

## Potensi Antivirus daripada Ekstrak Fermentasi Daun Nangka (*Artocarpus heterophyllus*) terhadap Virus Herpes Simpleks Jenis 1 (HSV-1) (Antiviral Potential of Fermented Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) Leaf Extract against Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1))

NORHAZNIZA AZIZ<sup>1,2</sup>, NOREFRINA SHAFINAZ MD NOR<sup>1,\*</sup> & KOH, S.P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

<sup>2</sup>Food Science and Technology Research Centre, MARDI, P.O. Box 12301, 50772 Kuala Lumpur, Malaysia

Diserahkan: 9 Mei 2024/Diterima: 3 Julai 2024

### ABSTRAK

Kewujudan virus rintang dadah dan mutasi virus baharu telah mendorong saintis untuk mengkaji terapi alternatif berasaskan produk semula jadi yang kaya dengan sumber bioaktif untuk merawat dan mengurangkan simptom jangkitan dengan lebih cekap. Dalam kajian ini, daun nangka telah difermentasi (JL) menggunakan kultur simbiotik gabungan bakteria asid asetik dan yis untuk menghasilkan ekstrak yang berpotensi sebagai agen antivirus terhadap virus herpes simpleks jenis 1 (HSV-1). Ujian ketoksikan ekstrak telah ditentukan melalui asai MTT (3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ke atas sel Vero bagi menentukan nilai  $CC_{50}$  dan hasil ujian ini mendapati kepekatan maksimum ekstrak yang tidak toksik untuk kajian antivirus ialah 15.17%. Kajian anti HSV-1 secara *in-vitro*, telah dinilai melalui tiga mod berbeza iaitu pasca rawatan, pra-rawatan dan virusid. Ekstrak JL didapati lebih berkesan sebagai antivirus secara pasca rawatan dan virusid dengan pendedahan terus ekstrak kepada HSV-1 selama 15 dan 30 minit telah merencat 100% aktiviti virus tersebut pada semua kepekatan ekstrak yang digunakan. Melalui analisis penjerapan dan pelakuran yang dijalankan, ekstrak JL dengan kepekatan 7.5% dan 15% didapati dapat menghalang virus memasuki sel. Hasil cerapan zarah virus menggunakan mikroskop transmisi elektron (TEM) mendapati interaksi JL secara terus pada zarah virus dapat memusnahkan sampul virus seterusnya merencat proses jangkitan. Hasil kajian ini menunjukkan ekstrak JL mempunyai potensi yang baik untuk dibangunkan sebagai agen anti-herpes yang berasaskan sumber semula jadi.

Kata kunci: Antivirus; daun nangka; fermentasi; HSV-1

### ABSTRACT

The emergence of drug-resistant viruses and new viral mutations encouraged scientists to investigate alternative therapies based on natural products rich in bioactive resources for more effective treatment and lessening infection symptoms. In this particular study, jackfruit leaves (JL) were subjected to fermentation using a combination of acetic acid bacteria and yeast cultures. The goal was to produce an extract with potential antiviral properties against herpes simplex virus type 1 (HSV-1). The toxicity of the extract was assessed through the MTT assay (3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) on Vero cells. This test helped determine the maximum non-toxic concentration of the extract for antiviral studies, which was found to be 15.17%. The antiviral activity of the JL extract against HSV-1 was evaluated through three different approaches: post-treatment, pre-treatment, and virucidal. The findings indicated that the JL extract was most effective in post-treatment and virucidal modes. Direct exposure of the extract to HSV-1 for 15 and 30 min resulted in complete inhibition of viral activity at all tested extract concentrations. Adsorption and fusion analyses demonstrated that the JL extract at concentrations of 7.5% and 15% was capable of preventing the entry of the virus into host cells. Further examination of virus particles using a transmission electron microscope (TEM) revealed that JL extract's direct interaction with the virus caused the destruction of the virus envelope and subsequent inhibition of the infection process. These results demonstrate the potential of JL extract as a natural resource-based treatment against HSV-1.

Keywords: Antiviral; fermentation; HSV-1; jackfruit leaves

## PENGENALAN

Virus Herpes Simpleks jenis 1 (HSV-1) merupakan penyebab utama jangkitan kulit dalam kalangan manusia. Menurut laporan yang pernah dikeluarkan oleh Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO) pada tahun 2016, sebanyak 3.7 bilion manusia di dunia didapati mengidap jangkitan HSV-1. Lazimnya, jangkitan HSV-1 melibatkan kawasan muka dan mulut dengan simptom klinikal seperti gingivostomatitis dan herpes labialis atau di bahagian kemaluan seperti herpes genital (Amir 2005). Rawatan HSV-1 sedia ada kebanyakannya menggunakan sebatian analog nukleosida dan salah satu daripada sebatian yang paling banyak digunakan ialah *Acyclovir* (ACV). ACV menghalang jangkitan HSV-1 dengan difosforilasi secara selektif oleh *thymidine kinase* yang dikodkan virus dalam sel yang dijangkiti dan seterusnya mengganggu replikasi DNA virus. Rawatan menggunakan ACV didapati berkesan mengurangkan simptom jangkitan HSV-1, tetapi penggunaan yang kerap dan berulang akan menyebabkan kewujudan virus termutasi yang rintang terhadap ACV. Penggunaan ACV ke atas pesakit imun tertindas juga didapati kurang berkesan berbanding dengan pesakit imunokompeten (Parsania et al. 2017).

Terdapat pelbagai kajian mengenai potensi sumber semula jadi sebagai terapi antimikrob daripada sumber alternatif seperti daripada sumber mikrob dan tumbuhan telah dijalankan (Taher et al. 2022; Yong et al. 2023). Potensi sumber semula jadi sebagai terapi alternatif untuk anti-herpes pernah dilaporkan dan ia terdiri daripada sumber mikroorganisma, fungi, haiwan dan tumbuhan. Antara bahan yang pernah dikaji sebagai agen anti-herpes ialah sebatian terbitan stirilpiron daripada *Goniothalamus umbrosus* (Bahtiar, Md Nor & Ibrahim 2016), ekstrak daun misai kucing, *Orthosiphon stamineus* (Nur Suhana et al. 2018), ekstrak akar tumbuhan *Pelargonium sidoides* (Schnitzler et al. 2008) dan ekstrak daun pudina (Schuhmacher, Reichling & Schnitzler 2003).

Nangka atau nama saintifiknya *Artocarpus heterophyllus* adalah tumbuhan yang banyak ditanam di Malaysia. Beberapa kajian telah menunjukkan bahawa daun nangka mempunyai ciri antioksidan, antibakteria, antikulat dan anti-radang, sebagai bahan untuk penyembuhan luka dan mengurangkan keradangan. Flavonoid, sterol dan *prenylflavonoid* adalah bahan fitokimia yang terdapat dalam daun yang menyumbang kepada kesan farmakologinya (Biworo et al. 2015; Sharma 2012; Swami et al. 2012). Selain itu, ekstrak daun nangka juga tidak menunjukkan kesan ketoksikan dalam beberapa kajian *in-vivo* yang telah dijalankan sebelum ini (Bhattacharjee & Amitsankar Dutta 2013; Sabidi et al. 2020).

Kaedah fermentasi adalah merupakan kaedah yang telah lama digunakan sebagai cara mengawet sesuatu bahan atau makanan agar tidak mudah rosak dan tahan lama, malah berpotensi untuk menambah baik dan memperkaya

sumber bioaktif dalam ekstrak semula jadi untuk digunakan sebagai ramuan berfungsi di dalam produk makanan dan perubatan (Leonard et al. 2021). Dalam kajian ini, ekstrak daun nangka terfermentasi dihasilkan daripada proses fermentasi dari gabungan bakteria dan yis terpilih yang juga dikenali sebagai SCOBY (*symbiotic culture of bacteria and yeast*). Fermentasi SCOBY yang melibatkan hubungan simbiotik antara yis dan bakteria asid asetik menghasilkan asid organik seperti asid asetik dan asid sitrik yang didapati bermanfaat untuk menghalang pertumbuhan mikroorganisma patogen serta meningkatkan ciri biologi seperti antioksidan dan anti-keradangan. Selain itu, produk fermentasi SCOBY seperti *kombucha* yang kaya dengan asid organik seperti asid asetik dan asid propionik telah dibuktikan mempunyai kesan antivirus dan ia berupaya menyekat replikasi virus dan meningkatkan sistem imun badan (Laavanya, Shivanand & Balasubramaniam 2021). Berdasarkan manfaat yang ada pada ekstrak hasil daripada fermentasi SCOBY ini, maka kajian ini dijalankan untuk meneroka potensi ekstrak daun nangka sebagai agen antivirus untuk jangkitan HSV-1.

## BAHAN DAN KAEDAH

### BAHAN

Daun matang daripada pokok nangka varieti buah Tekam Kuning yang digunakan dalam kajian ini diperolehi dari ladang nangka di Lanchang, Pahang, Malaysia. Daun ini dibersihkan dan dikeringkan pada suhu 45 °C, dikisar menjadi serbuk dan disimpan di dalam keadaan sejuk (4 °C) sehingga digunakan untuk analisis (Norhazniza et al. 2018). Virus herpes simpleks jenis 1, HSV-1 (strain klinikal) diperolehi dari stok koleksi kultur di Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, UKM Bangi, Selangor, Malaysia. Titisan sel Vero diperolehi daripada *American Type Culture Collection* (ATCC) CCL-81 dan dipropagasi di dalam media DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich, USA) dengan tambahan 5% (v/v) serum anak lembu (*fetal bovine serum*) (Tico Europe), asid amino tak perlu (1x) (Sigma Aldrich, USA) dan 100 µg/mL antibiotik penisilin-streptomisin (Nacalai Tesque, Jepun). Dadah kawalan positif iaitu Acyclovir (ACV) diperolehi secara komersil dari Sigma-Aldrich (USA).

### PROSES FERMENTASI DAUN NANGKA

Terdapat dua jenis mikroorganisma yang dipilih dari koleksi stok kultur makanan berfungsi (CFFC), MARDI iaitu yis (*Dekkera bruxellensis*) and bakteria asid asetik (*Komagataiebacter* sp.). Kaedah fermentasi daun nangka dijalankan berdasarkan kaedah yang diterangkan oleh Sabidi et al. (2020). Serbuk daun nangka difermentasi

menggunakan kaedah fermentasi fasa cecair dengan gabungan yis dan bakteria pada nisbah 1:4 dengan bilangan koloni bakteria sebanyak  $1 \times 10^8$  cfu/mL selama 8 hari pada suhu 30 °C. Kemudian, hasil fermentasi ini diempar menggunakan mesin pengempar pada kelajuan 11,200 g selama 10 minit bagi mengasingkan residu substrat dan mikrob. Ekstrak fermentasi ini disimpan di dalam suhu -20 °C sehingga digunakan untuk analisis seterusnya.

#### UJIAN SITOTOKSIK

Ujian sitotoksik adalah menggunakan kaedah pewarnaan 3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma Aldrich, USA) seperti yang dijalankan oleh Mosmann (1983). Sebelum asai ini dijalankan, ekstrak JL dilarutkan dengan medium pertumbuhan (DMEM) dan pencairan bersiri ganda dua dilakukan sebanyak 6 kali untuk mendapatkan siri pencairan dari 3.125% ke 100% (v/v). Sel Vero di dalam piring 96 telaga dirawat selama 48 jam dengan beberapa siri kepekatan ekstrak tersebut. Rawatan bagi telaga kawalan adalah menggunakan medium DMEM sahaja. Selepas 48 jam, ekstrak dan medium dikeluarkan dari setiap telaga dan dicuci dengan medium DMEM sebanyak dua kali sebelum ditambah 40 µL larutan MTT (5 mg/mL). Piring tersebut kemudian dieram pada suhu 37 °C dengan persekitaran yang mengandungi 5% karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) selama 3 jam. Selepas itu, larutan MTT dikeluarkan dari setiap telaga dan digantikan dengan 100µL dimetil sulfoksida (DMSO) bagi melisiskan sel. Nilai serapan kemudian ditentukan menggunakan pembaca piring mikro (Model 680, Biorad, USA) pada jarak gelombang 545 nm dan peratus kemandirian sel dihitung bagi menentukan nilai CC<sub>50</sub>. Penentuan nilai CC<sub>50</sub> dihitung menggunakan aplikasi dalam talian 'Quest Graph™ Calculator'. (AAT Bioquest 2024). Peratusan kemandirian sel dikira seperti formula berikut:

$$\text{Kemandirian sel (\%)} = \frac{A_{545} \text{ sel yang dirawat}}{A_{545} \text{ sel kawalan}} \times 100$$

dengan A<sub>545</sub> ialah nilai serapan telaga pada jarak gelombang 545 nm.

#### UJIAN ANTIVIRUS SECARA PASCA RAWATAN

Ujian antivirus ini dijalankan berpandukan kepada kaedah yang digunakan oleh Souza et al. (2008) dengan sedikit pengubahsuaian Sel Vero dikulturkan di dalam piring 12-telaga dan dijangkitkan dengan 50 pfu virus selama 120 minit (tempoh penjerapan) pada suhu 37 °C dengan persekitaran 5% CO<sub>2</sub>. Ekstrak fermentasi dilarutkan dalam metilselulosa 1% (MCS) pada kepekatan 0.5, 3, 6, 9, 12 dan 15% (v/v) sebelum dimasukkan secara perlahan-lahan ke dalam telaga kecuali telaga kawalan. Telaga kawalan

positif mengandungi MCS dan 5 µM ACV manakala telaga kawalan hanya diisi dengan MCS sahaja. Piring kemudiannya dieram selama 48 jam pada suhu 37 °C sebelum diwarnakan dengan kristal ungu. Selepas tempoh eraman, setiap telaga diperiksa untuk pembentukan plak. Peratus aktiviti antivirus dihitung menggunakan formula berikut:

$$\text{Aktiviti antivirus (\%)} = \frac{\text{Jumlah plak kawalan} - \text{Jumlah plak ujian}}{\text{Jumlah plak kawalan}} \times 100$$

#### UJIAN ANTIVIRUS SECARA PRA-RAWATAN

Pemiringan dan pengeraman sel Vero untuk ujian pra-rawatan dilakukan seperti yang diterangkan dalam asai rawatan pasca rawatan. Selepas semalaman, medium dikeluarkan dan sebanyak 1 mL ekstrak JL yang dilarutkan dengan DMEM bersama 5% FBS dengan kepekatan yang berbeza dimasukkan ke dalam telaga. Enam kepekatan JL digunakan dengan kepekatan bermula pada 0.5, 3, 6, 9, 12 dan 15% (v/v). Telaga kawalan dieramkan bersama media DMEM sahaja. Ekstrak kemudian dibilas dari telaga dan sel seterusnya dijangkitkan dengan 100 pfu virus selama 120 minit tempoh penjerapan. Kemudian, MCS dimasukkan secara perlahan-lahan ke dalam semua telaga. Piring kemudiannya dieram selama 48 jam pada suhu 37 °C dengan persekitaran yang mengandungi 5% CO<sub>2</sub> sebelum diwarnakan dengan kristal ungu. Selepas tempoh eraman setiap telaga diperiksa untuk kewujudan plak (Souza et al. 2008). Peratus aktiviti virus kemudian dihitung menggunakan formula sama seperti dalam asai pasca rawatan.

#### UJIAN VIRUSID

Bagi ujian virusid, ekstrak JL dilarutkan dengan DMEM pada kepekatan sebanyak 0.94, 1.88, 3.75, 7.5 dan 15% (v/v) dan dieramkan bersama virus HSV-1 pada kepekatan 10<sup>6</sup> pfu selama 15, 30 dan 60 minit di dalam tiub mikro pada suhu 37 °C. Untuk kawalan, virus tersebut hanya dieramkan di dalam media tanpa sebarang ekstrak. Selepas tempoh eraman, media yang mengandungi ekstrak dan virus akan dicairkan ke kepekatan yang lebih rendah bagi mengurangkan titer virus tersebut sebelum asai pembentukan plak ke atas sel Vero di jalankan (Shogan et al. 2006). Asai pembentukan plak dan pengiraan adalah mengikut kaedah sebelum ini.

#### ASAI PENJERAPAN

Asai penjerapan dilakukan berdasarkan kaedah oleh Logu et al. (2000) dengan sedikit pengubahsuaian. Sel Vero yang telah konfluen disejukkan pada suhu 4 °C selama dua jam. Media pertumbuhan yang lama dibuang dan digantikan dengan media yang mengandungi JL pada kepekatan

berbeza (0.9, 1.8, 3.75, 7.5 dan 15.0%) dan 100 pfu HSV-1. Sel yang dijangkiti HSV-1 tanpa JL dijadikan sebagai telaga kawalan. Sel yang dijangkiti kemudian dieram pada 4 °C selama tiga jam untuk proses penjerapan berlaku. Seterusnya, media yang mengandungi JL dan virus yang tidak berjaya menjerap pada sel dibuang dan dibasuh dengan penimbal PBS (pH 7.4) sejuk sebanyak dua kali. Media bersama MCS ditambah dan piring dieram selama 48 jam pada suhu 37 °C dengan 5% CO<sub>2</sub>. Selepas eraman, pewarnaan dilakukan untuk menentukan pembentukan plak dan peratusan pengurangan plak dihitung.

#### ASAI PELAKURAN

Asai pelakuran dijalankan berdasarkan kaedah yang dijalankan oleh Logu et al. (2000). Sel Vero yang telah konfluen di dalam piring disejukkan pada suhu 4 °C selama satu jam sebelum dijangkiti 100 pfu HSV-1. Piring kemudian disejukkan sekali lagi selama 3 jam untuk membolehkan virus menjerap pada permukaan sel. Selepas tiga jam eraman, inokulum virus dikeluarkan dan virus yang tidak menjerap dibasuh dengan PBS (pH 7.4) sejuk sebanyak dua kali. Kemudian, JL pada kepekatan 0.9, 1.8, 3.75, 7.5 dan 15.0% ditambah dan piring dieram pada suhu 37 °C dengan 5% CO<sub>2</sub> untuk proses pelakuran virus ke dalam sel perumah. Selepas 15 minit, sel yang dijangkiti dibasuh dengan penimbal PBS (pH 3) selama 1 minit untuk menyahaktifkan virus yang tidak dapat menembusi sel diikuti dengan basuhan menggunakan PBS sejuk dan DMEM. Seterusnya, media bersama MCS ditambah dan piring dieram selama 48 jam pada suhu 37 °C dengan 5% CO<sub>2</sub>. Selepas plak terbentuk, pewarnaan dilakukan dan peratusan pengurangan plak dihitung. Sel yang dijangkiti HSV-1 tanpa rawatan JL digunakan sebagai kawalan.

#### UJIAN PEWARNAAN NEGATIF DAN PENCERAPAN MENGGUNAKAN MIKROSKOP TRANSMISI ELEKTRON (TEM)

Pencerapan zarah HSV-1 dilakukan menggunakan teknik pewarnaan negatif dengan grid Formvar sebagai sokongan filem. Keadaan grid hidrofilik dikekalkan terlebih dahulu dengan menitiskan 1% akueus *Alcian blue* ke atas grid selama 5 minit dan kemudian grid tersebut dibasuh dengan 5 titis air suling atau sehingga titisan menjadi jernih. Sementara itu, HSV-1 (10<sup>6</sup> pfu) dieram dengan 500 µL ekstrak JL pada kepekatan 15% selama 1 jam pada suhu 37 °C dengan persekitaran 5% CO<sub>2</sub>. Sampel kawalan mengandungi virus dan DMEM sahaja. Selepas pengeraman, kedua-dua sampel telah diletakkan ke grid hidrofilik dan dibiarkan merebak dan melekat pada grid selama 3 minit. Sampel kemudian diwarnakan dengan uranil asetat 3% selama 5 minit dan dicerap menggunakan mikroskop transmisi elektron JEM-2100F (JEOL Ltd, Jepun).

#### ANALISIS STATISTIK

Kesemua data dalam kajian ini dijalankan dalam triplikat dan dinyatakan dalam nilai min ± sisihan piawai min. Data dianalisis menggunakan perisian MINITAB Versi 20 dengan menggunakan analisis varian (ANOVA) sehala pada aras keyakinan 95% (p < 0.05).

#### HASIL DAN PERBINCANGAN

##### UJIAN SITOTOKSIK EKSTRAK JL KE ATAS SEL VERO

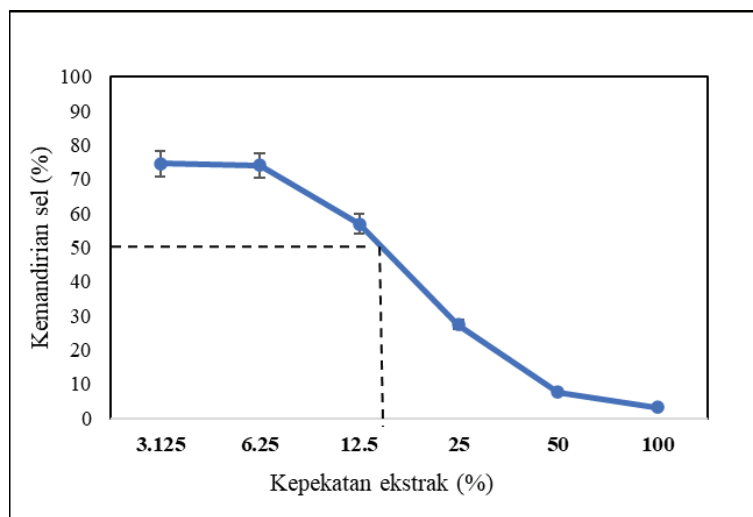
Ujian sitotoksik *in vitro* dijalankan untuk menentukan kepekatan ekstrak yang boleh menyebabkan 50% kematian sel yang disebut sebagai nilai CC<sub>50</sub>. Dalam kajian ini, ujian sitotoksik ke atas ekstrak JL telah dijalankan untuk menentukan nilai CC<sub>50</sub> terhadap kemandirian sel Vero. Hasil ujian ini mendapati nilai CC<sub>50</sub> bagi JL ialah 15.17% (Rajah 1). Nilai CC<sub>50</sub> yang ditentukan digunakan sebagai rujukan untuk menentukan kepekatan ekstrak maksimum yang tidak toksik terhadap sel Vero untuk asai antivirus berikutnya. Justeru, nilai kepekatan yang boleh digunakan untuk tujuan ujian antivirus seterusnya bagi JL adalah tidak melebihi 15.17%.

##### UJIAN SARINGAN EKSTRAK JL DALAM MERENCAT AKTIVITI HSV-1 SECARA PASCA RAWATAN, PRA-RAWATAN DAN VIRUSID

Aktiviti antivirus ekstrak JL telah dikaji dalam konteks tiga rawatan utama iaitu kesan pasca, pra dan virusid menggunakan asai pengurangan plak ialah pengukuran kuantitatif bilangan plak yang dibentuk oleh virus pada pelbagai pencairan (Smither et al. 2013). Peratus perencatan aktiviti antivirus dihitung berdasarkan peratus pengurangan plak berbanding jumlah plak di dalam telaga kawalan. Bagi asai pasca rawatan (Rajah 2(A)), beberapa siri kepekatan ekstrak JL digunakan untuk mengkaji kesan kepekatan tersebut terhadap pengurangan plak selepas jangkitan HSV-1 pada sel Vero. Hasil daripada uji kaji ini mendapati JL menunjukkan pengurangan plak sebanyak 100% pada kepekatan ekstrak 9, 12 dan 15%. Berdasarkan keputusan ini, dapat dirumuskan bahawa proses perencatan oleh ekstrak ini mungkin berlaku pada beberapa peringkat replikasi virus selepas ia menembusi sel. Perencatan selepas penjerapan termasuklah semasa kitar replikasi yang melibatkan transkripsi gen virus dan proses pembentukan sampul virus (Nur Suhana et al. 2018).

Ujian pra-rawatan juga dijalankan untuk menilai potensi JL dalam menghentikan penjerapan virus ke dalam sel (Rajah 2(B)). Dalam ujian ini, trend yang berlainan dapat diperhatikan pada jumlah pengurangan plak mengikut kepekatan ekstrak yang berbeza. Walaupun kepekatan ekstrak yang sama digunakan seperti dalam ujian pasca rawatan, peratus pengurangan plak dalam ujian





RAJAH 1. Peratus kemandirian sel Vero selepas rawatan dengan ekstrak JL

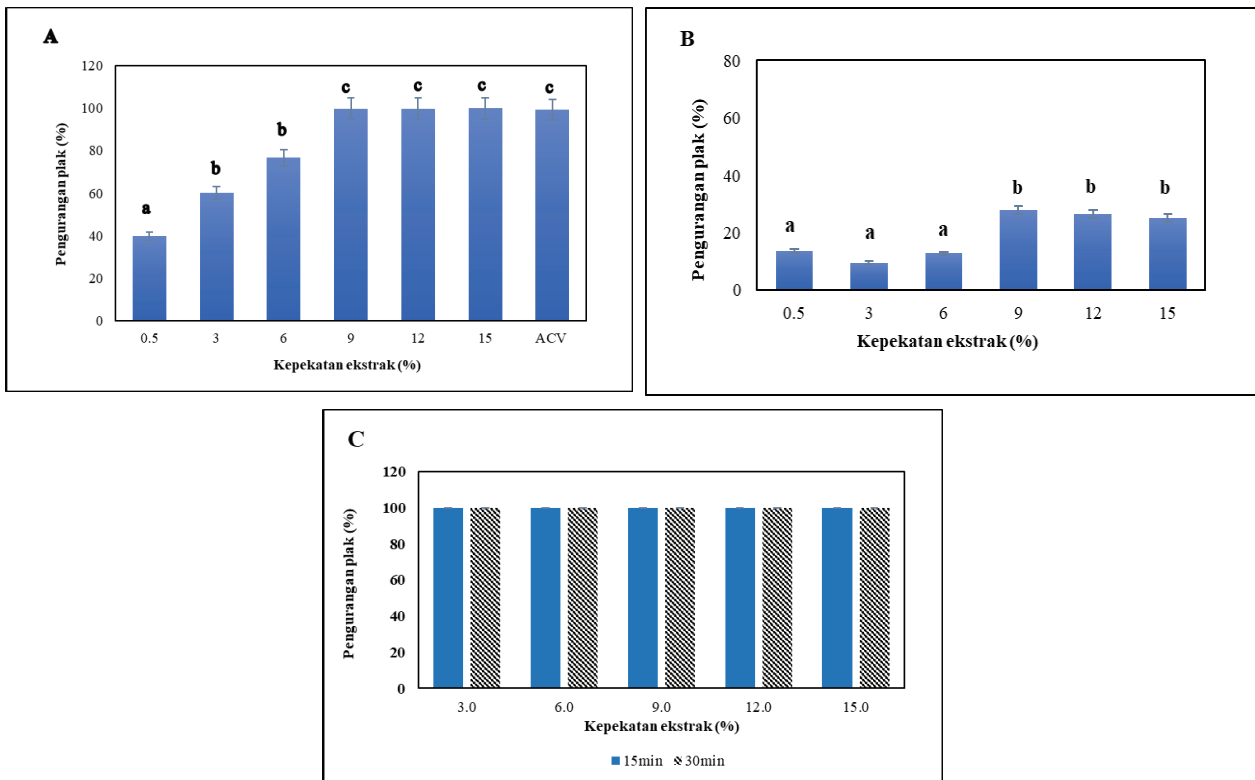
pra-rawatan ini didapati jauh lebih rendah. Hasil daripada ujian ini mendapati perencatan aktiviti virus oleh ekstrak JL adalah antara  $9.67 \pm 3.77\%$  ke  $28.0 \pm 0.94\%$ . Kajian pra rawatan bertujuan untuk melihat kesan ekstrak sebagai agen profilaksis yang boleh melindungi sel Vero daripada jangkitan HSV-1.

Perencatan HSV-1 yang lebih rendah dalam ujian pra-rawatan berbanding ujian pasca rawatan memberi kemungkinan bahawa ekstrak itu lebih berkesan untuk mengganggu proses replikasi atau kemasukan virus selepas virus telah menjangkiti sel. Ia menunjukkan bahawa ekstrak mungkin mempunyai mekanisme tindakan yang mensasarkan peringkat replikasi virus dalam sel perumah dan bukannya menghalang penjerapan atau pelakuran awal. Perbezaan keberkesanan antara ujian pasca dan pra-rawatan ini penting untuk memahami masa dan peringkat yang mana agen antivirus bertindak untuk membangunkan rawatan yang lebih bersasar dan berkesan terhadap jangkitan HSV-1.

Keberkesanan sesuatu bahan atau ekstrak sebagai agen antivirus boleh dinilai berdasarkan indeks selektif (SI) dan ia merujuk kepada nisbah antara jumlah kepekatan ekstrak yang toksik dan jumlah kepekatan ekstrak yang berkesan sebagai antivirus di dalam titisan sel yang khusus. Secara teori, nilai SI yang lebih tinggi menunjukkan bahan atau ekstrak tersebut lebih berkesan dan selamat untuk diteruskan dalam kajian *in vivo* (Cunha, Ferreira & Vaz 2021). Ini bermaksud walaupun ekstrak tersebut mempunyai peratus sitotoksik yang tinggi, ia berupaya merencat aktiviti virus pada kepekatan yang minimum dan jauh lebih rendah daripada kepekatan yang toksik kepada sel. Perbandingan nilai SI bagi ekstrak JL dalam kedua-dua uji kaji iaitu pasca rawatan dan pra-rawatan adalah seperti ditunjukkan dalam Jadual 3. Hasil analisis menunjukkan

bahawa JL mempunyai nilai SI yang lebih tinggi untuk pasca rawatan dengan nilai SI adalah 8.24. Berdasarkan keputusan kajian pra-rawatan yang menunjukkan nilai SI yang lebih rendah, ia menunjukkan bahawa ekstrak JL ini mungkin tidak berkesan dalam melindungi sel Vero daripada jangkitan HSV-1. Hasil kajian ini adalah sama seperti yang pernah dilaporkan oleh Nur Suhana dan Norefrina Shafinaz (2018) dengan kajian ke atas ekstrak akueus *Orthosiphon stamineus* juga didapati mempunyai nilai SI yang lebih rendah dalam pra-rawatan tetapi menunjukkan aktiviti antivirus yang lebih baik secara pasca rawatan dan virusid. Oleh kerana ekstrak produk semula jadi terdiri daripada campuran kompleks sebatian kimia yang akan menyumbang secara berbeza kepada kesan biologinya, nilai SI pada kebiasaannya tidak terlalu tinggi. Walau bagaimanapun, sesetengah penyelidik menganggap bahawa produk semula jadi (ekstrak atau sebatian) dengan nilai SI lebih dari 2 akan menjadi agen antivirus yang baik (Nogueira & do Rosário 2010).

Asai virusid dijalankan dengan mendedahkan JL secara terus pada zarah HSV-1 selama 15 dan 30 minit (Rajah 2(C)). Kesan virusid ekstrak merujuk kepada keupayaannya untuk menyahaktif atau memusnahkan struktur zarah virus secara langsung. Apabila ekstrak menunjukkan kesan virusid, ini bermakna ia boleh mengurangkan atau menghapuskan kebolehjangkitan virus dengan berkesan, menghalang keupayaannya untuk mereplikasi dan menyebabkan jangkitan. Merujuk kepada Rajah 2(C), pendedahan terus HSV-1 kepada ekstrak JL menunjukkan keberkesanan perencatan sebanyak 100% aktiviti virus bagi setiap kepekatan yang digunakan. Ini menunjukkan ekstrak fermentasi yang digunakan dalam kajian ini mempunyai kelebihan untuk merencat aktiviti virus secara virusid tanpa menjejaskan kemandirian sel.



RAJAH 2. Peratus pengurangan plak bagi ekstrak JL bagi asai pasca rawatan (A), pra-rawatan (B) dan virusid (C). Kepekatan kawalan positif (ACV) adalah 5 µM. Abjad yang berbeza menunjukkan perbezaan signifikan (P<0.05) pada nilai min

JADUAL 3. Nilai CC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> dan SI bagi ekstrak JL dalam pasca-rawatan dan pra-rawatan

	CC <sub>50</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (%)	SI (CC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> )
Pasca rawatan	15.17	1.84	8.24
Pra-rawatan	15.17	6.28	2.41

Penurunan titer virus yang diperhatikan dalam asai ini mungkin disebabkan oleh tindakan secara langsung ekstrak terhadap sampul dan glikoprotein HSV-1 yang mengakibatkan ia gagal menjerap serta menembusi ke dalam sel. Kajian oleh Nur Suhana et al. (2018) dan Schuhmacher, Reichling dan Schnitzler (2003) menggunakan ekstrak daun misai kucing dan daun pudina pernah melaporkan bahawa zarah HSV-1 yang terampai adalah sangat sensitif terhadap ekstrak yang mempunyai aktiviti virusid. Sebagai contoh, ekstrak misai kucing didapati berupaya memusnahkan sampul virus seterusnya merencat virus daripada melekat dan menembusi sel hos. Oleh yang demikian, ekstrak JL mempunyai kelebihan yang ketara berbanding dadah komersil seperti *acyclovir*,

*penciclovir* dan *foscarnet* yang mempunyai nilai indeks selektif yang lebih tinggi tetapi tidak menunjukkan aktiviti virusid terhadap HSV-1 (Arvin et al. 2007).

POTENSI JL UNTUK MENGHALANG PENJERAPAN DAN PELAKURAN HSV-1 PADA SEL PERUMAH

Aktiviti virusid JL yang tinggi terhadap HSV-1 dalam ujian saringan memberikan gambaran awal untuk mengkaji dan memahami mekanisme yang terlibat. Asai penjerapan dan pelakuran dijalankan untuk memahami dan mengkaji lebih lanjut mengenai kesan pendedahan JL secara terus terhadap zarah HSV-1. Dalam ujian penjerapan, virion HSV-1 dibiarkan untuk menjerap ke sel perumah dengan kehadiran

JL di dalam media pertumbuhan. Hasil ujian ini mendapati JL berjaya menghalang proses penjerapan HSV-1 pada kepekatan yang lebih tinggi. Hasil ujian ini mendapati ekstrak JL berjaya mengurangkan 100% pembentukan plak pada kepekatan 7.5 dan 15% (Rajah 4). Di samping itu, keputusan ujian ini menunjukkan aktiviti antivirus adalah bergantung kepada kepekatan ekstrak. Kepekatan terendah yang digunakan iaitu 0.9% masih mampu mengurangkan pembentukan plak lebih daripada 70%.

Asai pelakuran pula dijalankan untuk mengetahui kesan rawatan JL dalam menghalang proses pelakuran antara dua membran iaitu membran sampul HSV-1 dan membran plasma sel selepas penjerapan virus ke dalam perumah dilakukan. Kepekatan JL sebanyak 15% berjaya menghalang penjerapan virus pada sel dalam ketiga-tiga tempoh pendedahan yang digunakan. Keupayaan merencat pembentukan plak didapati semakin menurun apabila kepekatan JL semakin kurang dan tempoh pendedahan semakin singkat. Rajah 5 menunjukkan peratus pengurangan plak oleh JL dalam asai pelakuran.

Kitaran hayat lengkap virus merangkumi beberapa langkah penting; 1) penjerapan, 2) pelakuran, 3) replikasi genom dan 4) pemasangan serta 5) pelepasan progeni virus. Proses penjerapan dan pelakuran adalah merupakan langkah kritikal dalam kitaran jangka hayat HSV-1. Semasa penjerapan, virus melekat pada reseptor khusus pada permukaan sel perumah. Langkah ini dimediasi oleh glikoprotein sampul virus, terutamanya glikoprotein C (gC) dan glikoprotein B (gB) (Hadigal & Shukla 2013). Penjerapan tersebut membolehkan virus berinteraksi dan terikat pada sel, mewujudkan suatu hubungan yang diperlukan untuk langkah seterusnya dalam proses jangkitan. Selepas penjerapan, pelakuran berlaku apabila sampul virus bergabung dengan membran sel perumah. Proses penjerapan dan pelakuran ini penting kerana ia membolehkan HSV-1 memasuki sel hos, membolehkan ia mewujudkan jangkitan dan mereplikasi dalam hos. Tanpa kedua-dua proses ini, virus tidak boleh mendapat akses kepada jentera sel perumah untuk bereplikasi (Kukhanova et al. 2014).

Ujian virusid yang dijalankan dalam saringan awal aktiviti antivirus menunjukkan bahawa ekstrak JL berjaya merencat jangkitan virus daripada berlaku. Kesan virusid ekstrak tumbuhan pada virion HSV-1 adalah melibatkan penyahaktifan langsung atau pemusnahan virus. Ini bermakna bahawa ekstrak mungkin mempunyai komponen yang berinteraksi dengan zarah virus, mengganggu struktur atau fungsinya, membawa kepada ketidakaktifan dan menghalangnya daripada menjangkiti sel perumah. Kesan ini juga diperhatikan dalam kajian pada ekstrak *Euphorbia jolkini* yang berupaya menghalang penembusan dan replikasi virus manakala ekstrak *Phellodendron amurense* pula didapati lebih berkesan apabila didedahkan kepada virion sebelum jangkitan (Cheng et al. 2004; Wang et al. 2009). Keputusan sama juga diperolehi bagi ekstrak

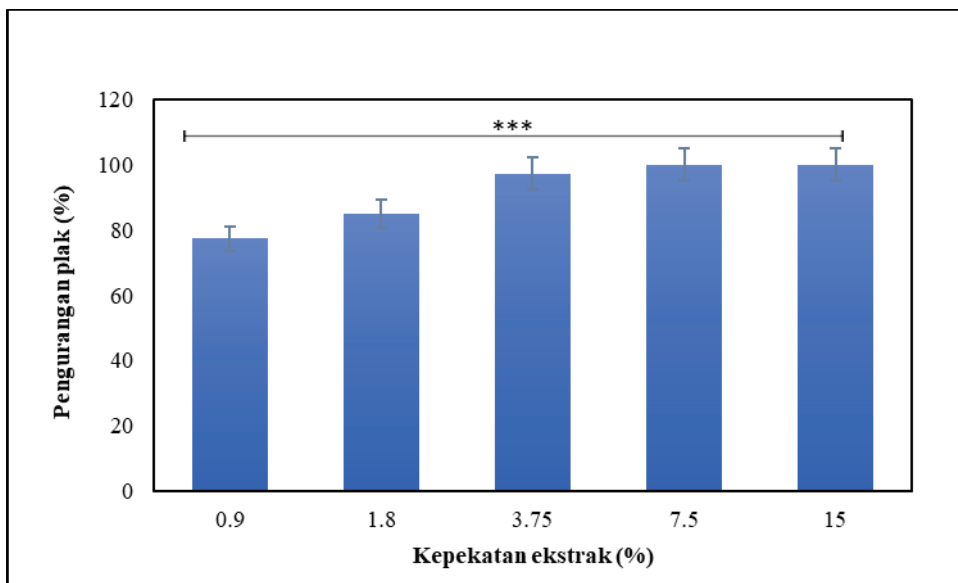
*Orthosiphon stamineus* yang menunjukkan perencatan 100% jangkitan HSV-1 tanpa mengira tempoh rawatan, menunjukkan kesan virusid secara langsung (Nur Suhana et al. 2018). Penemuan ini menyokong mekanisme yang dicadangkan bahawa ekstrak tumbuhan boleh menasarkkan dan mengganggu komponen virus kritikal yang membawa kepada penyahaktifan dan pencegahan jangkitan.

Ujian penjerapan dan pelakuran menunjukkan bahawa aktiviti virusid yang ditunjukkan oleh JL berupaya menghalang kedua-dua proses penjerapan dan pelakuran. Berdasarkan penemuan dalam ujian penjerapan dan pelakuran, hipotesis yang dibuat adalah mekanisme virusid JL melibatkan pengubahsuaian atau gangguan struktur HSV-1 terutamanya pada sampul virus.

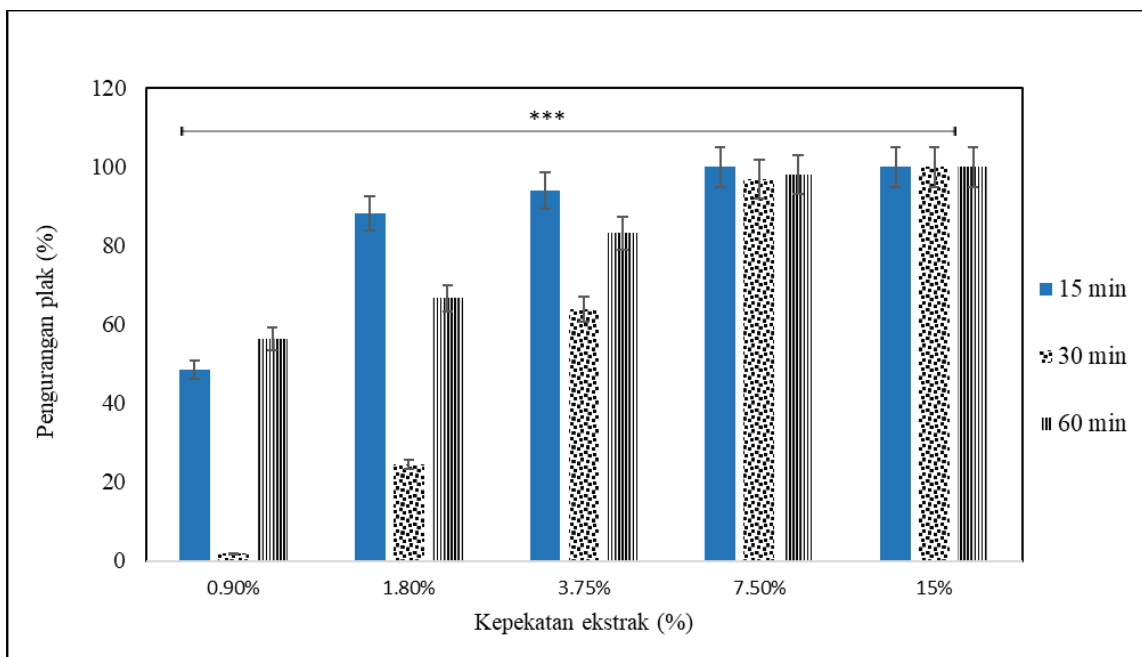
Penilaian mikroskopik menggunakan TEM telah dilakukan untuk melihat dan mengesahkan sama ada mekanisme perencatan JL adalah disebabkan oleh perubahan morfologi HSV-1 atau sebaliknya. Struktur HSV-1 adalah kompleks yang mempunyai struktur yang nyata dan boleh dicerap secara jelas menggunakan TEM (Rajah 6). Empat struktur utama yang diterangkan adalah kawasan teras dimana terletak DNA, kapsid, lapisan yang mengandungi protein tegumen dan sampul yang terdiri daripada glikoprotein (Liu & Zhou 2007). Berdasarkan pemerhatian, struktur asal HSV-1 yang digambarkan seperti telur goreng telah musnah setelah dirawat dengan JL. Sampul virus yang terawat dengan JL menunjukkan morfologi virus yang telah musnah.

Sampul HSV-1 memainkan peranan penting dalam kitaran hayat dan kepatogenesis virus. Sampul adalah lapisan paling luar virus dan terlibat dalam beberapa fungsi utama yang penting untuk jangkitan virus. Sampul adalah penting untuk penjerapan awal kepada sel perumah, yang mana glikoprotein pada sampul virus berinteraksi dengan reseptor permukaan sel tertentu, seperti *glycosaminoglycans* dan *nectin-1* untuk memudahkan pengikatan virus (Hadigal & Shukla 2013).

Glikoprotein penting HSV-1 yang terlibat dalam langkah penjerapan dan pelakuran ialah glikoprotein D (gD), glikoprotein B (gB), glikoprotein H (gH) dan glikoprotein L (gL). Glikoprotein D memainkan peranan penting dalam lampiran virus dengan berinteraksi dengan reseptor permukaan sel tertentu, memudahkan pengikatan awal virus kepada sel hos. Berikutan perlekatan, glikoprotein D mencetuskan rangkaian interaksi dengan gH dan gB yang membawa kepada gabungan membran antara sampul virus dan membran sel perumah (Arvin et al. 2007). Glikoprotein B terlibat dalam proses pelakuran, manakala glikoprotein H dan L membentuk kompleks yang penting untuk pelakuran membran semasa kemasukan HSV-1 ke dalam sel perumah. Glikoprotein ini berfungsi bersama untuk mengantara langkah lampiran dan gabungan yang kritikal untuk jangkitan HSV-1. Selain itu, sampul menyumbang kepada struktur ciri virus, yang penting untuk kestabilan dan kebolehhajkitannya (Dong et al. 2021).

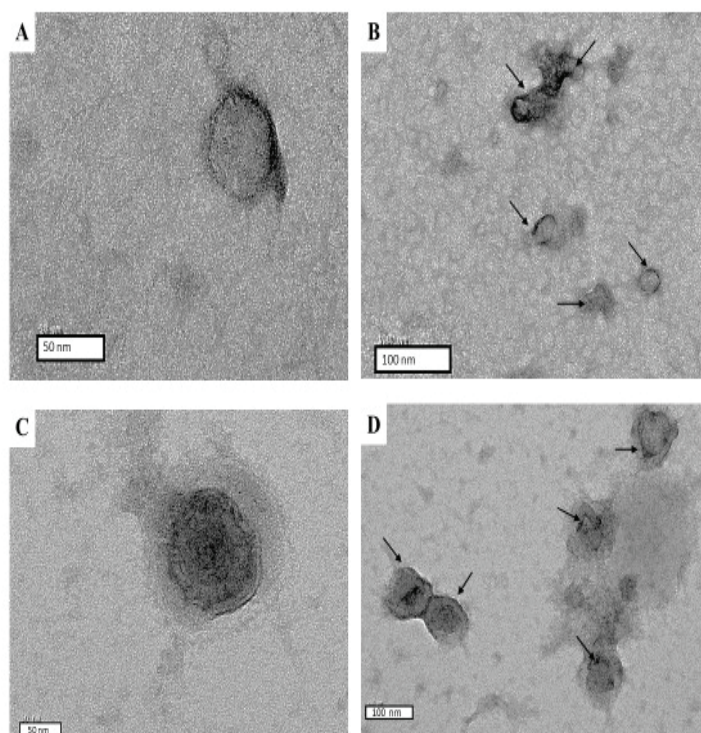


RAJAH 4. Peratusan pengurangan plak oleh JL pada kepekatan berbeza (0.9, 1.8, 3.75, 7.5 dan 15%) dalam asai penjerapan. Nilai mewakili min dari 3 uji kaji bebas, dihitung berdasarkan nilai kawalan negatif; \*\*\* p <0.05 (ANOVA sehala)



RAJAH 5. Peratusan pengurangan plak oleh JL pada kepekatan berbeza (0.9, 1.8, 3.75, 7.5 dan 15%) dalam asai pelakuran pada tempoh pendedahan selama 15, 30 dan 60 minit. Nilai mewakili min dari 3 uji kaji bebas, dihitung berdasarkan nilai kawalan negatif; \*\*\* p <0.05 (ANOVA sehala)





RAJAH 6. Perubahan pada morfologi HSV-1 setelah terdedah kepada JL pada kepekatan 15% selama 60 minit. Gambar A dan B merupakan zarah HSV-1 yang terdedah kepada JL dengan sampul dan kapsid setiap zarah tidak kelihatan manakala gambar C dan D adalah sampel kawalan HSV-1 yang mana zarah HSV-1 masih mengekalkan morfologi yang lengkap dan struktur yang utuh. Magnifikasi bagi gambar A dan C ialah x50k, gambar B ialah x25k dan gambar D ialah x30k

Dalam kajian terhadap ekstrak *Artemisia argyi*, analisis TEM menunjukkan bahawa ekstrak tersebut telah menyebabkan kerosakan pada sampul virus dengan memusnahkan integriti membran virion HSV-1 yang kemudiannya menjejaskan penjerapan dan pelakuran virus (Xiao et al. 2023). Kesan yang sama juga pernah ditunjukkan oleh ekstrak akueus *Orthosiphon stamineus* (OS) kerana didapati ekstrak ini dapat mengurangkan plak HSV-1 dalam ujian virusid dan analisis lanjut menggunakan TEM pada virion yang dirawat OS menunjukkan berlaku kerosakan pada sampul virus selepas ia didedahkan secara terus dengan ekstrak (Nur Suhana & Norefrina Shafinaz 2018).

Hasil pemerhatian di bawah TEM menunjukkan bahawa ketidakupayaan HSV-1 untuk menjerap dan melakur pada sel Vero adalah disebabkan oleh gangguan pada struktur HSV-1 iaitu pada sampul dan juga kapsid. Selain sampul, kapsid HSV-1 adalah sama penting untuk kemandirian dan replikasi virus. Dalam konteks penjerapan dan pelakuran virus, kapsid terlibat dalam pendokkan pada kompleks liang nukleus perumah semasa peringkat awal jangkitan. Lampiran ini membolehkan genom virus

berpindah melalui liang nukleus ke dalam nukleoplasma dan ia boleh ditranskripsi dan direplikasi untuk menyebarkan jangkitan. Kapsid juga memainkan peranan penting dalam kestabilan virus, memastikan genom virus kekal utuh dan dilindungi (Buck, Day & Trus 2013).

#### KESIMPULAN

Kajian ini telah menunjukkan keupayaan ekstrak JL sebagai agen anti HSV-melalui kaedah pasca rawatan, pra-rawatan dan virusid. Daripada pemerhatian yang dijalankan, ekstrak JL didapati mempunyai tahap ketoksikan yang sederhana terhadap sel Vero kerana komposisi ekstrak yang kaya dengan asid organik dan bersifat asidik. Melalui analisis penjerapan dan pelakuran HSV-1 serta pemerhatian zarah virus menggunakan TEM mendapati interaksi langsung HSV-1 dengan ekstrak JL telah menyebabkan kemusnahan sampul virus. Kebolehan ekstrak fermentasi ini merencat virus secara virusid menunjukkan ia mempunyai mekanisme yang berbeza dengan ACV dan mempunyai potensi untuk dibangunkan sebagai agen antivirus terhadap strain virus yang rintang dadah.

## PENGHARGAAN

Kajian ini disokong oleh Pusat Penyelidikan Hortikultur, MARDI dan dibiayai oleh Dana Geran Penyelidikan Kumpulan Wang Pembangunan Kerajaan Malaysia RMK-11 (P21003004050001). Kajian ini turut dibiayai oleh geran Universiti Penyelidikan GUP-2018-017.

## RUJUKAN

- AAT Bioquest, Inc. *Quest Graph™*  $IC_{50}$  Calculator. <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator> (Diakses 20 Jun 2020).
- Adibah Bahtiar, Norefrina Shafinaz Md Nor & Nazlina Ibrahim. 2016. *In vitro* antiviral activity of styrylpyrone derivative-incorporated formulations against herpes simplex virus type-1. *Malaysian Journal of Microbiology* 12(3): 228-232.
- Agung Biworo, Efrilia Tanjung, Iskandar, Khairina & Eko Suhartono. 2015. Antidiabetic and antioxidant activity of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) extract. *Journal of Medical and Bioengineering* 4(4): 318-323.
- Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P.S., Roizman, B., Whitley, R. & Yamanishi, K. 2007. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bhattacharjee, C. & Dutta, A. 2013. Phytochemical and acute toxicity study of leaves of *Artocarpus heterophyllus* Lam. *International Journal of Allied Medical Sciences and Clinical Research* 1(2): 78-81.
- Buck, C.B., Day, P.M. & Trus, B.L. 2013. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology* 445(1-2): 169-174.
- Cheng, H-Y., Lin, T-C., Yang, C-M., Wang, K-C., Lin, L-T. & Lin, C-C. 2004. Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits both virus entry and late stage replication of herpes simplex virus type 2 *in vitro*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53(4): 577-583.
- Cunha, A.C., Ferreira, V.F. & Vaz, M.G.F. 2021. Chemistry and anti-herpes simplex virus type 1 evaluation of 4-substituted-1H-1,2,3-triazole-nitroxyl-linked hybrids. *Mol. Divers* 25: 2035-2043.
- De Logu, A., Loy, G., Pellerano, M.L., Bonsignore, L. & Schivo, M.L. 2000. Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. *Antiviral Research* 48(3): 177-185.
- Dong, H., Wang, Z., Zhao, D., Len, X. & Zhao, Y. 2021. Antiviral strategies targeting herpesviruses. *Journal of Virus Eradication* 7(3): 100047.
- Hadigal, S. & Shukla, D. 2013. Exploiting herpes simplex virus entry for novel therapeutics. *Viruses* 5: 1447-1465.
- Kukhanova, M.K., Korovina, A.N. & Kochetkov, S.N. 2014. Human herpes simplex virus: Life cycle and development of inhibitors. *Biochemistry (Moscow)* 79(13): 1635-1652.
- Laavanya, D., Shivanand, S. & Balasubramaniam, P. 2021. Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. *Journal of Cleaner Production* 295: 126454.
- Leonard, W., Zhang, P., Ying, D., Adhikari, B. & Fang, Z. 2021. Fermentation transforms the phenolic profiles and bioactivities of plant-based foods. *Biotechnology Advances* 49: 107763.
- Liu, F. & Zhou, Z.H. 2007. Comparative virion structures of human herpesviruses. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, edited by Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P.S., Roizman, B., Whitley, R. & Yamanishi, K. Cambridge: Cambridge University Press.
- Masoud Parsania, Mohammad Bagher Rezaee, Seyed Hamidreza Monavari, Kamkar Jaimand, Seyed Milad Mousavi-Jazayeri, Mehdi Razazian & Mohammad Hossein Nadjarha. 2017. Antiviral screening of four plant extracts against acyclovir resistant herpes simplex virus type-1. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 30(4(Suppl.)): 1407-1411.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Muhammad Taher, Najah Fatehah Mohd Razali, Deny Susanti, Md. Atiar Rahman, Muh Ade Artasasta & Zainul Amiruddin Zakaria. 2022. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Picrasma javanica*: Quassinoids interest. *Sains Malaysiana* 51(3): 757-774.
- Nogueira, F. & do Rosário, V.E. 2010. Methods for assessment of antimalarial activity in the different phases of the *Plasmodium* life cycle. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 1(3): 109-124.
- Norhazniza Aziz, Koh Soo Peng, Rosmawati Abdullah, Nur Syazwani Abdul Hamid & Razali Mustaffa. 2018. The phytochemical and antioxidant characteristics of fermented jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) leaves using single and mixed starter culture. *Journal of Food Science and Engineering* 8(1): 55-60.
- Nur Suhana, M.R. & Norefrina Shafinaz, M.N. 2018. Virucidal properties of *Orthosiphon stamineus* against herpes simplex virus type 1 (HSV-1). *Malaysian Journal of Microbiology* 14: 590-578.
- Nur Suhana Mohamad Ripim, Nuraini Fazil, Saidatul Ibrahim, Adibah Bahtiar, Yip Chee Wai, Nazlina Ibrahim & Norefrina Md Nor. 2018. Antiviral properties of *Orthosiphon stamineus* aqueous extract in herpes simplex virus type 1 infected cells. *Sains Malaysiana* 47(8): 1725-1730.

- Sarah Sabidi, Soo Peng Koh, Shazwan Abd Shukor, Shaiful Adzni Sharifudin & Yun Shin Sew. 2020. Safety assessment of fermented jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) pulp and leaves in Sprague-Dawley rats. *Food Science & Nutrition* 8(8): 4370-4378.
- Schnitzler, P., Schneider, S., Stintzing, F.C., Carle, R. & Reichling, J. 2008. Efficacy of an aqueous *Pelargonium sidoides* extract against herpesvirus. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 15(12): 1108-1116.
- Schuhmacher, A., Reichling, J. & Schnitzler, P. 2003. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 *in vitro*. *Phytomedicine* 10(6-7): 504-510.
- Sharma, N. 2012. Process optimization for fermentation of wine from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). *Journal of Food Processing & Technology* 04(02): 1-5.
- Sheau Ting Yong, Paris Leonardo Lavin, Marcelo Aravena Gonzalez & Clemente Michael Vui Ling Wong 2023. A *Talaromyces* fungal species with strong antimicrobial activity from Deception Island, Antarctica. *Sains Malaysiana* 52(1): 83-93.
- Shogan, B., Kruse, L., Mulamba, G.B., Hu, A. & Coen, D.M. 2006. Virucidal activity of a GT-rich oligonucleotide against herpes simplex virus mediated by glycoprotein B. *J. Virol.* 80(10): 4740-4747.
- Smither, S.J., Lear-Rooney, C., Biggins, J., Pettitt, J., Lever, M.S. & Olinger, G.G. 2013. Comparison of the plaque assay and 50% tissue culture infectious dose assay as methods for measuring filovirus infectivity. *Journal of Virological Methods* 193(2): 565-571.
- Souza, T.M., De Souza, M.C., Ferreira, V.F., Canuto, C.V., Marques, I.P., Fontes, C.F. & Frugulhetti, I.C. 2008. Inhibition of HSV-1 replication and HSV DNA polymerase by the chloroquinolinic ribonucleoside 6-Chloro-1,4-Dihydro-4-Oxo-1-(Beta-D-Ribofuranosyl) Quinoline-3-carboxylic acid and its aglycone. *Antiviral Research* 77(1): 20-27.
- Swami, S.B. & Kalse, S.B. 2019. Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*): Biodiversity, nutritional contents, and health. In *Bioactive Molecules in Food*. Reference Series in Phytochemistry, edited by Mérillon, J-M. & Ramawat, K.G. Switzerland: Springer Nature. pp. 2237-2259.
- Wang, W., Zu, Y., Fu, Y., Reichling, J., Suschke, U., Nokemper, S. & Zhang, Y. 2009. *In vitro* antioxidant, antimicrobial and anti-herpes simplex virus type 1 activity of *Phellodendron amurense* Rupr. from China. *The American Journal of Chinese Medicine* 37(1): 195-203.
- Xiao, J., Liu, P., Hu, Y., Liu, T., Guo, Y., Sun, P., Zheng, J., Ren, Z. & Wang, Y. 2023. Antiviral activities of *Artemisia vulgaris* L. extract against herpes simplex virus. *Chinese Medicine* 18(1): 21.

\*Pengarang untuk surat-menyurat; email: efrina@ukm.edu.my