

## AKTIVITAS ANTIVIRUS EKSTRAK ETANOL BAWANG PUTIH (*Allium sativum* L.) TERHADAP MODEL NEWCASTLE DISEASE

### ANTIVIRUS ACTIVITY OF GARLIC ETHANOL EXTRACT (*Allium sativum* L.) AGAINST NEWCASTLE DISEASE MODEL

Sania Nur Azizah, Azis Saifudin\*  
Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta  
\*E-mail: [as151@ums.ac.id](mailto:as151@ums.ac.id)

#### Abstrak

Bahan alam, baik sebagai senyawa murni atau ekstrak dari tanaman memberikan peluang sebagai agen antivirus. Bawang putih merupakan tanaman herba yang dikonsumsi di seluruh dunia yang memiliki kandungan senyawa aktif di dalamnya yang telah diteliti memiliki aktivitas farmakologi seperti antibakteri, antivirus, antijamur, antiprotozoal, antioksidan, antiinflamasi, antikanker. Senyawa aktif dalam bawang putih yang dilaporkan berperan besar sebagai antivirus yaitu ajoene, alisin, alil metil thiosulfinat, dan metil alil thiosulfinat. Penelitian bertujuan untuk mengetahui aktivitas antivirus ekstrak etanol bawang putih terhadap model *Newcastle Disease*. Uji antivirus dilakukan dengan media telur ayam berembrio (TAB) usia 9-12 hari yang diinokulasi virus aktif ND La Sota dan ekstrak etanol bawang putih dengan variasi konsentrasi 1 µg/mL, 10 µg/mL, dan 100 µg/mL dengan metode *in ovo*. Validitas uji didasarkan atas hidupnya virus yang tampak adanya kejernihan pada larutan kultur pasca perlakuan. Aktivitas antivirus dievaluasi menggunakan uji hemaglutinasi dengan bahan uji cairan alantois yang sudah dipanen untuk mendapatkan titer virus yang digunakan untuk menghitung persen penghambatan virus. Hasil menunjukkan bahwa tidak adanya aktivitas antivirus pada ekstrak dengan variasi konsentrasi 1 µg/mL, 10 µg/mL, dan 100 µg/mL dengan persen penghambatan virus ketiga seri konsentrasi 0%.

**Kata Kunci:** Bawang putih, antivirus, uji hemaglutinasi, *Newcastle Disease*

#### Abstract

*Natural ingredients, either as pure compounds or extracts from plants provide opportunities as antiviral agents. Garlic is a herbaceous plant consumed throughout the world that contains active compounds in it that have been studied to have pharmacological activities such as antibacterial, antiviral, antifungal, antiprotozoal, antioxidant, anti-inflammatory, anticancer. Active compounds in garlic that are reported to play a major role as antivirals are ajoene, alisin, allyl methyl thiosulfinate, and methyl allyl thiosulfinate. The study aimed to determine the antiviral activity of garlic ethanol extract against the Newcastle Disease model. Antiviral tests were conducted with embryonic chicken egg media (TAB) aged 9-12 days inoculated with active ND La Sota virus and garlic ethanol extract with variations in concentrations of 1 µg / mL, 10 µg / mL, and 100 µg / mL with the in ovo method. The validity of the test is based on the life of the virus which appears to have clarity in the post-treatment culture solution. Antiviral activity was evaluated using a hemagglutination test with harvested alantois liquid test material to obtain a viral titer used to calculate percent virus inhibition. The results showed that there was no antiviral activity in extracts with concentration variations of 1 µg/mL, 10 µg/mL, and 100 µg/mL with percent inhibition of the third virus concentration series of 0%.*

**Keywords:** Garlic, antiviral, hemagglutination test, *Newcastle Disease*.

## PENDAHULUAN

Virus merupakan parasit obligat yang membutuhkan sel inang untuk bertahan hidup dan replikasi genomnya (Cheng *et al.*, 2014). Virus memiliki kesatuan struktur yang terdiri dari protein dan asam nukleat DNA atau RNA (Taylor, 2014). Pada awal tahun 2020, dunia gempar karena merebaknya jenis virus baru yaitu SARS-CoV-2 yang menyerang sistem respirasi manusia yang merupakan jenis virus RNA (Hayya, 2021). Dalam strategi mencari agen antivirus baru, terutama untuk jenis virus RNA, maka digunakan model virus RNA. Virus ND merupakan jenis virus RNA beruntai tunggal yang tidak tersegmentasi dan berpolaritas negatif dengan panjang sekitar 15,2 kb. *Newcastle Disease Virus* termasuk dalam strain virus *Avian paramyxovirus type-1*, famili *Paramyxoviridae*, genus *Avulavirus* (Worku and Teshome, 2020). Virus ini mengkode 6 protein utama yaitu Protein Fusion (F), Hemagglutinin-neuraminidase (HN), dan Matrix (M) semuanya terkait dengan amplop virus, sedangkan tiga protein yang lain terkait dengan RNA genomik: nukleokapsid (NP), fosfoprotein (P), dan RNA polimerase (L) (Ali *et al.*, 2022). Sepanjang studi molekuler, protein yang menjadi peran kunci dalam masuknya virus ke dalam yaitu protein F dan protein HN. Protein HN berperan dalam proses perlekatan pada reseptor sel inang dan pelepasan virus ke dalam sel inang. Sedangkan fungsi protein F yaitu dalam fusi antara selubung virus dan membran sel inang, memungkinkan virus masuk ke sel inang (Worku and Teshome, 2020).

Sejak zaman dahulu, tanaman obat telah digunakan untuk keperluan kesehatan dalam bentuk obat tradisional, rempah-rempah, dan komponen lainnya (Batiha *et al.*, 2020). Bahan alam, baik sebagai senyawa murni atau ekstrak dari tanaman memberikan peluang sebagai agen antivirus (Reichling *et al.*, 2009). Dalam beberapa dekade terakhir, dilakukan studi menyeluruh tentang fitokimia yang memiliki aktivitas antivirus. Berbagai fitokimia aktif termasuk flavonoid, terpenoid, senyawa organosulfur, limonoid, lignan, sulfida, polifenol, kumarin, saponin, klorofilin, senyawa furil, alkaloid, polilin, tiofena, protein, dan peptida, telah terbukti memiliki efek terapeutik terhadap berbagai virus yang beragam secara genetik dan fungsional (Perera *et al.*, 2021).

Salah satu tanaman yang dilaporkan memiliki aktivitas antivirus adalah bawang putih (Mouliia *et al.*, 2018). Bawang putih (*Allium sativum* L.) merupakan salah satu tanaman yang mudah ditemukan di Indonesia. Bawang putih merupakan tanaman herba yang dikonsumsi di seluruh dunia sebagai makanan dan obat tradisional untuk mengobati berbagai penyakit. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dilaporkan bahwa bawang putih dan komponen aktifnya memiliki aktivitas antibakteri, antivirus, antijamur, antipprotozoal, antioksidan, antiinflamasi, antikanker, dan lain-lain. (Batiha *et al.*, 2020). Bawang putih memiliki senyawa aktif organosulfur seperti aliin, senyawa thiosulfinat (alisin), ajoene, kelompok alil sulfida, alil sistein, dan senyawa sulfur lain (Hernawan and Setyawan, 2003; Lawson and Hunsaker, 2018). Pada penelitian yang telah dilakukan, ekstrak bawang putih dilaporkan memiliki aktivitas antivirus terhadap herpes simplex tipe 1 dan 2, human cytomegalovirus (HCMV), human rhinovirus tipe 2, influenza B, Parainfluenza virus tipe 3, vaccinia virus, dan vesicular stomatitis virus (Mikaili *et al.*, 2013). Senyawa organosulfur yang berperan besar terhadap aktivitas antivirus yaitu berturut-turut ajoene, alisin, alil metil thiosulfinat, dan metil alil thiosulfinat. Sedangkan tidak ditemukan aktivitas antivirus untuk fraksi polar, aliin, deoksialiin, dialil disulfida, atau dialil trisulfida (Alam *et al.*, 2016). Pada penelitian yang dilakukan oleh Wang *et al* (2017), menunjukkan bahwa alisin menghambat replikasi retrovirus dengan menekan aktivasi ERK pada limfosit dan limpa inang unggas yang terinfeksi. Berdasarkan penelitian sebelumnya,

bawang putih yang diekstraksi dengan pelarut air memiliki aktivitas antivirus terhadap virus ND dengkn menghambat protein kinase C sehingga infektivitas virus ND terganggu (Doostmohammadian *et al.*, 2020). Berdasarkan studi yang dilakukan dalam model uji in-vivo dan in-vitro, menunjukkan adanya potensi sebagai agen antivirus dari bawang putih dan senyawa aktifnya terhadap berbagai macam virus; misalnya dari famili Adenoviridae, Coronaviridae, Herpesviridae, Arteriviridae, Orthomyxoviridae, Flaviviridae, Picornaviridae, Poxvirus, Rhabdoviridae, Paramyxoviridae dan Retroviridae. Dari beberapa penelitian tentang efek antivirus bawang putih dan senyawa aktifnya memiliki mekanisme yaitu memblokir masuknya virus dan fusi ke dalam sel inang, menghambat RNA virus polimerase, *reverse transcriptase*, dan replikasi virus, dan meningkatkan respon imun inang (Rouf *et al.*, 2020).

Berdasarkan uraian di atas, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas antivirus hasil ekstraksi ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum* L.) terhadap model *Newcastle Disease*. Adanya penelitian ini diharapkan mampu menghasilkan suatu agen antivirus baru yang berasal dari senyawa aktif tanaman bawang putih dalam mengatasi virus jenis RNA.

## **METODE**

### **Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu neraca analitik (Ohaus), seperangkat alat gelas (Pyrex), toples kaca, corong *buchner*, kertas saring Whatman, *rotary evaporator* (Heidolph), inkubator telur, mikroplat dasar U (Iwaki), spuit injeksi 1 mL (One Med), oven (Memmert), LAF (*Laminar Air Flow*), mikropipet (Socorex), *yellow tip*, *white tip*, *blue tip*, flakon, PCR tube (One Med), autoklaf (Hirayama), sentrifugator (Hettich), termometer, pinset, paku dan blender.

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu umbi bawang putih, etanol 96% teknis, telur ayam berembrio berumur 9-12 hari, vaksin aktif Medivac ND La Sota, eritrosit ayam, EDTA, DMSO, larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*), antibiotik ampisilin, antibiotik streptomisin, *syringe filter*, dan WFI (*Water for Injection*).

### **Jalannya Penelitian**

#### **Ekstraksi Bawang Putih**

Sebanyak 100 g bawang putih yang telah dihaluskan menggunakan blender dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 1L, kemudian diaduk selama 30 menit dan dibiarkan dalam wadah tertutup selama 24 jam. Larutan disaring setelah 24 jam, filtrat bawang putih diremaserasi dalam etanol 96%, diulang sebanyak 3 kali. Setelah maserasi 3 hari, maserat dievaporasi dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental (Gosal *et al.*, 2021). Suhu yang digunakan untuk mengentalkan ekstrak yaitu 60°–70°C.

#### **Persiapan Antibiotik**

Antibiotik ampisilin 1000 mg dan streptomisin 1000 mg masing-masing dilarutkan dalam 5 mL WFI hingga larut dan disaring dengan *syringe filter*.

#### **Persiapan Telur Uji**

Sebanyak 12 telur ayam kampung fertil yang didapat dari peternak di Desa Derasan, Sempu, Kecamatan Andong, Kabupaten Boyolali. Telur diusahakan memiliki bentuk dan ukuran yang sama. Dilakukan pemeriksaan dengan lampu untuk memastikan embrio yang terdapat di dalam telur masih hidup. Adanya embrio dalam telur dibuktikan dengan adanya pergerakan aktif dan pembuluh darah berwarna merah (Kencana, 2017). Kemudian telur diberi tanda pada ruang

hawa secara melingkar dan ditandai pada bagian 3-5 mm dari batas antara ruang hawa dan isi telur menggunakan spidol lalu ditempatkan pada inkubator dengan suhu 37°C hingga usia 9-12 hari. Sebelum dilakukan injeksi pada usia telur yang cukup, dilakukan *candling* untuk memastikan adanya pertumbuhan embrio.

#### **Pembuatan Seri Konsentrasi**

Ekstrak sebanyak 10 mg, dilarutkan dalam 10 mL DMSO agar terbentuk konsentrasi 1 mg/mL. Pengenceran bertingkat dilakukan dengan mengambil sebanyak 1 µL, 10 µL, dan 100 µL, kemudian masing-masing senyawa dilarutkan dengan 1 mL DMSO untuk membentuk variasi konsentrasi 1 µg/mL, 10 µg/mL, dan 100 µg/mL. Tiap konsentrasi ditambahkan antibiotik sebanyak 0,2 mL, kemudian diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 37°C untuk memaksimalkan kerja antibiotik.

#### **Persiapan Virus ND**

Sebanyak 1 vial vaksin Medivac ND La Sota dengan dosis 1000 dilarutkan ke dalam 20 mL PBS steril. Kemudian itu ditambahkan sebanyak 0,3 mL antibiotik. Suspensi virus diinkubasi dengan suhu 37°C selama 60 menit untuk memaksimalkan kerja antibiotik.

#### **Inokulasi Sampel dan Virus dengan Metode In Ovo**

Cangkang TAB yang telah diinkubasi selama 9 hari terlebih dahulu dibersihkan menggunakan alkohol 70% sebagai antiseptik. Inokulasi dilakukan dalam keadaan aseptis menggunakan LAF. Cangkang telur dilubangi di bagian atas pada area yang terdapat ruang hawa dengan paku yang telah disterilisasi. Penelitian eksperimental ini terdiri atas 4 perlakuan, setiap perlakuan masing-masing menggunakan 3 TAB yang dapat diuraikan sebagai berikut :

1. Kelompok 1 : Diinokulasi 200 µL ekstrak dengan konsentrasi 1 µg/mL yang telah diberi antibiotik Selang 5 menit kemudian, diinokulasi 200 µL suspensi virus yang telah diberi antibiotik.
2. Kelompok 2 : Diinokulasi 200 µL ekstrak dengan konsentrasi 10 µg/mL yang telah diberi antibiotik Selang 5 menit kemudian, diinokulasi 200 µL suspensi virus yang telah diberi antibiotik.
3. Kelompok 3 : Diinokulasi 200 µL ekstrak dengan konsentrasi 100 µg/mL yang telah diberi antibiotik Selang 5 menit kemudian, diinokulasi 200 µL suspensi virus yang telah diberi antibiotik.
4. Kelompok 4 : Diinokulasi 200 µL suspensi virus yang telah diberi antibiotik.

Prosedur inokulasi sampel dan virus ND dilakukan dengan memasukkan spuit injeksi 1 mL sedalam ± 1 cm sejajar dengan sumbu panjang telur. TAB yang telah diberi perlakuan, lubang pada cangkang telur ditutup menggunakan selotip agar tidak terkontaminasi. Selanjutnya, telur diberi label dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 3 x 24 jam. Setiap 1 x 24 jam, dilakukan *candling*. Embrio yang mati dalam waktu kurang dari 24 jam dipisahkan dan dibuang. Embrio yang mati dalam waktu 2 x 24 jam dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C. Sedangkan embrio yang masih hidup dalam waktu 3 x 24 jam dimasukkan ke dalam lemari pendingin selama satu malam untuk mematikan embrio. Menurut Ashraf *et al* (2017) pendinginan bertujuan agar mempermudah pengambilan cairan alantois untuk uji hemaglutinasi.

#### **Persiapan Eritrosit 1%**

Darah ayam segar sebanyak 20 mL yang diperoleh dari tempat pemotongan ayam yang berada di Desa Pabelan, Kartasura, Sukoharjo dimasukkan ke dalam flakon yang berisi EDTA 200 mg yang telah dilarutkan dengan 2 mL *Water for Injection*. Darah ayam kemudian ditampung ke

dalam PCR tube 1,5 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan eritrosit dengan plasma darah. Plasma sebagai supernatan dibuang dan endapan eritrosit dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali agar diperoleh konsentrasi eritrosit 100% dengan menambahkan 0,5 mL PBS ke dalam tube dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 1 menit. Pembuatan eritrosit 1% dilakukan dengan perbandingan eritrosit dan PBS yaitu 1:99 (Fitrawati *et al.*, 2015).

### **Pengambilan Cairan Alantois**

Selotip pada cangkang telur dibuka menggunakan pinset. Cangkang telur dibuka pada bagian rongga udara hingga cairan alantois pada bagian atas terlihat dengan jelas, Kemudian diambil cairan alantois menggunakan spuit injeksi 1 mL. Masing-masing cairan alantois yang telah diambil dimasukkan ke dalam flakon dan diberi label. Pengambilan cairan alantois ini dilakukan dalam kondisi aseptis. Kemudian dilanjutkan untuk uji hemaglutinasi.

### **Uji Hemaglutinasi**

Uji hemaglutinasi dilakukan untuk menghitung titer hemaglutinasi virus ND menggunakan mikrotelat dasar U 96 sumuran. Pada mikrotelat pertama untuk baris A-C merupakan sumuran kelompok 1 dan baris D-F merupakan sumuran kelompok 2. Sedangkan pada mikrotelat kedua untuk baris A-C merupakan sumuran kelompok 3 dan baris D-F merupakan sumuran kelompok 4. Semua sumuran nomor 1-12 ditambahkan PBS sebanyak 50 µL. Selanjutnya, ditambahkan cairan alantois yang mengandung senyawa dan virus sebanyak 50 µL pada sumuran pertama. PBS dan cairan alantois diresuspensi sebanyak ± 3 kali, lalu diambil 50 µL dan dipindahkan ke sumuran 2 demikian seterusnya hingga sumuran ke-12. Langkah yang sama juga dilakukan pada sumuran yang hanya berisi virus. Semua sumuran yang telah diresuspensi ditambahkan suspensi eritrosit 1% sebanyak 50 µL dan plat digoyangkan agar tercampur rata. Kemudian mikrotelat dibiarkan selama 15-25 menit pada suhu kamar dan diamati aktivitas hemaglutinasi.

### **Analisis Data**

Analisis uji antivirus dilakukan dengan perhitungan titer virus ND yang berasal cairan alantois dengan melihat hasil uji hemaglutinasi pada sumuran mikrotelat untuk menentukan persentase penghambatan. Rumus persentase penghambatan adalah sebagai berikut :

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

P = Persentase penghambatan virus

A = Jumlah titer pada TAB tanpa perlakuan ekstrak etanol bawang putih

B = Jumlah titer pada TAB dengan perlakuan ekstrak etanol bawang putih

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Ekstraksi Bawang Putih**

Ekstrak bawang putih memperoleh ekstrak kental sebesar 4,31 gram berwarna kuning kecoklatan dan memiliki aroma khas.

**Tabel 1. Pengamatan Pembuatan Ekstrak Etanol Bawang Putih**

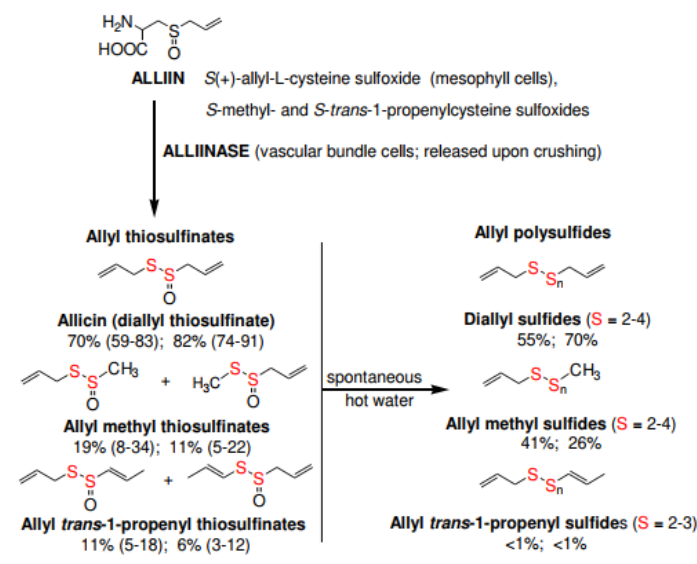
<b>Pengamatan</b>	<b>Hasil</b>
Bobot bawang putih	100 g
Bobot ekstrak kental hasil maserasi	4,31 g
Rendemen	4,31%



**Tabel 2. Uji Organoleptis Ekstrak Etanol Bawang Putih**

Parameter	Hasil
Bentuk ekstrak	Kental
Bau	Khas bawang putih
Warna	Kuning kecoklatan

Metode ekstraksi yang digunakan untuk mengekstraksi bawang putih adalah metode maserasi. Maserasi dipilih karena bawang putih mengandung senyawa tidak tahan terhadap panas dan tidak stabil. Pemilihan etanol sebagai pelarut karena etanol merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa non polar dan polar (Putranti *et al.*, 2019). Terdapat dua senyawa organosulfur penting yang ada pada bawang putih yaitu S-alk(en)ilsistein sulfoksida atau alliin dan  $\gamma$ -glutamil-S-alk(en)il-L-sistein. Proses pemanasan akan menghambat enzim alliinase dan pada suhu lebih dari 60°C enzim ini akan rusak (Hernawan and Setyawan, 2003). Pada saat bawang putih dihancurkan, aliin dihidrolisis oleh enzim aliinase menjadi asam alil sulfenat yang kemudian terkondensasi menjadi alisin dan senyawa thiosulfinat yang lain. Alisin dan senyawa thiosulfinat lain merupakan senyawa volatil tidak stabil sehingga mudah mengalami degradasi atau bereaksi lebih lanjut secara spontan menghasilkan kelompok alil sulfida, ajoene, dithiin, dan senyawa sulfur lainnya (Lanzotti, 2006; Lawson and Hunsaker, 2018). Reaksi lanjut dari alisin dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kondisi pengolahan, penyimpanan, suhu, pH, dan lain-lain (Moulia *et al.*, 2018).



**Gambar 1. Reaksi degradasi senyawa aktif dalam bawang putih (Sumber : Lawson L.D. and Hunsaker S.M., 2018)**

Pada penelitian ini, pemekatan ekstrak etanol bawang putih menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 60-70°C dan tidak dilakukan pemeriksaan kandungan zat aktif yang terkandung di dalamnya. Sehingga tidak dapat dibandingkan kandungan dan jumlah yang terdapat dalam penelitian ini dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Bajac *et al* (2018). Ekstrak etanol bawang putih yang dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 45°C mengandung senyawa bioaktif berupa alisin, alil sulfida, dialil disulfida, dan metil

metantiosulfonat. Berdasarkan penelitian tersebut, alisin merupakan senyawa organosulfur dengan konsentrasi tertinggi dengan kisaran antara yang ditemukan dalam ekstrak etanol bawang putih 4,39 - 4,56 µg/mL. Sedangkan alil sulfida, dialil disulfida, dan metil metantiosulfonat ditemukan dalam ekstrak etanol bawang putih berturut-turut kisaran antara 0,21 – 0,7 µg/mL ; 0,03 - 0,04 µg/mL; dan 0,45 – 0,67 µg/mL tergantung dengan jenis bawang putih (Bajac *et al.*, 2018). Senyawa aktif dalam bawang putih yang memiliki aktivitas antivirus yaitu dengan urutan ajoene > alisin > alil metil thiosulfinat > metil alil thiosulfinat. Sedangkan tidak ditemukan aktivitas antivirus pada aliin, deoksialiin, dialil disulfida, atau dialil trisulfida (Alam *et al.*, 2016).

### Inokulasi Sampel dan Virus dengan Metode *In Ovo*

Metode *in ovo* merupakan metode yang digunakan sebagai salah satu media pertumbuhan virus yang memiliki keuntungan jika dibandingkan dengan metode *in vitro* karena tidak memerlukan kondisi laboratorium yang khusus (Aziz *et al.*, 2019). Virus merupakan parasit intraseluler obligat yang sepenuhnya membutuhkan sel inang untuk bereplikasi (Louten, 2016). Dalam hal ini, sel inang yang diperlukan sebagai media pertumbuhan virus yaitu telur ayam berembrio. Alasan telur ayam berembrio dipilih sebagai media pertumbuhan virus ND karena mudah didapat, relatif bebas dari patogen, peka terhadap virus ND, dan mudah diberi tanda (Kencana, 2017). Pemilihan ruang alantois sebagai rute inokulasi sampel dan virus karena tidak menyebabkan kematian embrio (Murtini *et al.*, 2006). Berdasarkan pengamatan keadaan embrio setelah inokulasi selama 3x24 jam, tidak terdapat kematian embrio pada ketiga konsentrasi dan kontrol virus yang disertai kejernihan cairan alantois.

**Tabel 3. Pengamatan kematian embrio setelah inokulasi virus ND dan variasi konsentrasi ekstrak etanol bawang putih.**

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%

Virus ND memiliki sifat peka terhadap suhu panas dan inaktif pada suhu > 50°C, akan tetapi dapat bertahan selama satu minggu pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan selama 3x24 jam dengan suhu inkubasi 37°C karena vaksin ND La Sota merupakan virus yang bersifat strain lentogenik. Strain lentogenik merupakan virus yang dapat membunuh embrio ayam dalam waktu 90 jam (Pudjiatmoko *et al.*, 2014). Sehingga, inkubasi dengan suhu 37°C setelah inokulasi dalam waktu 3x24 jam tidak menyebabkan kematian embrio.

### Hemaglutinasi

Virus ND memiliki protein hemaglutinin-neuraminidase (HN) yang yang berada pada amplop virus (Ali *et al.*, 2022). Adanya protein hemaglutinin (H) menyebabkan terjadinya hemaglutinasi karena adanya ikatan antara protein hemaglutinin dengan reseptor permukaan eritrosit (Fitrawati *et al.*, 2015). Apabila tidak adanya partikel virus, sel darah merah mengendap ke dasar sumur karena gaya gravitasi, menimbulkan titik berwarna merah dalam sumuran.

Apabila adanya virus, eritrosit akan menggumpal akibat interaksi antara protein H dari partikel virus dan eritrosit. Akibat adanya gaya gravitasi maka akan mengarah ke pembentukan *lattice* atau kekeruhan (Ryu, 2017). Protein neuraminidase adalah suatu enzim yang berperan dalam pelepasan virus dari sel inang dan memengaruhi waktu yang dibutuhkan virus untuk mengelusi eritrosit (Pudjiatmoko *et al.*, 2014).

Hasil uji hemaglutinasi pada keempat kelompok perlakuan ditunjukkan pada Tabel 4 dan 5. Pada kelompok variasi konsentrasi dan kontrol virus di semua sumuran keruh atau membentuk *lattice*. Hal ini menandakan adanya hemaglutinasi eritrosit oleh virus.

**Tabel 4. Hasil uji hemaglutinasi ekstrak etanol bawang putih konsentrasi 1 µg/mL dan 10 µg/mL**

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

Keterangan :



: terjadi hemaglutinasi



: tidak terjadi hemaglutinasi

**Tabel 5. Hasil uji hemaglutinasi ekstrak etanol bawang putih konsentrasi 100 µg/mL dan kontrol virus**

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

Keterangan :



: terjadi hemaglutinasi

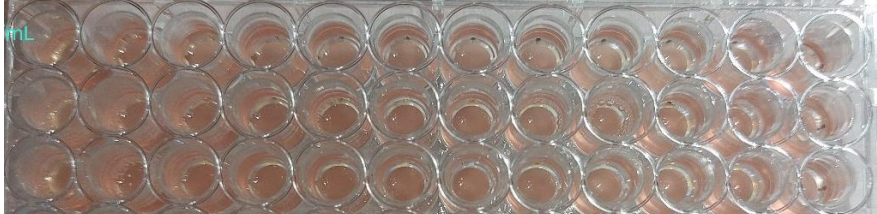


: tidak terjadi hemaglutinasi



Pada penelitian ini, tidak digunakan kontrol positif. Hal ini disebabkan karena pada saat percobaan, favipiravir tidak menunjukkan adanya aktivitas antivirus. Sedangkan ribavirin tidak digunakan sebagai kontrol positif karena keterbatasan dalam persediaan di beberapa rumah sakit besar sekitar Solo Raya. Hasil percobaan favipiravir sebagai kontrol positif ditunjukkan pada tabel 6.

**Tabel 6. Hasil Uji Hemaglutinasi Favipiravir dan Virus ND**

Perlakuan		Sumuran											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kontrol Positif (Favipiravir + Virus ND)	A												
	B												
	C												

Keterangan :



: terjadi hemaglutinasi



: tidak terjadi hemaglutinasi

**Tabel 7. Hasil titer uji hemaglutinasi**

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

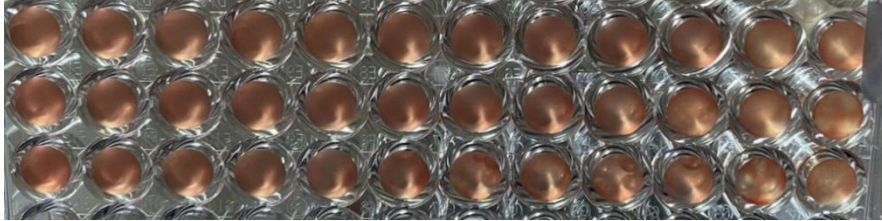
**Tabel 8. Persentase penghambatan virus ND oleh ekstrak etanol bawang putih**

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

Pelarut DMSO yang digunakan untuk melarutkan ekstrak bawang putih ini tidak memiliki aktivitas antivirus. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Sormpet *et al* (2017) dan Kang *et al* (2017), bahwa DMSO tidak menunjukkan adanya penghambatan proses replikasi virus *Avian Influenza* dan virus ND. Tidak adanya penghambatan virus terhadap DMSO ditunjukkan pada Tabel 9.

Daya hambat ekstrak etanol bawang putih dihitung menggunakan rumus persen penghambatan yang membutuhkan data perbandingan selisih titer kontrol virus dan titer senyawa ekstrak dengan titer kontrol virus. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 1 µg/mL, 10 µg/mL, dan 100 µg/mL tidak adanya daya hambat terhadap virus dengan persentase penghambatan 0% yang ditunjukkan pada Tabel 8. Hal ini dapat disebabkan karena faktor pemanasan saat pemekatan dan faktor pelarut dalam ekstraksi.

**Tabel 9. Hasil Uji Hemaglutinasi DMSO**

Perlakuan		Sumuran											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kontrol Pelarut (DMSO + Virus ND)	A												
	B												
	C												

Keterangan :



: terjadi hemaglutinasi



: tidak terjadi hemaglutinasi

Senyawa thiosulfinat merupakan senyawa yang mudah terdegradasi secara spontan bahkan dalam suhu ruang, seperti alisin, alil metil thiosulfinat, metil alil thiosulfinat, dan senyawa thiosulfinat lainnya (Ilić *et al.*, 2011; Lanzotti, 2006). Degradasi alisin di bawah pengaruh suhu yang dipantau dengan spektrometri FTIR dengan paparan suhu 70° – 80°C menunjukkan adanya penurunan seiring dengan lamanya waktu pemaparan. Ajoene merupakan produk degradasi dari alisin. Secara kimia, ajoene bersifat lebih stabil dibandingkan alisin. Senyawa ini ditemukan pada ekstrak kloroform, ekstrak minyak bawang putih, atau bubuk bawang putih yang dicampur dengan air (Ilić *et al.*, 2011; Weber *et al.*, 1992). Pada penelitian terdahulu, ekstrak air bawang putih yang dievaporasi dengan suhu 40°C memiliki kandungan alisin sebesar 16,6% dan terbukti memiliki aktivitas antivirus terhadap virus ND (Doostmohammadian *et al.*, 2020). Berdasarkan dari beberapa penelitian di atas, terdegradasinya senyawa alisin, alil metil thiosulfinat, metil alil thiosulfinat akibat paparan suhu panas 60-70°C dari *rotary evaporator* pada saat pemekatan ekstrak serta diduga tidak terdapatnya senyawa ajoene pada ekstrak etanol bawang putih menjadi faktor yang menyebabkan tidak adanya aktivitas antivirus dari ekstrak tersebut, sehingga persentase penghambatan virus pada penelitian ini 0%.

## KESIMPULAN

Hasil penelitian aktivitas antivirus ekstrak etanol bawang putih terhadap model *Newcastle Disease*, menunjukkan tidak adanya aktivitas antivirus baik pada konsentrasi 1 µg/mL, 10 µg/mL, maupun 100 µg/mL. Persentase penghambatan virus pada ketiga seri konsentrasi didapatkan sebesar 0%. Tidak adanya aktivitas antivirus dalam ekstrak etanol bawang putih diduga disebabkan oleh faktor pemanasan saat pemekatan ekstrak dan faktor pelarut dalam ekstraksi yang menyebabkan hilangnya senyawa aktif yang berperan sebagai antivirus. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengevaluasi aktivitas antivirus bawang putih dan senyawa aktifnya menggunakan pelarut etanol dengan suhu pemekatan ekstrak di bawah suhu 50°C atau menggunakan pelarut selain etanol untuk mendapatkan senyawa aktif yang berperan sebagai antivirus. Pengujian hasil menggunakan teknik uji hemaglutinasi dengan media telur ayam berembrio usia 9-12 hari dan diperlukannya kontrol telur tanpa perlakuan virus dan sampel sebagai perbandingan hasil uji. Pengujian perlu setidaknya dilakukan minimal 3 kali percobaan independen agar validitas metode tinggi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alam M.K., Hoq M.O. and Uddin M.S., 2016, Medicinal plant *Allium sativum*- A Review, *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4 (6), 72–79.
- Ali A., Abdallah F., Farag G.K. and Sameh karim, 2022, A Mini-Review on Newcastle Disease Virus in Egypt, With Particular References to Common Vaccines and Their Development, *Zagazig Veterinary Journal*, 50 (1), 19–36.
- Ashraf A., Ashraf M.M., Rafiqe A., Aslam B., Galani S., Zafar S., Asad F., Asghar R.D., Akram S., Ahmed H., Muhammad S., Shah A. and Asif R., 2017, In vivo antiviral potential of *Glycyrrhiza glabra* extract against Newcastle disease virus, , 30 (2), 567–572.
- Aziz G.N., Suwarno S., Praja R.N., Rahmahani J., Wibawati P.A. and Fikri F., 2019, Identifikasi Perkembangan Virus Infectious Bronchitis Isolat Lokal Dan Massachusetts Pada Cairan Allantois TAB Dengan Indirect Fluorescence Antibody Technique, *Jurnal Medik Veteriner*, 2 (1), 18.
- Bajac J., Nikolovski B., Kocić-Tanackov S., Tomšik A., Mandić A., Gvozdanić-Varga J., Vlajić S., Vujanović M. and Radojković M., 2018, Extraction of different garlic varieties (*A. sativum* L.) – determination of organosulfur compounds and microbiological activity, Dalam *IV International congress Food technology, quality and safety*, p. 82.
- Batiha G.E., Beshbishy A.M. and Wasef L.G., 2020, Chemical Constituents and Pharmacological, , 1–21.
- Cheng X.F., Virk N. and Wang H.Z., 2014, *Impact of the host on plant virus evolution*, Elsevier. Terdapat di: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-411584-2.00019-6>.
- Doostmohammadian F., Id T.S., Id N.M. and Mohammadi M., 2020, In ovo evaluation of antiviral effects of aqueous garlic (*Allium sativum*) extract against a velogenic strain of Newcastle disease virus, , 9 (3), 232–238.
- Fitrawati F., Wibowo M.H., Amanu S. and Sutrisno B., 2015, Isolasi dan Identifikasi Egg Drop Syndrome Virus dengan Uji Hemaglutinasi dan Hemaglutinasi Inhibisi, *Jurnal Sain Veteriner* , 33 (1), 59–68.
- Gosal L., Hutomo S. and Sooi C.M., 2021, Kemampuan ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum* L.) dalam menghambat perlekatan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Medicine and Health*, 3 (1), 1–8.
- Hayya A.W., 2021, Penggunaan Klorokuin Pada Infeksi Virus COVID-19, *Jurnal Inovasi Penelitian*, 1 (8), 1761–1766.
- Hernawan U.E. and Setyawan A.D., 2003, REVIEW: Organosulphure compound of garlic (*Allium sativum* L.) and its biological activities, *Biofarmasi Journal of Natural Product Biochemistry*, 1 (2), 65–76.
- Ilić D.P., Nikolić V.D., Nikolić L.B., Stanković M.Z., Stanojević L.P. and Cakić M.D., 2011, Allicin and Related Compounds: Biosynthesis, Synthesis and Pharmacological Activity, *Physics, Chemistry and Technology*, 9 (1), 9–20.
- Kang Y., Yuan R., Zhao X., Xiang B., Gao S., Gao P., Dai X., Feng M., Li Yanling, Xie P., Li Yulian, Gao X. and Ren T., 2017, Transient activation of the PI3K/Akt pathway promotes Newcastle disease virus replication and enhances anti-apoptotic signaling responses, *Oncotarget*, 8 (14), 23551–23563.
- Kencana G.A.Y., 2017, *Cara Mengisolasi Virus dan Mengidentifikasi Dengan Uji Serologi Hemaglutinasi*, Lanzotti V., 2006, The analysis of onion and garlic, *Journal of Chromatography A*, 1112 (1–2), 3–22.
- Lawson L.D. and Hunsaker S.M., 2018, Allicin bioavailability and bioequivalence from garlic supplements and garlic foods, *Nutrients*, 10 (7)
- Louten J., 2016, Virus Structure and Classification, *Essential Human Virology*, 19–29.
- Mikaili P., Maadirad S., Moloudizargari M. and Aghajanshakeri S., 2013, Therapeutic Uses and Pharmacological Properties of Garlic , Shallot , and Their Biologically Active Compounds, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16 (10), 1031–1048.

- Mouliya M.N., Syarief R., Iriani E.S. and Kusumaningrum H.D., 2018, Antimikroba Ekstrak Bawang Putih, 55–66.
- Murtini S., Murwani R., Satrija F. and Malole M.B.M., 2006, Penetapan Rute dan Dosis Inokulasi pada Telur Ayam Berembrio sebagai Media Uji Khasiat Ekstrak Benalu Teh (*Scurrula oortiana*), *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 11 (2), 137–143.
- Perera W.P.R.T., Liyanage J.A., Dissanayake K.G.C., Gunathilaka H., Weerakoon W.M.T.D.N., Wanigasekara D.N., Fernando W.S.K., Rajapaksha R.M.H., Liyanage R.P. and Perera B.T., 2021, Review Article Antiviral Potential of Selected Medicinal Herbs and Their Isolated Natural Products, 2021
- Pudjiatmoko, Syibli M., Nurtanto S., Lubis N., Syafrison, Yulianti S., N. D.K., Yohana C.K., Setianingsih E., Nurhidayah, Efendi D. and Saudah E., 2014, *Manual Penyakit Unggas*, Subdit Pengamatan Penyakit Hewan Direktorat Kesehatan Hewan Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan.
- Putranti W., Maulana A., Fatimah S.F., Farmasi F. and Dahlan U.A., 2019, Formulasi Emulgel Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum* L.), 6 (1), 7–15.
- Reichling J., Schnitzler P., Suschke U. and Saller R., 2009, Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties – an Overview, *Forsch Komplementmed*, 16 (2), 79–90.
- Rouf R., Jamal S., Kumer D. and Torequl M., 2020, Antiviral potential of garlic (*Allium sativum*) and its organosulfur compounds: A systematic update of pre-clinical and clinical data, *Trends in Food Science & Technology*, 104, 2019–234.
- Ryu W.-S., 2017, Diagnosis and Methods, Dalam *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*, pp. 47–62.
- Sornpet B., Potha T., Tragoolpua Y. and Pringproa K., 2017, Antiviral activity of five Asian medicinal plant crude extracts against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10 (9), 871–876. Terdapat di: <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.08.010>.
- Taylor M.W., 2014, Viruses and man: A history of interactions, Dalam *Viruses and Man: A History of Interactions*, pp. 23–40.
- Wang L., Jiao H., Zhao J., Wang X., Sun S., Eden W. Van and Lin H., 2017, Allicin Alleviates Reticuloendotheliosis Virus-Induced Immunosuppression via ERK/Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Specific Pathogen-Free Chickens, *Frontiers in Immunology*, 8 (1856)
- Weber N.D., Andersen D., North J.A., Murray B.K., Lawson L.I. and Hughes B.G., 1992, In Vitro Virucidal Effects of *Allium sativum* (Garlic) Extract and Compounds, *Planta Medica*, 58 (5), 417–423.
- Worku T. and Teshome I., 2020, Review on the Role of Viral Structural Proteins on the Pathogenicity of Newcastle Disease Virus in Chickens, *American Journal of Zoology*, 3 (2), 40–46.