

Potensi Kurkumin dan Pentagamavunon-0 sebagai Anti Viral Dengue - 2

THE POTENTIAL OF CURCUMIN AND PENTAGAMAVUNON – 0 AS ANTI VIRAL DENGUE - 2

Dewi Marbawati^{1*}, Sitti Rahmah Umniyati², Sardjiman³

¹Balai Litbang P2B2 Banjarnegara

Jl. Selamanik No. 16 A. Banjarnegara, 53415 Jawa Tengah Indonesia

²Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

Jl. Farmako Sekip Utara Yogyakarta, 55281 Indonesia

³Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

Jl. Farmako Sekip Utara Yogyakarta, 55281 Indonesia

*E-mail : dewimarba@yahoo.co.id

Submitted : 18-3-2014, Revised 1 : 1-4-2014, Revised 2 : 2-5-2014, Accepted : 29-5-2014

Abstract

More than 40% of the world's population who live in tropical and subtropical regions at risk for dengue infection. Specific and effective antiviral therapies to treat dengue infection has not been found yet. Many researches proved that curcumin has preventive activity against viruses, such as vasicular stomatis (VSV), HSV 1 and 2, parainfluenza-3, reovirus-1, feline corona virus, feline herpes virus. Curcumin also known to perform the inhibition of ubiquitin - proteasome system that decrease the production of Japanese encephalitis in neuroblastoma cells. Pentagamavunon-0 (PGV-0) is expected to have better activity than curcumin. This study aims to determine the cytotoxic effect and the potential of curcumin and PGV-0 as antiviral Dengue-2 on vero cells. Including experimental study. Cytotoxic test performed to obtain a safe concentration of curcumin and PGV-0 on vero cells followed by antiviral test using immunocytochemistry SBPC (Streptavidin Biotin Peroxidase Complex). The results showed that the safe concentrations for curcumin is 6.25 ppm and PGV-0 is 1.5625 ppm based on cytotoxic test to vero cell. The positive rate from Immunocytochemistry test showed that no significant difference between curcumin and PGV-0 treatment. However, when compared with the positive control results are significantly different. We concluded both curcumin and PGV-0 can reduce the positive rate caused Dengue-2 infection at one day incubation.

Keywords : Dengue-2, curcumin, pentagamavunon-0 (PGV-0), Immunocytochemistry

Abstrak

Lebih dari 40 % populasi dunia yang tinggal di daerah tropis dan subtropis mempunyai risiko untuk terjangkit infeksi Dengue. Terapi yang spesifik dan efektif untuk mengobati infeksi Dengue belum ditemukan. Kurkumin terbukti memiliki aktivitas preventif terhadap beberapa virus, antara lain: vasicular stomatis (VSV), HSV 1 dan 2, *parainfluenza-3*, *reovirus-1*, *feline corona virus*, *feline herpes virus*. Kurkumin juga diketahui mampu melakukan penghambatan sistem ubiquitin-proteasome yang menyebabkan penurunan produksi Japanese ensefalitis dari sel neuroblastoma yang sebelumnya terinfeksi. Pentagamavunon-0 (PGV-0) diperkirakan memiliki aktivitas lebih baik daripada kurkumin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik dan mengetahui potensi antiviral Dengue-2 dari kurkumin dan PGV-0 pada sel vero. termasuk penelitian eksperimental. Uji sitotoksik dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi yang aman dari kurkumin dan PGV-0 terhadap sel vero dilanjutkan dengan uji antiviral melalui imunositokimia SBPC (*Streptavidin Biotin Peroxidase Complex*). Hasil

uji sitotoksik menunjukkan konsentrasi yang aman terhadap sel vero adalah 6,25 ppm untuk kurkumin dan 1,5625 ppm untuk PGV-0. Perhitungan positive rate dari uji imunositokimia pada sel vero yang diinfeksi Dengue-2 inkubasi 1 hari dan diberi kurkumin dan PGV-0 adalah tidak berbeda nyata, namun jika dibandingkan dengan kontrol positifnya hasilnya berbeda nyata. Disimpulkan baik kurkumin maupun PGV-0 mampu menurunkan positive rate akibat infeksi Dengue-2 inkubasi satu hari.

Kata kunci : Dengue-2, kurkumin, pentagamavunon-0 (PGV-0), imunositokimia

PENDAHULUAN

Penyakit Demam Berdarah Dengue (DBD) merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh virus Dengue. Penyakit DBD masih menjadi masalah kesehatan penting di negara-negara tropis dan sub tropis, karena perjalanan penyakit ini sangat cepat, sehingga jika tidak segera ditangani dapat berakibat fatal. Prevalensi global infeksi Dengue telah meningkat pada beberapa dekade terakhir. Infeksi Dengue saat ini telah menjadi endemis di lebih dari 112 negara di Afrika, Amerika, bagian timur Mediterania, Asia Tenggara dan bagian barat Pasifik. Lebih dari 2,5 milyar orang (40 % populasi dunia) yang tinggal di daerah tropis dan subtropis mempunyai risiko untuk terjangkit infeksi Dengue.^{1,2}

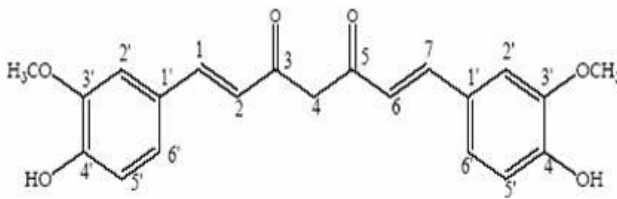
Virus Dengue menginfeksi 50 sampai 100 juta orang per tahun, namun belum ditemukan vaksin yang tersedia secara komersial. Terapi yang spesifik atau obat antivirus yang efektif untuk mengobati infeksi virus Dengue juga belum ditemukan. Pengembangan obat antivirus berlisensi untuk pengobatan pasien merupakan kebutuhan mendesak untuk mencegah kematian karena DBD. Penelitian untuk mengeksplorasi aktivitas antivirus senyawa kimia terhadap virus Dengue terus dilakukan. Penggunaan senyawa yang dapat menghambat langkah-langkah spesifik dari virus intraseluler, belum satupun yang telah disetujui untuk digunakan pada manusia.³

Indonesia memiliki banyak tanaman obat tradisional yang telah dilaporkan memiliki aktivitas anti virus yang kuat dan beberapa telah digunakan untuk infeksi karena virus. Tanaman tersebut diantaranya adalah *Curcuma longa* yang mempunyai kandungan kurkumin yaitu senyawa kimia yang berwarna kuning terutama pada bagian rimpang tanaman. Beberapa

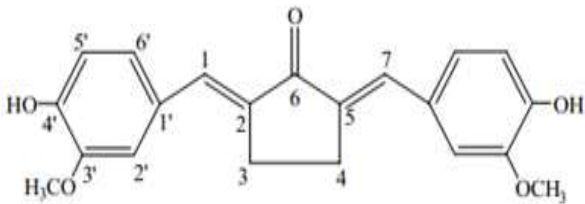
penelitian menyebutkan kurkumin mempunyai aktivitas preventif terhadap agen-agen virus, seperti vasicular stomatis (VSV), HSV 1 dan 2, *parainfluenza-3*, *reovirus-1*, *feline corona virus*, *feline herpes virus* dan virus – virus lainnya.⁴ Kurkumin juga diketahui mampu melakukan penghambatan sistem *ubiquitin*-proteasome yang menyebabkan penurunan produksi salah satu jenis flavivirus yaitu Japanese ensefalitis dari sel neuroblastoma yang sebelumnya terinfeksi.⁵

Dalam perkembangannya, modifikasi terhadap struktur kurkumin dilakukan untuk memperoleh senyawa yang lebih potensial, stabil, aman, dan memiliki aktivitas yang lebih spesifik.⁶ Senyawa PGV-0 [2,5-bis-(4'-hidroksi-3'-metoksibenzilidin)-siklopentanon] dipilih sebagai senyawa uji karena relatif lebih mudah dalam sintesisnya, memiliki potensi sebagai antioksidan dan antiinflamasi lebih kuat dan kurang toksik dibanding senyawa analog kurkumin lainnya dan belum pernah diuji aktivitasnya secara in vitro sebagai antiviral. Pertimbangan tersebut yang mendasari penggunaan kurkumin dan PGV-0 yang diujicobakan pada jenis flavivirus lainnya yaitu virus Dengue pada sel vero. Sel vero merupakan sel monolayer dan termasuk jenis *epithelial-like* yang berasal dari ginjal monyet hijau afrika (*African green monkey*). Sel ini banyak digunakan untuk penelitian mikrobiologi serta biologi molekuler.⁷

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi tertinggi yang aman dari kurkumin dan PGV-0 terhadap sel vero dari hasil uji sitotoksik. Konsentrasi kurkumin dan PGV-0 tersebut selanjutnya digunakan untuk uji anti viral Dengue melalui teknik imunositokimia SBPC (*Streptavidin Biotin Peroxidase Complex*). Gambaran struktur kimia kurkumin dan PGV-0 dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 1. Struktur kimia kurkumin [1,7-bis-(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)hepta-1,6-diena-3,5-dion].8



Gambar 2. Struktur kimia 2,5-bis(4'-hidroksi-3'-metoksibenzilidin)siklopentanon atau PGV-0.9

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental.

1. Bahan

Senyawa uji kurkumin (1,7-bis (4'hidroksi-3 metoksifenil)-1,6 heptadien, 3,5-dion) C1386 Sigma dan PGV-0 (2,5-bis(4'-hidroksi-3' metoksibenzilidin) siklopentanon), sel vero, Dimetilsulfoksida (DMSO), MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromida], Phosphat Buffer Saline (PBS), Bahan

imunositokimia SBPC yaitu *peroxidase blocking solution*, akuades, *background sniper* (protein *blocking solution*), antibodi primer (antibodi monoklonal DSSE10), *Trekkie universal link* (antibodi sekunder), trekavidin-HRP, kromogen DAB, *cat mayer hematoxylin (counterstain)*, alkohol, *entellan*.

2. Cara Kerja

Penyediaan kurkumin dan PGV-0 : Larutan stok diperoleh dengan cara menimbang senyawa kurkumin dan PGV-0 sebanyak 5 mg kemudian dilarutkan dalam DMSO 100 μ L dan disimpan sebagai larutan stok untuk selanjutnya digunakan dalam penelitian.

Uji sitotoksik kurkumin dan PGV-0 pada sel vero : Uji dilakukan dilakukan untuk menentukan konsentrasi kurkumin dan PGV-0 yang aman terhadap sel vero untuk selanjutnya diteruskan dengan uji anti viral. Sel vero ini menempel dengan kuat pada lapisan substrat yang berbahan polistiren. Uji sitotoksik dilakukan dengan menggunakan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromida]. Sel vero dengan kepadatan 104 sel/sumuran didistribusikan ke dalam sumuran (*well plate*) dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah itu ditambahkan kurkumin dengan 7 (tujuh) seri konsentrasi yaitu 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625 dan 0,78125 ppm masing - masing 4 kali ulangan. Skema uji sitotoksitas kurkumin dan PGV-0 terhadap sel vero tersaji seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Skema uji sitotoksitas kurkumin dan PGV-0 terhadap sel vero *in vitro*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Kur	Kur	Kur	Kur	PGV-0	PGV-0	PGV-0	PGV-0	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
A	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
B	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
C	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
D	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
E	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125
F	1,562	1,562	1,562	1,562	1,562	1,562	1,562	1,562	1,562	1,562	1,562	1,562
G	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781	0,781
H	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KS	KM	KM	KM

Keterangan:

KS : kontrol sel (tanpa penambahan senyawa uji), KM : kontrol media (hanya diberi senyawa MTT) Baris A sampai G (nomor 1 sampai 4) : kelompok perlakuan senyawa uji kurkumin, nomor 5 sampai 8 kelompok perlakuan senyawa uji PGV-0 dan nomor 9-12 kelompok perlakuan dengan DMSO sebagai kontrol pelarut.

Pelarut yang digunakan adalah DMSO. Hasil uji sitotoksitas dibaca dengan *Elisa reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Data absorbansi yang diperoleh dikonversikan dalam bentuk persentase sel hidup atau viabilitas sel. Konsentrasi kurkumin dan PGV-0 yang digunakan sehingga diperoleh sel hidup 100% digunakan untuk uji antiviral. Penghitungan persentase sel hidup menggunakan rumus berikut.

$$\% \text{ Sel hidup} = \frac{\text{Absorbansi sel perlakuan} - \text{Absorbansi media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi media}} \times 100\%$$

Pembuatan sediaan untuk uji imunositokimia SBPC : Kultur sel vero dengan kepadatan 5×10^5 sel per *well* (sumuran) ditumbuhkan dalam *well plate*. Masing – masing plate diberi *deck glass* yang sudah dilapisi *poly L-lisin* sebagai tempat menempelnya sel dan dibagi menjadi kelompok sel yang diinfeksi virus Dengue-2 inkubasi 1 hari dan diberi kurkumin, sel yang diinfeksi virus Dengue-2 inkubasi 1 hari dan diberi senyawa PGV-0, kontrol positif (sel diinfeksi Dengue 2 inkubasi 1 hari) dan sel yang diinfeksi Dengue-2 inkubasi 1 hari namun pada saat pewarnaan imunositokimia tidak diberikan antibodi primer DSSE10 sebagai kontrol pengerjaan imunositokimia, serta kontrol negatif (sel tidak diinfeksi Dengue-2 inkubasi 1 hari). Masing – masing dibuat tiga kali ulangan.

Pemeriksaan imunositokimia SBPC¹⁰ : sediaan yang akan diuji difiksasi dengan cara dicuci metanol dingin dan PBS. Sediaan direndam *peroxidase blocking solution* pada temperatur kamar selama 10 menit, kemudian dicuci dengan akuades. Preparat diinkubasikan dalam *background sniper (protein blocking solution)* selama 10 menit pada temperatur kamar. Antibodi primer (antibodi monoklonal DSSE10 1:10) ditambahkan 100 μL per preparat (d disesuaikan sampai semua bagian tergenang) kemudian diinkubasikan pada nampan yang lembab selama semalam. Preparat selanjutnya dicuci dengan PBS selama 2 x 2 menit. *Trekkie universal link* (antibodi sekunder) ditambahkan sebanyak 30 μL per preparat dan diinkubasikan pada temperatur kamar (25^o C) selama 15 menit dan dicuci dengan PBS selama 2 x 2 menit. *Reagen trekavidin*-HRP ditambahkan dan diinkubasikan

selama 10 menit, kemudian dicuci dengan PBS selama 2 x 2 menit. Preparasi substrat dilakukan dengan kromogen DAB : 1 μL betazoid DAB kromogen diencerkan dengan 100 μL betazoid DAB *substrate buffer* segera sebelum digunakan. Preparat diinkubasikan dalam substrat kromogen DAB di atas sebanyak 30 μL per preparat selama 10 menit, kemudian preparat dicuci dengan air kran. Cat mayer hematoxylin (*counterstain*) ditambahkan ke preparat, kemudian diinkubasi selama 1-3 menit, lalu dicuci di bawah air kran dan dikeringkan. Selanjutnya dicelupkan ke dalam alkohol, dikeringkan dan dibersihkan serta ditetesi entellan kemudian ditutup dengan kaca penutup. Setelah kering, siap diperiksa di bawah mikroskop. Preparat yang selnya memperlihatkan warna coklat di bagian sitoplasmanya atau terdapat granula-granula berwarna coklat di sekitar sel berarti positif antigen Dengue-2, sedangkan sel yang menunjukkan warna biru atau pucat dan tidak terdapat granula-granula berwarna coklat di sekitar sel sebagaimana kontrol negatif berarti tidak mengandung antigen Dengue-2.

Analisis Hasil

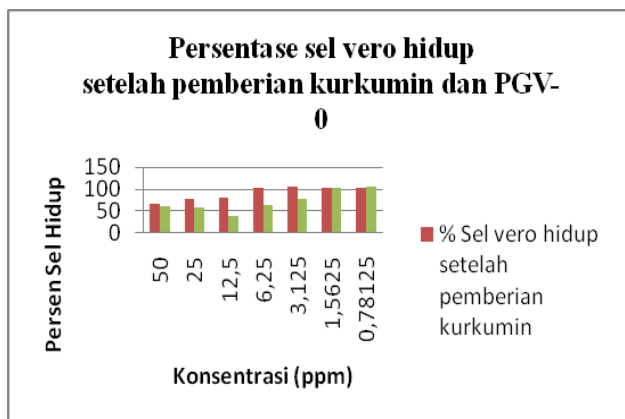
Hasil uji sitotoksik ditampilkan dalam bentuk tabel. Daya antiviral Dengue-2 dilihat dari hasil imunositokimia SBPC dihitung *positive rate* virus Dengue-2 pada sel vero dengan menghitung jumlah sel positif yang terinfeksi virus Dengue-2 dan sel negatif dalam 10 lapangan pandang pada perbesaran 100 x 10, dibagi jumlah sel seluruhnya dikalikan 100 %. Perhitungan *positive rate* ini mengacu pada perhitungan *infection rate* sel monosit pada sediaan apus darah Tebal dengan metode imunositokimia SBPC. Hasil rata – rata *positive rate* dianalisis dengan Anova dengan *Confidence Interval* (CI) 95%.

HASIL

1. Uji sitotoksitas kurkumin dan PGV-0 terhadap sel vero

Uji sitotoksik kurkumin dan PGV-0 terhadap sel vero dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksik kedua senyawa tersebut pada sel vero. Uji dilakukan dengan metode MTT,

berdasarkan perubahan garam tetrazolium menjadi produk berwarna oleh enzim mitokondria suksinat dehidrogenase dengan bantuan NADH seluler untuk mengevaluasi kesitotoksikan suatu senyawa. Persentase sel vero yang hidup dihitung berdasarkan perbandingan antara absorbansi perlakuan senyawa uji dengan kontrol sel vero. Persentase sel vero hidup setelah pemberian kurkumin dan PGV-0 dapat dilihat seperti grafik berikut.



Gambar 3. Persentase sel vero hidup setelah pemberian kurkumin dan PGV-0

Gambar 3. menunjukkan hasil uji sitotoksik kurkumin dan PGV-0 terhadap sel vero, penurunan konsentrasi senyawa uji berkorelasi positif dengan persentase jumlah sel yang hidup pada perlakuan dengan kurkumin, sedangkan pada PGV-0 sebagian tidak berkorelasi positif. Hasil uji sitotoksik mendapatkan konsentrasi yang aman terhadap sel vero untuk senyawa kurkumin adalah 6,25 ppm sedangkan untuk PGV-0 adalah 1,5625 ppm. Kedua konsentrasi tersebut didapatkan dari hasil perhitungan persen sel hidup yang lebih dari 100 %.

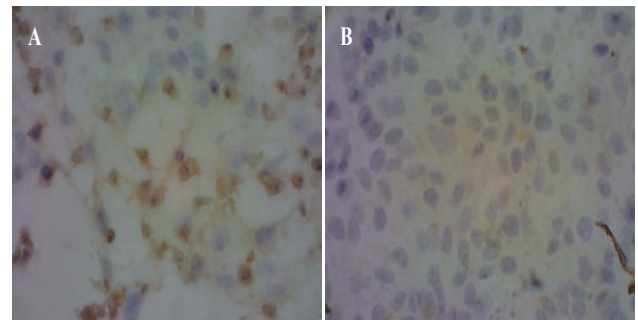
Pada uji sitotoksik kurkumin dan PGV-0 pelarut yang digunakan untuk melarutkan senyawa uji ini adalah DMSO, karena kelarutan dalam air kedua senyawa tersebut sangat kecil. Selain itu penelitian diketahui penggunaan DMSO tidak berpengaruh terhadap sel vero karena pada konsentrasi tertinggipun (50 ppm) tidak memberikan efek terhadap sel vero.

2. Uji Antiviral dengan Imunositokimia.

Imunositokimia merupakan metode yang potensial untuk identifikasi protein atau antigen dalam sel dan jaringan. Metode ini tergantung pada spesifisitas antibodi yang mengikat epitop protein yang digunakan sebagai imunogen. Antibodi yang digunakan dalam pemeriksaan imunositokimia adalah antibodi DSSE10 yang termasuk kelas IgG1 dan tidak menunjukkan reaksi silang dengan antigen *Japanese encephalitis* dan Chikungunya.¹⁰

Kontrol Positif dan Negatif

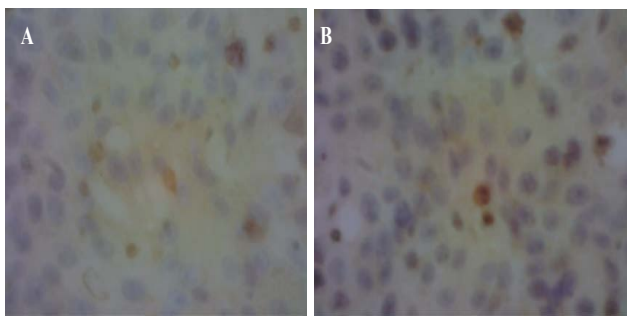
Kontrol positif yaitu sel vero yang diinfeksi Dengue-2 tanpa perlakuan senyawa menunjukkan nilai *positive rate* (hasil rata-rata positif terinfeksi Dengue) 17,44 %, yang ditunjukkan dengan warna coklat pada sitoplasma sel, sedangkan kontrol negatif (sel vero yang tidak diinfeksi Dengue-2) menunjukkan warna biru pada sitoplasmanya (Gambar 4).



Gambar 4. Foto mikroskopis pada perbesaran 40 x 10 sediaan imunositokimia SBPC menggunakan antibodi monoklonal DSSE10, sel vero yang diinfeksi virus Dengue 2 yang diinkubasi 1 hari (A kontrol positif, B kontrol negatif)

Kelompok Perlakuan

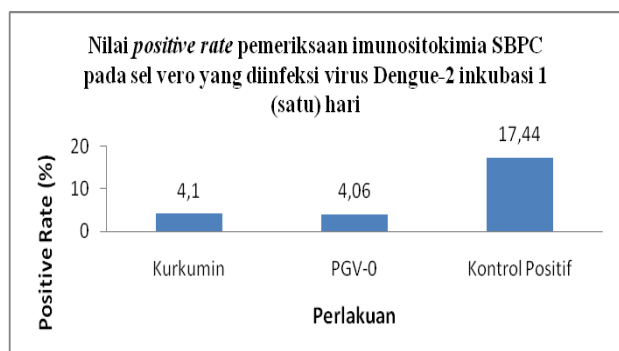
Pada kelompok perlakuan dengan kurkumin maupun PGV-0 menunjukkan hasil positif dengan rata-rata 4,1 % dan 4,06 % (Gambar 6). Sel vero yang terinfeksi Dengue-2 setelah perlakuan dengan kurkumin (6,25 ppm) dan PGV-0 (1,5625 ppm) berdasarkan uji imunositokimia dengan antibodi DSSE 10 tampak pada Gambar 5 berikut.



Gambar 5. Foto mikroskopis pada perbesaran 40 x 10 sediaan imunositokimia SBPC menggunakan antibodi monoklonal DSSE10, sel vero yang diinfeksi virus Dengue 2 yang diinkubasi 1 hari (A perlakuan kurkumin 6,25 ppm, B perlakuan PGV-0 1,5625 ppm)

Perhitungan nilai positive rate

Hasil perhitungan nilai *positive rate* (rata-rata sel positif terinfeksi Dengue) dari uji imunositokimia SBPC pada sel vero yang diinfeksi virus Dengue-2 inkubasi satu hari dan diberi perlakuan kurkumin dan PGV-0 tampak seperti pada grafik berikut.



Gambar 6. Persentase sel vero hidup setelah pemberian kurkumin dan PGV-0

Hasil uji ANOVA menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antara nilai positive rate antara perlakuan kurkumin dan PGV-0. Perbandingan kurkumin maupun PGV-0 dengan kontrol positifnya terdapat perbedaan yang bermakna (nilai signifikansi 0.007), sehingga dapat diartikan baik kurkumin maupun PGV-0 dapat menurunkan nilai positive rate akibat infeksi virus Dengue.

PEMBAHASAN

1. Uji Sitotoksik

Uji MTT dilakukan karena relatif cepat, sensitif, akurat dan banyak sampel dapat diuji. Pengukuran sel hidup didasarkan pada kapasitas enzim mitokondria suksinat dehidrogenase dari sel hidup untuk merubah MTT menjadi produk formazan. Jumlah formazan yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel yang hidup dari berbagai variasi tipe sel.^{11,12}

Dimetilsulfoksida (DMSO) yang digunakan sebagai pelarut kurkumin dan PGV-0 diketahui tidak berpengaruh terhadap kematian sel vero. Zandia *et al.*, (2010) juga menyatakan konsentrasi DMSO sebagai pelarut yang kurang dari 2% dapat diabaikan.¹³

Struktur kurkumin dan PGV-0 berbeda pada rantai tengahnya, sedang rantai ujungnya sama yaitu terdiri dari gugus terminal aromatik dengan gugus parahidroksi dan metoksi. Kurkumin memiliki gugus alifatik β diketon (asetil aseton), terdapat gugus metilen aktif, rantai tengahnya lebih panjang dibandingkan dengan PGV-0 sehingga jumlah ikatan rangkapnya lebih banyak. Pentagamavunon-0 (PGV-0) memiliki gugus monoketon siklik (siklopentanon), tidak terdapat gugus metilen, terdapat pemendekan pada rantai tengah sehingga jumlah ikatan rangkapnya lebih sedikit dan memiliki struktur yang kaku karena berada dalam keadaan flat.

Gambar 3 menunjukkan potensi kesitotoksikan PGV-0 lebih tinggi dibanding kurkumin, karena nilai konsentrasi yang aman terhadap sel vero untuk PGV-0 bernilai lebih kecil dari kurkumin. Peningkatan potensi kesitotoksikan PGV-0 tersebut kemungkinan disebabkan karena adanya perubahan gugus β -diketon pada kurkumin menjadi gugus siklopentanon, sehingga menyebabkan peningkatan aktivitas sitotoksiknya terhadap sel vero.

Pada kultur sel vero yang diberi perlakuan dengan kurkumin dengan konsentrasi bertingkat, tampak adanya perubahan gambaran morfologi sel vero. Mekanisme kematian sel vero pada tingkat molekuler akibat pemberian kurkumin maupun senyawa turunannya belum dapat diketahui berdasarkan uji sitotoksitas ini. Reaktivitas kurkumin termasuk senyawa turunannya mampu berinteraksi dengan komponen seluler seperti DNA, membran lipid dan protein selular lainnya yang akan mempengaruhi proses biologi di dalam sel seperti

siklus sel, metabolisme dan apoptosis.⁹ Kurkumin diketahui mempunyai kemampuan memacu apoptosis pada berbagai kultur sel kanker.¹⁴

2. Uji Antiviral

Hasil penelitian menunjukkan uji imunositokimia SBPC dengan antibodi primer DSSE10 mampu mendeteksi infeksi virus Dengue-2 pada inkubasi 1 hari ditunjukkan dengan warna coklat yang terbentuk pada bagian sitoplasma sel. Kontrol positif, kontrol negatif dan kontrol pengerjaan imunositokimia juga dilakukan untuk mengontrol pekerjaan. Spesifisitas imunositokimia harus divalidasi dengan kontrol negatif dan kontrol positif yang menunjukkan bahwa antibodi berikatan.¹⁵

Pada pengerjaan uji imunositokimia SBPC, penambahan antibodi sekunder yang dilabel biotin berfungsi sebagai penghubung antara antibodi primer dengan konjugat *streptavidin-peroxidase*. Konjugat *streptavidin peroxidase* ditambahkan untuk mengikat residu biotin. Keberadaan enzim dapat diperlihatkan dengan penambahan suatu campuran dari larutan substrat-kromogen. Enzim peroxidase akan mengkatalisa substrat hidrogen peroksida dan mengubah kromogen menjadi deposit warna coklat yang menunjukkan adanya lokasi antigen (menunjukkan hasil positif). Intensitas warna coklat yang terbentuk tergantung dari jumlah kromogen yang bereaksi dengan enzim peroksidase.

Hasil pemeriksaan metode imunositokimia bersifat kualitatif, tetapi dikenal sangat sensitif, spesifik.¹⁶ Metode Imunositokimia diketahui memiliki sensitifitas yang tinggi sehingga antigen dengan kadar rendah bisa terdeteksi. Uji Imunositokimia SBPC pada sediaan *head squash* nyamuk *Aedes aegypti* dengan antibodi DSSE10 mempunyai sensitifitas dan spesifisitas diagnostik yang tinggi (100% dan 91%).¹⁶

Beberapa kelebihan dari uji imunositokimia adalah tidak memerlukan peralatan khusus, yaitu dapat dilakukan hanya dengan mikroskop cahaya yang banyak tersedia di laboratorium-laboratorium, serta tidak memerlukan ketrampilan tertentu. Metode ini juga memungkinkan peneliti dapat mengetahui *sub-cellular compartement* yang mengandung antigen. Uji imunositokimia SBPC dengan antibodi primer WDSSB5 didapatkan nilai *positive rate* 100% pada sel C6/36 yang diinfeksi virus Dengue-3.¹⁷ Pada sel terinfeksi dengan nilai *positive rate* 100 % dari pengamatan terlihat reaksi positif kuat warna coklat sangat jelas pada sitoplasma sel, banyak *giant*

cell, bentuk sel tidak beraturan dan inti sel mengecil.

Jika dibandingkan hasil nilai *positive rate* antara kurkumin maupun PGV-0 dengan kontrol terdapat perbedaan yang nyata/bermakna, sehingga dapat diartikan baik kurkumin maupun PGV-0 dapat menurunkan nilai *positive rate* akibat infeksi virus. Reaksi positif hasil uji imunositokimia tampak dengan adanya sitoplasma sel vero yang berwarna coklat sedangkan sel negatif tampak pada kelompok kontrol negatif dan kontrol pengerjaan imunositokimia yang menunjukkan warna biru pada bagian sitoplasmanya.

Rata-rata jumlah sel yang digunakan dalam uji imunositokimia baik pada perlakuan senyawa kurkumin, PGV-0, kontrol positif dan kontrol negatif pada masa inkubasi 1 (satu) hari juga diuji statistik dengan Anova. Hasil uji statistik menunjukkan nilai signifikansi antar perlakuan sebesar 0,455 (> 0,05) yang artinya tidak ada perbedaan bermakna jumlah sel vero yang digunakan dalam penelitian pada beberapa kelompok uji.

Kurkumin diketahui dapat menekan replikasi virus dalam sel dengan melibatkan proteasome inhibitor. Siklus replikasi virus memerlukan peranan endositosis untuk proses penetrasi virus ke dalam sel. Proses endositosis tersebut diregulasi oleh sistem *ubiquitin-proteasome*. Kurkumin dapat melakukan penghambatan mekanisme *ubiquitin-proteasome* yang menyebabkan penurunan produksi partikel virus infeksi *Japanese ensefalitis* dari sel neuroblastoma yang sebelumnya terinfeksi.⁵ Pengaruh pemberian kurkumin terhadap *Japanese ensefalitis* ini diharapkan diharapkan memberikan hasil yang sama ketika diberikan terhadap virus Dengue, karena kedua jenis virus tersebut masih dalam satu jenis Flavivirus, namun penelitian lebih mendalam perlu dilakukan untuk mengetahui hal tersebut.

KESIMPULAN

Hasil uji sitotoksitas kurkumin dan PGV-0 menunjukkan nilai konsentrasi tertinggi yang aman dari kurkumin dan PGV-0 terhadap sel vero adalah 6,26 dan 1,5625 ppm. Nilai konsentrasi kurkumin yang lebih besar dari PGV-0 mengindikasikan PGV-0 memiliki potensi kesitotoksikan lebih tinggi dari kurkumin. Hasil perhitungan *positive rate* dari uji imunositokimia pada sel vero yang diinfeksi Dengue-2 inkubasi 1 hari dan diberi kurkumin dan PGV-0 adalah tidak berbeda nyata. Jika dibandingkan dengan kontrol positifnya hasilnya berbeda nyata, sehingga bisa disimpulkan baik kurkumin maupun

PGV-0 mampu menurunkan nilai positive rate akibat infeksi Dengue-2.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Prof. Dr. drh. Wayan T Artama dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada (UGM) serta semua pihak yang telah membantu memberikan masukan dan arahan baik dalam penelitian maupun penulisan hasil penelitian.

DAFTAR RUJUKAN

1. Surasombatpattana P, Hamel R, Patramool S, Luplertlop N. Dengue virus replication in infected human keratinocytes leads to activation of antiviral innate immune responses. *J Infect, Gen and Evol.* 2011;11:1664-73.
2. WHO. Dengue and severe Dengue. 2013. [Diakses 23 September 2013]. Available from: www.who.int/media/centre/factsheets/fs117/en/.
3. Dutra NR, de Paula MB, de Oliveira MD, et al. The laboratorial diagnosis of Dengue: applications and implications. *J Global Infect.* 2009;1:38-44.
4. Ramendra KS, Diwakar R, Dipti Y, Bhargava A, Balzarini J, De Clercq E. Synthesis, antibacterial and antiviral properties of curcumin bioconjugates bearing dipeptide, fatty acids and folic acid, *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2010;45:1078-86.
5. Dutta K, Debapriya G and Anirban B. 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 of Neuro Phar.* 2009;4(3):328-37.
6. Ritmaleni dan S. Ari. Sintesis tetrahidro pentagamavunon-0. *Majalah Farmasi Indonesia.* 2010;21(2):100-5.
7. Van der Velden MV, Geisberger A, Dvorak T, et al. Safety and immuno-genicity of a Vero cell culture-derived whole-virus H5N1 influenza vaccine in chronically ill and immunocompromised patients. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21:867-76.
8. Gui-Zhen Ao, Xiao-Jing Chu, Yuan-Yuan Ji and Jian-Wen Wang. Antioxidant Properties and PC12 Cell Protective Effects of a Novel Curcumin Analogue (2E,6E)-2,6-Bis(3,5-dimethoxybenzylidene)cyclohexanone (MCH) *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15:3970-88
9. Meiyanto E, Putri DDP, Susidarti RA, Murwanti R, Sardjiman, Fitriyani A, Husnaa U, Purnomo H, Kawaichi M. Curcumin and its Analogues (PGV-0 and PGV-1) Enhance Sensitive of Resistant MCF-7 Cells to Doxorubicin through Inhibition of HER2 and NF-kB Activation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2014;15:174-84.
10. Umniyati SR. Teknik Imunositokimia dengan Antibodi Monoklonal DSSC7 untuk Kajian Patogenesis Infeksi dan Penularan Transovarial Virus Dengue serta Surveilansi Virologis Vektor Dengue, Disertasi Untuk derajat Doktor dalam Ilmu Kedokteran, Yogyakarta Program Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada;2009.
11. Lu L, Zhang L, Wai MSM, Yew DTW, Xu J. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicol in Vitro.* 2012;26:636-44.
12. Stockert JC, Blázquez-Casto A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability: intracellular localisation of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 2012;114:785-96.
13. Zandia K, Ramedani E, Mohammadi K, Tajbakhsh S, Deilami I, Rastian Z, Fouladvand M, Yousefi F and Farshadpour F. Evaluation of Antiviral Activities of Curcumin Derivatives against HSV-1 in Vero Cell Line. *Natural Product Communications (NPC).* 2010;5(12):1935-38.
14. Zhou GZ, Cao FK, Chang JM, Sun GC, Chen XB, Mechanism of curcumin analog MHMD-induced cell death in A549 lung. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014;18(20):3134-38.
15. O'Hurley, G., Sjöstedt, E., Rahman, A., Li, B., Kampf, C., Pontén, F., Gallagher, W.M., Lindskog, C., Garbage in, Garbage out: A Critical Evaluation of Strategies Used for Validation of Immunohistochemical Biomarkers, *Molecular Oncology* (2014), doi: 10.1016/j.molonc.2014.03.008. Burry RW. Specificity Control for immunocytochemical Methods, *J. histochem & Cytochem.* 2000;48(2):163-165.
16. Widiastuti D. Deteksi Infeksi Virus Dengue-3 Pada Nyamuk *Aedes aegypti* dengan Teknik Imunositokimia Menggunakan Antibodi Monoklonal DSSE10 (Tesis). Yogyakarta Program Studi Ilmu Kedokteran Tropis. Fakultas Kedokteran UGM;2011.
17. Nurminha. Karakterisasi dan Aplikasi Antibodi Monoklonal WDSSB5 Untuk Deteksi Virus Dengue Pada Sel C6/36 Dengan Metode Imunositokimia. Tesis. Yogyakarta Program Studi Ilmu Kedokteran Tropis. Fakultas Kedokteran UGM;2011