

PURIFIKASI INHIBITOR ATPASE/RNA HELIKASE VIRUS JAPANESE ENCEPHALITIS DARI *STREPTOMYCES CHARTREUSIS*

Lina Elfita*, Shanti Ratnakomala**, Herman Suryadi**,
Puspita Lisdiyanti***, Andi Utama***

* Program studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam
Syarif Hidayatullah

** Departemen Farmasi FMIPA UI

*** Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI

ABSTRACT

Japanese encephalitis virus (JEV) is a neuropathogenic virus commonly caused central nervous diseases such as meningitis and severe encephalitis. Although vaccine has been developed, no specific and effective drug is available so far. We previously carried out a screening of inhibitor of JEV RNA helicase, an enzyme that essential for virus replication, from Actinomycetes and found that Streptomyces chartreusis produce the inhibitor of JEV RNA helicase. In this study, an extracellular protein which has inhibition activity on ATPase activity of JEV RNA helicase was purified from supernatant of Streptomyces chartreusis culture by ammonium sulfate precipitation and size exclusion chromatography. SDS-PAGE analysis showed a single band with approximate molecular mass of 11,4 kDa, suggesting that the inhibitor was successfully purified into a single protein.

Key words : *Japanese encephalitis virus, RNA helicase Inhibitor, ATPase, Streptomyces chartreusis.*

ABSTRAK

Virus Japanese encephalitis (JEV) merupakan virus neuropathogen yang dapat menyebabkan penyakit pada sistem syaraf pusat seperti meningitis dan beberapa encephalitis. Meskipun vaksin telah dikembangkan, sampai saat ini belum ada obat yang spesifik dan efektif yang tersedia. Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan skrining terhadap inhibitor RNA helikase JEV, yaitu suatu enzim yang esensial untuk replikasi virus dari isolat Actinomycetes dan ditemukan bahwa Streptomyces chartreusis dapat menghasilkan inhibitor RNA helikase JEV. Pada studi ini, protein ekstraseluler yang dapat menghambat aktivitas ATPase dari RNA helikase JEV dipurifikasi dari kultur supernatan Streptomyces chartreusis menggunakan pengendapan ammonium sulfat dan kromatografi gel filtrasi. Analisis SDS-PAGE memperlihatkan pita tunggal dengan perkiraan berat molekul 11,4 kDa, sehingga dapat dikatakan inhibitor telah berhasil dipurifikasi menjadi protein tunggal.

Kata kunci : *Japanese encephaliti virus, RNA helikase Inhibitor, ATPase, Streptomyces chartreusis.*

PENDAHULUAN

Japanese encephalitis adalah suatu penyakit infeksi pada sistem syaraf pusat yang disebabkan oleh virus Japanese encephalitis (JEV) yang ditularkan melalui vektor nyamuk *Culex tritaeniorhynchus*. Penyakit Japanese encephalitis ditemukan di Asia Selatan, Asia Tenggara, Asia Timur dan Pasifik. Diperkirakan 50.000 kasus klinis dan 10.000-15.000 kematian diseluruh dunia setiap tahunnya (1, 2). Di Indonesia, Wei (2005) melaporkan bahwa kasus klinis Japanese encephalitis di Bali mencapai 36%, di Manado (Sulawesi Utara) mencapai 22% dan di Pontianak (Kalimantan Barat) mencapai 25% (3). Walaupun vaksin telah dikembangkan sejak tahun 1960, sampai saat ini belum ada obat yang spesifik dan efektif untuk penanganan penyakit ini (4). Salah satu upaya untuk penemuan obat anti-JEV adalah penemuan inhibitor enzim yang esensial untuk replikasi JEV, seperti enzim helikase, serin protease, dan RNA polimerase (5, 6).

JEV termasuk dalam genus Flavivirus dari famili Flaviviridae. JEV memiliki genom RNA untai tunggal positif dengan panjang sekitar 11 kb. Genom RNA ini ditranslasikan ke dalam precursor poliprotein tunggal yang akan diproses untuk menghasilkan tiga protein struktural (C, prM, E) dan tujuh protein non-

struktural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B dan NS5). Protein NS3 merupakan multifungsional protein yang menghasilkan dua aktivitas enzimatik yaitu aktivitas serin protease yang diidentifikasi pada asam amino no. 1-162 dan aktivitas RNA helikase yang terletak pada asam amino no. 163-619 (7, 5). RNA helikase mempunyai tiga aktivitas yaitu aktivitas pengikatan RNA (*RNA binding*), ATPase, dan RNA helikase. Aktivitas RNA helikase berfungsi melepaskan untai ganda RNA menjadi untai tunggal, dimana proses ini sangat penting dalam proses replikasi JEV. Oleh karena itu, RNA helikase merupakan target yang potensial untuk pengembangan obat anti-JEV karena inhibisi RNA helikase dapat dilakukan melalui salah satu dari tiga aktivitas tersebut (8, 7, 9). Aktivitas ATPase adalah aktivitas yang menguraikan ATP menjadi ADP dan Pi, dan menghasilkan energi yang digunakan untuk menguraikan untai ganda RNA. Karena aktivitas RNA helikase tergantung pada aktivitas ATPase serta uji ATPase dapat dilakukan dengan mudah, maka uji inhibitor helikase dapat dilakukan melalui uji ATPase (7).

Actinomycetes merupakan salah satu kelompok mikroorganisme yang telah diketahui berperan penting dalam bidang bioteknologi karena memiliki kemampuan untuk menghasilkan inhibitor alami terhadap

suatu enzim (10, 11). Hatsu *et al.* (2002) menemukan bahwa Actinomycetes khususnya *Streptomyces* sp. dapat menghasilkan inhibitor RNA helikase dari JEV (12). Dari hasil penapisan sekitar 2.200 isolat actinomycetes koleksi Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, ditemukan bahwa *Streptomyces chartreusis* menghasilkan inhibitor RNA helicase. Dalam studi ini, inhibitor tersebut dipurifikasi menggundakan pengendapan ammonium sulfat dan kromatografi gel filtrasi.

METODOLOGI PENELITIAN

Purifikasi Enzim RNA helikase JEV dan Pengukuran Aktivitas ATPase

Eksprei dan purifikasi enzim RNA helikase JEV dilakukan berdasarkan metode Utama *et al* (2000). Pengukuran aktivitas ATPase juga dilakukan sesuai dengan laporan terdahulu (7).

Kultur *Streptomyces chartreusis*

Satu ose *Streptomyces chartreusis* diinokulasikan ke dalam 300 ml medium ISP2 (yeast extract 1,2 g; malt extract 3 g; glukosa 1,2 g) dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 10 hari dengan pengocokan 200 rpm. Kultur kemudian disentrifuge pada 17.548 g selama 1 jam pada suhu 4°C, dan kultur supernatant digunakan untuk pengendapan ammonium sulfat.

Pengendapan Amonium sulfat

Ammonium sulfat ditambahkan

sedikit demi sedikit ke dalam 250 ml kultur supernatan sampai mencapai konsentrasi saturasi 40% (13). Larutan selanjutnya diaduk perlahan dengan magnetik stirrer (20 rpm) sampai seluruh ammonium sulfat larut. Larutan kemudian didiamkan selama semalam, dan protein inhibitor yang mengendap dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 17.548 g selama 1 jam pada suhu 4°C. Endapan protein yang terbentuk dilarutkan dalam bufer Tris HCl (20 mM, pH 8) dan selanjutnya didialisis. Senyawa inhibitor hasil dialisis, diuji aktivitas inhibisinya terhadap aktivitas ATPase RNA helikase JEV. Pengendapan dilanjutkan untuk saturasi 50%, 60%, 70%, 80% dengan cara yang sama seperti diatas.

Kromatografi Gel Filtrasi

Sephadex G-50 dimasukkan ke dalam kolom (30 cm x 1,5 cm), diekuilibrasi dengan fase gerak metanol : air (4:6). Sebanyak 1 ml sampel hasil dialisis diinjeksikan kedalam kolom kromatografi dan dielusi dengan metanol:air (4:6) dengan laju alir 0,4 ml/menit. Tiap fraksi ditampung selama 5 menit. Keseluruhan proses purifikasi dilakukan pada suhu 4°C. Masing-masing fraksi elusi diuji aktivitas inhibisinya terhadap aktivitas ATPase RNA helikase JEV.

Pengukuran aktivitas inhibitor RNA helikase

Uji aktivitas inhibitor RNA helikase dilakukan berdasarkan metode sebelumnya (12). Persentase inhibisi

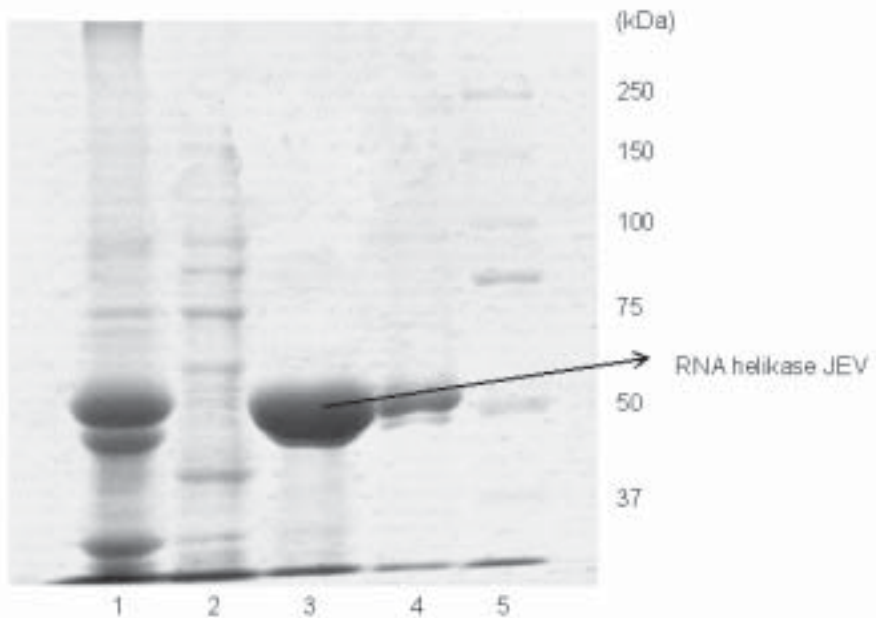
(%) diukur dengan menggunakan persamaan : $[(A-I) / A] \times 100\%$, dimana A adalah aktivitas enzim yang diukur tanpa adanya senyawa inhibitor dan I adalah aktivitas enzim yang diukur dengan adanya senyawa inhibitor.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Purifikasi Enzim RNA helikase JEV

Karena enzim rekombinan RNA helikase JEV memiliki 6 histidine residue pada C-terminal, enzim ini dipurifikasi dengan kromatografi afinitas menggunakan resin BD TALON™, yang secara spesifik berikatan dengan histidine residue. Analisis SDS-PAGE menunjukkan adanya pita tunggal dengan berat

molekul sekitar 50 kDa pada fraksi elusi 1 (E1) dan 2 (E2) (Gambar 1). Sementara pada fraksi pelet terdapat banyak pita yang menunjukkan protein-protein yang dihasilkan oleh *E. coli* yang digunakan untuk memproduksi enzim RNA helikase. Hal ini menunjukkan bahwa enzim RNA helikase telah berhasil dipurifikasi. Resin BD TALON™ banyak digunakan untuk purifikasi protein rekombinan yang memiliki histidin residue. Selain Utama *et al.* (2000) yang menggunakan resin ini untuk purifikasi RNA helikase JEV, Yon *et al.* (2005) juga telah berhasil memurnikan RNA helikase virus dengue tipe 2 (DENV2) (14).



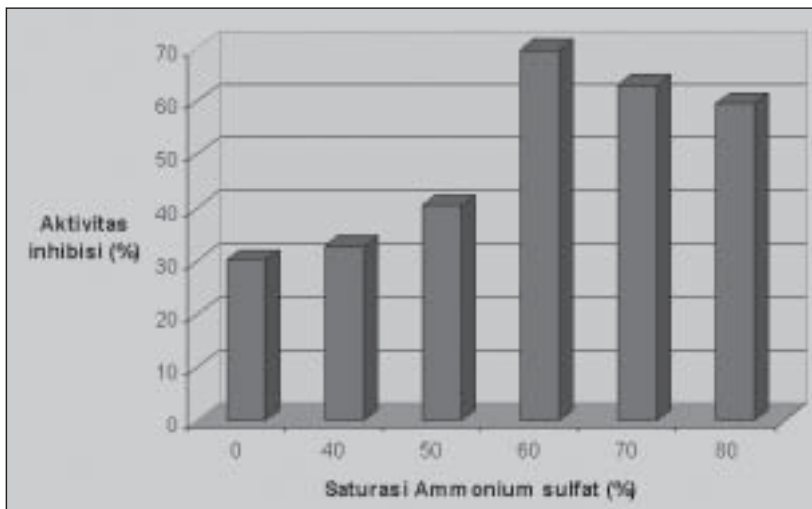
Gambar 1. Analisis SDS-PAGE enzim RNA helikase JEV, lane 1: pelet sel; lane 2: inner volum; lane 3: enzim helikase (elusi 1); lane 4: enzim helikase elusi 2; lane 5: marka protein

Purifikasi Inhibitor RNA helikase JEV

Dari hasil uji kolorimetrik ATPase, sampel dengan saturasi ammonium sulfat 60% memiliki aktivitas inhibisi tertinggi dengan nilai aktivitas inhibisi 69,84% dan kadar protein 6,09 mg (Gambar 2). Ekstrak kasar senyawa inhibitor mempunyai aktivitas inhibisi terhadap ATPase RNA helikase sebesar 27,71%, setelah diendapkan dengan ammonium sulfat pada saturasi 60% aktivitas inhibisi meningkat menjadi 69,87%. Oleh karena itu dalam purifikasi selanjutnya dilakukan pengendapan senyawa inhibitor ekstrak kasar menggunakan ammonium sulfat dengan saturasi 60%.

Pemurnian inhibitor RNA helikase JEV hasil dialisis dari saturasi ammonium sulfat 60%, selanjutnya dimurnikan dengan kromatografi gel

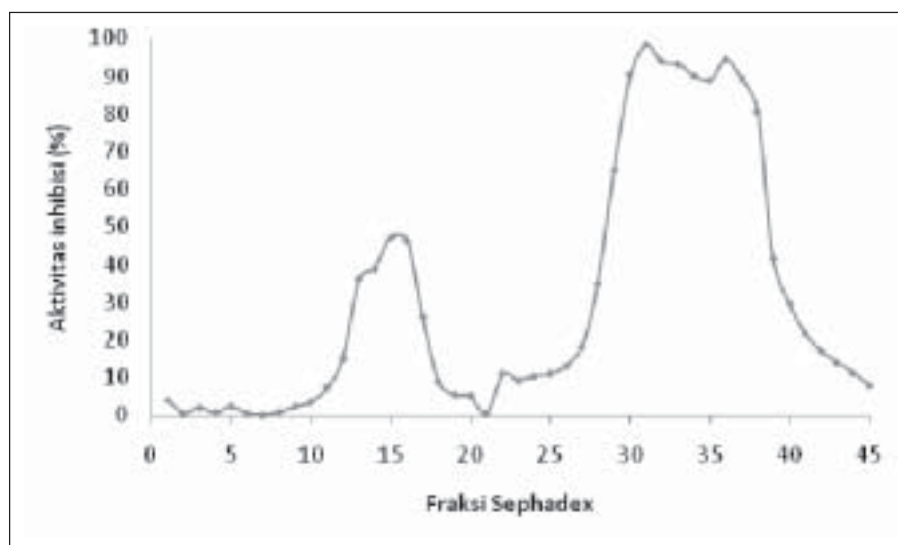
filtrasi. Pada penelitian ini matrik sephadex G-50 digunakan sebagai fasa diam. Sedangkan untuk fasa gerak digunakan metanol : air (4 : 6). Pada umumnya untuk mengelusi senyawa protein dengan kromatografi gel filtrasi yang menggunakan matrik sephadex digunakan larutan bufer, seperti bufer Tris HCl atau bufer fosfat. Akan tetapi penggunaan bufer Tris HCl 20 mM sebagai eluen pada penelitian ini memberikan hasil pemisahan fraksi yang tidak baik dan aktifitas inhibisi masing-masing fraksi eluat menjadi rendah. Hal ini mungkin disebabkan karena senyawa inhibitor tersebut banyak mengandung gugus hidrofobik, sehingga dengan penambahan pelarut organik seperti metanol dapat mengurangi interaksi hidrofobik antara protein dengan matriksnya. Penggunaan metanol : air sebagai fasa gerak



Gambar 2. Grafik pengendapan dengan Ammonium sulfat dan pengaruhnya terhadap aktivitas inhibitor

Tabel 1. Ringkasan purifikasi inhibitor RNA helikase JEV dari *Streptomyces chartreusis*

Step purifikasi	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total aktivitas (U)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Purity	Yield (%)
Ekstrak kasar	400	93,20	699,56	7,51	1,00	100,00
Pengendapan Am. Sulfat 60%	15	8,46	254,40	30,07	4,00	36,37
Sephadex G-50	15	3,35	197,03	58,90	7,85	28,17

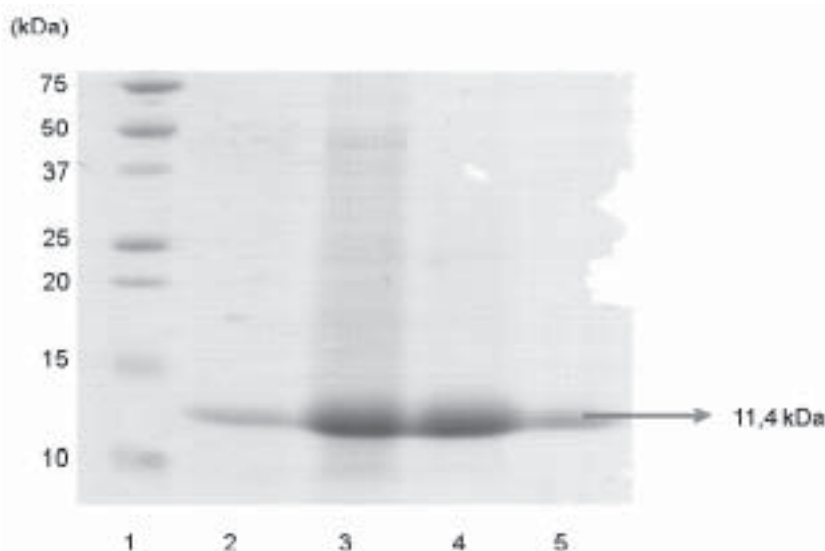


Gambar 3. Profil aktivitas inhibisi *Streptomyces chartreusis* dari fraksi gel filtrasi

memperlihatkan pemisahan yang jauh lebih baik (Gambar 3). Menurut Coligan *et al.* (1997), penggunaan metanol sebagai eluen bertujuan untuk menghindari interaksi solut-matriks (15). Fraksi ke 30-38 menunjukkan aktivitas inhibisi sebesar 80-98%. Fraksi 31 memperlihatkan aktivitas inhibisi tertinggi (98,23%). Senyawa inhibitor yang dimurnikan dengan menggunakan matrik sepha-

dex G-50 ini mempunyai aktivitas spesifik sebesar 58,9 U/mg dengan kemurnian 7,8 kali lebih murni dari ekstrak kasar dan perolehan hasil sebesar 28,2% (Tabel 1).

Senyawa inhibitor yang mempunyai aktivitas inhibisi tertinggi, dianalisis kemurniannya dengan SDS-PAGE dengan konsentrasi 15%. Pewarnaan dengan coomassie blue memperlihatkan pita protein tunggal



Gambar 4. Hasil SDS-PAGE inhibitor RNA helikase JEV dengan pewarnaan Coomassie blue G-250 Lane 1: marka protein; lane 2: ekstrak kasar; lane 3: saturasi amonium sulfat 60%; lane 4 dan 5: fraksi gel filtrasi

berwarna biru pada *lane* gel filtrasi dengan perkiraan berat molekul 11,4 kDa (Gambar 4). Penelitian yang dilakukan memperlihatkan hasil yang berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Hatsu *et al.* (2002). Hatsu menemukan inhibitor RNA helikase JEV dari *Streptomyces sp.* dengan 3 pita protein pada SDS-PAGE (12). Ketiga pita protein tersebut mempunyai berat molekul masing-masing 67, 60 dan 58 kDa. Sementara Komala (2008) menemukan inhibitor RNA helikase dengan 2 pita protein pada SDS-PAGE dengan berat molekul 10 dan 14 kDa (16).

KESIMPULAN

Protein inhibitor RNA helikase JEV yang dihasilkan oleh *Streptomy-*

ces chartreusis telah berhasil dimurnikan menggunakan pengendapan amonium sulfat dan kromatografi gel filtrasi. Hasil analisis SDS-PAGE menunjukkan bahwa inhibitor RNA helikase JEV mempunyai berat molekul sekitar 11,4 kDa. Protein inhibitor RNA helikase memiliki aktivitas spesifik 58,90 U/mg dan tingkat kemurnian 7,85 kali.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Muhamad Ridwan yang membantu pelaksanaan penelitian ini. Penelitian didanai oleh Dana Riset Kompetitif LIPI tahun anggaran 2007/2008.

DAFTAR PUSTAKA

1. Erlanger ET, S Weiss, J Keiser, J Utzinger and K Wiedenmayer. 2009. Past, Present and Future of Japanese encephalitis. *Emerg Infect Dis.* **15**: 1-7.
2. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2004. Japanese encephalitis.
3. Wei L. 2005. *Disease burden of Japanese encephalitis: epidemiologic perspectives*. Workshop and training surveilans Japanese encephalitis di rumah sakit. Jakarta, 17-19 Februari 2005.
4. Ray D dan PY Shi. 2006. Recent advances in flavivirus anti viral drug discovery and vaccine development. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery.* **1**: 45-55.
5. Kwong DA, B Govinda R, dan TJ Kuan. 2005. Viral and Cellular RNA Helicases as Antiviral Targets. *Nat Rev Drug Discov.* **5**:845-853.
6. Paeshuyse J, P Leysen, E Mabery, N Bodderker, *et. al.* 2006. A novel, highly selective inhibitor of Pestivirus replication that targets the viral RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol.* **80**: 149-160.
7. Utama A, H Shimizu, S Morikawa, F Hasebe, K Morita, A Igarashi, *et. al.* 2000. Identification and characterization of the RNA helicase activity of Japanese encephalitis virus NS3 protein. *FEBS Lett.* **465**: 74-78.
8. Borowski P, M Lang, A Haag, H Schmitz, J Choe, HM Chen, *et. al.* 2002. NTPase / helicase of *Flaviviridae*: inhibitors and inhibition of the enzyme. *Acta Biochim Pol.* **49**: 597-614.
9. Boguszewska-Chachulska AM, M Krawczyk, A Stankiewicz, A Gozdek, AL Haenni & L Strokovskaya. 2004. Direct fluorometric measurement of hepatitis C virus helicase activity. *FEBS Lett.* **567**: 253 - 258.
10. Lopes A, RRR Coelho, MNL Meirelles, MH Branquinha, AB Vermelho. 1999. Extracellular serine-proteinases isolated from *Streptomyces alboniger*: Partial charactreization and effect of apronitin cellular structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **94**: 763-770.
11. Zitouni A, H Boudjella, L Lamari, B Badji, F Mathieu, A Lebrihi, *et. al.* 2005. Nocardiosis and Saccharothrix genera in Saharan Soil in Algeria: Isolation, biological activities and partial characteriazation of antibiotics. *Res Microbiol.* **156**: 984-993.
12. Hatsu M, M Tanaka, A Utama, H Shimizu, dan K Takamizawa. 2002. A Japanese Encephalitis Virus NS3 Inhibitor Produced by a *Streptomyces* sp. *Actinomycetol.* **16**: 6-8.
13. Scopes RK. 1994. *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Ed. New York Inc., Springer-Verlag.
14. Yon C, T Teramoto, N Mueller, J Phelan, VK Ganesh, KHM Mur-

- thy, et. al. 2005. Modulation of the nucleoside triphosphatase/ RNA helicase and 5'- RNA triphosphatase activities of Dengue virus type 2 NS3 by interaction with NS5, the RNA- dependent RNA polymerase. *J Biol Chem.* **1**: 1 – 26.
15. Coligan JE, BM Dunn, HL Ploegh, DW Speicher, dan PT Wingfield. 1997. *Current Protocols in Protein Science*, Vol 1. John Wiley & Sons Inc., USA.
 16. Komala RS. 2008. *Purifikasi dan karakterisasi protein ekstraselular dari Streptomyces chartreusis 5-095 yang bersifat inhibitor terhadap RNA helikase virus Japanese encephalitis*. Tesis Program S2, Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
 17. Grace SY. 2006. *Penapisan inhibitor RNA Helikase dari Actinomyces terhadap virus Japanese Encephalitis*. Skripsi Program S1. Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, Depok.
 18. Zulaichah S. 2007. *Skrining Inhibitor RNA Helikase Virus Japanese encephalitis dari Aktinomisetes*. Skripsi Program S1. Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farmasi, Bogor.