

BIOINFORMATIKA, SOLUSI PENGEMBANGAN PRODUK BIOTEKNOLOGI DI INDONESIA: STUDI KASUS ENZIM PADA VAKSIN

Muhammad Yusuf^{1,2}, Umi Baroroh², Safri Ishmayana¹, Agus Safari¹, Vestika IW Hijah³, Clara S Ayesda³,
Undi Suhartono⁴, Kurnia Safitri⁴, Amiranda Nurul Syafithri⁵, Zahra Zahwia⁵, Nadira Permatasari⁶,
Cecep⁷, Muhammad RA Ghofir⁸, Toto Subroto^{1,2,*}

¹Fakultas MIPA, Universitas Padjadjaran

²Pusat Riset Bioteknologi Molekular dan Bioinformatika, Universitas Padjadjaran

³PT Medion, Bandung, Indonesia

⁴PT Biofarma, Bandung, Indonesia

⁵Fakultas Ilmu Komunikasi, Universitas Padjadjaran

⁶Fakultas Teknologi Industri Pertanian, Universitas Padjadjaran

⁷Fakultas Ilmu Sosial dan Politik, Universitas Padjadjaran

⁸Fakultas Teknik Geologi, Universitas Padjadjaran

ABSTRAK,

Industri produk bioteknologi di Indonesia merupakan bidang dengan potensi yang sangat besar. Sayangnya, hampir seluruh produk bioteknologi di Indonesia, khususnya protein, masih mengandalkan dari impor. Padahal khususnya di bidang kesehatan, keragaman genetik di Indonesia menjadikan produk bioteknologi sebagai prioritas untuk dapat dikembangkan secara mandiri. Salah satu produk bioteknologi adalah vaksin. Kejadian Luar Biasa difteri akhir-akhir ini telah menarik perhatian banyak pihak. Pengembangan vaksin baru yang lebih efektif dan efisien diperlukan untuk menanggulangi permasalahan tersebut. Kami bertujuan melakukan pengabdian kepada masyarakat kepada masyarakat ilmiah dan industri di Indonesia mengenai teknik rekayasa protein berbantuan bioinformatika, sehingga dapat mengakselerasi penemuan vaksin baru yang diperlukan di masyarakat. Akademisi dan industri di bidang vaksin dilibatkan dalam kegiatan pelatihan ini. Hasil dari penelitian adalah pendampingan riset vaksin berbantuan bioinformatika, sehingga diharapkan industri vaksin dapat mengaplikasikan metode ini dalam pengembangan produk kesehatan yang bermanfaat bagi masyarakat.

Kata kunci: bioinformatika, bioteknologi, riset produk, enzim, vaksin

PENDAHULUAN

Industri produk protein di Indonesia hampir seluruhnya mengandalkan sumber dari impor, padahal sumber daya alam di Indonesia sangat melimpah. Enzim merupakan salah satu protein yang memiliki sifat katalitik dan dapat diaplikasikan di berbagai bidang, seperti bidang industri pangan, tekstil, kesehatan, dan farmasi. Pada bidang industri pangan misalnya, enzim digunakan untuk mengolah bahan pangan menjadi produk yang memiliki nilai tambah. Alfa amilase merupakan salah satu enzim dengan nilai pasar terbesar di dunia. Enzim ini dapat mengubah sumber karbohidrat seperti tepung tapioka menjadi maltodekstrin, gula dengan tingkat kemanisan tinggi, maupun juga bioetanol. Sayangnya, sampai saat ini belum ada enzim dari sumber lokal yang dikembangkan langsung diaplikasikan di tingkat industri. Hal ini disebabkan karena proses industri seringkali melibatkan kondisi yang tidak alami sehingga enzim natif tidak dapat bekerja dengan baik.

Di negara maju, enzim di industri telah direkayasa dengan cara memodifikasi struktur proteinnya sehingga sifat fisiko-kimianya meningkat. Salah satu contoh enzim tersebut adalah Fungamyl, varian enzim alfa amilase yang telah direkayasa sehingga dapat bertahan pada suhu tinggi dan dalam kondisi pH rendah. Fungamyl merupakan salah satu produk yang dikembangkan oleh perusahaan terkemuka dunia, Novozyme. Metode yang digunakan pada pengembangan Fungamyl ini adalah bioinformatika. Teknik simulasi dinamika molekul (DM),

salah satu metode bioinformatika yang digunakan untuk meniru pergerakan partikel, atom, atau molekul pada suatu sistem di dalam program komputer, digunakan untuk menentukan gen yang perlu dimodifikasi pada sekuen alfa amilase *Aspergillus oryzae* (Frantzen et al., 2002). Melalui simulasi DM ini, daerah yang memiliki fleksibilitas tinggi dibuat menjadi lebih kaku dengan mengubah asam amino pada daerah tersebut agar menjadi lebih stabil. Beberapa varian Fungamyl, seperti tercantum pada paten US20070128313A1, dihasilkan dengan mengubah asam amino berdasarkan hasil simulasi DM pada struktur A. *oryzae*. Meskipun metode ini telah lama berkembang, sayangnya aplikasi di Indonesia untuk pengembangan enzim masih sangat jarang. Oleh karena itu, kami bermaksud untuk mengadakan pelatihan kepada para pelaku industri maupun peneliti di lingkungan akademik untuk dapat mengaplikasikan bioinformatika dalam pengembangan produk bioteknologi, khususnya protein.

Selain bidang industri, bidang kesehatan juga berkaitan erat dengan aplikasi enzim. Salah satu topik yang mengundang perhatian kami adalah munculnya Kejadian Luar Biasa (KLB) penyakit difteri yang telah lama dianggap sudah tereradikasi. Unsur berbahaya dari patogen difteri adalah suatu enzim, yaitu toksoid yang dapat mengatalisis reaksi ribosiltransferase dari NAD sehingga menghambat sintesis protein dari sel yang terinfeksi. Dalam pengembangan vaksin, toksin ini dipakai sebagai bahan utama vaksin difteri maupun penyakit lainnya melalui prinsip konjugasi. Namun, metode yang digunakan untuk “melemahkan” toksin masih sangat konvensional, yaitu

dengan menggunakan formaldehida. Meskipun metode ini masih direkomendasikan oleh WHO, tetapi metode ini memiliki beberapa kelemahan, seperti ketidakhomogenya produk toksoid (toksin yang dilemahkan) hasil reaksi. Untuk menanggulangi hal tersebut, modifikasi toksin secara genetik dapat digunakan dan hal ini telah lama dikembangkan serta telah dipatenkan sebagai toksoid yang lebih homogen dan aman. Pengembangan komponen vaksin seperti ini juga dapat dibantu dan diakselerasi dengan metode bioinformatika. Sayangnya, belum banyak peneliti vaksin di Indonesia yang mengembangkan komponen vaksin ini dengan berbantuan bioinformatika. Oleh karena itu, pada tahun ini fokus dari pelatihan bioinformatika yang dilakukan adalah penggunaan bioinformatika dalam pengembangan enzim sebagai komponen vaksin dan aplikasinya. Kami berkoordinasi dengan beberapa industri vaksin nasional dan mengundang mereka untuk mengimplementasikan bioinformatika untuk pengembangan vaksin.

Kami berharap dengan semakin meluasnya pemahaman konsep dan praktik bioinformatika dalam pengembangan vaksin di Indonesia, kita akan mampu untuk menghasilkan vaksin dengan kualitas yang lebih baik untuk kesejahteraan rakyat Indonesia. Disamping itu, keragaman genetik penyakit yang tersebar di Indonesia menyebabkan adanya perbedaan antara patogen yang beredar di Indonesia dengan negara pengembang vaksin yang kita impor.

Sebelumnya, kami telah berhasil merekayasa struktur enzim alfa-amilase dengan menambahkan *surface binding site* untuk meningkatkan adsorptivitasnya terhadap substrat. Rekayasa struktur enzim ini dilakukan dengan berbantuan metode bioinformatika. Simulasi dinamika molekul mutan baru menunjukkan tingkat adsorptivitas substrat yang baik dibandingkan dengan struktur asalnya (Yusuf *et al.*, 2017). Berbekal pengalaman tersebut, kami meyakini bahwa pemahaman atas struktur protein sangatlah penting dalam mengembangkan produk berbasis protein, diantaranya enzim.

Beberapa bulan yang lalu, Indonesia mengalami KLB difteri yang menarik perhatian seluruh dunia. Penyakit ini telah lama dianggap punah, salah satunya adalah karena keberhasilan program vaksinasi sehingga manusia memiliki imunitas yang baik terhadap penyakit difteri. Munculnya kembali difteri dapat disebabkan oleh beberapa hal, yaitu perubahan genetika patogen yang menyebabkan imunitas terdahulu gagal memberikan proteksi terhadap penyakit baru, serta berkurangnya kualitas vaksin yang diberikan kepada masyarakat.

Pada tahun 2017, Mulyastuti dkk menemukan bahwa gen pengode protein toksin pada difteri yang diambil dari isolat penyebab *outbreak* pada KLB tahun lalu tidak berubah. Meskipun terdapat beberapa mutasi genetik, namun mutasi tersebut tidak menyebabkan perubahan asam amino. Hal ini menandakan bahwa struktur toksin difteri tidak atau berubah dari dulu. Sehingga, salah satu hal yang berpotensi menyebabkan KLB kemarin adalah menurunnya kualitas vaksin

difteri yang digunakan oleh masyarakat Indonesia.

Difteri merupakan suatu penyakit menular yang disebabkan oleh bakteri *Corynebacterium diphtheria* (Funke, 1997), bakteri ini akan menghasilkan toxin yang dapat menyerang saluran pernafasan pada penderita yang menyebabkan pembengkakan serta menyerang organ lain seperti jantung, hati, paru-paru dan ginjal, jika tidak dilakukan tindakan dapat menyebabkan kematian (Rydell, 2004). Wabah difteri petama di Indonesia ditemukan pada tahun 1990 dan berhasil diatasi secara baik dengan pemberian vaksin difteri kemudian difteri kembali muncul pada tahun 2015 terdapat 252 kasus diantaranya 5 pasien meninggal, lalu pada tahun 2016 terdapat 415 kasus diantaranya 24 pasien meninggal, pada tahun 2017 kasus difteri semakin meningkat menjadi 593 kasus diantaranya 32 meninggal yang terjadi di seluruh Indonesia sehingga dinyatakan sebagai kejadian luar biasa oleh KEMENKES RI (Depkes, 2018)

Untuk mengatasi KLB pemerintah Indonesia mengadakan vaksinasi untuk mencegah penyebaran penyakit difteri (Depkes, 2018). Vaksin difteri merupakan suatu toksin yang telah dilemahkan atau dihilangkan toksisitasnya yang disebut toksoid. Dalam pembuatan toksoid difteri terdapat 2 metode yang dapat digunakan yaitu dengan reaksi kimia atau rekayasa genetik (Metz, 1992).

Metode rekayasa genetik pada pembuatan toksoid ialah dengan memutasi asam amino glisin menjadi asam glutamat yang mempengaruhi sisi pengikatan *Nicotinamide Adenosine Dinucleotide* (NAD) sehingga dapat mengurangi toksisitas dari toksin difteri yang dikenal sebagai CRM197 (Malito *et al.*, 2012).

Metode reaksi kimia pada pembuatan toksoid ialah dengan mereaksikan difteri toksin (DT) dengan formaldehid dan natrium borocianohidrida (NaCNBH_3) sehingga menghasilkan reaksi berupa asam amino lisin yang termetilasi (Glenny, 1923). Dalam pembuatan vaksin difteri metode yang digunakan hingga saat ini adalah metode reaksi kimia (CDC, 2018).

Penelitian Metz *et al.*, 2003 menghasilkan bahwa DT yang dimetilasi $\geq 50\%$ menyebabkan menurunnya toksisitas dan menghilangkan immunogenisitasnya terhadap antibodi spesifik. Antibodi spesifik yang dihasilkan oleh sel limfosit B tidak dapat mengenali sisi pengenalan pada antigen yang menyebabkan antibodi spesifik DT tidak terbentuk. Untuk membuktikan pengaruh lysin termetilasi terhadap epitop maka metode *in silico* merupakan metode yang tepat karena dapat membuktikan perubahan struktur yang terjadi pada toksoid dengan menganalisis pada epitop mapping.

Toxin Difteri

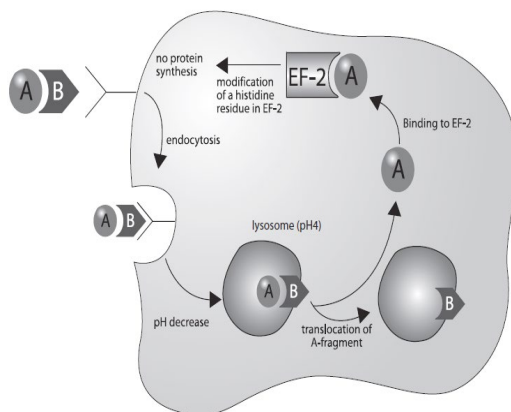
Toxin difteri terdiri atas 535 asam amino yang terdiri atas 3 domain diantaranya domain katalitik (C) residu 1 – 187, transmembran (T) residu 201 – 384, dan reseptor (R) 387 – 535 (Choe S *et al.*, 1992). Terdapat 2 fragmen pada toxin difteri yaitu fragmen A yang terdiri

atas domain katalitik dan fragmen B yang terdiri atas domain transmembrane dan reseptor. Kedua fragmen ini dihubungkan oleh jembatan cystein antara 186 dan 201 (Gambar1) (Pappenheimer, 1977).



Gambar 1. Struktur kristal toksin difteri (Choe S et.al, 1992).

Setiap domain pada DT memiliki peran dalam mekanisme penyerangan toksin terhadap sel inang, domain reseptor pada DT akan berikatan dengan reseptor *heparin-binding epidermal growth factor* (HB-EGF) yang ada pada permukaan sel sehingga DT dapat masuk ke dalam sel (Naglich *et al.*, 1992). Selanjutnya DT dibawa oleh endositosis menuju lisosom disini domain transmembran berfungsi agar DT dapat masuk ke dalam lisosom, lisosom memiliki enzim sulfatase yang dapat memotong jembatan disulfida sehingga memutus fragmen A dan B. Domain katalitik pada fragmen A akan keluar dari lisosom menuju sitoplasma dan berikatan dengan NAD⁺ kemudian NAD akan dipotong menjadi Adenosine diphosphate ribose (ADP-ribose) dan ditransfer ke faktor elongasi-2 yang menyebabkan proses sintesis protein tidak terjadi (Metz, 1992).



Gambar 2. Mekanisme infeksi toksin difteri (Metz, 1992)

Toksoid

Toksoid Difteri (DTx) adalah toksin yang telah dilemahkan atau dihilangkan toksisitasnya. Terdapat 2 cara dalam pembuatan toksoid dengan menggunakan rekayasa genetik dan reaksi kimia.

Pembuatan toksoid dengan rekayasa genetik ialah dengan mengubah salah satu atau lebih asam amino yang dapat menghilangkan toksisitasnya. Salah satu produk

hasil rekayasa genetik adalah CRM197, yang dapat digunakan sebagai konjugat vaksin. Dengan mengubah asam amino glisin menjadi asam glutamat pada posisi 52 (G52) dapat mempengaruhi fleksibilitas loop pada sisi pengikatan NAD sehingga afinitas toksin dengan NAD berkurang (Malito *et al.*, 2012).

Selain itu juga dalam membuat toksoid dapat menggunakan rekasi kimia, toksin akan direaksikan dengan formaldehid yang menyebabkan asam amino lisin pada toksin akan termetilasi sehingga menghilangkan toksisitas dari toksin (Gambar 3). Metode ini ditemukan oleh salah satu vaksin yang paling sukses dan telah menghilangkan difteri di banyak negara. Ini disiapkan dari toksin difteri. Toksin diubah oleh formaldehida menjadi toksoid difteri tidak beracun tetapi masih imunogenik. Metode ini telah dijelaskan oleh Ramon dan Glenly pada tahun 1920. Kualitas toksoid difteri sangat dipengaruhi oleh proses detoksifikasi, di mana kondisi reaksi memiliki pengaruh yang besar seperti konsentrasi formaldehida, waktu reaksi dan suhu, serta komposisi matriks (Metz, 1992). Hingga saat ini dalam pembuatan vaksin metode yang digunakan ialah mereaksikan toksin dengan formaldehid (CDC, 2018). Modifikasi lisin pada toksoid menyebabkan terjadinya interaksi *cross-link* antar lisin termetilasi. Interaksi *cross-link* ini terjadi antara residu lisin dan beberapa asam amino yang dapat termetilasi seperti arginin, asparagin, glutamin, histidin, triptofan dan tirosin. Untuk menentukan aksesibilitas masing-masing residu lisin untuk formaldehida, toksin difteri ditreatment dengan formaldehida dan NaCNBH₃. Dalam reaksi ini kelompok amino primer residu lisin dan N-terminal diubah menjadi struktur dimetilasi dengan peningkatan massa 28 Da (Gambar 2.3) (Metz, 1992).

DAFTAR PUSTAKA

- Andel, I. & Collicie, R.J. (1974) Nicotinamide of Fragment A from Diphtheria Adenine Dinucleotide * Toxin with. 249 (7).
- Belenky, P., Bogan, K.L., & Brenner, C. (2006) NAD + metabolism in health and disease. 32(1).
- Bell, C.E. & Eisenberg, D. (1996) Crystal Structure of Diphtheria Toxin Bound to Nicotinamide Adenine, 1137–1149.
- Bell, C.E. & Eisenberg, D. (1997) Crystal Structure of Nucleotide-Free Diphtheria Toxin. 2960 (96), 481–488.
- Choe S, J, B.M., G, F., G, C.P.M., A, kantardjieff K., J, C.R., & D, E. (1992) The crystal structure of diphtheria toxin. Nature Publishing Group. 357, 216–222.
- Douzi, B. (2017) Protein–Protein Interactions: Surface Plasmon Resonance. Laure Journet and Eric Cascales. 1615, 257–275.

- Frantzen, H., Pedersen, S. & Svendsen, A. 2002. Fungamyl-like alpha-amylase variants EP 1230351 A1.
- Giannini, G., R, R., & G, R. (1984) The amino-acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM45 and CRM197. *Nucleic acid research*. 12(10), 4063–4069.
- Glenny, A.T. (1923) Diphtheria toxoid as an immunising agent.
- Han, M.K., Lee, J.Y., Cho, Y.S., Song, Y.M., An, N.H., Kim, H.R., & Kim, U.H. (1996) Regulation of NAD⁺ glycohydrolase activity by NAD⁺ dependent auto-ADP-ribosylation. *The Biochemical journal*. 318. Pt 3, 903–908.
- Liang, J. (2011) Surface Plasmon Resonance: An Introduction to a Surface Spectroscopy Technique.. 87(7), 742–746.
- Malito, E., Bursulaya, B., Chen, C., Lo, P., Picchianti, M., & Balducci, E. (2012) Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197. (Md), 1–6.
- Metz, B. (1992) Structural Characterisation of Diphtheria Toxoid.
- Naglich, J.G., Metherall, J.E., Russell, D.W., & Eidels, L. (1992) Expression Cloning of a Diphtheria Identity with a Heparin-Binding EGF-like Growth Factor Precursor Toxin Receptor. 69, 1051–1061.
- Pappenheimer, A.M. (1977) Diphtheria toxin. . 1884 (1).
- Pollard, A.J., Perrett, K.P., & Beverley, P.C. (2009) Maintaining protection against invasive bacteria with protein – polysaccharide conjugate vaccines.. 426(2000), 422–426.
- Qiao, J., Ghani, K., & Caruso, M. (2008) Diphtheria toxin mutant CRM197 is an inhibitor of protein synthesis that induces cellular toxicity. *Toxicon*. 51 (3), 473–477.
- Rydell, N. (2004) Development of a New Oral Vaccine against Diphtheria and the Study of its Immunogenicity in Mouse and Man.
- Stenberg, E.S.A. (1990) Quantitative Determination of Surface Concentration of Protein with Surface Plasmon Resonance Using Radiolabeled Proteins.
- Vollrath, F., Hawkins, N., Porter, D., Holland, C., & Boulet-Audet, M. (2014) Differential scanning fluorimetry provides high throughput data on silk protein transitions. *Scientific Reports*. 4, 1–6.
- Wilson, B.A., Blanka, S.R., Reichlll, K.A., & Collier, R.J. (1994) Active-site Mutations of Diphtheria Toxin. 269(37), 23296–23301.