

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

Arham Augusto, Azis Saifudin, dan Ahmad Fauzi

Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah
Surakarta

Abstrak

Penemuan jenis virus jauh melampaui ditemukannya agen antivirus yang efektif. Tingkat perkembangan ini didasari oleh kecepatan mutasi virus yang tinggi. Beberapa tahun terakhir terjadi lonjakan munculnya jenis virus baru, terutama pada COVID-19. Penemuan senyawa penuntun merupakan tahap yang penting dalam pengembangan agen antivirus. Senyawa pirimidin dan turunannya diketahui mempunyai berbagai aktivitas farmakologi seperti antikanker, antijamur, antibakteri, serta antivirus. Senyawa etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat merupakan contoh senyawa turunan pirimidin. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antivirus dari senyawa etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat dengan menggunakan *Newcastle disease* sebagai modelnya. Telur ayam berembrio usia 9-11 hari digunakan sebagai media pertumbuhan virus *Newcastle disease*. Penelitian aktivitas antivirus menggunakan metode uji hemaglutinasi, didukung dengan kemampuan virus dalam mengaglutinasi eritrosit. Hasil penelitian dalam bentuk persentase penghambatan, diperoleh persentase penghambatan pada konsentrasi 1 µg/mL sebesar 0%, konsentrasi 10 µg/mL sebesar 0%, dan konsentrasi 100 µg/mL sebesar 0%. Berdasarkan persentase penghambatan yang diperoleh maka menunjukkan bahwa senyawa etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat tidak memiliki aktivitas antivirus terhadap *Newcastle disease*.

Kata Kunci: tetrahidropirimidin, antivirus, *newcastle disease*, hemaglutinasi.

Abstract

The identification of virus types extends far beyond the identification of efficient antiviral drugs. This rate of growth was caused by the high rate of virus mutation. In the last few years, there has been a surge in the emergence of new types of viruses, especially COVID-19. The discovery of lead compounds is an important stage in the development of antiviral agents. Pyrimidine compounds and their derivatives are known to have various pharmacological activities, such as anticancer, antifungal, antibacterial, and antiviral. The ethyl 4-(4-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate compounds is an example of a pyrimidine derivative. This study aims to examine the antiviral activity of the ethyl 4-(4-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate compound using *Newcastle disease* as a model. Embionated chicken eggs aged 9-11 days are used as growth media for the *Newcastle disease* virus. Study on antiviral activity used

the hemagglutination test method, supported by the ability of the virus to agglutinate erythrocytes. The results of the study in the form of inhibition percentage, obtained the percentage of inhibition at concentration of 1 µg/mL was 0%, a concentration of 10 µg/mL was 0%, and a concentration of 100 µg/mL was 0%. Based on the percentage of inhibition obtained, it shows that the ethyl 4-(4-methoxyphenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate compound does not have antiviral activity against *Newcastle disease*.

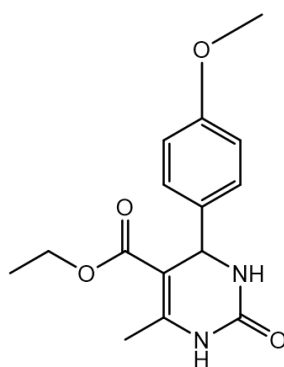
Keywords: tetrahydropyrimidine, antiviral, *newcastle disease*, hemagglutination.

1. PENDAHULUAN

Virus dapat dikatakan sebagai susunan molekul kompleks yang tersusun oleh asam nukleat serta cangkang protein yang menyelubunginya. Virus merupakan agen infeksius yang hanya bisa berkembang di dalam sel yang hidup. Penemuan jenis virus semakin bervariasi seiring berjalannya waktu. Meningkatnya jumlah variasi virus ini berpotensi menyebabkan berbagai penyakit baru. Tingkat perkembangan virus ini dipengaruhi oleh kecepatan mutasi virus yang tinggi (Ryu, 2017). Ada lebih dari 240 spesies virus yang menginfeksi manusia. Dan, secara alami sekitar 80% dari virus yang menginfeksi manusia berada pada hewan (Parvez and Parveen, 2017). Mengatasi infeksi virus merupakan tugas yang sulit walaupun dengan perkembangan yang signifikan dalam penemuan obat antivirus (Li and Clercq, 2021). Pada kasus pandemi COVID-19 menunjukkan bahwa kurangnya senyawa antivirus yang dapat dengan cepat digunakan dan dimanfaatkan untuk mengatasi kemunculan penyakit yang disebabkan oleh virus (Adamson et al., 2021). Penelitian mengenai senyawa penuntun merupakan tahapan yang penting untuk pengembangan senyawa dengan aktivitas biologis yang optimum. Senyawa penuntun adalah senyawa yang diketahui memiliki aktivitas biologis dengan potensi untuk dikembangkan. Pengembangan senyawa penuntun dilakukan melalui modifikasi tertentu yang bertujuan menjaga komponen senyawa spesifik yang menunjukkan aktivitas biologis dan mengatasi kelemahan dari senyawa penuntun tersebut (Hughes et al., 2011).

Senyawa pirimidin dan turunannya diketahui memiliki berbagai macam aktivitas biologis. Beberapa aktivitas biologis yang dimiliki oleh turunan pirimidin yaitu antikanker (Taglieri et al., 2019), antifungi, antibakteri (Fouda et al., 2019), dan antivirus (Razzaghi-Asl et al., 2019). Senyawa 5-etoksikarbonil-4-(5-bromo-2-

hydrofenil)-6-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-2-tion merupakan senyawa turunan pirimidin yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi minimal (MIC) sebesar 15 mkr/mL (Foroughifar et al., 2017). Kemudian ada benzil 6-metil-2-okso-4-(3-(trifluorometil)fenil)-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat yang dapat menghambat pertumbuhan virus HIV-1 dengan tingkat penghambatan sebesar 71.65%, selain itu senyawa ini juga memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dengan konsentrasi untuk menghambat 50% bakteri (IC₅₀) sebesar 52.4 mkr/mL (Razzaghi-Asl et al., 2019). Pada gambar 1 senyawa uji yang digunakan yakni etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat merupakan salah satu turunan dari tetrahidropirimidin. Untuk mengetahui aktivitas biologis yang dimiliki senyawa uji yang digunakan maka dilakukan penelitian mengenai aktivitas antivirus yang dimilikinya.



Gambar 1. Struktur etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat

Newcastle disease (ND) atau yang dikenal dengan penyakit tetelo merupakan infeksi pada unggas yang disebabkan oleh virus *Avian Paramyxovirus Serotype 1* (APMV-1). Pada bagian permukaan virus ini terkandung glikoprotein yang dapat menyebabkan aglutinasi pada sel darah merah. ND memiliki risiko rendah untuk menginfeksi manusia (Swayne et al., 2013). ND digunakan sebagai model karena memiliki aktivitas aglutinasi yang dapat digunakan dalam metode uji yang sesuai serta relatif lebih aman. Uji hemaglutinasi dapat dilakukan pada virus yang memiliki selubung hemaglutinin-neuraminidase (HN) pada bagian luarnya, seperti yang dimiliki virus penyebab ND. Kandungan HN pada bagian luar virus ini akan bereaksi

dengan sel darah merah dan menunjukkan hasil pengujian. Data yang didapatkan berupa titer hemaglutinasi yang kemudian digunakan untuk menghitung persentase penghambatan senyawa uji terhadap virus (Ryu, 2017).

2. METODE

2.1 Bahan dan Alat

2.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada pengujian ini meliputi: bor telur, corong *buchner*, hot plate, inkubator, *laminar air flow* (LAF), lampu teropong telur, mikro sentrifus, mikroplat 96 sumuran dasar U, mikropipet, oven, dan spuit injeksi 1 mL.

2.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada pengujian ini meliputi: antibiotik ampisilin dan streptomycin, dimetil sulfoksida (DMSO), eritrosit ayam, etanol, kertas saring, larutan *phosphate buffer saline* (PBS), senyawa uji etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat, spiritus, telur ayam berembrio usia 9-11 hari, virus *Newcastle Disease* (ND) dari vaksin Medivac ND La Sota, dan *water for injection* (WFI)

2.2 Pereparasi Senyawa Uji

Senyawa uji etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat diperoleh melalui laboratorium kimia farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Senyawa uji dilakukan pemurnian melalui proses rekristalisasi. Sejumlah 1 gram senyawa uji dilarutkan dalam etanol 70% pada gelas beaker yang dipanaskan dalam suhu 70 °C menggunakan *hot plate*. Penambahan etanol dilakukan secara berkala hingga senyawa uji larut sepenuhnya. Setelah itu, larutan tersebut didiamkan pada ruang terbuka hingga mencapai suhu ruang. Kemudian, larutan dimasukkan ke dalam lemari pendingin selama 24 jam. Dilakukan penyaringan pada kristal yang telah terbentuk menggunakan corong *buchner* dan kemudian dilakukan pengeringan menggunakan desikator.

2.3 Preparasi Telur Ayam Berembrio

Telur yang digunakan adalah telur KUB (Kampung Unggul Balitbangtan) dengan usia embrio 9-11 hari yang diperoleh dari salah satu peternakan ayam di daerah Yogyakarta. Dilakukan peneropongan telur untuk mengetahui fertilitas telur. Telur

dengan kondisi embrio yang baik dapat diamati dengan adanya objek seperti gumpalan yang bergerak dan pembentukan pembuluh darah halus di sekitar embrio. Pada telur yang sesuai kemudian posisi kepala embrio serta rongga hawa diberikan tanda menggunakan pensil. Telur yang sudah ditandai diletakkan di dalam inkubator pada suhu 37 °C hingga waktu pengujian.

2.4 Preparasi Virus Newcastle Disease

Virus ND yang digunakan yaitu dari vaksin Medivac ND La Sota. Virus ND diperoleh dari salah satu toko peternakan di daerah Kartasura. Dilakukan pelarutan vaksin Medivac ND La Sota 150 dosis dengan 3 mL PBS. Untuk mencegah kontaminasi bakteri maka perlu ditambahkan antibiotik. Sebagai antibiotik digunakan ampicilin dan streptomisin dengan perbandingan 1:1. Sejumlah 1000 mg ampicilin dan 1000 mg streptomisin dilarutkan dengan 5 mL WFI. Virus yang telah disiapkan ditambahkan dengan antibiotik sejumlah 1,8 mL kemudian diinkubasi selama 60 menit dengan suhu 37 °C agar antibiotik bekerja secara optimal.

2.5 Pembuatan Seri Konsentrasi Senyawa Uji

Senyawa uji etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat dibagi dalam beberapa konsentrasi yaitu 1 µg/mL, 10 µg/mL, dan 100 µg/mL. Larutan stok senyawa uji 1 mg/mL disiapkan dengan ditimbang 10 mg senyawa uji lalu ditambahkan dengan DMSO hingga 10 mL. Larutan stok 1 mg/mL kemudian diencerkan menggunakan DMSO untuk mendapatkan seri konsentrasi 1 µg/mL, 10 µg/mL, dan 100 µg/mL.

2.6 Inokulasi Virus dan Senyawa Uji

Telur ayam berembrio yang akan diberi perlakuan disterilkan menggunakan alkohol 70%. Pada sisi rongga hawa dibuat lubang menggunakan bor telur sebagai jalan masuknya spuit. Diinokulasikan virus dan senyawa uji melalui lubang pada rongga hawa.

Ada 4 kelompok perlakuan dalam penelitian ini, yaitu:

1. Kelompok 1, diinokulasikan seri konsentrasi senyawa uji 1 µg/mL sejumlah 0,2 mL dan virus ND sejumlah 0,2 mL.
2. Kelompok 2, diinokulasikan seri konsentrasi senyawa uji 10 µg/mL sejumlah 0,2 mL dan virus ND sejumlah 0,2 mL.

3. Kelompok 3, diinokulasikan seri konsentrasi senyawa uji 100 µg/mL sejumlah 0,2 mL dan virus ND sejumlah 0,2 mL.
4. Kelompok 4, diinokulasikan virus ND sejumlah 0,2 mL.

Lubang pada telur kemudian ditutup menggunakan selotip kertas untuk mencegah kontaminasi pada telur. Telur yang telah diberi perlakuan kemudian diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 3 hari. Diamati apakah terjadi kematian pada embrio setiap 24 jam, kematian embrio dapat diamati dengan tidak adanya pergerakan pada embrio tersebut (Diniatik et al., 2011).

2.7 Preparasi Eritrosit Ayam

Eritrosit yang akan dipreparasi berasal dari darah ayam segar. Darah ayam diperoleh dari pemotongan ayam di daerah Kartasura. Darah ayam segar dimasukkan ke dalam flakon yang telah diberi EDTA sejumlah 10 mg dengan tujuan mencegah darah ayam menggumpal. Darah ayam kemudian disentrifugasi selama 15 menit pada 3000 RPM, terbentuk 2 sisi dengan perbedaan yang jelas yaitu bagian plasma pada sisi atas dan eritrosit pada sisi bawah. Cairan pada sisi atas kemudian dibuang dan ditambahkan PBS pada eritrosit, proses ini dilakukan sebanyak 3 kali selama 1 menit pada setiap pengulangannya. Eritrosit yang sudah bersih diambil sebanyak 4 tetes dan dilarutkan dalam 60 mL PBS.

2.8 Pengambilan Cairan Alantois

Telur yang telah diinkubasi selama 3 hari terlebih dahulu dimasukkan ke dalam kulkas selama 60 menit. Cangkang telur pada bagian rongga hawa dipecah menggunakan pinset, kemudian cairan alantois diambil dengan spuit dan disimpan ke dalam flakon yang telah diberi label sesuai dengan kelompok perlakuan (Diniatik et al., 2011).

2.9 Uji Hemaglutinasi

Uji hemaglutinasi dilakukan pada mikropelat 96 sumuran dasaran U. Pada mikropelat 1 ditambahkan larutan PBS sejumlah 50 µL ke dalam sumuran kolom 1 hingga 12 baris A sampai H dan mikropelat 2 ditambahkan larutan PBS sejumlah 50 µL dimasukkan pada sumuran kolom 1 sampai 12 baris A sampai E. Cairan alantois ditambahkan sejumlah 50 µL ke dalam sumuran sesuai dengan kelompok perlakuan. Pada mikropelat 1, sumuran kolom 1 baris A sampai C ditambahkan dengan cairan alantois dari kelompok perlakuan 1. Sumuran kolom 1 baris D sampai F ditambahkan dengan

cairan alantois dari kelompok perlakuan 2. Sumuran kolom 1 baris G dan H ditambahkan dengan cairan alantois dari kelompok perlakuan 4. Pada mikrolat 2, sumuran kolom 1 baris A sampai C ditambahkan dengan cairan alantois dari kelompok perlakuan 3. Sumuran kolom 1 baris D dan E ditambahkan cairan alantois dari kelompok perlakuan 4. Pada masing-masing baris dilakukan pengenceran bertingkat hingga kolom 12. Pada sumuran yang telah dilakukan pengenceran kemudian ditambahkan eritrosit sejumlah 50 μ L. Mikrolat kemudian didiamkan selama 15 hingga 20 menit dengan kondisi suhu ruang (Diniatik et al., 2011).

2.10 Titer Hemaglutinasi

Titer hemaglutinasi ditentukan dengan menghitung jumlah sumuran yang menunjukkan hasil positif dari kolom 1 sampai 12 pada setiap barisnya. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya kekeruhan tanpa adanya dot di dasar sumuran, ini menunjukkan adanya proses hemaglutinasi. Titer hemaglutinasi didapat dengan rumus 2^n , n didapat dari jumlah sumuran yang positif (Diniatik et al., 2011).

2.11 Analisis Data

Hasil perhitungan titer hemaglutinasi yang didapat digunakan untuk menghitung persentase penghambatan akibat senyawa uji etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat dengan rumus:

$$P = \frac{(A-B)}{A} \times 100\% \quad \dots\dots(1)$$

Keterangan:

P = Persentase penghambatan

A = Jumlah titer hemaglutinasi tanpa pemberian senyawa uji

B = Jumlah titer hemaglutinasi dengan pemberian senyawa uji

Analisis data persentase penghambatan yang didapat dianalisis menggunakan metode analisis varian pola searah (ANOVA) dengan taraf kepercayaan 95%. Jika diperoleh perbedaan yang bermakna maka dilakukan pengujian lebih dalam dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dengan taraf kepercayaan 95% (Diniatik et al., 2011).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemurnian senyawa uji etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat dilakukan menggunakan metode rekristalisasi.

Adanya perbedaan kelarutan antara zat pengotor dan senyawa yang dimurnikan menjadi prinsip dasar rekristalisasi. Pada pemurnian dengan metode rekristalisasi senyawa yang akan dimurnikan dilarutkan dan kemudian dikristalkan kembali menggunakan pelarut yang sesuai. Zat pengotor yang terkandung kemudian ikut larut dan terbuang dengan pelarut (Pinalia, 2011). Pelarut yang sering digunakan dalam rekristalisasi turunan tetrahidropirimidin yaitu etanol (Foroughifar et al., 2017). Pada gambar 2 merupakan senyawa uji setelah dilakukan rekristalisasi.



Gambar 2. Senyawa etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat

Hasil pengamatan kematian telur selama masa inkubasi setelah diberikan perlakuan disajikan pada Tabel 1. Pada waktu 24 jam inkubasi tidak ditemukan kematian embrio dari masing-masing kelompok perlakuan. Kelompok seri konsentrasi 100 µg/mL mengalami 1 kematian embrio selama 48 jam inkubasi. Selama 72 jam inkubasi, kelompok seri konsentrasi 1 µg/mL mengalami 1 kematian embrio, kelompok seri konsentrasi 10 µg/mL 2 kematian embrio, dan kelompok kontrol virus 1 kematian embrio. Persentase kematian pada kelompok 1 sebesar 16,7%; kelompok 2 sebesar 33,3%; kelompok 3 sebesar 16,7%; dan kelompok kontrol virus 16,7%. Virus ND mampu berkembang biak dengan baik di cairan alantois telur berembrio yang berusia 9-10 hari dan virus ND dari strain lentogenik membunuh embrio selama periode inkubasi yang lebih dari 90 jam (Pudjiatmoko et al., 2014). Kematian embrio tidak disebabkan oleh senyawa uji etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat, karena berdasarkan data yang diperoleh menunjukkan bahwa kematian embrio tidak meningkat seiring dengan peningkatan

seri konsentrasi senyawa uji. Penyebab kematian embrio dapat disebabkan karena adanya kerusakan pembuluh darah embrio pada proses inokulasi senyawa uji dan virus ND. Ada potensi pembuluh darah embrio terluka oleh jarum spuit, karena bagian dalam telur tidak dapat terlihat sepenuhnya selama proses inokulasi. Pembuluh darah berperan penting dalam kehidupan embrio. Kuning telur yang menjadi sumber berbagai macam nutrisi bagi embrio secara bertahap disalurkan melalui pembuluh darah menuju embrio. Oksigen dan karbon dioksida juga disalurkan melalui pembuluh darah menuju embrio setelah melewati proses pertukaran pada cangkang telur (Bellairs and Osmond, 2014). Sehingga, bila terdapat kerusakan pada pembuluh darah embrio dapat menyebabkan kematian embrio.

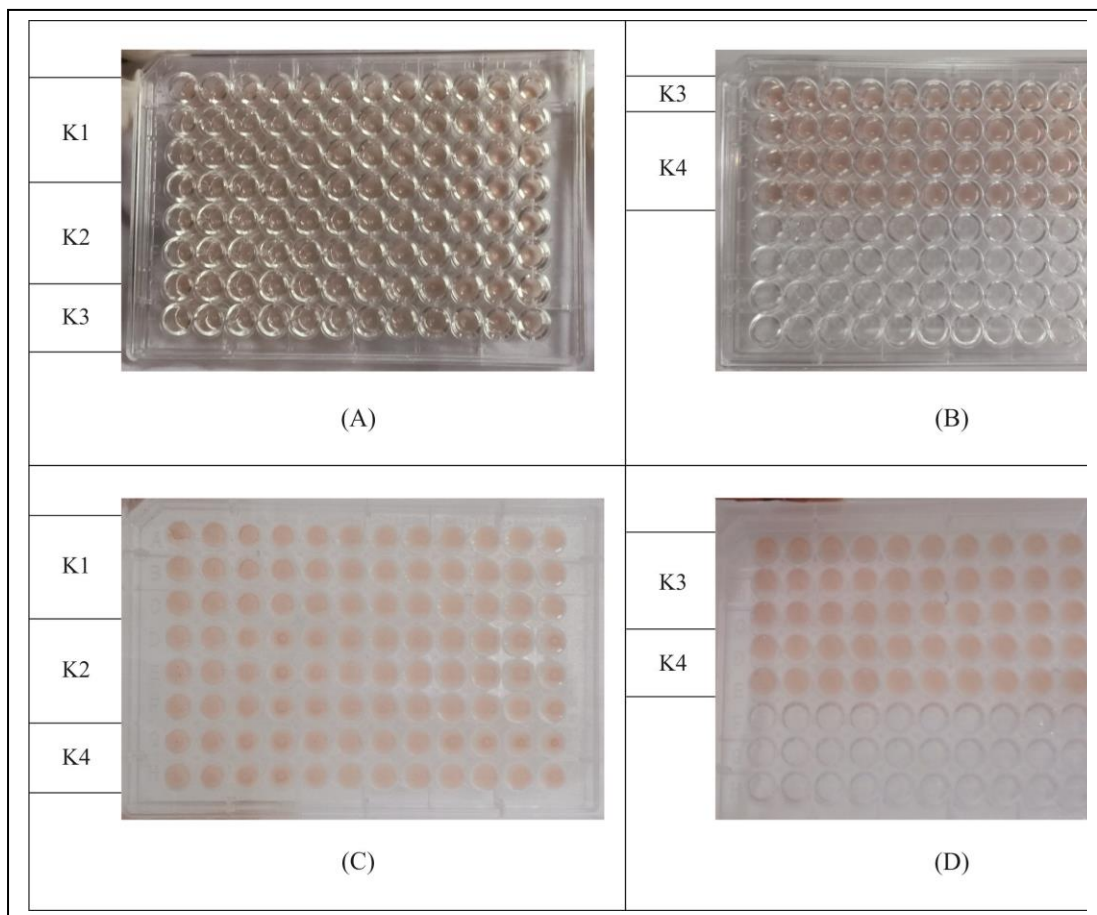
Tabel 1. Persentase kematian embrio setiap kelompok perlakuan

Kelompok Perlakuan	Replikasi	Kematian Embrio			Jumlah Telur Mati	% Kematian
		24 jam	48 jam	72 jam		
Kelompok 1 (1 µg/mL)*	1	+	+	+	1	16,7%
	2	+	+	+		
	3	+	+	-		
Kelompok 1 (1 µg/mL)**	1	+	+	+	2	33,3%
	2	+	+	+		
	3	+	+	+		
Kelompok 2 (10 µg/mL)*	1	+	+	+	1	16,7%
	2	+	+	-		
	3	+	+	-		
Kelompok 2 (10 µg/mL)**	1	+	+	+	1	16,7%
	2	+	+	+		
	3	+	+	+		
Kelompok 3 (100 µg/mL)*	1	+	+	+	1	16,7%
	2	+	+	+		
	3	+	+	+		
Kelompok 3 (100 µg/mL)**	1	+	+	+	1	16,7%
	2	+	-	-		
	3	+	+	+		
Kelompok 4 (Kontrol virus)*	1	+	+	+	1	16,7%
	2	+	+	+		
	3	+	+	+		
Kelompok 4	1	+	+	+		

(Kontrol virus)**	2	+	+	-
	3	+	+	+

* percobaan 1; ** percobaan 2; + (embrio hidup); - (embrio mati)

Aktivitas antivirus senyawa uji etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat terhadap virus ND diamati dengan melakukan uji hemaglutinasi. Virus ND tersusun dari 6 struktur protein, yang meliputi protein nukleokapsid (N), fosforprotein (P), matriks (M), fusi (F), hemaglutinin-neuraminidase (HN), dan RNA-dependen RNA polimerase (RNAP) (Swayne et al., 2013). Uji hemaglutinasi digunakan pada virus yang memiliki selubung dengan karakterisasi tertentu, yaitu virus yang pada selubung nya mempunyai hemaglutinin-neuramidase (HN) seperti pada virus ND. Selubung virus ini memiliki kemampuan untuk mengadsorpsi eritrosit, kandungan HN pada bagian luar virus ini akan bereaksi dengan reseptor asam sialat pada permukaan eritrosit. Keberadaan virus menyebabkan reaksi antara HN dengan eritrosit kemudian terdispersi, ditandai dengan terbentuknya kekeruhan tanpa ditemukan titik merah di dasar sumuran (Ryu, 2017). Hasil pengujian hemaglutinasi disajikan pada gambar 3. Dapat diamati bahwa dari kelompok seri konsentrasi 1 µg/mL, 10 µg/mL, dan 100 µg/mL memperlihatkan adanya kekeruhan tanpa ditemukan titik merah di dasar sumuran, kondisi yang sama juga dapat ditemukan pada kelompok kontrol virus. Adanya kekeruhan dan tidak ditemukannya titik merah di dasar sumuran menandakan bahwa terdapat virus ND. Pada tabel 2 diperoleh titer hemaglutinasi yang sama dari kelompok seri konsentrasi 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, dan kontrol virus yaitu sebesar 4096.



Gambar 3. Hasil uji hemaglutinasi percobaan 1 (A): seri konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ (K1), seri konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ (K2), seri konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ (K3); (B): seri konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ (K3), kontrol (K4). Hasil uji hemaglutinasi percobaan 2 (C): seri konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$, seri konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ (K2), kontrol (K4); (D): seri konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ (K3), kontrol (K4)

Untuk memastikan bahwa eritrosit yang digunakan dalam kondisi yang baik maka dilakukan percobaan dengan memberikan eritrosit pada media PBS. Pada gambar 4 dapat dilihat adanya titik merah pada dasar sumuran yang menunjukkan bahwa eritrosit dalam kondisi baik. Tidak adanya virus pada sumuran menyebabkan darah seiring waktu mengendap di dasar sumuran yang kemudian membentuk titik.



Gambar 4. Eritrosit + PBS

Tabel 2. Hasil titer hemaglutinasi setiap kelompok perlakuan

Replikasi	Hasil titer hemaglutinasi setiap kelompok perlakuan			
	Senyawa 1 μg/mL	Senyawa 10 μg/mL	Senyawa 100 μg/mL	Kontrol virus
1	$2^{12} = 4096^*$ $2^{12} = 4096^{**}$	$2^{12} = 4096^*$ $2^{12} = 4096^*$	$2^{12} = 4096^*$ $2^{12} = 4096^*$	$2^{12} = 4096^*$ $2^{12} = 4096^*$
2	$2^{12} = 4096^*$ $2^{12} = 4096^{**}$	$2^{12} = 4096^*$ $2^{12} = 4096^{**}$	$2^{12} = 4096^*$ $2^{12} = 4096^{**}$	$2^{12} = 4096^*$ $2^{12} = 4096^{**}$
3	$2^{12} = 4096^*$ $2^{12} = 4096^{**}$	$2^{12} = 4096^*$ $2^{12} = 4096^{**}$	$2^{12} = 4096^*$ $2^{12} = 4096^{**}$	$2^{12} = 4096^*$ $2^{12} = 4096^{**}$

* percobaan 1; ** percobaan 2

Kemudian dari data titer hemaglutinasi digunakan untuk mengetahui daya hambat senyawa uji terhadap virus ND. Tabel 3 menyajikan persentase daya hambat yang diperoleh pada kelompok seri 1 μg/mL, 10 μg/mL, dan 100 μg/mL yaitu sebesar 0%. Dibandingkan dengan kelompok kontrol virus, jumlah virus dalam cairan alantois yang diberi perlakuan senyawa uji tidak lebih rendah. Menunjukkan bahwa senyawa uji etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat pada konsentrasi 1 μg/mL, 10 μg/mL, dan 100 μg/mL tidak memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan virus ND.

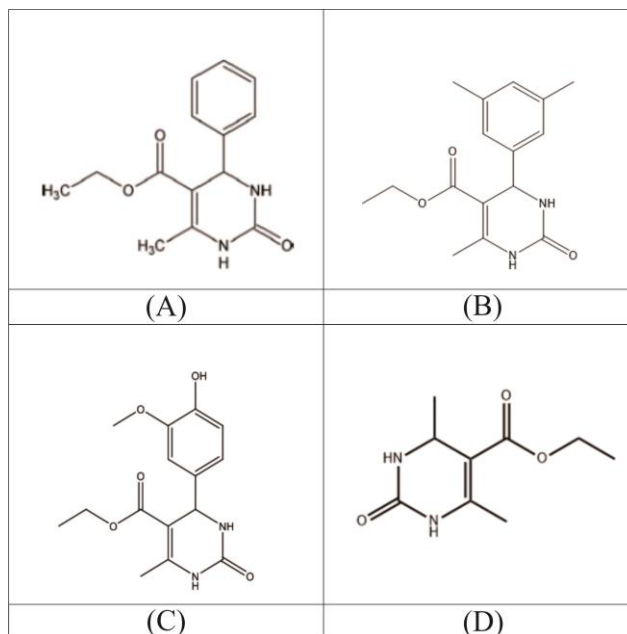
Tabel 3. Persentase penghambatan senyawa etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat terhadap virus ND

Replikasi	Persentase penghambatan setiap kelompok perlakuan		
	Senyawa 1 μg/mL	Senyawa 10 μg/mL	Senyawa 100 μg/mL
1	0%	0%	0%
2	0%	0%	0%
3	0%	0%	0%
Rerata	0%	0%	0%

Penggunaan DMSO sebagai pelarut dapat meningkatkan diameter kepala embrio yang berhubungan dengan perkembangan otak embrio. Hal ini tidak berbahaya bagi embrio, bahkan menguntungkan karena memiliki kemampuan neuroprotektif dan melindungi dari suhu (Pratiwi et al., 2020). Dari penelitian yang telah dilakukan, DMSO juga tidak menunjukkan efek penghambatan terhadap pertumbuhan virus ND (Bakari et al., 2012; Kang et al., 2017). Sehingga, DMSO

tidak mempengaruhi hasil daya hambat senyawa uji etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat terhadap virus ND.

Ada beberapa senyawa tetrahidropirimidin lainnya yang menunjukkan adanya aktivitas penghambatan pada virus *Newcastle disease*. Senyawa berikut memiliki penghambatan baik pada konsentrasi tertentu, etil 6-metil-2-okso-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat dapat menghambat senyawa pada konsentrasi 1 µg/mL, etil 4-(3,5-dimetilfenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat pada konsentrasi 100 µg/mL, etil 4-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat dapat menghambat dengan baik pada konsentrasi 100 µg/mL, dan etil 4,6-dimetil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat pada konsentrasi 10 µg/mL. Pada gambar 5 dapat diamati struktur dari senyawa-senyawa tersebut. Terdapat perbedaan struktur senyawa pada gugus atom karbon (C) nomor 4 dari masing-masing senyawa. Perbedaan gugus inilah yang dapat mempengaruhi aktivitas biologis yang ditimbulkan dari suatu senyawa (Kirmani et al., 2021).



Gambar 5. Struktur senyawa etil 6-metil-2-okso-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (A), senyawa etil 4-(3,5-dimetilfenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (B), senyawa etil 4-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (C), dan senyawa etil 4,6-dimetil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (D)

Setiap tahap yang terlibat dalam siklus hidup virus memiliki potensi sebagai target intervensi antivirus. Tahap polimerase DNA atau RNA menjadi salah satu

target yang cukup sering digunakan pada berbagai obat antivirus (Ryu, 2017). Keberadaan struktur pirimidin yang memiliki kemiripan dengan asam nukleat DNA dan RNA pada senyawa uji etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat membuatnya berpotensi dalam penemuan obat antivirus. Salah satu senyawa yang memiliki aktivitas antivirus yaitu ribavirin. Ribavirin merupakan obat antivirus dengan spektrum yang luas, diketahui memiliki aktivitas antivirus pada banyak virus RNA maupun DNA. Dengan konsentrasi 20 µg/mL, ribavirin memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan virus ND, dimana tidak ditemukan adanya aktivitas hemaglutinasi (Omer et al., 2013). Jika dibandingkan dengan ribavirin, senyawa uji pada uji hemaglutinasi dapat ditemukan aktivitas hemaglutinasi. Adanya proses hemaglutinasi menunjukkan keberadaan virus, yang berarti senyawa uji tidak mampu menghambat perkembangan dari virus ND.

4. PENUTUP

Pada senyawa uji etil 4-(4-metoksifenil)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat tidak ditemukan adanya aktivitas antivirus terhadap virus *Newcastle Disease*. Dengan konsentrasi tertinggi yaitu 100 µg/mL juga belum menunjukkan adanya aktivitas antivirus dengan persentase penghambatan yang didapatkan sebesar 0%. Peneliti menyarankan untuk menambahkan kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol pelarut yakni DMSO. Kelompok perlakuan lain yang perlu ditambahkan yaitu kelompok kontrol positif dengan menggunakan antivirus yang sudah diketahui aktivitas antivirusnya, misalnya ribavirin. Kemudian untuk mengetahui komponen spesifik yang mempengaruhi aktivitas antivirus maka perlu dilakukan analisis lebih dalam mengenai struktur senyawa dengan analisis secara komputasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Adamson C.S., Chibale K., Goss R.J.M., Jaspars M., Newman D.J. and Dorrington R.A., 2021, Antiviral Drug Discovery: Preparing for The Next Pandemic, *Chemical Society Review*, 50(6), 3647-4655.
- Bakari G.G., Max R.A., Mdegela R.H., Phiri E.C.J. and Mtambo M.A.M., 2012, Antiviral activity of crude extracts from *Commiphora swynnertonii* against Newcastle disease virus in ovo, *Tropical animal health and production*, 44 (7), 1389–1393.

- Bellairs R. and Osmond M., 2014, *The Atlas of Chick Development*, 3rd ed., Academic Press, Kidlington, 57-59.
- Diniatik, Kusuma A.M. and 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, *Jurnal Farmasi Indonesia*, 08(01), 54-58.
- Foroughifar N., Beromi S.K., Pasdar H. and Shahi M., 2017, Synthesis of Some New Tetrahydropyrimidine Derivatives as Possible Antibacterial Agents, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16(2), 596-601.
- Fouda A.M., Abbas H.A.S., Ahmed E.H., Shati A.A., Alfaifi M.Y. and Elbehairi S.E.I., 2019, Synthesis, In Vitro Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Some New Pyrazolol[1,5-a]pyrimidine Derivatives, *Molecules*, 24(6), 1-20.
- Hughes J.P., Rees S., Kalindjian S.B. and Philpott K.L., 2011, Principle of Early Drug, *British Journal of Pharmacology*, 162(6), 1239-1249.
- Kang Y., Yuan R., Zhao X., Xiang B., Gao S., Gao P., Dai X., Feng M., Li Y., Xie P., Li Y., Gao X. and Ren T., 2017, Transient Activation of The PI3K/Akt Pathway Promotes Newcastle Disease Virus Replication and Enhances Anti-Apoptotic Signaling Responses, *Oncotarget*, 8(14), 23551-23563.
- Kirmani A.K., Ali P. and Azam F., 2021, Topological indices and QSPR/QSAR analysis of some antiviral drugs being investigated for the treatment of COVID-19 patients, *International Journal of Quantum Chemistry*, 121(9), 1-22.
- Li G. and Clercq E.D., 2021, Overview of Antiviral Drug Discovery and Development: Viral Versus Host Targets, Dalam Munoz-Fontela C. and Delgado R., eds. *Antiviral Discovery for Highly Pathogenic Emerging Viruses*, Royal Society of Chemistry, London, 1-27.
- Omer M.O., AlMalki W.H., Shahid I., Khuram S., Altaf I. and Imran S., 2013, Comparative Study to Evaluate the Anti-viral Efficacy of Glycyrrhiza glabra Extract and Ribavirin Against The Newcastle Disease Virus, *Pharmacognosy Research*, 6(1), 6-11.
- Parvez M.K. and Parveen S., 2017, Evolution and Emergence of Pathogenic Viruses: Past, Present, and Future, *Intervirolgy*, 60, 1-7.
- Pinalia A., 2011, Penentuan Metode Rekristalisasi yang Tepat untuk Meningkatkan Kemurnian Kristal Amonium Perklorat (AP), *Majalah Sains dan Teknologi Dirgantara*, 6(2), 64-70.
- Pratiwi H., Wardana A.W., Okatvianie 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), 220-224.
- Pudjiatmoko, Muhammad S., Nurtanto S., Lubis N., Syafrison, Yulianti S., Kartika N D., Yohana C.K., Setianingsih E., Nurhidayah, Efendi D. and Saudah E., 2014, Manual Penyakit Unggas, *Kementrian Pertanian*, Jakarta.

- Razzaghi-Asl N., Kamrani-Moghadam M., Farhangi B., Vahabpour R., Zabihollahi R. and Sepehri S., 2019, Design, Synthesis and Evaluation of Cytotoxic, Antimicrobial, and Anti-HIV-1 Activities of New 1,2,3,4-tetrahydropyrimidine Derivatives, *Research In Pharmaceutical Sciences*, 14(2), 155-166.
- Ryu W.S., 2017, *Molecular Virology of Human Pathogenic*, Academic Press, Cambridge.
- Swayne D.E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L. and Nair V., 2013, *Disease of Poultry 13th Edition*, John Wiley & Sons, USA.
- Taglieri L., Saccoliti F., Nicolai A., Peruzzi G., Madia V.N., Tudino V., Messori A., Di Santo R., Artico M., Taurone S., Salvati M., Costi R. and Scarpa S., 2019, Discovery of a Pyrimidine Compound Endowed with Antitumor Activity, *Investigational New Drugs*, 38, 39-49.