

Aktivitas antiviral ekstrak etanolik biji srikaya (*Annona squamosa* L.) terhadap virus *newcastle disease* pada telur ayam berembrio

The antiviral activity of srikaya seed (*Annona squamosa* L.) ethanolic extract against *newcastle disease* virus in chicken embryo

Nanik Sulistyani^{1*}, Ibnatul Azizah¹ dan M. Kuswandi²

¹) Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

²) Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

Abstrak

Tanaman srikaya (*A. squamosa* L.) diketahui mengandung senyawa polifenol, flavonoid, tanin, alkaloid dan saponin. Golongan senyawa tersebut dapat diekstraksi dengan etanol. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa infusa biji srikaya mempunyai aktivitas antiviral dengan nilai IC_{50} 3.236 $\mu\text{g/mL}$ terhadap Virus *Newcastle Disease* (NDV). Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak etanolik biji srikaya sebagai antivirus terhadap Virus *Newcastle Disease*.

Sebanyak 28 butir telur ayam berembrio umur 9-11 hari dibagi menjadi 7 kelompok yaitu : kontrol virus, kontrol pelarut etanol : aquades (1:10) dan kelompok perlakuan ekstrak etanolik biji srikaya dengan konsentrasi 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,15 $\mu\text{g/mL}$; 0,2 $\mu\text{g/mL}$; 0,25 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,3 $\mu\text{g/mL}$. NDV diinokulasikan ke dalam ruang alantoik segera setelah inokulasi ekstrak etanolik biji srikaya, kemudian diinkubasi selama 2 hari. Aktivitas antiviral diamati dengan metode hemaglutinasi lambat. Harga IC_{50} dihitung dengan analisis probit.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanolik biji srikaya memiliki aktivitas antiviral karena kenaikan konsentrasi ekstrak menimbulkan kenaikan persentase penghambatan hemaglutinasi. Diperoleh harga IC_{50} sebesar 0,152 $\mu\text{g/mL}$.

Kata kunci: Antiviral, *Annona squamosa*, *Newcastle Disease Virus* (NDV).

Abstract

Srikaya (*A. squamosa* L.) is a plant containing polyphenol, flavonoid, tannin, alkaloid and saponin compounds. These compounds could be extracted by ethanol solvent. Previous study shown that infuse of Srikaya seed had antiviral activity with value of IC_{50} 3,236 $\mu\text{g/mL}$ against *Newcastle Disease Virus* (NDV). Therefore, the aim of research is to know the potency of ethanolic extract of Srikaya seed as antiviral against *Newcastle Disease Virus*.

The 28 chicken embryos at age of 9-11 days were classified into 7 groups, i.e. : control of virus, control of solvent ethanol : aquadest (1:10) and treatment groups were given ethanolic extract of Srikaya seed with concentration 0.1 $\mu\text{g/mL}$; 0.15 $\mu\text{g/mL}$; 0.2 $\mu\text{g/mL}$; 0.25 $\mu\text{g/mL}$; dan 0.3 $\mu\text{g/mL}$. NDV was inoculated into allantoic cavity intermediate after inoculated of extract and then incubated for 2 days. Antiviral activity were observed by hemagglutination method. The value of IC_{50} was calculated by probit analysis.

The result showed that ethanol extract of srikaya seed (*A. squamosa* L.) had antiviral activity because of increasing concentration caused the higher inhibition percentage of hemagglutination. The value of IC_{50} is 0.152 $\mu\text{g/mL}$.

Key words: Antiviral, *Annona squamosa*, *Newcastle Disease Virus* (NDV).

Pendahuluan

Virus merupakan parasit pada tingkat genetik (Jawetz dan Adelberg, 1995). NDV (*Newcastle Disease Virus*) adalah salah satu virus yang dapat menggumpalkan eritrosit (hemaglutinasi) karena hemaglutinin virus berinteraksi dengan permukaan eritrosit. Hemaglutinin terdapat pada amplop virus (Mahy and Collier, 1998). Aktivitas hemaglutinasi dapat diukur dengan uji hemaglutinasi lambat (Nester *et al.*, 2004).

Obat-obat antiviral yang diakui FDA (*Food and Drug Administration*), kebanyakan merupakan analog nukleosida sintetik. Resistensi virus terhadap analog nukleosida sintetik telah dilaporkan baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Oleh karena itu, dibutuhkan penemuan antiviral-antiviral yang baru (Chiang, *et al.*, 2003).

Pemanfaatan bahan alam merupakan salah satu alternatif untuk mencari antiviral baru. Telah dilaporkan bahwa ekstrak gubal biji *Annona squamosa* L. (srikaya) mengandung RIP (*Ribosome-Inactivating Protein*) karena dapat memotong DNA superkoil (Sismindari dkk, 1998). RIP terbukti mempunyai efek sebagai antiviral, baik pada virus tanaman maupun hewan (Barbieri *et al.*, 1993). Penelitian Triadisti (2005) membuktikan bahwa infusa biji srikaya mempunyai kemampuan sebagai antiviral terhadap NDV dengan IC_{50} 3.236 μ g/mL.

Srikaya juga diketahui mengandung senyawa polifenol, flavonoid, tanin, alkaloid dan saponin serta dilaporkan memiliki aktivitas antiviral terhadap EBV Early Antigen (Maryumi, 1996). Beberapa komponen kimia dalam tanaman srikaya tersebut dapat diekstraksi dengan etanol, sehingga penelitian antiviral dari ekstrak etanol perlu dilakukan.

Metodologi

Bahan

Biji dari buah srikaya yang sudah masak diperoleh dari daerah Tepus, Gunung Kidul, Yogyakarta pada bulan Mei 2007 (dideterminasi oleh Drs. Heri Setiyawan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Ahmad Dahlan), telur ayam berembrio umur 9-11 hari dari Bugisan Yogyakarta, etanol 70 %, vaksin Medivac ND La Sota berisi 50 dosis bentuk kering beku diperoleh dari *poultry shop* Yogyakarta, antibiotik *Streptomycin sulfate* (Meiji) dan *Vicillin* (Meiji), Larutan *Phosphate*

buffered saline (PBS) pH 7,2, betadine, eritrosit ayam 0,5%, Na Sitrat 4% dan parafin padat.

Alat

Oven, *waterbath*, kipas angin, corong Buchner, penyedot *vacuum*, neraca, spuit 3 mL dan 1 mL (One Med), lampu teropong, bor pelubang, gunting, pinset, cawan petri, *egg tray*, lampu spiritus, inkubator telur (Multiplo), mikroplat, diluter (Titertek), mikropipet (Socorex), *yellow* dan *blue tips*, flakon, lampu spiritus, *Laminar air flow*, tabung makro hematokrit, inkubator (Membert), sentrifuge dan alat-alat gelas.

Jalannya penelitian

Biji srikaya dikeringkan dalam oven pada suhu 50° C– 60° C selama 2 hari (kadar air 12 %) lalu diserbuk. Sebanyak 100 gram serbuk dimaserasi selama 24 jam menggunakan etanol 70 %. Remaserasi dilakukan hingga warna maserat sama dengan warna pelarut, sehingga maserasi diselesaikan selama 5 hari.

Satu gram vaksin Medivac ND La Sota dilarutkan pada aquadest 5 mL dan ditambahkan antibiotik *vicillin* dan *streptomycin* (1:1) dengan kadar 5 mg/mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 2 jam. Ekstrak etanolik biji Srikaya dibuat seri kadar 0,10 μ g/mL; 0,15 μ g/mL; 0,20 μ g/mL; 0,25 μ g/mL; dan 0,30 μ g/mL dalam pelarut etanol 96 % : aquadest (1:10). Tiap-tiap ekstrak ditambah antibiotik *vicillin* dan *streptomycin* (1:1) dengan kadar 5 mg/mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 2 jam.

Sebanyak 28 butir telur ayam berembrio dibagi menjadi 7 kelompok.

- kelompok 1 : kontrol virus (satu dosis vaksin (berisi 10^7 EID₅₀ NDV))
- kelompok 2 : kontrol pelarut (etanol 96 % dan aqua-dest (1:10)) dan virus
- kelompok 3 : perlakuan ekstrak etanol konsentrasi 0,10 μ g/mL dan virus
- kelompok 4 : perlakuan ekstrak etanol konsentrasi 0,15 μ g/mL dan virus
- kelompok 5 : perlakuan ekstrak etanol konsentrasi 0,20 μ g/mL dan virus
- kelompok 6 : perlakuan ekstrak etanol konsentrasi 0,25 μ g/mL dan virus
- kelompok 7 : perlakuan ekstrak etanol konsentrasi 0,30 μ g/mL dan virus.

Ekstrak diinjeksikan ke ruang alantoik telur ayam berembrio. Selang 5 menit virus diinkubasikan pada tempat yang sama, kemudian lubang ditutup parafin dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 2 hari. Selama proses ini, perkembangan embrio selalu diamati menggunakan lampu teropong (*candling*) setiap hari. Selanjutnya, telur dimasukkan

ke dalam kulkas suhu 4° C selama 24 jam untuk membunuh embrio. Cairan alantoik diambil menggunakan spuit dan dimasukkan ke tabung reaksi steril.

Eritrosit ayam dalam tabung ditambah natrium sitrat 4 % (1:5), disentrifus selama 1 menit. Endapan eritrosit dicuci dengan PBS pH 7,2 hingga volumenya sama dengan volume darah sebelum disentrifus. Konsentrasi eritrosit diukur dengan tabung makro hematokrit (skala 100). Kemudian suspensi eritrosit tersebut dibuat konsentrasi 0,5 % dengan PBS pH 7,2 sebagai medium.

Penetapan aktivitas antiviral menggunakan metode hemaglutinasi lambat (Wiyono dkk, 2004). Pada mikropelat 96, isolat cairan alantoik dibuat seri pengenceran 2ⁿ dengan PBS (dari 2⁰ – 2¹⁰), masing-masing dibuat 50 µL (sumuran 1-11), sumuran 12 berisi 50 µL PBS saja. Tiap sumuran lalu ditambah 50 µL suspensi eritrosit. Pembacaan dimulai jika sumuran yang ke-12 terjadi endapan eritrosit. Perhitungan persentase penghambatan dihitung dengan rumus:

$$P = \frac{Pel - B}{Pel} \times 100\%$$

Keterangan :

P : persentase penghambatan infeksi (%).

Pel : rata-rata *end point* pada kelompok kontrol pelarut.

B : rata-rata *end point* pada kelompok perlakuan konsentrasi tertentu ekstrak etanolik biji Srikaya.

Data persen kematian digunakan untuk menghitung LC₅₀ dengan analisis probit.

(rendemennya 4,26 %). Ekstrak tersebut ditambahkan pada kultivasi virus di dalam telur ayam berembrio untuk mengetahui kemampuan ekstrak menghambat pertumbuhan virus.

Uji hemaglutinasi lambat ini digunakan untuk mengetahui titer virus, kemampuan virus dalam menginfeksi yang ditandai dengan adanya hemaglutinasi eritrosit. Titer virus dapat diketahui dengan melihat sumuran terakhir pada nomor terbesar (*end point*) menunjukkan hemaglutinasi positif, yaitu sumuran dengan faktor pengenceran terbesar dari isolat alantoik yang masih terjadi hemaglutinasi. Terjadinya hemaglutinasi ditandai dengan adanya agregat- agregat di dasar sumur. Hasil uji hemaglutinasi dirangkum pada Tabel I.

Tabel I menunjukkan bahwa kontrol virus mempunyai titer yang paling tinggi, karena tidak ada perlakuan ekstrak. Sementara itu, kontrol pelarut menunjukkan titer yang lebih rendah yaitu 2⁶. Hal ini menunjukkan bahwa pelarut (etanol-air) mempunyai aktivitas penghambatan infeksi yang ditandai dengan penghambatan hemaglutinasi bila dibandingkan kontrol virus. Oleh karena itu, perhitungan persentase penghambatan infeksi tidak menggunakan kontrol virus tetapi kontrol pelarut. Hasil perhitungan persentase penghambatan infeksi virus oleh ekstrak etanolik biji srikaya dapat dilihat pada Tabel II.

Berdasarkan data persentase hambatan pada Tabel II, dapat diketahui bahwa secara umum kenaikan konsentrasi ekstrak

Tabel I. Hasil uji hemaglutinasi lambat

Telur	Kontrol Virus	Kontrol Pelarut	Titer				
			Perlakuan Ekstrak etanolik Biji Srikaya (<i>Annona squamosa</i> L.) (µg/mL)				
			0,10	0,15	0,20	0,25	0,30
1	2 ⁹	2 ⁶	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁶	2 ²	2 ⁰
2	2 ⁷	2 ⁶	2 ⁶	2 ⁵	2 ³	2 ⁰	2 ⁰
3	2 ⁶	2 ⁶	2 ⁶	2 ⁵	2 ³	2 ³	2 ⁰
4	2 ⁷	2 ⁶	2 ⁵	2 ⁴	2 ⁶	2 ³	2 ⁰

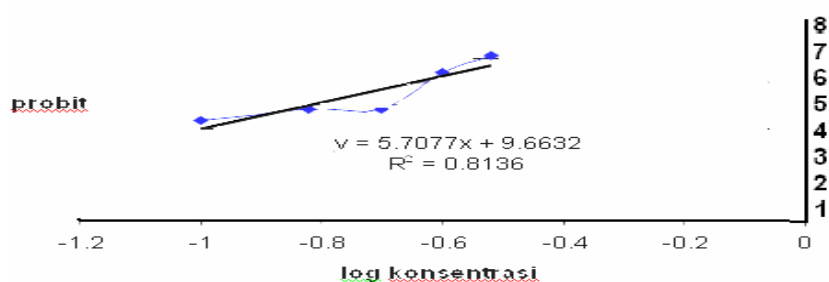
Hasil dan Pembahasan

Ekstrak yang digunakan untuk uji aktivitas antivirus diperoleh dari maserasi 100 gram serbuk biji dengan etanol 70 % dan diperoleh hasil ekstrak sebanyak 4,26 g

menyebabkan peningkatan respon berupa kenaikan persen penghambatan. Konsentrasi 0,10 µg/mL sudah mampu menghambat sebesar 25 %. Aktivitas penghambatan terbesar ditunjukkan oleh ekstrak etanolik biji

Tabel II. Persen penghambatan dan probit ekstrak etanolik biji srikaya terhadap NDV

Konsentrasi	% Penghambatan				Rata-rata % penghambatan	Log Konsentrasi	Probit
0,10 µg/mL	50	0	0	50	25	-1	4,33
0,15 µg/mL	0	50	50	75	43,8	-0,82	4,84
0,20 µg/mL	0	87,5	87,5	0	43,8	-0,70	4,84
0,25 µg/mL	93,8	98,5	87,5	87,5	91,8	-0,60	6,39
0,30 µg/mL	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	-0,52	7,14



Gambar 1. Kurva regresi linier antara log konsentrasi ekstrak etanolik biji srikaya vs probit.

srikaya konsentrasi 0,30 µg/mL persentase hambatannya 98,5 %. Data persentase hambatan pada kelompok perlakuan dibandingkan secara statistik menggunakan program SPSS 12. Dari hasil uji Levene dan uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan hasil bahwa data konsentrasi perlakuan dan persentase hambatan normal dan varians tidak homogen. Persentase hambatan ekstrak etanolik biji srikaya dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis dengan taraf kepercayaan 95 % didapatkan kesimpulan bahwa ada perbedaan yang bermakna persentase hambatan antar perlakuan. Berdasarkan uji Mann-Whitney dapat dilihat terdapat perbedaan aktivitas antara dua perlakuan, kecuali pada perlakuan ekstrak etanol 0,10 µg/mL dengan 0,15 µg/mL, 0,15 µg/mL dengan 0,20 µg/mL, 0,20 µg/mL dengan 0,25 µg/mL dan 0,25 µg/mL dengan 0,30 µg/mL.

Potensi ekstrak etanolik biji srikaya sebagai antiviral dapat diketahui menggunakan parameter *Inhibition Concentration* 50 % (IC_{50}). Nilai IC_{50} menunjukkan nilai hambatan perkembangan virus sebesar 50 %. Rata-rata

persen penghambatan yang diperoleh selanjutnya dikonversi menjadi harga probit (Tabel II) untuk melakukan perhitungan IC_{50} berdasarkan persamaan regresi linier antara log konsentrasi vs probit. Persamaan regresi linier yang diperoleh adalah $y = 5,7077x + 9,6632$ ($y = \text{probit}$, $x = \text{log konsentrasi}$) (Gambar 1). Dari persamaan regresi linier tersebut diperoleh harga IC_{50} sebesar 0,1524 µg/mL.

Adanya hambatan terhadap hema-glutinas menunjukkan bahwa dalam ekstrak etanolik biji srikaya terdapat senyawa yang mampu menghambat perkembangan virus *Newcastle Disease* pada telur ayam berembrio. Kemungkinan golongan senyawa pada biji srikaya yang terlarut dalam etanol 70 % adalah RIP (*Ribosome-Inactivating Protein*) dan atau tanin, flavonoid dan glikosida lain, saponin, polifenol dan alkaloid. RIP dan tanin pada beberapa tanaman telah terbukti mempunyai aktivitas antiviral. Bila dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya terhadap infusa biji srikaya dengan harga IC_{50} 3.236 µg/mL terhadap (Triadisti, 2005), maka aktivitas antiviral yang dihasilkan oleh ekstrak etanol (IC_{50} sebesar 0,1524 µg/mL) jauh lebih besar,

sehingga sangat prospektif dikembangkan sebagai antiviral.

Adanya aktivitas antiviral dapat terjadi melalui mekanisme antara lain penghambatan adsorpsi dan penetrasi sel yang rentan; penghambatan sintesis awal protein yang nonstruktural, misalnya, polimerase asam nukleat; penghambatan sintesis RNA dan DNA; penghambatan sintesis protein struktural dan penghambatan pengumpulan (pematangan) partikel virus dan pelepasannya dari sel (Katzung, 1998).

Berdasarkan pelarut yang digunakan, kandungan RIP pada biji srikaya hanya sebagian yang terlarut ke dalam etanol 70 % karena RIP termasuk protein dan bersifat polar. RIP akan lebih banyak tersari pada pelarut air. RIP pada beberapa tanaman telah diketahui mempunyai aktivitas antiviral dengan beberapa kemungkinan mekanisme, antara lain mengubah permeabilitas dan memudahkan masuknya RIP ke dalam sel yang terinfeksi, inaktivasi ribosom sel yang terinfeksi akan mengemblok sintesis protein dan mengurangi replikasi virus

(Barbieri *et al.*, 1993). Tanin pada beberapa tanaman juga dapat menghambat interaksi protein permukaan sel inang dan protein virus, sehingga menghambat perlekatan virus dan penetrasi virus ke dalam membran plasma (Moreira *et al.*, 2005) atau dengan kata lain tanin akan berikatan baik dengan protein virus maupun protein sel inang membentuk kompleks, sehingga mencegah proses adsorpsi virus (Jasim and Naji, 2003).

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanolik biji srikaya (*Annona squamosa* L.) terbukti dapat menghambat perkembangan Virus *Newcastle Disease* pada telur ayam berembrio dengan harga IC_{50} 0,1524 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Terima Kasih

Kami ucapkan terimakasih kepada Universitas Ahmad Dahlan (UAD) atas terfasilitasinya penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Barbieri, L., Battelli, M.G., and Stirpe, F., 1993, Ribosome-Inactivating Protein from Plants, *Biochem et Biophys Acta*, 1154, 237-282.
- Chiang, L.C., Chiang, W., Liu, M.C., and Lin, C.C., 2003, In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 194-198.
- Jasim, S.A.A. and Naji, M.A., 2003, *A Review Novel Antiviral Agents: A Medicinal Plant Perspective*, [http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2672.2003.02026.x? cookie Set=1](http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2672.2003.02026.x?cookieSet=1), diakses pada 8 Mei 2008.
- Jawetz, Melnick, dan Adelberg, 1995, *Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi 20, 351, Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Katzung, B.G., 1998, *Farmakologi Dasar dan Klinik*, diterjemahkan oleh Azwar Agoes, 760, Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Mahy, B.W.J. and Collier L., 1998, *Microbiology and Microbial Infections*, 435-436 dan 452, Oxford University Press, Inc., New York.
- Maryumi, 1996, Isolasi dan Karakterisasi Komponen Aktif dari Kulit Batang Srikaya (*Annona squamosa*, L.), *Penelitian Tanaman Obat di Berbagai Perguruan Tinggi di Indonesia VIII*, 53, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Moreira, D.L., Leitão, S.G., Gonçalves, J.L.S., Wigg, M.D., and Leitão, G.G., 2005, *Antioxidant and Antiviral Properties of Pseudopiptadenia contorta (Leguminosae) and of Quebracho (Schinopsis sp.) Extracts*, [http://www.scielo.br/scielo.php?script =sci_arttext&pid=S0100-404220050003-00011](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-404220050003-00011), diakses pada 8 Mei 2008.
- Nester, E.W., Anderson, D.G., Robert Jr. C.E., Pearsall, N.N., and Nester, M.T., 2004, *Microbiology : A Human Perspective*, 4th ed, 347-348, Mc. Graw Hill, New York.
- Sismindari, Hussana, A., dan Mubarika, S., 1998, Pematangan DNA Superkoil Untai Ganda Secara In Vitro oleh Ekstrak Gubal *Annona squamosa* L., *Majalah Farmasi Indonesia*, Vol. 9 No.4.

- Triadisti, N., 2005, Uji Daya Antiviral Infus Biji Srikaya (*Annona squamosa* L.), Pada Embrio Telur Ayam Dengan Virus Newcastle Disease, *Skripsi*, F.Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Wiyono,A., Indriyani,R., Dharmayanti,R.L.P.I., Damayanti,R., Parede,L., Safriyati,T., and Darminto, 2004, Isolasi dan Karakterisasi Virus *Highly Pathogenic Avian Influenza* Subtipe H5 dari Ayam Asal Wabah di Indonesia, *JITV*, Vol. 9 No. 1, Balai Penelitian Veteriner, Bogor.

* Korespondensi : Nanik Sulistyani
Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta
E-mail : naniksulistyani@gmail.com