

## Aktivitas antiviral influenza A subtype H5N1 dari ekstrak *Brucea javanica* L.Merr

Neny Purwitasari, Herra Studiawan

Departemen Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Surabaya-Indonesia

[npurwitasari@gmail.com](mailto:npurwitasari@gmail.com)

### ABSTRACT

The outbreak of influenza A H5N1 subtype has raised a global concern on the future risk of a pandemic. Oseltamivir, the current antiinfluenza drug, could not meet the demand if there is a major outbreak. Thus, there is a need to find alternative treatment for influenza A. The objective of this study was to determine the antiviral activity of *Brucea javanica* extract against H5N1 influenza A virus, inoculated in embryonated chicken eggs. The antiviral activity was performed in hemagglutination assay. This is a method for titrating influenza viruses based on their ability to attach to molecules present on the surface of red blood cells. Serial concentrations of extract using in this study were tested on embryonated chicken eggs prior to the viral inhibition assay. Result showed that there is no death of chicken embryos after treated with the maximum concentration of the extract (1000 µg/ml) incubated for 72 hours. At the same concentration, *B.javanica* extract reduced 97.39% of H5N1 hemagglutinin titer. In conclusion, *B.javanica* has a potential to be developed as antiinfluenza, especially for inhibiting the initial step of viral infection.

**Keywords:** H5N1 Influenza A, Hemagglutination Assay, *Brucea javanica*

### PENDAHULUAN

Virus influenza digolongkan menjadi 3 tipe, yaitu virus influenza A, B dan C. Salah satu tipe yang menimbulkan pandemik adalah virus influenza A karena mudahnya mereka bermutasi, baik berupa *antigenic drift* ataupun *antigenic shift* sehingga membentuk varian-varian baru yang lebih patogen.

Flu burung atau avian influenza merupakan penyakit influenza yang sebelumnya menginfeksi kelompok hewan unggas, mulai ayam, bebek, dan spesies burung. Flu burung disebabkan oleh virus influenza subtype H5N1. Sejak 1997, virus ini telah dilaporkan menginfeksi manusia. Jumlah orang yang terinfeksi saat ini lebih dari 650 orang dengan tingkat kematian lebih dari 60%. Korban di Indonesia sejak pertama kali dilaporkan sampai 2014 adalah 195 orang dan 163 orang diantaranya meninggal. Jumlah kematian di Indonesia ini merupakan jumlah tertinggi di antara negara-negara yang terinfeksi oleh virus flu burung H5N1 ([www.who.int](http://www.who.int)).

Virus flu burung H5N1 di Indonesia, masih bersifat endemis, masih menjadi penyakit yang merugikan sektor peternakan unggas serta masih menimbulkan masalah kesehatan masyarakat. Pola dinamika dan mutasi, patogenesis, model penularan antarspesies, khususnya pada manusia, obat antiviral serta model vaksin yang tepat, merupakan deretan permasalahan yang perlu dikaji secara mendalam khususnya di Indonesia. Penelitian bukan hanya untuk kepentingan Indonesia, akan tetapi juga bagi bangsa-bangsa lain di dunia (Nidom, 2010).

Virus Flu Burung atau Avian influenza merupakan virus influenza A yang termasuk dalam family orthomyxoviridae. Virus ini merupakan virus RNA, *single strand* yang memiliki 2 lapisan glikoprotein atau antigen permukaan yaitu: Hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Saat ini para ahli telah menemukan 15 macam HA (H1-H15) dan 9 macam NA (N1-N9). Ada 3 tipe virus influenza yaitu tipe A, B dan C. namun tipe A adalah influenza yang paling berbahaya (Harimoto dan Kawaoka, 2001)

*Brucea javanica* memiliki nama lokal buah makasar. Tanaman ini tumbuh liar di India sampai dengan Australia Utara. Di Indonesia umumnya terdapat di hutan jati muda dan hutan sekunder, di pagar dan tempat-tempat yang sudah dibuka hutannya untuk pertanian pada daerah rendah hingga 500 meter dpl (Republik Indonesia, 1979). Kandungan kimia dari tanaman ini adalah alkaloid, alkaloid glikosida, quassinoid, quassinoid glikosida, triterpenoid, serta lignan (Kampedick, 1995; Kim, 2004; Polonsky, 1980). Sedangkan aktivitas farmakologi dari kandungan quassinoid adalah sebagai antivirus HIV dan antivirus Tobacco Mosaic Virus, suatu virus yang menyerang daun tembakau (Shen *et al.*, 2008). Aktivitas lain yang telah dilaporkan dari buah makasar adalah anti babesial (Subeki *et al.*, 2007), anti diabet (Shahidaa *et al.*, 2009), anti-inflamasi (Hall *et al.*, 1983), antimalarial (Kitagawa, 1994).

Pada penelitian pendahuluan, peneliti menemukan bahwa ekstrak *B.javanica* mampu menghambat enzim neuraminidase bakteri *Clostridium perfringens* (Purwitasari, 2010). Juga mampu menghambat aktivitas enzim neuraminidase virus H5N1 dan H1N1 (Purwitasari, 2011). Isolat yang diisolasi dari fraksi etil asetat Buah Makasar juga mampu menghambat virus H1N1 dalam kultur sel MDCK secara signifikan (Purwitasari, 2013). Aktivitas antivirus influenza subtype H5N1 dengan menggunakan virus yang diinokulasikan dalam telur ayam berembrio dari tanaman ini belum pernah diteliti. Dengan diketahui aktivitas antivirus dari ekstrak tanaman ini, maka diharapkan dapat menjadi alternatif pengobatan influenza apabila terjadi wabah atau resistensi terhadap obat anti influenza yang tersedia sekarang.

### BAHAN DAN METODE

**Bahan.** Buah Makasar diperoleh dari supplier yang diidentifikasi dan dideterminasi di Balai Materia Medica Batu. Bahan kimia yang dipakai dalam penelitian ini adalah metanol, Penisilin-Streptomisin (Sigma), DMSO (Merck), PBS, Aqua bidestilata. Host atau inang dalam penelitian ini adalah Telur Ayam Berembrio (TAB) yang berusia 10-11

hari, diperoleh dari Pusat Veterinary Farma. Virus H5N1: A/chicken/Indonesia/114/2008 (H5N1) dengan titer HA 2<sup>11</sup> diperoleh dari Avian Influenza Research Center (AIRC) Universitas Airlangga

**1. Metode Ekstraksi.** Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan metanol. Ekstraksi dilakukan selama 3 x 24 jam. Filtrat diuapkan menggunakan *Rotary evaporator* sampai didapat ekstrak kental.

**2. Uji toksisitas ekstrak pada TAB.** Uji diawali dengan melakukan uji toksisitas ekstrak terhadap telur ayam berembrio (TAB). Tujuan eksperimen ini adalah memperoleh konsentrasi ekstrak yang tidak menimbulkan kematian pada embrio. Sebanyak 10 mg ekstrak dilarutkan dengan 2,5% DMSO dan 10 ml Phosphate Buffered Saline, kemudian difilter dengan millipore untuk menghilangkan kontaminan. Larutan uji diencerkan menggunakan pelarut yang sama hingga diperoleh konsentrasi 1000, 500, 250 dan 125 µg/ml. Disiapkan telur ayam berembrio yang berusia 10-11 hari dan larutan ekstrak dengan konsentrasi tersebut di atas di injeksikan ke dalam cairan alantois telur ayam, diinkubasi selama 72 jam dan tiap 24 jam diamati apakah ada kematian embrio akibat paparan ekstrak tersebut. Setelah didapat konsentrasi ekstrak tertinggi yang aman dan tidak menimbulkan kematian embrio, maka uji dilanjutkan dengan uji penghambatan virus yang diinokulasikan dalam TAB dan diberi perlakuan ekstrak dengan berbagai konsentrasi.

**3. Uji Penghambatan Pertumbuhan Virus.** Disiapkan telur ayam berembrio berusia 10-11 hari. Dibuat lubang pada bagian telur yang terdapat cairan alantois dan diinjeksikan dengan ekstrak pada konsentrasi 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml dan 125 µg/ml sebanyak 100 µl, ditambah dengan 100 µl suspensi virus H5N1 (0,01 MOI). Zanamivir 10 µg/ml dipakai sebagai kontrol positif dan virus H5N1 tanpa perlakuan ekstrak digunakan sebagai kontrol negatif. Pada masing-masing ekstrak ditambah larutan penisilin streptomisin 50 µl. Telur kemudian diinkubasi selama 72 jam, 37°C. Kematian embrio diamati dengan *candler* setiap 24 jam. Setelah masa inkubasi selesai, telur disimpan dalam suhu 4°C selama 12-24 jam dan cairan alantois dipanen untuk dilakukan uji penghambatan aktivitas hemaglutinasi.

**4. Uji Penghambatan Aktivitas Hemagglutinasi.** Penghambatan aktivitas hemagglutinasi bertujuan untuk menghitung titer virus influenza berdasarkan kemampuannya untuk melekat pada asam sialat di permukaan sel darah merah. Protein hemagglutinin ini berperan dalam membatu langkah awal pelekatan virus kepada sel inang. Uji dilakukan dengan menggunakan 0,6 % sel darah merah ayam. Dalam penelitian ini, digunakan U-bottom 96-well plate. Uji ini diawali dengan menambahkan 50 µl PBS ke dalam tiap well kecuali baris pertama. Setelah itu ditambahkan sampel (cairan alantois berisi larutan virus yang telah diberi perlakuan ekstrak yang telah dipanen, dan juga larutan virus yang tanpa ekstrak) sebanyak 100 µl ke baris pertama dan kedua. Pengenceran 2 kali dilakukan dengan memindahkan 50 µl larutan dari baris kedua (A2-K2) ke (A3-JK3) dengan menggunakan mikropipet. Perlakuan ini dilanjutkan sampai ke well terakhir dan larutan yang terakhir dibuang. Setelah masing-masing well terisi larutan uji, setiap well diisi dengan 50 µl

larutan sel darah merah dan kemudian diinkubasi selama 30 menit. Setelah terjadi pengendapan sel darah merah pada kontrol (PBS + sel darah merah saja) maka perlakuan dianggap selesai. Titer HA ditetapkan well sebelum well terakhir yang menunjukkan adanya pengendapan sel darah merah. Perhitungan % penghambatan tiap konsentrasi dilakukan dengan menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Penurunan titer HA} = \frac{\text{Titer HA virus tanpa perlakuan} - \text{Titer HA virus dengan perlakuan}}{\text{Titer virus tanpa perlakuan}} \times 100\%$$

perlakuan

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**1. Hasil Ekstraksi.** Sebanyak 625g Buah Makasar diserbuk dengan penyerbuk diperoleh 614 g serbuk halus. Serbuk tersebut kemudian diekstrak dengan metanol dengan metode maserasi selama 3 x 24 jam, didapat ekstrak kental 64 g.

**2. Hasil Uji Toksisitas.** Uji toksisitas menunjukkan hanya terdapat satu kematian embrio pada konsentrasi ekstrak 1000 µg/ml di hari pertama. Kematian terjadi pada replikasi ke-3. Setelah dibuka cangkangnya ternyata cairan alantois berwarna merah dan tidak berwarna kuning keruh. Ini memberi dugaan bahwa kematian embrio disebabkan oleh terkenanya pembuluh darah embrio pada saat penginjeksian sampel, bukan karena pengaruh ekstrak yang toksik. Maka dari itu, pada uji penghambatan antivirus pada TAB, digunakan semua konsentrasi mulai dari 1000 sampai dengan 125. (Tabel 2.1)

**Tabel 2.1** Hasil pengamatan uji toksisitas ekstrak terhadap TAB

Konsentrasi ekstrak (µg/ml)	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
1000	hidup	hidup	mati hari ke-1*
500	hidup	hidup	hidup
250	hidup	hidup	hidup
125	hidup	hidup	hidup
62.5	hidup	hidup	hidup

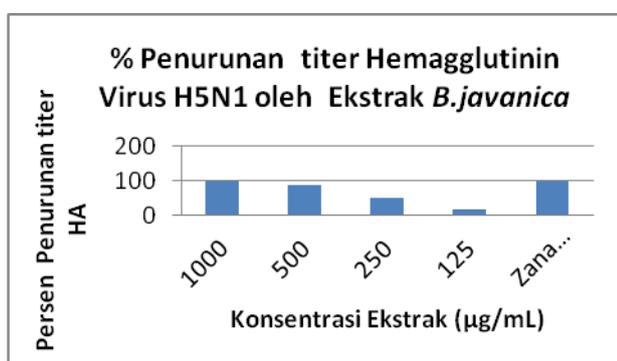
**Keterangan (\*):** telur ayam yang embrionya mati dibuka cangkangnya, isinya masih berwarna merah jernih diindikasikan karena pembuluh darah pecah akibat proses injeksi mengenai pembuluh darah).

**1. Uji Penghambatan Pertumbuhan Virus.** Dari inokulasi TAB menggunakan virus H5N1 yang telah diberi perlakuan ekstrak dengan berbagai konsentrasi menunjukkan kematian embrio pada jam ke-48. Hal ini terjadi karena virus H5N1 sangat patogen terhadap embrio ayam. Uji dihentikan pada jam ke-48. Maka dari itu semua TAB dimasukkan ke dalam lemari pendingin 4°C selama 12 jam sebelum dipanen cairan alantoisnya.

**2. Hasil Uji Hemagglutinasi.** Dari uji hemagglutinasi yang dilakukan terhadap cairan alantois yang dipanen dari TAB, di dapatkan rerata titer HA dan kemudian dihitung persen penghambatannya menggunakan rumus persen penghambatan di dapat data seperti pada tabel berikut:

**Tabel 4.1.** Persentase Penghambatan Hemaglutinin H5N1 oleh Ekstrak *B.javanica*

Dosis/konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	rata-rata titer HA	Persen penghambatan (%)
1000	13,33	97,39
500	53,33	89,58
250	256	50
125	426,67	16,79
Zanamivir 10	4	99,22
Virus H5N1 tanpa perlakuan	512	-

**Tabel 4.2.** Diagram penurunan titer hemaglutinin H5N1 oleh ekstrak *B.javanica*

Pada penelitian ini, digunakan Buah Makasar yang dibeli di pasar Genteng Surabaya dan di determinasi di Matera Medika Batu. Dari hasil ekstraksi diperoleh rendemen sekitar 10%. Ekstrak yang diperoleh kemudian digunakan sebagai bahan uji aktivitas antivirus H5N1. Penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh peneliti membuktikan bahwa Buah Makasar memiliki kandungan aktif yang mampu menghambat pertumbuhan virus H1N1 (Flu Babi) dengan mekanisme penghambatan aktivitas neuraminidase dan hemagglutinin (Purwitasari, 2013).

Salah satu cara untuk menghambat replikasi virus influenza adalah saat pelekatan virus pada membran sel inang. Hemagglutinin virus influenza melekat pada oligosakarida di membran sel inang berupa asam sialat pada posisi terminal. Pengujian Hemagglutinasasi (Uji HA) merupakan pengujian paling sederhana untuk menghitung titer virus berdasarkan kemampuannya untuk melekat pada molekul di permukaan sel darah merah. Pengujian dilakukan pada mikropate 96 well dengan menggunakan berbagai macam sel darah merah (*Red Blood Cell* (RBC)) ayam, turkey, marmot dan manusia. Sel darah merah ayam merupakan sel darah merah yang paling sering dipakai.

Menurut Chattopadhyay (2009) apabila suatu bahan uji atau ekstrak bisa menghambat virus sehingga titer virus akan turun demikian halnya dengan protein hemagglutinin akan mengalami penurunan juga. Sehingga metode ini selain bisa menggambarkan aktivitas penghambatan pada pelekatan pertama virus pada sel inang, juga bisa menggambarkan penurunan titer virus karena adanya hambatan dari ekstrak.

Pada penelitian ini diperoleh bahwa ekstrak masih relatif aman pada telur ayam berembrio yang diinokulasi dengan ekstrak saja sampai dengan konsentrasi tertinggi yaitu 1000 $\mu\text{g/mL}$ . Hal ini menggambarkan bahwa pemakaian ekstrak tidak membunuh embrio sebagai inang perkembangan virus. Hasil uji hemagglutinin menunjukkan penurunan titer sebesar 97,39% pada konsentrasi ekstrak 1000 $\mu\text{g/mL}$ . Dari hasil yang telah diperoleh ternyata memiliki gambaran bahwa ekstrak Buah Makasar memiliki hambatan terhadap virus H5N1, terutama pada step awal pelekatan virus kepada asam sialat pada saluran pernafasan. Kontrol obat yang dipakai dalam eksperimen ini adalah Zanamivir yang merupakan obat standart yang sudah disetujui oleh FDA.

**Kesimpulan.** Ekstrak buah Makasar memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai antiinfluenza A (H5N1). Penelitian lanjutan mengenai senyawa aktif dan mekanisme penghambatan yang lain sedang dilakukan.

**Ucapan Terimakasih.** Penelitian ini dibiayai oleh DIPA BOPTN tahun 2014 dengan no. SK Rektor 1336/UN3/2014. Peneliti juga mengucapkan terimakasih kepada Kepala Lab Avian Influenza Research Center (AIRC) Universitas Airlangga beserta seluruh anggota atas bantuan yang diberikan selama mengerjakan penelitian ini.

#### PUSTAKA

- Chattopadhyay, D. 2009. Recent Advancements for the Evaluation of Anti-viral Activities of Natural Products. *New Biotechnology* vo.24, No 5 p.347-368
- Hall, I. H., Lee, K. H., Imakura, Y., Okano, M. & Johnson, A. (1983) Anti-Inflammatory Agents. Iii. Structure-Activity Relationships Of Brusatol And Related Quassinoids. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 72, 1282-1284.
- Harimoto and Kawaoka .2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev* 14 (1): 129-149
- Kampedick, C, Sung, T.V., Thuy., Tri, M.V., Adam, G., 1995 (20R)-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosylpregn-5-ene-3 $\beta$ ,20-diol from *Bucea javanica*. *Phytochemistry* 38 pp.699-701.
- Kim, I.H., Suzuki, R., Hitotsuyanagi, Y, Takeya, K., 2004.Three novel quassinoids javanicolides A dan B, and javanoside A from seeds of *Bucea javanica*. *Tetrahedron* 59 pp.9985-9989.
- Kitagawa, I., Mahmud, T., Simanjuntak, P., Hori, K., Uji, T. & Shibuya, H. (1994) Indonesian Medicinal Plants. VIII. Chemical Structure of Three New Triterpenoids, Bruceajavanin A, Duhydrobruceajavanin A, and Bruceajavanin B, and a New Alkaloidal Glycoside, Bruceacanthoside from the Stem of *Bucea javanica* (Simaroubaceae). *Chem. Pharm. Bull*, 42, 1416-1421.
- Nidom, CA. 2010. Menelusuri Penyebaran Virus Flu Burung di Indonesia (Tahun 2003-2007). Airlangga University Press, Surabaya
- Polonsky, J., Varenne, J., Prange, T., Pascard, C., Antileukemic quassinoids: structure (X-ray

- analysis) of bruceine C and revised structure of bruceantinol, *Tetrahedron Letters* 21 (1980) 1853-1856.
- Purwitasari, N. 2010. Neuraminidase Inhibition Activity of *Brucea Javanica* L.Merr. *International Conference on Natural Product*, 20-21th December. Penang-Malaysia.
- Purwitasari, N. 2011. Potential Neuraminidase Influenza A (H5N1 & H1N1) Inhibitor from *Brucea javanica* L.Merr. *Bali International Seminar on Science and Technology*, 20-22th July. Denpasar-Bali.
- Purwitasari, N. 2013. Neuraminidase Inhibition and In-vitro Antiviral Influenza A (H1N1) Activities of *Brucea Javanica* L.Merr. *Master Thesis*. School of Pharmaceutical Sciences, University of Science Malaysia. Penang-Malaysia
- Republik Indonesia. 1979. *Materia Medika Indonesia jilid 1*. Departemen Kesehatan RI
- Shahidaa, A. N., Wong, T. W. & Chooa, C. Y. (2009) Hypoglycemic Effect Of Quassinoids From *Brucea Javanica* (L.) Merr (Simaroubaceae) Seeds. *Journal Of Ethnopharmacology*, 124, 586-591.
- Shen, J. G., Zhang, Z. K., Wu, Z. J., Ouyang, M. A., Xie, L. H. & Lin, Q. L. (2008) Antiphytoviral Activity Of Bruceine-D From *Brucea Javanica* Seeds. *Pest Manage. Sci*, 46, 191-196.
- Subeki, Matsuura, H., Takahashi, K., Nabeta, K., Yamasaki, M., Maede, Y. & Katakura, K. (2007) Screening Of Indonesian Medicinal Plant Extracts For Antibabesial Activity And Isolation Of New Quassinoids From *Brucea Javanica*. *J.Nat.Prod*, 70, 4.
- [http://www.who.int/csr/don/2010\\_03\\_05/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2010_03_05/en/index.html)