

AKTIVITAS ANTIVIRAL CURCUMIN TERHADAP VIRUS DENGUE PADA GALUR SEL A549

Jonathan A. N. Halim¹, Edi Dharmana², Rebriarina Hapsari³

¹ Mahasiswa Program Pendidikan S-1 Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

² Staf Pengajar Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

³ Staf Pengajar Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang - Semarang 50275, Telp. 02476928010

ABSTRAK

Latar Belakang : Virus Dengue (DENV) adalah arbovirus yang secara geografis tersebar paling luas dan menjadi masalah besar seluruh dunia. Pengobatan infeksi DENV saat ini terbatas pada deteksi dini, penggantian cairan dan terapi simptomatik. Viral load sering dikaitkan dengan tingkat keparahan penyakit pada pasien terinfeksi DENV, namun sampai saat ini belum ada obat antivirus berlisensi yang tersedia. Penelitian ini melihat efek antivirus curcumin, senyawa aktif utama dari kunyit (*Curcuma longa*), pada pertumbuhan DENV pada galur sel karsinoma epitel paru-paru manusia (A549).

Metode : Penelitian ini melakukan uji toksisitas Curcumin pada sel A549 untuk menentukan konsentrasi curcumin yang digunakan berdasarkan konsentrasi sitotoksik (CC50) curcumin pada sel A549. Kelompok perlakuan dibedakan berdasarkan konsentrasi curcumin dan cara pemberian curcumin. Sel A549 diinfeksi dengan DENV-1 dengan *Multiplicity of Infection* = 1 dan sel diinkubasi dengan Curcumin pada dosis multi-subtoxic selama seluruh waktu inkubasi (*Full Time*) dan setelah virus masuk ke sel (*After Entry*). Sel yang terinfeksi diinkubasi dengan Curcumin selama 48 jam dan kemudian titer virus ditentukan dengan *Plaque Assay*.

Hasil : Berdasarkan uji toksisitas curcumin pada sel A549, curcumin tidak akan mempengaruhi viabilitas sel-sel A549 secara signifikan pada konsentrasi hingga 50 μM dengan CC50 = 151,19 μM . Hasil penelitian menunjukkan pemberian Curcumin pada sel yang terinfeksi DENV dapat mengurangi titer virus secara signifikan pada perlakuan *Full Time*, dengan IC50 = 20,383 μM , tetapi hasil dari perlakuan *After Entry* menunjukkan penurunan titer virus yang tidak signifikan, dengan IC50 = 33,062 μM .

Kesimpulan : Curcumin memiliki aktivitas antivirus terhadap infeksi DENV dan bisa memberikan pendekatan baru dalam terapi infeksi DENV.

Kata Kunci : Curcumin, Dengue, A549 cell

ABSTRACT

CURCUMIN ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST DENGUE VIRUS ON A549 CELL LINES

Introduction : Dengue virus (DENV) is the most geographically widespread arbovirus and a major worldwide problem. Viral load is associated with severity of the disease in the patients, but there is no licensed antiviral drug available. Consequently, the current treatment for DENV infection is limited to early detection, fluid replacement and symptomatic therapy. Therefore, antiviral drug should be more effective treatment. In this study, we investigated the antiviral effect of Curcumin, a major active constituent of turmeric (*Curcuma longa*), on DENV growth in human lung epithelial carcinoma (A549) cells line.

Methods : Initially, we conducted Curcumin A549 cells toxicity assay to determine Curcumin's Cytotoxic Dose (CC50) in A549 cells. Then, we infected the cells with DENV-1 at multiplicity of infection = 1 and treated the cells with multi-subtoxic dose Curcumin during whole incubation (Full Time) and after the virus entry to the cells (After Entry). We incubated the infected cells with Curcumin for 48 H and latter, determined virus titer with Plaque Assay.

Results : Based on Curcumin A549 cells toxicity assay, we found that Curcumin would not significantly affect A549 cells in concentration up to 50 μM with $\text{CC}_{50} = 151.19 \mu\text{M}$. The results showed treatment of DENV infected cells with Curcumin could significantly reduce virus titer in full time treatment, with $\text{IC}_{50} = 20.383 \mu\text{M}$, but the results from After Entry treatment showed non-significant reduction in virus titer, with $\text{IC}_{50} = 33.062 \mu\text{M}$.

Conclusion : Curcumin has an antiviral activity against DENV infection and could provide new therapeutic approach for DENV infection.

Keywords : Curcumin, Dengue, A549 cell

PENDAHULLUAN

WHO memperkirakan 50-200 juta orang terinfeksi viru dengue setiap tahunnya di seluruh dunia dengan daerah beriklim tropis menjadi daerah utama kejadian. DENV telah dinyatakan endemis di 125 negara, salah satunya Indonesia. WHO mencatat pada tahun 2004-2010 ada 129.435 kasus Dengue terjadi setiap tahunnya di Indonesia.¹ Berdasarkan data outbreak pada tahun 2015, diketahui DENV-1 mendominasi penyebab Demam Dengue pada outbreak tersebut.²

Virus dengue (DENV) termasuk dalam genus *Flavivirus* pada famili *Flaviviridae*. Ada 4 serotype DENV yaitu DENV-1, DENV-2, DENV3 dan DENV-4. Sel-sel fagosit mononuklear (monosit, makrofag, dendritic sel, sel Langerhans) merupakan target primer dari DENV pada *in vivo*,³ sedangkan untuk model *in vitro*, berbagai galur sel telah terbukti dapat digunakan untuk melihat kemampuan infeksi dan siklus replikasi DENV. Yohan et al, melaporkan galur sel C6/36 (*A. albopictus*), galur sel mamalia Vero (*Cercophitecus aethiops, green monkey kidney*) dan galur sel manusia A549 (*human lung epithelial cell line*) sebagai galur sel yang paling sensitif terhadap *isolate* DENV.⁴ Virus *wild strain* atau yang berasal dari alam diketahui memiliki karakteristik yang lebih sesuai dengan keadaan *in vivo* dibandingkan jenis virus yang diperoleh dari laboratorium.⁵

Saat ini belum ada terapi antiviral maupun vaksinasi untuk DENV yang sudah berlisensi sehingga manajemen terapi saat ini hanya difokuskan dalam mendeteksi dini dengue dan terapi simptomatis dengan resusitasi cairan untuk kasus dengue berat.⁶ Penelitian menunjukkan adanya korelasi langsung antara jumlah virus dalam darah selama fase viremia dan derajat keparahan

infeksi DENV⁷ oleh karena itu, penurunan viral load dengan menggunakan antiviral dianggap dapat mengurangi derajat keparahan penyakit.¹

Ada berbagai senyawa yang berasal dari tumbuhan yang memiliki kemampuan antiviral. Salah satunya adalah Curcumin. Curcumin merupakan senyawa bis alpha beta unsaturated beta diketone yang merupakan senyawa aktif utama kunyit (*Curcuma longa*).

Penelitian telah menunjukkan adanya kemampuan antiviral curcumin pada berbagai virus salah satunya HCV yang diketahui menghambat adsorpsi dan mengganggu envelop virus⁸ serta menghambat ubiquitin proteasome system yang merupakan suatu pathway dalam replikasi DENV pada infeksi DENV⁹ dan JEV.¹⁰

METODE

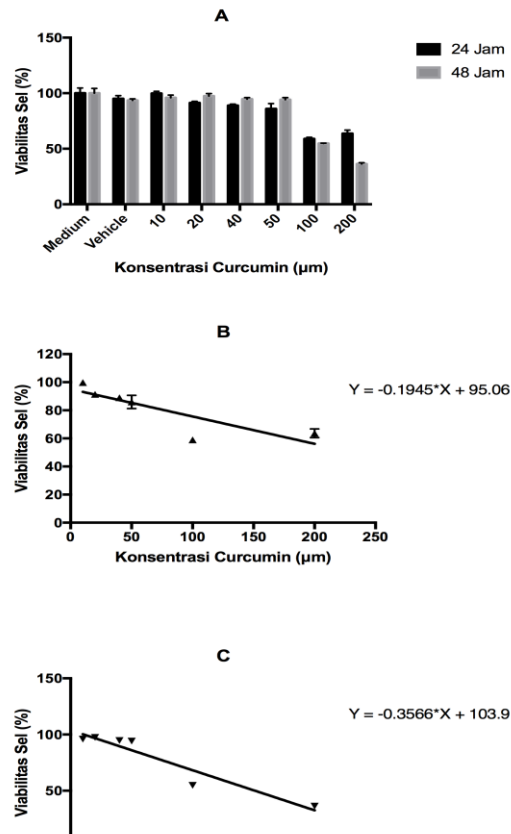
Sel A549 diperoleh dari Lembaga Biologi Molekuler Eijkman Jakarta dan disubkultur menggunakan media RPMI [Gibco-Life Technologies] yang disuplementasi dengan 10% Fetal Bovine Serum [Gibco-Life Technologies] dan 1% Antibiotic/Antimycotic [Gibco-Life Technologies]. Curcumin didapatkan dari Sigma-Aldrich dalam bentuk bubuk dan dilarutkan dengan Dimethyl Sulfoxide (DMSO) [AppliChem]. Cell Toxicity assay / MTT assay dilakukan menggunakan MTT assay kit [Trevigen]

Uji Aktivitas Antiviral Curcumin terhadap virus dengue dilakukan dengan dua metode yaitu Full Time dan After Entry dengan pengulangan perlakuan sebanyak tiga kali. Kedua metode dimulai dengan seeding 10^5 sel / well 24 jam sebelum infeksi. Infeksi virus dilakukan dengan Multiplicity of Infection = 1. Pada metode full time infeksi dan pemberian curcumin dilakukan pada satu waktu sedangkan after entry pemberian curcumin diberikan setelah satu jam infeksi. dilakukan inkubasi selama 48 jam dan dilakukan pengukuran viabilitas sel dan titer virus. Titer virus diukur dengan plaque assay pada sel BHK21 dengan pengulangan sebanyak dua kali. Viabilitas sel diukur dengan

Data ditampilkan dalam tabel atau grafik, kemudian dilakukan uji normalitas data dengan saphiro wilk bila terdistribusi normal digunakan uji anova dan bila tidak normal dilakukan uji kruskal wallis. Analisis statistik menggunakan program IBM SPSS Statistics ver. 23 dan Graphpad Prism 7.

HASIL

Hasil yang diperoleh menunjukkan penurunan viabilitas sel seiring peningkatan konsentrasi curcumin. Vehicle dalam penelitian ini menggunakan DMSO tidak berpengaruh terhadap viabilitas sel. pada inkubasi 24 jam uji oneway anova dengan post hoc tukey menunjukkan bahwa konsentrasi curcumin mulai 20 µm memberikan penurunan viabilitas sel yang signifikan sedngakan pada inkubasi 48 jam penurunan viabilitas sel secara signifikan baru terjadi pada konsentrasi 100 µm. Berdasarkan regresi linear diketahui cc50 curcumin pada inkubasi 24 jam (Gambar 1B) adalah 231.67 µm dan pada 48 jam (Gambar 1C) adalah 151.19 µm



Gambar 1. Hasil Curcumin Sel A549 Toxicity Assay. (A) Viabilitas sel A549 berdasarkan konsentrasi curcumin pada inkubasi 24 dan 48 jam. (B) Grafik regresi linear viabilitas sel A549 pada inkubasi 24 jam. (C) Grafik regresi linear

Viabilitas sel setelah pemberian curcumin dan infeksi virus kembali dilakukan untuk memastikan tidak adanya kematian sel yang signifikan. Hasilnya menunjukkan peningkatan viabilitas sel walaupun tidak bermakna secara statistic

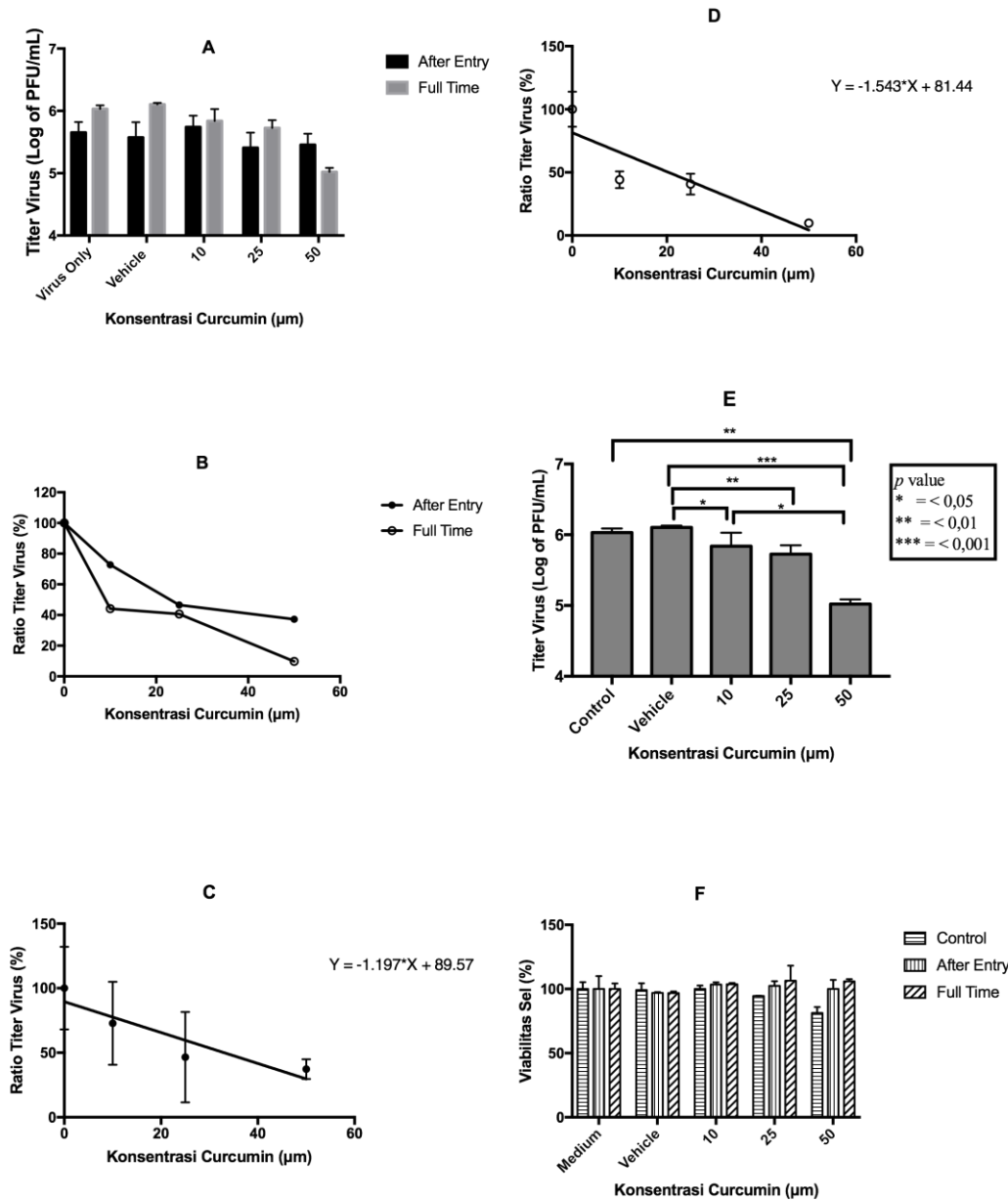


Figure 2 Hasil Pengaruh Curcumin Terhadap Titer Virus. (A) Grafik Pengaruh Konsentrasi Curcumin Pada Titer Virus. (B) Ratio Pengaruh Curcumin pada Titer Virus Terhadap Control. (C) Regresi Linear Titer Virus Pada Perlakuan After Entry. (D) Regresi Linear Titer Virus Pada Perlakuan Full Time (E) Analisis statistik one way Anova titer virus full time (F) Viabilitas sel setelah pemberian curcumin dan infeksi DENV

Titer virus mengalami penurunan kurang lebih sebesar 1 log namun analisis statistik menunjukkan penurunan pada perlakuan After Entry tidak signifikan sedangkan penurunan pada perlakuan Full Time signifikan. Konsentrasi 50 μm pada perlakuan full time menunjukkan penurunan bermakna titer virus dibandingkan kelompok kontrol. Dengan regresi linear IC 50 pada after entry adalah 33.062 μm dan pada Full time 20.383 μm .

PEMBAHASAN

Viabilitas sel A549 menurun seiring peningkatan dosis Curcumin. Menurut penelitian Curcumin meningkatkan ekspresi gen proapoptosis (p53, caspase-3 dan caspase-9) pada sel A549.¹¹ Sehingga, semakin banyak pemberian curcumin semakin banyak apoptosis sel A549 yang terjadi.

Bila dibandingkan dengan penelitian Kaushik *et al*¹², terdapat kesamaan hasil viabilitas sel yang mana konsentrasi curcumin hingga 50 μM tidak memengaruhi viabilitas sel. Kaushik *et al* lebih lanjut meneliti tentang pengaruh curcumin terhadap apoptosis sel A549 dan menemukan adanya apoptosis sel sebesar 20.13% dan 44.25% pada konsentrasi 50 dan 100 μM .¹²

Viabilitas sel A549 setelah perlakuan yang didapat menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh curcumin yang besar terhadap viabilitas sel. Berdasarkan penelitian Hee Sam Na *et al* mengenai pengaruh curcumin terhadap *Vibrio vulnificus*, toksisitas terhadap sel HeLa pada infeksi *Vibrio vulnificus* dapat dikurangi dengan pemberian curcumin dan penelitian ini lebih lanjut menemukan kemampuan curcumin untuk menghambat penempelan *Vibrio vulnificus* dan menghambat pengikatan RTX toxin oleh sel inang sehingga memberikan efek protektif terhadap sel.¹³ Peningkatan viabilitas sel pada perlakuan *After Entry* dan *Full Time* kemungkinan dikarenakan berkurangnya efek curcumin pada sel sebab adanya kerja antiviral curcumin pada virus, sehingga memberikan efek protektif pada sel.

Berdasarkan data yang diperoleh, diketahui curcumin dapat dengan signifikan menurunkan titer virus pada perlakuan *Full Time* namun pada perlakuan *After Entry* didapatkan penurunan yang tidak bermakna. Hal ini mengindikasikan bahwa curcumin memengaruhi infektivitas DENV bukan melalui penghambatan replikasi.

Curcumin kemungkinan dapat memengaruhi kestabilan *envelope* DENV^{14,8}, sehingga dapat menghambat infektivitas DENV dan akhirnya mengurangi jumlah titer virus. Namun masih diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh curcumin pada kestabilan

envelope DENV dengan melakukan penilaian polarisasi fluoresensi 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH).

Titer virus pada penelitian ini diukur menggunakan metode plaque assay. Plaque assay merupakan metode yang cukup akurat dan menjadi gold standart untuk penghitungan jumlah virus infeksius, namun metode ini memiliki beberapa kekurangan yaitu subjektivitas pengerjaan, waktu pengerjaan yang lama dan tidak dapat mengukur keseluruhan virus yang ada karena hanya dapat mengukur virus yang infeksius, sehingga membutuhkan penggunaan metode lain untuk mengkonfirmasi hasil penemuan. Metode RT-PCR merupakan metode yang dapat dilakukan untuk mengatasi kekurangan metode *Plaque assay*¹⁵.

Jika dibandingkan dengan penelitian Tzu Yen Chen et al¹⁴, hasil yang diperoleh pada penelitian ini dapat disamakan dengan hasil penelitian Tzu Yen Chen et al yang mana penurunan titer virus DENV-2 hanya didapatkan pada perlakuan *Full Time* sedangkan pada perlakuan *After Entry* tidak didapatkan penurunan titer virus yang signifikan.

Penelitian ini menggunakan serotipe virus DENV-1 yang berasal dari *wild strain* atau alam sehingga memiliki karakteristik yang lebih sesuai dengan keadaan *in vivo* dibandingkan jenis virus yang diperoleh dari laboratorium.⁵ Penelitian serupa dengan menggunakan serotipe serotipe lain (DENV-2, DENV-3 dan DENV-4) diperlukan untuk mengkonfirmasi dan melihat kemampuan antiviral curcumin terhadap DENV lebih luas lagi. Penelitian pada model hewan coba (tikus AG129)^{16,17} diperlukan untuk melihat kemampuan antiviral curcumin *in vivo*.

Padilla et al melaporkan bahwa IC50 curcumin pada DENV-2 pada sel BHK-21 adalah 11.51 μM ⁹ sedangkan pada penelitian ini IC50 adalah 33.062 μM pada perlakuan *After Entry* dan IC50 pada perlakuan *Full Time* adalah 20.383 μM yang diperoleh pada penelitian. Terdapat perbedaan hasil IC50 antara penelitian yang kami lakukan dengan penelitian Padilla et al, hal ini dimungkinkan karena penggunaan sel yang berbeda dan jenis virus yang berbeda pula.

KESIMPULAN

Konsentrasi toksik (CC50) curcumin pada sel A549 adalah 231.67 μM pada inkubasi 24 jam, sedangkan pada inkubasi 48 jam CC50 curcumin pada sel A549 adalah 151.19 μM . Pada konsentrasi dibawah 50 μM , curcumin tidak menyebabkan

penurunan viabilitas sel A549 yang signifikan. Curcumin dapat menurunkan titer virus pada infeksi DENV terhadap galur sel A549 dan konsentrasi yang dibutuhkan curcumin untuk menghambat infeksi DENV (IC50) adalah 33.062 μM pada perlakuan *After Entry* dan IC50 pada perlakuan *Full Time* adalah 20.383 μM .

DAFTAR PUSTAKA

1. Murray NE, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol*. 2013;5:299-309. doi:10.2147/CLEP.S34440.
2. Haryanto S, Hayati RF, Yohan B, et al. The molecular and clinical features of dengue during outbreak in Jambi, Indonesia in 2015. *Pathog Glob Health*. May 2016;1-11. doi:10.1080/20477724.2016.1184864.
3. Fink J, Gu F, Ling L, et al. Host gene expression profiling of dengue virus infection in cell lines and patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2007;1(2):e86. doi:10.1371/journal.pntd.0000086.
4. Yohan B, Kendarsari RI, Mutia K, Bowolaksono A, Harahap AR, Sasmono RT. Growth characteristics and cytokine/chemokine induction profiles of dengue viruses in various cell lines. *Acta Virol*. 2014;58(1):20-27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24717025>.
5. Ni H, Barrett AD. Molecular differences between wild-type Japanese encephalitis virus strains of high and low mouse neuroinvasiveness. *J Gen Virol*. 1996;77 (Pt 7):1449-1455. doi:10.1099/0022-1317-77-7-1449.
6. Wilder-Smith A, Ooi E-E, Vasudevan SG, Gubler DJ. Update on Dengue: Epidemiology, Virus Evolution, Antiviral Drugs, and Vaccine Development. *Curr Infect Dis Rep*. 2010;12(3):157-164. doi:10.1007/s11908-010-0102-7.
7. Wang W-K, Chao D-Y, Kao C-L, et al. High Levels of Plasma Dengue Viral Load during Defervescence in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever: Implications for Pathogenesis. *Virology*. 2003;305(2):330-338. doi:10.1006/viro.2002.1704.
8. Anggakusuma, Colpitts CC, Schang LM, et al. Turmeric curcumin inhibits entry of all hepatitis C virus genotypes into human liver cells. *Gut*. 2014;63(7):1137-1149. doi:10.1136/gutjnl-2012-304299.
9. Padilla-S L, Rodríguez A, Gonzales MM, Gallego-G JC, Castaño-O JC. Inhibitory effects of curcumin on dengue virus type 2-infected cells in vitro. *Arch Virol*. 2014;159(3):573-579. doi:10.1007/s00705-013-1849-6.

10. Dutta K, Ghosh D, Basu A. Curcumin protects neuronal cells from Japanese encephalitis virus-mediated cell death and also inhibits infective viral particle formation by dysregulation of ubiquitin-proteasome system. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009;4(3):328-337. doi:10.1007/s11481-009-9158-2.
11. Kang JH, Kang HS, Kim IK, et al. Curcumin sensitizes human lung cancer cells to apoptosis and metastasis synergistically combined with carboplatin. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015;240(11):1416-1425. doi:10.1177/1535370215571881.
12. Kaushik G, Kaushik T, Yadav SK, Sharma SK, Ranawat P. Curcumin sensitizes lung adenocarcinoma cells to apoptosis via intracellular redox status mediated pathway. 2012;50(December):853-861.
13. Na HS, Cha MH, Oh D-R, Cho C-W, Rhee JH, Kim YR. Protective mechanism of curcumin against *Vibrio vulnificus* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011;63(3):355-362. doi:10.1111/j.1574-695X.2011.00855.x.
14. Chen T, Chen D, Wen H, et al. Inhibition of Enveloped Viruses Infectivity by Curcumin. *PLoS One.* 2013;8(5):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0062482.
15. Edelman DC, Barletta J. Real-time PCR provides improved detection and titer determination of bacteriophage. 2003;35(2).
16. Tan GKX, Ng JKW, Lim AHY, Yeo KP, Angeli V, Alonso S. Subcutaneous Infection with Non-mouse Adapted Dengue Virus D2Y98P Strain Induces Systemic Vascular Leakage in AG129 Mice. 1997:523-532.
17. Tan GK, Ng JKW, Trasti SL, Schul W, Yip G, Alonso S. A Non Mouse-Adapted Dengue Virus Strain as a New Model of Severe Dengue Infection in AG129 Mice. 2010;4(4). doi:10.1371/journal.pntd.0000672.