

UJI AKTIVITAS ANTIVIRUS FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK METANOL KULIT JERUK PURUT (*Citrus hystrix*) DENGAN MODEL NEWCASTLE DISEASE

ANTIVIRAL ACTIVITY TEST OF ETHYL ACETATE FRACTION OF KAFFIR LIME PEEL (*Citrus hystrix*) METHANOLIC EXTRACT WITH NEWCASTLE DISEASE MODEL

Audina Putri Pratiwi, Azis Saifudin*
Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
*E-mail: azis.saifudin@ums.ac.id

Abstrak

Jeruk purut merupakan salah satu tanaman herbal yang dapat tumbuh dengan mudah di wilayah Indonesia. Senyawa yang terdapat di dalam jeruk purut sangat beragam. Limonine merupakan senyawa yang dipercaya memiliki aktivitas antivirus dari jeruk purut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antivirus fraksi etil asetat ekstrak metanol jeruk purut terhadap virus Newcastle. Jeruk purut diekstraksi dengan metode maserasi dan difraksinasi cair-cair. Hasil fraksinasi kemudian diinokulasikan kedalam telur ayam berembrio (TAB) berumur 9-11 hari dan diinkubasi selama 3 hari. Terdapat 3 seri konsentrasi dalam penelitian ini yaitu, 1 µg/mL, 10 µg/mL dan 100 µg/mL. Selama proses inkubasi, dilakukan pengecekan untuk melihat kematian embrio. Metode yang digunakan dalam melihat aktivitas antivirus dalam penelitian ini adalah uji hemaglutinasi. Hasil uji hemaglutinasi menunjukkan adanya aktivitas antivirus dari fraksi etil asetat ekstrak metanol jeruk purut dengan ditandai menurunnya jumlah titer virus pada pemberian senyawa dengan konsentrasi yang meningkat. Kelompok konsentrasi senyawa yang memiliki efek antivirus yang baik adalah 10 µg/mL dan 100 µg/mL dengan persentase penghambatan 99,93%.

Kata Kunci: *in ovo*, *Citrus hystrix*, uji hemaglutinasi

Abstract

Kaffir lime is one of the herbal plants that can grow easily in the territory of Indonesia. The compounds contained in kaffir lime are very diverse. Limonine is a compound that is believed to have antiviral activity from kaffir limes. This study aimed to determine the antiviral activity of the ethyl acetate fraction of kaffir lime methanol extract against Newcastle virus. Kaffir lime was extracted by maceration method and liquid-liquid fractionation method. The results of the fractionation were then inoculated into embryonated chicken eggs (TAB) aged 9-11 days and incubated for 3 days. There are 3 concentration series in this study, namely, 1µg/mL, 10µg/mL and 100µg/mL. During the incubation process, checks are made to see the death of the embryo. The method used to see the antiviral activity in this study is the hemagglutination test. The results of the hemagglutination test showed the presence of antiviral activity from the ethyl acetate fraction of kaffir lime methanol extract with a marked decrease in the number of virus titers when the compound was given with increasing concentrations. The concentration groups of compounds that have good antiviral effects are 10 µg/mL and 100 µg/mL with an inhibition percentage of 99.93%.

Keywords: *in ovo*, *Citrus hystrix*, hemagglutination test

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi di Indonesia masih banyak yang harus ditangani, salah satunya yaitu infeksi karena virus (Depkes RI, 2007). Virus merupakan gen penyebab infeksi yang dapat hidup hanya pada sel hidup yaitu pada sel hewan termasuk manusia, tumbuhan, jamur, dan bakteri. Replikasi, reproduksi virus hanya terjadi jika berada dalam sel organisme lain (Black, 2008). *Newcastle disease* merupakan penyakit virus yang sangat menular yang biasanya

mendominasi penyakit unggas di daerah tropis (Williamson *et al.*, 2021). ND atau *Newcastle disease* merupakan salah satu penyakit yang sangat ditakuti di industri broiler. *Newcastle disease* biasanya muncul sebagai penyakit pernafasan yang menyerang burung liar dan unggas domestik. Depresi, gejala syaraf, atau diare adalah gejala klinis yang dominan disertai dengan kematian (Alexander and Gough, 2003). *Newcastle disease virus* menyerang permukaan sel dengan cara mengenali dan mengikat molekul yang mengandung asam sialat seperti glikoprotein dan glikolipid (Ferreira *et al.*, 2004). *Newcastle disease virus* memiliki protein HN (hemagglutinin neuraminidase) mengaglutinasi sel darah merah (DeLeeuwe and Peeters, 1999).

Aktivitas antivirus ekstrak tanaman diperlukan untuk mengatasi munculnya penyakit - penyakit baru yang disebabkan varian virus baru. Salah satu contohnya adalah tanaman jeruk purut (*Citrus hystrix*). Wungsintaweekul *et al.* (2010), melaporkan minyak jeruk purut dari kulit dan daun memiliki komposisi kimia sitronelal sebagai komponen utama, dan komponen lainnya meliputi linalool, β -pinene dan limonine. Selain itu, bagian kulit buah mengandung senyawa golongan flavonoid dan steroid, serta senyawa kumarin (Dalimartha, 2000). Menurut Dogmo *et al.* (2009), limonine dan β -pinene merupakan senyawa yang memiliki aktivitas antivirus. Menurut Jin *et al.* (2017), aktivitas antivirus jeruk purut (*Citrus hystrix*) dipengaruhi oleh kandungan limonin di dalamnya.

Dalam penelitian yang dilakukan oleh Esam *et al.* (2017), limonin mampu menghambat proliferasi sel kanker dan menginduksi apoptosis pada kanker sel. Limonin mengganggu replikasi HIV-1 dalam kultur sel mononuklear melalui aktivitas inhibisi protease HIV-1. Penelitian yang dilakukan oleh Jin *et al.* (2017), mengungkapkan bahwa senyawa limonin yang terdapat pada ekstrak etanol *Melia fructus* memiliki aktivitas antivirus dengan protein PA dari RNA polymerase kompleks pada influenza virus. Selain itu, limonin juga dapat digunakan sebagai agen antivirus karena menghambat proses hemaglutinasi pada *Newcastle disease* (Nazhan *et al.*, 2019).

Didasarkan pada data di atas, dilakukan penelitian untuk melihat efek antivirus fraksi etil asetat ekstrak metanol kulit jeruk purut (*Citrus hystrix*) pada model *Newcastle disease*. Penelitian ini akan membahas aktivitas antivirus hasil ekstraksi ekstrak metanol jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan fraksi etil asetat terhadap *Newcastle disease* secara *in ovo* menggunakan telur ayam berembrio (TAB) berusia 9-11 hari.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat: blender, alat saring, alat gelas, timbangan digital, corong buncher, alat evaporasi, sonikator, flakon, lampu spiritus, bor telur, inkubator, spuit injeksi 1mL, microplate dasar U, flakon, mikropipet, white tip, yellow tip, termometer, mikrosentrifuse, dan LAF (*Laminar Air Flow*).

Bahan: kulit jeruk purut, metanol, etil asetat, aquadest, telur ayam berembrio (TAB) berumur 9-11 hari, vaksin aktif Medivac ND La Sota, eritrosit ayam, EDTA, DMSO, dan larutan PBS (Phosphate Buffer Saline) steril.

Jalannya Penelitian

Ekstraksi sampel

Jeruk purut sebanyak 3 kg yang berasal dari Boyolali dikupas kulitnya dan dikeringkan di bawah sinar matahari selama 3 hari. Setelah kering, kulit jeruk purut dihaluskan menggunakan

blender dan ditimbang bobotnya. Sejumlah 200 g bubuk kulit jeruk purut dimaserasi menggunakan metanol sebanyak 2 L selama 3 hari. Setelah itu dilakukan remaserasi 1 hari menggunakan metanol 800 mL. Setelah itu dilakukan penyaringan menggunakan buchner dan kemudian maserat diuapkan penyarinya dengan cara dievaporasi hingga menjadi ekstrak kental, kemudian diletakkan di waterbath selama 6 jam (Diniatik dkk., 2011). Ekstrak kental yang didapat sejumlah 40 g.

Fraksinasi ekstrak metanol jeruk purut

Sebanyak 10 g ekstrak kental dimasukkan ke dalam labu takar, ditambahkan aquadest sebanyak 100 mL lalu disonikasi selama 20 menit. Setelah disonikasi, larutan dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan etil asetat 100mL. Setelah itu, corong pisah digojog selama 10 menit hingga ekstrak kental larut dalam fase cair. Larutan didiamkan selama 3 jam hingga terbentuk 2 fase. Bagian bawah dibuang sedangkan bagian atasnya disimpan lalu dievaporasi sampai kental. Ekstrak kental yang diperoleh sebanyak 2 g yang siap digunakan untuk pengujian.

Pembuatan seri konsentrasi

Dibuat larutan stok dengan melarutkan 10 mg ekstrak metanol kulit jeruk purut dengan 10 mL DMSO. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi 1 µg/mL, 10 µg/mL dan 100 µg/mL dengan cara melarutkan masing-masing 1 µg, 10 µg, dan 100 µg ekstrak kental kedalam 1 mL DMSO.

Persiapan telur uji

Sebanyak 12 telur berembrio berumur 9-11 hari yang didapat dari peternak di Desa Madu Kecamatan Mojosongo Kabupaten Boyolali, diinkubasi. Telur diusahakan mempunyai 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 dan pembuluh darah. Telur diberi tanda pada bagian kepala embrio lalu ditempatkan pada inkubator dengan suhu 37 °C.

Persiapan virus menggunakan vaksin ND La Sota

Vaksin Medivac ND La Sota didapatkan dari poultry shop yang terdapat di Kartasura. Vaksin ND La Sota merupakan jenis vaksin aktif. Vaksin ND La Sota dosis 100 dilarutkan dalam 2 mL PBS steril. Selanjutnya larutkan 200 mg antibiotik ampicilin ke dalam 1 mL aquadest steril dan 200 mg streptomisin ke dalam 1 mL aquadest steril. Masing-masing sebanyak 0,3 mL antibiotik ditambahkan ke dalam suspensi vaksin untuk menghindari adanya kontaminasi bakteri. Persiapan virus dilakukan dalam LAF. Setelah dicampurkan, suspensi virus diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 1 jam menggunakan inkubator.

Inokulasi sampel dan virus ke dalam ruang allantois

Inokulasi dilakukan dalam keadaan aseptis menggunakan LAF. Dilakukan sterilisasi pada cangkang telur menggunakan kapas dan alkohol 70% lalu dikeringkan. Lubangi cangkang telur bagian atas pada area yang terdapat rongga udara menggunakan bor kecil. Sebanyak 12 TAB berumur 9-11 (masing-masing 3 telur) dibagi dalam 2 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol dan kelompok uji. Kelompok uji:

Kelompok 1: 0,2 mL ekstrak kental dengan konsentrasi 1 µg/mL + 0,2 mL suspensi virus yang sudah diberi antibiotik.

Kelompok 2: 0,2 mL ekstrak kental dengan konsentrasi 10 µg/mL + 0,2 mL suspensi virus yang sudah diberi antibiotik.

Kelompok 3: 0,2 mL ekstrak kental dengan konsentrasi 100 µg/mL + 0,2 mL suspensi virus yang sudah diberi antibiotik.

Kelompok kontrol:

Kelompok 4: 0,2 mL suspensi virus yang sudah diberi antibiotik sebagai kontrol negatif.

Injeksi dilakukan menggunakan syringe 1 mL. Posisikan jarum secara vertikal, dan masukkan jarum secara perlahan ke dalam telur melewati lubang yang telah dibuat. Masukkan jarum kurang lebih 16 mm ke dalam telur agar mencapai ruang alantoni. Kemudian ditutup lubang pada cangkang telur menggunakan selotip agar tidak terkontaminasi. Telur selanjutnya diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37 °C selama 3 hari. Selama 3 hari dilakukan pengecekan embrio. Setelah 3 hari diinkubasi, telur dimasukkan ke kulkas dengan suhu 4 °C selama 24 jam untuk membunuh embrio dan mengurangi kontaminasi cairan alantoni dengan darah. Untuk embrio yang mati sebelum 24 jam, telur ayam dipisahkan dan disimpan dalam kulkas terlebih dahulu.

Pembuatan larutan eritrosit 1%

Ditampung darah ayam segar sebanyak 20 mL ke dalam flakon yang sudah diberi 20 mg EDTA. Darah ayam didapatkan dari tempat pemotongan ayam yang ada di Kartasura. Selanjutnya dilakukan pemisahan plasma darah menggunakan sentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Setelah itu dibuang plasma darah dan ditambahkan PBS sampai 1 mL lalu disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 1 menit. Pencucian dilakukan selama 3 kali. Untuk membuat eritrosit dengan konsentrasi 1%, diambil 1 tetes eritrosit dan ditambahkan sebanyak 99 tetes larutan PBS steril.

Pengambilan cairan allantois

Dibuka selotip dan lakukan sterilisasi menggunakan kapas beralkohol pada cangkang telur. Buang pecahan cangkang telur menggunakan pinset, lalu digunakan spuit injeksi berukuran 1 mL untuk mengambil cairan alantoni yang terdapat di sisi embrio. Masing-masing allantois dimasukkan ke dalam flakon dan diberi label.

Uji hemaglutinasi

Diteteskan larutan PBS steril sebanyak 50 µL ke dalam semua sumuran plat. Digunakan 2 mikroplate dalam sekali uji. Selanjutnya teteskan cairan allantois sebanyak 50 µL ke dalam sumuran A masing-masing konsentrasi dan perlakuan. Dilakukan pengenceran berseri dimulai dari sumuran A1 sampai ke A12 dengan menggunakan mikropipet. Pengenceran berseri dilakukan dengan cara meresuspensi sumur A1 sebanyak 3 kali lalu memindahkan sebanyak 50 µL cairan A1 ke dalam A2, sumuran A2 ke A3, sampai sumuran A12. Di sumuran A12, sebanyak 50 µL cairan dibuang agar konsentrasinya sama. Dilakukan langkah yang sama pada sumuran B-F pada kedua mikroplate. Setelah semua allantois diresuspensi, diteteskan sebanyak 50 µL eritrosit kedalam semua sumuran. Diamkan mikroplate selama 15-20 menit pada suhu kamar dan diamati aktivitas hemaglutinasi.

Tabel 1. Konsentrasi uji hemaglutinasi

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												A											
B			Kelompok 1: kontrol virus												Kelompok 3: konsentrasi 10 µg/mL								
C												C											
D												D											
E			Kelompok 2: konsentrasi 1 µg/mL												Kelompok 4: konsentrasi 100 µg/mL								
F												F											

Tabel 2. Perlakuan uji hemaglutinasi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PBS (µg)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Alantois (µg)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Pengenceran	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{256}$	$\frac{1}{512}$	$\frac{1}{1024}$	$\frac{1}{2048}$	$\frac{1}{4096}$
RBC 1% (µg)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Fraksinasi *Citrus hystrix*

Ekstraksi metanol jeruk purut yang didapat sebanyak 40 g ekstrak kental. Hasi fraksinasi menggunakan etil asetat menghasilkan sebanyak 2 g ekstrak kental.

Tabel 3. Pengamatan pembuatan ekstrak metanol fraksi kloroform jeruk purut

Pengamatan	Hasil
Bobot jeruk purut segar	3 kg
Bobot serbuk kulit jeruk purut	200 g
Pelarut yang digunakan dalam maserasi	2000 mL
Pelarut yang digunakan dalam remaserasi	800 mL
Jumlah ekstrak kental	40 g
Jumlah ekstrak yang digunakan dalam fraksinasi	10 g
Jumlah ekstrak setelah fraksinasi	2 g

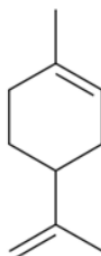
Tabel 4. Uji organoleptis ekstrak metanol fraksi kloroform jeruk purut

Parameter	Hasil
Bentuk ekstrak	Kental
Bau	Khas jeruk purut
Warna	Hijau kehitaman

Jeruk purut mengandung minyak atsiri dan kandungan senyawa lainnya yang tidak stabil akan pemanasan. Metode maserasi digunakan karena dapat digunakan untuk senyawa yang bersifat termostabil (Harbone, 1996). Dalam penelitian ini digunakan metanol sebagai pelarut ekstraksi karena metanol pelarut yang banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam (Susanti *et al.*, 2012). Metanol memiliki titik didih yang rendah (65 °C). Jika memakai pelarut yang memiliki titik didih tinggi, minyak atsiri akan terdekomposisi (Harianingsih *et al.*, 2017). Setelah maserasi kemudian dilakukan evaporasi guna memisahkan pelarut dari ekstrak. Hasil ekstraksi yang diperoleh sebanyak 40 g ekstrak kental. Setelah itu ekstrak kental di fraksinasi dengan etil asetat dan diperoleh hasil sebanyak 2 g dari 10 g ekstrak kental yang difraksinasi. Fraksinasi digunakan untuk memisahkan senyawa utama dalam suatu tanaman dengan senyawa lainnya berdasarkan kepolaritasannya. Etil asetat merupakan jenis pelarut yang bersifat semi polar. Pelarut ini memiliki titik didih yang relatif rendah yaitu 77 °C sehingga memudahkan pemisahan minyak dari pelarutnya (Susanti *et al.*, 2012).

Limonine merupakan senyawa yang memiliki aktivitas antivirus (Dogmo dkk, 2009). Menurut Nazhan *et al.*, (2019), limonin dapat proses dapat digunakan sebagai agen antivirus

karena menghambat proses hemaglutinasi pada *Newcastle disease*. Limonin mampu menurunkan densitas protein yang terdapat dalam sel Hela dan RD.



Gambar 1. Struktur Limonine (sumber:pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

Berdasarkan hal tersebut, efek fraksi etil asetat ekstrak metanol kulit jeruk purut pada model *Newcastle disease* sebagai antivirus disebabkan oleh kandungan limonin yang mampu mencegah ikatan antara virus dan sel target dengan cara menurunkan konsentrasi asam sialat. Penurunan jumlah ikatan antara virus dan reseptor akan menyebabkan penurunan jumlah titer hemaglutinasi.

Hasil Inokulasi

Uji aktivitas virus *Newcastle disease* dilakukan pada 12 TAB berumur 9-11 hari. Telur ayam didapatkan dari peternak yang berada di Desa Madu Kecamatan Mojosongo Kabupaten Boyolali. Induk ayam belum divaksinasi sehingga telur diharapkan tidak memiliki antibodi terhadap virus Newcastle. Keadaan tersebut akan meminimalisasi adanya hasil positif palsu pada penelitian. Virus yang digunakan dalam penelitian adalah vaksin virus aktif Medivac ND La Sota. Virus yang diinokulasikan ke dalam cairan allantois adalah sebanyak 10 dosis sekali injeksi. Dipilih vaksin Medivac ND La Sota dikarenakan mudah didapat dan juga banyak digunakan dalam penelitian hemaglutinasi.

Senyawa diinokulasikan kedalam cairan allantois dari TAB. Pemilihan umur embrio dan rute ditentukan oleh karakteristik dan sifat virus terhadap membran yang berada dalam telur (Burlison *et al.*, 1992). Cairan allantois merupakan media yang sesuai untuk perkembangan *Newcastle disease* virus (Fidyah *et al.*, 2015).

Embrio diamati setiap 24, 48, dan 72 jam. Kematian embrio sebelum 24 jam dianggap ada kontaminasi atau kesalahan saat melakukan inokulasi virus dan sampel. Hasil penelitian menunjukkan selama 72 jam, tidak ada kematian embrio pada kelompok 1 (kelompok kontrol) dan kelompok 2 (konsentrasi 1 µg/mL). Sedangkan pada konsentrasi 10 µg/mL dan 100 µg/mL embrio ayam mengalami kematian. Kematian 1 embrio pada kelompok 3, sehingga terdapat 2 telur dengan embrio yang masih hidup. Pada kelompok 4 menyisakan 1 embrio yang masih hidup. Hasil pengamatan dari penelitian ini dapat dilihat di tabel 5 dan tabel 6.

Dari data pada tabel 5, kelompok 1 (kontrol) memiliki persentase kematian embrio 0%; kelompok 1 dengan nilai 0% dan kelompok 2 dengan nilai 33,3% dan kelompok 4 dengan persentase terbanyak dengan nilai 66,7%. Kematian embrio bisa diakibatkan karena kesalahan saat penginjeksian senyawa mungkin karena jarum menusuk embrio atau pembuluh darah, konsentrasi senyawa yang diinjeksikan toksik. Jenis virus yang digunakan adalah vaksin aktif Medivac ND La Sota Vaksin Medivac 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, 2003).

Tabel 5. Kematian embrio dalam masa inkubasi

Perlakuan pada telur berumur 9-12 hari	Kematian embrio selama inkubasi			% Kematian
	24 jam	48 jam	72 jam	
Kelompok 1 kontrol tanpa senyawa	3/3 hidup	3/3 hidup	3/3 hidup	0%
Kelompok 2 senyawa uji dengan konsentrasi 1 µg/mL	3/3 hidup	3/3 hidup	3/3 hidup	0%
Kelompok 3 senyawa uji dengan konsentrasi 10 µg/mL	2/3 hidup	2/3 hidup	2/3 hidup	33,3%
Kelompok 4 senyawa uji dengan konsentrasi 100 µg/mL	1/3 hidup	1/3 hidup	1/3 hidup	66,7%

Tabel 6. Hasil *candling* embrio selama 36 jam







Perlakuan	Percobaan	Waktu inkubasi		
		24 jam	48 jam	72 jam
Kelompok 1: 1 µg/mL	A	+	+	+
	B	+	+	+
	C	+	+	+
Kelompok 2: 10 µg/mL	A	+	+	+
	B	+	+	+
	C	+	+	+
Kelompok 3: 100 µg/mL	A	+	+	+
	B	+	+	+
	C	-	-	-
Kelompok 4: Kontrol tanpa senyawa	K1	+	+	+
	K2	-	-	-
	K3	-	-	-

Keterangan:

(+) embrio hidup dan (-) embrio mati

Hasil Uji Hemaglutinasi







Hasil positif uji hemaglutinasi adalah tidak terbentuknya dot (endapan) pada sumuran hasil percobaan membuktikan bahwa eritrosit mengalami aglutinasi akibat interaksi dengan Newcastle Disease Virus. Eritrosit dengan protein virus *Newcastle disease* membentuk ikatan sehingga cairan keruh (tidak terbentuk dot). Pembacaan uji hemaglutinasi dengan melihat terjadinya endapan eritrosit ayam (dot), apabila tidak terjadi endapan (keruh) dinyatakan positif hemaglutinasi.

Perlakuan	Replikasi	Sumuran ke-												Jumlah titer
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Kelompok 1 (Kontrol)	1													2 ¹¹
	2													2 ¹¹
	3													2 ¹⁰
Kelompok 2 (1 µg/mL)	1													2 ¹⁰
	2													2 ⁷
	3													2 ⁷

Keterangan :

● (tidak terjadi hemaglutinasi) ○ (terjadi hemaglutinasi)

Gambar 2. Hasil uji hemaglutinasi pada kelompok 1 dan 2

Perlakuan	Replikasi	Sumuran ke-												Jumlah titer
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Kelompok 3 (10 µg/mL)	1													2 ⁰
	2													2 ⁰
	3													2 ⁰
Kelompok 4 (100 µg/mL)	1													2 ⁰
	2													2 ⁰
	3													2 ⁰

Keterangan :

● (tidak terjadi hemaglutinasi) ○ (terjadi hemaglutinasi)

Gambar 2. Hasil uji hemaglutinasi pada kelompok 3 dan 4

Tabel 9. Perhitungan titer virus

Kelompok Pelakuan	Titer Hemaglutinasi (HAU)			Rerata Titer HA (HAU)	% Penghambatan
	TAB ke-				
	1	2	3		
1 (Kontrol)	211	211	210	210,6	0%
2 (1 µg/mL)	210	27	27	28	83,506%
3 (10 µg/mL)	20	20	20	20	99,93%
4 (100 µg/mL)	20	20	20	20	99,93%

Data penelitian menunjukkan fraksi etil asetat ekstrak metanol kulit jeruk purut (*Citrus hystrix*) memiliki aktivitas antivirus terhadap *Newcastle disease*. Pada hasil penelitian menunjukkan penurunan jumlah titer pada konsentrasi senyawa yang semakin tinggi. Rata-rata jumlah titer pada kelompok 1 adalah 210,6, kelompok 2 adalah 28, pada kelompok 3 dan 4 adalah 20. Rata-rata jumlah tertinggi adalah kelompok 1 (kontrol) sedangkan kelompok lain

lebih rendah rata-ratanya. Hal tersebut sesuai dikarenakan tidak adanya senyawa penghambat replikasi virus di dalam allantois telur. Peningkatan jumlah titer hemaglutinasi dipengaruhi oleh peningkatan jumlah virus (dosis) yang diinokulasikan ke dalam TAB. Persen penghambatan pada kelompok 1 menunjukkan hasil 0%, pada kelompok 2 adalah 83,506%, kelompok 3 adalah 99,93%, dan kelompok 4 adalah 99,93%. Data menunjukkan hasil yang linear. Pada kelompok kontrol virus, tidak menandakan terjadinya hemaglutinasi pada sumuran bisa disebabkan oleh tidak stabilnya virus yang berasal dari vaksin Medivac ND La Sota.

Newcastle disease merupakan suatu virus RNA yang memiliki nukleokapsid dan envelope. Menurut DeLeeuwe and Peeters (1999), *Newcastle disease virus* memiliki protein HN (hemagglutinin neuraminidase) yang dapat mengaglutinasi sel darah merah. Protein hemagglutinin memiliki kemampuan untuk berikatan dengan reseptor asam sialat yang terdapat pada eritrosit sehingga menyebabkan kekeruhan pada hasil (tidak dot). Prinsip pengujian hemagglutinasinya adalah virus ND yang mempunyai protein hemagglutinin akan berikatan dengan eritrosit yang akan menyebabkan terjadinya hemagglutinasi (kekeruhan). Dugaan mekanisme fraksi etil asetat ekstrak metanol kulit jeruk purut sebagai agen antivirus adalah kandungan limonin yang ada pada sampel mencegah ikatan antara virus ND dan eritrosit dengan cara menurunkan konsentrasi asam sialat, yang akan menyebabkan hasil sumuran menjadi dot (tidak terjadi hemagglutinasi). Uji Hemagglutinasi dapat digunakan untuk mendeteksi virus yang memiliki hemagglutinin (Burleson et al., 1992).

Contoh obat antivirus adalah hidroksiklorokuin, lopinavir, ritonavir, ribavirin, remdesivir, tocilizumab. Untuk mengetahui potensi fraksi etil asetat ekstrak metanol kulit jeruk purut sebagai antivirus dilakukan perbandingan dengan antivirus ribavirin. Pada penelitian yang dilakukan Khan *et al*, (2018), Ribavirin digunakan sebagai antivirus terhadap *Newcastle disease*. Ribavirin memiliki persen penghambatan sebesar 83% dengan dosis 20 µg/mL. Ribavirin merupakan analog guanosisin yang cincin purinya tidak lengkap. Ribavirin menghasilkan spektrum luas terhadap beberapa virus RNA dan DNA. Fosforilasi intrasel ribavirin trifosfat mengganggu tahap awal transkripsi virus. Hal ini menghambat elongasi mRNA serta sintesis ribonukleoprotein (replikasi RNA dan ekspresi gen).

Dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak metanol kulit jeruk purut (*Citrus hystrix*) memiliki aktivitas antivirus yang baik. Dilihat dari semakin besar kadar yang diberikan semakin banyak dot yang dihasilkan, begitupun sebaliknya dan hasil titer mengalami penurunan pada kenaikan konsentrasi senyawa yang diberikan.

KESIMPULAN

Hasil penelitian aktivitas antivirus ekstrak metanol jeruk purut menunjukkan adanya aktivitas antivirus terhadap virus Newcastle. Adanya aktivitas tersebut dilihat melalui uji hemagglutinasi yang menunjukkan adanya penurunan jumlah titer pada kenaikan konsentrasi senyawa. Persentase penghambatan menunjukkan hasil yang linear yaitu 83,50%; 99,93%; dan 99,93% pada konsentrasi 1µg/mL, 10 µg/mL dan 100 µg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

Abdisa T. and Tagesu T., 2003, Review on Newcastle Disease of Poultry and its Public Health Importance, *Journal of Veterinary Science & Technology*, 8 (3)

Alexander D. and Gough R., 2003, Newcastle and Other Avian Paramyxovirus and Pneumovirus

- Infection, Dalam *Disease of Poultry*, Iowa State University Press, Ames, pp. 63–87.
- Black J., 2008, *Microbiology*, 7th ed., Wiley, United State.
- Burleson F.G., Thomas M.C. and Danny L., 1992, *Virology, a laboratory manual*, Academic Press, London, United Kingdom.
- Dalimartha S., 2000, *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*, Trobus Agriwidya., Bogor.
- DeLeeuwe O.S. and Peeters B., 1999, Complete Nucleotide Sequence Of Newcastle Disease Virus: Evidence For The Existence Of A New Genus Within The Subfamily Paramyxovirinae., *J. Gen. Virol*, 80, 131–136.
- Depkes RI, 2007, *Riset Kesehatan Dasar*, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta.
- Diniatik, Kusuma A.M. and Purwaningrum O., 2011, Uji Aktivitas Antivirus Eksrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruitz & Pav) Terhadap Virus Newcastle Disease (ND) Dan Profil Kromatografi Lapis Tipisnya, *PHARMACY*, 08 (01), 51–70.
- Dogmo P.M.J., Tatsadjieu L.N., Tchinda E., Kuate J., Zollo P.H.A. and C. Menut, 2009, Essential Oil of Citrus aurantifolia from Cameroon and Their Antifungal Activity Against *Phaeoramularia angolensis*, *African Journal of Agricultural Research*, 4 (4), 354–358.
- Esam E., Aldehbiani A.Y. and Wael H., 2017, Partial molecular characterization of the Fig latent virus 1 (FLV-1) infecting figs in Western Saudi Arabia, *Research Journal of Biotechnology*, 2 (3), 91–98.
- Ferreira L., Villar E. and Munoz-Barroso I., 2004, No Reseptors, Gangliosides and N glycoproteins function as Newcastle disease virus Title, , 36 (*Int. J. Biochem*), 2344–2356.
- Fidyah F., W.M. H., A. S. and S. B., 2015, Isolasi dan Identifikasi Egg Drop Syndrome Virus dengan Uji Hemaglutinasi dan Hemaglutinasi Inhibisi, *Jurnal Sain Veteriner*, 33 (1), 59–68.
- Harbone J., 1996, *Metode Fitokimia: Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*. Penerjemah: Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, ITB, Bandung.
- 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, J.G. C., Cho W.K. and J.Y. M., 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.
- Jin Y.H., Choi J.G., Cho W.K. and 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.
- Khan A.U., Yasin M., Shafee M., Ullah N. and Tariq M., 2018, In-ovo Antiviral Effect of *Nigella sativa* Extract against Newcastle Disease Virus in Experimentally Infected Chicken Embryonated Eggs, *Pakistan Veterinary Journal*, 38 (4), 434–437.
- Nattadiputra S. and Munaf S., 2009, Aminoglikosida dan Beberapa Antibiotika Khusus, Dalam *Kumpulan Kuliah Farmakologi*, EGC, Jakarta, p. 631.
- Nazhan J., Majeed A.S.A. and Abd A.H., 2019, Antiviral activity of arctigenin against newcastle disease virus in vitro, *Research Journal of Chemistry and Environment*, 23 (Specia), 68–76.
- Susanti A.D., Ardiana D., Gumelar G. and Bening Y., 2012, Polaritas Pelarut Sebagai Pertimbangan Dalam Pemilihan Pelarut Untuk Ekstraksi Minyak Bekatul Dari Bekatul Varietas Ketan (*Oriza sativa glatinosa*), *Symposium Nasional RAPI XI FT UMS-2012*, 8–14.
- Wlillimson, T U. and A.E.T.H W., 2021, Isolasi, identifikasi, sifat fisik, dan biologi virus tetelo yang diisolasi dari kasus lapangan, *Jurnal Veteriner Desember*, 13, 425–433.
- Wungsintaweekul J., Sitthithaworn W., Putalun W., Pfeifhoffer H.W. and Brantner A., 2010, Antimicrobial, antioxidant activities and chemical composition of selected Thai spices, *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 32 (6), 589–598.