

**PENGHAMBATAN *CYTHOPHATIC EFFECT* (CPE) PADA SEL BHK-21 YANG TERINFEKSI VIRUS DENGUE SEROTIPE 4 (DENV-4) DENGAN PEMBERIAN EKSTRAK N-HEKSAN *STREPTOMYCES* SP. GMR22****INHIBITION OF *CYTHOPHATIC EFFECT* (CPE) BHK-21 CELL LINE INFECTED WITH DENGUE VIRUS SEROTYPE 4 (DENV-4) TREATED BY EXTRACT OF N-HEXANE *STREPTOMYCES* SP. GMR22****Diani Mentari<sup>1,2\*</sup>, Jaka Widada<sup>3</sup>, dan Tri Wibawa<sup>4</sup>, Nastiti Wijayanti<sup>2\*</sup>,**<sup>1</sup>Prodi DIII Teknologi Bank Darah, STIKES Guna Bangsa Yogyakarta<sup>2</sup>Program Pascasarjana Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta<sup>3</sup>Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta<sup>4</sup>Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

\*Corresponding author: dianimentari@gmail.com; nastiti\_wijayanti@ugm.ac.id

**Abstrak**

Negara tropis seperti Indonesia sangat berpotensi sebagai tempat berkembangnya berbagai penyakit menular berbahaya salah satunya Demam Berdarah Dengue (DBD) yang disebabkan oleh infeksi virus dengue. Variasi genetik pada serotipe virus dengue menyebabkan penyakit ini menjadi perhatian dunia medis karena menyebabkan kompleksitas respon imun yang berbeda. Vaksin Dengue (Denvaxia) diperkenalkan oleh WHO pada akhir tahun 2015, namun penggunaannya belum sepenuhnya efektif. Hal ini menyebabkan banyak peneliti berupaya untuk mencari senyawa bioaktif yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai agen antiviral. *Streptomyces* sp. GMR22 diketahui menghasilkan senyawa bioaktif dengan spektrum yang luas. Ekstrak n-heksane *Streptomyces* sp. GMR22 memiliki nilai  $CC_{50}$  yang tidak terlalu tinggi dibandingkan dengan ekstrak Etil Asetat. Hal ini menyebabkan metabolit sekunder yang dihasilkan dapat digunakan untuk analisis lanjut seperti uji antivirus karena aman terhadap sel BHK-21 yang merupakan *host* virus dengue. Virus DENV-4 merupakan serotipe endemik di Asia Tenggara. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antivirus DENV-4 menggunakan ekstrak n-heksan *Streptomyces* sp. GMR22. Aktivitas antivirus dilakukan melalui pengamatan sel BHK-21. Hasil pengamatan morfologi sel BHK-21 terinfeksi virus DENV-4 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak n-heksan *Streptomyces* sp. GMR22 mengurangi terbentuknya *Cytophatic Effect* (CPE). Namun penggunaan konsentrasi 40  $\mu\text{g/mL}$  menyebabkan kematian pada sel BHK-21.

**Kata kunci:** Antiviral, DENV-4, Metabolit sekunder, *Streptomyces* sp. GMR22, CPE**Abstract**

Tropical countries like Indonesia have great potential as a place for developing various infectious diseases one of them is Dengue Fever (DHF) caused by dengue virus infection. Genetic variations in the dengue virus serotype causing immune response complexities. In 2015 Dengue Vaccine (Denvaxia) was introduced but it's not effective. Its make researchers are looking for bioactive compounds that have the potential to be developed as antiviral agents. *Streptomyces* sp. GMR22 can produce bioactive compounds with a broad spectrum. N-hexane extract *Streptomyces* sp. GMR22 has a lower  $CC_{50}$  value compared to Ethyl Acetate extract. This causes the secondary metabolites produced can be used for further analysis such as antiviral testing because it is safe against BHK-21 cells which are hosts of dengue virus. The DENV-4 virus is an endemic serotype in Southeast Asia and also dominates the incidence of dengue infection in Maros, South Sulawesi, Indonesia. The purpose of this study is to the knowability of *Streptomyces* sp GMR22 as a DENV-4 antiviral. Antiviral activity analysis was carried out through the cytopathic effect of the BHK-21 cell line. The results are extract n-hexane of *Streptomyces* sp. GMR22 decreases the formation of cytopathic effect. However, exposure of 40  $\mu\text{g/mL}$  of n-hexane extract induces the death of BHK-21 cells.

**Keywords:** Antiviral, DENV-4, Secondary metabolite, *Streptomyces* sp. GMR2, CPE

## Pendahuluan

Virus dengue banyak menginfeksi pada negara di kawasan Asia Tenggara. Angka Kejadian Demam berdarah Dengue (DBD) akibat terinfeksi DENV-4 pada tahun 2009 hingga 2010 di Jakarta mencapai 69%, baik dikarenakan infeksi tunggal maupun co-infeksi dengan serotipe lainnya (Dewi *et al.*, 2014). Pada tahun 2012, DENV-4 merupakan serotipe yang paling banyak menyebabkan Demam Berdarah Dengue (DBD) di Provinsi Aceh. Hasil screening pemeriksaan serotipe di beberapa RSUD di Aceh menunjukkan bahwa sebanyak 56,25 % DBD disebabkan DENV-4 (Paisal *et al.*, 2015). Pada tahun 2018, infeksi virus dengue juga pernah terjadi di Provinsi Sulawesi selatan yaitu pada daerah endemik seperti Makasar, Maros dan Gowa. Hasil menunjukkan bahwa serotipe yang banyak menginfeksi adalah DENV-2 dan DENV-4. Infeksi DENV-4 banyak mendominasi di daerah Maros (Taslim *et al.*, 2018).

Pengobatan infeksi virus Dengue sampai saat ini dirasa masih belum efektif. Vaksin Denvaxia (CYD-DTV) yang dikenalkan pada tahun 2015 ternyata menyebabkan *asymptomatic natural infection* pada seseorang yang belum pernah terinfeksi virus Dengue. Dampak yang terjadi adalah seseorang tersebut mengalami demam berdarah berat apabila terkena infeksi virus dengue pertama kalinya. Terkait hal tersebut WHO mengambil kebijakan bahwa vaksin Denvaxia hanya dapat digunakan pada seseorang yang pernah terinfeksi virus dengue (WHO, 2017)

Kurang efektifnya penggunaan Denvaxia membuat para peneliti fokus mencari senyawa yang berpotensi sebagai antiviral. *Streptomyces* sp GMR22 merupakan isolat lokal yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai antivirus karena memiliki metabolit sekunder dengan aktivitas antivirus pada DENV-1 (Imaniar, 2013), DENV-2 (Praditya, 2014). Selain itu ekstrak *n*-heksan *Streptomyces* sp. GMR22 memiliki aktivitas antivirus pada DENV-1 (Mentari, 2016). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi aktivitas ekstrak *n*-heksan metabolit sekunder *Streptomyces* sp. GMR22 pada virus DENV-4. Selain itu nilai  $CC_{50}$  49,160  $\mu$ L/mL menyebabkan ekstrak *n*-heksan metabolit sekunder *Streptomyces* sp. GMR22 aman untuk digunakan pada BHK-21 (Mentari *et al.*, 2019).

## Metode Penelitian

### Alat dan Bahan

Pada penelitian ini beberapa alat yang digunakan adalah *shaker*, inkubator, inkubator CO<sub>2</sub> (Memmert), *Waterbath* (Memmert), *Laminar Air Flow*, sentrifuse (Beckman dan Hettich), pH meter (Metrohm). Bahan yang digunakan Isolat *Streptomyces* sp. GMR22 diperoleh dari Fakultas Pertanian UGM sedangkan Virus Dengue serotipe 4 dan sel C6/36 (*adherent cell line* dari larva nyamuk *Aedes albopictus*) berasal dari koleksi Laboratorium Litbangkes RI. Kultur sel BHK-21 (*adherent cell line* dari *baby hamster kidney*) berasal dari Lembaga Biologi Molekular Eijkman Jakarta plat silika gel GF<sub>254</sub> (E-Merck), *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche-Germany), *DNA loading* (Thermo Scientific), Agarose 1% (Roche), 100 bp marker (Thermo Scientific).

## Prosedur kerja

### 1. Produksi Metabolit Sekunder *Streptomyces* sp.GMR22

Metabolit sekunder *Streptomyces* sp GMR22 diproduksi melalui *prekultivasi* pada media SNB (*Starch Nitrat Broth*) selama 5 hari, selanjutnya dikultivasi selama 15 hari. Cairan supernatan kemudian disentrifuse dan diekstraksi dengan *n*-heksan menggunakan labu gojok. Ekstrak yang didapat kemudian dipekatkan dengan *waterbath* (Mentari *et al.*, 2019).

### 2. Propagasi Virus DENV-4

Sel C6/36 yang telah konfluen diinokulasikan Virus DENV-4 sebanyak 1 ml (100  $\mu$ L virus + 900  $\mu$ L media DMEM 2%). Sel diinkubasi selama 1 jam sambil dilakukan pengoyangan tiap 15 menit sekali. Medium DMEM (berisi FBS 2%, penstrep 1,5%, fungizone 0,5%) sebanyak 4 mL. Propagasi virus DENV-4 dilakukan dengan menginkubasi sel dalam inkubator suhu 28°C tanpa CO<sub>2</sub> selama 3-9 hari.

### 3. *Plaque assay*

Virus DENV-4 hasil propagasi dihitung titernya menggunakan metode *Plaque assay*. Sel BHK-21 dengan kepadatan  $15 \times 10^4$  sel/*well* yang telah diinkubasi semalam dibuang medianya. Virus DENV-4 sebanyak 200  $\mu$ L/*well* diinokulasikan dalam sel BHK-21. Inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C dengan kadar CO<sub>2</sub> 5% dan dilakukan pengoyangan tiap 15 menit. Pengenceran virus dilakukan dengan cara melarutkan 50  $\mu$ L virus DENV-4 kemudian ditambahkan 450  $\mu$ L DMEM 2%, selanjutnya pengeceran kedua dibuat dengan mengambil 50  $\mu$ L virus dari stok awal dan ditambahkan 450  $\mu$ L media DMEM 2%. Proses pengenceran dibuat sebanyak 6 kali. Satu jam kemudian inokulum dibuang dan diganti dengan media *overlay* yang mengandung *carboxymetylcellulosa* 1% sebanyak 1 mL/*well*. Sel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan kadar CO<sub>2</sub> 5% selama 5 hari. Pada hari enam sel difiksasi menggunakan formaldehid 10% dan didiamkan selama 10 menit. Formaldehid diambil kemudian ditambahkan larutan kristal violet 1% dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. *Plate* kemudian dicuci menggunakan aquadest sebanyak 1 mL/*well*. Apabila kristal violet masih nampak terlalu tebal, pencucian dapat dilakukan kembali. *Well* kemudian dikering anginkan, *plaque* yang terbentuk diamati dan dihitung menggunakan rumus:

$$\frac{\text{PFU}}{\text{ml}} = \frac{\text{Jumlah Plaque (PFU)}}{\text{Faktor Pengenceran} \times \text{volume inokulum (mL)}}$$

### 4. Konfirmasi hasil Propagasi menggunakan *Reverse transcriptase-PCR* (RT-PCR)

Sel C6/36 dipanen dan diisolasi RNA virusnya menggunakan *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche-Germany) dengan prosedur yang sesuai direkomendasikan produsen. Selanjutnya RNA virus dianalisis menggunakan *one-step reverse transcriptase-PCR* (RT-PCR) dengan primer *forward* D1-TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G dan primer *reverse* DEN4-TGT TGT CTT AAA CAA GAG AGG TC. Amplifikasi DENV-4 proses *reverse transcriptase* menggunakan suhu

60°C selama 35 menit, predenaturasi 94°C selama 2 menit, *denaturasi* pada suhu 94°C selama 45 detik, *anealing/elongasi* 50°C selama 1 menit sebanyak 40 siklus (Harris *et al.*, 2019).

#### 5. Uji antivirus DENV-4

Hasil propagasi virus DENV-4 sebanyak 100  $\mu\text{L/well}$  (24 *well plate*) diinokulasikan pada sel BHK-21 yang telah konfluen dengan kepadatan awal  $10 \times 10^4$  sel/mL. Selanjutnya sel diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C dengan kadar  $\text{CO}_2$  5%, setiap 20 menit *well plate* digoyang agar virus DENV-4 dapat menginfeksi seluruh sel. Inokulum kemudian diambil dan ditambahkan 1 ml senyawa uji yang telah dilarutkan dalam medium DMEM 2%. Konsentrasi yang digunakan adalah dibawah nilai  $\text{CC}_{50}$  (Mentari, 2019). Konsentrasi supernatan GMR22: 200; 50; 12,5  $\mu\text{g/mL}$  dan Ekstrak n-heksan GMR22: 40; 10; 2,5  $\mu\text{g/mL}$ . Sel kemudian diinkubasi selama 6 hari pada inkubator  $\text{CO}_2$  dengan kadar 5% dan suhu 37°C.

### Hasil dan Pembahasan

#### Hasil Penelitian

*Streptomyces* sp. GMR22 merupakan isolat yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai penghasil senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antiviral.

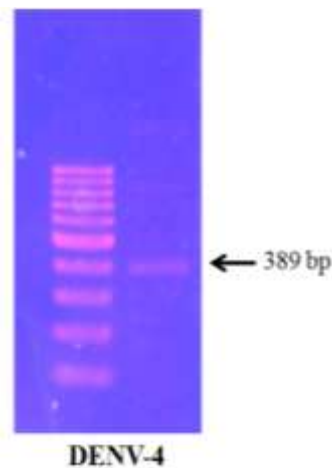
##### a) Propagasi virus DENV-4

Dalam penelitian ini, propagasi virus DENV-4 menggunakan sel C6/36. Proses inkubasi dilakukan selama 7 hari atau hingga timbul CPE. Dalam penelitian yang telah dilakukan CPE terbentuk akibat infeksi DENV-4 pada sel C6/36 menunjukkan banyak sel yang bergerombol. Hal ini dikarenakan sel yang terinfeksi virus DENV-4 telah kehilangan kemampuan untuk *attachmen* pada permukaan sehingga melayang (panah kuning). Adapun CPE yang terbentuk akibat infeksi Virus DENV-4 pada sel C6/36 yang dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 100x dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil propagasi DENV-4 pada sel C6/36 hari ke-7 *post infeksi*. Tanda panah kuning menunjukkan terbentuknya CPE Pengamatan menggunakan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 200x.

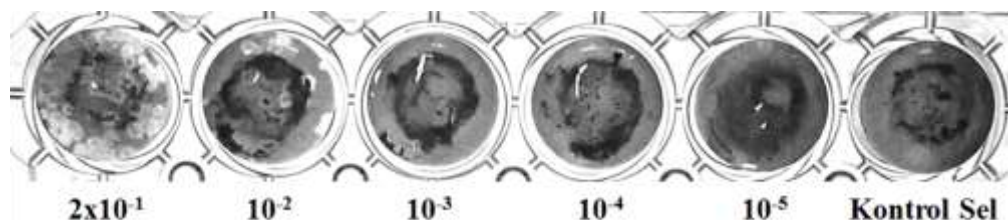
Hasil propagasi selanjutnya dikonfirmasi dengan menggunakan RT-PCR untuk mengetahui apakah sel positif terinfeksi DENV-4. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan Primer D1 dan Den 4 (Harris *et al.*, 1998). Hasil kemudian diamati menggunakan gel elektroforesis dengan konsentrasi agarosa 1%. Hasil memperlihatkan terdapat band ukuran  $\pm 389$  bp (Gambar 2). Hal ini dapat disimpulkan bahwa propagasi virus DENV-4 berhasil dilakukan.



Gambar 2. Elektroforegram deteksi dan konfirmasi hasil propagasi virus DENV-4 yang diamplifikasi dengan primer forward D1 dan reverse DEN4 serta marker 100 bp *leader* (M) (Harris *et al.*, 1998)

**b) Titer Virus DENV-4**

*Plaque assay* merupakan salah satu metode yang digunakan untuk menghitung titer virus (Morens *et al.*, 1985). Dalam penelitian ini, perhitungan dilakukan dengan menggunakan sel BHK-21. Hal ini dikarenakan sel BHK-21 menghasilkan *plaque* yang lebih baik dibandingkan dengan sel Vero dan C6/36 pada perhitungan titer DENV-3 (Supardan *et al.*, 2016). *Plaque* yang terbentuk menandakan kematian atau kerusakan sel akibat terinfeksi virus. Dalam *plaque assay* digunakan *overlay* medium berupa carboxymethyl-cellulose (CMC). Adapun hasil fiksasi uji *plaque assay* pada hari ke 6 dapat dilihat pada Gambar 3 dan jumlah perhitungan *plaque* dapat dilihat pada Tabel 1



Gambar 3. Hasil uji *plaque assay* virus DENV-4 pada sel BHK-21. Sel BHK-21 ( $15 \times 10^4$ ) ditumbuhkan selama 24 jam hingga konfluen pada medium DMEM kemudian diinokulasikan virus DENV-4 sebanyak 200  $\mu$ L/well dengan berbagai seri pengenceran ( $2 \times 10^{-1}$  sampai  $10^{-5}$ ), kemudian pada hari ke-6 *post infeksi* dilakukan fiksasi.



**Tabel 1. Jumlah *Plaque* pada beberapa pengenceran virus DENV-4**

Serotipe	Pengenceran virus	Jumlah <i>Plaque</i>			Rata-rata	Titer Virus (PFU/mL)
		Opt 1	Opt 2	Opt 3		
DENV-4	$2 \times 10^{-1}$	36	49	40	41,66	$10,415 \times 10^2$
	$10^{-2}$	9	8	11	9,33	
	$10^{-3}$	-	-	-		
	$10^{-4}$	-	-	-		
	$10^{-5}$	-	-	-		
	Kontrol Sel	-	-	-		

Pada penelitian ini, *Plaque* yang terbentuk akibat infeksi virus DENV-4 hanya terlihat pada pengenceran  $2 \times 10^{-1}$  dan  $10^{-2}$ , dari hasil perhitungan didapatkan konsentrasi virus dengue adalah  $10,415 \times 10^2$  (PFU/mL). Pada pengenceran  $2 \times 10^{-1}$  hasil rata-rata jumlah *plaque* yang terbentuk adalah 41,66 *plaque*, sehingga titer virus DENV-4 yang diperoleh adalah sebesar  $10,415 \times 10^2$ . Titer virus yang didapat, selanjutnya digunakan untuk uji antiviral.

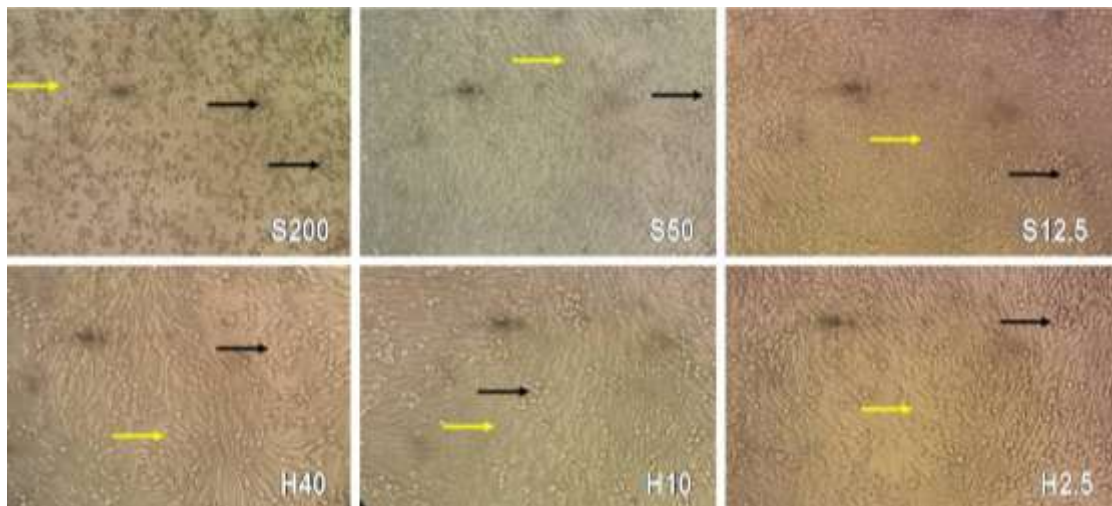
**c) CPE pada sel BHK-21 setelah pemberian ekstrak *n*-heksan *Streptomyces* sp. GMR2**

*Cytopathic Effect* (CPE) merupakan perubahan morfologi sel akibat terinfeksi virus (Agol, 2012). Perubahan ini terjadi karena virus mengendalikan metabolisme seluler sel *host* yang menyebabkan terjadi penurunan ATP sehingga terjadi perubahan morfologi sel berupa nekrosis, lisis, pembentukan badan inklusi, pembentukan sel raksasa dan vakuolisasi sitoplasma (Ahlquist *et al.*, 2002; Agol, 2012; McCormick *et al.*, 2012).

Pada kondisi normal (tidak diinfeksi dengan DENV-4), morfologi sel nampak konfluen memenuhi permukaan *well*. Hal ini berbeda pada sel yang diinfeksi dengan DENV-4. Sel nampak bulat-bulat bergerombol yang menunjukkan sel mengalami kematian (panah hitam pada Gambar 4). Sel BHK-21 yang bergerombol tersebut kehilangan kemampuan attachment pada dasar permukaan *well* sehingga melayang. Adapun morfologi sel BHK-21 yang tidak dan terinfeksi DENV-4 dapat dilihat pada Gambar 4 dan penghambatan CPE pada sel BHK-21 setelah pemberian ekstrak *n*-heksan dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 4. Kondisi sel BHK-21 yang tidak diinfeksi DENV-4 (kontrol sel/KS) memperlihatkan sel konfluen (panah kuning), sedangkan pada Kontrol Virus (KV) sel terlihat banyak yang mati (panah hitam).



Gambar 5. Aktivitas antivirus DENV-4 dengan pemberian supernatan dan ekstrak n-heksan *Streptomyces* sp GMR 22 pada sel BHK-21. Panah hitam terbentuknya CPE, panah kuning menunjukkan sel konfluen. Pengamatan menggunakan mikroskop inverted dengan perbesaran 200x

## Pembahasan

Pada Penelitian ini, propagasi virus DENV-4 menggunakan sel C6/36. Hal ini dikarenakan sel C6/36 dilaporkan mampu meningkatkan propagasi virus DENV-2 lebih baik dari pada sel Vero. Titer virus DENV-2 sudah terbentuk pada hari ke 4 ketika dipropagasi pada sel C6/36 sedangkan pada sel Vero titer virus baru terbaca saat hari ke-6 (Alexandra et al., 2019). Perolehan titer virus yang tinggi ini dapat disebabkan karena kecepatan rata-rata pertumbuhan sel C6/36 lebih cepat (0,576/hari) dibandingkan dengan sel Vero 0,384/hari (Supardan, 2016). Selain itu sel C6/36 memiliki reseptor lebih banyak, yaitu laminin reseptor, HSP *related* dan prohibitin yang akan memudahkan *entry* virus jika dibandingkan dengan sel BHK-21 yang hanya memiliki 2 reseptor yaitu heparan sulfat dan glycoprotein (Alen and Schol, 2012). Dalam penelitian ini, perhitungan dilakukan dengan menggunakan sel BHK-21. Hal ini dikarenakan sel BHK-21 menghasilkan *plaque* yang lebih baik dibandingkan dengan sel Vero dan C6/36 pada perhitungan titer DENV-3 (Supardan, 2016). Pada penelitian ini fiksasi menggunakan *carboxymethyl-cellulose* (CMC) dilakukan pada hari keenam. CMC berguna untuk meningkatkan viskositas medium sehingga untuk membatasi penyebaran virus dan menstabilkan sel-sel (Zamree et al., 2005; Escobar-Herrera et al 2007; Supardan et al., 2016). Jumlah *plaque* yang dapat dihitung yaitu antara 30-300/*well* baik yang berbentuk bulat ataupun ireguler (Panec and Katz, 2006). *Plaque* pada sel BHK-21 dapat terlihat saat hari ke 5 sampai 7 (Imaniar, 2013). Pada umumnya *plaque* akan meningkat (ukuran ataupun jumlahnya) apabila proses fiksasi terlambat dilakukan *plaque* pada infeksi DENV-4 cenderung bergerombol dan besar-besar, ini dapat disebabkan karena akumulasi kerusakan sel lebih parah. Hal ini mengakibatkan *plaque* akan sulit dihitung karena terlalu banyak dan saling menempel

Pada saat uji antivirus konsentrasi senyawa uji yang digunakan untuk pengujian

adalah dibawah nilai  $CC_{50}$  yaitu 49,160  $\mu\text{g/mL}$  (Mentari *et al.*, 2019). Hal ini dimaksudkan agar konsentrasi tersebut tidak toksik terhadap sel BHK-21. Pengujian menggunakan ekstrak *n*-heksan *Streptomyces* sp. GMR22 dengan 3 konsentrasi yaitu 40, 10 dan 2,5  $\mu\text{g/mL}$ . Selain itu juga dilakukan pengujian aktivitas antivirus DENV-4 menggunakan supernatan *Streptomyces* sp. GMR22 (hasil metabolit sekunder yang belum diekstrak), yaitu menggunakan konsentrasi 200, 50 dan 12,5  $\mu\text{g/mL}$ . Nilai  $CC_{50}$  dari supernatan *Streptomyces* sp. GMR22 adalah 547,44  $\mu\text{g/mL}$  (Mentari *et al.*, 2019).

Penggunaan ekstrak *n*-heksan dan supernatan terlihat memiliki aktivitas penghambatan terbentuknya CPE pada sel BHK-21. Penggunaan ekstrak *n*-heksan dengan konsentrasi tertinggi 40  $\mu\text{g/mL}$  (H40) pada dasar permukaan *well* menunjukkan banyak area yang kosong. Hal ini berarti banyak terdapat sel yang mati (Gambar 5). Pada pemberian supernatan dengan konsentrasi tertinggi 200  $\mu\text{g/mL}$  (S200) memperlihatkan banyak sel yang mengalami kematian. Sel nampak berbentuk bulat karena kehilangan kemampuan *attachmen* pada permukaan sehingga sel terlepas dan bergerombol. Hal ini berbeda pada pemberian supernatan konsentrasi 50  $\mu\text{g/mL}$  (S50), sel terlihat konfluen dan memenuhi dasar permukaan. Begitupula pada pemberian supernatan dengan konsentrasi 12,5  $\mu\text{g/mL}$  (S12,5), banyak terdapat sel konfluen namun tidak sebanyak pada konsentrasi S50. Hasil ini menunjukkan ada penghambatan pertumbuhan virus DENV-4 sehingga CPE yang terbentuk semakin sedikit. Pada pemberian supernatan maupun *n*-heksan pada konsentrasi tertinggi memperlihatkan terdapat sel yang mati cukup banyak. Hal ini mungkin disebabkan sel BHK-21 menghadapi 2 jenis inhibitor, yaitu virus DENV-4 dan ekstrak dengan konsentrasi yang cukup besar. Analisis uji antiviral ekstrak *n*-heksan metabolit sekunder *Streptomyces* sp. GMR22 pada virus DENV-1 menghasilkan nilai *Inhibition Concentration* 50 ( $IC_{50}$ ) 7,244  $\mu\text{g/mL}$ , sedangkan pada supernatan yaitu 15,962  $\mu\text{g/mL}$ . Penghambatan pertumbuhan antiviral pada DENV-1 dapat disebabkan karena ekstrak *n*-heksana metabolit sekunder *Streptomyces* sp. GMR22 menghasilkan senyawa flavanoid, fenol, terpenoid (Mentari *et al.*, 2019).

Hal ini kemungkinan juga dapat terjadi pada uji antiviral menggunakan DENV-4. *Streptomyces* sp. GMR22 diketahui memiliki gen PKS dan NRPS. Struktur gen PKS *Streptomyces* sp. GMR22 memiliki kemiripan dengan *S.geldanamycininus* B430980 (Alimuddin, 2012). *S.geldanamycininus* B430980 merupakan mikroorganisme yang dapat memproduksi senyawa geldanamycin. Geldanamycin merupakan senyawa yang dikenal memiliki aktivitas *multiple pleiotropik action* salah satunya antiviral (Li *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017).

Geldanamycin awalnya dikenal memiliki aktivitas penghambatan tirosin kinase, seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan aktivitas lain yang telah diketahui adalah penghambatan "chaperon" HSP90 yang berfungsi membantu maturasi virion (Li *et al.*, 2012;). Hasil uji analisis kepolaran menggunakan program MarvinSketch memperlihatkan bahwa geldanamycin memiliki nilai Log P 2,15, sedangkan *n*-heksana 3,13 dan etil asetat 0,28 (data tidak ditampilkan). Nilai Log P yang semakin besar mengindikasikan senyawa semakin non-polar. Hal ini memungkinkan senyawa seperti geldanamycin bisa terambil dalam proses ekstraksi menggunakan senyawa non polar seperti *n*-heksan.



### Kesimpulan

Pemberian ekstrak n-heksan dan supernatan *Streptomyces* sp. GMR22 menurunkan CPE pada sel BHK-21 yang telah terinfeksi virus DENV-4. Namun pada pemberian konsentrasi tertinggi senyawa uji menyebabkan kematian pada sel BHK-21. Saran yang dapat peneliti berikan, yaitu perlu dilakukan uji molekuler untuk memastikan penghambatan proliferasi DENV-4. Selain itu juga dapat dilakukan pengamatan morfologi sel menggunakan mikroskop elektron, sehingga invasi virus DENV-4 kedalam sel dapat teramati.

### Ucapan Terimakasih

Penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada Kemenristek DIKTI atas pemberian hibah PUPT UGM dan hibah Penulisan artikel Ilmiah Nasional Tahun 2019.

### Daftar Pustaka

- Agol V.I, 2012. Cytopathic effects: virus-modulated manifestations of innate immunity ?. *Trends Microbiol. Trends Microbiol.* Dec; 20(12): 570–576.
- Ahlquist P, 2002. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science.* May 17;296(5571):1270-3.
- Alen M.N.F and Schols D, 2012. Dengue Virus Entry as Target for Antiviral Therapy. *Journal Of Tropical Medicine.* Volume 2012
- Alexandra N., Guerrero S., Bello F.J, 2019. Major Article Comparative assessment of the replication efficiency of dengue, yellow fever , and chikungunya arboviruses in some insect and mammalian cell lines. *Rev Soc Bras Med Trop.* Apr 25(52).
- Dewi B.E., Naiggolan L., Putri D.H., Rachmayanti N., Albar S., Indriastuti N.T., Sjamsuridzal W., Sudiro T.M. 2014. Characterization of dengue virus serotype 4 infection in Jakarta, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* Jan: 45(1):53-61
- Escobar-Herrera J., JoséMedina-Ramírez F., LorenaGutiérrez-Escolano A, 2007. Short communication A carboxymethyl-cellulose plaque assay for feline calicivirus. 146:393–6. *Journal of Virological Methods.* **146**: 393-396.
- Harris E, Roberts T.G., Smith L., Selle J., Kramer L.D., Valle S., Sandoval E., Balmaseda A, 1998. Typing of Dengue Viruses in Clinical Specimens and Mosquitoes by Single-Tube Multiplex Reverse Transcriptase PCR. *J Clin Microbiol.* Sep;36(9):2634-9.
- Li Y, Tao P., Liu Y., Jiang J, 2012. Geldanamycin , a ligand of heat shock protein 90 , inhibits herpes simplex virus type 2 replication both in vitro and in vivo. *The Journal of Antibiotics.* **65 (10)**: 509–512.
- Liu C., and Wu S, 2012. Mosquito and Mammalian Cells Grown on Microcarriers for Four-Serotype Dengue Virus Production: Variations in Virus Titer, Plaque Morphology, and Replication Rate *Biotechnol Bioeng.* Mar 5;85(5):482-8.

- McCormick K.D., Liu S., Jacobs J.L., Marques E.T.A., Sluis-Cremer, Jr.N, Wang T, 2012. Development of a Robust Cytopathic Effect-Based High-Throughput Screening Assay To Identify Novel Inhibitors of Dengue Virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(6):3399–401.
- Mentari D, 2016. Antivirus Activity Of N-Hexane Extract From Streptomyces Sp. GMR22 Against Dengue Virus Serotype 1. *Tesis.* Program Pascasarjana Fakultas Biologi UGM
- Mentari D, Naima M., Wulansari R., Widada J., Nuringtyas T.R., Wibawa T., Wijayanti N, 2019. Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Metabolit Sekunder Streptomyces sp . GMR22 terhadap Toksisitas pada Sel BHK-21. *Pharmacon: Jurnal Farmasi Indonesia.* 2019;16(1):1–10.
- Morens D.M, Halstead S.B., Repik, P.M, Putvatana R., Raybourne N, 1985. Simplified Plaque Reduction Neutralization Assay for Dengue Viruses by Semimicro Methods in BHK-21 Cells : Comparison of the BHK Suspension Test with Standard Plaque Reduction Neutralization. *J Clin Microbiol.* 1985 Aug;22(2):250-4.
- Paisal, Herman H., Arifin A.Y., Ardiansyah A, Hanum S, Khairiah, Zuardi M., Yasir, 2015. Serotipe virus Dengue di Provinsi Aceh Dengue virus serotype in Aceh Province. *Aspirator.* 7(1): 7-12
- Panec M and Katz D.S, 2006. Plaque Assay Protocols [Internet]. 2006. Available from: <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3073>
- Praditya D.F, 2014. Potensi Aktivitas Antiviral Ekstrak Etil Asetat Dan Ekstrak Air Metabolit Sekunder Aktinomisetes Terhadap Virus Dengue Serotipe-2 (Denv-2). *Tesis.* Program Pascasarjana Bioteknologi UGM
- Supardan D., Widada J., Wibawa T., Wijayanti N., 2016. Uji Viabilitas Virus Dengue Serotipe 3 Pada Beberapa Galur Sel (Cell-Line). *Biota.* 9(1)
- Taslim N, Arsunan A.A., Ishak H., Nasir S, Usman A.N, 2018. Diversity of Dengue Virus Serotype in Endemic Region of South Sulawesi Province. *Journal of Tropical Medicine.* (1):1-4
- Wang C., Liu, Luo J, Hua, Gao Y., Sun Y., Luo F, Liu X, He H, 2017. Geldanamycin Reduces Acute Respiratory Distress Syndrome and Promotes the Survival of Mice Infected with the Highly Virulent H5N1 Influenza Virus. *Front Cell Infect Microbiol.* Jun 15(7): 267.
- WHO, 2017. Dengue vaccine: WHO position paper, July 2016 – recommendations. Vaccine. World Health Organization. Nur Insana Imaniar, 2013. Aktivitas Antivirus Metabolit Sekunder Aktinomisetes Laut dan Tanah Terhadap Virus Dengue Serotipe-1. *Tesis.* Program Pascasarjana Bioteknologi UGM
- Zamree I., Drakes N., Rohani A., Lee H.L, 2005. Sensitivity of Aedes albopictus C6 / 36 cells line for the detection and infectivity titration of dengue virus. *Trop Biomed.* 22(2):217-9.