

# PEMURNIAN POLISAKARIDA DARI MIKROALGA BTM 11 SEBAGAI INHIBITOR RNA HELIKASE VIRUS HEPATITIS C

## *Optimization of Polysaccharide Purification from Microalgae BTM 11 as RNA Helicase Hepatitis C Virus Inhibitor*

Apon Zaenal Mustopa<sup>1\*</sup>, Aksar Chair Lages<sup>2</sup>, Iriani Setyaningsih<sup>2</sup>, Muhamad Ridwan<sup>1</sup>,  
Rifqiyah Nur Umami<sup>1</sup>, Dwi Susilaningsih<sup>1</sup>, Delicia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor  
E-mail: azmustopa@yahoo.com

Diterima 22 Oktober 2012 /Disetujui 30 November 2012

### Abstract

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of chronic liver disease worldwide. Polysaccharide from microalgae has the ability against HCV infection. Extract of microalgae BTM 11 is able to inhibit RNA helicase of HCV. The study aimed to purify polysaccharide from microalgae BTM 11 extract. This study included isolation of HCV RNA helicase from *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLyss carrier of NS3 helicase gene in pET 21b plasmid using affinity chromatography, and purification of polysaccharides from microalgae BTM 11 using gel filtration and ion-exchange chromatography. Inhibitor activity was measured using releasing of phosphate inorganic in colorimetric of ATPase. The results of SDS-PAGE showed that purified RNA helicase had a molecular weight of 54 kDa. Gel filtration chromatography could purify active fraction of polysaccharide for RNA helicase inhibitors with activity of 78.76% and sugar content of 2.97 mg/mL, while using ion-exchange had inhibitor activity of 74.6% with sugar content of 3.21 mg/mL. Profile of the inhibitor on thin layer chromatography (TLC) showed one spot of the active compound, but the results obtained from high performance liquid chromatography (HPLC) showed three peaks compounds as that the fractions of inhibitor polysaccharide are still needed to be purified further.

Key words: chromatography, HCV, microalgae BTM 11, polysaccharide, RNA helicase

### Abstrak

Infeksi virus hepatitis C (HCV) merupakan penyebab utama penyakit hati kronis di seluruh dunia. Polisakarida dari mikroalga memiliki kemampuan melawan infeksi HCV. Ekstrak mikroalga BTM 11 mampu melawan HCV dengan cara menghambat RNA helikase. Penelitian ini ditujukan untuk memurnikan polisakarida dari ekstrak mikroalga BTM 11. Tahapan penelitian ini meliputi isolasi RNA helikase HCV dari bakteri *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLyss yang membawa gen NS3 helikase dalam plasmid pET 21b menggunakan kromatografi afinitas, dan pemurnian polisakarida dari mikroalga BTM 11 dengan kromatografi gel filtrasi dan *ion-exchange*. Aktivitas inhibitor diketahui dari besarnya aktivitas ATPase yang dimiliki oleh RNA helikase. Analisis SDS-PAGE menunjukkan RNA helikase terpurifikasi dengan bobot molekul 54 kDa. Kromatografi gel filtrasi menghasilkan fraksi aktif polisakarida inhibitor RNA helikase dengan aktivitas sebesar 78,76% dan kandungan gula sebesar 2,97 mg/mL, sedangkan kromatografi *ion-exchange* memiliki aktivitas polisakarida inhibitor sebesar 74,6% dengan kandungan gula sebesar 3,21 mg/mL. Profil inhibitor pada kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan satu spot senyawa aktif, namun hasil kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) diperoleh tiga puncak senyawa yang menunjukkan bahwa hasil fraksi polisakarida inhibitor belum murni.

Kata kunci: HCV, kromatografi, mikroalga BTM 11, polisakarida, RNA helikase

\*Korespondensi: Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong, Bogor  
16911, E-mail: azmustopa@yahoo.com

## PENDAHULUAN

Infeksi virus hepatitis C (HCV) merupakan penyebab utama penyakit hati kronis di seluruh dunia. Jumlah penderita hati kronis di seluruh dunia hampir mencapai 200 juta jiwa (EASL 2011). Kementerian Kesehatan menyebutkan bahwa pada tahun 2010 jumlah penderita hepatitis C di Indonesia mencapai 7 juta jiwa (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia 2010).

Pengobatan yang dilakukan terhadap penderita hepatitis C selama ini adalah terapi dengan pemberian interferon yang dikombinasikan dengan ribavirin. Terapi ini memiliki tingkat efektivitas yang tidak lebih dari 50% terhadap infeksi HCV genotip 1 dan 4, dan tidak lebih dari 80% terhadap genotip 2 dan 3. Terapi ini juga dapat menimbulkan efek samping berupa flu, depresi dan anemia (Clercq 2004), oleh karena itu diperlukan suatu obat baru yang dapat mengatasi infeksi virus hepatitis C.

Upaya dalam menemukan obat HCV terus dilakukan dengan mencari senyawa antiviral yang melawan virus dengan cara menghambat enzim yang penting bagi HCV salah satunya adalah *ribonucleid acid* (RNA) helikase. Borowski *et al.* (2008) menjelaskan bahwa enzim RNA helikase berperan dalam proses replikasi virus HCV, yaitu membuka ikatan dupleks RNA virus agar dapat direplikasikan. Utama *et al.* (2000) menjelaskan bahwa apabila proses pembukaan ikatan dupleks RNA virus sebagai induk (template) genetik tidak dapat dilakukan, maka proses translasi informasi genetik tidak dapat berjalan sehingga siklus hidup HCV terhenti.

Borowski *et al.* (2002) menjelaskan bahwa selain membuka ikatan dupleks, RNA helikase juga memiliki aktivitas ATPase, yaitu aktivitas yang menguraikan ATP (*adenosine triphosphate*) menjadi ADP (*adenosine diphosphate*) dan Pi (fosfat anorganik). Proses penguraian ini menghasilkan energi yang digunakan untuk menguraikan pasangan DNA atau RNA. Hal ini menjelaskan bahwa

penghambatan terhadap aktivitas enzim RNA helikase dianggap lebih potensial sebagai target obat hepatitis C.

Inhibitor enzim RNA helikase dapat diperoleh dari senyawa metabolit, misalnya metabolit dari mikroalga. Setyaningsih *et al.* (2005) menjelaskan bahwa mikroalga merupakan produsen alami dari ekosistem perairan yang dapat menghasilkan metabolit yang sangat bermanfaat, sehingga keberadaannya sebagai organisme hidup yang mikroskopis sudah mulai banyak dikaji. Ye *et al.* (2008) menjelaskan bahwa mikroalga memiliki banyak komponen bioaktif yang sangat berpotensi sebagai obat antiinflamasi, antitumor, antimikroba, dan antivirus. Sanchez *et al.* (2007) menjelaskan bahwa biomassa mikroalga mengandung beberapa komposisi kimia yang potensial, misalnya protein, karbohidrat, pigmen (klorofil dan karotenoid), asam amino, lipid dan hidrokarbon. Karbohidrat yang dihasilkan dapat ditemukan dalam bentuk pati, glukosa, gula dan polisakarida lainnya. Obyek yang umum dijadikan target penemuan obat adalah senyawa kimia dan jarang yang memfokuskan pada polisakarida sebagai antivirus hepatitis C.

Laboratorium Bakteriologi dan Virologi Molekuler, Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI Cibinong telah melakukan penapisan terhadap 30 isolat mikroalga dengan pelarut metanol. Hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak kasar mikroalga BTM 11 memiliki aktivitas penghambatan tertinggi terhadap RNA helikase HCV dan bersifat stabil dibandingkan isolat lainnya, namun dalam pengembangan polisakarida dari mikroalga BTM 11 sebagai inhibitor RNA helikase HCV dibutuhkan informasi awal mengenai teknik pemurnian yang terbaik dalam menghasilkan aktivitas inhibisi yang optimum, oleh karena itu perlu adanya optimalisasi dalam pemurnian polisakarida dari mikroalga BTM 11 sehingga dapat diaplikasikan sebagai inhibitor RNA helikase HCV.

## MATERIAL DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan meliputi bakteri *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS yang membawa gen NS3 RNA helikase virus hepatitis C dalam plasmid pET 21b (koleksi Andi Utama, Puslit Bioteknologi LIPI) dan isolat mikroalga BTM 11 (koleksi Dwi Susilaningsih, Laboratorium Biorekayasa Lingkungan, Puslit Bioteknologi LIPI). Media yang digunakan adalah Luria Bertani (LB) sebagai media pertumbuhan bakteri, media *IMK-Sea Water* sebagai media pertumbuhan mikroalga, dan bahan-bahan kimia lainnya.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah ultrasentrifus (Sorvall RC-26 plus), sonikator, *waterbath*, tabung sentrifus, labu Erlenmeyer, inkubator, rotator, *microtiter plate*, *microplate reader* (Multiscan EX Thermo), pipet mikro, oven, kolom kromatografi, SDS-PAGE, tabung vial, *hot plate magnetic stirrer*, dan timbangan digital.

### Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap. Tahap satu yaitu preparasi RNA helikase HCV yang meliputi (1) ekspresi RNA helikase dengan cara menumbuhkan bakteri *E. coli* BL21 (DE3) pLysS yang membawa gen NS3 RNA helikase HCV dalam plasmid pET 21b (Utama *et al.* 2000), dan (2) pemurnian RNA helikase yang telah terekspresi pada sel bakteri menggunakan kromatografi afinitas (Utama *et al.* 2000). Tahap dua meliputi (1) kultivasi mikroalga BTM 11 dalam media *IMK-Sea Water* pada suhu ruang dengan pencahayaan 4800 lux, dan (2) ekstraksi polisakarida dari biomassa mikroalga BTM 11 (Wang *et al.* 2004). Tahap tiga meliputi (1) pemurnian ekstrak polisakarida menggunakan teknik kromatografi gel filtrasi dan kromatografi *ion-exchange*, dan (2) penentuan profil senyawa polisakarida inhibitor yang paling aktif menggunakan kromatografi lapis tipis dan kromatografi cair kinerja tinggi.

Analisis yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi (1) penentuan bobot molekul RNA

helikase murni menggunakan SDS-PAGE, (2) uji aktivitas penghambatan RNA helikase HCV menggunakan uji kolorimetri ATPase terhadap ekstrak polisakarida dan fraksi polisakarida termurnikan, (3) penentuan kandungan gula pada fraksi polisakarida murni yang memiliki aktivitas penghambatan yang tinggi terhadap RNA helikase HCV.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

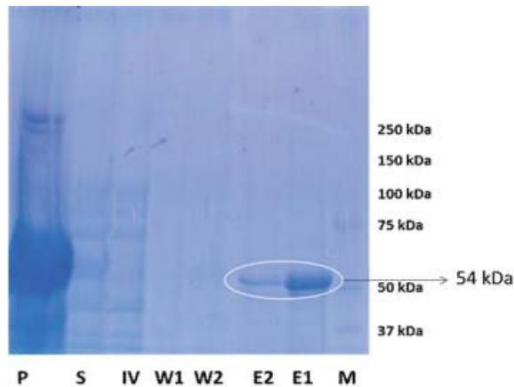
### RNA Helikase Virus Hepatitis C

Enzim RNA helikase HCV terekspresi secara intraseluler pada sel *E. coli* BL21 (DE3) pLysS sehingga untuk memurnikannya harus dilakukan pemecahan dinding sel terlebih dahulu agar komponen intraseluler termasuk RNA helikase HCV dapat keluar dari dalam sel *E. coli*. Hasil pemecahan sel bakteri (*cell lysate*) diduga telah mengandung enzim RNA helikase HCV sehingga harus dimurnikan menggunakan kromatografi afinitas. Metode ini didasarkan pada pengikatan spesifik logam  $\text{Ni}^{2+}$  atau  $\text{Co}^{2+}$  yang dimiliki resin TALON dengan label 6xHis-tag (*tag* protein dengan enam histidin) yang terdapat pada ujung RNA helikase. Petty (1996) menjelaskan bahwa histidin akan berikatan secara selektif ke logam  $\text{Co}^{2+}$  resin TALON meskipun dalam resin tersebut terdapat ion metal bebas lainnya.

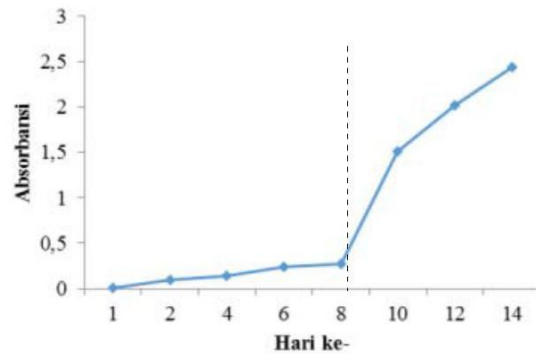
Hasil SDS-PAGE menunjukkan pita protein tunggal dengan bobot 54 kDa pada hasil elusi dengan imidazole sehingga dapat dikatakan bahwa RNA helikase HCV telah berhasil dipurifikasi (Gambar 1). Hal ini sesuai dengan hasil yang telah dilaporkan Utama *et al.* (2000) yang menyatakan bahwa bobot molekul RNA helikase yang dimiliki oleh virus hepatitis C adalah sebesar 54 kDa. BD Bioscience Clontech (2003) menjelaskan bahwa konsentrasi imidazole hingga lebih dari 200 mM menyebabkan protein yang memiliki residu His-tag terdisosiasi karena tidak mampu lagi bersaing untuk berikatan dengan resin.

### Biomassa Mikroalga BTM 11

Mikroalga BTM 11 merupakan salah satu ganggang atau fitoplankton yang



Gambar 1 Analisis SDS-PAGE pemurnian RNA helikase HCV. P: pelet sel, S: supernatan hasil lisis, IV: inner volume (supernatan binding), W1: pencucian pertama, W2: pencucian kedua, E1 & E2: RNA helikase HCV, M: marker protein.



Gambar 2 Kurva pertumbuhan mikroalga BTM 11.

diisolasi dari Perairan Laut Batam, dengan lokasi spesifik yaitu pada titik/stasiun ke-11 di area pengamatan. Kultur mikroalga BTM 11 sebanyak 30 liter selama 14 hari menghasilkan biomassa basah hasil panen sebesar 338 g (1,13% bobot basah). Mikroalga BTM 11 dipanen sebelum mencapai fase stasioner (fase pertumbuhan) (Gambar 2). Hal ini berdasarkan pada waktu pembentukan makromolekul polisakarida dalam sel mikroalga. Arad *et al.* (1985) menjelaskan bahwa aktivitas optimum pembentukan polisakarida terjadi pada fase stasioner, namun pembentukan polisakarida pada fase stasioner dilakukan bersamaan dengan sekresi polisakarida tersebut oleh mikroalga ke media tumbuh yang dapat dilihat dari peningkatan viskositas media tumbuh mikroalga.

**Ekstrak Polisakarida Mikroalga BTM 11**

Hasil ekstraksi dari 2 g biomassa kering menghasilkan 50 mg ekstrak polisakarida. Ekstrak kasar polisakarida inhibitor kemudian diuji aktivitas penghambatannya menggunakan uji ATPase. Hasil pengujian menunjukkan ekstrak kasar polisakarida BTM 11 dapat menghambat aktivitas ATPase dari RNA helikase HCV sebesar 64,65%. Nilai ini menunjukkan bahwa inhibitor menghambat

sebesar 64,65% aktivitas enzim per 1 molekul RNA helikase dalam menghidrolisis ATP menjadi ADP dan fosfat anorganik.

Aktivitas inhibisi (Tabel 1) fluktuatif selama proses ekstraksi polisakarida. Hasil maserasi tahap akhir oleh NaCl 0,9% memiliki aktivitas penghambatan terhadap RNA helikase lebih besar dari 100%, hal ini dikarenakan masih terdapatnya senyawa-senyawa yang dalam aktivitasnya secara *in vitro* dapat menghambat aktivitas RNA helikase. Tahap selanjutnya, yaitu deproteinasi menggunakan TCA 10% menunjukkan aktivitas penghambatan yang lebih rendah dari sebelumnya, hal ini dapat terjadi karena sebagian senyawa terendapkan oleh TCA sehingga filtrat hasil presipitasi tersebut memiliki aktivitas yang rendah. Ye *et al.* (2008) menjelaskan bahwa penambahan TCA dapat menghilangkan protein yang terkandung dalam sampel.

Ekstrak kasar polisakarida memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan hasil deproteinasi. Hal ini dikarenakan pemekatan dengan *freeze dryer* dari hasil deproteinasi yang menyebabkan konsentrasi ekstrak

Tabel 1 Aktivitas inhibisi ekstrak polisakarida

Tahapan	Aktivitas inhibisi (%)
Maserasi akhir	103,4
Deproteinasi TCA	35,1
Pemekatan dengan <i>freeze dry</i>	64,6



meningkat sehingga aktivitas penghambatan terhadap RNA helikase pun ikut meningkat karena minimnya pengaruh dari pelarut. Zhang *et al.* (2012) menjelaskan bahwa pelarut dapat mempengaruhi nilai aktivitas antivirus sehingga pelarut harus dihilangkan agar dapat diketahui besarnya aktivitas penghambatan yang murni dimiliki oleh inhibitor.

### Pemurnian Polisakarida Inhibitor RNA Helikase

#### Kromatografi Gel Filtrasi

Pemurnian polisakarida BTM 11 dilakukan menggunakan kolom kromatografi Sepharose 4B. Matriks gel Sepharose 4B menggunakan fase gerak etanol:air (3:7) menghasilkan penghambatan tertinggi terhadap RNA helikase HCV sebesar 78,76% pada fraksi ke-13 (Gambar 3) dengan konsentrasi penghambatan sebesar 0,7615 mM. Nilai ini sudah merupakan nilai murni penghambatan karena sudah dikurangi dengan kontrol negatif. Kontrol negatif digunakan untuk mengetahui pengaruh dari pelarut yang digunakan. Kontrol positif tidak digunakan karena belum ditemukannya obat atau vaksin yang sesuai untuk infeksi virus hepatitis C.

Hasil fraksinasi dengan aktivitas penghambatan tertinggi yang diperoleh tergolong cukup efektif, dan lebih tinggi jika dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya. Mori *et al.* (2012) melaporkan bahwa polisakarida yang diisolasi dari makroalga *Cladosiphon okamuranus* memiliki aktivitas penghambatan terhadap replikasi HCV sebesar 60%. Perbedaan ini karena

penggunaan metode ekstraksi dan pemurnian yang digunakan berbeda sehingga kandungan polisakarida yang aktif menghambat virus hepatitis C juga berbeda.

#### Kromatografi Ion-Exchange

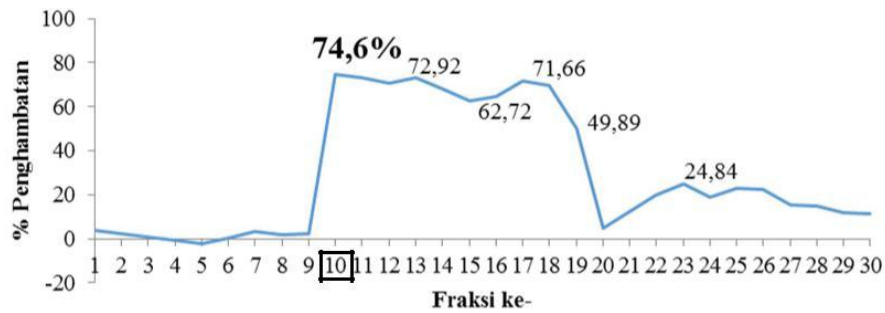
Pemurnian ini menggunakan sistem elusi gradien. Eluen yang dipakai adalah NaCl dengan konsentrasi dimulai dari 0,1-1 M. Aktivitas penghambatan tertinggi adalah sebesar 74,6% dengan konsentrasi 0,7205 mM pada fraksi ke-10 (Gambar 4). Nilai ini merupakan nilai murni aktivitas penghambatan karena sudah dikurangi dengan kontrol negatif yaitu NaCl 0,25 M. Aktivitas penghambatan ini lebih rendah dari hasil kromatografi gel filtrasi. Hal ini kemungkinan diduga karena interaksi yang lebih kuat antara eluen dengan polisakarida inhibitor pada kromatografi gel filtrasi, sehingga zat aktif akan lebih mudah terelusi oleh fase gerak. Rinaudo (2006) menjelaskan polisakarida berikatan kuat dengan molekul polar dengan cara membentuk ikatan hidrogen dari gugus -OH yang dimilikinya.

#### Kandungan Gula

Fraksi aktif dalam penghambatan terhadap RNA helikase HCV pada tiap teknik kromatografi dianalisis untuk menentukan konsentrasi gula penyusun polisakarida pada sampel. Gula penyusun polisakarida yang dianalisis dalam penelitian ini adalah glukosa. Fraksi 13 kromatografi gel filtrasi dengan nilai aktivitas penghambatan tertinggi terhadap RNA helikase HCV memiliki konsentrasi



Gambar 3 Inhibisi polisakarida fraksi gel filtrasi terhadap aktivitas ATPase RNA helikase HCV.



Gambar 4 Inhibisi polisakarida fraksi ion-exchange terhadap aktivitas ATPase RNA helikase HCV.

gula sebesar 2,97 mg/mL, sedangkan fraksi 10 kromatografi ion-exchange memiliki konsentrasi gula sebesar 3,21 mg/mL (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa kandungan gula tidak selalu berkorelasi dengan aktivitas penghambatan dari polisakarida inhibitor. Hal ini disebabkan analisis hanya dilakukan terhadap glukosa yang merupakan salah satu penyusun polisakarida sehingga tidak tertutup kemungkinan bahwa glukosa berikatan dengan senyawa lain dalam menghambat RNA helikase HCV.

**Kemurnian Fraksi Aktif Polisakarida Inhibitor**

**Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Kromatografi lapis tipis dilakukan untuk melihat profil kimiawi dari fraksi 13 kromatografi gel filtrasi yang memiliki aktivitas penghambatan paling besar terhadap RNA helikase HCV. Hasil KLT (Tabel 3) menunjukkan bahwa fraksi 13 mempunyai 1 spot dengan nilai Rf sebesar 0,832. Nilai ini mendekati spot yang ditunjukkan oleh standar glukosa yang digunakan dengan

nilai Rf sebesar 0,834 sehingga diduga bahwa komponen aktif yang terdeteksi merupakan senyawa glukosa. Hasil penelitian lain yang dilaporkan Biringanine et al. (2012) menunjukkan bahwa polisakarida inhibitor HCV dari tumbuhan *Plantago palmata* memiliki kandungan monosakarida jenis ramnosa, arabinosa dan glukosa dengan nilai Rf pada KLT sebesar 0,3; 0,5 dan 0,65. Perbedaan nilai Rf dapat dipengaruhi oleh fase gerak yang digunakan. Soczewinski dan Wawrzynowics (2003) menjelaskan bahwa senyawa yang berikatan lebih kuat dengan fase diam akan terpisah paling akhir dikarenakan daya serap adsorben dengan komponen-komponen senyawa tidak sama sehingga senyawa tersebut akan bergerak dengan kecepatan yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya.

**Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**

Fraksi dengan aktivitas tertinggi (fraksi 13) dari hasil fraksinasi gel filtrasi dianalisis kemurniannya menggunakan teknik kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT/

Tabel 2 Analisis kandungan gula

Sampel	Aktivitas inhibisi (%)	Kandungan gula (mg/mL)
Kromatografi gel filtrasi	Fraksi 12	3,51
	<b>Fraksi 13</b>	<b>2,97</b>
	Fraksi 14	0,45
Kromatografi ion-exchange	<b>Fraksi 10</b>	<b>3,21</b>
	Fraksi 11	3,50
	Fraksi 12	3,77

Tabel 3 Nilai  $R_f$  senyawa aktif polisakarida

Sampel	$R_f$
Fraksi 13 kromatografi gel filtrasi	0,832
Standar glukosa	0,834

HPLC). Fraksi 13 memiliki tiga *peak* (Gambar 5), satu *peak* tajam yang menunjukkan *retention time* (Rt) sebesar 4,072 dan dua *peak* lainnya yang terdeteksi dengan Rt 4,706 dan 5,530. Hal ini menunjukkan bahwa hasil fraksi aktif yang didapat tersebut belum murni karena masih terdapat senyawa lain.

Senyawa-senyawa yang terdeteksi diduga berperan dalam penghambatan aktivitas RNA helikase virus hepatitis C, namun belum diketahui aktivitas inhibisi dari masing-masing senyawa tersebut. Mekanisme inhibitor RNA helikase meliputi (1) inhibitor menempel pada RNA helikase tidak pada sisi aktifnya, namun terjadi perubahan konformasi bentuk enzim yang mengakibatkan berkurangnya interaksi enzim dengan substrat (Borowski *et al.* 2008), (2) inhibitor berikatan pada sisi aktif enzim (RNA *binding-site*) sehingga ATP tidak dapat berikatan dengan enzim, menyebabkan enzim tidak memiliki cukup energi untuk membuka untai ganda RNA (Yamashita *et al.* 2012).

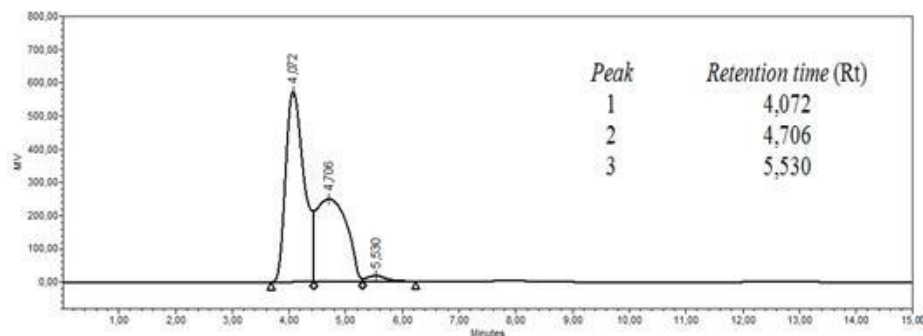
## KESIMPULAN

Kultur mikroalga BTM 11 dapat tumbuh pada media *IMK-Sea Water* dengan menghasilkan biomassa basah sebesar 1,13%

pada umur panen 14 hari. Polisakarida yang memiliki aktivitas inhibisi tertinggi terhadap RNA helikase HCV diperoleh melalui pemurnian menggunakan kromatografi gel filtrasi, dengan aktivitas sebesar 78,76% dan kandungan gula sebesar 2,97 mg/mL. Hasil pemurnian lanjutan menggunakan KLT menghasilkan satu spot senyawa aktif dengan nilai  $R_f$  sebesar 0,832. Hasil analisis fraksi aktif dengan KCKT diperoleh 3 puncak senyawa yang menandakan bahwa hasil fraksi polisakarida belum murni.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arad SM, Adda M, Cohen E. 1985. The potential of production of sulfated polysaccharides from *Porphyridium. Plan and Soil* 89: 117-127.
- BD Bioscience Clontech. 2003. *BD TALON TM Metal Affinity Resins User Manual*. Becton: Dickinson & Company. 47 hlm.
- Biringanine G, Ouedraogo M, Vray B, Samuelson AB, Duez P. 2012. Partial chemical characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Plantago palmata*. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* : 1-7.
- Borowski P, Niebuhr A, Schmitz H, Hosmane RS, Bretner M, Siwecka MA, Kulikowski T. 2002. NTPase/helicase of Flaviviridae: inhibitors and inhibition of the enzyme. *Acta Biochimica Polonica* 49: 597-614.
- Borowski P, Heising MV, Miranda IB, Liao CL, Choe J, Baier A. 2008. Viral NS3



Gambar 5 Kromatogram KCKT fraksi 13.

- helicase activity is inhibited by peptides reproducing the Arg-rich conserved motif of the enzyme (motif VI). *Biochemical Pharmacology* 76: 28-38.
- Clercq ED. 2004. Antivirals and antiviral strategies. *Nature Review: Microbiology* 2: 704-720.
- [EASL] European Association for the Study of the Liver. 2011. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology* 55: 245-264.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2010. *Menkes Meluncurkan Program Pendataan Penyakit Hepatitis C Tahap II*. [terhubung berkala] <http://www.depkes.go.id/> [1 Juni 2012].
- Mori N, Nakasone K, Tomimori K, Ishikawa C. 2012. Beneficial effects of fucoidan in patient with chronic hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology* 18(18): 2225-2230.
- Petty KJ. 1996. Metal-chelate affinity chromatography. Dalam: Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, dan Wingfield PT, editor. *Current Protocols in Protein Science*. Washington: John Wiley & Sons Inc. 610 hlm.
- Rinaudo M. 2006. Non-covalent interaction in polysaccharide systems. *Macromolecular Bioscience*. 6: 590-610.
- Sanchez-Moyano JE, Garcia-Asencio IM, Garcia-Gomez JC. 2007. Effect of temporal variation of the seaweed *Caulerpa prolifera* cover on the associated crustacean community. *Marine Ecology* 28: 324-337.
- Setyaningsih I, Desniar, Sriwardani T. 2005. Konsentrasi hambatan minimum ekstrak *Chlorella* sp. terhadap bakteri dan kapang. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan* 8(1): 25-34.
- Soczewinski E, Wawryznowicz T. 2003. Gel filtration chromatography. Di dalam Jack Cazes, editor. *Encyclopedia of Chromatography*. New York: Marcel Dekker. 1679 hlm.
- Utama A, Shimizu H, Morikawa S, Hasebe F, Morita K, Igarashi A, Hatsu M, Takamizawa K, Miyamura T. 2000. Identification and characterization of the RNA helicase activity of Japanese encephalitis virus NS3 protein. *FEBS Letter* 456:74-78.
- Wang Y, Zhang M, Ruan D, Shashkov AS, Kilcoyne M, Savage AV, Zhang L. 2004. Chemical component and molecular mass of six polysaccharides isolated from the sclerotium of *Poria cocos*. *Carbohydrate Research* 339: 327-334.
- Yamashita A, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi K. 2012. Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. *Marine Drugs* 10: 744-761.
- Ye H, Wang K, Zhou C, Liu J, Zeng X. 2008. Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chemistry* 111: 428-432.
- 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): 1-16.



