

## Aktivitas Antivirus *Simian Retrovirus* Serotype-2 (SRV-2) dari Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*) dan Temu Lawak (*Curcuma Xanthorrhiza*)

AMOR TRESNA KARYAWATI

Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknik, Universitas Nusa Cendana, Indonesia

**INTISARI:** Telah diteliti aktivitas antivirus dari ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*) dan Temu Lawak (*Curcuma xanthorrhiza*) terhadap *Simian Retrovirus Serotype-2* (SRV-2). SRV-2 adalah virus penyebab penyakit penurunan kekebalan tubuh pada monyet jenis *Macaca* (K/SAIDS). SRV-2 berspektrum luas, tidak hanya menyerang sel-sel limfoid tetapi juga sel-sel tubuh lainnya. SRV dapat ditemukan pada berbagai jaringan tubuh dan organ monyet melalui metode *polymerase chain reaction* (PCR). Daun Meniran dan rimpang Temu Lawak diekstraksi dengan etanol lalu dipekatkan dalam alat penguap-putar. Uji morfologi sel digunakan untuk mempelajari daya toksisitas ekstrak terhadap sel. Konsentrasi ekstrak 100 ppm, 250 ppm, dan 500 ppm ditambahkan pada kultur sel A549 yang telah diinfeksi SRV-2. Aktivitas antivirus dari ekstrak dideteksi dengan teknik *Real-Time* PCR. Aktivitas antivirus ditentukan berdasarkan *cycle threshold* (Ct) dari supernatan kultur sel A549 yang diinfeksi SRV-2. Nilai Ct dari supernatan tidak terdeteksi karena jumlah virus terlalu sedikit sebagai akibat dari aktivitas antivirus yang berhasil menekan pertumbuhan virus.

**KATA KUNCI:** antivirus, SRV-2, Meniran, Temu Lawak, A-549.

**ABSTRACT:** Antiviral activity of *Phyllanthus niruri* and *Curcuma xanthorrhiza* extracts against *Simian Retrovirus Serotype-2* (SRV-2) was investigated. SRV-2 causes simian immune deficiency syndrome (SAIDS) in various macaques species. SRV has a broad cellular tropism, including both lymphoid and non-lymphoid tissues. SRV can be demonstrated in many tissues and organs by polymerase chain reaction (PCR). Leaves of *Phyllanthus niruri* and rhizome of *Curcuma xanthorrhiza* was extracted with ethanol and the extract was concentrated using rotary-evaporator. Cells morphological assay were used to examine the toxicity of the extract. Extract with concentrations of 100 ppm, 250 ppm and 500 ppm were added to cultured A549 cell line that had been infected with SRV-2. Antiviral activity of the extracts were detected by using *Real-Time* PCR technique. The antiviral activity was determined based on cycle threshold of supernatant from SRV-2 infection in cultured of A549 cells. *Phyllanthus niruri* and *Curcuma xanthorrhiza* extracts at concentrations of 100 ppm, 250 ppm, and 500 ppm did not detected by *Real-Time* PCR because the number of viruses too scanty as a result of antiviral activity of the extracts.

**KEYWORDS:** antiviral activity, SRV-2, *Phyllanthus niruri*, *Curcuma xanthorrhiza*, A549.

E-MAIL: amorprimate@yahoo.com

Juli 2011

### 1 PENDAHULUAN

Meniran (*Phyllanthus niruri*) memiliki khasiat sebagai obat antivirus. Senyawa yang ditemukan pada Meniran antara lain triterpenoid, flavonoid, tanin, alkaloid, dan asam fenolat. Secara empiris, rebusan daun Meniran sering dimanfaatkan sebagai obat tradisional untuk mengobati penyakit hati, diuretik, penyakit kelamin, obat batuk, antidiare, sariawan, panas dalam dan tonik lambung. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Meniran berfungsi menghambat DNA polymerase dari virus hepatitis B dan virus hepatitis lainnya, menghambat enzim reverse transcrip-

tase dari retrovirus, antibakteri, antifungi, antidiare, dan obat penyakit gastrointestinal lainnya<sup>[1]</sup>.

Temu Lawak (*Curcuma xanthorrhiza*) bermanfaat untuk mengobati penyakit saluran pencernaan, kelainan hati, kandung empedu, pancreas, usus halus, tekanan darah tinggi, kontraksi usus, sariawan dan dapat digunakan sebagai tonikum. Kandungan kimia Temu Lawak antara lain: feladren, kamfer, tumerol, tolilmetilkarbinol, arkurkumen, zingiberen, kuzerenon, germakron, a-tumeron dan xanthorrhizol<sup>[2]</sup>.

SRV-2 adalah virus yang secara alami terdapat pada monyet *Macaca*. SRV-2 menyebabkan penyakit

Simian AIDS (SAIDS). Gejala penyakit SAIDS memiliki banyak persamaan dengan penyakit AIDS pada manusia. Penyakit SAIDS dapat menyebabkan kematian pada *Macaca* dan dapat ditularkan dari *Macaca* kepada manusia. Monyet jenis *Macaca* sering digunakan dalam penelitian biomedis. Monyet yang digunakan dalam penelitian biomedis harus bebas virus SRV-2. Senyawa antivirus SRV-2 diperlukan untuk mengatasi penyakit SAIDS<sup>[3]</sup>.

Ekstrak meniran dan temulawak dapat dimanfaatkan sebagai obat penyakit hepatitis. Penyakit hepatitis disebabkan oleh virus. Ekstrak meniran dan temulawak memiliki aktivitas antivirus terhadap virus hepatitis. Kedua ekstrak tersebut diduga dapat pula menghambat aktivitas hidup virus SRV-2.

## 2 BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan November 2008 sampai bulan Februari 2009 di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi Pusat Studi Satwa Primata IPB. Bahan yang digunakan antara lain: ekstrak Temulawak, ekstrak Meniran, sel A549, sel A549 yang telah diinfeksi SRV-2 (disediakan oleh Diah Iskandriati dan Robin Watanabe), Dulbecco's- Modified Eagle Medium (D-MEM), Fetal Bovine Serum (FBS) 10%, Antibiotik (Penicillin 100 unit/ml, Streptomycin 100 g/mL), NaHCO<sub>3</sub>, Phosphate Buffer Saline (PBS), Trypsin 0,125% dalam PBS, air deionisasi, Gas CO<sub>2</sub>.

### 2.1 Kultur sel

Kultur sel mengadaptasi prosedur yang dikemukakan oleh Freshney<sup>[4]</sup>. Sel A549 normal atau yang terinfeksi SRV-2 dithawing atau dicairkan setelah dikrio-preservasi, lalu ditanam pada medium D-MEM dan diinkubasi pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub>. Pada sel yang telah tumbuh *confluent* harus dilakukan subkultur. Media sel dibuang kemudian ditambahkan PBS sebanyak 10 mL untuk membersihkan flask dari sisa media, lalu PBS dibuang. Kemudian Trypsin ditambahkan ke dalam Flask sebanyak 5 mL dan diinkubasi pada 37°C selama 5 menit, lalu media ditambahkan ke dalam Flask sebanyak 2 mL untuk menghentikan Trypsin. Sel yang telah lepas dari substrat dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi 15 mL, kemudian disentrifugasi 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, sel dilarutkan dalam 3 mL media sambil diaduk sampai homogen, setelah homogen baru ditanam ke dalam 2 flask yang berisi media D-MEM.

### 2.2 Uji toksisitas ekstrak

Sebanyak 100 l suspensi sel A549 normal (103 sel per 1 ml) dikultur dalam Plate styrene 24 wells dan diinkubasi pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub> selama 24 jam.

Setelah 24 jam inkubasi ekstrak Meniran dan Temulawak pada konsentrasi 250 ppm, 500 ppm dan 750 ppm ditambahkan ke dalam kultur, lalu diinkubasi selama 96 jam pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub>. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai terjadi kematian 100% dalam suatu lubang<sup>[5]</sup>. Persentase kematian dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{jumlah sel yang hidup}}{\text{jumlah sel kontrol}} \times 100\%$$

Jumlah sel yang hidup dalam biakan sel dihitung menggunakan *haemocytometer*. Setelah persentase kematian diketahui dapat disimpulkan konsentrasi ekstrak yang tidak toksik terhadap sel A549 normal. Selanjutnya konsentrasi ekstrak yang tidak toksik dijadikan acuan dalam uji senyawa antiviral.

### 2.3 Uji aktivitas antivirus

Sebanyak 100  $\mu$ l suspensi sel A549 (103 sel per 1 ml) yang telah diinfeksi oleh SRV-2 dikultur pada *Plate styrene 24 wells*. Sel A549 dan SRV-2 dibiarkan tumbuh selama 24 jam pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub>, lalu ekstrak Meniran dan Temulawak ditambahkan pada konsentrasi 100 ppm, 250 ppm dan 500 ppm. Selanjutnya *Plate styrene 24 wells* diinkubasi di inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub> selama 3 hari. Pada hari ketiga supernatan kultur sel diambil dan diekstraksi RNA-nya.

Ekstraksi RNA dilakukan dengan menggunakan QIAamp Viral RNA Mini Kits. Hasil ekstraksi RNA perlu dirubah dulu menjadi cDNA supaya dapat di amplifikasi dengan metode PCR. Proses perubahan RNA menjadi cDNA dilakukan oleh enzim reverse-transkriptase. Transkripsi terbalik dilakukan dengan menggunakan kit transkripsi terbalik produksi Invitrogen. Setelah dalam bentuk cDNA baru dapat dilakukan proses amplifikasi cDNA atau proses penggandaan untai cDNA melalui Real-Time PCR<sup>[6]</sup>. Real-Time PCR dilakukan dengan menggunakan kit produksi Biorad. Pada mesin Real-Time PCR diset inkubasi tahap I pada suhu 95°C selama 3 menit. Inkubasi tahap II diset 40 siklus dengan urutan setiap siklus inkubasi pada suhu 95°C selama 10 detik, 47°C selama 30 detik dan 72°C selama 30 detik. Pada tahap III diset inkubasi pada suhu 95°C selama 1 menit dan 55°C selama 1 menit. Pada tahap IV diset 81 siklus dengan setiap siklus diinkubasi pada suhu 55°C selama 10 detik. Pada tahap V diset inkubasi pada suhu 25°C dan dipertahankan pada suhu ini sampai proses pengolahan data Real-Time PCR selesai. Hasil kuantitatif PCR akan muncul di layar monitor alat PCR.

### 3 HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.1 Hasil uji toksisitas

Posisi kultur sel dan penambahan ekstrak Temu Lawak (T), Meniran (M), kontrol pelarut (KP), dan kontrol media (KM) tersusun seperti pada tabel berikut:

TABEL 1: Posisi kultur sel A549 dan penambahan ekstrak Temu Lawak dan Meniran

	1	2	3	4	5	6
A	750 T	750 T	750 M	750 M		
B	500 T	500 T	500 M	500 M		
C	250 T	250 T	250 M	250 M		
D			KM	KM	KP	KP

Jumlah sel yang hidup pada akhir pengujian toksisitas tercantum pada tabel 2.

TABEL 2: Jumlah sel ( $\times 10^4$ ) yang hidup setelah penambahan ekstrak Meniran dan Temu Lawak

	1	2	3	4	5	6
A	0	0	1,9	3,2	0	0
B	1,3	3,3	1,7	3,3	1,6	3,0
C	2,1	1,6	1,7	2,2	1,9	0,5
D			1,9	2,6	2,2	1,3

Hasil uji toksisitas menunjukkan bahwa pada penambahan ekstrak 250 ppm dan 500 ppm sel A549 tumbuh normal. Penambahan ekstrak Temu Lawak 750 ppm menyebabkan kematian sel A549 dengan persentase kematian 100%, sedangkan penambahan ekstrak Meniran 750 ppm tidak menyebabkan kematian sel. Berdasarkan hasil uji toksisitas, dosis tertinggi yang tidak toksik bagi sel A549 adalah 500 ppm. Dengan demikian dosis yang digunakan dalam uji aktivitas antivirus adalah 100 ppm, 250 ppm dan 500 ppm. Hasil pengujian toksisitas setelah penghitungan persentase kematian sel ditunjukkan pada tabel 3.

TABEL 3: Hasil uji toksisitas ekstrak Meniran dan Temu Lawak terhadap sel A549

Ekstrak	Konsentrasi (ppm)	Persentase kematian (%)
Temulawak	250	0
	500	0
	750	100
Meniran	250	0
	500	0
	750	0

#### 3.2 Hasil uji aktivitas antivirus

Pada kontrol (NTC-1) tidak terdeteksi adanya amplifikasi cDNA virus SRV-2. Semua standar dari susensi virus SRV-2 menunjukkan adanya amplifikasi cDNA. Standar 1 (Std-1) dengan konsentrasi 10-3 menunjukkan terjadinya amplifikasi pada siklus 18.24 dan 17.62. Standar 2 (Std-2) dengan konsentrasi 10-4 menunjukkan amplifikasi pada siklus 23.09 dan 22.86. Standar 3 (Std-3) yang memiliki konsentrasi 10-5 menunjukkan amplifikasi pada siklus 26.34 dan 25.37. Standar 4 (Std-4) dengan konsentrasi 10-6 menunjukkan terjadinya amplifikasi cDNA pada siklus 29.59 dan 29.58. Dengan demikian semakin kecil konsentrasi cDNA memerlukan siklus yang lebih banyak untuk beramplifikasi. Sedangkan pada kontrol media, kontrol pelarut (air) dan semua perlakuan SRV yang ditambah ekstrak tidak terdeteksi adanya amplifikasi cDNA virus. Tidak terdeteksinya cDNA virus diduga disebabkan kandungan cDNA sampel yang terlalu sedikit. Kandungan cDNA yang terlalu sedikit diduga berhubungan dengan sedikitnya jumlah virus SRV-2 yang dilepaskan ke supernatan sehingga setelah diekstraksi RNA-nya dan ditranskripsi terbalik hanya menghasilkan sedikit cDNA. Jumlah virus yang dilepas pada supernatan sedikit juga diduga karena adanya pengaruh penghambatan pertumbuhan virus SRV-2 dari ekstrak yang ditambahkan pada kultur sel. Ditinjau dari titik lelehnya cDNA kontrol dan sampel memiliki titik leleh pada 83,5°C dan 84°C. Titik leleh yang hampir mencapai pada satu titik menunjukkan kandungan zat pengotor yang sedikit dalam kontrol dan sampel.

### 4 SIMPULAN

Konsentrasi ekstrak meniran dan temulawak yang tidak toksik untuk sel A549 adalah 500 ppm. Ekstrak Meniran dan Temu Lawak pada konsentrasi 100 ppm, 250 ppm, dan 500 ppm dapat menghambat pertumbuhan virus SRV-2 yang ditumbuhkan pada sel A549 (sel kanker paru-paru manusia).

### DAFTAR PUSTAKA

- [1] Bermawie, N., 2006, Mengatasi demam berdarah dengan tanaman obat, *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*, Vol.28, No.6,
- [2] Kristina, N.N., R. Noveriza, S.F. Syahid, dan M. Rizal, 2007, *Peluang peningkatan kadar kurkumin pada tanaman kunyit dan temulawak*, Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik
- [3] Saepuloh, U., D. Iskandriati, M. Sadikin, dan J. Pamungkas, 2009, Expression of Simian Retrovirus type D serotype 2 envelope in insect cell using baculovirus expression vector system, *Microbiology Indonesia*, 3(2):91-95.

- [4] Doyle, A., dan J.B. Griffiths, 2000, *Cell and Tissue Culture for Medical Research*, John Wiley & Sons LTD., Chichester
- [5] Freshney, R.L., 2000, *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*, edisi keempat, Wiley-Liss Inc., Canada
- [6] Leblanc, J.J., J. Pettipas R.J., Davidson, G.A. Tipples, J. Hiebert, dan T.F. Hatchette, 2008, Detection of mumps virus RNA by real-time one-step reverse transcriptase PCR using the light cycler platform, *Journal Cilinical Microbiology*, 46(12):4049-4051 \_\_\_\_\_