

Asplenium nidus Menindas Virus Herpes Simplex pada Awal Fasa Jangkitan, Tindakan Virusidal dan Menurunkan Jangkitan Progeni (*Asplenium nidus* Inhibit Herpes Simplex Virus during the Early Infection Phase, Virucidal Action and Reduces Progeny Infection)

NAZLINA IBRAHIM*, MARIYA MOHD TAHIR & NOREFRINA SHAFINAZ MD NOR

Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM
Bangi, Selangor, Malaysia

Diserahkan: 30 April 2024/Diterima: 1 November 2024

ABSTRAK

Aktiviti antivirus ekstrak akuis akar *Asplenium nidus* atau paku langsuir telah diketahui namun cara tindakannya terhadap virus herpes simplex jenis 1 (HSV-1) belum dikenal pasti. Objektif kajian ini adalah menentukan kandungan sebatian dalam ekstrak akuis akar *Asplenium nidus* (EAAAN) serta tindakannya terhadap fasa awal jangkitan dan virus tersebut secara terus. Ekstrak akar *A. nidus* yang ditentukan melalui kromatografi cecair-spektrum jisim/spektrum jisim (LC-MS/MS) terdiri beberapa sebatian flavonoid iaitu metoksiflavon, rutin, katekin, kaempferol dan asid quinik. Penentuan rawatan EAAAN secara pasca jangkitan menunjukkan peratus pengurangan 75% plak pada kepekatan 12.5 mg/mL berbanding peratus pengurangan 60% melalui ujian pra-rawatan sel secara signifikan pada $p < 0.05$. Seterusnya, EAAAN dapat menghalang penjerapan virus dengan bersandarkan dos yang didedahkan dengan kepekatan yang berkesan terhadap 50% aktiviti antivirus (EC_{50}) adalah pada kepekatan melebihi 1 mg/mL. Seawal 15 minit pasca jangkitan (p.j), EAAAN dapat menghalang penembusan virus ke dalam membran sel. Seterusnya asai virusidal menunjukkan EAAAN memberi kesan langsung terhadap zarah HSV-1 dan disahkan berlaku kerosakan sampul virus melalui pencerapan mikroskopi transmisi elektron. Melalui asai kebolehjangkitan progeni virus, berlaku penurunan titer virus progeni berbanding titer progeni virus dalam sel terjangkit tanpa rawatan. Sebagai kesimpulan, kajian ini mengesahkan ekstrak akuis akar *A. nidus* mengandungi beberapa sebatian flavonoid dengan potensi anti-HSV-1 melalui beberapa tindakan iaitu mengelak jangkitan virus melalui halangan penjerapan dan penembusan virus ke dalam sel iaitu pada fasa awal jangkitan virus, tindakan virusidal yang menyebabkan kerosakan kepada zarah virus dan mengurangkan bilangan progeni virus yang berdayajangkit.

Kata kunci: Akar *Asplenium nidus*; halang penjerapan dan penembusan virus; sebatian flavonoid; virusidal; virus herpes simplex jenis-1

ABSTRACT

Asplenium nidus or Paku Langsuir root aqueous extract (EAAAN) has been identified as having antiviral activity but its mode of action against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is unknown. The objective of this study was to determine the compounds present in EAAAN and the mode of action against HSV-1 early replication stage and directly towards the virus. *Asplenium nidus* root aqueous extract was determined by Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS/MS) contains several flavonoid compounds namely methoxyflavone, rutin, catechin, kaempferol and quinik acid. Post-infection treatment with EAAAN showed 75% plaque reduction percentage at the concentration of 12.5 mg/mL compared to 60% reduction percentage when cells were pretreated prior to infection significantly at $p < 0.05$. Subsequently, EAAAN was able to prevent virus attachment to host cell in dose dependant manner with 50% virus activity concentration (EC_{50}) was more than 1 mg/mL. As early as 15 min post-infection, EAAAN was able to prevent virus penetration into the cell membrane. Virucidal assay showed EAAAN had direct effect against HSV-1 particles and virus envelope was damaged as confirmed by transmission electron microscopy. In virus progeny yield assay, titer of virus progeny compared to titer of virus progeny in infected cells without treatment decreased to 63.3%. As a conclusion, this study confirms that *A. nidus* root aqueous extract contains several flavonoid compounds with potential anti-HSV-1 activity with multiple mode of action including interrupting early phase of virus infection by preventing attachment and penetration into cells, virucidal activity by direct damage to virus particle and reduction in viral progeny infectivity.

Keywords: *Asplenium nidus* root; flavonoid compounds; herpes simplex virus type-1; mode of actions; virusidal

PENGENALAN

Virus herpes simplex jenis satu (HSV-1) adalah virus herpes manusia (HHV) yang tergolong dalam famili *Herpesviridae* (Mims et al. 2004). Ia virus bersampul melitupi bahagian kapsid dengan kandungan DNA bebenang ganda dua (dsDNA). Jangkitan HSV-1 sering berlaku pada epitelium mukosa yang menyebabkan berlakunya gejala ringan kepada teruk seperti lepuhan dan keradangan di bahagian mulut serta sel mata dan dalam kes tertentu boleh menjadi penyakit teruk seperti kebutaan, kehilangan pendengaran atau keradangan otak (Koujah, Suryawanshi & Shukla 2019; Lobo, Agelidis & Shukla 2019).

Jangkitan HSV-1 dapat dirawat secara berkesan dengan Acyclovir (ACV) dan terbitannya (De Clercq et al. 2001). ACV adalah analog nukleosid guanosis (dGTP) yang bertindak menindas virus herpes secara khusus terhadap aktiviti polimerase DNA sekali gus menghalang penghasilan sintesis DNA virus (Gnann Jr., Barton & Whitley 1983). Walau bagaimanapun, penggunaan ACV secara berterusan menyebabkan kerintangan virus meningkat melalui mutasi polimerase DNA dan seterusnya rawatan tersebut gagal memberikan kesan optimum (Korovina et al. 2010). Oleh yang demikian, pencarian agen antivirus yang baharu diperlukan untuk merawat HSV-1 yang rintang kepada agen antivirus yang sedia ada ataupun mempunyai cara tindakan berbeza dengan ACV.

Asplenium nidus tergolong dalam famili Aspleniaceae merupakan spesies epifit yang tumbuh di dalam habitat hutan dengan persekitaran yang redup dan lembap pada ketinggian kurang daripada 350 meter (Maideen et al. 2011). *Asplenium nidus* lebih dikenali sebagai paku langsuir tergolong sebagai paku pakis atau pteridofit sering dijadikan tanaman hiasan selain daripada kegunaan secara tradisi untuk merawat pelbagai penyakit seperti selsema dan jangkitan pada mulut (Benjamin & Manickam 2007). Bahagian akar paku langsuir yang menjadi tumpuan kajian ini kerana pernah dilaporkan mempunyai aktiviti antivirus tertinggi dengan indeks pemilihan (SI = 63) berbanding bahagian daun dengan SI = 20 (Tahir, Ibrahim & Yaacob 2014) serta ekstrak dan fraksi lain pula nilai SI lebih rendah daripada 29 (Tahir et al. 2015).

Secara tradisi di Arunachal Pradesh, India, bahagian akar digunakan bagi merawat demam, sakit untut, melegakan penyakit pada bahagian dada serta pelembap kulit (Benniamin 2001). Di Guam pula, pelepah dan akar digunakan sebagai bahan persediaan ubatan bagi merawat angin ahmar (Anon, tth). Bahagian akarnya menjadi pilihan sebagai bahan menanam pokok berbanding gambut lumut kerana murah, mudah ditemui dan lebih mudah dihasilkan (Pimsuwan et al. 2020).

Selain daripada bukti penggunaan secara tradisi, beberapa kumpulan fitokimia telah ditemui pada paku langsuir seperti flavonoid dan fenol (Hammami 2016; Imperato 1993) yang dikaitkan dengan aktiviti antikanser, antibakteria dan antioksidan (Jarial et al. 2018). Saringan fitokimia dan kemampuan *A. nidus* dalam aktiviti antivirus

secara *in vitro* telah dikenal pasti melalui beberapa kajian menggunakan ekstrak kasar dan fraksi bahagian akar dan daunnya (Tahir, Ibrahim & Yaacob 2014; Tahir et al. 2017, 2015). Namun begitu, belum banyak diketahui berkaitan sebatian kimia pada ekstrak akuas akar *A. nidus* serta mod tindakan antivirusnya sama ada serupa atau berbeza daripada mod tindakan ubat antivirus sedia ada. Maka kajian ini dilakukan bagi mendapat maklumat tersebut sebagai langkah awal kepada pembangunannya sebagai ubatan antivirus alternatif.

BAHAN DAN KAEDAH

SEL DAN VIRUS

Stok sel Vero dan pencilan klinik virus HSV-1 diperoleh daripada simpanan Makmal Virologi, Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi UKM. Pengkulturan sel, perambatan virus serta penentuan kepekatan berkesan virus adalah seperti dijelaskan dalam Tahir et al. (2017).

PENYEDIAAN EKSTRAK DAN PENENTUAN SEBATIAN AKTIF

Sampel akar *A. nidus* kering dikisar menggunakan pengisar (Waring, USA) menjadi serbuk. Seterusnya ekstrak akuas akar *A. nidus* (EAAAN) disediakan seperti dalam Tahir, Ibrahim dan Yaacob (2014). Sebatian aktif EAAAN dianalisis dengan kromatografi cecair spektrometri jisim (LCMS) yang menggunakan sistem RR 1200 Agilent (Waldbronn, Germany) dengan pam binari SL, diod pengesan pelbagai G1315C Starlight dan penyuntik automatik (G1367C SL) yang disambungkan kepada spektrometer jisim Bruker (Bremen, Germany). Analisis telah dijalankan menggunakan turus Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent) dengan saiz granul sebanyak $2.1 \times 10 \text{ mm}^2$ dan $1.8 \mu\text{M}$. Pemisahan kromatografi dilakukan menggunakan air dan asetonitril dengan asid formik 0.1% dan ammonium format 5 mM pada kadar aliran 0.5 mL/min. Sasaran spektrometri jisim/spektrometri jisim (MS/MS) telah dilakukan menggunakan tenaga pelanggaran antara 10-25 eV, bergantung kepada jisim molekul sebatian. Untuk mengenal pasti sebatian, instrumen yang beroperasi dalam mod CID MS/MS dan kromatogram ion tunggal untuk jisim sebenar direkodkan.

UJIAN RAWATAN PASCA JANGKITAN

Ujian rawatan pasca jangkitan adalah seperti dijelaskan oleh Tahir et al. (2015). Sel Vero ekalapis dikultur dalam piring 24-telaga dan dijangkitkan dengan 200 μL medium mengandungi virus pada kepekatan ~ 50 unit pembentukan plak (upp). Virus dibiarkan menjerap selama 2 jam dan kemudiannya dibuang sebelum medium metilselulosa sebanyak 300 μL mengandungi EAAAN pada kepekatan 0.024 -12.5 mg/mL ditambah ke dalam setiap telaga.

Setelah dieram selama 48 jam atau sehingga plak virus kelihatan, sel diwarnakan dengan kristal lembayung. Kiraan jumlah plak dilakukan melalui pengamatan di bawah mikroskop dan peratus pengurangan plak dikira menggunakan persamaan berikut:

Peratus pengurangan plak (%)

$$\frac{\text{Purata jumlah plak kawalan} - \text{purata jumlah plak ujian}}{\text{Purata jumlah plak kawalan}} \times 100 \quad (1)$$

dengan purata jumlah plak kawalan ialah sel terjangkit tanpa rawatan dan purata jumlah plak ujian ialah sel terjangkit dengan rawatan ekstrak.

UJIAN PRA-RAWATAN SEL

Dalam ujian pra-rawatan sel, sel Vero ekalapis dalam piring 24-telaga dieram dengan 500 μL medium yang mengandungi EAAAN pada kepekatan 0.024 - 12.5 mg/mL selama 24 jam pada 37 °C. Tempoh pengeraman 24 jam dipilih setelah melihat kesan EAAAN pada tempoh tersebut tidak mematikan sel. Selepas medium tersebut dibuang, sel dibilas dengan penimbal fosfat pH 7.4 sebelum 200 μL medium yang mengandungi ~ 50 upp virus ditambah. Setelah tempoh penjerapan virus selama 2 jam, virus disedut keluar dan medium metilselulosa sebanyak 300 μL ditambah ke dalam setiap telaga. Sel terjangkit virus dieram selama 48 jam atau sehingga plak virus kelihatan dan diwarnakan. Jumlah plak dikira di bawah mikroskop dan peratus pengurangan plak dikira menggunakan Persamaan (1).

UJIAN PENJERAPAN

Ujian ini dilakukan berdasarkan laporan oleh De Logu et al. (2000). Sel Vero ekalapis dikultur dalam piring 24-telaga dan disejukkan selama satu jam pada 4 °C. Medium pertumbuhan dibuang dan digantikan dengan EAAAN pada kepekatan berbeza (0.5 - 1.1 mg/mL). Ini diikuti dengan penambahan 50 upp/telaga HSV-1 dan dieram lagi selama 2 jam pada 4 °C. Selepas itu, campuran EAAAN dan virus dibuang dan telaga dibasuh dengan PBS sebanyak 3 kali. Metilselulosa ditambah ke dalam telaga dan piring dieram selama 48 jam pada suhu 37 °C sebelum plak diwarnakan. Peratus pengurangan plak kemudiannya dikira.

UJIAN PENEMBUSAN

Ujian penembusan dijalankan berdasarkan prosedur yang dijalankan oleh Cheng et al. (2006) dengan sedikit pengubahsuaian. Sel Vero ekalapis disejukkan selama satu jam pada 4 °C dan kemudian dijangkitkan dengan virus pada 50 upp/telaga sebelum dieram kembali selama 3 jam pada 4 °C. Tempoh pengeraman tiga jam bertujuan membenarkan hanya virus yang berjaya menjerap kepada sel untuk menembusnya. Medium pemeliharaan dibuang

dan sel dibilas dengan penimbal fosfat pH 7.4. Sebanyak 200 μL medium pemeliharaan yang baharu dengan kehadiran EAAAN pada kepekatan 0.6 mg/mL, 0.8 mg/mL dan 1 mg/mL. Kepekatan ini dipilih bergantung kepada nilai CC_{50} dan nilai IC_{90} (Tahir et al. 2015). Suhu dinaikkan kepada 37 °C untuk memaksimumkan kebolehan penembusan virus. Tempoh penembusan diteruskan selama 15, 30, 45, 60, 75 dan 90 minit untuk setiap telaga yang berbeza. Kemudian, telaga dieram menggunakan PBS pada pH 3 selama 1 minit untuk meneutralkan sebarang virus yang tidak menembusi sel. Kemudian telaga dibasuh dengan medium pemeliharaan bebas serum sebanyak tiga kali dan 500 μL metilselulosa ditambah dan seterusnya dieram selama 48 jam. Jumlah plak terbentuk dikira di bawah mikroskop dan peratus pengurangan plak dikira.

UJIAN VIRUSIDAL

Ujian ini dijalankan berdasarkan prosedur yang telah dilakukan oleh Cheng et al. (2004). Sebelum uji kaji dijalankan, 50 μL virus (1×10^8 upp) dicampurkan dengan 50 μL EAAAN (1 mg/mL) sebelum ditambah DMEM bebas serum sebanyak 100 μL . Ampaian virus-EAAAN ini dieram selama 1 jam pada 37 °C dengan kehadiran 5% CO_2 . Selepas proses eraman, ampaian virus-EAAAN dilakukan pencairan 1/10. Virus pada pencairan berbeza kemudiannya ditambah kepada sel Vero ekalapis yang dikultur dalam piring 12-telaga dan ditambah metilselulosa sebelum dieram selama 48 jam (atau sehingga plak virus kelihatan). Jumlah plak dikira di bawah mikroskop dan peratus pengurangan plak dikira.

PENGAMATAN STRUKTUR VIRUS DIRAWAT MELALUI MIKROSKOP ELEKTRON TRANSMISI (TEM)

Asai ini dijalankan berdasarkan prosedur yang dijalankan oleh Fayyad, Ibrahim dan Yaacob (2013). Virus dibiakkan dan diempar untuk mendapatkan pelet virus yang kemudiannya diampai dengan DMEM sebanyak 100 μL . Sebanyak 50 μL virus tidak dirawat untuk digunakan sebagai kawalan negatif dan selebihnya dirawat dengan EAAAN (1 mg/mL) selama 1 jam. Setiap sampel (5 μL) diletakkan ke dalam grid Formvar-karbon bersalut tembaga. Kemudian diikuti dengan 5 μL uranil asetat selama 3 minit sebagai pewarna negatif. Lebihan larutan diserap dengan kertas turas. Grid tersebut dicerap dengan menggunakan TEM (Philips CM12).

UJIAN KEMAMPUAN JANGKITAN PROGENI

Asai ini dijalankan berdasarkan kaedah Saddi et al. (2007). Sel Vero ekalapis dikultur dalam piring 24-telaga dan dijangkitkan dengan virus pada ~50 upp. Setelah penjerapan selama 2 jam, virus dikeluarkan dan digantikan dengan medium pemeliharaan yang mengandungi EAAAN pada kepekatan berbeza (0.6 - 1 mg/mL), medium pemeliharaan sahaja (kawalan negatif) dan ACV 5 μM (kawalan positif).

Selepas 48 jam eraman pada 37 °C, piring tersebut dibekukan pada suhu -80 °C selama 20 minit. Sel ekalapis beku dibiarkan cair pada suhu 4 °C. Setelah cair, piring diketuk perlahan-lahan untuk meleraikan sel daripada permukaan telaga. Langkah ini diulang sebanyak dua kali. Kemudian, piring mengandungi sel disonikasi untuk membebaskan virus dan ampaiian sel-virus dipindahkan ke dalam tiub yang berlainan mengikut kepekatan bahan. Semua telaga dibilas dengan PBS dan ampaiian sel-PBS dikumpulkan mengikut tiub masing-masing. Isi padu setiap tiub dipastikan agar sama sebelum proses penentuan kepekatan virus dilakukan terhadap semua jenis rawatan melalui ujian pos-rawatan sel seperti sebelum ini.

ANALISIS STATISTIK

Analisis statistik dilakukan pada hasil keputusan yang diperoleh bagi menentukan perubahan atau perbezaan adalah signifikan atau sebaliknya menggunakan Microsoft Excel 2013. Data telah dianalisis menggunakan ujian t-pelajar. Kesemua analisis menggunakan selang keyakinan 95% dan perbezaan yang diperolehi adalah signifikan jika nilai $p < 0.05$.

HASIL DAN PERBINCANGAN

SEBATIAN KIMIA EKSTRAK AKUAS AKAR *A. nidus*

Analisis menggunakan LCMS/MS telah dapat mengasingkan 19 sebatian namun hanya lima sebatian dapat dikenal pasti melalui perbandingan jisim dan masa penahanan pada kromatogram yang diperolehi (Rajah 1 & Jadual 1). EAAAN mengandungi sebatian dalam kumpulan flavonoid dan subkumpulan flavonol dan fenol. Kumpulan flavonoid telah dikenal pasti mempunyai pelbagai mekanisme anti-HSV dalam banyak kajian (Šudomová & Hassan 2023; Urmenyi et al. 2016).

Sebatian metoksiflavin pernah dipencilkan daripada akar *Scutellaria baicalensis* dengan kemampuan menghalang perlekatan sampul virus pada endosom membran sel (Nagai et al. 1995). Metoksiflavin daripada ekstrak batang *Euphorbia grantii* pula mempunyai kesan antivirus terhadap Picornavirus dan virus Stomatitis Vesikular. Metoksiflavin yang dipencilkan daripada *Marcetia taxifolia* pula mempunyai aktiviti rawatan pasca-jangkitan sederhana terhadap HSV-1 seperti dilaporkan oleh Ortega et al. (2019).

Rutin yang juga dikenali sebagai vitamin P ataupun rutosida ditemui dalam banyak tumbuhan antaranya pokok teh dan juga epal (Ganeshpurkar & Saluja 2017). Rutin digunakan sebagai agen antivirus yang disebabkan oleh beberapa virus antaranya Retrovirus, Orthomyxovirus, Herpesvirus, Hepatitis B dan Hepatitis C (De Clercq & Field 2006). Rutin juga mampu menghalang penembusan dan kitaran sel virus bagi virus Canine Distemper (Carvalho et al. 2013). Rutin yang dipencilkan daripada

Capparis sinaica mempunyai kesan antivirus terhadap virus influenza burung strain H5N1 (Ibrahim et al. 2013).

Katekin tergolong dalam kumpulan proantosianidin mempunyai pelbagai jenis terbitan bergantung kepada struktur dimernya. Kajian yang dilakukan oleh Isaacs et al. (2008) menunjukkan ekstrak katekin daripada daun teh hijau mampu menyahaktifkan keseluruhan virion HSV-2 dan HSV-1 sebanyak 3000-kali ganda. Sebatian kaempferol telah dapat diekstrak daripada daun *A. nidus* (Jarial et al. 2018). Kaempferol mampu menghalang aktiviti HSV, virus influenza (H1N1 dan H9N2) dan hepatitis B secara *in vitro* (Jeong et al. 2008 & Li et al. 2008). Kaempferol juga didapati mampu menunjukkan aktiviti antivirus terhadap virus Japanese Encephalitis dengan mengganggu replikasi genom virus dan pengekspressan protein (Zhang et al. 2012). Kaempferol merupakan salah satu bahan yang ditemui dalam ekstrak *Ocotea notata* menghalang jangkitan HSV-1 dan HSV-2 dengan mengganggu penyerapan dan penembusan virus ke dalam sel (Garrett et al. 2012). Ekstrak biji *Securigera securidaca* menghalang penyerapan dan penembusan HSV-1 ke dalam sel serta merencat virus polimerase (Behbahani et al. 2013). Fraksi flavonoid daun *Ocotea notate* mengandungi kandungan kaempferol utama dan kesan anti-herpes terutama HHV-2 melalui perencatan kitar replikasi pada beberapa tahap (Garrett et al. 2012). Kemampuan kaempferol sebagai sebatian antivirus telah dirumuskan oleh Periferakis et al. (2023).

Asid quinik digolongkan dalam kumpulan tannin dalam bentuk ester atau bebas yang boleh dijumpai dalam sayur-sayuran seperti lobak dan tomato (De Maria, Trugo & Mariz 1999). Ia adalah bahan asas mensintesis Tamiflu iaitu sejenis ubat untuk merawat jangkitan virus influenza A dan B (Federspiel et al. 1999). Terbitan asid quinik juga menunjukkan aktiviti antivirus terhadap Human Immunodeficiency Virus (Kamng'ona et al. 2011), virus hepatitis B (Wang et al. 2009) dan HSV-1 (Ikeda et al. 2011; Rezende et al. 2014). Dapat disimpulkan bahawa kesemua sebatian yang terdapat dalam EAAAN pernah dilaporkan mempunyai aktiviti antivirus terhadap HHV-I dan juga pelbagai jenis virus. Seterusnya mod tindakan EAAAN dalam aktiviti antivirus dikenal pasti.

MOD TINDAKAN EKSTRAK AKUAS AKAR *A. nidus* TERHADAP HSV-1

Ekstrak akuas akar *A. nidus* yang terpilih untuk penentuan mod tindakan antivirus mempunyai nilai indeks pemilihan (SI) 63 seperti dilaporkan Tahir et al. (2015). Berdasarkan CDER (2006), nilai SI haruslah tinggi untuk memberi kesan maksimum antivirus dan kurang toksik kepada sel. Nilai SI yang melebihi 10 dikira mempunyai potensi besar sebagai agen antivirus dan wajar dikaji dengan lebih mendalam (Chattopadhyay & Naik 2007; Dargan 1998). Maka, adalah wajar untuk mengenal pasti cara tindakan anti-HSV-1 EAAAN melalui kesan rawatan pasca-jangkitan, rawatan sel pra-jangkitan, virusidal, penembusan, penyerapan dan kebolehhangkitan progeni.

EAAAN BERJAYA MENGHALANG JANGKITAN HSV-1 TERHADAP SEL SECARA SEDERHANA

EAAAN mampu menghalang jangkitan HSV-1 sama ada selepas sel dijangkitkan atau dirawat terlebih dahulu kepada sel. Walau bagaimanapun, kemampuan rawatan dengan EAAAN bertindak secara pasca jangkitan berlaku adalah bergantung kepada kepekatan dengan peratus pengurangan aktiviti 75% pada kepekatan 12.5 mg/mL (Rajah 2). Keupayaan EAAAN sebagai agen profilaksis kepada sel Vero diperhatikan dalam ujian pra-rawatan sel dengan kejayaan mengurangkan plak paling tinggi adalah 60% pada kepekatan 6.125 mg/mL. Analisis statistik melalui ujian-t pelajar menunjukkan EAAAN lebih berkesan diberikan secara rawatan pasca-jangkitan berbanding rawatan pra-rawatan sel ($p < 0.05$).

EAAAN MENGHALANG PENJERAPAN DAN PENEMBUSAN HSV-1

Penjerapan HSV-1 pada sel Vero dapat dihalang oleh EAAAN (Rajah 3) berkadar dengan kepekatan ekstrak yang digunakan. Peratus pengurangan plak tertinggi adalah sekitar 70% pada kepekatan 1.1 mg/mL dengan nilai pengurangan plak 50% atau IC_{50} adalah 0.7 mg/mL. Rajah 4 pula menunjukkan penembusan virus kepada sel terhalang yang juga bergantung kepada kepekatan EAAAN. EAAAN masih mampu menghalang penembusan virus walaupun sel telah dieram bersama virus selama 3 jam pada 4 °C. Seawal minit ke-15 sel dieram, peratus perencatan penembusan virus ke dalam sel oleh EAAAN adalah lebih daripada 43%. Peratus pengurangan plak terus bertambah apabila proses pengeraman dalam EAAAN dipanjangkan dari 15 minit hingga 90 minit.

Penjerapan dan penembusan merupakan fasa permulaan jangkitan virus yang dapat dihalang oleh aktiviti EAAAN yang mengandungi sebatian flavonoid yang dijelaskan dalam analisis fitokimia di atas seperti metoksiflavon, katekin, kaempferol dan rutin. Kehadiran metoksiflavon dapat dikaitkan dengan aktiviti EAAAN. Tempoh pengeraman tiga jam bertujuan membenarkan hanya virus yang berjaya menjerap kepada sel untuk menembusi secara sederhana terhadap HSV-1 sebagaimana dilaporkan oleh Ortega et al. (2019). Sebatian metoksiflavon juga mempunyai kemampuan menghalang perlekatan sampul virus pada endosom membran sel (Nagai et al. 1995). Metoksiflavon juga boleh menghalang pembahagian sel yang diaruh oleh virus polio jenis 1 dan coxsackie B4 (Van Hoof et al. 1984).

Katekin mampu mempengaruhi kemasukan HSV ke dalam sel dengan membentuk ikatan dengan protein yang terdapat pada sampul virus dan juga pada membran sel yang menghalang penjerapan dan penembusan HSV-1 ke dalam sel tidak berlaku (Cheng, Lin & Lin 2002; Shahat et al. 2002). Kajian oleh Behbahani et al. (2013) dan Garrett et al. (2012) telah menunjukkan bahawa

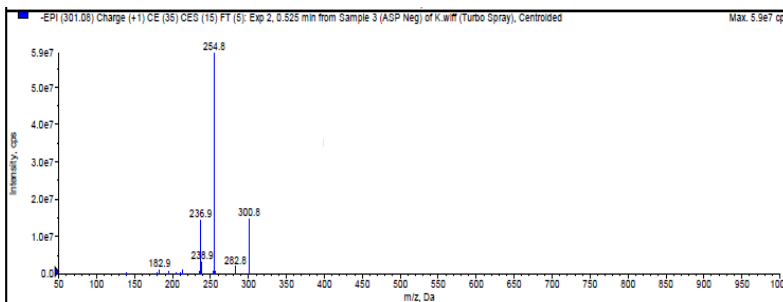
kaempferol mempunyai aktiviti menghalang penjerapan dan penembusan virus. Rutin juga terbukti menghalang proses penjerapan dan penembusan virus ke dalam sel melalui penyahaktifan zarah virus secara langsung dengan melekat pada glikoprotein virus ataupun melekat pada ligan yang terdapat pada sel dan terlibat dalam jangkitan seperti dicadangkan oleh Carvalho et al. (2013).

EAAAN MEROSAKKAN ZARAH VIRUS

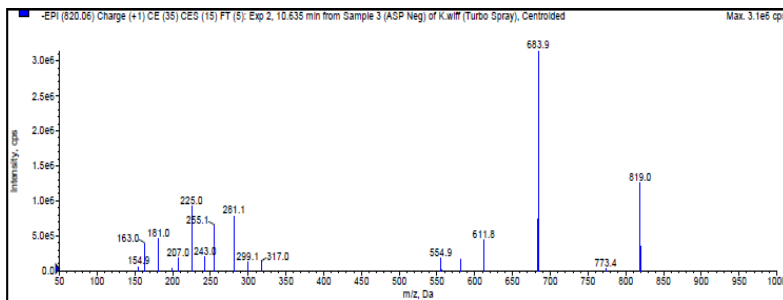
Kesan langsung EAAAN terhadap zarah virus HSV-1 dikenal pasti melalui ujian virusidal. Kepekatan yang digunakan dalam ujian ini ialah 1 mg/mL iaitu nilai IC_{90} iaitu kepekatan yang menyebabkan pembentukan plak terhalang sebanyak 90%. Pembentukan plak terhalang lebih daripada 90% apabila virion pada titer 1×10^4 upu dieram terlebih dahulu dengan EAAAN. Aktiviti EAAAN dipengaruhi oleh kepekatan virus kerana semakin tinggi dos virus digunakan, semakin rendah aktiviti virusidal yang ditunjukkan (Rajah 5).

Bagi mengesahkan aktiviti virusidal EAAAN, perubahan zarah virus diperhatikan di bawah TEM. Struktur virion yang tidak dirawat menunjukkan struktur virion HSV lengkap dengan sampul diperhatikan di sekeliling kapsid (Rajah 6(A) dan 6(B)). Manakala pada Rajah 6(C) sampul virus didapati tidak menutupi kapsid sepenuhnya. Rajah 6(D) menunjukkan sampul virus terlerai sepenuhnya. Pengesahan melalui cerapan ini menjelaskan mengapa berlakunya kegagalan penjerapan dan penembusan HSV-1 pada sel Vero yang dirawat EAAAN kerana berlaku kerosakan pada sampul virus. Bagi virus tidak dirawat, sampul masih sempurna dan pengamatan tersebut selari dengan ketiadaan perencatan dalam aktiviti antivirus melibatkan penjerapan dan penembusan HSV-1 kepada sel Vero. Tiada kesan jelas kerosakan terhadap sel Vero akibat pendedahan dengan EAAAN. Sejenis ester asid quinik pernah dilaporkan mempunyai aktiviti melindungi sel daripada kerosakan dengan adanya aktiviti anti-oksidan dan anti-keradangan (Sheng et al. 2005). Aktiviti perlindungan sel terhadap jangkitan virus dapat dilihat dalam kajian ini, jangkitan virus dapat dielak apabila sel dirawat dengan EAAAN dalam ujian pra-rawatan. Perkara ini penting kerana kesan EAAAN adalah khusus kepada virus sahaja dan boleh diguna pakai untuk rawatan terhadap pelbagai virus tanpa mengganggu sel seperti dicadangkan oleh Iberahim et al. (2018) dan Ripim et al. (2018).

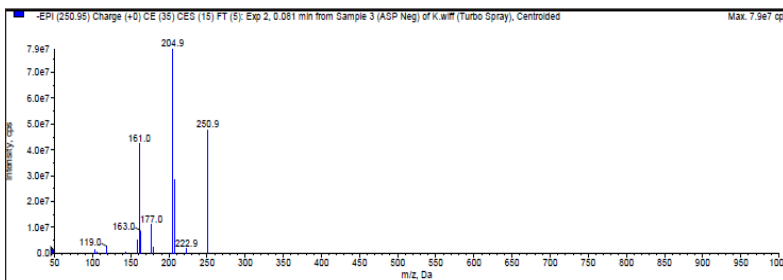
Asid quinik hadir dalam EAAAN yang boleh memainkan peranan dalam kerosakan zarah HSV-1 yang dilihat. Asid quinik tergolong dalam kumpulan tannin dengan keupayaan mengikat pada glikoprotein HSV-1 seterusnya menyahaktifkan fungsinya dalam menembusi sel (Lin et al. 2011). Kehadiran katekin dalam EAAAN boleh menyumbang kepada ciri antivirus yang berkesan. Ini berdasarkan laporan Isaacs et al. (2008) yang menunjukkan katekin mampu menyahaktifkan keseluruhan virion HSV-1 dengan berkesan.



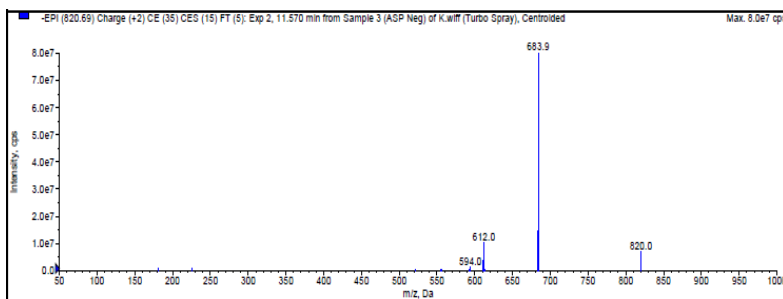
A) Spektrum bagi terbitan metoksiflavone



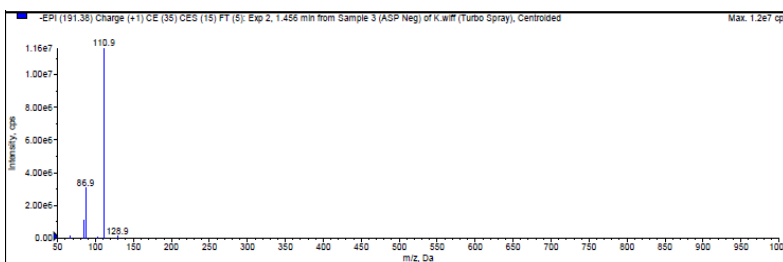
B) Spektrum bagi terbitan rutin



C) Spektrum bagi katekin



D) Spektrum bagi kaempferol

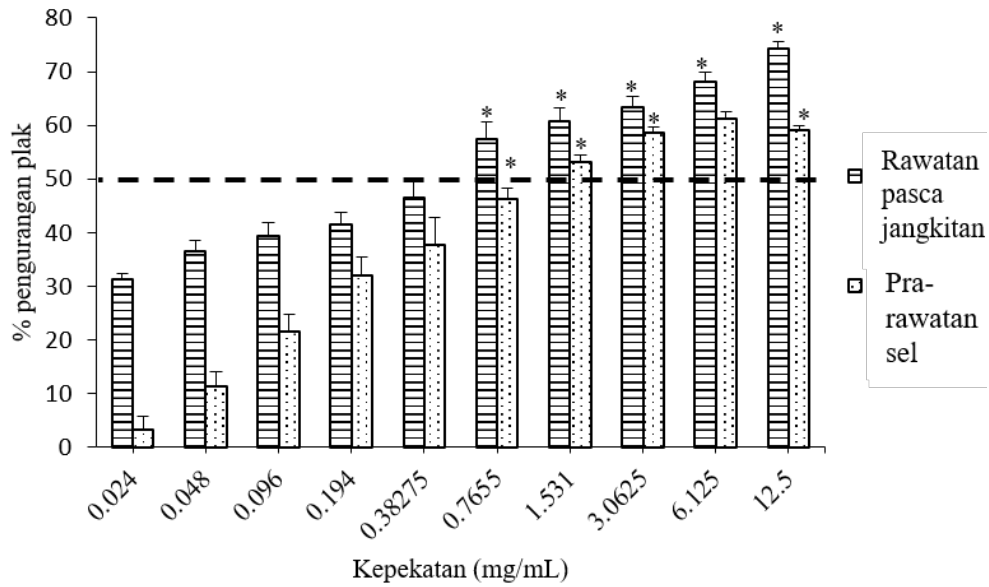


E) Spektrum bagi asid quinik

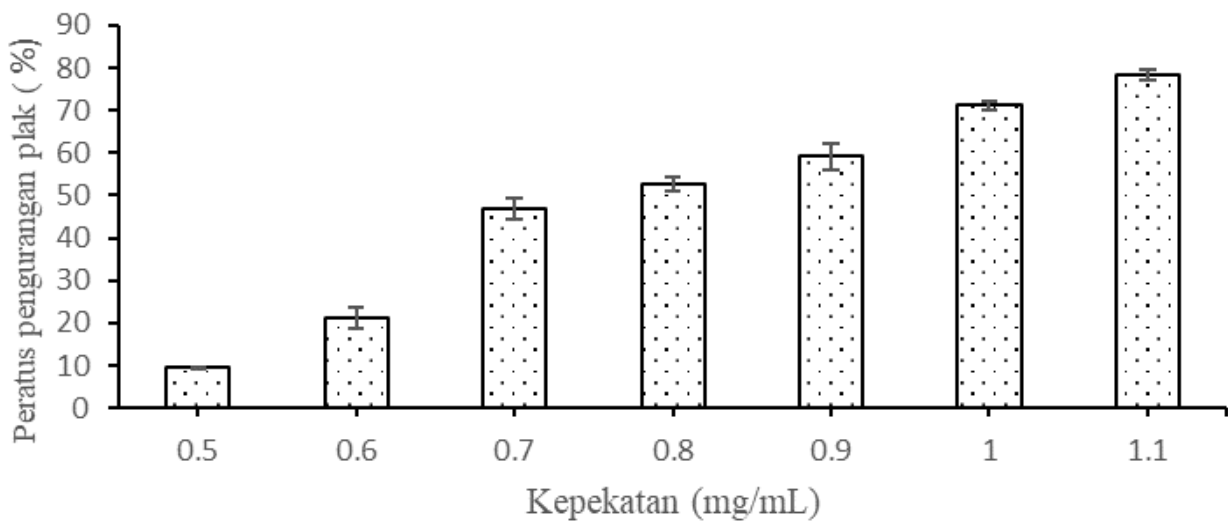
RAJAH 1. Spektrum bagi EAAAN menggunakan LC-MS

JADUAL 1. Kandungan kimia EAAAN

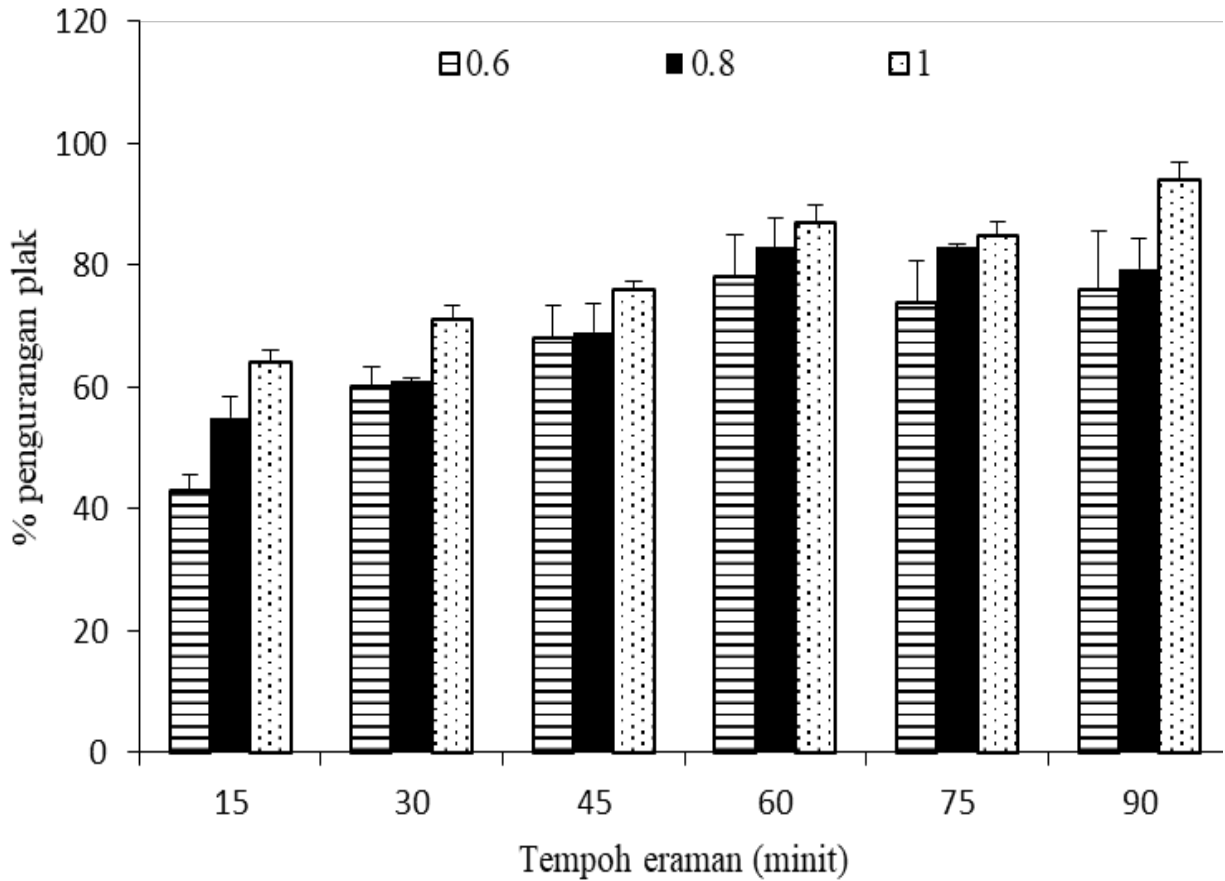
Masa penahanan ($X \times 10^7$)	m/z (Da)	Sebatian jangkaan	Kumpulan/subkumpulan
4.0	611.1	Rutin	Flavonol
7.9	204.9	Katekin	Flavanol
0.2	594.0	Kaempferol	Flavonol
1.16	110.9	Asid quinik	Fenol



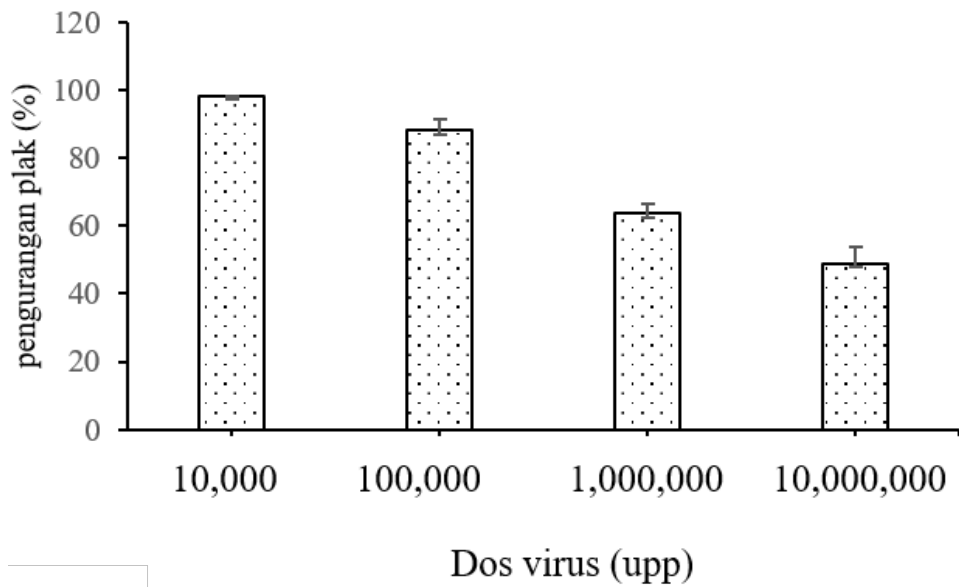
RAJAH 2. Aktiviti pengurangan plak HSV-1 pelbagai kepekatan EAAAN dalam ujian rawatan pasca jangkitan dan pra-rawatan sel. (*) menunjukkan perbezaan peratus pengurangan plak melebihi 50% yang signifikan ($p < 0.05$)



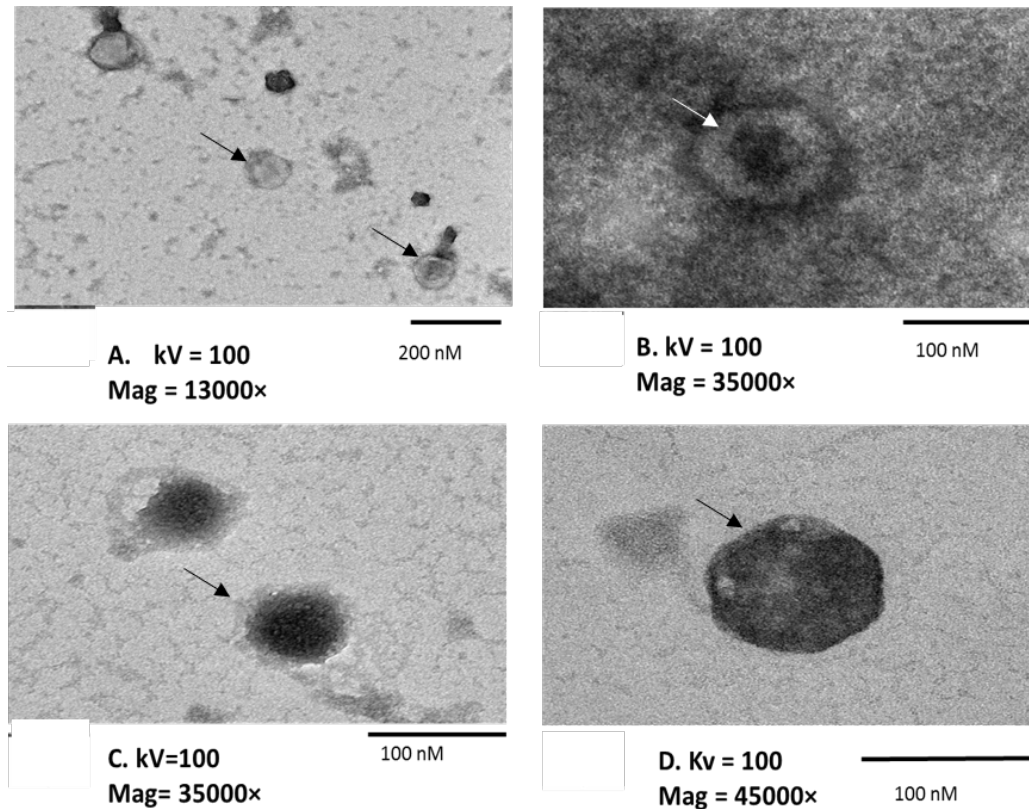
RAJAH 3. Kesan EAAAN terhadap kebolehan HHV-1 menjerap kepada sel perumah Vero. Sebanyak tiga kepekatan berbeza diuji iaitu 0.5 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 dan 1.1 mg/mL



RAJAH 4. Kesan EAAAN terhadap kebolehan HHV-1 menembusi sel perumah Vero. Sebanyak tiga kepekatan berbeza diuji iaitu, 0.6, 0.8 dan 1.0 mg/mL



RAJAH 5. Aktiviti virusidal ekstrak akas akar *Asplenium nidus* menggunakan dos virus berbeza

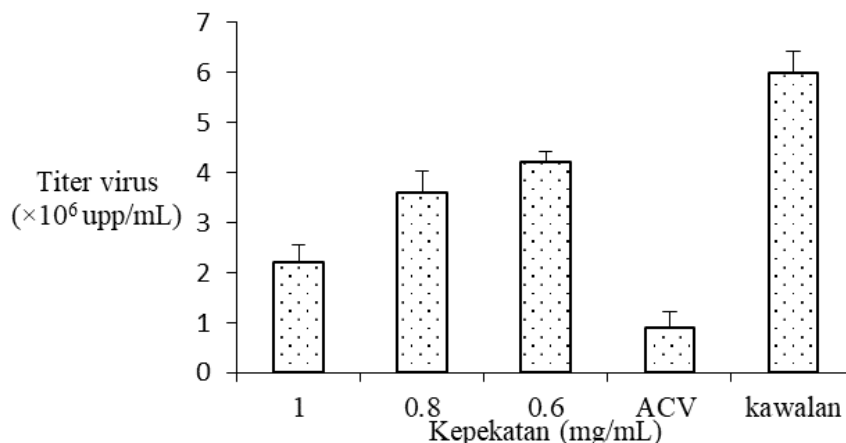


RAJAH 6. Cerapan mikrograf TEM HSV-1 yang tidak dirawat dan dirawat dengan EAAAN pada kepekatan 1 mg/mL. A. HSV-1 tidak dirawat dengan EAAAN dan cerapan pada pembesaran 13000 \times ; B. HSV-1 tidak dirawat dengan EAAAN dan cerapan pada pembesaran 35000 \times ; C. HSV-1 dirawat dengan EAAAN dan cerapan pada pembesaran 35000 \times , HSV-1 dirawat dengan EAAAN dan pencerapan pada pembesaran 45,000 \times . Anak panah pada A dan B menunjukkan kehadiran sampul virus manakala pada C menunjukkan sampul virus separa terlerai dan pada D sampul virus terlerai sepenuhnya

EAAAN MENGHALANG KEMAMPUAN PROGENI VIRUS

Tiga jenis kepekatan telah digunakan dalam menentukan kesan EAAAN terhadap kebolehhangkitan progeni virus. EAAAN berkeupayaan menghalang penghasilan virion selepas jangkitan dan seterusnya daya kebolehhangkitan progeni virus berkurang. Rajah 7 menunjukkan titer progeni virus berkurang (2.25×10^6 upp/mL), apabila kepekatan EAAAN yang digunakan untuk merawat sel terjangkit HSV-1 tinggi iaitu 1 mg/mL tetapi bilangan progeni terhasil meningkat dengan kepekatan EAAAN lebih rendah (0.8 dan 0.6 mg/mL). Pengamatan sebegini adalah satu kebiasaan yang diperhatikan dalam aktiviti antivirus apabila sesuatu bahan akan dipengaruhi oleh kepekatan agen antivirus tersebut (Suga et al. 1996). ACV sebagai kawalan dapat mengurangkan titer progeni virus manakala virus yang tidak dirawat menghasilkan progeni virus yang tinggi.

Pengurangan daya jangkit progeni HSV-1 yang dibebaskan oleh EAAAN boleh dikaitkan dengan hasil yang dilihat dalam ujian virusidal dan pengamatan menggunakan TEM yang menunjukkan kerosakan permukaan virus. Kesannya adalah EAAAN merosakkan progeni virus yang mengakibatkan penjerapan dan penembusan kepada sel terhalang. Pengamatan serupa aktiviti virusidal dan pengurangan kebolehhangkitan progeni pernah diperhatikan oleh Iberahim et al. (2018). Selain itu, progeni yang kurang berdaya jangkit boleh disebabkan oleh beberapa perkara seperti kegagalan untuk menjerap dengan baik akibat kerosakan protein pengikat glikoprotein (Mettenleiter 2002). Kerosakan kepada zarah HSV-1 seterusnya menghalang kemasukan virus ke dalam sel, menghalang jangkitan virus dari sel ke sel yang lain dan mengurangkan jangkitan kedua (Isaacs et al. 2008; Lin et al. 2011; Nagai et al. 1995).



RAJAH 7. Titer virus hasil rawatan dengan pelbagai kepekatan EAAAN serta ACV melalui ujian kebolehjangkitan progeni. Kawalan adalah bilangan titer HSV-1 yang tidak dirawat

KESIMPULAN

Ekstrak akuas akar *A. nidus* mengandungi sebatian flavonoid metoksiflavan, kampferol, rutin, katekin dan asid quinik yang membolehkannya bertindak sebagai anti-HSV-1 melalui pelbagai tindakan. EAAAN boleh bertindak selepas virus menjangkiti sel atau secara profilaksis terhadap jangkitan virus pada dos tinggi. Tindakan EAAAN adalah pada fasa awal jangkitan virus melibatkan penjerapan dan penembusan melalui membran sel Vero terhalang apabila dirawat dengan EAAAN namun bergantung kepada kepekatan yang digunakan. EAAAN boleh merosakkan sampul virus yang menghalang virus daripada menjangkiti sel serta menghalang progeni yang dibebaskan daripada menjangkiti semula sel dan mengurangkan pembentukan plak. Secara keseluruhannya, kajian ini telah berjaya menunjukkan potensi ekstrak akuas akar *A. nidus* yang mengandungi pelbagai sebatian sebagai agen anti HSV-1 yang selamat kepada sel Vero melalui beberapa mod tindakan yang berbeza daripada ubat antivirus ACV sedia ada.

PENGHARGAAN

Kajian ini dibiayai oleh Universiti Kebangsaan Malaysia melalui geran GUP-2024-071 dan BKBP-FST-K006401. Pengajian pengarang kedua dibiayai oleh Kementerian Pendidikan Malaysia melalui program MyBrain.

RUJUKAN

Anon. tth. *Medicinal Plants of Guam*. University of Guam: College of Natural and Applied Sciences. https://www.uog.edu/_resources/files/wptrc/Ebook_medicinal.pdf (24 April 2024).

- Behbahani, M., Shanehsazzadeh, M., Shokoohinia, Y. & Soltani, M. 2013. Evaluation of anti-herpetic activity of methanol seed extract and fractions of *Securigera securidaca* in vitro. *Journal of Antiviral and Antiretroviral* 5(4): 72-76.
- Benjamin, A. & Manickam, V. S. 2007. Medicinal pteridophytes from the Western Ghats. *Indian Journal of Traditional Knowledge* 6: 611-618.
- Benniamin, A. 2011. Medicinal ferns of North Eastern India with special reference to Arunachal Pradesh. *Indian Journal of Traditional Knowledge* 10(3): 516-522.
- Carvalho, O.V., Botelho, C.V., Ferreira, C.G., Ferreira, H.C., Santos, M.R., Diaz, M.A., Oliveira, T.T., Soares-Martins, J.A., Almeida, M.R. & Silva Jr. A. 2013. In vitro inhibition of canine distemper virus by flavonoids and phenolic acids: Implications of structural differences for antiviral design. *Research in Veterinary Science* 95(2): 717-724.
- CDER. 2006. *Guidance for Industry Antiviral Product Development-Conducting and Submitting Virology Studies to the Agency*. Center for Drug Evaluation and Research.
- Chattopadhyay, D. & Naik, T.N. 2007. Antivirals of ethnomedicinal origin: Structure-activity relationship and scope. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 7(3): 275-301.
- Cheng, H.Y., Lin, C.C. & Lin, T.C. 2002. Antiviral properties of prodelfinidin B-2 3'-O-gallate from green tea leaf. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 13(4): 223-229.

- Cheng, H.Y., Yang, C.M., Lin, T.C., Shieh, D.E. & Lin, C.C. 2006. ent-epiafzelechin-(4 α →8)-epiafzelechin extracted from *Cassia javanica* inhibits herpes simplex virus type 2 replication. *Journal of Medical Microbiology* 55(2): 201-206.
- 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 2 *in vitro*. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 53(4): 577-583.
- Dargan, D.J. 1998. Anti- HSV of antiviral agents. Dlm. *Methods in Molecular Medicine, Vol 9 Herpes Simplex Virus Protocols*, disunting oleh Brown, S.M. & MacLean, A.R. New Jersey: Humana Press: hlm. 387-405.
- De Clercq, E. & Field, H.J. 2006. Antiviral prodrugs- the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *British Journal of Pharmacology* 147(1): 1-11.
- De Clercq, E., Naesens, L., De Bolle, L., Schols, D., Zhang, Y. & Neyts, J. 2001. Antiviral agents active against human herpesviruses HHV-6, HHV-T and HHV-8. *Review in Medical Virology* 11(6): 381-395.
- 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.
- De Maria, C., Trugo, L. & Mariz, M. 1999. The content of individual caffeoylquinic acids in edible vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis* 12: 289-292.
- Fayyad, A., Ibrahim, N. & Yaacob, W.A. 2013. *In vitro* virucidal activity of hexane fraction of *Marrubium vulgare* against type 1 Herpes simplex virus. *American Journal of Drug Discovery and Development* 3: 84-94.
- Federspiel, M., Fischer, R., Hennig, M., Mair, H.J., Oberhauser, T. & Rimmler, G. 1999. Industrial synthesis of the key precursor in the synthesis of the anti-influenza drug oseltamivir phosphate (Ro 64-0796/002, GS-4104-02) ethyl (3R,4S,5S)-4,5-epoxy-3-(1-ethyl-propoxy)-cyclohex-1-ene-1-carboxylate. *Organic Process Research and Development* 3: 266-274.
- Ganeshpurkar, A. & Saluja, A.K. 2017. The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal* 25: 149-164.
- Garrett, R., Romanos, M.T.V., Borges, R.M., Santos, M.G., Rocha, L. & da Silva, A.J.R. 2012. Antiherpetic activity of a flavonoid fraction from *Ocotea notata* leaves. *Revista Brasileira De Farmacognosia* 22: 306-313.
- Gnann Jr., J.W., Barton, N.H. & Whitley, R.J. 1983. Acyclovir: Mechanism of action, pharmacokinetics, safety and clinical applications. *Pharmacotherapy* 3(5): 275-383.
- Hammami, S., Snène, A., El Mokni, R., Faidi, K., Falconieri, D., Dhaouadi, H., Piras, A., Mighri, Z. & Porcedda, S. 2016. Essential oil constituents and antioxidant activity of *Asplenium* ferns, *Journal of Chromatographic Science* 54(8): 1341-1345.
- Iberahim, R., Md. Nor, N.S., Yaacob, W.A. & Ibrahim, N. 2018. *Eleusine indica* inhibits early and late phases of herpes simplex virus type 1 replication cycle and reduces progeny infectivity. *Sains Malaysiana* 47(7): 1431-1438.
- Ibrahim, A.K., Youssef, A.I., Arafa, A.S. & Ahmed, S.A. 2013. Anti-H5N1 virus flavonoids from *Capparis sinaica* Veill. *Natural Product Research* 27(22): 2149-2153.
- Ikeda, K., Tsujimoto, K., Uozaki, M., Nishide, M., Suzuki, Y. & Koyama, A.H. 2011. Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. *International Journal of Molecular Medicine* 2(28): 595-598.
- Imperato, F. 1993. 3, 6, 8-Tri-C-xylosylapigenin from *Asplenium viviparum*. *Phytochemistry* 33: 729-730.
- Isaacs, C.E., Wen, G.Y., Xu, W., Jia, J.H., Rohan, L., Corbo, C., Di Maggio, V., Jenkins, E.C. & Hillier, S. 2008. Epigallocatechin gallate inactivates clinical isolates of herpes simplex virus. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 52(3): 962-970.
- Jarial, R., Thakur, S., Sakinah, M., Zularisam, A.W., Sharad, A., Kanwar, S.S. & Singh, L. 2018. Potent anticancer, antioxidant and antibacterial activities of isolated flavonoids from *Asplenium nidus*. *Journal of King Saud University-science* 30: 185-192.
- Jeong, H.J., Ryu, Y.B., Park, S.J., Kim, J.H. & Kwon, H.J. 2008. Neuraminidase inhibitory activities of flavonols isolated from *Rhodiola rosea* roots and their *in vitro* anti-influenza viral activities. *Bioorganic and Medical Chemistry* 17: 6816-6823.
- Kamng'ona, A., Moore, J.P., Lindsey, G. & Brandt, W. 2011. Inhibition of HIV-1 and M-MLV reverse transcriptases by a major polyphenol (3,4,5 tri-O-galloylquinic acid) present in the leaves of the South African resurrection plant, *Myrothamnus flabellifolia*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry* 26: 843-853.
- Korovina, A.N., Gus'kova, A.A., Skoblov, M.Y., Andronova, V.L., Galegov, G.A., Kochetkov, S.N., Kukhanova, M.K. & Skoblov, Y.S. 2010. Mutations in the DNA polymerase and thymidine kinase genes of herpes simplex virus clinical isolates resistant to antiherpetic drugs. *Molecular Biology* 44(3): 431-438.

- Koujah, L., Suryawanshi, R.K. & Shukla, D. 2019. Pathological processes activated by herpes simplex virus-1 (HSV-1) infection in the cornea. *Cellular and Molecular Life Sciences* 76(3): 405-419.
- Li, J., Huang, H., Feng, M., Zhou, W. & Shi, X. 2008. *In vitro* and *in vivo* anti-hepatitis B virus activities of a plant extract from *Geranium carolinianum* L. *Antiviral Research* 79: 114-120.
- Lin, L.T., Chen, T.Y., Chung, C.Y., Noyce, R.S., Grindley, T.B., McCormick, C., Lin, T.C., Wang, G.H., Lin, C.C. & Richardson, C.D. 2011. Hydrolyzable tannins (chebulagic acid and punicalagin) target viral glycoprotein-glycosaminoglycan interactions to inhibit herpes simplex virus 1 entry and cell-to-cell spread. *Journal of Virology* 85(9): 4386-4398.
- Lobo, A-M., Agelidis, A.M. & Shukla, D. 2019. The ocular surface pathogenesis of herpes simplex keratitis: The host cell response and ocular surface sequelae to infection and inflammation. *The Ocular Surface* 17: 40-49. doi: 10.1016/j.jtos.2018.10.002
- Maideen, H., Che-Desa, Z., Damanhuri, A., Latiff, A. & Rusea, G. 2011. Kepelbagaian dan habitat pteridofit di Hutan Simpan Angsi, Negeri Sembilan. *Sains Malaysiana* 40(12): 1341-1344.
- Mettenleiter, T.C. 2002. Herpesvirus assembly and egress. *Journal of Virology* 76(4): 1537-1547.
- Mims, C., Dockrell, M., Goering, R.V., Roitt, I., Wakelin, D. & Zuckerman, M. 2004. *Medical Microbiology*. Spain: Elsevier Limited.
- Nagai, T., Moriguchi, R., Suzuki, Y., Tomimori, T. & Yamada, H. 1995. Mode of action of the anti-influenza virus activity of plant flavonoid, 5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone, from the roots of *Scutellaria baicalensis*. *Antiviral Research* 26(1): 11-25.
- Ortega, J.T., Serrano, M.L., Suárez, A.I., Baptista, J., Pujol, F.H., Cavallaro, L.V., Campos, H.R. & Rangel, H.R. 2019. Antiviral activity of flavonoids present in aerial parts of *Marctia taxifolia* against Hepatitis B virus, Poliovirus, and Herpes Simplex Virus *in vitro*. *EXCLI Journal* 18: 1037-1048.
- Periferakis, A., Periferakis, A-T., Troumpata, L., Periferakis, K., Scheau, A-E., Savulescu-Fiedler, I., Caruntu, A., Badarau, I.A., Caruntu, C. & Scheau, C. 2023. Kaempferol: A review of current evidence of its antiviral potential. *International Journal of Molecular Sciences* 24(22): 16299.
- Pimsuwan, S., Watcharinrat, D., Jomsong, P., Kanchanaphusanon, T. & Suksa-ard, U. 2020. The effects of watering rates using the drip irrigation method on the root mass growth of bird's nest ferns. *International Journal of GEOMATE* 18(67): 15-20.
- Rezende, C.O., Rigotto, C., Caneschi, W., Rezende, C.A.M., Le Hyaric, M. & Couri, M.R.C. 2014. Anti-HSV-1 and antioxidant activities of dicaffeoyl and digalloyl esters of quinic acid. *Biomedicine and Preventive Nutrition* 4: 35-38.
- Ripim, N.S.M., Fazil, N., Ibrahim, K., Bahtiar, A, Wai, C.Y., Ibrahim, N., Nor M. 2018. Antiviral properties of *Orthosiphon stamineus* aqueous extract in Herpes Simplex Virus Type 1 infected cells. *Sains Malaysiana* 47(8): 1725-1730.
- Saddi, M., Sanna, A., Cottiglia, F., Chisu, L., Casu, L., Bonsignore, L. & De Logu, A. 2007. Antiherpesvirus activity of *Artemisia arborescens* essential oils and inhibition of lateral diffusion in Vero cells. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 6: 10.
- Shahat, A.A., Cos, P., De Bruyne, T., Apers, S., Hammouda, F.M., Ismail, S.I., Azzam, S., Claeys, M., Goovaerts, E., Pieters, L., Van den Berghe, D. & Vlietinck, A.J. 2002. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Planta Medica* 68: 539-541.
- Sheng, Y., Åkesson, C., Holmgren, K., Bryngelsson, C., Giamapa, V. & Pero, R.W. 2005. An active ingredient of Cat's Claw water extracts: Identification and efficacy of quinic acid. *Journal of Ethnopharmacology* 96(3): 577-584.
- Šudomová, M. & Hassan, S.T.S. 2023. Flavonoids with anti-Herpes Simplex Virus properties: Deciphering their mechanisms in disrupting the viral life cycle. *Viruses* 15: 2340.
- Suga, S., Yoshikawa, T., Yazaki, T., Ozaki, T. & Asano, Y. 1996. Dose-dependent effects of oral acyclovir in the incubation period of varicella. *Acta Paediatrica* 85(12): 1418-1421.
- Tahir, M.M., Ibrahim, N. & Yaacob, W.A. 2014. Cytotoxicity and antiviral activities of *Asplenium nidus*, *Phaleria macrocarpa* and *Eleusine indica*. *AIP Conference Proceedings* 1614(549): 549-552.
- Tahir, M.M., Hassan, N.S., Dyari, H.R.E., Yaacob, W.A. & Ibrahim, N. 2017. Phytochemistry, antibacterial and antiviral effects of the fractions of *Asplenium nidus* leaves aqueous extract. *Malaysian Applied Biology* 46(1): 207-212.
- Tahir, M.M., Yip, C.W., Yaacob, W.A. & Ibrahim, N. 2015. Antibacterial, cytotoxicity and antiviral activities of *Asplenium nidus*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 7(7): 440-444.
- Urmenyi, F.G., Saraiva, G.D., Casanova, L.M., Matos, A.D., De Magalhães Camargo, L.M., Romanos, M.T. & Costa, S.S. 2016. Anti-HSV-1 and HSV-2 flavonoids and a new kaempferol triglycoside from the medicinal plant *Kalanchoe daigremontiana*. *Journal of Chemical Biodiversity* 13(12): 1707-1714.
- Van Hoof, L., Dirk, A., Berghe, V., George, M., Hatfield, M. & Vlietinck, A.J. 1984. Plant antiviral agents; V.1 3-methoxyflavones as potent inhibitors of viral-induced block of cell synthesis. *Planta Medica* 50(6): 513-517.

- Wang, G.F., Shi, L.P., Ren, Y.D., Liu, Q.F., Liu, H.F., Zhang, R.J., Li, Z., Zhu, F.H., He, P.L., Tang, W., Tao, P.Z., Li, C., Zhao, W.M. & Zuo, J.P. 2009. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid *in vivo* and *in vitro*. *Antiviral Research* 83(2): 186–190.
- Zhang, T., Wu, Z., Du, J., Hu, Y., Liu, L., Yang, F. & Jin Q. 2012. Anti-Japanese Encephalitis viral effects of kaempferol and daidzin and their RNA-binding characteristics. *PLoS ONE* 7(1): e30259.

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