

UJI AKTIVITAS ANTIVIRUS EKSTRAK ETANOL DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum* Ruitz & Pav) TERHADAP VIRUS *NEWCASTLE DISEASE* (ND) DAN PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPISNYA

Diniatik, Anjar Mahardian Kusuma, Okti Purwaningrum

Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto
Kampus 1 UMP, Jl. Raya Dukuwaluh telp. (0281) 636751

ABSTRAK

Virus merupakan parasit berukuran mikroskopik, menginfeksi sel organisme biologis, dan hanya dapat bereproduksi dalam material hidup. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya aktivitas anti virus dari ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruitz & Pav) Terhadap Virus *Newcastle Disease* dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. Ekstrak dibuat dengan cara maserasi menggunakan etanol 96%. Penelitian ini dilakukan secara in ovo yaitu dengan menggunakan telur ayam berembrio umur 9 – 10 hari. Pengamatan penghambatan virus digunakan uji hemaglutinasi (HA). Penelitian ini dilakukan dengan uji anava. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah mampu menghambat pertumbuhan virus *Newcastle Disease* konsentrasi yang digunakan adalah 1, 10, 100 µg/ml. Dari ketiga konsentrasi tersebut menunjukkan bahwa makin tinggi konsentrasi makin besar pula hambatan terhadap pertumbuhan virus dengan hambatan tertinggi 94,79% dan terendah 50%. Untuk mengetahui mana yang poten antara ketiga konsentrasi terhadap virus *Newcastle Disease* digunakan uji BNT, hasilnya menunjukkan perbedaan bermakna secara statistik (0,05) berarti aktivitas antivirus ekstrak etanol daun sirih merah terhadap virus *Newcastle Disease* mempunyai perbedaan yang bermakna antara konsentrasi 1 µg/ml dengan 10 µg/ml dan 1 µg/ml dengan 100 µg/ml. Aktivitas antivirus ekstrak etanol daun sirih merah mulai 10 µg/ml yang secara statistik tidak berbeda bermakna dengan konsentrasi 100 µg/ml. Ekstrak etanol daun sirih merah memiliki kandungan senyawa kimia yaitu Flavonoid, Saponin, Tanin, Minyak Atsiri.

Kata Kunci : antivirus, ekstrak etanol, daun sirih merah, virus new castle disease, kromatografi lapis tipis.

ABSTRACT

Virus is the microscopic of measured parasite, to infection the organism cell, and only reproducing in know that there is antiviral activity from the ethanol extract of Sirih Merah leaf (Piper crocatum Ruitz & Pav) into Newcastle Disease virus with thin layer chromatography profile. The extract made by the maceration method with using the ethanol 96%. This research did conducting in ovo, there is chicken's egg embryo with the age 9 – 10 days. The inspection of hindrance virus is used for hemagglutination test (HA test). This research analyze with the anava test. The resulting of research indicates that the ethanol extract of Sirih Merah leaf can delay the growth Newcastle Disease virus. The concentration third of this show that more increase of concentration, the highest

94,79% of purpose to 50%. For knowing which one of more potent between concentration of third to Newcastle Disease virus with used BNT test, those result to show the different of meaning manner statistic ($P < 0,05$), it means of that the activity of antiviral ethanol extract Sirih merah leaf to Newcastle Disease virus has the different meaning between $1 \mu\text{g/ml}$ with $10 \mu\text{g/ml}$ and $1 \mu\text{g/ml}$ with $100 \mu\text{g/ml}$ concentration. Activity of antiviral ethanol extract sirih merah leaf is $10 \mu\text{g/ml}$ manner statistic Ethanol extract Sirih Merah leaf have content of chemical compound like flavonoid, saponin, tannin.

Keyword : antiviral, ethanol extract, sirih merah leaf, Newcastle Disease, thin layer chromatography.

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Makalah

Saat ini banyak obat-obatan modern dibuat dari tanaman obat alami. Banyak telah terbukti penyakit kronis dapat disembuhkan dengan menggunakan tanaman obat tanpa campuran bahan kimia. Salah satu tanaman yang digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional adalah tanaman sirih. Tanaman sirih mempunyai banyak spesies dan memiliki jenis yang beragam, seperti sirih gading, sirih hijau, sirih hitam, sirih kuning dan sirih merah. Semua jenis tanaman sirih memiliki ciri yang hampir sama yaitu tanamannya merambat dengan bentuk daun menyerupai hati dan bertangkai yang tumbuh berselang seling dari batangnya. Sirih merah (*Piper crocatum* Ruitz & Pav) termasuk dalam keluarga *Piperaceae*.

Tanaman sirih merah (*Piper crocatum* Ruitz & Pav) berasal dari

Amerika Tengah, tetapi sekarang dianggap sebagai tanaman asli karena multikhasiat mengatasi beragam penyakit (Duryatmo, 2006). Sirih merah adalah jenis sirih-sirihan yang sangat berkhasiat untuk menyembuhkan berbagai penyakit. Penggunaan sirih merah dapat digunakan dalam bentuk segar, simplisia maupun ekstrak kapsul. Secara empiris sirih merah dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit seperti diabetes melitus, penyakit jantung koroner, asam urat, hipertensi, hepatitis, batu ginjal, menurunkan kolesterol, mencegah stroke, radang liver, radang prostat, radang mata, keputihan, maag, kelelahan, nyeri sendi, memperhalus kulit. peradangan organ tubuh (paru, ginjal, hati, dan pencernaan), menghambat pertumbuhan sel-sel kanker serta luka yang sulit sembuh (Duryatmo, 2006). Selain sirih merah, cabe jawa juga termasuk dalam famili *Piperaceae* yang

mempunyai senyawa afrodisiaka dan sebagai antivirus. Dan yang termasuk senyawa afrodisiaka adalah turunan steroid, saponin, alkaloid dan tanin (Moeloek N, 2009). Dengan demikian, karena sirih merah dan cabe jawa termasuk dalam golongan famili yang sama yaitu famili *Piperaceae* yang juga memiliki kandungan senyawa yang sama yaitu saponin, alkaloid dan tanin. Maka, memberikan dorongan melakukan penelitian mengenai potensi sirih merah sebagai antivirus. Karena, penelitian daun *P.crocatum* dalam aktivitas antivirus terhadap *Newcastle Disease* belum dilakukan.

Menurut Syariefa (2006) seluruh bagian tanaman sirih merah mengandung unsur-unsur zat kimia yang bermanfaat untuk pengobatan, tetapi bagian tanaman sirih merah yang paling banyak digunakan sebagai obat adalah daunnya. Senyawa fitokimia yang terkandung dalam daun sirih merah yakni alkaloid, saponin, tanin dan flavonoid. Senyawa aktif alkaloid dan flavonoid memiliki aktivitas hipoglikemik atau penurunan kadar gula darah. Hara (1993) menyatakan senyawa tanin dan saponin dapat dipakai sebagai antimikroba (bakteri dan virus).

Virus adalah parasit berukuran mikroskopik yang menginfeksi sel organisme biologis. Virus hanya dapat bereproduksi di dalam material hidup dengan menginvasi dan memanfaatkan sel makhluk hidup karena virus tidak memiliki perlengkapan selular untuk bereproduksi sendiri. Dalam sel inang, virus merupakan parasit obligat dan di luar inangnya menjadi tak berdaya. Biasanya virus mengandung sejumlah kecil asam nukleat (DNA atau RNA, tetapi tidak kombinasi keduanya) yang diselubungi semacam bahan pelindung yang terdiri atas protein, lipid, glikoprotein atau kombinasi ketiganya. Virus sering diperdebatkan statusnya sebagai makhluk hidup karena tidak dapat menjalankan fungsi biologisnya secara bebas. Karena karakteristik khasnya ini virus selalu terasosiasi dengan penyakit tertentu, baik pada manusia (misalnya virus influenza dan HIV), hewan (misalnya virus flu burung dan *Newcastle Disease*) atau tanaman (misalnya virus mosaic tembakau/TMF). *Newcastle Disease* (ND) adalah penyakit yang sangat menular, dengan angka kematian yang tinggi, disebabkan oleh virus genus paramyxovirus dengan famili paramyxoviridae. Nama lain untuk *Newcastle Disease* (ND) adalah tetelo,

pseudovogolpest, sampar ayam, *Rhaniket*, *Pneumoencephalitis* dan *Tantaor furens*.

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut diatas maka menarik untuk diteliti:

1. Apakah ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*Ruitz & Pav) memiliki aktivitas antivirus terhadap *Newcastle Disease*?
2. Bagaimana profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak etanol daun sirih merah?

B. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui aktivitas antivirus ekstrak etanol daun sirih merah terhadap *Newcastle Disease*.
2. Mengetahui profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak etanol daun sirih merah.

METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

1. Alat

- a. Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan serbuk yaitu : blender, alat saring, alat gelas.
- b. Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak : bejana untuk meserasi, alat timbang, sendok pengaduk, kain saring.

c. Alat uji anti virus antara lain : alat-alat gelas, timbangan analitik, inkubator, nampan telur, spuit injeksi, tabung reaksi, mikroplate dasar U, diluter, multimikro pipet, kanul, flakon, lampu spiritus, bor telur, pinset, gunting, lampu teropong.

d. Alat untuk deteksi senyawa menggunakan KLT : alat-alat gelas, lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, bejana KLT, lempeng selulosa, lempeng silka gel F 254.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. Daun sirih merah (*Piper crocatum*Ruitz & Pav)
- b. Untuk uji aktivitas antivirusdigunakan telur ayam berembrio yang berumur 9-11 hari
- c. *Virus Newcastle Disease*
- d. Eritrosit ayam
- e. Bahan kimia yang digunakan adalah : etanol 96%, etanol70%, iodine tincture, larutan PBS (Phosphate Buffer Saline), parafin padat, asam asetat 15%, pereaksi sitroborat, rutin, etil asetat, toluena, vanillin, asam sulfat pekat, aquades, eugenol, metanol.

B. Variabel dalam Penelitian

Definisi operasional variabel dalam penelitian ini:

1. Variabel Bebas : konsentrasi ekstrak etanol daun sirihmerah (*Piper crocatum*Ruitz & Pav)
2. Variabel tergantung : efek antivirus ekstrak etanol daun sirihmerah terhadap telur ayam berembrio yang terinfeksi virus *Newcastle Disease*.
3. Variabel terkendali: telur ayam berembrio umur 9-10 hari yang diinfeksi virus *Newcastle Disease*.

C. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman sirih merah (*Piper crocatum* Ruitz & Pav)

Determinasi tanaman sirih merah (*Piper crocatum*) dilakukan di laboratorium Morfologi dan Taksonomi Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto. Determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan bahwa tumbuhan yang digunakan untuk penelitian benar-benar daun sirih merah (*Piper crocatum*)

2. Penyiapan simplisia

Pada penelitian ini digunakan daun sirih merah yang didapat dari Desa Ijo, Kecamatan Rowokele, Kebumen pada bulan April 2010. Daun yang telah dikumpulkan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang

menempel. Setelah daun sirih merah dibersihkan, kemudian diangan-anginkan dan dikeringkan dalam lemari pengering sampai daun mudah untuk dihancurkan ketika diremas. Simplisia daun sirih merah yang diperoleh, diserbuk menggunakan mesin serbuk sampai menjadi serbuk. Serbuk diayak dengan ayakan No 20/40.

3. Pembuatan ekstrak daun sirih merah Serbuk sebanyak 200 g diekstraksi dengan teknik maserasi menggunakan pelarut (solvent) etanol 96%. Ekstraksi dilakukan selama 2 x 24 jam. Menggunakan perbandingan penyari dengan simplisia (1:10) pada 1 x 24 jam pertama, saring dengan kain penyaring selanjutnya ampas diekstraksi kembali dengan penyari etanol 96% (1:4) pada 1 x 24 jam kedua. Maserat diuapkan penyarinya hingga diperoleh ekstrak kental daun sirih merah. Ekstrak yang diperoleh digunakan untuk melakukan uji aktivitas terhadap virus *Newcastle Disease*.

4. Perlakuan telur ayam berembrio

Telur ayam berembrio didapat dari Dinas Peternakan Bantul, Yogyakarta. Telur ayam berembrio yang digunakan berumur antara 9-10 hari, mempunyai bentuk dan berat yang hampir sama, rongga udara telur terletak pada ujung

telur. Telur ditempatkan pada inkubator dengan suhu 37^o C.

D. Uji Aktivitas Antivirus dengan metode Hemaglutinasi

Ekstrak etanol daun sirih merah dengan seri kadar yang dibuat, diuji aktivitas antivirusnya terhadap virus *Newcastle Disease* dengan media kultivasi virus berupa telur ayam berembrio. Pada uji ini membutuhkan virus *Newcastle Disease* yang diinjeksikan pada telur ayam berembrio dibagian rongga allantois sebanyak 0,2 mL. Uji ini dibagi dalam 4 kelompok perlakuan pada semua ekstrak, masing-masing kelompok terdiri dari 3 telur ayam berembrio.

1. Kelompok 1

Diberi ekstrak daun sirih merah 1 µg/ml dan virus *Newcastle Disease* sebanyak 0,2 mL.

2. Kelompok 2

Diberi ekstrak daun sirih merah 10 µg/ml dan virus *Newcastle Disease* sebanyak 0,2 mL

3. Kelompok 3

Diberi ekstrak daun sirih merah 100 µg/ml dan virus *Newcastle Disease* sebanyak 0,2 mL

4. Kelompok 4

Diberi virus *Newcastle Disease* sebanyak 0,2 mL.

Cara kerja uji ini adalah sebagai berikut:

a. Persiapan telur uji

Telur berembrio yang digunakan telah dieramkan 9-10 hari mempunyai bentuk dan berat yang hampir sama, kemudian diperiksa dengan lampu di dalam kamar gelap. Warna kuning telur tanpa vasculature (bintik hitam) menandakan embrio yang hidup. Bagian kepala embrio dan batas rongga hawa diberi tanda dengan pensil. Telur ditempatkan pada inkubator dengan suhu 37^oC.

b. Inokulasi virus dan sampel ke dalam ruang alantois

Kutub telur yang mengandung rongga hawa disekitar kepala embrio terlebih dahulu disterilkan dengan cara mengoleskan iodium, kemudian pada tempat tersebut dibuat lubang dengan cara dibor didekat pembuluh darah dan dekat rongga hawa. Hal ini dikarenakan injeksi dalam penelitian ini akan menambah volume dalam telur, padahal volume dalam telur sudah penuh. Sehingga terjadi penekanan dalam telur yang akan mengakibatkan lapisan rongga udara bisa pecah dan sampel yang kita injeksikan bisa keluar lagi. Kemudian masing-masing sampel dengan variasi konsentrasi diinokulasikan kedalam ruang alantois. Selanjutnya dengan cara yang sama, sebanyak 0,2 ml suspensi

virus diinokulasikan kedalam ruang alantois dengan menggunakan spuit injeksi 1 ml. Tutup lubang yang dibor tadi dengan parafin cair tujuannya agar pertumbuhan virus tanpa kontaminasi dari luar, kemudian telur berembrio diinkubasi dengan suhu 37°C selama 2-3 hari.

c. Membuka telur berembrio yang diinokulasi virus

Setelah dieramkan 2-3 hari, kerabang telur dipecahkan dengan pinset. Embrio ditekan kesamping dengan pinset, cairan alantois yang terdapat di sisi embrio dihisap dengan spuit. Selanjutnya cairan alantois disimpan pada tabung reaksi sesuai dengan variasi konsentrasi yang kita buat dan ditutup.

d. Uji hemaglutinasi

Uji hemaglutinasi dilakukan dengan menggunakan mikroplat dengan dasar "U" mempunyai 96 sumuran. Lubang sumuran diisi dengan larutan PBS (*Phosphat Buffer Saline*) sebanyak 0,5 ml mulai dari lubang sumuran 1-12 pada baris A sampai D, lubang mikroplat pada baris D digunakan sebagai kontrol virus. Lubang sumuran 1 pada baris A sampai C diisi dengan cairan alantois pada masing-masing seri konsentrasi sebanyak 0,5 ml dari telur ayam berembrio yang telah mengandung ekstrak etanol daun sirih

merah dan virus *NewcastleDisease*, dan pada baris D diisi dengan cairan alantois telur berembrio yang tidak diberi ekstrak (kontrol virus). Lakukan pencampuran menggunakan mikrotiter masing-masing konsentrasi dengan cara digoyang selama 12 putaran dimulai dari lubang 1 sampai 12. Tambahkan sebanyak 0,5 ml eritrosit ayam pada lubang 1 baris A sampai D, mikroplat tersebut dibiarkan pada suhu kamar selama 15-20 menit. Pembacaan uji hemaglutinasi dengan melihat terjadinya endapan eritrosit ayam, apabila tidak terjadi endapan seperti pada lubang kontrol virus dinyatakan negatif HA.

e. Perhitungan titer uji hemaglutinasi

Perhitungan hemaglutinasi dilakukan dengan cara menghitung lubang yang positif adanya endapan eritrosit ayam pada dasar sumuran dimulai dari enceran yang paling pekat (lubang 1). Apabila terjadi sampai pada lubang ke-5, maka titer hemaglutinasi dinyatakan dengan nilai 2^5 yaitu 32.

E. Analisis data

Dilakukan perhitungan titer dari cairan alantois, dengan sistem hemaglutinasi yang ada pada sumuran mikroplat dihitung persentase penghambatannya. Perhitungan persentase penghambatan

oleh ekstrak etanol daun sirih merah yang digunakan, menggunakan rumus:

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

Dimana:

P = Persentase penghambat infeksi

A = Jumlah titer pada telur ayam berembrio tanpa perlakuan ekstrak etanol daun sirih merah

B = Jumlah titer pada telur ayam berembrio dengan perlakuan ekstrak etanol daun sirih merah

Data persentase hambatan antiviral dapat di analisis dengan metode analisis varian pola searah dengan taraf 95%. Apabila hasil yang diperoleh dari uji anava menunjukkan perbedaan yang bermakna di lanjutkan dengan uji BNT dengan taraf 95% (Kuswandi, 2008).

F. Identifikasi Golongan Senyawa dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis
Disiapkan larutan uji, kemudian ditotolkan dengan pipa kapiler pada lempeng kromatografi lapis tipis silika gel F_{254} dan lempeng selulosa dengan ukuran 2 x 10 cm dan jarak elusi 8 cm. Lempeng sebelumnya telah dipanaskan pada oven dengan suhu 110°C selama 30 menit. Lempeng kemudian dimasukkan dalam bejana berisi fase gerak yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan

cara ditutup dengan kaca dan diolesi dengan vaselin. Elusi dilakukan sampai tanda batas elusi. Kemudian dikeluarkan, dikering anginkan dan hasilnya diidentifikasi. Identifikasi masing-masing dengan menggunakan pengamatan pada lampu UV 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya dilakukan perhitungan harga Rf dari masing-masing bercak, kemudian diidentifikasi golongan senyawa yang terkandung di dalamnya.

Identifikasi golongan senyawa kimia dari profil kromatografi hasil KLT dilakukan dengan cara memberikan pereaksi penampak bercak untuk masing-masing golongan senyawa. Hasilnya diidentifikasi dengan melihat warna bercak, baik dengan sinar UV 254 nm ataupun dengan sinar UV 366 nm. Reaksi positif ditunjukkan dengan warna.

1. Identifikasi flavonoid

Deteksi senyawa flavonoid dilakukan sebagai berikut:

Fase diam : selulosa

Fase gerak : asam asetat 15%

Pereaksi semprot : sitroborat

Pembanding : rutin

Positif : warna kuning pada sinar tampak

(Harborne,1987)

2. Identifikasi minyak atsiri

Deteksi senyawa minyak atsiri dilakukan sebagai berikut:

Fase diam : silika gel F₂₅₄
 Fase gerak : toluene : etil asetat (93:7)
 Pembanding : eugenol
 Pereaksi semprot : vanilin-asam sulfat
 Positif : warna coklat jingga, positif eugenol

(Depkes, 1987)

3. Tanin

Deteksi senyawa tanin dilakukan sebagai berikut:

Fase diam : silika gel F₂₅₄
 Fase gerak : etil asetat : metanol : air (10:1:1)
 Pereaksi semprot : FeCl₃

(Harborne,

1987)

4. Identifikasi saponin

Pembentukan busa yang mantap sewaktu mengekstraksi tumbuhan atau waktu memekatkan ekstrak tumbuhan merupakan bukti adanya saponin.

(Harborne,1987)

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Tanaman

Tanaman sirih merah (*Piper crocatum*) yang digunakan dalam penelitian dideterminasi di Laboratorium

Taksonomi Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Jendral Soedirman purwokerto. Tujuan determinasi untuk mendapatkan kebenaran identitas dengan jelas dari tanaman yang diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama penelitian Hasil determinasi menyatakan, bahwa spesimen tumbuhan tersebut adalah benar-benar tanaman *Piper crocatum* Ruitz & Pav. dari famili Piperaceae. Hasil determinasi tersebut berdasarkan buku *Flora of Java Vol II* (Backer and Van Den Brink, 1965).

B. Pengumpulan Bahan dan Pembuatan Simplisia Daun Sirih Merah (*P. crocatum*) Pada penelitian ini menggunakan daun tanaman sirih merah yang diambil dari desa Ijo, Kecamatan Rowokele, Kebumen. Daun tanaman sirih merah (*Piper crocatum*) diambil pada bulan April 2010. Daun sirih merah yang didapatkan, dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan kotoran atau kontaminasi yang berupa tanah atau materi lain pada daun tersebut. Dipilih daun yang bagus untuk selanjutnya daun diangin-anginkan dan dikeringkan pada almari pengering. Selama pemanasan, bahan ditata tidak bertumpuk dan dibolak-balik agar pemanasan merata serta proses pengeringan berlangsung

cepat. Pengeringan dilakukan sampai daun mudah untuk dihancurkan ketika diremas. Pengeringan menggunakan panas matahari dihindari untuk mencegah kemungkinan adanya perubahan komponen bahan aktif yang terkandung dalam tanaman sirih merah. Tujuan dari pengeringan adalah mencegah pertumbuhan jamur atau mikroorganisme dan mencegah penguraian senyawa aktif oleh reaksi enzimatis dan proses hidrolisis karena kandungan air yang tinggi, agar simplisia yang dihasilkan tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang relatif lama. Simplisia kering yang diperoleh selanjutnya diserbuk dengan menggunakan blender untuk memperbesar luas permukaan sehingga kontak permukaan partikel simplisia dengan penyari semakin besar dan penyarian lebih optimal. Simplisia selanjutnya diayak menggunakan ayakan mesh 20/40 yang berarti sebanyak 100% simplisia kering lolos pada ayakan mesh 20, kemudian sebanyak 40% dari 100% simplisia kering lolos ayakan mesh 40, Pada umumnya proses pengayakan ini penting dalam proses ekstraksi, karena dengan adanya pengecilan ukuran partikel akan memperluas permukaan kontak serbuk dengan penyari sehingga

ekstraksi menjadi lebih maksimal dan kandungan zat aktif dapat tersari secara optimal.

C. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruitz & Pav)

Metode penyarian yang digunakan adalah maserasi. Metode ini merupakan metode yang paling sederhana karena mudah dilakukan, murah, tidak memerlukan peralatan yang canggih. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Pada penelitian ini dilakukan pengadukan dan remaserasi untuk meningkatkan efektifitas ekstraksi. Maserasi dilakukan selama 2 x 24 jam dengan perbandingan antara simplisia dengan etanol 96% yaitu 1 : 10 pada 1 x 24 jam pertama, dan pada 1 x 24 jam kedua kedua 1 : 4. Caranya yaitu serbuk simplisia sebanyak 200 gram di maserasi dengan etanol 96% sebanyak 2 liter, kemudian dienap-tuangkan dan diperas. Ampas yang diperoleh dimaserasi lagi dengan etanol 96% sebanyak 800 ml. Pada penelitian ini, penyari yang digunakan yaitu etanol 96% karena dapat menarik senyawa-senyawa relatif polar seperti senyawa flavonoid, saponin dan senyawa polar lain yang terkandung dalam daun sirih merah (*Piper crocatum*). Dipilih etanol 96% karena

lebih efektif, tidak beracun, netral, absorpsi baik, dapat mencegah pertumbuhan kapang dan kuman, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit. Sari yang diperoleh diuapkan diatas penangas air hingga konsentrasi kental. Penguapan dilakukan untuk menghilangkan larutan penyari agar tidak mempengaruhi uji aktivitas antivirus.

D. Uji Aktivitas Antivirus

Uji aktivitas antivirus ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol dan sirih merah (*Piper crocatum*) dalam menghambat pertumbuhan virus *Newcastle Disease*, yang diinokulasikan dalam cairan alantois embrio ayam berumur 11 hari. Pada penelitian ini menggunakan 12 telur ayam berembrio yang dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok sebagai kontrol virus. Masing-masing kelompok menggunakan 3 telur ayam berembrio untuk replikasi. Tiga kelompok perlakuan mempunyai konsentrasi masing-masing sebagai berikut:

- a. Kelompok I pemberian ekstrak dengan konsentrasi 1 µg/ml
- b. Kelompok II pemberian ekstrak dengan konsentrasi 10µg/ml

c. Kelompok III pemberian ekstrak dengan konsentrasi 100µg/ml

d. Kelompok IV sebagai kontrol virus (kontrol negatif)

Kelompok I,II, dan kelompok III sebagai kelompok perlakuan masing-masing dibuat konsentrasi 1,10,dan 100 µg/ml yang ditambahkan dengan PBS (*Phosphate BufferSaline*) yang berfungsi sebagai pelarut. Kelompok IV yaitu kontrol virus yang digunakan untuk mengetahui kemampuan virus dalam replikasinya.

Tempat inokulasi virus terdiri dari tiga bagian yaitu hewan percobaan, kultur sel, dan telur ayam berembrio. Pada penelitian ini menggunakan telur ayam berembrio karena mempunyai kelebihan yaitu mudah didapat, murah dan mudah dikerjakan dilaboratorium. Telur ayam berembrio mempunyai 4 tempat yang digunakan sebagai inokulasi virus yaitu kantong merah telur, ruang anionik, membran korioalantois dan ruang alantois (Capuccino and Natalie, 1983). Pada penelitian ini menggunakan ruang alantois karena ruang alantois berisi cairan alantois yang selalu diproduksi seiring dengan pertumbuhan embrio

E. Uji Aktivitas Antivirus ekstrak etanol daun sirih merah terhadap virus *NewcastleDisease*

Pada penelitian ini menggunakan uji Hemaglutinasi. Uji HA dapat digunakan untuk mendeteksi virus yang memiliki hemaglutinin. Adanya hemaglutinin akan dapat mengaglutinasi eritrosit di beberapa spesies unggas, mamalia maupun manusia. Pengujian hemaglutinasi memerlukan suspensi eritrosit ayam dengan konsentrasi 0,5%. Cara mendapatkan eritrosit ayam yaitu dengan cara mengambil darah ayam melalui vena branchialis dengan menggunakan *sprit* sebanyak 3 ml kemudian dimasukkan dalam tabung venoject yang telah diisi dengan antikoagulan. Darah tersebut disentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan 3000 rpm (rotasi per menit). Supernatan dibuang sisa endapannya dicuci dengan menambahkan PBS, kemudian disentrifuge lagi selama 1 menit. Setelah terjadi endapan, supernatannya dibuang. Pencucian tersebut diulang sampai tiga kali dengan cara yang sama hingga didapatkan suspensi eritrosit ayam dengan konsentrasi 100%. Suspensi eritrosit ayam dengan konsentrasi 0,5% didapatkan dengan menambahkan PBS hingga konsentrasi 0,5%.

Uji hemaglutinasi mikrotiter pada penelitian ini digunakan untuk mengetahui titer isolat, dengan menggunakan mikroplate bentuk "U". Langkah pertama yang dilakukan adalah lubang mikroplate diisi dengan PBS sebanyak 0,5 ml dan eritrosit ayam dengan konsentrasi 0,5% pada semua lubang (baris A hingga baris D). Baris A sebagai kelompok 1, baris B sebagai kelompok II, baris C sebagai kelompok III dan baris D sebagai kelompok IV (kontrol virus). Ditambahkan sebanyak 0,5 ml masing-masing kelompok konsentrasi (1,10,100 µg/ml dan kontrol virus) pada lubang mikroplate sumuran no 1 pada masing-masing baris, dan dibuat enceran secara seri sampai pada lubang sumuran no 12 dengan digoyang menggunakan mikrotiter selama 30 detik. Pelat mikrotiter tersebut di diamkan selama 15 menit. Hasil uji HA positif ditandai dengan adanya endapan eritrosit berbentuk titik ditengah sumuran. Perhitungan hemaglutinasi unit dilakukan dengan cara menghitung lubang yang positif dimulai dari enceran paling pekat (lubang pertama). Pemilihan konsentrasi (1,10,100 µg/ml) bertujuan untuk mengetahui besarnya daya hambat ekstrak terhadap virus berdasarkan variasi konsentrasi. Dapat

dilihat dari hasil titer cairan alantois embrio ayam pada telur kelompok I,II dan III dengan konsentrasi berturut-turut 1,10,dan 100 µg/ml sebagai respon penghambatan ekstrak terhadap virus keruang alantois embrio ayam. Kontrol

virus digunakan untuk membandingkan titer virus pada ruang alantois telur ayam berembrio yang diberi ekstrak dengan yang tidak diberi ekstrak.

Tabel 1. Hasil titer daya hambat antivirus ekstrak etanol Sirih Merah

Replikasi	Hasil tites daya hambat pada perlakuan			
	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	Kontrol virus
I	2 ⁴ = 16	2 ⁶ = 64	2 ⁸ = 256	2 ⁹ = 512
II	2 ⁵ = 32	2 ⁵ = 32	2 ⁸ = 256	2 ⁹ = 512
III	2 ⁵ = 32	2 ⁵ = 32	2 ⁸ = 256	2 ⁹ = 512

Daya hambat ekstrak etanol daun Sirih Merah terhadap virus *NewcastleDisease* yang menginfeksi telur ayam berembrio dapat dihitung persentasinya dengan menggunakan rumus:

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

Dimana:

P = Persentase penghambatan infeksi

A = Jumlah titer pada telur ayam berembrio tanpa perlakuan ekstrak etanol daun sirih merah

B = Jumlah titer pada telur ayam berembrio dengan perlakuan ekstrak etanol daun sirih merah.

Dari rumus tersebut dapat dilakukan perhitungan persentase daya hambat ekstrak etanol sirih merah, yaitu:

Rep 1

- 1 µg/ml =

$$\frac{512 - 256}{512} \times 100\% = 50\%$$

- 10 µg/ml =

$$\frac{512 - 64}{512} \times 100\% = 87,5\%$$

- 100 µg/ml =

$$\frac{512 - 16}{512} \times 100\% = 96,875\%$$

Dari perhitungan tersebut, diperoleh daya hambat ekstrak etanol daun sirih merah pada konsentrasi dosis 100 µg/ml mencapai rata-rata 94,792 %, pada konsentrasi dosis 10 µg/ml persentase daya hambatnya mencapai rata-rata 91,67 %, dan pada konsentrasi 1 µg/ml persentase daya hambatnya mencapai rata-rata 50 %. Hasil perhitungan persentase daya hambat ekstrak etanol daun Sirih Merah terhadap virus

Newcastle Disease dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 2. Hasil persentase daya hambat antivirus ekstrak etanol daun sirih merah

Replikasi	Presentase daya hambat antivirus pada perlakuan		
	100	10	1
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
I	96,875%	87,5%	50%
II	93,75%	93,75%	50%
III	93,75%	93,75%	50%

Dari tabel diatas menunjukkan bahwa pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ mempunyai daya hambat terbesar dibandingkan dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$ dan 1 $\mu\text{g/ml}$. Dari hal tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi dosis yang digunakan maka semakin tinggi daya hambat untuk menginfeksi virus *Newcastle Disease* tersebut. Ekstrak etanol daun sirih merah pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ bersifat toksik karena dapat menghambat dan mematikan semua virus *Newcastle Disease* pada plate mikro.

Perhitungan analisis tersebut menggunakan analisis varian satu arah (ANOVA satu arah) dengan tingkat kepercayaan 95%. Perhitungan analisis tersebut digunakan untuk mengetahui perbedaan aktivitas antivirus dari tiap kelompok perlakuan. Analisis varian satu arah pada kelompok perlakuan ekstrak

etanol daun sirih merah dengan konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ dan kontrol virus menunjukkan hasil yang heterogen. Dimana ditunjukkan dengan nilai F hitung sebesar 1452,467 yang lebih besar dari F tabel.

Dari hasil uji BNT menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar masing-masing konsentrasi. Dapat diketahui bahwa konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ dan konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ memberikan daya hambat yang berbeda signifikan terhadap infeksi virus *Newcastle Disease*. Sedangkan konsentrasi 10 μg dan 100 μg tidak berbeda signifikan. Aktivitas antivirus ekstrak etanol daun sirih merah mulai pada konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini dapat diperjelas pada tabel 4.

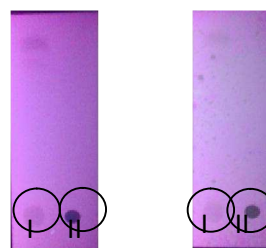
F. Hasil Identifikasi Senyawa dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)
Identifikasi golongan senyawa kimia yang berperan dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan KLT. Keuntungan dari penggunaan metode KLT adalah sederhana, murah dan membutuhkan waktu yang cepat dalam memisahkan yang berupa kromatogram spesifik dan dapat di dokumentasikan

serta memiliki daya resolusi atau daya pisahnya cukup tinggi (Stahl, 1985).

Dalam KLT terdiri atas 2 fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan dalam identifikasi senyawa adalah silika gel F_{254} dan selulosa. Digunakan fase diam silika gel karena penggunaan silika gel F_{254} lebih luas dan dapat memisahkan berbagai macam senyawa. Sedangkan penggunaan fase diam selulosa, karena selulosa dapat memisahkan senyawa dalam waktu yang lebih singkat. Fase gerak yang digunakan dalam identifikasi senyawa adalah berbagai macam kombinasi pelarut. Identifikasi tersebut dilanjutkan dengan penggunaan deteksi secara kualitatif yaitu sinar tampak, sinar UV 254 nm, sinar UV 366 nm serta pereaksi penampak bercak.

1. Identifikasi senyawa flavonoid

Identifikasi flavonoid menggunakan metode KLT dengan fase diam selulosa dan fase gerak asam asetat 15% serta deteksi dengan pereaksi sitroborat, dan pembandingan digunakan rutin. Digunakan rutin karena rutin sendiri terdapat sangat umum dalam tumbuhan dan merupakan senyawa yang banyak di jumpai sewaktu pemeriksaan senyawa flavonoid (Harborne, 1987)



(a) (b)
Gambar 3. Hasil KLT deteksi flavonoid fase diam selulosa, fase gerak asam asetat 15%, pembandingan rutin, deteksi di bawah UV 366 nm dan disemprot sitroborat diambil di bawah UV 366
I. Ekstrak etanol daun sirih merah
II. Rutin
(a) Deteksi di bawah lampu sinar UV 366 nm
(b) Setelah disemprot dengan pereaksi sitroborat pada sinar UV 366 nm

Tabel 3. Hasil identifikasi senyawa flavonoid

	hRf	Sebelum disemprot sitroborat pada sinar UV 360 nm	Setelah disemprot sitroborat pada sinar UV 366 nm	Hasil
Ekstrak	87,5	Kuning lemah	Kuning lemah	Positif

Kromatogram pemeriksaan senyawa flavonoid pada ekstrak etanol daun sirih merah yaitu adanya bercak warna kuning lemah pada UV 366 nm setelah disemprot sitroborat. Hal ini menunjukkan bahwa adanya senyawa flavonoid pada ekstrak etanol daun sirih merah. Akan tetapi senyawa rutin tidak memberikan bercak, hal itu disebabkan karena konsentrasi yang ditotolkan sedikit.

2. Identifikasi senyawa minyak atsiri

Identifikasi minyak atsiri menggunakan metode KLT dengan fase diam silika gel F₂₅₄, dan fase gerak toluen : etil asetat (93:7) dan pembanding digunakan eugenol serta dideteksi dengan pereaksi semprot vanilin-asam sulfat.

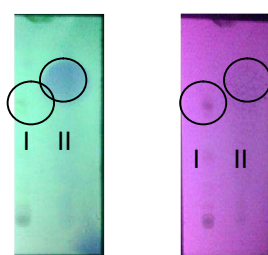
disemprot dengan vanilin-asam sulfat pekat diamati dibawah UV 366 nm.

I. Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

II. Eugenol

(a) Deteksi di bawah lampu UV 254 nm sebelum disemprot vanilin-asam sulfat

(b) Deteksi di bawah lampu UV 366 nm setelah disemprot vanilin-asam sulfat



Gambar 4. (a) Hasil KLT deteksi senyawa minyak atsiri dengan fase diam silika gel F₂₅₄, fase gerak toluen-etil asetat, pembanding eugenol diamati dibawah UV 254 dan

Tabel 4. Hasil identifikasi senyawa minyak atsiri

	hRf	Pada UV 254 nm sebelum disemprot	Pada UV 366 nm setelah disemprot	Hasil
Ekstrak	62,5	Coklat Jingga	Violet Kemerahan	+
Eugenol	81,25	Coklat Jingga	Violet Kemerahan	+

Hasil identifikasi minyak atsiri pada ekstrak etanol daun sirih merah menunjukkan bercak berwarna coklat jingga yang sejajar dengan bercak pembanding yaitu eugenol. Bercak di amati dibawah sinar UV 366 nm setelah di panaskan selama 10 menit pada suhu 100°C. Kromatogram di semprot dengan pereaksi semprot vanilin-asam sulfat pekat terbentuk warna violet kemerahan dibawah sinar UV 366 (Depkes RI, 1987). Warna violet kemerahan langsung di

bawah bercak eugenol dengan hRf 62,5 menunjukkan adanya kandungan senyawa minyak atsiri pada ekstrak etanol dan sirih merah.

3. Identifikasi saponin

Pembentukan busa yang mantap sewaktu mengekstraksi tumbuhan atau waktu memekatkan ekstrak tumbuhan merupakan bukti adanya saponin (Harborne,1987)

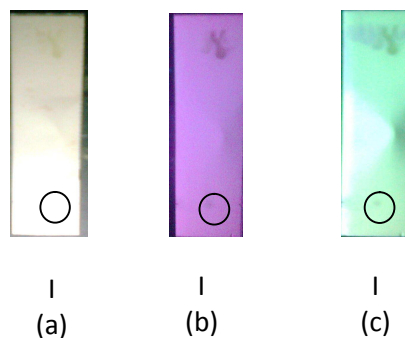
Hasil identifikasi menunjukan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah

mengandung saponin dengan adanya busa yang mantap dan hilang setelah didiamkan selama 10 menit.

4. Identifikasi tanin

Identifikasi tanin pada ekstrak etanol daun sirih merah menggunakan metode KLT dengan fase diam silika gel F₂₅₄ dan fase gerak etil asetat : metanol : air (10:1:1) serta deteksi dengan dengan pereaksi FeCl₃. Jika tanin menggunakan reaksi FeCl₃ menunjukkan biru kehitaman atau hijau kehitaman. Warna biru kehitaman menunjukkan bahwa simplisia mengandung tanin galat. Sedangkan warna hijau kehitaman menunjukkan bahwa simplisia

mengandung tanin katekol (Depkes RI, 1987).



Gambar 5. Hasil KLT deteksi senyawa tanin fase diam silika gel F₂₅₄, fase gerak etil asetat : metanol : air (10:1:1) dan disemprot dengan FeCl₃.

- I. Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah
- (a) Sinar tampak setelah disemprot FeCl₃
- (b) Deteksi di bawah sinar UV 366 nm sebelum disemprot FeCl₃
- (c) Deteksi di bawah UV 254 nm sebelum disemprot FeCl₃

Tabel 5. Hasil identifikasi senyawa tanin

	hRf	Sebelum disemprot FeCl ₃			Setelah disemprot FeCl ₃	Hasil
		Sinar tampak	Sinar UV 254 nm	Sinar UV 366 nm		
Ekstrak	10 0	Hijau	Hijau	Biru	Hijau kehitaman	Positif

Hasil identifikasi tanin pada ekstrak etanol daun sirih merah menunjukkan warna hijau kehitaman, sehingga ekstrak etanol daun sirih merah positif mengandung tanin yaitu tanin katekol. Adanya aktivitas antiviral dapat terjadi melalui mekanisme antara lain penghambatan adsorpsi dan penetrasi sel yang rentan, penghambatan sintesis awal protein yang non struktural,

misalnya polymerase asam nukleat, penghambatan sintesis RNA dan DNA, penghambatan sintesis protein struktural dan penghambatan pengumpulan partikel virus dan pelepasannya dari sel (Katzung, 2001). Pemberian ekstrak terbukti dapat menghambat pertumbuhan virus *NewcastleDisease*. Penghambatan pertumbuhan virus tersebut di

mungkinan karena adanya senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak yang mempunyai aktivitas sebagai antiviral. Setelah ekstrak etanol daun sirih merah dideteksi golongan senyawanya menggunakan metode KLT dan beberapa pereaksi warna menunjukkan bahwa pada ekstrak etanol daun sirih merah mengandung golongan senyawa flavonoid, tanin, minyak atsiri dan saponin.

Mekanisme kerja antivirus secara umum dalam menghambat pertumbuhan virus (Syarurachman, 1994) antara lain:

1. Dengan menghambat DNA polimerase virus
2. Mengganggu mRNA virus
3. Menghambat sintesis DNA virus dan sel dengan cara bergabung dengan DNA
4. Menghambat pembentukan kapsid dari virus
5. Menghambat proses awal infeksi yang dipengaruhi adalah penetrasi atau pelepasan selubung virus.

Berdasarkan mekanisme kerja virus diatas ekstrak etanol daun sirih merah diduga memiliki mekanisme mengganggu mRNA virus, menghambat pembentukan kapsid virus. Hal ini dikarenakan virus *NewcastleDisease* adalah virus RNA. Senyawa yang

berfungsi sebagai antivirus adalah flavonoid, saponin dan tanin.

Menurut Robinson (1995) senyawa yang mempunyai aktifitas antivirus adalah golongan flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa fenol alam yang banyak dijumpai dalam tanaman. Flavonoid memiliki aktivitas farmakologi yaitu sebagai reverse transkriptase. Flavonoid merupakan senyawa kimia yang sangat berguna pada tumbuhan maupun pada manusia. Fungsi flavonoid yang lain adalah berperan pada pengaturan pertumbuhan, fotosintesis dan pertahanan bagi tumbuhan. Flavonoid pada kadar rendah akan menyebabkan denaturasi protein dan pada kadar tinggi akan menyebabkan koagulasi protein sehingga sel akan mati. Berdasarkan dari asumsi tersebut maka, salah satu dugaan mekanisme flavonoid sebagai antivirus yaitu menghambat enzim reverse transkriptase virus sehingga RNA virus tidak bisa disintesis menjadi cDNA dan tidak bisa bereplikasi dan membuat protein serta enzim-enzim yang dibutuhkan oleh virus, terutama protein amplop virus sehingga kapsul virus tidak bisa dibentuk, akibatnya virus tidak bisa bereplikasi.

Senyawa saponin mempunyai aktivitas antivirus karena senyawa tersebut dapat

menghambat pembentukan kapsid dari virus, selain itu senyawa saponin juga dapat meningkatkan ketahanan dari sel inang.

Sedangkan senyawa tanin pada tanaman dapat menghambat interaksi protein permukaan sel inang dan protein virus, sehingga menghambat perlekatan virus dan penetrasi virus kedalam membran plasma atau dengan kata lain tanin berikatan baik dengan protein virus maupun protein sel inang membentuk kompleks, sehingga mencegah proses adsorpsi virus

Ekstrak etanol daun sirih merah mempunyai aktivitas antivirus yang sangat besar dengan dosis yang kecil. Sehingga dengan konsentrasi terkecil yaitu konsentrasi 1 µg/ml ekstrak etanol daun sirih merah dapat menghambat pertumbuhan virus *Newcastle Disease* sebesar 50%.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat di simpulkan bahwa:

1. Ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) mempunyai aktivitas antivirus terhadap virus *Newcastle Disease* yaitu konsentrasi 10 µg/ml mampu menghambat pertumbuhan virus.

2. Golongan senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak etanol daun sirih merah adalah flavonoid, minyak atsiri, tanin, saponin. Dan yang diduga mempunyai aktivitas antivirus adalah senyawa saponin, tanin dan flavonoid.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1995 a. *Farmakope Indonesia Edisi III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- _____. 1995 b. *Farmakologi Indonesia Edisi IV*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- _____. 2009. *Ilmu Peternakan Bahasan ilmu peternakan*. <http://aspan-gabe.com/perkembangan-embrio-ayam#more-280>. diakses pada tanggal 25 Juni 2010.
- Backer, C. A. R. C, and Van Den Brink, B., *Flora of Java Vol II*. Wolters Nordroof N. V. Groningen The Netherland
- Balittro. 2008. *Sirih Merah Sebagai Tanaman Obat Multif fungsi*. <http://www.Pkesinterapi.com>.
- _____. 2009. *Kandungan Senyawa pada Sirih Merah*. <http://www.adisucipto.com>.
- Cappuccino, J. D., and Natalie Sherman. 1983. *Mycrobiology A Laboratory Manual*. Sydney: Addison Wesley Pubishing Company

- Depkes RI. 1987. *analisis Obat Tradisional*. Jakarta : Depkes RI.
- _____. 1995. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta : Depkes RI.
- Duryatmo, S. 2006. *Senyawa Aktif Daun Sirih Merah*. <http://herbalsirihmerah.com>
- Ganwarin, Margareta S. 2009. *Klasifikasi Virus*. http://www.Spc.Int/rahs/Manual/images/nwcastle_disease.htm
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia = Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan (Terjemahan)*. Kosasi, P. Bandung : ITB.
- Irianto, K. 2006. *Mikrobiologi Menguk Dunia Mikroorganisme jilid 1*. Editor. Nunung Nurhayati. Bandung: CV Yrama Widya
- Katzung, B. 2001. *Farmakologi Klinik Jilid II IL*. Jakarta : Salemba Medika.
- Kuswandi M, Triadisti. N, Asmara W. 2008. *Antiviral Infus Biji Sirkaya (Annona Squamona L) pada Embrio Telur Ayam Dengan Virus Newcastle Disease (ND)*. <http://Farmsarea.Blogspot.com/2008/07/ujidaya-antiviral-biji-Sirkaya.html>
- Moeloek N. 1999. *Beberapa Perkembangan Mutakhir DiBidang Andrologi*. Majalah Kedok Indon. Jakarta
- Plantamor.2009. *Situs Dunia Tumbuhan*. <http://www.plantamor.com>
- Robinson, T.1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi, (Terjemahan) KosasihPadmawinata*. Bandung: ITB, hal 157, 208
- Sastrohamidjojo, A. 2002. *Kromatografi*. Yogyakarta : Liberty.
- Sholikhah, A. 2006. *Sirih Merah Menurunkan Glukosa Darah*. <http://www.pustakatani.com>
- Stahl, E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Bandung : ITB.
- Syahrurchman, A, dkk. 1994. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran Edisi Revisi*. Jakarta : Binapura Aksara.
- Syarief, E.2006. *Resep Sirih Merah untuk putih merona Hingga Kanker Ganas*. Majalah Trubus, hlm 88.