

UJI ANTI VIRUS SENYAWA ETIL 4-(3,5-DIMETILFENIL)-6-METIL-2-OKSO-1,2,3,4-TETRAHIDROPIRIMIDIN-5-KARBOKSILAT DENGAN MODEL NEWCASTLE DISEASE

ANTIVIRAL TEST OF ETHYL 4-(3,5-DIMETHYLPHENYL)-6-METHYL-2-OKSO-1,2,3,4-TETRAHYDROPYRIMIDINE-5-CARBOXYLATE COMPOUND WITH NEWCASTLE DISEASE MODEL

Muhammad Reza Fatkhurohman¹, Azis Saifudin^{1*}

¹Laboratorium Biologi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jl. A. Yani No 157, Sukoharjo, Indonesia

*E-mail: Azis.Saifudin@ums.ac.id

Abstrak

Penemuan senyawa baru penuntun antivirus diperlukan untuk mengantisipasi munculnya penyakit-penyakit baru yang disebabkan oleh virus varian baru. Dihidropirimidinon (DHMPs) dengan gugus inti cincin pirimidin, dilambangkan sebagai senyawa Biginelli dengan aktivitas farmakologis yang memiliki efektivitas tinggi. Aktivitas yang dimiliki diantaranya antibakteri, antivirus, antitumor, antiinflamasi dan antioksidan. *Newcastle Disease* adalah virus yang termasuk dalam famili paramyxoviridae, genus Paramyxovirus. Pada manusia, virus ini menyebabkan suatu peradangan konjungtiva. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui bagaimana aktivitas antivirus senyawa Etil 4-(3,5-dimetilfenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat. Penelitian ini menggunakan telur ayam KUB berusia 9-11 hari. Penelitian ini menggunakan ruang allantonis yang berisi cairan alantonis yang terus diproduksi seiring perkembangan embrio. Pengamatan penghambatan virus menggunakan uji Hemaglutinasi. Perhitungan persentase penghambatan didapatkan pada kelompok kontrol menunjukkan hasil 0%, pada kelompok 1 (1 µg/mL) adalah 0%, kelompok 2 (10 µg/mL) 92,3% dan kelompok 3 (100 µg/mL) adalah 99,6%. Data yang didapat menunjukkan hasil yang linear, peningkatan pemberian konsentrasi senyawa menyebabkan peningkatan persen penghambatan yang tinggi pula.

Kata Kunci: Tetrahidropirimidin, Antivirus, Newcastle Disease

Abstract

The discovery of new antiviral guiding compounds is needed to anticipate the emergence of new diseases caused by new variant viruses. Dihydropyrimidines (DHMPs) with ring core pyrimidine groups, denoted as Biginelli compounds, are a class of organic compounds with high biological and pharmacological effectiveness. Biological activity, including antibacterial, antiviral, antitumor, anti-inflammatory and antioxidant. Newcastle Disease is a virus that belongs to the family paramyxoviridae, genus Para-myxovirus. In humans this virus causes an inflammation of the conjunctiva. This research was conducted to determine the presence or absence of antiviral activity on the compound Ethyl 4-(3,5-dimethylphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate. This study used KUB chicken eggs aged 9-11 days. This study uses the allantonic space because this space contains allantonic fluid which continues to be produced as the embryo develops. Observation of virus inhibition using Hemagglutination test. The calculation of the percentage of inhibition obtained in the control group showed 0% results, then in group 1 (1 µg/mL) was 0%, group 2 (10 µg/mL) was 92.3% and group 3 (100 µg/mL) was 99.6%. The data obtained showed linear results that the increase in the concentration of the compound caused a high increase in the percentage of inhibition as well.

Keywords: Tetrahydropyrimidine, Antivirus, Newcastle Disease

PENDAHULUAN

Penemuan senyawa baru penuntun antivirus diperlukan untuk mengantisipasi munculnya penyakit-penyakit baru yang disebabkan oleh virus varian baru. Dihidropirimidinon (DHMPs) dengan gugus pirimidin inti cincin, dilambangkan sebagai senyawa Biginelli merupakan kelas senyawa organik dengan aktivitas biologis dan farmakologis yang memiliki efektivitas tinggi. Aktivitas yang dimiliki diantaranya antivirus, antitumor, antiinflamasi, dan antioksidan (Abo El-Yazeed *et al.*, 2020)

Reaksi multikomponen (MCR) kini semakin meningkat penting dalam dunia kimia organik dan obat-obatan. Reaksi ini memberikan kecepatan, keragaman, dan efisiensi dalam proses penemuan obat. Sehingga strategi MCR menawarkan keunggulan yang signifikan dibandingkan dengan sintesis tipe linier konvensional. Tiga reaksi atau lebih reaktan bergabung dalam satu bejana reaksi untuk membentuk produk baru yang mengandung bagian dari semua komponen. Kappe (2003) menyatakan bahwa ketertarikan reaksi multikomponen meningkat yang disebabkan karena sintesis kimia dengan keunggulan intrinsik yang signifikan dibandingkan sintesis tipe linier konvensional. Sebagian besar memerlukan reaksi yang sederhana dan bahan sederhana, kompleksitas produk tinggi dan keragaman produk yang besar (Huseynzada *et al.*, 2020).

Newcastle Disease adalah virus yang termasuk dalam famili paramyxoviridae, genus Para-myxovirus. Newcastle Disease merupakan virus yang banyak menyerang unggas, dan mamalia lainnya. Genome virus ini adalah suatu rantai tunggal RNA. Virus ini menyerang alat pernapasan, susunan jaringan syaraf, serta alat-alat reproduksi telur dan menyebar dengan cepat serta menular pada banyak spesies unggas yang bersifat akut, epidemik dan sangat patogen (Nagarajaiah *et al.*, 2016). Pada manusia, virus ini menyebabkan suatu peradangan konjungtiva. Penyembuhan lengkap terjadi dalam 10-14 hari. Penyebaran virus ini sangat cepat dan dapat menyerang alat pernapasan, susunan jaringan syaraf, serta alat-alat reproduksi telur (Suprobawati dan Kurniwati, 2018). Penelitian ini menggunakan virus *newcastle disease* sebagai model virus atau media untuk uji aktivitas antivirus (Lodish *et al.*, 2016). Kebaruan penelitian ini adalah penemuan senyawa baru untuk antivirus serta mengujinya pada model *newcastle disease* sehingga diharapkan senyawa antivirus baru ini bisa digunakan sebagai obat antivirus.

METODE PENELITIAN

Penelitian yang dilakukan ini termasuk dalam kategori eksperimental dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan melibatkan kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mikropate, LAF, timbangan analitik, inkubator, dan peralatan penunjang lainnya. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa Etil 4-(3,5-dimetilfenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat, telur ayam berembrio yang berumur 9-11 hari, Virus *Newcastle Disease*, eritrosit ayam, etanol 96%, etanol 70%, PBS, antibiotik ampisilin dan streptomisin, DMSO.

Persiapan Senyawa

Senyawa yang digunakan didapat dari laboratorium kimia farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Senyawa dimurnikan terlebih dahulu dengan proses pemanasan.

Persiapan Telur Uji

Penelitian ini menggunakan telur ayam KUB berusia 9-11 hari yang didapatkan dari peternakan daerah Jogja di *candling* untuk melihat embrio yang ada di dalam telur apakah mati atau tidak. Jika mati, maka telur tidak bisa digunakan sebagai media uji antivirus. Setelah diseleksi, telur yang hidup ditandai posisi embrio dan juga rongganya menggunakan pensil.

Persiapan Virus Newcastle Disease

Virus ND didapatkan dari toko peternakan daerah Kartasura. Sebanyak 150 dosis virus diencerkan dengan PBS sebanyak 3 mL, kemudian dicampur dengan antibiotik ampisilin + streptomisin dan diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 1 jam.

Perlakuan Telur Uji

Telur dibagi menjadi 4 kelompok.

1. Kelompok 1 : Diberi senyawa dengan konsentrasi 1 dan virus *Newcastle Disease* sebanyak 0,2 mL
2. Kelompok 2 : Diberi senyawa dengan konsentrasi 10 dan virus *Newcastle Disease* sebanyak 0,2 mL
3. Kelompok 3 : Diberi senyawa dengan konsentrasi 100 dan virus *Newcastle Disease* sebanyak 0,2 mL
4. Kelompok 4 : Diberi virus *Newcastle Disease* sebanyak 0,2 mL

Persiapan Telur Uji

Telur yang sudah didapatkan dari peternak daerah Yogyakarta disimpan dalam inkubator agar embrio yang ada didalamnya tetap terjaga kehidupannya. Disimpan sampai usia 9 hari. Setelah itu ditandai dengan pensil bagian rongga udara dan juga posisi embrionya, dengan tujuan untuk memudahkan pada saat proses injeksi.

Inokulasi Virus dan Sampel ke Ruang Alantoni

Bagian rongga udara telur disemprot terlebih dahulu dengan alkohol agar steril, kemudian diberi lubang kecil dengan cara dibor. Selanjutnya masing-masing konsentrasi senyawa diinokulasikan ke dalam ruang alantoni, setelah itu dengan cara yang sama virus diinokulasikan ke dalam ruang alantoni menggunakan spuit injeksi 1 mL. Lubang ditutup dengan plester kertas tujuannya agar pertumbuhan virus tanpa kontaminasi dari luar, kemudian telur berembrio diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 2 hari (Diniatik dkk., 2011).

Pembuatan Eritrosis Ayam 1% dan Membuka Telur Berembrio Yang Diinokulasi Virus

Setelah dieramkan selama 2 hari, telur dimasukkan kedalam kulkas selama 1 hari untuk mematikan embrio yang ada di dalam telur. Setelah dikeluarkan dari kulkas, cangkang telur

dikupas menggunakan pinset steril. Setelah itu diambil cairan alantonis menggunakan spuit sebanyak 1 mL dan disimpan dalam vial.

Uji Hemaglutinasi

Uji hemaglutinasi menggunakan mikroplat dengan dasar "U" mempunyai 96 sumuran. Lubang sumuran diisi dengan PBS 0,5 mL pada lubang sumuran 1-12, baris A-H serta mikroplat kedua baris A-D. Mikroplat kedua baris B-D digunakan untuk kontrol virus. Lubang sumuran bukan kontrol diisi dengan cairan alantonis pada masing-masing seri konsentrasi sebanyak 0,5 mL yang telah mengandung senyawa dan juga virus *Newcastle Disease*, dan lubang sumuran sisanya diisi dengan cairan alantonis yang hanya mengandung virus *Newcastle Disease* saja. Dilakukan pencampuran menggunakan mikrotiter masing-masing konsentrasi dengan cara digoyang selama 12 putaran dimulai dari lubang 1 sampai 12. Ditambahkan sebanyak 0,5 mL eritrosit ayam pada lubang 1 baris A sampai akhir, mikroplat tersebut dibiarkan pada suhu kamar selama 15-20 menit. Pembacaan uji hemaglutinasi dengan melihat terjadinya endapan eritrosit ayam, apabila tidak terjadi endapan seperti pada lubang kontrol virus dinyatakan negatif HA.

Perhitungan Titer Uji Hemaglutinasi

Perhitungan hemaglutinasi dilakukan dengan cara menghitung lubang yang positif adanya endapan eritrosit ayam pada dasar sumuran dimulai dari lubang 1. Titer hemaglutinasi dinyatakan dengan nilai $2n$, dimana n merupakan banyaknya lubang yang menunjukkan hasil positif (Diniatik dkk., 2011).

Analisis Data

Dilakukan perhitungan titer dari cairan alantonis, dengan sistem hemaglutinasi yang ada pada sumuran mikroplat dihitung persentase penghambatannya.

Data persentase hambatan antiviral dapat di analisis dengan metode analisis varian pola searah dengan taraf 95%. Apabila hasil yang diperoleh dari uji anava menunjukkan perbedaan yang bermakna dilanjutkan dengan uji BNT dengan taraf 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemurnian senyawa

Senyawa Etil 4-(3,5-dimetilfenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat dimurnikan terlebih dahulu dengan cara kristalisasi mengingatkan senyawa yang ada sudah lama sehingga kemungkinan tercemar oleh partikel lain yang tidak diperlukan. Senyawa berbentuk padatan dipanaskan dengan etanol 70% sebanyak 150 mL kemudian setelah larut didiamkan pada suhu ruang. Setelah itu dimasukkan ke dalam lemari pendingin selama 24 jam supaya kristal terbentuk. Kemudian senyawa dicuci menggunakan corong buchner agar kristal senyawa murni terpisah dengan pelarut dan pengotor lainnya.

Inokulasi

Proses inokulasi dengan cara menyuntikkan senyawa dan juga virus ke dalam cairan alantonis. Penelitian ini menggunakan telur ayam berembrio karena mudah didapatkan. Selain

itu juga karena harganya yang murah dan juga mudah dikerjakan di laboratorium. Telur berembrio memiliki 4 ruang yang digunakan untuk inokulasi diantaranya kantung merah telur, ruang anionic, membrane korioalantois dan ruang allantois (Ryu, 2017). Penelitian ini menggunakan ruang allantonis karena ruang ini berisi cairan alantonis yang mana terus diproduksi seiring perkembangan embrio (Diniatik dkk., 2011). Virus yang digunakan merupakan vaksin ND La Sota yang berisi vaksin aktif strain lentogenic (non virulen). Virus dicampur dengan antibiotic ampisilin dan juga streptomisin kemudian diinkubasi dengan suhu 37 °C dengan waktu 1 jam. Tabel 1 menunjukkan waktu kematian embrio tiap kelompok percobaan.

Tabel 1. Waktu kematian embrio tiap kelompok

Perlakuan	Percobaan	Waktu Inkubasi	
		24 jam	48 jam
Kelompok 1:	A	+	-
	B	+	-
	C	+	-
Kelompok 2 :	A	+	-
	B	+	-
	C	+	-
Kelompok 3 :	A	+	-
	B	+	-
	C	+	-
Kelompok 4:	K1	+	-
	K2	+	-
	K3	+	-

Embrio hidup (+) , Embrio mati (-)

Pada inkubasi hari kedua setelah inokulasi, embrio mati semua.

Persentase Kematian

Data persen kematian pada penelitian ini yaitu 100% (Tabel 2) karena embrio mati semua pada hari kedua. Ini bisa disebabkan oleh lamanya proses inokulasi sehingga telur tidak mendapatkan suhu yang semestinya, akhirnya embrio melemah dan rentan untuk mati. Selain faktor tersebut, kematian embrio juga bisa disebabkan oleh senyawa yang terlalu toksik, pelarut senyawa, atau juga bisa karena virus yang menginfeksi embrio. DMSO yang digunakan sebagai pelarut senyawa menyebabkan pertumbuhan diameter kepala dan tinggi badan pada embrio namun tidak menyebabkan kematian (Pratiwi *et al.*, 2020).













Tabel 2. Persen kematian

Perlakuan pada telur berumur 9-12 hari	Kematian embrio selama inkubasi		% kematian
	24 jam	48 jam	
Kelompok 1	3/3 hidup	3/3 mati	100 % mati
Kelompok 2	3/3 hidup	3/3 mati	100 % mati
Kelompok 3	3/3 hidup	3/3 mati	100 % mati
Kelompok 4	3/3 hidup	3/3 mati	100 % mati

Uji hemaglutinasi

Hemaglutinin virus mempunyai kemampuan berikatan secara spesifik dengan reseptor asam sialat yang terdapat pada membran plasma sel darah merah (SDM) ayam (Alexander, 2003). Hal inilah yang menjadi dasar dalam pengujian uji hemaglutinasi. Uji hemaglutinasi dilakukan dengan cara meneteskan larutan PBS 0,5 µg/mL pada mikroplat, kemudian ditambah cairan allantois 0,5 µg/mL dan diencerkan hingga lubang ke 12. Terakhir yaitu ditambah eritrosit ayam 0,5 µg/mL, ditunggu selama 15 menit agar reaksi hemaglutinasi berlangsung. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan eritrosit ditandai dengan titik merah pada tengah sumuran. Perhitungan hemaglutinasi atau endapan dimulai dari cairan paling pekat yaitu lubang pertama. Hasil didapatkan pada tabel 3 berikut.

Tabel 3. Hasil uji hemaglutinasi

Perlakuan	Rep	Sumuran ke-												Jumlah titer
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Kelompok 1 (1 µg/mL)	1													2 ¹²
	2													2 ¹²
	3													2 ¹²
Kelompok 2 (10 µg/mL)	1													2 ⁹
	2													2 ⁹
	3													2 ⁷
Kelompok 3 (100 µg/mL)	1													2 ⁵
	2													2 ⁶
	3													2 ⁰
Kelompok 4 kontrol	1													2 ¹²
	2													2 ¹²
	3													2 ¹²

Persentase Penghambatan

Perhitungan persentase penghambatan didapatkan sebagai berikut, pada kelompok kontrol menunjukkan hasil 0%, lalu pada kelompok 1 (1 µg/mL) adalah 0%, kelompok 2 (10 µg/mL) 92,3% dan kelompok 3 (100 µg/mL) adalah 99,6%. Data yang didapat menunjukkan hasil yang linear, peningkatan pemberian konsentrasi senyawa menyebabkan peningkatan persen penghambatan yang tinggi pula. Kelompok satu tidak ada penghambatan dikarenakan konsentrasi ya yang kecil. Hal ini berbanding terbalik dengan konsentrasi terbesar yang memiliki persentase penghambatan yang besar. Daya hambat senyawa ini dihitung dengan rumus:

$$P = \frac{(A-B)}{A} \times 100\%$$

Keterangan:

P = Persentase penghambat infeksi

A = Jumlah titer pada telur ayam berembrio tanpa perlakuan senyawa sintetis

B = Jumlah titer pada telur ayam berembrio dengan perlakuan senyawa sintetis

Tabel 4. Perhitungan titer virus

Kelompok Perlakuan	Titer Hemaglutinasi (HAU)			Rerata Titer HA (HAU)	% Pengham- batan
	TAB ke-				
	1	2	3		
1 (1 µg/mL)	2 ¹²	2 ¹²	2 ¹²	2 ¹²	0%
2 (10 µg/mL)	2 ⁹	2 ⁹	2 ⁷	2 ^{8,3}	92,3%
3 (100 µg/mL)	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁰	2 ^{3,7}	99,6%
4 (kontrol)	2 ¹²	2 ¹²	2 ¹²	2 ¹²	0%

KESIMPULAN

Hasil penelitian aktivitas antivirus Etil 4-(3,5-dimetilfenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat terlihat menunjukkan adanya aktivitas antivirus terhadap virus Newcastle yang baik pada konsentrasi 100 µg/mL, diikuti konsentrasi 10 µg/mL dan paling kecil persentase penghambatannya yaitu pada konsentrasi 1 µg/mL. Meskipun memiliki persen penghambatan yang baik, namun ketiga konsentrasi tersebut juga memiliki persentase kematian embrio yang tinggi sehingga mempunyai kemungkinan bahwa antivirus atau senyawa yang digunakan masih belum aman digunakan sebagai antivirus.

DAFTAR PUSTAKA

- Abo El-Yazeed W.S., Abou El-Reash Y.G., Elatwy L.A. and Ahmed A.I., 2020. Novel Bimetallic Ag-Fe MOF for Exceptional Cd and Cu Removal and 3,4-dihydropyrimidinone Synthesis, *Journal of The Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 114, 199–210. Terdapat di: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2020.09.028>.
- Alexander, D.J., 2003. Newcastle and Other Avian Paramixovirus and Pneumovirus Infection, Dalam Saif, Y. M., Barnes, H.J., Fadly, A.M., Glisson, J. R., McDaugld, L.R., and Swayne, D. E., eds. *Disease of Poultry 11th edition*, Blackwell Publishing Company, Iowa State University Press, P.63-85.
- Diniatik, Kusuma A.M., dan Purwaningrum O., 2011. Uji Aktivitas Antivirus Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruitz & Pav) Terhadap Virus Newcastle Disease (ND) Dan Profil Kromatografi Lapis Tipisnya, *Pharmacy*, 08 (01), 51–70.
- Huseynzada A.E., Jelsch C., Akhundzada H.N., Soudani S., Ben Nasr C., Doria F., Hasanova U.A. and Freccero M., 2020. Synthesis, Crystal Structure and Antibacterial Properties of 6-methyl-2-oxo-4-(quinolin-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate, *Journal of Molecular Structure*, 1219, 128581. Terdapat di: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128581>.
- Kappe C.O., 2003. The Generation of Dihydropyrimidine Libraries Utilizing Biginelli Multicomponent

Chemistry, *QSAR and Combinatorial Science*, 22 (6), 630–645.

Lodish, H., Arnold, B., Chris, A.K., Monty, K., Anthony, B., Hidde, P., Angelika, A. and Kelsey, C.M., 2016. *Molecular Cell Biology 8th ed*, W. H. Freeman and Company, New York.

Nagarajaiah, H., Arindam, M. and Jarugu, N.M., 2016. Biginelli reaction: an overview, *Tetrahedron Letters*, 57 (47), 5135-5149.

Pratiwi, H., Wardana, A.W., Oktavianie, A.P.D.A., Haryo, A., Fauziah, N.D., Abqariyyan, R.P., Aditia, R. and Afra, S., 2020. The effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on the development of 10-days chicken embryo based on body length and head diameter, *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 30 (3), 220-222.

Ryu, W. S., 2017. Diagnosis and Methods, *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*, 47-62.

Suprobowati, O.D. dan Kurniati, I., 2018. *Bahan Ajar Teknologi Laboratorium Medik (TLM): Virologi*, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.