

AKTIVITAS ANTIVIRUS EKSTRAK ETANOL DAUN BANDOTAN (*Ageratum conyzoides*) TERHADAP VIRUS NEWCASTLE DISEASE

ANTIVIRUS ACTIVITY OF BANDOTAN LEAVES (*Ageratum conyzoides*) ETHANOL EXTRACT AGAINST NEWCASTLE DISEASE VIRUS

Miftah Muhayaroh, Azis Saifudin*
Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
***E-mail: as151@ums.ac.id**

Abstrak

Virus *Newcastle disease* merupakan *avian paramyxovirus* yang bisa menyerang sistem pernapasan. ND memiliki protein HN (*hemagglutinin neuraminidase*) mengaglutinasi sel darah merah. Secara umum pengobatan antivirus diatasi dengan beberapa hal, seperti penggunaan tanaman herbal. *Ageratum conyzoides* termasuk tanaman herbal yang dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional masyarakat. *Ageratum conyzoides* mengandung senyawa kimia yaitu quercetin (flavonoid). Pada dosis sedang, daun bandotan dengan ekstrak etanol dapat menghambat aktivitas antivirus yang tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antivirus ekstrak etanol daun bandotan terhadap virus ND. *Ageratum conyzoides* diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut apa?. Uji antivirus dilakukan dengan metode uji hemaglutinasi. Hasil ekstraksi diinokulasikan ke dalam telur ayam berembrio (TAB) berumur 9-12 hari dan diinkubasi selama 3 hari. Sebanyak 12 telur ayam dibagi menjadi 4 kelompok (kontrol virus, 1µg/mL, 10µg/mL dan 100µg/mL). Selama proses inkubasi, dilakukan pengecekan telur untuk melihat kematian embrio. Hasil uji hemaglutinasi menunjukkan tidak adanya aktivitas antivirus dari ekstrak etanol daun bandotan yang ditandai dengan tidak terbentuknya dot pada sumuran mikroplate. Beberapa faktor yang menyebabkan kegagalan seperti, lama penyimpanan dan suhu. Pada lama penyimpanan akan sangat berpengaruh terhadap ekstrak daun bandotan karena semakin lama penyimpanan maka semakin banyak meningkatkan aktivitas mikroorganisme yang dapat menyebabkan kegagalan.

Kata Kunci: Newcastle Disease, ekstrak etanol, *Ageratum conyzoides*, antivirus, uji hemaglutinasi.

Abstract

Newcastle disease virus is an avian paramyxovirus that can attack the respiratory system. ND has the HN protein (hemagglutinin neuraminidase) agglutinating red blood cells. In general, antiviral treatment is treated with several things, such as the use of herbal plants. Ageratum conyzoides includes herbal plants that are used in traditional medicine. Ageratum conyzoides contains a chemical compound, namely quercetin (flavonoid). At moderate doses, bandotan leaves with ethanol extract show high antiviral treatment. This study aims to determine the antiviral activity of the ethanol extract of bandotan leaves against the ND virus. Ageratum conyzoides was extracted by maceration method. The extraction results were then inoculated into embryonated chicken eggs (TAB) aged 9-12 days and incubated for 3 days. A total of 12 chicken eggs were divided into 4 groups (viral control, 1µg/mL, 10µg/mL and 100µg/mL). During the incubation process, eggs are checked to see if the embryos die. The method used in this study was the hemagglutination test. The principle of the hemagglutination test is that there is a binding between the viral protein and the receptor on the surface of the erythrocytes. The results of the hemagglutination test

showed no antiviral activity from the ethanol extract of bandotan leaves which was characterized by the absence of dot formation in the microplate wells. Several factors caused failure such as storage time and temperature. The length of storage will greatly affect the bandotan leaf extract because the longer the storage, the more it increases the activity of microorganisms which ultimately results in failure.

Keywords: Newcastle Disease, ethanol extract, *Ageratum conyzoides*, antiviral, hemagglutination test

PENDAHULUAN

Virus *Newcastle disease* merupakan penyakit menular dengan tingkat kematian tinggi karena strain virulen *avian paramyxovirus* tipe 1 (APMV-1) hingga serotipe 9 (AMPV-9), genus *paramyxovirus* yang termasuk dalam famili *Paramyxoviridae* (Ganar *et al.*, 2014). *Newcastle disease* dapat menyerang pada sistem pernafasan, pencernaan, dan saraf. Pola penyebaran dan penularan yang cepat berdampak pada kerugian ekonomi yang besar pada bidang perunggasan (Hodder *et al.*, 1994) dan bisa menginfeksi manusia walaupun tingkat kejadiannya sedikit (Abdisa and Tagesu, 2017). *Newcastle Disease Virus* (NDV) menyerang permukaan sel dengan cara mengenali dan mengikat molekul yang mengandung asam sialat seperti glikoprotein dan glikolipid. Virus ini memiliki protein HN (*hemagglutinin neuraminidase*) mengaglutinasi sel darah merah (De-Leeuw and Peeters, 1999).

Secara umum pengobatan antivirus diatasi dengan beberapa hal, seperti penggunaan tanaman herbal. Pada tanaman herbal memiliki ketahanan yang lebih lemah daripada obat-obatan kimia tradisional karena berbagai senyawa yang dikandungnya. (Jin *et al.*, 2017). Tanaman herbal sering dimanfaatkan sebagai agen antivirus karena kandungan komponen seperti alkaloid, terpenoid, flavonoid, kumarin, dan antrakuinon yang tinggi. Mekanisme aksi dari komponen tersebut adalah dengan membunuh virus atau mempengaruhi replikasi dari virus tersebut (Bakari *et al.*, 2012). Tanaman herbal banyak digunakan karena mudah ditemukan disekitaran masyarakat, aman dan efektif dalam pengobatan.

Tanaman bandotan adalah salah satu jenis tanaman herbal yang tumbuh liar di seluruh wilayah Indonesia. Tanaman bandotan (*Ageratum conyzoides*.) termasuk tanaman yang dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional masyarakat, diantaranya daun dan batang yang masih muda, yang biasa dikonsumsi untuk obat panas, radang, malaria, radang paru-paru, pendarahan rahim, maag, kontrasepsi, dll. tumor rahim digunakan (Kusuma & Zaky, 2005). Tanaman bandotan tidak sulit dicari karena ada di ladang, kebun, pekarangan, dan pinggir jalan. Tinggi tanaman 10-120 cm, batang tegak atau sujud, berdaun tunggal dan berbentuk kubus, dengan bentuk bulat bergerigi dan ujung runcing (Bamidele *et al.*, 2010).

Seluruh bagian tanaman bandotan dapat dimanfaatkan sebagai obat. Daun bandotan mengandung senyawa kimia yaitu quercetin (flavonoid), triterpenoid (terpenoid), eugenol (minyak atsiri), dan saponin (Egi & Dianiatik, 2010). Penelitian Kotta (2020) menemukan bahwa daun bandotan memiliki sifat antipiretik. Tanaman bandotan memiliki sifat antipiretik (penurun demam) karena mengandung komponen flavonoid (Kotta *et al.*, 2020). Daun bandotan juga bisa digunakan untuk mengobati batuk. Pada dosis sedang, daun bandotan dengan ekstrak etanol menunjukkan perlakuan antivirus yang tinggi (Kasrina *et al.*, 2021). Selain itu, penelitian Achuwa (2006) melaporkan bahwa daun bandotan (*Ageratum conyzoides*) dengan menggunakan ekstrak kloroform mampu mengambat pertumbuhan virus *Newcastle disease*, dengan berbagai

konsentrasi yang menunjukkan semakin tinggi konsentrasi semakin besar pula penghambatan terhadap pertumbuhan virus.

Berdasarkan pada data di atas, dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah daun bandotan memiliki efek antivirus dengan menggunakan ekstrak yang berbeda dengan penelitian sebelumnya yaitu dengan menggunakan ekstrak etanol terhadap virus *Newcastle disease*.

METODE

Alat

Alat dalam penelitian yaitu *buncher*, *rotary evaporator* (Stuart RE300B), spuit injeksi 1 mL, microplate dasar U, mikropipet (Socorex), LAF (Laminar Air Flow), inkubator (Nuair TM IR autoflow), autoklaf (spesifikasi), sentrifugator (Hettich Mikro 200 R).

Bahan

Bahan pada penelitian adalah TAB (telur ayam berembrio) usia 9 hari yang diperoleh dari peternak di daerah Boyolali. Bahan lainnya meliputi vaksin aktif Medivac ND La Sota, daun bandotan (*Ageratum conyzoides*) yang diperoleh dari kota Bengkulu, DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) for synthesis, etanol 96% teknis, kertas saring, PBS (*Phosphate Buffer Saline*), eritrosit ayam, EDTA (*Ethylene diamine tetra acetic acid*), antibiotik ampisilin (*Ampicillin sodium salt Sigma*), antibiotik streptomisin (*Streptomycin sulfate salt Sigma*), WFI (*Water for injection*), dan aluminium foil.

Jalannya Penelitian

Ekstraksi

Daun bandotan (*Ageratum conyzoides*) sebanyak 3kg dibersihkan dan dikeringkan selama 2 hari. Sebanyak 200 g daun bandotan dimaserasi dengan menggunakan 2 liter etanol 96% (1:10) 2x24 jam. Dilakukan remaserasi selama 1 hari menggunakan 550 ml etanol. Setelah maserasi selama 3 hari, disaring dengan saringan dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporatory* hingga menjadi ekstrak kental (Harianingsih et al., 2017). Hasil ekstrak digunakan untuk uji aktivitas terhadap virus Newcastle disease.

Preparasi Antibiotik

Antibiotik ampisilin 1000 mg dan streptomisin 1000 mg masing-masing dilarutkan dalam 5 ml WFI hingga larut lalu dicampur.

Persiapan sampel

Larutan stok ekstrak etanol daun bandotan dibuat dengan melarutkan 10 mg ekstrak kental dalam 10 ml DMSO hingga konsentrasi 1 mg/ml. Pengenceran seri konsentrasi dibuat dengan mengambil 1 µl, 10 µl dan 100 µl. Masing-masing senyawa kemudian dilarutkan dalam 1 mL konsentrasi target DMSO 1 µg/mL, 10 µg/mL, dan 100 µg/mL. Sebanyak 0,3 ml antibiotik ditambahkan pada masing-masing konsentrasi diinkubasi dengan temperatur 37°C selama 30 menit untuk memaksimalkan efek antibiotik (Setyasari, 2007).

Preparasi Virus ND

Vaksin aktif Medivac ND La Sota sebanyak 500 dosis dalam bentuk padat kering diperoleh dari toko unggas di dekat Kartasura. Vaksin disimpan pada suhu -4°C. 500 dosis vaksin dilarutkan dalam 10 ml PBS sehingga 1 ml vaksin memuat 50 dosis atau 500 virus ND. Untuk menghindari kontaminasi bakteri, maka ditambahkan 0,3 ml antibiotik ampisilin dan 0,3 ml antibiotik streptomisin diinkubasi dengan temperatur 37°C selama 60 menit untuk memaksimalkan efek antibiotik.

Persiapan telur uji

Telur ayam berembrio kemudian diinkubasi dengan suhu 37oC menggunakan inkubator hingga berumur 9-12 hari dengan memastikan telur memiliki ukuran dan bentuk yang sama. Telur ayam berembrio dibalik sehari dua kali. Sebelum dilakukan injeksi, telur di candling kembali untuk memastikan fertilitas dari embrio dengan memeriksa menggunakan lampu untuk

memastikan embrio masih hidup di dalam telur. Fertilitas embrio dibuktikan dengan adanya pergerakan dan pembuluh darah yang terdapat di dalam telur (Ayu and Kencana, 2017). Telur diberi tanda pada bagian rongga udara secara melingkar menggunakan spidol. Tempat injeksi dipastikan tidak mengenai pembuluh darah yang terdapat di dalam telur

Preparasi suspensi eritrosit 1%

Eritrosit ayam diperoleh dari rumah potong ayam di area kampus UMS. Sel darah merah diletakkan ke tabung PCR 1,5 ml yang berisi EDTA 20 mg sebagai antikoagulan. Plasma dipisahkan dari darah dengan cara sentrifugasi selama 15 menit pada 3000 rpm. Plasma (supernatan) dibuang dan eritrosit yang mengendap dicuci tiga kali dengan PBS untuk mendapatkan konsentrasi eritrosit 100%. Suspensi eritrosit 1% dibuat dengan perbandingan eritrosit terhadap PBS yaitu 1:99 atau 1 tetes eritrosit ditambah 99 tetes PBS (Fitrawati *et al.*, 2017).

Inokulasi Sampel dan Virus ke dalam ruang alantois

Sterilisasi dilakukan untuk semua alat yang tahan panas tinggi dengan menggunakan oven dengan temperatur 170°C selama 1 jam dan autoclave dengan temperatur 120°C selama 20 menit untuk alat yang tidak tahan panas tinggi. Cangkang telur kemudian dibersihkan dan dikeringkan dengan LAF menggunakan kapas dan tisu basah yang tidak mengandung alkohol. Dibuat lubang di bagian atas cangkang telur di are yang terdapat rongga udara dengan menggunakan bor khusus. Prosedur inokulasi sampel dan virus dilakukan dengan memasukkan jarum suntik 1 ml digunakan untuk menyuntikkan sampel. Tempatkan jarum secara vertikal dan perlahan masukkan jarum melalui lubang di telur. Masukkan kurang dari 16 mm mesh ke dalam telur untuk mencapai ruang allantois.

Pada kelompok uji, masing-masing sampel diinjeksikan ke dalam allantoic chamber dengan variasi konsentrasi yang telah ditentukan sebagai berikut:

1. Kelompok 1 hingga 0,2 ml ekstrak kental pada konsentrasi 1 µg/ml + 0,2 ml suspensi virus yang diberi antibiotik
2. Kelompok 2 hingga 0,2 ml ekstrak kental dengan konsentrasi 10 µg/ml + 0,2 ml suspensi virus saat diberi antibiotik
3. Kelompok 3 hingga 0,2 ml ekstrak kental pada konsentrasi 100 µg/ml + 0,2 ml suspensi virus yang diberi antibiotik
4. Kelompok 4 adalah kontrol negatif yang disuntik hingga 200 L vaksin virus penyakit Newcastle yang dibubuhi antibiotik dalam 3 butir telur tanpa terapi campuran.

TAB yang telah diproses ditutup lubangnya dengan selotip untuk menghindari kontaminasi. TAB diinkubasi 3 x 24 jam dengan temperatur 37°C kemudian dinyalakan 1 x 24 jam. Embrio yang mati setelah kurang dari 24 jam dibuang, sedangkan embrio yang mati selama inkubasi 2 x 24 jam ditempatkan dalam lemari es pada suhu 4 °C. Embrio yang masih hidup sampai masa inkubasi 3 x 24 jam dikorbankan dengan cara dimasukkan ke dalam lemari pendingin semalaman untuk mencegah perdarahan selama pengumpulan allantoic. Pendinginan juga dikatakan mempermudah asimilasi cairan alantois sebagai bahan uji hemaglutinasi (Ashraf *et al.*, 2017).

Uji Hemaglutinasi

Uji hemaglutinasi dilakukan untuk menghitung titer virus ND menggunakan pelat mikrotiter U 96-sumur. 50 µl larutan PBS ditambahkan ke semua sumur bernomor 1-12. Selanjutnya, 50 µl cairan alantoat yang mengandung senyawa dan virus ditambahkan ke sumur pertama. PBS dan cairan alantoat diresuspensi dengan mikropipet ± 5 kali, kemudian diambil 50 µl dan dipindahkan ke sumur 2 dan seterusnya hingga sumur ke-12. Langkah ini juga dilakukan untuk sumur yang hanya mengandung virus. Sebanyak 50 µl suspensi eritrosit ditambahkan ke semua sumuran, plate dikocok hingga tercampur rata. Mikroplate dibiarkan dengan temperatur ruang selama 15-20 menit dan diamati aktivitas hemaglutinasinya (Diniatik *et al.*, 2011).

Teknik Analisis Data

Data dianalisis dengan melihat titik akhir dan ditentukan sebagai titer hemaglutinasi cairan alantois. Titik akhir adalah jumlah pengenceran tertinggi terkecil yang masih dapat menunjukkan reaksi hemaglutinasi. Pengamatan dilakukan di sumur lempeng mikro dan dihitung persentase penghambatannya.

Persamaan presentase penghambatan:

$$P = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

P = persentase penghambat infeksi

A = jumlah titer pada telur ayam berembrio tanpa perlakuan senyawa (kelompok kontrol)

B = jumlah titer pada telur ayam berembrio dengan perlakuan senyawa (kelompok perlakuan)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Daun Bandotan (*Ageratum conyzoides*)

Hasil ekstraksi 200 gram herba bandotan diperoleh ekstrak kental sebanyak 8,22 gram (rendemen 4,11%). Ekstrak yang dihasilkan sangat kental dan memiliki warna hijau kehitaman. Proses ekstraksi bertujuan untuk menarik kandungan kimia dalam suatu tanaman. Daun bandotan (*Ageratum conyzoides*) mengandung minyak atsiri dan kandungan senyawa lainnya yang tidak stabil akan pemanasan. Metode maserasi dilakukan karena dapat digunakan untuk senyawa yang bersifat termostabil (Harborne, 1996). Pada penelitian ini menggunakan etanol sebagai pelarut dalam ekstraksi. Pelarut yang digunakan didasarkan pada kemampuan melarutkan kandungan kimia sehingga dalam pemilihan cairan pelarut harus dipertimbangkan sesuai syarat kefarmasian (*Pharmaceutical grade*) (Depkes RI, 2000). Etanol merupakan pelarut yang memiliki sifat polar karena etanol termasuk alkohol primer dengan 1 gugus hidroksil dan gugus alkil yaitu etil etanol sehingga dapat membentuk ikatan hydrogen dengan air (Loekitowati, 2003).

Dalam proses ekstraksi, daun bandotan (*Ageratum conyzoides*) dipekatkan dengan *rotary evaporator*. *Rotary evaporator* dapat menghilangkan komponen yang mudah menguap dengan cara vakum dan rotasi. Ekstrak disimpan dalam botol kaca yang dilapisi aluminium foil di dalam suhu ruang atau di dalam lemari pendingin. Stabilitas ekstrak yang disimpan pada suhu 40C atau 21 °C menunjukkan hasil yang lebih baik daripada penyimpanan dalam suhu ruang (Mehdizadeh *et al.*, 2017).

Inokulasi virus dan injeksi senyawa

Uji aktivitas virus Newcastle Disease dilakukan pada TAB berumur 9-11 hari yang diperoleh dari perternakan di Sragen. TAB yang digunakan merupakan TAB berusia 9 hari karena sudah terdapat perkembangan embrio, adanya cairan alantois dan pembuluh darah mulai berkembang. Semakin tua usia embrio, maka akan terjadi perkembangan embrio yang semakin besar sehingga ruang cairan alantois akan menyusut sehingga pada usia 11 hari sudah mulai menyusut (Poultry Hub, 2022). Telur ayam berembrio dipilih sebagai media penelitian karena mudah diperoleh, relatif bebas dari mikroorganisme patogen, dan peka terhadap infeksi virus ND (Ayu and Kencana, 2017).

Rute dan umur embrio ditentukan oleh karakteristik dan sifat virus terhadap membran yang berada dalam telur (Burlenson *et al.*, 1992). Cairan alantois merupakan media yang sesuai untuk perkembangan virus Newcastle (Fidyah *et al.*, 2015). Selain itu inokulasi virus melalui rute alantois termasuk aman karena tidak menimbulkan banyak kematian pada embrio (Murtini *et al.*, 2006). Inokulasi virus dan injeksi senyawa jalur alantois akan menyebabkan senyawa tersebut berdifusi menuju cairan amnion dan diserap oleh embrio melalui trakea sehingga meminimalkan efek toksik dari senyawa (Jochemsen and Jeurissen, 2002). Berdasarkan pengamatan keadaan embrio setelah inokulasi selama 3x24 jam, tidak terdapat kematian embrio pada ketiga konsentrasi dan kontrol virus.

Tabel 1. Pengamatan kematian embrio setelah inokulasi virus ND dan variasi konsentrasi ekstrak etanol daun bandotan

Kelompok Perlakuan	Kematian Embrio				% Kematian
	0 jam	24 jam	48 jam	72 jam	
Konsentrasi 1 µg/mL	0/3	0/3	0/3	0/3	0%
Konsentrasi 10 µg/mL	0/3	0/3	0/3	0/3	0%
Konsentrasi 100 µg/mL	0/3	0/3	0/3	0/3	0%
Kontrol virus	0/3	0/3	0/3	0/3	0%

Pada penelitian ini virus yang digunakan dalam penelitian adalah vaksin virus aktif Medivac ND La Sota. Vaksin ND La Sota merupakan vaksin yang berisi virus Newcastle aktif strain lentogenik sehingga tidak menyebabkan kematian dalam waktu kurang dari 90 jam (Abdisa and Tagesu, 2017). Virus ND memiliki karakteristik peka terhadap panas sehingga akan mati pada suhu 50 °C, tetapi dapat bertahan pada suhu 37 °C selama 1 minggu (Pudjiatmoko *et al.*, 2014). Hal tersebutlah yang menjadi dasar sebagai pemilihan suhu dan tempat yang optimal agar virus ND dapat berkembang dengan baik. Pada penelitian ini juga digunakan antibiotik untuk mencegah kontaminasi yang dapat mengganggu hasil uji antivirus. Kombinasi antibiotik ampisilin dan streptomisin digunakan karena ampisilin aktif terhadap bakteri gram positif, sedangkan streptomisin aktif terhadap bakteri gram negatif. Harapannya, dengan menggunakan kombinasi tersebut dapat mencegah kemungkinan munculnya kontaminasi dari berbagai jenis bakteri. Sehingga dari data di atas menghasilkan bahwa TAB yang telah di inkubasi dengan suhu 37 °C setelah inokulasi dalam waktu 3x24 jam tidak menyebabkan kematian embrio.

Hasil Uji Hemaglutinasi

Virus Newcastle memiliki protein neurominidase yang dapat membantu pelepasan virus dari sel inang dan mempengaruhi waktu yang dibutuhkan virus untuk melulusi eritrosit (Pudjiatmoko *et al.*, 2014). Apabila tidak terdapat virus, maka eritrosit akan mengalami presipitasi akibat gaya berat yang akan membentuk suatu dot atau titik merah pada sumuran. Namun, adanya virus akan mengakibatkan penggumpalan eritrosit yang mengarah pada pembentukan lattice atau kekeruhan karena terdapat interaksi protein hemaglutinin dari virus dengan eritrosit (Ryu, 2017). Interaksi ikatan antara eritrosit dengan virus berlangsung sementara. Oleh karena itu, terdapat waktu optimum inkubasi plat uji hemaglutinasi yaitu pada rentang 15-25 menit (Diniatik *et al.*, 2011).

Tabel 2. Efek perbedaan penggunaan larutan DMSO 100% dan DMSO 5% terhadap adanya kontaminasi pada pertumbuhan virus dalam percobaan

Penambahan DMSO pada ND virus	Efek terhadap munculnya kontaminasi
100% (pada percobaan kedua)	Tidak ada kontaminasi
5% (pada percobaan pertama)	Adanya kontaminasi

Perbandingan hasil uji hemaglutinasi dengan perbedaan larutan seri konsentrasi menghasilkan faktor pengaruh kegagalan pada perlakuan pertama dengan menggunakan DMSO 5%. Didasarkan pada tabel 2 menunjukkan bahwa virus yang ditambahkan ke dalam larutan DMSO (dimetil sulfoksida) 5% telah terkontaminasi. Tidak ada kontaminasi virus yang ditambahkan ke dalam larutan 100% DMSO (dimethyl sulfoxide). Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan 5% DMSO (dimethyl sulfoxide) sebagai pelarut bereaksi terhadap perubahan struktur yang menyebabkan pembusukan pada telur sehingga dalam pengambilan cairan sulit

karena semua isi di dalam telur berwarna sangat keruh, sedangkan penggunaan 100% DMSO sebagai pelarut tidak menyebabkan pembusukan pada telur. Penggunaan DMSO 100% sebagai pelarut dan juga tidak memiliki aktivitas antivirus. Data tersebut didukung dari beberapa penelitian yang menunjukkan tidak adanya penghambatan terhadap proliferasi virus Avian Influenza maupun virus ND (Johari *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2017; Sormpet *et al.*, 2017). Oleh karena itu, pelarut DMSO tidak berpotensi dalam mengganggu aktivitas antivirus yang dihasilkan oleh senyawa sintesis.

Tabel 3. Hasil Uji Hemaglutinasi pada Kelompok 1 dan 2

Perlakuan	Sumuran												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Kelompok 1 (Virus ND + ekstrak daun bandotan konsentrasi 1 µg/mL)	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Kelompok 2 (Virus ND + ekstrak daun bandotan konsentrasi 10 µg/mL)	D	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	E	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	F	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Keterangan :

X : terjadi hemaglutinasi

• : tidak terjadi hemaglutinasi

Tabel 4. Hasil Uji Hemaglutinasi Pada kelompok 3 dan 4

Perlakuan	Sumuran												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Kelompok 3 (Virus ND + ekstrak daun bandotan konsentrasi 100 µg/mL)	A	X	•	•	X	•	•	•	X	X	•	X	X
	B	•	X	X	X	X	X	X	X	•	X	X	X
	C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Kelompok 4 (Virus ND sebagai kontrol virus)	D	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	E	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	F	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Keterangan :

X : terjadi hemaglutinasi

• : tidak terjadi hemaglutinasi

Berdasarkan hasil percobaan kedua pada Tabel 3 dan 4, menunjukkan bahwa konsentrasi 1 µg/ml dan 10 µg/ml tidak memiliki aktivitas hemaglutinasi. Hasil pengujian pada Tabel 4 menunjukkan aktivitas penghambatan palsu pada 100 µg/mL karena yang dihasilkan tidak terlalu jelas. Hal ini karena sel darah merah yang digunakan sudah tidak segar sehingga menyebabkan penggumpalan darah. Untuk mencegah eritrosit rusak, perlu mengumpulkan eritrosit langsung dari ayam yang disembelih. Dilakukan penambahan EDTA ke sel darah merah segar dan segera lakukan sentrifugasi darah. Selanjutnya, dilakukan perlakuan lagi pada konsentrasi 100 µg/mL dengan menggunakan eritrosit yang segar menunjukkan tidak ada terjadinya dot sehingga tidak ada penghambatan aktivitas hemaglutinasi.

Tabel 5. Hasil Titer daya hambat antivirus ekstrak etanol daun bandotan

Replikasi ke-	Hasil Titer HA Tiap Kelompok Perlakuan			
	Kontrol virus	Konsentrasi 1 µg/mL	Konsentrasi 10 µg/mL	Konsentrasi 100 µg/mL
	Titer	Titer	Titer	Titer
1	2 ¹²	2 ¹²	2 ¹²	2 ¹²
2	2 ¹²	2 ¹²	2 ¹²	2 ¹²
3	2 ¹²	2 ¹²	2 ¹²	2 ¹²

Tabel 6. Hasil persentase daya hamabat antivirus ekstrak etanol daun bandotan
Persentase Daya Hambat Virus (%)

Kelompok Perlakuan	Persentase Daya Hambat Virus (%)			
	1	2	3	$\bar{x} \pm SD$
Kontrol virus	0,00	0,00	0,00	0,00 \pm 0,00
Konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$	0,00	0,00	0,00	0,00 \pm 0,00
Konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$	0,00	0,00	0,00	0,00 \pm 0,00
Konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$	0,00	0,00	0,00	0,00 \pm 0,00

Secara khusus, penggunaan daun Bandotan (*Ageratum conyzoides*) sebagai antivirus *Newcastle disease* dapat diketahui dengan menguji ekstrak tumbuhan yang mencegah pertumbuhan virus. Hal tersebut terlihat dari hasil titer yang diperoleh pada Tabel 5 menunjukkan bahwa ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides*) tidak memiliki aktivitas antivirus terhadap *Newcastle disease*. Titer virus hemaglutinasi dihitung dengan melihat *end point* dari masing-masing kelompok. Rata-rata jumlah titer pada kelompok 1, 2, dan 3 adalah 2^{12} . Sehingga pada hasil dari Tabel 5 dapat dimanfaatkan untuk menghitung persen inhibisi pada Tabel 6. Dari perhitungan pada Tabel 6 terlihat konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ dan 100 $\mu\text{g/mL}$ mencapai 0% di semua perlakuan, oleh karena itu tidak mungkin untuk mengetahui apakah hasilnya efektif atau tidak seperti yang terlihat, tidak ada penghambatan virus penyakit *Newcastle disease*.

Virus *Newcastle disease* termasuk *family Paramyxovirid* yang mengandung sejumlah virus yang menyebabkan penyakit saluran pernapasan pada manusia (Simoes, 2010). Tidak ada vaksin berlisensi atau pengobatan antivirus yang efektif yang tersedia untuk virus ini (Carrillo *et. al*, 2012; Moss, 2012; Parker, 2006). *Paramyxovirus* merupakan avian pneumovirus (AMPV) yang terdapat di unggas yang diusulkan dari HMPV, dan ada di avian *Newcastle disease virus* (NDV) (Goebel, 2007). Sehingga pada data di atas, penelitian ini dilakukan penambahan perlakuan kontrol positif pada percobaan ketiga. Kontrol positif yang digunakan adalah antivirus Favipiravir. Favipiravir (T-705; 6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinecarboxamine) adalah turunan pirazina yang telah menunjukkan aktivitas antivirus yang kuat terhadap beberapa virus RNA (Middleton, 2012). Enzim inang intraseluler bekerja pada T-705, mengubahnya menjadi bentuk aktifnya, T-705-4- ribofuranosyl-5-triphosphate (T-705RTP). T-705 saat ini dalam pengembangan klinis sebagai penghambat virus influenz. Virus influenzer termasuk *family Paramyxovirid* (Naesens, 2013).

Penggunaan kontrol positif pada percobaan ketiga mengalami kegagalan dalam menghambat aktivitas antivirus saat hasil uji hemaglutinasi Faktor pada perlakuan kontrol positif antivirus favipiravir mengalami kegagalan dipengaruhi oleh ketidakmurnian obat yang digunakan. Oleh karena itu, obat favipiravir diganti dengan obat antivirus yang lain seperti ribavirin. Namun, pengujian obat ribavirin mengalami kendala berupa kesulitan untuk mendapatkan obat tersebut di wilayah Surakarta. Sehingga dalam penelitian ini, untuk kontrol positif tidak bisa digunakan untuk perbandingan dengan hasil uji hemaglutinasi pada konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$.

Faktor-faktor lainnya, terjadi penghambatan pada penelitian ini yaitu Lama penyimpanan dan suhu penyimpanan juga dapat mempengaruhi hasil. Pada ekstrak daun bandotan penyimpanan yang dilakukan pada suhu ruang 26-28 karena semakin rendah suhu penyimpanan, maka ada kecenderungan kadar air semakin besar (Asagar dan Rahayu, 2014) dan pada lama penyimpanan akan sangat berpengaruh terhadap ekstrak daun bandotan karena semakin lama penyimpanan maka semakin banyak meningkatkan aktivitas mikroorganisme yang pada akhirnya mengakibatkan kebusukan atau kegagalan (kusuma, 2017). Hal ini sesuai, dengan penelitian Mengkido *et al.* (2019) bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides*), daya hambatnya semakin besar.

Penelitian ini semakin sedikit menghambat atau bahkan sama sekali tidak bisa menghambat pertumbuhannya. Dengan begitu virus ini tumbuh dan berkembang biak sebanyak mungkin.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun Bandoani (*Ageratum conyzoides*) tidak menunjukkan aktivitas antivirus terhadap virus Newcastle disease.

DAFTAR PUSTAKA

- Achuwa, S. N. (2006). Uji Daya Antiviral Ekstrak Kloroform Daun Bandoani (*Ageratum conyzoides* Lour) terhadap Infeksi Virus Newcastle Disease (ND) pada telur Ayam Berembrio. *Skripsi*, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Alexander, D. J., Aldous, E. W., & Fuller, C. M. (2012). The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathology*, 41(4), 329–335. <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.697991>
- Ashraf, A., Ashraf, M. M., Rafiqe, A., Aslam, B., Galani, S., Zafar, S., Asad, F., Asghar, R. D., Akram, S., Ahmed, H., Shah, S. M. A., & Asif, R. (2017). In vivo antiviral potential of *Glycyrrhiza glabra* extract against Newcastle disease virus. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(2), 567–572.
- Ayu G. and Kencana Y., 2017, Modul Training Cara Mengisolasi Virus dan mengidentifikasi, Denpasar, pp. 13–21.
- Bamidele, O., Akinnuga, A. M., Anyakudo, M. M. C., Ojo, O. A., Ojo, G. B., Olorunfemi, J. O., & Johnson, O. P. (2010). Haemostatic effect of methanolic leaf extract of *Ageratum conyzoides* in albino rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(20), 2075–2079.
- Burleson, Thomas, & Danny. (1992). *Virology, a laboratory manual*. Academic Press.
- Carrillo-Santistevan P, Lopalco PL. 2012. Measles still spreads in Europe: who is responsible for the failure to vaccinate. *Clin Microbiol Infect* 18 (Suppl 5):S50 –S56. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03982.x>.
- Dewi, 2007. Deteksi Virus avian Influenza Subtipe H5 pada Kucing jalanan (*Felis silvestris catus*) di Wilayah Kota Bandung. Bandung: FKH Universitas Airlangga.
- Diniatik, K, A. M., & Purwaningrum, O. (2011). Uji Aktivitas Antivirus Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruitz & Pav) Terhadap Virus Newcastle Disease (Nd) Dan Profil Kromatografi Lapis Tipisnya. 08(01), 51–70.
- Egi, & Diniatik. (2010). Aktivitas Antivirus Ekstrak Etanol Daun Bandoani (*Ageratum conyzoides* L.) Terhadap Virus Newcastle Disease Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis.
- Fitrawati, F., Haryadi W. M., Amanu, S., Sutrisno, B., (2017). Isolasi dan Identifikasi Egg Drop Syndrome Virus dengan Uji Hemaglutinasi dan Hemaglutinasi Inhibisi Isolation and Identification of Egg Drop Syndrome Virus with Hemagglutination and Hemagglutination Tests 1 1 1 1. *Jurnal Sain Veteriner*, 33(1), 59–68.
- Ganar, K., Das, M., Sinha, S., & Kumar, S. (2014). Newcastle disease virus: Current status and our understanding. *Virus Research*, 184, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.02.016>
- Goebel SJ, Taylor J, Barr BC, Kiehn TE, Castro-Malaspina HR, Hedvat CV, Rush-Wilson KA, Kelly CD, Davis SW, Samsonoff WA, Hurst KR, Behr MJ, Masters PS. 2007. Isolation of avian paramyxovirus 1 from a patient with a lethal case of pneumonia. *J Virol* 81:12709–12714. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01406-07>.
- Harianingsih, Wulandari R., Harliyanto C. and Andiani C.N., 2017, Identifikasi GC-MS Ekstrak Minyak Atsiri dari Sereh Wangi (*Cymbopogon winterianus*) Menggunakan Pelarut Metanol, *Techno*, 18(1), 23-27.

- Jin, Y. H., Choi, J. G., Cho, W. K., & Ma, J. Y. (2017). Ethanolic extract of melia fructus has anti-influenza a virus activity by affecting viral entry and viral RNA polymerase. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 2–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00476>
- Kasrina, K., Zukmadini, A. Y., Laily, F. A. B., & Rahmi, S. (2021). Medicinal Plants Diversity in Traditional Treatment of Rejang Ethnic Communities in Rejang Lebong Regency as a Resource for Learning Plant Taxonomy. *Proceedings of the International Conference on Educational Sciences and Teacher Profession (ICETeP 2020)*, 532(532), 275–282. <https://doi.org/10.2991/assehr.k.210227.048>
- Kotta, J. C., Lestari, A. B. S., Candrasari, D. S., & Hariono, M. (2020). Medicinal Effect, in Silico Bioactivity Prediction, and Pharmaceutical Formulation of *Ageratum conyzoides* L.: A Review. *Scientifica*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6420909>
- Kusuma & Zaky. (2005). *Tumbuhan Liar Berkhasiat Obat*. Agromedia Pustaka.
- Mengkido, M., Orryani L., & Harso, W (2019). Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Bantotan (*Ageratum conyzoides*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aerus*. Sulawesi Tengah. Universitas Tadulako.
- Moss WJ, Griffin DE. 2012. Measles. *Lancet* 379:153–164. [http://dx.doi.org/10.1016/S01406736\(10\)62352-5](http://dx.doi.org/10.1016/S01406736(10)62352-5).
- MS, Middleton D, McCall B, Field H, Wang LF. 2012. Hendra virus: an emerging paramyxovirus in Australia. *Lancet Infect Dis* 12:799–807. [http://dx.doi.org/10.1016/S14733099\(12\)701585](http://dx.doi.org/10.1016/S14733099(12)701585)
- Nair H, Simoes EA, Rudan I, Gessner BD, Azziz-Baumgartner E, Zhang JS, Feikin DR, Mackenzie GA, Moisi JC, Roca A, Baggett HC, Zaman SM, Singleton RJ, Lucero MG, Chandran A, Gentile A, Cohen C, Krishnan A, Bhutta ZA, Arguedas A, Clara AW, Andrade AL, Ope M, Ruvinsky RO, Hortal M, McCracken JP, Madhi SA, Bruce N, Qazi SA, Morris SS, El Arifeen S, Weber MW, Scott JA, Brooks WA, Breiman RF, Campbell H, Severe Acute Lower Respiratory Infections Working Group. 2013. Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *Lancet* 381:1380–1390. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61901-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61901-1)
- Naesens L, Guddat LW, Keough DT, van Kuilenburg AB, Meijer J, Vande Voorde J, Balzarini J. 2013. Role of human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase in activation of the antiviral agent T-705 (favipiravir). *Mol Pharmacol* 84:615–629. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.113.087247>
- Setyasari R., 2007, Efek Ekstrak Etanol Rimpang Temu Mangga (*Curcuma mangga Val.*) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. dan Virus Newcastle Disease, Terdapat di: <http://eprint.ums.ac.id/id/eprint/16878>.
- Parker AA, Staggs W, Dayan GH, Ortega-Sanchez IR, Rota PA, Lowe L, Boardman P, Teclaw R, Graves C, LeBaron CW. 2006. Implications of a 2005 measles outbreak in Indiana for sustained elimination of measles in the United States. *N Engl J Med* 355:447–455. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa060775>