

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Landasan Teori

##### 2.1.1 Virus *Dengue*

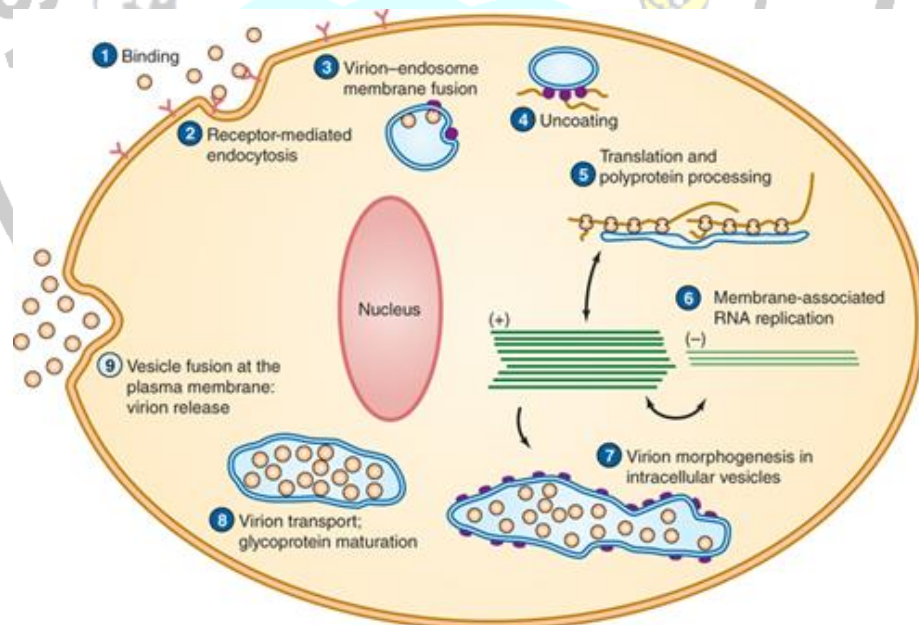
Penyebab penyakit Demam Berdarah *Dengue* (DBD) adalah virus *dengue*. Manifestasi klinis yang dapat muncul pada DBD adalah demam, nyeri otot dan/ atau nyeri sendi yang disertai leukopenia, ruam, limfadenopati, trombositopenia dan diatesis hemoragik. Pada DBD terjadi pembesaran plasma yang ditandai dengan hemokonsentrasi (peningkatan hematokrit) atau penumpukan cairan di rongga tubuh. Sindrom syok *dengue* (DSS) adalah demam berdarah *dengue* yang ditandai dengan syok.<sup>(22)</sup>

Virus *dengue* termasuk dalam genus flavivirus, keluarga flaviviridae. Virus *dengue* memiliki 4 serotipe virus yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4. Secara genetik keempatnya hampir sama dan saling berbagi sekitar 65% genom yang sama. Keempat serotipe tersebut, semuanya dapat menyebabkan demam *dengue* atau demam berdarah *dengue*. Keempat serotipe ditemukan di Indonesia dengan DENV-3 merupakan serotipe terbanyak dan sering dihubungkan dengan kasus-kasus parah.<sup>(22)</sup>

Virus *Dengue* memiliki beberapa strain, dimana strain DENV yang pertama diisolasi pada tahun 1944 dan diantara strain tersebut adalah DENV-1 strain US/Hawai, DENV-2 strain PNG (Papua Nugini)/ New Guinea C, DENV-3 strain H-87 dan DENV-4 strain H-241. Papua Nugini memiliki kedekatan geografis dengan negara Indonesia dan negara Asia Tenggara lainnya, sehingga transmisi aktivitas virus *Dengue* terjadi di wilayah Indonesia dan negara Asia tenggara lainnya yang memiliki vector virus *Dengue* yaitu nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*.<sup>(23)</sup>

Flavivirus adalah virus berselubung yang mengandung Ribonucleic Acid (RNA) untai-tunggal, genomnya bervariasi dari 9,5 kb (Hepatitis C virus), 11 kb (virus *Dengue* berdiameter 50 nm), hingga 125 kb (Pestivirus). Virion matang terkumpul dalam sisterna retikulum endoplasma. Grup arbovirus meliputi virus demam kuning dan virus *dengue*. Sebagian besar anggotanya ditransmisikan oleh arthropoda darah.<sup>(24)</sup>

Flavivirus dimasukkan ke dalam famili togavirus sebagai "arbovirus grup B", tetapi kemudian dimasukkan ke dalam famili tersendiri karena perbedaan dalam pengaturan genom viral. Famili Flaviviridae terdiri dari sekitar 70 virus berdiameter 40-60 nm yang memiliki genom RNA sens-positif beruntai-tunggal. Selubung virus ini mengandung dua glikoprotein. Beberapa flavivirus dapat ditularkan di antara vertebrata oleh nyamuk dan sengkenit, sementara lainnya ditularkan di antara tikus atau kelelawar tanpa vektor serangga.<sup>(24)</sup>



**Gambar 1.** Siklus replikasi virus *dengue* <sup>(24)</sup>

### 2.1.2 Cara Penularan Virus Dengue

Penularan infeksi virus *dengue* terjadi melalui nyamuk genus *Aedes* terutama *Aedes aegypti* dan *Aedes albopictus*. Nyamuk sebagai vektor penularan infeksi virus *dengue* berkaitan dengan sanitasi lingkungan dengan tersedianya tempat perindukan bagi nyamuk betina yaitu bejana yang berisi air jernih (bak mandi, kaleng bekas dan tempat penampungan air lainnya).<sup>(22)</sup>

#### 1. Taksonomi vektor DBD

Taksonomi *Aedes aegypti*<sup>(25)</sup>

Phylum *Arthropoda*

Kelas *Insecta*

Ordo *Diptera*

Sub ordo *Nematocera*

Famili *Culicidae*

Sub Famili *Culicinae*

Genus *Aedes*

Species *Aedes aegypti*

Taksonomi *Aedes albopictus*<sup>(26)</sup>

Pylum *Arthropoda*

Kelas *Insecta*

Ordo *Diptera*

Familli *Culicidae*

Sub famili *Culicinae*

Genus *Aedes*

Sub genus *Stegomyia*

Spesies *Aedes albopictus*

#### 2. Morfologi *Aedes sp*

Nyamuk ini dikenal juga sebagai *Tiger mosquito* atau *Black White Mosquito* karena tubuhnya mempunyai ciri khas berupa adanya garis – garis dan bercak bercak putih keperakan di

atas dasar warna hitam. Dua garis melengkung berwarna putih keperakan di kedua sisi lateral serta dua buah garis putih sejajar di garis median dari punggungnya yang berwarna dasar hitam.<sup>(26)</sup>

Nyamuk dewasa *Aedes albopictus* mudah dibedakan dengan *Aedes aegypti* karena garis thoraks hanya berupa dua garis lurus di tengah thorax. Mulut nyamuk termasuk tipe yang menusuk dan mengisap (*rasping – sucking*), mempunyai enam stilet yaitu gabungan antara mandibula, maxilla yang bergerak naik turun menusuk jaringan sampai menemukan pembuluh darah kapiler dan mengeluarkan ludah yang berfungsi sebagai cairan racun dan antikoagulan.<sup>(26)</sup>

### 3. Peran *Aedes* sp sebagai vektor virus *Dengue*

Nyamuk dapat mengandung virus Demam Berdarah *Dengue* bila menghisap darah penderita. Virus tersebut akan masuk ke dalam intestinum nyamuk. Replikasi virus terjadi dalam hemocoelom dan akhirnya akan menuju ke dalam kelenjar air liur serta siap ditularkan. Fase ini disebut sebagai *extrinsic incubation* periode yang memerlukan waktu selama tujuh sampai empat belas hari.<sup>(25)</sup>

*Dengue* dapat menimbulkan *Cyto Pathogenic Effect* (CPE) yang tergantung pada jenis sel yang digunakan. Dengan demikian hal ini dapat dianalogikan dengan keberadaan virus pada tubuh nyamuk *Aedes* di alam, dimana virus ini dapat berada dalam tubuh nyamuk dan bereplikasi tanpa menimbulkan kematian pada nyamuk karena tidak terbentuknya CPE.<sup>(25)</sup>

#### 2.1.3 Patofisiologi Infeksi Virus *Dengue*

*Dengue* virus (DENV) memiliki protein non-struktural 1 (NS1) dalam patogenesis DBD/DSS. Protein kapsid dan genom RNA virus membentuk nukleokapsid di retikulum endoplasma (ER)

dan terhubung dengan 180 salinan Protein M dan E dan membawa lipid yang diturunkan dari inang membentuk virion yang belum matang. Kemudian virion akan melakukan pembelahan, pembelahan ini menghasilkan penataan ulang struktur E ke dimer yang belum matang, dimana E mempertahankan interaksi dengan protein E dan M.<sup>(27)</sup>

PH netral pada lingkungan ekstraseluler sel terdisosiasi protein E dan M untuk membentuk virion dewasa, yang tersedia untuk menginfeksi sel-sel baru. Selain protein struktural, genom RNA virus *dengue* mengkodekan 7 nonstruktural protein yang penting untuk replikasi virus (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B dan NS5).<sup>(27)</sup>

Struktur, ekspresi, dan sekresi NS1 DENV. NS1 adalah glikoprotein 48-kDa yang sangat terkonservasi di antara semua flavivirus. NS1 sangat penting untuk replikasi virus dengan mekanisme yang tidak diketahui yang mungkin melibatkan interaksi dengan NS4A dan NS4B. Mulanya, NS1 diekspresikan sebagai monomer dalam sel yang terinfeksi. Setelah modifikasi pascaterjemahan dalam lumen ER, terbentuk homodimer yang terkait dengan membran organel dan membran sel. NS1 berlabuh ke membran sel melalui beberapa jalur. Selain itu, NS1 adalah satu-satunya protein yang ada terus menerus disekresikan oleh sel inang yang terinfeksi. NS1 disekresi dalam bentuk hexamer, yang terdiri dari tiga dimer dengan rongga pusat hidrofobik.<sup>(27)</sup>

NS1 dan lipoprotein densitas tinggi memiliki kesamaan, sehingga NS1 telah diusulkan untuk mengganggu kaskade koagulasi yang mungkin melalui interferensi dengan interaksi atau biogenesis partikel lipoprotein endogen. Akumulasi NS1 yang disekresikan dalam serum pasien DBD / DSS telah diamati selama fase kritis. Konsentrasi serum NS1 pada pasien DBD / DSS dapat mencapai setinggi 50 µg / ml, dan konsentrasi

berkorelasi positif dengan tingkat keparahan penyakit. Selama fase pemulihan, NS1 akan dibersihkan dari sirkulasi oleh efek yang dimediasi antibodi.<sup>(28)</sup>

Respons imun yang diketahui berperan dalam patogenesis DBD adalah:

1. Respons humoral berupa pembentukan antibodi yang berperan dalam proses netralisasi virus, sitolisis yang dimediasi komplemen dan sitotoksitas yang dimediasi antibodi. Antibodi terhadap virus *dengue* berperan dalam mempercepat replikasi virus pada monosit atau makrofag. Hipotesis ini disebut *antibody dependent enhancement* (ADE);
2. Limfosit T baik T-helper (CD4) dan T- sitotoksik (CD8) berperan dalam respon imun selular terhadap virus *dengue*. Diferensiasi T helper yaitu TH1 akan memproduksi interferon gamma, IL-2 dan limfokin, sedangkan TH2 memproduksi IL-4, IL-5, IL-6 dan IL-10;
3. Monosit dan makrofag berperan dalam fagositosis virus dengan opsonisasi antibodi, Namun proses fagositosis ini menyebabkan peningkatan replikasi virus dan sekresi sitokin oleh makrofag;
4. Selain itu aktivasi komplemen oleh kompleks imun menyebabkan terbentuknya C3a dan C5a.<sup>(22)</sup>

Halstead pada tahun 1973 mengajukan hipotesis secondary heterologous infection yang menyatakan bahwa DHF terjadi bila seseorang terinfeksi ulang virus *dengue* dengan tipe yang berbeda. Reinfeksi menyebabkan reaksi amnestik antibodi sehingga mengakibatkan konsentrasi kompleks imun yang tinggi.<sup>(22)</sup>

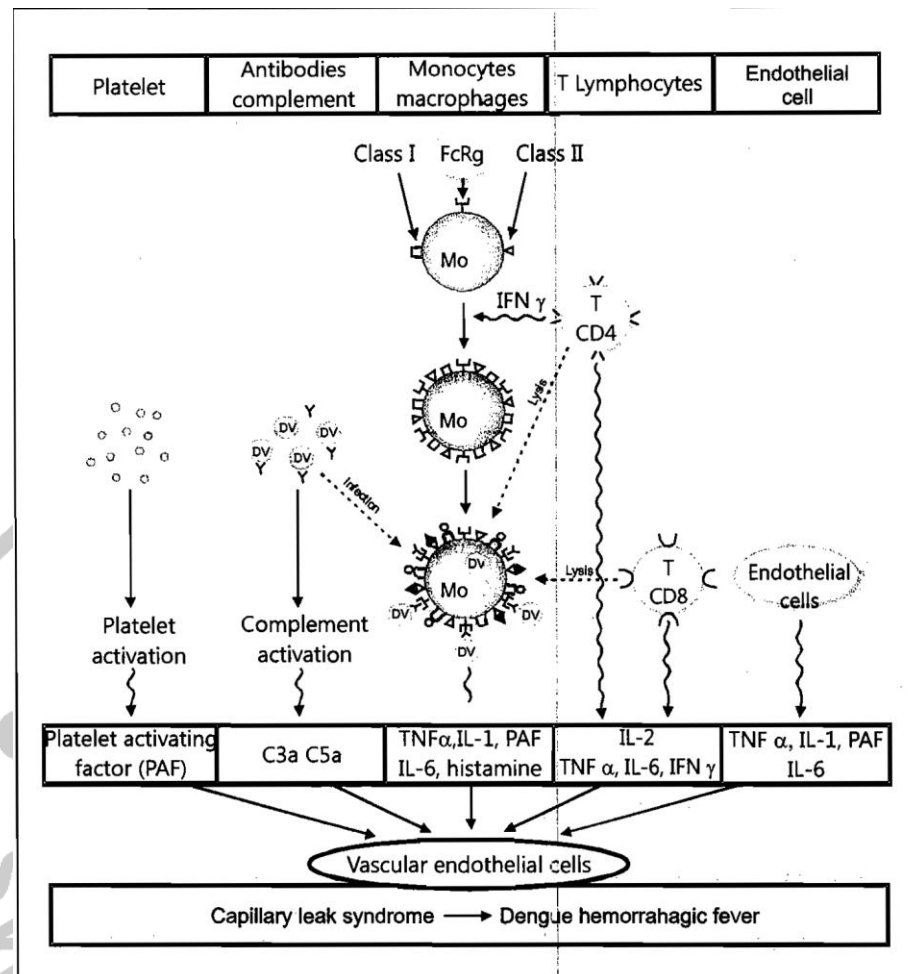
Kurane dan Ennis pada tahun 1994 merangkum pendapat Halstead dan peneliti lain; menyatakan bahwa infeksi virus *dengue* menyebabkan aktivasi makrofag yang memfagositosis kompleks virus-antibodi non netralisasi sehingga virus bereplikasi di makrofag.

Terjadinya infeksi makrofag oleh virus *dengue* menyebabkan aktivasi T-helper dan T-sitotoksik sehingga diproduksi limfokin dan interferon gamma, Interferon gamma akan mengaktivasi monosit sehingga disekresi berbagai mediator inflamasi seperti TNF-a, IL-1, PAF (platelet activating factor), IL-6 dan histamin yang mengakibatkan terjadinya disfungsi sel endotel dan terjadi kebocoran plasma. Peningkatan C3a dan C5a terjadi melalui aktivasi oleh kompleks virus-antibodi yang juga mengakibatkan terjadinya kebocoran plasma.<sup>(22)</sup>

Trombositopenia pada infeksi *dengue* terjadi melalui mekanisme:

1. Supresi sumsum tulang
2. Destruksi dan pemendekan masa hidup trombosit. Gambaran sumsum tulang pada fase awal infeksi (< 5 hari) menunjukkan keadaan hiposelular dan supresi megakariosit. Setelah keadaan nadir tercapai akan terjadi peningkatan proses hematopoiesis termasuk megakariopoiesis. Kadar trombopoietin dalam darah pada saat terjadi trombositopenia justru menunjukkan kenaikan, hal ini menunjukkan terjadinya stimulasi trombopoiesis sebagai mekanisme kompensasi terhadap keadaan trombositopenia. Destruksi trombosit terjadi melalui pengikatan fragmen C3g, terdapatnya antibodi virus *dengue*, konsumsi trombosit selama proses koagulopati dan sekuestrasi di perifer. Gangguan fungsi trombosit terjadi melalui mekanisme gangguan pelepasan ADP, peningkatan kadar b-tromboglobulin dan PF4 yang merupakan petanda degranulasi trombosit.<sup>(22)</sup>

Koagulopati terjadi sebagai akibat interaksi virus dengan endotel yang menyebabkan disfungsi endotel. Berbagai penelitian menunjukkan terjadinya koagulopatikonsumsi pada demam berdarah *dengue* stadium III dan IV. Aktivasi koagulasi pada demam berdarah *dengue* terjadi melalui aktivasi jalur ekstrinsik (*tissue factor pathway*). Jalur intrinsik juga berperan melalui aktivasi faktor XIa namun tidak melalui aktivasi kontak (*kalikrein C1-inhibitor complex*).<sup>(22)</sup>



**Gambar 2.** Immunopatogenesis demam berdarah *dengue* <sup>(22)</sup>

#### 2.1.4 Perkembangan Antivirus Dengue

Pengembangan vaksin *dengue* telah dilakukan sejak 20 tahun lalu dimulai dari penelitian fase I, II, dan III. Sanofi Pasteur yang merupakan seorang peneliti telah melakukan uji klinis (*clinical trial*) fase III vaksin *dengue* sejak tahun 2011 di 10 negara dengan kasus *dengue* terbanyak yaitu di 5 negara di Amerika latin dan 5 negara di Asia. 10 negara tersebut terdiri dari; Indonesia, Malaysia, Philippines, Thailand, Vietnam, Brazil, Columbia, Honduras, Mexico, dan Puerto Rico. Jumlah subjek dalam penelitian lebih dari 30.000 anak, yaitu sebanyak 10.275 anak usia 2-14 tahun di lima negara di Asia, dan 20.869 anak usia 9-16 tahun di lima negara di amerika Latin. Hasil

penelitian tersebut telah dipublikasikan dan untuk mengetahui hasil efikasi dan keamanan vaksin *dengue* dalam jangka waktu yang lebih lama, penelitian di 10 negara masih dilanjutkan sampai akhir tahun 2017. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa efikasi vaksin *dengue* untuk mencegah kejadian demam *dengue* dirawat di Rumah Sakit sebesar 80,8% dan mencegah DBD berat sebesar 92,9%.<sup>(29-31)</sup> Vaksin tersebut telah didaftarkan di 12 negara termasuk Indonesia. Surat izin vaksin juga telah diedarkan oleh Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) Indonesia pada bulan September 2016 dan telah tersedia di pasaran Indonesia, akan tetapi penggunaannya terbatas dan harga vaksin masih terbilang cukup mahal.<sup>(29)</sup>

Berdasarkan *Handbook for Clinical Management of Dengue* oleh WHO, algoritme penatalaksanaan *dengue* sampai saat ini masih menangani gejala secara simtomatik, seperti pemberian substitusi cairan untuk mencegah dehidrasi dan pemberian antipiretik untuk menurunkan demam.<sup>(13)</sup> Maka dari itu alternatif pencarian obat antivirus DENV dilakukan menggunakan bahan alam. Obat-obatan herbal telah digunakan sebagai terapi penyakit menular. Dalam perkembangan obat antivirus untuk DENV, obat-obatan herbal dinilai memiliki potensi tinggi untuk melawan DENV<sup>(13)</sup> serta lebih efektif dan relative aman.<sup>(16)</sup>

Ada pula penelitian mengenai delapan tanaman yang terdiri dari *Psidium guajava* (Jambu biji), *Euphorbia hirta* (Patikan kerbau), *Piper bettle L.* (Sirih), *Carica papaya* (Pepaya), *Curcuma longa L.* (Kunyit/turmeric), *Phyllanthus niruri L.* (Meniran), *Andrographis paniculata* (Sambiloto), dan *Cymbopogon citratus* (Serai) dimana kedelapan tanaman tersebut berpotensi memiliki kemampuan antivirus *dengue*. Namun, dari hasil penelitian tersebut hanya *Psidium guajava* dan *Carica papaya* yang memiliki potensi besar sebagai antivirus *dengue*.<sup>(32)</sup>

## 2.1.5 Singkong (*Manihot esculenta* C.)

### 2.1.5.1 Habitat Tanaman Singkong

Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) atau bahasa daerah ketela pohon, ubi kayu, (pohung, kasbi, sepe, boled, budin (jawa), sampeu (sunda), kaspe (papua), dan dalam bahasa inggris disebut *cassava*. Jenis (*Manihot esculenta* Crantz) pertama kali dikenal di Amerika selatan kemudian dikembangkan pada masa prasejarah di Brazil dan Paraguay. Di Indonesia singkong diperkenalkan oleh orang Portugis pada abad ke-16 dari Brazil dan mulai ditanam secara komersial sekitar tahun 1810.<sup>(33)</sup>

### 2.1.5.2 Taksonomi dan Nama Umum

Tanaman Singkong memiliki nama latin *Manihot esculenta* Crantz.<sup>(33)</sup>

#### Nama Umum

Indonesia : Singkong, Ketela pohon, ubi kayu, pohung, kasbi, sepe, boled, budin (Jawa), sampeu (Sunda), kaspe (Papua)  
 Inggris : Cassava, tapioca plant  
 Filipina : Kamoteng kahoy

#### Klasifikasi

Kingdom	<i>Plantae</i>
Subkingdom	<i>Tracheobionta</i>
Super Divisi	<i>Spermatophyta</i>
Divisi	<i>Magnoliophyta</i>
Kelas	<i>Magnoliopsida</i>
Sub Kelas	<i>Rosidae</i>
Ordo	<i>Euphorbiales</i>
Famili	<i>Euphorbiaceae</i>
Genus	<i>Manihot</i>
Spesies	<i>Manihot esculenta</i> Crantz <sup>(33)</sup>

### 2.1.5.3 Morfologi Tanaman Singkong

Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) adalah tanaman dikotil. Tanaman singkong merupakan tanaman semak belukar tahunan. Ubi kayu tumbuh sekitar 1- 4 m dengan daun besar yang menjari dengan 5-9 belahan lembar daun. Daunnya yang bertangkai panjang bersifat cepat luruh yang berumur paling lama hanya beberapa bulan. Batangnya 3 memiliki pola percabangan yang khas, yang keragamannya bergantung pada kultivar. Pada tanaman yang diperbanyak secara vegetatif, akar serabut tumbuh dari dasar lurus. Umbinya berwarna putih atau kekuning-kuningan. Singkong memiliki umbi atau akar pohon yang panjang dengan diameter dan tinggi batang yang beragam tergantung dari varietasnya. Di Indonesia, umbinya dikenal luas sebagai makanan pokok penghasil karbohidrat dan daunnya sebagai sayuran.<sup>(33)</sup>

Ubi kayu dapat tumbuh setinggi 1-4 m, bentuk daunnya menjari dengan 5, 7, atau 9 helai belahan lembar daun (lobes). Tangkai daun panjang dan cepat luruh. Warna permukaan batang bervariasi, antara lain hijau, kemerahan, keabu-abuan dan kecoklatan. Sistem perakaran serabut dan beberapa akar membentuk umbi melalui proses penebalan sekunder. Panjang umbi yang terbentuk sekitar 15- 100 cm dengan bobot umbi mencapai 0,5 - 2 kg tergantung varietas dan kondisi lingkungan.<sup>(33)</sup>



**Gambar 3.** Daun singkong <sup>(33)</sup>

#### **2.1.5.4 Kandungan dan Manfaat Tanaman Singkong**

Tanaman singkong memiliki berbagai macam bahan aktif pada setiap bagiannya, pada bagian daun singkong mengandung senyawa organik flavonoid, triterpenoid, tanin serta saponin. Kandungan masing-masing senyawa metabolit sekunder pada daun singkong adalah pada alkaloid sebesar 26.03 sampai 38.33mg/100g, senyawa saponin sebesar 1.58 sampai 1.65 mg/100g dan flavonoid sebesar 48.07 sampai 58.94mg/100g, senyawa yang tertinggi dan paling banyak adalah senyawa flavonoid. Flavonoid, saponin dan tannin dalam tanaman daun singkong mempunyai potensi dalam aktivitas antibakteri yaitu diare. Kandungan flavonoid, saponin dan tanin dalam daun singkong diketahui, senyawa-senyawa tersebut mempunyai aktivitas sebagai antibiotik yang membunuh bakteri.<sup>(33)</sup>

Flavonoid banyak terdapat di alam dan dapat dengan mudah diekstraksi dari berbagai tanaman. Banyak dari senyawa ini telah digunakan dalam sediaan farmasi, kosmetik dan makanan. Namun kelarutannya sangat rendah dalam air dan dapat dipengaruhi oleh pH pelarut. Kandungan flavonoid daun singkong cukup tinggi dibandingkan senyawa lain yang

terkandung didalamnya. Salah satu senyawa flavonoid yang berada dalam daun singkong yaitu rutin.<sup>(34)</sup> Flavonoid juga diketahui memiliki kemampuan sebagai antibakteri, antioksidan, antiinflamasi, dan mencegah kanker. Flavonoid dapat menghambat fungsi DNA gyrase bakteri dengan merusak membran sitoplasma dari bakteri dan menyebabkan kerusakan pada dinding sel bakteri. Flavonoid merupakan senyawa polar sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, dan air.<sup>(35)</sup>

Triterpenoid adalah senyawa metabolit sekunder turunan terpenoid yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprena (*2-metilbuta-1,3-diene*) yaitu kerangka karbon yang dibangun oleh enam satuan C<sub>5</sub> dan diturunkan dari hidrokarbon C<sub>30</sub> asiklik, yaitu skualena. Senyawa ini berbentuk siklik atau asiklik dan sering memiliki gugus alkohol, aldehida, atau asam karboksilat. Senyawa golongan triterpenoid menunjukkan aktivitas farmakologi yang signifikan, seperti antiviral, antibakteri, antiinflamasi, sebagai inhibisi terhadap sintesis kolesterol dan sebagai antikanker.<sup>(35)</sup>

Tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang diketahui mempunyai beberapa khasiat yaitu sebagai astringen, anti diare, anti bakteri dan antioksidan. Tanin merupakan komponen zat organik yang sangat kompleks, terdiri dari senyawa fenolik yang sukar dipisahkan dan sukar mengkristal, mengendapkan protein dari larutannya dan bersenyawa dengan protein tersebut.<sup>(35)</sup>

### 2.1.6 Ekstraksi

Ekstrak/sari adalah material hasil penarikan oleh pelarut air atau pelarut organik dari bahan kering (dikeringkan). Hasil penyarian tersebut kemudian pelarutnya dihilangkan dengan cara penguapan

dengan alat evaporator sehingga diperoleh ekstrak kental jika pelarutnya pelarut organik.<sup>(36)</sup>

Metode ekstraksi yang digunakan secara farmasi melibatkan proses pemisahan bahan dari campurannya atau pemisahan bagian jaringan tanaman yang aktif secara medis dari komponen tidak aktif dengan menggunakan pelarut yang sesuai.<sup>(37,38)</sup> Selama ekstraksi, pelarut berdifusi ke dalam bahan tanaman padat dan melarutkan senyawa dengan polaritas yang sama.<sup>(38)</sup>

Untuk penentuan senyawa biologis aktif dari bahan tanaman sangat tergantung pada jenis pelarut yang digunakan dalam prosedur ekstraksi.<sup>(38)</sup> Pada prinsipnya cairan pelarut harus memenuhi syarat kefarmasian atau dalam perdagangan dikenal dengan kelompok spesifikasi "*pharmaceutical grade*". Sampai saat ini berlaku aturan bahwa pelarut yang digunakan dalam ekstraksi adalah air dan alkohol (etanol) serta campurannya.<sup>(39)</sup>

Cara ekstraksi secara garis besar terbagi menjadi dua yaitu ekstraksi cara panas dan ekstraksi cara dingin :<sup>(39)</sup>

#### 1. Ekstraksi cara dingin

Pada metode ekstraksi cara dingin tidak dilakukan pemanasan selama proses ekstraksi berlangsung dengan tujuan agar senyawa yang diinginkan tidak menjadi rusak. Beberapa jenis metode ekstraksi cara dingin, yaitu:<sup>(39)</sup>

##### a. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan cara perendaman menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan.<sup>(36-39)</sup> Kerugian utama dari metode maserasi adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang, selain itu beberapa senyawa mungkin saja sulit di ekstraksi pada

suhu ruang. Namun di sisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil.<sup>(37)</sup>

b. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai prosesnya sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada suhu ruangan. Pada metode ini, bahan direndam dengan pelarut, kemudian pelarut baru dialirkan secara terus menerus sampai warna pelarut tidak lagi berwarna atau tetap bening yang artinya sudah tidak ada lagi senyawa yang terlarut.<sup>(37-39)</sup>

Kelebihan metode ini adalah bahan selalu dialiri dengan pelarut baru, sedangkan kelemahan metode ini adalah jika bahan tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area atau tidak meratanya kontak antara padatan dengan pelarut, selain itu metode ini juga membutuhkan banyak pelarut dan memakan banyak waktu.<sup>(37,39)</sup>

2. Ekstraksi cara panas

Pada metode ini melibatkan pemanasan selama proses ekstraksi berlangsung. Adanya panas secara otomatis akan mempercepat proses ekstraksi dibandingkan dengan cara dingin. Beberapa jenis metode ekstraksi cara panas, yaitu.<sup>(39)</sup>

a. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Pada metode ini, bahan dimasukkan bersama pelarut ke dalam labu yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut dipanaskan hingga mencapai titik didih, lalu uap akan terkondensasi dan kembali ke dalam labu. Kelebihan metode refluks adalah padatan yang memiliki tekstur kasar dan tahan terhadap

pemanasan langsung dapat diekstrak dengan metode 16 ini. Kelemahan metode ini adalah membutuhkan jumlah pelarut yang banyak.<sup>(37,39)</sup>

b. Soxhlet

Ekstraksi dengan alat soxhlet merupakan ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru, umumnya dilakukan menggunakan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi konstan dengan adanya pendingin balik (kondensor). Pada metode ini, padatan disimpan dalam alat soxhlet dan dipanaskan, sedangkan yang dipanaskan hanyalah pelarutnya. Pelarut terdinginkan dalam kondensor, kemudian mengekstraksi padatan.<sup>(37-39)</sup>

Keuntungan dari metode ini adalah proses ekstraksi kontinyu, bahan terkekstraksi oleh pelarut murni hasil kondensasi sehingga tidak membutuhkan banyak pelarut dan tidak memakan banyak waktu. Sedangkan, kerugian dari metode ini adalah senyawa bersifat termolabil dapat terdegradasi karena ekstrak yang diperoleh terus-menerus berada pada titik didih.<sup>(37-39)</sup>

### 2.1.7 Fraksinasi

Fraksinasi adalah proses penarikan senyawa pada suatu ekstrak dengan menggunakan dua macam pelarut yang saling tidak bercampur tujuannya untuk mengambil senyawa aktif sesuai dengan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawa yang telah dipisahkan akan terjadi fraksi yang berbeda. Senyawa yang bersifat nonpolar akan masuk ke pelarut nonpolar, senyawa semi polar akan masuk ke pelarut semi polar, sedangkan yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar. Keuntungan fraksinasi adalah diperolehnya isolate atau senyawa yang lebih spesifik terhadap polaritas pelarut yang digunakan.<sup>(39,40)</sup>

Ekstrak awal merupakan campuran dari berbagai senyawa dan sulit dipisahkan melalui teknik pemisahan tunggal untuk mengisolasi senyawa tunggal. Oleh karena itu, perlu dipisahkan ke dalam fraksi

yang memiliki polaritas dan ukuran molekul yang sama. Fraksinasi dapat dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair atau dengan kromatografi kolom cair vakum (KCV), kromatografi kolom (KK), *size-exclusion chromatography* (SEC), *solid-phase extraction* (SPE).<sup>(36,37)</sup>

Pelarut yang lazim digunakan untuk tahap fraksinasi dengan metode partisi cair-cair adalah etil asetat, butanol, diklorometan/kloroform, dan heksana.<sup>(36)</sup>

#### 1. Butanol

Butanol merupakan pelarut yang bersifat polar yang mampu menarik senyawa organik alkaloid, fenolik dan steroid. Namun tidak mampu menarik senyawa flavonoid dengan tingkat polaritas yang rendah karena gugus fungsi yang terikat padanya atau senyawa lain yang memiliki gugus fungsi bersifat semi polar.<sup>(41)</sup>

#### 2. Etil Asetat

Etil asetat merupakan pelarut yang bersifat semi polar sehingga dapat menarik senyawa yang bersifat polar maupun nonpolar, memiliki toksisitas rendah, dan mudah diuapkan. Etil asetat dapat digunakan sebagai pelarut karena dapat menarik senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, polifenol, dan triterpenoid.<sup>(42)</sup>

#### 3. N-heksana

Pelarut n-heksana merupakan pelarut non-polar yang bersifat stabil, mudah menguap, dan selektif melarutkan senyawa bersifat nonpolar, seperti golongan kandungan kimia minyak atsiri, lemak, dan asam lemak tinggi, steroid dan triterpenoid, dan korotenoid.<sup>(43)</sup>

### 2.1.8 Kultur Virus Dengue

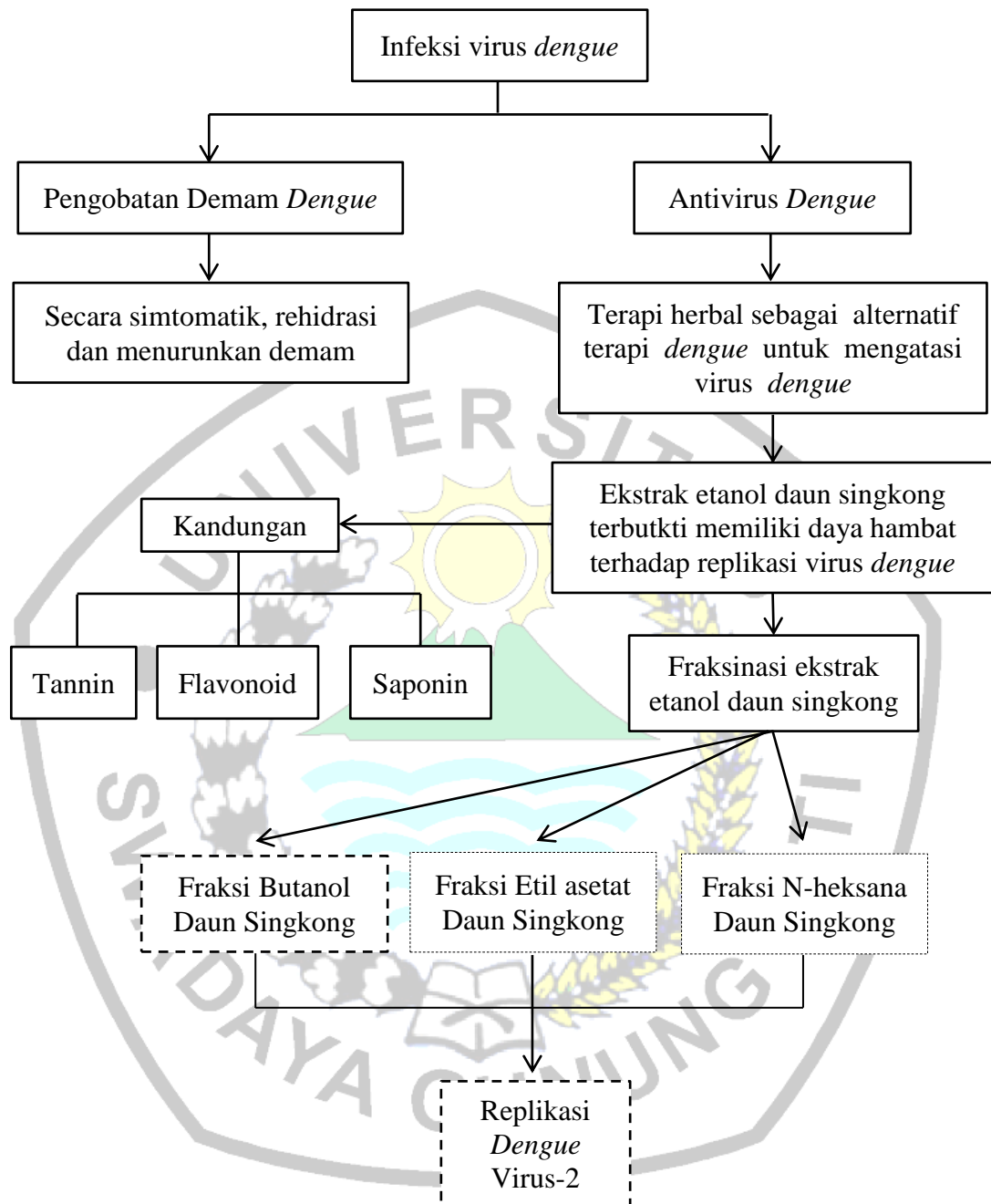
Kultur virus *dengue* adalah suatu teknik umum untuk menumbuhkan virus *dengue* secara *in vitro* atau di luar tubuh, dengan penyesuaian kondisi lingkungan serta bahan makanan yang diusahakan menyerupai keadaan sel di dalam tubuh atau *in vivo*.

Kultur ini biasanya bertujuan untuk mengukur aktivitas biologi, sitotoksitas, dan mutagenitas.<sup>(32)</sup>

Fungsi utama media kultur sel adalah mempertahankan pH dan osmoralitas esensial yang dibutuhkan untuk multipikasi dan pertumbuhan sel. Pertumbuhan sel juga memerlukan kondisi lingkungan yang mendukung, seperti pH lingkungan 7.4, temperatur 37°C, konsentrasi oksigen 95%, serta karbon dioksida 5%.<sup>(32)</sup>

Prosedur dalam kultur sel, sel diisolasi dari jaringan untuk ditumbuhkan dan diperbanyak di media buatan secara in vitro. Ketika sebuah jaringan tidak beragregasi, baik secara mekanik maupun enzimatik, sel-sel memiliki kemampuan untuk melekat membentuk substrat solid, disebut monolayer. Sel vero adalah sel yang berasal dari ginjal monyet hijau afrika, sel vero adalah salah satu sel kontinu mamalia yang paling umum digunakan dalam penelitian. Sel vero ini telah digunakan secara luas dalam studi virologi, sel vero juga telah dilisensikan di Amerika Serikat untuk produksi vaksin virus hidup seperti rotavirus dan cacar. Sel vero ditumbuhkan dalam *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) ditambah 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS), 1% Streptomisin/Penisilin pada kondisi suhu 37°C dan kadar CO<sub>2</sub> sebanyak 5%.<sup>(44)</sup>

## 2.2 Kerangka Teori

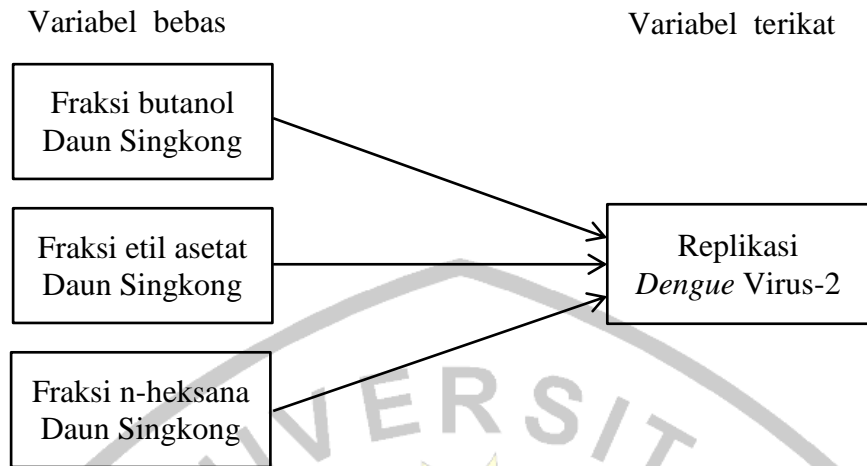


### Keterangan :

- - - - - : Variabel yang diteliti  
 □ : Variabel yang tidak diteliti

Bagan 1. Kerangka Teori

### 2.3 Kerangka Konsep



**Bagan 2. Kerangka Konsep**

### 2.4 Hipotesis

1. Fraksi butanol daun singkong (*Manihot esculenta* C) memiliki pengaruh dalam menghambat replikasi virus *dengue* dengan studi *in vitro*.
2. Fraksi etil asetat daun singkong (*Manihot esculenta* C) memiliki pengaruh dalam menghambat replikasi virus *dengue* dengan studi *in vitro*.
3. Fraksi n-heksana daun singkong (*Manihot esculenta* C) memiliki pengaruh dalam menghambat replikasi virus *dengue* dengan studi *in vitro*.