Antiviral Activity of Mayana Leaves (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br) Extract and Fraction Against Neuraminidase H5N1 with Munana Assay

Nurmalia Saraswati, Moelyono Moektiwardoyo*, Melisa I. Barliana

Department of Biological Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Universitas Padjadjaran - Indonesia

Submitted 06 August 2021; Accepted 13 August 2021; Published 31 August 2021

*Corresponding author: moelyono@unpad.ac.id

Abstract

Influenza A (H5N1) virus is a major epidemic that has a potential to cause epidemics in worldwide. There has been cases of resistance to the antiviral drugs influenza A so that its use began to be limited. Therefore, research needs to be done to make the development of new more effective and safe drugs to fight the influenza A virus. Herbs become one source of new antiviral drugs' development. In this research, antiviral activity from extract and fraction of miana leaf extract (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br.) has been tested through determination of IC_{50} on neuraminidase enzyme using MUNANA Assay method. The optimal concentration of neuraminidase enzyme used is 1.25 U/mL. Validation of the method was performed by determining IC_{50} from DANA as an inhibitor against a neuraminidase enzyme of 15.72 $\mu\text{g/mL}$. The results of inhibition activity test of neuraminidase enzyme by ethanol extract, ethyl acetate fraction, n-hexane fraction and mayana leaf water fraction were 339.1 $\mu\text{g/mL}$; 125.6 $\mu\text{g/mL}$, 355.4 $\mu\text{g/mL}$ and 288.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Between all of samples tested, ethyl acetate fraction has the good potential inhibitory activity.

Keywords: Influenza A (H5N1) Virus, IC_{50} , mayana leaf, MUNANA Assay, neuraminidase enzyme, *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br.

Aktivitas Antivirus Ekstrak dan Fraksi Daun Miana (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br.) terhadap Enzim Neuraminidase H5N1 dengan Metode Munana Assay

Abstrak

Virus influenza A (H5N1) merupakan wabah utama yang berpotensi menyebabkan epidemik di seluruh dunia. Telah ditemukan banyaknya kasus resistensi terhadap obat antivirus influenza A sehingga penggunaannya mulai dibatasi. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk melakukan pengembangan obat baru yang lebih efektif dan aman untuk melawan virus influenza A. Tanaman herbal menjadi salah satu sumber pengembangan obat antivirus baru. Dalam penelitian ini, dilakukan pengujian aktivitas antivirus dari ekstrak dan fraksi ekstrak daun miana (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br) melalui penentuan IC_{50} terhadap enzim neuraminidase menggunakan metode MUNANA Assay. Konsentrasi optimal enzim neuraminidase yang digunakan adalah 1,25 U/mL. Validasi metode dilakukan melalui penentuan IC_{50} dari inhibitor DANA terhadap enzim neuraminidase yaitu sebesar 15,72 $\mu\text{g/mL}$. Hasil pengujian aktivitas inhibisi enzim neuraminidase oleh ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi n-heksan dan fraksi air daun miana secara berturut-turut adalah 339,1 $\mu\text{g/mL}$; 125,6 $\mu\text{g/mL}$, 355,4 $\mu\text{g/mL}$ dan 288,5 $\mu\text{g/mL}$. Dari seluruh sampel yang diuji, fraksi etil asetat memiliki aktivitas potensial penghambatan yang paling baik.

Kata Kunci: Daun miana, Enzim neuraminidase, IC_{50} , MUNANA Assay, *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br., Virus influenza A.

1. Pendahuluan

Virus influenza A merupakan salah satu wabah yang berpotensi menyebabkan epidemik di seluruh dunia. Infeksi dengan virus influenza A dapat menyebabkan gejala klinis ringan sampai patogenesis berat, gejala distress pernapasan akut bahkan kematian.¹

Berdasarkan data WHO sejak tahun 2003 hingga 2017, telah terjadi 860 kasus influenza A (H5N1) di seluruh dunia dengan jumlah kematian sebanyak 454 kasus. Indonesia menjadi urutan kedua kasus influenza terbesar setelah Mesir dengan angka kematian sebanyak 168 orang dari 200 kasus.²

Vaksin menjadi salah satu strategi yang dapat mencegah paparan virus influenza A (H5N1). Namun, karena mutasi pada virus A berkembang pesat, maka penggunaan vaksin menjadi kurang efektif. Sementara itu, saat ini dalam pengobatan penyakit influenza A, terdapat dua jenis golongan obat yang diakui oleh WHO yaitu obat golongan pemblok saluran ion M2 dan golongan inhibitor enzim neuraminidase (NA) yang penggunaannya kini mulai dibatasi.

Saat ini, penelitian mengenai pengembangan tanaman herbal sebagai antivirus influenza A mulai banyak dilakukan. Telah dilakukan studi *in silico* dari antosianin terhadap enzim neuraminidase N1, hasilnya senyawa yang termasuk ke dalam golongan flavonoid tersebut mampu menghambat enzim neuraminidase N1, mencegah pengikatan asam sialat sehingga mengurangi aktivitas neuraminidase.³ Berdasarkan penelitian Jatmiko (2015), daun miana (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br) mengandung pigmen antosianin sebesar 34,22 mg/100 g. Oleh sebab itu, kandungan pigmen antosianin pada daun miana diduga mempunyai aktivitas inhibisi enzim neuraminidase.⁴ Dari uraian tersebut, maka dilakukan penelitian untuk melihat aktivitas antivirus dari ekstrak dan fraksi daun miana terhadap enzim neuraminidase influenza A (H5N1) melalui MUNANA Assay.

2. Metode

Pengujian aktivitas antivirus ekstrak

dan fraksi ekstrak daun miana (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br.) dilakukan dengan melakukan penyiapan sampel uji ekstrak dan fraksi daun miana meliputi pengumpulan dan determinasi, ekstraksi dan fraksinasi, penetapan kadar air, penapisan fitokimia dan pemeriksaan pola KLT. Setelah sampel uji dipersiapkan, dilakukan pengujian aktivitas inhibisi enzim NA H5N1 oleh sampel dengan melakukan tahapan optimasi enzim neuraminidase, validasi metode MUNANA Assay, dan pengujian inhibisi enzim NA H5N1 oleh sampel.

2.1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain *chamber glass*, corong pisah, lampu UV 254 & 366 nm (Camag), maserator, pelat mikro 96-well, pelat mikrotiter, pembaca pelat mikro, dan alat gelas lab lainnya.

2.2. Bahan

Bahan tanaman yang digunakan berupa simplisia daun Miana yang diperoleh dari kebun percobaan Manoko, Lembang, Jawa Barat. Determinasi dilakukan di Herbarium Jatinangor, Laboratorium Taksonomi tumbuhan, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjadjaran.

2.3. Prosedur Rinci

2.3.1. Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi simplisia daun miana dilakukan dengan metode maserasi selama 3 x 24 jam. Fraksinasi ekstrak daun miana dilakukan dengan metode ekstrak cair-cair menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan air.⁵

2.3.2. Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode destilasi. Dalam pengujian ini, digunakan toluen sebanyak 200 mL dan 2 gram sampel.⁶

2.3.3. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia simplisia dan ekstrak daun miana meliputi uji kandungan alkaloid dengan reagen Mayer dan Dragendorff, uji flavonoid dengan reagen amil alkohol dan serbuk magnesium, uji saponin dengan proses

pengocokkan dan penambahan HCl, uji tanin dengan reagen gelatin, uji kuinon dengan reagen KOH, uji polifenol dengan reagen FeCl_3 , uji monoterpenoid dan seskuiterpenoid dengan reagen vanilin sulfat dan uji steroid dan triterpenoid dengan reagen Liebermann-Burchard.⁷

2.3.4. Pemeriksaan Pola KLT

Pemeriksaan pola KLT dilakukan dengan fase diam silika gel Gf254 dan fase gerak butanol : air asetat (4:1:3); n-heksan : etil asetat (7:3) dan (6:4).

2.3.5. Pengujian Inhibisi enzim NA H5N1 oleh Sampel Ekstrak dan Fraksi Daun Miana

Pengujian dilakukan dengan menggunakan pelat mikro 96-well dan pembaca pelat mikro pada panjang gelombang 360 nm dan 450 nm.⁸

2.3.6. Optimasi enzim NA

Optimasi enzim NA menggunakan pelat mikrotiter dengan melibatkan 3 bagian well, yaitu well uji berisi larutan kerja dapar MES, enzim NA dengan variasi konsentrasi, substrat MUNANA dan larutan stop, well kontrol yang berisi larutan kerja dapar MES, substrat MUNANA dan larutan stop, dan well blanko yang hanya berisi larutan dapar MES. Kemudian dilakukan pembacaan nilai RFU menggunakan pembaca pelat mikro pada panjang gelombang 360 nm dan 450 nm. Optimasi dilakukan secara triplo.⁸

2.3.7. Validasi MUNANA Assay

Validasi metode MUNANA Assay menggunakan pelat mikrotiter dengan melibatkan 3 bagian well, yaitu well uji berisi larutan kerja dapar MES, larutan DANA dengan variasi konsentrasi, enzim NA, dan substrat MUNANA serta larutan stop, well kontrol yang berisi larutan kerja dapar MES, enzim NA, substrat MUNANA dan larutan stop, dan well blanko yang hanya berisi larutan dapar MES. Kemudian dilakukan pembacaan nilai RFU menggunakan pembaca pelat mikro pada panjang gelombang 360 nm dan 450 nm. Validasi dilakukan secara triplo.⁸

2.3.8. Uji Inhibisi Enzim NA oleh Sampel Ekstrak dan Fraksi Daun Miana

Pada pelat mikrotiter, well uji terdiri atas well uji ekstrak, fraksi etil asetat, fraksi n-heksan dan fraksi air. Dalam masing-masing well uji, terdapat larutan kerja dapar MES, larutan sampe dengan variasi konsentrasi, enzim NA dan substrat MUNANA, serta larutan stop. Well kontrol berisi larutan kerja dapar MES, enzim NA dan substrat MUNANA, sedangkan well kontrol hanya berisi larutan kerja dapar MES.⁸

3. Hasil

3.1. Pengumpulan dan Determinasi

Bahan simplisia yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia kering daun miana (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br) yang diperoleh dari Kebun Percobaan Manoko, Kecamatan Lembang, Kabupaten Bandung, Jawa Barat. Simplisia tersebut dideterminasi di Herbarium Jatinangor, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Padjadjaran, dengan tujuan untuk memastikan kebenaran spesies dari simplisia yang digunakan untuk menghindari resiko terjadinya kesalahan penggunaan simplisia yang diuji. Berdasarkan hasil determinasi, diperoleh bahwa simplisia kering tersebut merupakan daun miana (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br) yang termasuk marga *Plectranthus* dari suku Lamiaceae.

3.2. Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Miana

Sebanyak 36 liter etanol 70% digunakan untuk mengekstraksi 1 kilogram simplisia daun miana. Ekstrak cair dikentalkan dengan penguap vakum putar pada kecepatan 60 rpm pada temperatur 40°C. Hasil rendemen ekstrak daun miana yang diperoleh adalah 18,214 %. Hasil rendemen masing-masing fraksi secara berturut-turut adalah 3,12 %; 0,63 %; dan 12,49 %.

3.3. Penetapan Kadar Air

Kadar air dalam ekstrak daun miana yang diperoleh adalah sebesar 4,92%, menggunakan sampel seberat 2 gram dengan kenaikan air setinggi 0,1 cm.

3.4. Penapisan Fitokimia

Hasil penapisan fitokimia dari simplisia dan ekstrak daun miana secara kualitatif menunjukkan bahwa kedua sampel tersebut positif mengandung flavonoid, polifenol, saponin, monoterpenoid dan seskuiterpenoid, dan steroid.

3.5. Pemeriksaan Pola KLT

Hasil pemeriksaan KLT pada ekstrak dan fraksi ekstrak daun miana dapat dilihat pada tabel 1 dan 2.

3.6. Optimasi Aktivitas Enzim NA

Komponen dalam setiap well dapat dilihat pada tabel 3, sedangkan hasil optimasi enzim NA dapat dilihat pada gambar 1.

3.7. Validasi MUNANA Assay

Komponen yang terdapat dalam setiap well sama dengan komponen pada optimasi aktivitas enzim NA (tabel 3), sedangkan hasil validasi dapat dilihat pada gambar 2.

3.8. Uji Inhibisi enzim NA oleh Sampel Ekstrak dan Fraksi ekstrak

Komponen yang terdapat dalam setiap well sama dengan komponen pada optimasi aktivitas enzim NA (tabel 3), sedangkan hasil uji inhibisi enzim NA oleh sampel dapat dilihat pada gambar 4 berikut ini.

Ekstraksi simplisia daun miana dilakukan dengan metode maserasi selama 3 x 24 jam. Metode ini dipilih karena teknis dan peralatan yang digunakan sederhana. Selain itu, metode ini mampu mengekstraksi senyawa yang belum diketahui kestabilannya pada temperatur yang tinggi, sehingga senyawa yang termolabil dalam simplisia tidak akan rusak saat disari. Meskipun begitu, kelemahan dari metode ini adalah penggunaan pelarut yang lebih banyak dibandingkan metode lain.⁹

Fraksinasi ekstrak daun miana dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair. Metode ini bekerja berdasarkan pada prinsip partisi senyawa sesuai dengan kepolarannya. Pelarut yang digunakan dalam fraksinasi ekstrak secara berturut-turut dari tingkat kepolaran yang paling rendah adalah n-heksan, etil asetat dan air. Berdasarkan hasil rendemen fraksi, senyawa metabolit lebih banyak terkandung di dalam fraksi air yaitu 12,49 %. Artinya, di dalam ekstrak etanol daun miana banyak terkandung senyawa metabolit yang bersifat polar.

Penentuan kadar air dalam ekstrak daun miana dilakukan untuk menetapkan residu air yang tersisa setelah proses penguapan pada ekstrak kental daun miana. Kadar air dalam suatu sampel ekstrak mempunyai batasan minimal, yaitu tidak lebih dari 10%.⁶ Kadar air dalam ekstrak daun miana perlu ditentukan karena berkaitan dengan stabilitas

4. Pembahasan

Tabel 1. Hasil Pola Kromatogram Ekstrak Daun Miana dengan Pengembang Butanol : Asam Asetat : Air (4 : 1 : 3)

Rf	Warna					
	Penampak bercak AlCl_3		Penampak bercak H_3BO_3		Sinar UV 254nm	Sinar UV 366nm
	UV 254nm	UV 366nm	UV 254nm	UV 366nm		
0,9	kuning	-	merah	merah	hijau	hijau
0,8	kuning	-	kuning	kuning	hijau	-
0,7	kuning	hijau	kuning	kuning	hijau	hijau
0,61	kuning	biru	kuning	kuning	hijau	-
0,52	kuning	biru	kuning	kuning	hijau tua	hijau
0,49	kuning	hijau	kuning	kuning	hijau tua	hijau
0,38	kuning	biru	kuning	kuning	coklat	hijau
0,24	kuning	-	kuning	kuning	coklat	hijau
0,20	kuning	-	kuning	kuning	-	-

Tabel 2. Hasil Pola KLT fraksi daun miana menggunakan penampak bercak AlCl_3 pada UV 366 nm

No	Jenis Fraksi		
	Fraksi etil asetat n-heksan : etil asetat (6:4)	Fraksi n-heksan n-heksan : etil asetat (7:3)	Fraksi air Butanol : asetat : air (4:1:3)
1	biru	ungu	merah
2	biru	ungu	hijau
3	hijau terang	ungu	hijau
4	hijau terang	ungu	biru
5	-	-	biru

dan kualitas dari ekstrak tersebut.

Metode yang digunakan dalam penetapan kadar air adalah metode destilasi. Prinsip metode ini yaitu menguapkan air dengan cairan pembawa yang mempunyai titik didih lebih tinggi dari air, bobot jenis yang lebih rendah dan tidak dapat bercampur dengan air, yaitu toluen.¹⁰

Pemeriksaan Pola KLT dilakukan dengan tujuan untuk memberikan gambaran awal komponen senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak dan fraksinat berdasarkan pola pemisahan. Berdasarkan tabel 1 dan 2, diketahui bahwa pada ekstrak etanol daun miana terkandung senyawa flavonoid yang ditandai dengan munculnya bercak warna biru pada penambahan penampak bercak aluminium klorida yang diamati di bawah sinar UV 366 nm. Demikian juga ketika disemprotkan dengan penampak bercak sitroborat, hasil positif ditandai dengan adanya warna kuning. Munculnya warna kuning disebabkan terjadinya reaksi antara sitroborat dengan gugus orto-hidroksi yang terdapat pada flavonoid. Selain ekstrak etanol, senyawa flavonoid juga terkandung di dalam fraksi etil asetat dan fraksi air, hal ini ditandai dengan adanya bercak warna biru saat disemprot dengan penampak bercak aluminium klorida. Bercak

ini merupakan reaksi pembentukan kompleks antara gugus orto-dihidroksi dengan ion Al (III). Menurut Wagner (1996), warna biru, kuning dan hijau pada bercak yang diamati pada UV 366 nm setelah penambahan aluminium klorida mengindikasikan adanya flavonoid. Sedangkan penampak bercak sitroborat akan menampilkan warna kuning di bawah pengamatan UV 366 nm yang menandakan terdapatnya senyawa flavonoid di dalamnya.¹¹

Uji aktivitas inhibisi enzim neuraminidase (NA) virus influenza A (H5N1) dilakukan dengan metode fluorometrik menggunakan MUNANA Assay. Prinsip dasar dari metode fluorometrik ini adalah adanya mekanisme hidrolisis oleh enzim NA terhadap substrat MUNANA yang menghasilkan senyawa n-asam sialat dan 4-metil umbelliferil (4-MU). Senyawa 4-MU mempunyai kemampuan berfluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 360 nm dan emisi 450 nm, pengukuran nilai satuan fluoresensi relatif (RFU) pada 4-MU menjadi parameter dalam penentuan aktivitas enzim NA virus influenza A (H5N1). Mekanisme reaksi hidrolisis MUNANA oleh enzim NA dapat dilihat pada gambar 3.

Optimasi dilakukan untuk menentukan konsentrasi minimal yang menunjukkan aktivitas optimal dari enzim NA dalam

Tabel 3. Komponen zat dalam setiap well pada optimasi enzim NA

Well	Komponen			
	Larutan kerja dapar MES	Enzim NA	Substrat MUNANA	Larutan stop glisin
Uji	+	+	+	+
Kontrol	+	-	+	+
Blanko	+	-	-	-

Gambar 1. Grafik optimasi enzim neuraminidase (NA)

Gambar 2. Grafik IC_{50} DANA terhadap Enzim NA

menghidrolisis substratnya. Dari grafik konsentrasi NA terhadap nilai RFU (Gambar 2), diperoleh hasil bahwa konsentrasi optimal enzim NA sebesar 1,25 U/mL. Konsentrasi 1,25 U/mL adalah konsentrasi yang akan digunakan dalam proses selanjutnya, yaitu proses validasi metode MUNANA Assay dan proses pengujian aktivitas inhibisi NA oleh

ekstrak dan fraksi daun miana.

Validasi MUNANA Assay dilakukan untuk membuktikan bahwa karakteristik kinerja metode yang digunakan dalam pengujian inhibisi enzim NA oleh suatu inhibitor menggunakan substrat MUNANA sesuai dengan tujuan penggunaannya. Dalam validasi MUNANA Assay, inhibitor

Gambar 3. Mekanisme Hidrolisis MUNANA oleh Enzim NA¹²

Gambar 4. Grafik IC_{50} oleh (a) ekstrak etanol (b) fraksi etil asetat, (c) fraksi n-heksan, dan (d) fraksi air daun miana.

yang digunakan adalah 2,3-dehidro-2-deoksi-N-asam asetil neuraminat (DANA). Validasi dilakukan dengan menentukan nilai konsentrasi hambat 50% (IC_{50}) dari DANA terhadap enzim NA. Dari hasil perhitungan, DANA mempunyai aktivitas inhibisi terhadap enzim NA yang dinyatakan dalam IC_{50} yaitu 15,72 µg/mL atau 53,97 µM. Hasil tersebut memenuhi persyaratan validasi, di mana nilai IC_{50} dari DANA terhadap enzim NA yaitu 6-90 µM.¹³

Pada pengujian inhibisi NA oleh sampel uji ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi n-heksan dan fraksi air, masing-masing sampel dibuat dalam konsentrasi 4 mg/mL, sehingga konsentrasi pada well kekuatan pertama adalah 1 mg/mL.

Berdasarkan grafik pada Gambar 4, nilai IC_{50} pada sampel ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi n-heksan dan fraksi air secara berturut-turut adalah 339,1 µg/mL; 125,6 µg/mL, 355,4 µg/mL dan 288,5 µg/mL.

Dari seluruh sampel uji yang digunakan, aktivitas penghambatan enzim NA terbesar yang mengacu pada nilai IC_{50} terkecil dimiliki oleh sampel etil asetat, yaitu 125,6 µg/mL, kemudian diikuti oleh fraksi air, ekstrak etanol

dan fraksi n-heksan daun miana.

5. Simpulan

Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi n-heksan dan fraksi air daun miana (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br) mempunyai aktivitas inhibisi enzim neuraminidase (NA) dengan nilai IC_{50} secara berturut-turut 339,1 µg/mL; 125,6 µg/mL, 355,4 µg/mL dan 288,5 µg/mL.

Fraksi etil asetat mempunyai nilai penghambatan yang paling tinggi terhadap aktivitas enzim neuraminidase virus influenza A (H5N1) yaitu sebesar 125,6 µg/mL, sehingga mempunyai potensi yang paling baik sebagai inhibitor neuraminidase.

Daftar Pustaka

1. Peiris JS, Hui KP, Yen HL. Host response to influenza virus: protection versus immunopathology. *Curr. Opin. Immunol.* 2010. 22, 475–481.
2. World Health Organization. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2017. 2017. [Diakses 5 Januari 2018]. Tersedia dari www.who.

- int.
3. Swaminathan K, Jeffrey CD, Andrea M, Mark VI, Kevin MD. Binding of a Natural Anthocyanin Inhibitor to Influenza Neuraminidase by Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2013. 405:6563–6572.
  4. Jatmiko ST. Stabilitas Warna Ekstrak Daun Miana (*Coleus scutellarioides* L. Benth var *crispa*) Yang Dikopigmentasi Dengan Ekstrak Apel Malang (*Malus sylvestris* Mill) Var. *rome beauty* (Skripsi) Salatiga: Universitas Kristen Satya Wacana. 2015
  5. Salaeh A. Antidiabetic Activity of Fraction and Subfraction Iler (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br.) Leaves on Diabetic Mice Induced by Alloxan. *Research Journal of Chemistry and Environment.* 2018. 22(Special Issue 1): 5-10.
  6. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. Hal 13-17, 30-32
  7. Fansworth WR. Biological and Phytochemical Screening of Plants. *J Pharm Sci.* 1996. 55(3): 225-276.
  8. Potier M, Mameli L, Belisle M, Dallaire L, Sb M. Fluorometric Assay of Neuraminidase with a Sodium (4-Methyl-umbelliferyl-Alpha-D-N-Acetylneuraminic) Substrate. *Analytical Biochemistry.* 1979. 95:287-296.
  9. Pandey A, Tripathi S. Concept of Standarization, Extraction, and Pre Phytochemical Screening Strategies for Herbal Drug. *J Pharmacognosy Phytother.* 2014. 2 (50): 115-119.
  10. Soebagio. *Kimia Analitik II.* Malang: UM Press. 2005.
  11. Wagner HB. *Plant Drug Analysis.* New York: Springer. 1996.
  12. Kongkamnerd J, Milani A, Cattoli G, Terregino C, Capua I, Beneduce L, et al. The quenching effect of flavonoids on 4-methylumbelliferone, a potential pitfall in fluorimetric neuraminidase inhibition assays. *J Biomol Screen.* 2011. 16(7): 755-764.
  13. Zhang YA. Identification of Selective Inhibitors for Human Neuraminidase Isoenzymes Using C4,C7-Modified 2 Deoxy-2,3-didehydro N acetylneuraminic Acid (DANA) Analogues. *J. Med. Chem.* 2013. 56 : 2948-2958.