

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI AWAL SENYAWA INHIBITOR RNA HELIKASE VIRUS HEPATITIS C DARI EKSTRAK BUAH MANGROVE *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh

*Isolation and Preliminary Identification of RNA Helicase Inhibitor for Hepatitis C Virus from Extract of Mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh*

A. Zaenal Mustopa^{1*}, Melki², Ika Sari Kusumawati³

¹Pusat Penelitian Bioteknologi-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia

²Program studi Ilmu Kelautan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya

³Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila

Diterima 7 Juni 2012/Disetujui 4 September 2012

Abstract

Hepatitis C virus is the cause of hepatitis C disease which has high virulence. Recent therapy using combination of ribavirin and alpha interferon has short efficiency (< 80%). Thus, the discovery of new drug is needed. Antiviral drugs can be discovered through molecular target therapy by finding the inhibitor of RNA helicase that play role in viral replication. Inhibitor can be derived from chemical compound produced by mangrove. The aim of this research was to isolate the active compound groups from fruit of *Avicennia marina* (Forsk) which had inhibitory activity against RNA helicase. Inhibitory activity was measured by releasing of phosphate inorganic in colorimetric ATPase assay. Crude extract was fractionated using gel filtration chromatography with methanol in chloroform solvent. The result showed that fraction 2 has the highest inhibitory activity i.e. 81.78%. Phytochemical test of crude extract indicated positive result for flavonoids, alkaloids, steroid dan triterpenoid, tannin and saponins. Moreover, high performance liquid chromatography (HPLC) analysis showed absorption peak with the high abundance at the retention time of 7.250; 18.983 and 20.050 minute at 216 nm, 247 nm and 263 nm, respectively. According to the results of phytochemical, TLC, and HPLC analyses, inhibitor compound from fruit of *A. marina* (Forsk) was suggested it belongs to flavonoids.

Key words: *Avicennia marina*, flavonoid, hepatitis C virus, RNA helicase

Abstrak

Virus hepatitis C merupakan penyebab penyakit hepatitis C yang mempunyai tingkat virulensi yang tinggi. Pengobatan menggunakan kombinasi ribavirin dan interferon alfa mempunyai efektivitas yang rendah (< 80%). Penemuan obat yang berperan sebagai antivirus dapat dilakukan melalui terapi target molekuler dengan mencari inhibitor RNA helikase yang berperan dalam replikasi virus. Penelitian ini bertujuan mengisolasi golongan bahan bioaktif dari tanaman mangrove jenis *Avicennia marina* (Forsk) Vierh yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap RNA helikase virus hepatitis C. Aktivitas penghambatan dihitung berdasarkan pelepasan fosfat anorganik bebas dengan pengujian secara kolorimetri ATPase. Golongan bahan aktif yang diisolasi difraksinasi menggunakan kromatografi gel filtrasi dengan pelarut metanol dalam kloroform. Fraksi 2 merupakan fraksi yang mempunyai aktivitas inhibisi tertinggi sebesar 82,78%. Uji fitokimia terhadap ekstrak kasar menunjukkan positif pada flavonoid, alkaloid, steroid dan triterpenoid, tanin, dan saponin. Kromatogram kromatografi cair kinerja tinggi menunjukkan serapan puncak dengan kelimpahan tertinggi pada waktu retensi 7,250; 18,983 dan 20,050 menit pada 216 nm, 247 nm dan 263 nm. Hasil analisis dengan uji fitokimia, kromatografi lapis tipis, dan serapan panjang gelombang puncak pada kromatografi cair kinerja tinggi menunjukkan bahwa diperkirakan bahan aktif yang berperan sebagai inhibitor dalam fraksi tersebut merupakan senyawa golongan flavonoid.

Kata kunci: *Avicennia marina*, flavonoid, RNA Helikase, virus hepatitis C

*Korespondensi: Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong,
16911, Telp. +6281310611768
e-mail: azmustopa@yahoo.com

PENDAHULUAN

Virus Hepatitis C (HCV) menginfeksi hampir 170 juta orang di seluruh dunia (Yazdani *et al.* 2012). Virus ini menyebabkan penyakit hepatitis C yaitu peradangan pada hati yang mengakibatkan sirosis hati (Lauer dan Walker 2001). Data Kementerian Kesehatan Republik Indonesia menunjukkan pada tahun 2010 jumlah penderita hepatitis C di Indonesia cukup tinggi yaitu sebesar 30 juta jiwa orang (DEPKES 2010).

Jumlah penderita yang sangat tinggi dikarenakan penyebaran virus yang sangat cepat. Virus dapat menghasilkan sekitar 1 milyar virion (partikel virus baru) tiap jamnya pada tubuh penderita (Baginski *et al.* 2000; Sy dan Jamal 2006). Virus Hepatitis C dapat menyebar melalui penggunaan jarum suntik, transfusi darah, hubungan seksual, dan hemodialisis (Sy dan Jamal 2006). Virus ini mengalami perkembangan secara klinis selama 7 hingga 8 minggu setelah paparan virus tersebut, namun biasanya penderita tidak menunjukkan tanda-tanda adanya gejala atau hanya gejala ringan. Gejala tersebut timbul setelah menjadi kronis dan dalam waktu interval yang sangat lama. Infeksi virus hepatitis C sangat sulit untuk dideteksi. Interval antara infeksi hingga fase kronis yang menimbulkan fibrosis dan sirosis dapat meningkat setelah tiga puluh tahun.

Hepatitis C adalah penyakit yang sulit untuk disembuhkan karena belum ada obat maupun vaksin yang spesifik. Terapi pengobatan hepatitis C pada umumnya dengan pemberian interferon alfa (PEG-IFN α) yang dikombinasikan dengan ribavirin yang diberikan selama 12-72 minggu, namun terapi ini hanya berhasil pada penderita yang terinfeksi hepatitis C dengan genotip tertentu saja. Genotip satu dan empat pada pasien yang terinfeksi hepatitis C dapat menghambat pertumbuhan virus baru sebesar 50%-80%, sedangkan pada pasien yang terinfeksi HCV genotipe dua dan tiga dapat menghambat pertumbuhan virus kurang dari 80%. Terapi ini juga menimbulkan efek samping seperti depresi, anemia, dan mual (Moradpour

et al. 2007) sehingga diperlukan pencarian obat baru untuk terapi penyakit hepatitis C.

Beberapa upaya pencarian obat terhadap hepatitis C telah dilakukan, salah satunya melalui terapi target molekuler. Terapi target molekuler dikembangkan dengan pencarian inhibitor enzim yang berperan dalam replikasi HCV. Enzim yang berperan dalam replikasi HCV adalah serin protease, RNA polimerase, dan RNA helikase.

Inhibitor enzim RNA helikase HCV dapat diperoleh dari hasil metabolit sekunder dari tumbuhan yang dihasilkan secara alami, misalnya dari mangrove. Mangrove merupakan suatu komunitas vegetasi pantai wilayah tropis yang didominasi oleh beberapa spesies pohon yang khas atau semak-semak yang mampu tumbuh di perairan asin (Miles *et al.* 1999). Mangrove memiliki berbagai macam manfaat bagi kehidupan manusia diantaranya dapat digunakan sebagai obat-obatan (Sharaf *et al.* 2000; Zandi *et al.* 2009). Senyawa-senyawa bioaktif tumbuhan mangrove yang telah ditemukan meliputi jenis *Acanthus ilicifolius* ditemukan pada ekstrak daun mengandung senyawa mirisil alkohol, stigmasterol dan stigmasterol- β -D-glukopiranosid dan ekstrak akar mengandung oktakosil alkohol, benzoksazolin-2-one, stigmasterol- β -D-glukopiranosid, saponin, dan flavonoid (Nursal *et al.* 1998).

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh golongan bahan bioaktif yang berpotensi dalam menghambat RNA helikase virus hepatitis C dari ekstrak buah tanaman mangrove. Hasil penelitian sebelumnya telah dilakukan skrining terhadap tujuh jenis tanaman mangrove di laboratorium virologi molekuler-LIPI. *Avicenna marina* merupakan salah satu dari tujuh jenis tanaman mangrove yang memiliki potensi dalam menghambat RNA helikase virus hepatitis C.

MATERIAL DAN METODE

Bahan dan Alat

Organ tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah yang sudah masak dari tanaman mangrove jenis *A. marina* yang

diambil dari komunitas hutan mangrove Desa Teluk Payo, Kabupaten Banyuasin, Provinsi Sumatera Selatan.

Metode Penelitian

Penyediaan sampel

Buah tanaman mangrove jenis *A. marina* yang sudah masak diambil, kemudian dibersihkan dari kotoran menggunakan akuades dan dikeringkan. Proses pengeringan dilakukan pada oven dengan suhu 60 °C selama 3-7 hari, selanjutnya dijadikan serbuk halus dan disaring.

Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan berdasarkan metode Manilal *et al.* (2009) secara maserasi. Sampel mangrove yang telah ditimbang sebanyak 100 g dimaserasi selama 3 x 24 jam dengan metanol 80%. Hasil maserasi kemudian disaring dengan kertas saring, selanjutnya filtrat yang didapat dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40 °C sehingga diperoleh ekstrak metanol dari buah *A. marina*.

Ekspresi dan Purifikasi RNA Helikase

Virus Hepatitis C

Ekspresi dan pemurnian RNA helicase berdasarkan metode Utama *et al.* 2000. Ekspresi helicase di *E. coli* BL21(DE3) pLysS akan diinduksi dengan isopropil β -D-thiogalaktopiranosidase (IPTG). Helikase dipurifikasi dengan kromatografi afinitas (TALON resin, Novagen) dan dianalisis kemurniannya dengan SDS-PAGE.

Isolasi dan purifikasi protein RNA helicase HCV dimulai dengan menumbuhkan HCV pada medium LB cair yang mengandung ampicilin 100 μ g/mL, kemudian diinkubasi semalam pada kecepatan 200 rpm dan suhu 37 °C. Kultur HCV sebanyak 10 mL ditransfer pada 400 mL medium LB cair selanjutnya diinkubasi sampai didapatkan OD 0,3 pada panjang gelombang 620 nm. Setelah tercapai OD yang diinginkan selanjutnya diinduksi dengan IPTG dan diinkubasikan lagi sampai OD 1 pada panjang gelombang yang sama. Kultur tersebut selanjutnya disentrifugasi 3500

rpm, 10 menit. Pelet yang didapat ditambahkan bufer B (10 mM Tris HCl pH 8,5; 100 mM NaCl; 0,25% Tween 20) selanjutnya dilakukan pemecahan sel menggunakan metode freeze dengan suhu -20 °C dan *thawing* dengan suhu ruang, selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm, dengan waktu 30 menit dan dikoleksi supernatannya.

Purifikasi protein RNA helicase dengan kromatografi afinitas (TALON resin, Novagen). Resin diresuspensi dengan *cell lysate*, diagitasi pada 4 °C selama 3 jam lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 5 menit, kemudian dicuci dengan bufer B sebanyak 3 kali dan dielusi dengan bufer elusi (400 mM imidazol dalam bufer B) kemudian diinkubasi menggunakan rotator dalam ruangan pendingin (4 °C) selama satu malam. Sampel disentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 3000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang didapat adalah enzim RNA helicase HCV.

Uji ATPase

Uji ATPase dilakukan dengan mengukur konsentrasi fosfat yang terurai dari adenosin trifosfat (ATP) menjadi ADP dan fosfat (P) yang dihasilkan dari reaksi enzim RNA helicase dengan ATP. Uji ATPase dilakukan sebagai berikut: 50 μ L/sumur campuran reaksi yang terdiri atas 10 mM bufer asam morfolinopropana sulfonat (MOPS) (pH 6,5), 2 mM ATP, 1 mM MgCl₂, dan enzim RNA helicase diinkubasi dalam 96 well microtiter plate pada suhu ruangan selama 30 menit, kemudian dilakukan pewarnaan dengan penambahan 100 μ L/sumur larutan pewarna (H₂O : *malachite green* 0,081% : amonium molibdate 5,7% dalam HCl 6 M : polivinylalkohol 2,3% = 2:2:1:1, v/v) dan diinkubasi selama 5 menit. Reaksi pewarnaan dihentikan dengan penambahan 25 μ L/sumur sodium sitrat 30% kemudian diukur absorbansinya pada absorban 620 nm dengan referensi 405 nm (Utama *et al.* 2000).

Uji fitokimia

Uji fitokimia dilakukan terhadap ekstrak

simplicia berdasarkan “*Phytochemical screening*” Farnsworth (1966) berupa pemeriksaan golongan alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, triterponoid, tanin, kuinon, minyak atsiri dan kumarin.

Uji flavonoid dan Senyawa fenolik

Sebanyak 2 g bahan ditambahkan 100 mL air panas dan dididihkan selama 5 menit kemudian disaring. Sebanyak 5 mL filtrat ditambahkan serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, selanjutnya ditambah 5 mL amil alkohol dan dikocok hingga kuat. Warna yang terbentuk dalam amil alkohol menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

Uji alkaloid

Sebanyak 2 g bahan dilembabkan dengan ammonia 30%, digerus dan ditambahkan 20 ml kloroform kemudian disaring. Filtrat (larutan A) diekstraksi dengan 10 mL HCl 1:10 dan dikocok dalam tabung atasnya (larutan B). Larutan A diteteskan pada kertas saring dan disemprot dengan pereaksi Dragendorff, Meyer, dan Wagner. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan merah oleh pereaksi Dragendorff, endapan putih oleh pereaksi Meyer, dan endapan coklat oleh pereaksi Wagner.

Uji tanin

Sebanyak 2 g serbuk bahan ditambah 100 mL akuades kemudian dididihkan selama 15 menit. Setelah dingin, campuran disaring dan filtratnya ditambah FeCl_3 1% (b/v). Warna biru tua atau hitam menunjukkan adanya tanin.

Uji Saponin

Ekstrak sampel sebanyak 0,1 g ditambah air secukupnya dan dipanaskan selama 5 menit. Larutan tersebut didinginkan kemudian dikocok. Timbulnya busa selama \pm 10 menit menunjukkan adanya saponin.

Uji Triterpenoid

Ekstrak sampel sebanyak 1 g dimaserasi dengan 20 mL eter selama 2 jam kemudian disaring dan diambil filtratnya. Filtrat

sebanyak 5 mL diuapkan hingga diperoleh residu. Residu kemudian ditambahkan dengan pereaksi Liebermann-Burchard (3 tetes asam asetat anhidrida dan 1 tetes H_2SO_4 pekat). Warna merah atau ungu menunjukkan adanya triterpenoid dan warna hijau menunjukkan adanya triterpenoid.

Pemurnian Bahan Aktif dari Mangrove *A. marina* sebagai Inhibitor RNA Helikase HCV

Silika gel dimasukkan secara perlahan ke dalam kolom kromatografi. Ekstrak kasar mangrove *A. marina* sebanyak 5% dari volume kolom dimasukkan ke kolom gel filtrasi dengan fase diam silika gel (0,063 mm-0,200 mm). Sampel dielus dengan eluen kloroform-metanol dengan perbandingan 6:4, dengan laju alir 1 mL/menit tiap fraksi. Masing-masing fraksi hasil pemisahan diuji aktivitas penghambatannya terhadap RNA helikase virus hepatitis C dengan uji ATPase. Fraksi yang mempunyai aktivitas penghambatan tertinggi dilihat profilnya dengan kromatografi lapis tipis (KLT).

Kromatografi Lapis Tipis

Purifikasi senyawa bahan aktif sampel mangrove untuk melihat metabolit sekunder dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT). KLT dilakukan pada plat silika gel (Merck) pada eluen kloroform dan metanol dengan perbandingan 60:40, 40:60, 50:50, 30:70, 20:80 dan 10:90 (Manilal *et al.* 2009). Penampak noda yang digunakan adalah pereaksi serum sulfat.

Identifikasi Fraksi Teraktif dengan KCKT

Identifikasi lebih lanjut dilakukan terhadap fraksi yang paling aktif dari hasil KLT preparatif menggunakan KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi). Instrumen yang digunakan adalah KCKT KNAUER menggunakan kolom 4,6 x 150 mm Eurospher 100-5C-18 diameter 5 μm . Fase gerak menggunakan metanol (A) : air (B) dengan berbagai perbandingan. Perbandingan yang digunakan adalah 0% A pada 0 menit,

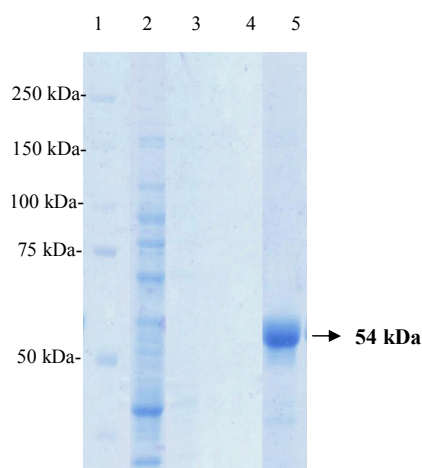
100% A pada 22 menit, 100% A pada 30 menit, 0% A pada 33 menit, dan 0% A pada 40 menit. Volume yang diinjeksikan sebanyak 20 μ L dan laju alir sebesar 1 mL/menit. Detektor yang digunakan adalah photo diode array (PDA) panjang gelombang 254 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Eksresi dan Pemurnian RNA Helikase Virus Hepatitis C

Eksresi dan pemurnian RNA helikase HCV dilakukan untuk memperoleh RNA helikase HCV murni yang dapat digunakan sebagai target dalam menentukan aktivitas inhibisi ekstrak buah mangrove *A. marina* terhadap aktivitas ATPase. Eksresi RNA helikase HCV dilakukan pada bakteri *E. coli* BL21 (DE3) pLysS dalam plasmid pET 21b.

Enzim diisolasi dengan pemecahan sel terlebih dahulu. Pemecahan sel berlangsung secara mekanik, yaitu dengan cara pengeringbekuan (*freeze thawing*) dan sonikasi. Pada saat sonikasi ditambahkan bufer B yang mengandung 10 mM Tris HCl pH 8,5; 100 mM NaCl, dan 0,25% Tween 20. Hasil sonikasi selanjutnya disentrifugasi dan diambil supernatannya. Pemurnian menggunakan kromatografi afinitas metal amobilisasi. Metode pemurnian ini menggunakan resin TALON afinitas logam (*metal affinity*)



Gambar 1 Elektroforegram SDS-PAGE RNA helikase virus hepatitis C (1: marker, 2: inner volume; 3: washing 1; 4: washing 2; 5: enzim).

yang secara spesifik dapat mengikat RNA helikase yang terlabel dengan 6xHis-Tag pada N terminalnya. RNA helikase yang telah diikat oleh resin TALON dipisahkan dengan metabolit intraseluler lainnya melalui sentrifugasi. Bufer elusi (imidazola dalam bufer B) ditambahkan untuk menghilangkan protein selain enzim RNA helikase. Imidazola yang terdapat dalam bufer elusi dapat memutuskan ikatan antara RNA helikase dengan resin TALON afinitas logam. Sentrifugasi pada kecepatan 5000 g selama 1 menit digunakan untuk memisahkan imidazola dengan enzim yang telah murni. Setiap hasil sentrifugasi pada tahap pemurnian enzim dikoleksi untuk dianalisis dengan metode SDS-PAGE. Analisis ini bertujuan mengetahui kemurnian enzim. Elektroforegram SDS-PAGE (Gambar 1) menunjukkan lajur 1 berupa marker yang digunakan. Lajur 2 adalah supernatan hasil sentrifugasi yang terdapat banyak pita protein yang belum dimurnikan. Lajur 3 dan 4 merupakan supernatan hasil pencucian. Pada lajur W1 dan W2 tidak terdapat pita protein karena supernatan hanya berisi bufer B. Enzim RNA helikase berhasil diisolasi yang ditunjukkan dengan hasil SDS-PAGE pada lajur 5 berupa pita protein (E) dengan bobot molekul 54 kDa (Gambar 5). Ukuran pita protein tersebut hasilnya sama dengan yang dilaporkan oleh Utama *et al.* (2000).

Uji Fitokimia

Analisis kualitatif ini bertujuan mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak metanol 80% buah mangrove *A. marina*. Kandungan metabolit sekunder yang dianalisis dalam ekstrak kasar mangrove antara lain alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, kumarin, triterpenoid, dan steroid. Uji fitokimia pada ekstrak buah mangrove *A. marina* menunjukkan hasil positif terdapat flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, steroid dan triterpenoid (Tabel 1). Hal ini sesuai dengan Stobiecki dan Kachlicki (2006) bahwa flavonoid akan larut dalam pelarut polar, seperti metanol dan air. Hasil

Tabel 1 Hasil uji fitokimia ekstrak buah mangrove *A. marina*

Golongan Senyawa	Ekstrak 80% metanol
Alkaloid	+
Flavonoid	+
Tanin	+
Saponin	+
Kumarin	-
Steroid dan triterpenoid	+
Kuinon	-
Minyak Atsiri	-

Keterangan: (-) reaksi negatif; (+) reaksi positif

negatif ditunjukkan terhadap kumarin, kuinon, dan minyak atsiri. Kumarin, kuinon, dan minyak atsiri diduga tidak terekstrak dalam pelarut polar seperti metanol 80%.

Aktivitas Penghambatan Terhadap RNA Helikase HCV

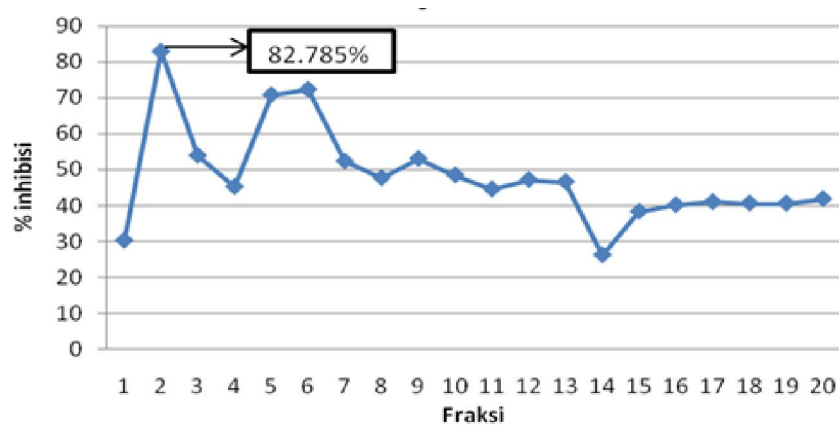
Ekstrak kasar yang diperoleh merupakan kumpulan dari berbagai senyawa yang terekstrak dalam metanol 80%, oleh karena itu, perlu dimurnikan untuk mendapatkan senyawa kimia yang berperan sebagai inhibitor. Pemurnian ekstrak kasar menggunakan teknik kromatografi, yaitu kromatografi gel filtrasi dan kromatografi lapis tipis. Ekstrak kasar terlebih dahulu difraksinasi dengan kromatografi kolom gel filtrasi. Fraksinasi ini menghasilkan 20 fraksi yang ditampung

masing-masing sebanyak 1 mL. Kromatografi gel filtrasi merupakan teknik umum yang digunakan untuk memisahkan senyawa berdasarkan ukuran partikel dan polaritas analit. Ukuran analit yang cocok akan terperangkap dalam pori gel (fase diam) dan terelusi oleh fase gerak yang digunakan. Pemisahan ini menggunakan silika gel sebagai fase diamnya. Fase gerak yang digunakan merupakan campuran kloroform-metanol dengan perbandingan 60:40.

Penentuan aktivitas penghambatan RNA helikase HCV menggunakan uji kolorimetri ATPase. Hasil uji terhadap 20 fraksi hasil kromatografi gel filtrasi menunjukkan bahwa fraksi 2 mempunyai aktivitas penghambatan tinggi sebesar 82,785% (Gambar 2). Pengujian tersebut menggunakan kontrol negatif (metanol 80%). Kontrol negatif ini diuji untuk mengetahui pengaruh dari pelarut yang digunakan terhadap penghambatan enzim. Pengujian ini tidak menggunakan kontrol positif dikarenakan belum ditemukannya obat atau vaksin yang sesuai untuk infeksi virus hepatitis C.

Profil Kimiawi Fraksi Teraktif sebagai Inhibitor RNA Helikase HCV

Hasil uji ATPase tiap fraksi yang memiliki aktivitas penghambatan tinggi dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk melihat pemisahan senyawanya. Hasil percobaan menunjukkan bahwa fraksi 2 hasil



Gambar 2 Aktivitas penghambatan fraksi kromatografi gel filtrasi terhadap RNA helikase HCV.

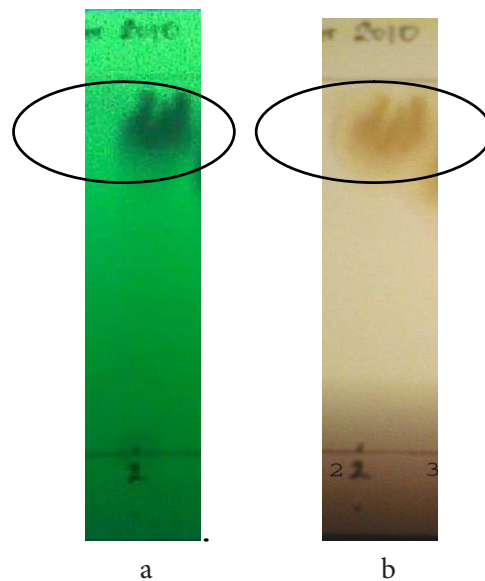
kromatografi gel filtrasi memiliki aktivitas penghambatan tertinggi. Kromatogram KLT terlihat bahwa fraksi 2 mempunyai 1 noda pemisahan dengan nilai Rf sebesar 0,83 (Gambar 3).

Pemurnian lanjutan dengan KLT preparatif dilakukan terhadap fraksi 2 karena fraksi inilah yang mempunyai aktivitas penghambatan tertinggi terhadap RNA helikase HCV. Eluen yang digunakan adalah kloroform : metanol (6:2). Fase gerak ini dipilih karena kemampuan metanol dalam meningkatkan polaritas kloroform (Stoddard *et al.* 2007). Noda yang terbentuk kemudian dikerok dan dilarutkan dengan metanol 80%. Pemisahan senyawa yang terikat dengan silika gel dilakukan dengan teknik sentrifugasi.

Kromatogram dideteksi pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm. Pada panjang gelombang ini, plat silika gel akan berpendar dan analit akan terlihat sebagai noda berwarna hitam. Hasil deteksi dengan sinar UV menunjukkan noda pemisahan yang sama dengan hasil penyemprotan lempeng silika gel dengan serum sulfat.

Hasil Analisis dengan KCKT

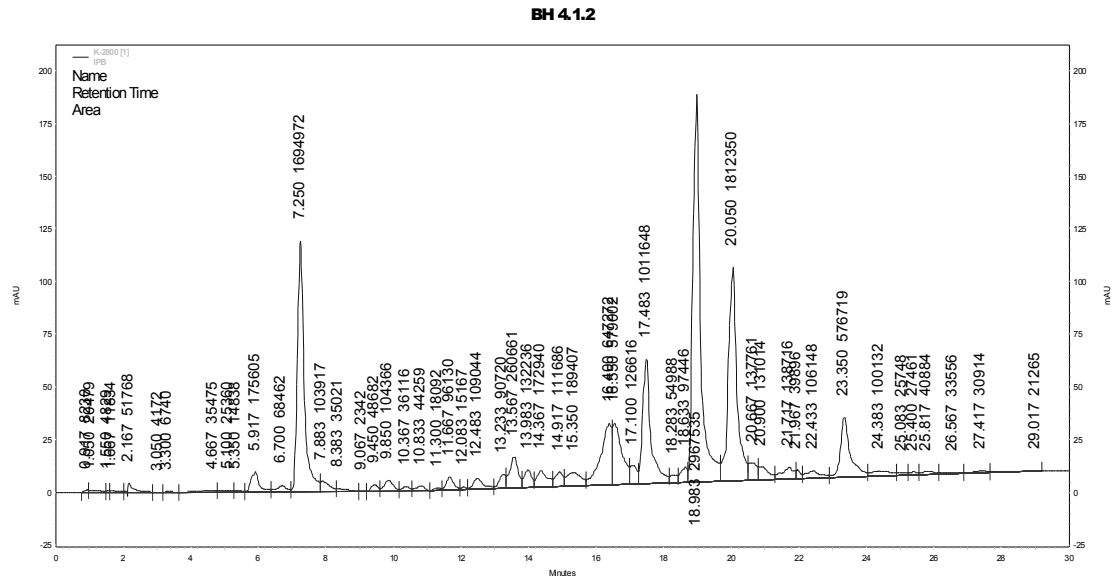
Analisis kualitatif senyawa terhadap fraksi 2 menggunakan KCKT. Kromatogram KCKT berupa puncak-puncak yang memiliki serapan pada panjang gelombang tertentu. Kromatogram fraksi 2 menunjukkan tiga puncak yang memiliki kelimpahan tertinggi pada waktu retensi (Rt, retention time) menit 7,250; 18,983 dan 20,050. (Gambar 4). Tiga puncak terpilih pada fraksi 2 selanjutnya dianalisis dengan detektor PDA untuk mengetahui serapan panjang gelombangnya. Fraksi 2 untuk puncak dengan Rt 7,250 menit mempunyai serapan pada panjang gelombang 216 nm, Rt 18,983 serapannya 246 nm sedangkan pada Rt 20,050 serapannya adalah 263 nm. Berdasarkan Harborne (1987), ketiga serapan puncak tersebut merupakan golongan senyawa flavonoid. Hasil KLT yang memperlihatkan adanya noda yang terdeteksi pada panjang gelombang



Gambar 3 Kromatogram KLT fraksi 2; (a) hasil deteksi spot pada sinar UV 254. (b) hasil deteksi spot dengan penampak noda.

254 juga mengindikasikan bahwa senyawa yang berhasil diisolasi merupakan golongan flavonoid. Analisis dengan KCKT juga sesuai dengan penapisan awal fitokimia yang menunjukkan hasil positif terhadap flavonoid.

Hasil analisis dengan uji fitokimia, KLT, dan KCKT menunjukkan bahwa golongan senyawa yang diperkirakan sebagai inhibitor RNA helikase HCV adalah flavonoid. Flavonoid telah banyak diteliti sebagai agen antivirus terhadap virus herpes, HIV, virus parainfluenza, dan adenovirus (Tapas *et al.* 2008). Flavonoid menghambat siklus hidup virus pada waktu replikasi. Mekanisme penghambatan dari flavonoid yang melibatkan enzim replikasi virus diperkirakan melalui interaksi flavonoid dengan kofaktor enzim. Enzim replikasi, misalnya RNA helikase yang aktivitasnya bergantung pada ATP, sangat membutuhkan kofaktor (Mg^{2+}) untuk membantu interaksinya dengan substrat. Apabila keberadaan dari kofaktor tersebut digantikan oleh flavonoid maka aktivitas enzim replikasi akan terhambat (Narayana *et al.* 2001).



Gambar 4 Hasil kromatografi cair kinerja tinggi pada fraksi 2.

KESIMPULAN

Hasil penapisan fitokimia terhadap ekstrak buah mangrove *A. marina* menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid, alkaloid, steroid dan triterpenoid, tanin dan saponin. Fraksinasi menggunakan kromatografi gel filtrasi dengan pelarut metanol dalam kloroform menunjukkan bahwa fraksi 2 mempunyai aktivitas inhibisi tertinggi sebesar 82,785%. Identifikasi bahan bioaktif yang berperan sebagai inhibitor dalam fraksi tersebut merupakan senyawa golongan flavonoid.

DAFTAR PUSTAKA

- Baginski SG, Pevear DC, Seipel M, Sun SCC, Benetatos CA, Chunduru SK, Rice CM, Collett MS. 2000. Mechanism of action of Pest virus antiviral compound. *PNAS* 97: 14.
- [DEPKES] Departemen Kesehatan. 2010. Masyarakat Dunia Peringati Hari Hepatitis. <http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/1156-masyarakat-dunia-peringati-hari-hepatitis.html>.
- Farnsworth NR. 1966. Biological and phytochemical screening of plant. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 55(3): 225-76.
- Harborne JB. 2006. *Metode Fitokimia:*

Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan. Ed ke-2. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah; Mansoor S, editor. Bandung: Penerbit ITB Bandung. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*

- Lauer GM, Walker BD. 2001. Review article: hepatitis c virus infection. *The New England Journal of Medicine* 1: 41-50.
- Manilal A, Sujith S, Seghal K. 2009. Biopotensial of mangroves collected from the Southwest Coast of India. *Journal Biotechnology and Biochemistry* 4(1): 59-65.
- Miles DH, Kokpol U, Chittawong V, Tip-Pyang S, Tunsuwan K, Nguyen C. 1999. Mangrove forest: The importance of conservation as a bioresource for ecosystem diversity and utilization as a source of chemical constituents with potential medicinal and agricultural value. *IUPAC* 70(11): 1-9.
- Moradpour D, Penin F, Rice CM. 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology* 5: 453-463.
- Narayana KR, Sripal R, Chaluvadi, Khrisna. 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effect and therapeutical potentials. *Indian Journal Pharmacology* 33: 2-16.
- Nursal M, Sutisna, Ngarno NR. 1998. Pengaruh

- Ekstrak Mangrove *Acanthus ilicifolius* terhadap Pertumbuhan Bakteri *Vibrio* sp. Prosiding Seminar Nasional VI Ekosistem Mangrove, Pekanbaru, 15-18 Sept 1998. 14 hlm.
- Sharaf M, El-Ansari MA, Saleh NAM. 2000. New flavonoids from *Avicennia marina*. *Fitoterapia* 71: 274-277.
- Stobiecki M, Kachlicki P. 2006. *The Science of Flavonoids*. Erich Grotewold, editor. New York: Springer Science.
- Stoddard JM, Nguyen L, Mata-Chavez H, Nguyen K. 2007. TLC plates as a convenient platform for solvent-free reactions. *Chemical Communication* 12: 1240-1241
- SyT, Jamal MM. 2006. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *International Journal of Medical Sciences* 3: 41-46.
- Tapas AR, Darkarrar DM, Kakde RB. 2008. Flavonoids as nutraceuticals. *Tropical Journal Pharmaceutical* 7: 1089-1099.
- Utama A, Shimizu H, Morikawab S, Hasebe F, Morita K, Igarashi A, Hatsu M, Takamizawa K, Miyamura T. 2000. Identification and characterization of the RNA helicase activity of Japanese encephalitis virus NS3 protein. *FEBS Letters* 456: 74-78.
- Yazdani MR, Kassaian N, Ataei B, Nokhodian Z, Adibi P. 2012. Hepatitis C virus infection in patients with hemophilia in Isfahan, Iran. *International Journal of Preventive Medicine Special issue*: S89-93
- Zandi K, Taherzadeh M, Yaghoubi R, Tajbakhsh S, Rastian Z, Fouladvand M, Sartavi K. 2009. Antiviral activity of *Avicennia marina* against herpes simplex virus type 1 and vaccine strain of poliovirus (an in vitro study). *Journal of Medicinal Plants Research* 3(10): 771-775.