

KARAKTERISASI BIOKIMIA LEKTIN MAKROALGA *Sargassum polycystum* DAN *Turbinaria ornata*

Biochemical Characterisation of Lectin Derived from *Sargassum polycystum* and *Turbinaria ornata* Macroalgae

Nurrahmi Dewi Fajarningsih^{1*}, Naomi Intaqta², Danar Praseptianga²,
Choirel Anam², dan Ekowati Chasanah¹

¹Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Badan Riset dan Sumber Daya Manusia Kelautan dan Perikanan, Jl. KS.Tubun Petamburan VI, Slipi, Jakarta, Indonesia

² Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret (UNS),
Jl. Ir. Sutami 36 A Kentingan, Jebres, Surakarta, Indonesia

*Korespondensi Penulis: nurrahmi.dewi@gmail.com

Diterima: 7 November 2018; Direvisi: 17 Desember 2018; Disetujui: 22 Desember 2018

ABSTRAK

Kemampuan lektin untuk mengikat karbohidrat secara spesifik dan *reversible* dapat dikembangkan dalam berbagai aplikasi, misalnya sebagai reagen histokimia. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari spesifisitas pengikatan lektin makroalga *Sargassum polycystum* dan *Turbinaria ornata* pada berbagai jenis karbohidrat, stabilitas aktivitas hemaglutinasi lektin pada berbagai rentang suhu dan pH, serta pengaruh kation divalen pada aktivitasnya. Uji penghambatan hemaglutinasi secara kualitatif dan kuantitatif dilakukan untuk mempelajari spesifisitas pengikatan lektin terhadap 20 jenis gula dan glikoprotein. Untuk melihat stabilitas aktivitasnya, lektin *S. polycystum* dan *T. ornata* diberi perlakuan pemanasan pada rentang suhu 30-100 °C, perlakuan pH 3-10 dan perlakuan kation divalen MgCl₂ dan CaCl₂ kemudian diuji aktivitas hemaglutinasinya. Ekstrak kaya lektin *S. polycystum* dan *T. ornata* mampu mengenali dan mengikat 8 glikoprotein secara kualitatif, yaitu fetuin (Fe), asialo Fe (aFe), thyroglobulin from bovine (BTG), asialo BTG, thyroglobulin from porcine (PTG), asialo PTG (aPTG), asialo mucin from bovine submaxillary glands (aBSM), dan asialo transferrin (aTf), namun tidak mempunyai afinitas terhadap gula sederhana. Lektin *S. polycystum* memiliki spesifisitas pengikatan terbaik terhadap aFe dan transferrin (*Minimum Inhibitory Concentration*/MIC 250 µg/ml), sementara Lektin *T. ornata* memiliki spesifisitas pengikatan terbaik terhadap aPTG (MIC 31.25 µg/ml), PTG (MIC 125 µg/ml), dan BTG (MIC 250 µg/ml). Aktivitas hemaglutinasi lektin *S. polycystum* stabil pada suhu 30-80 °C dan suasana netral hingga basa (pH 7-10), namun kurang stabil pada suasana asam (pH 3-6). Aktivitas lektin *T. ornata* relatif tidak stabil pada suhu 40-100 °C, sedikit menurun pada pH sangat asam, namun stabil pada rentang pH 5-10. Keberadaan kation divalent Ca²⁺ dan Mg²⁺ sedikit menurunkan aktivitas lektin *S. polycystum* dan *T. ornata*.

KATA KUNCI: lektin, makroalga, *Sargassum polycystum*, *Turbinaria ornata*

ABSTRACT

The ability of lectins to specifically and reversibly bind carbohydrates is an important characteristics for its various applications. This research aims to study the binding specificity of Sargassum polycystum and Turbinaria ornata lectin rich extracts to various types of carbohydrates, the stability of both lectins hemagglutination activities at various temperatures and pH, and the effects of divalent cations on the lectin activities. The lectin binding specificity was studied through qualitative and quantitative hemagglutination inhibition studies. To study their activity stability, both lectins were treated at 30 to 100 °C, treated with various pH buffers (pH 3-10), treated with MgCl₂ and CaCl₂ followed with hemagglutination assay. Both lectins bound 8 glycoproteins tested, i.e. fetuin (Fe), asialo Fe (aFe), thyroglobulin from bovine (BTG), asialo BTG, thyroglobulin from porcine (PTG), asialo PTG (aPTG), asialo mucin from bovine submaxillary glands (aBSM), and asialo transferrin (aTf) but did not have any affinity to the simple sugars. The S. polycystum lectin bound to aFe and transferrin (MIC 250 µg/ml). Meanwhile, the T. Ornata lectin specifically bound to aPTG (MIC 31.25 µg/ml), PTG (MIC 125 µg/ml), and BTG (MIC 250 µg/ml). The hemagglutination activity of S. polycystum lectin was stable at 30-80 °C and in neutral to alkaline conditions (pH 7-10), but less stable in acidic conditions (pH 3-6). The T. ornata lectin activity was relatively unstable at 40-100 °C, slightly decreased at a very acidic pH, but was stable in a pH range of 5-10. The presence of Ca²⁺ and Mg²⁺ divalent cations slightly decreased the lectins activities.

KEYWORDS: lectin, macroalgae, *Sargassum polycystum*, *Turbinaria ornata*

PENDAHULUAN

Lektin atau hemagglutinin merupakan protein yang dapat mengikat karbohidrat secara spesifik dan *reversible*. Lektin mampu mengenali dan berinteraksi dengan karbohidrat bebas ataupun glikokonjugat (glikoprotein, glikolipid) tanpa mengubah struktur karbohidrat tersebut (Singh & Walia, 2018). Kemampuan lektin untuk mengenali dan mengikat karbohidrat secara spesifik dan *reversible* memungkinkan lektin untuk dikembangkan sebagai reagen biokimia di bidang imunologi dan glikobiologi (Holanda et al., 2012). Sebagai contoh, lektin dapat digunakan untuk mendeteksi metastasis sel kanker (Wolters-Eisfeld & Schumacher, 2017), mendeteksi sel yang mengalami apoptosis (Seco-Rovira, Beltran-Frutos, Hernandez-Martinez, Ferrer, & Pastor, 2017) atau untuk pengenalan patogen (Brooks, 2017). Selain potensi pemanfaatannya di bidang imunologi dan glikobiologi, lektin yang diisolasi dari berbagai sumber juga dilaporkan sebagai antibakteri (Marques et al., 2018; Vasconcelos et al., 2014), antikapang (Amano, Katayama, Saito, Ando, & Nagata, 2012; Chikalovets et al., 2015), anti HIV (Alexandre et al., 2011; Zi³kowska & Wlodawer, 2006), antitumor (Hamid, Masood, Wani, & Rafiq, 2013; Singh & Walia, 2018) maupun antiinsekta (Hamid et al., 2013; Lam & Ng, 2011).

Secara alami, lektin banyak ditemukan pada hampir semua makhluk hidup termasuk tumbuhan, jamur, bakteri, virus, dan hewan (vertebrata dan avertebrata). Namun demikian, secara umum lektin dari makroalga mempunyai beberapa karakteristik unik dibandingkan dari sumber lain, yaitu berukuran kecil, mempunyai spesifisitas pengikatan terhadap glikoprotein dan tidak memerlukan kation divalen untuk aktifasinya (Rogers & Hori, 1993; Singh, Thakur, & Bansal, 2015).

Kandungan lektin pada makroalga pertama kali dilaporkan oleh Boyd, Var, dan Boyd (1966). Sejak saat itu, lektin makroalga cukup banyak dieksplorasi dan dilaporkan. Namun demikian, informasi mengenai potensi pemanfaatan lektin dari makroalga tropis Indonesia bahkan Asia Tenggara masih sangat terbatas. Dalam 10 tahun terakhir hanya terdapat beberapa publikasi yang melaporkan mengenai hal tersebut, di antaranya Hung et al. (2012) yang melaporkan hasil penapisan lektin dari 42 spesies makroalga asal Vietnam; Fajarningsih et al. (2015) yang melaporkan penapisan 17 spesies makroalga asal Binuangeun, Banten; serta Anam, Praseptiangga, Fajarningsih, dan Intaqta (2016) melaporkan penapisan lektin dari 13 spesies makroalga coklat asal Gunung Kidul, Yogyakarta. Hingga saat ini laporan mengenai purifikasi dan karakterisasi lektin dari makroalga masih sangat terbatas dibandingkan lektin dari tanaman tingkat tinggi (Hung et al., 2012).

Hasil penelitian bioprospeksi lektin makroalga yang dilaporkan sebelumnya (Anam et al., 2016) menunjukkan bahwa ekstrak lektin makroalga *S. polycystum* dan *T. ornata* mampu mengaglutinasi eritrosit kelinci dan eritrosit manusia golongan A, B dan O. Hal tersebut mengindikasikan kemampuan lektin dari kedua makroalga dalam mengikat gula atau glikoprotein pada membran eritrosit yang diujikan hingga menghasilkan aktivitas hemaglutinasi. Kemampuan lektin untuk mengenali dan mengikat karbohidrat secara spesifik dan *reversible* menjadi informasi penting terkait potensi pemanfaatan lektin dalam berbagai bidang. Oleh karena itu, melanjutkan penelitian sebelumnya, penelitian ini bertujuan untuk mempelajari karakteristik biokimia lektin makroalga *S. polycystum* dan *T. ornata* yang meliputi spesifisitas pengikatan lektin pada berbagai jenis karbohidrat (gula dan glikoprotein), stabilitas aktivitas hemaglutinasi lektin pada rentang suhu dan pH, serta pengaruh kation divalent pada aktivitasnya.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Sampel makroalga coklat *S. polycystum* dan *T. ornata* yang tumbuh di zona pasang surut Pantai Wediombo, Gunung Kidul, Yogyakarta (S8°11'4" E110°42'28") dikoleksi pada April 2015. Sampel makroalga dicuci dan dibersihkan dari pengotor dengan menggunakan air tawar. Untuk memudahkan pada tahap ekstraksi, masing-masing sampel ditimbang per 100 gram kemudian disimpan dalam *cool box* untuk menjaga kesegaran sampel. Setiap spesimen makroalga diambil dan didokumentasikan untuk keperluan identifikasi. Sampel makroalga disimpan dalam *cold storage* (suhu -20 °C) hingga diekstraksi. Foto dan spesimen makroalga dikirimkan ke Pusat Penelitian Oseanografi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) untuk diidentifikasi jenisnya.

Metode

Ekstraksi lektin makroalga

Ekstraksi dilakukan menurut metode Fajarningsih et al. (2015). Ekstraksi pada setiap sampel makroalga dilakukan masing-masing 3 kali ulangan. Sebanyak 100 gram talus dari setiap jenis makroalga, dipotong-potong menjadi ukuran kecil, kemudian digerus dalam nitrogen cair hingga menjadi bubuk. Bubuk makroalga diekstraksi dengan menggunakan buffer fosfat 20 mM pH 7,0 yang mengandung 0,85% NaCl (*Phospat Buffer Saline/PBS*) dengan perbandingan 1:2 kemudian dihomogenasi dengan *stirrer* pada suhu 4°C selama 8 jam. Selanjutnya homogenat makroalga

disentrifugasi pada 15,302 g (Beckman Coulter, rotor JA-14) selama 30 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dipresipitasi dengan ammonium sulfat (kejenuhan 75%) selama semalam pada suhu 4 °C, kemudian disentrifugasi pada 15,302 g selama 30 menit pada suhu 4 °C. Presipitat yang diperoleh dilarutkan dengan penambahan PBS dengan volume sesedikit mungkin untuk kemudian didialisis (*SnakeSkin dialysis tubing 10K MWCO*) menggunakan PBS selama 10 jam, dengan penggantian PBS setiap 2 jam. Setelah didialisis, fraksi bagian dalam (*inner fraction*) disentrifugasi pada 15,302 g selama 30 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang diperoleh, disebut sebagai ekstrak kaya lektin, kemudian disimpan pada suhu -20 °C.

Uji kadar protein terlarut

Kadar protein terlarut diukur dengan menggunakan *Bicinchoninic Acid Assay (BCA) protein assay kit* (Pierce-Thermo Scientific) sesuai petunjuk penggunaan kit reagen.

Uji aktivitas hemaglutinasi

Uji aktivitas hemaglutinasi dilakukan menurut metode Praseptiangga, Hirayama, dan Hori (2012). Uji tersebut dilakukan pada mikroplat 96 sumuran dengan dasar V menggunakan larutan eritrosit kelinci (2%) yang telah diberi perlakuan tripsin/*trypsinized red blood cell* (TRBC). Sebanyak 25 µL ekstrak kaya lektin diencerkan secara serial menggunakan larutan garam (0,85% NaCl). Pada tiap sumuran kemudian ditambahkan 25 µL TRBC. Selanjutnya, mikroplat digoyang perlahan kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang (25-28 °C). Aktivitas hemaglutinasi ditandai positif apabila lebih dari 50% eritrosit teraglutinasi. Hasil negatif ditandai dengan terbentuknya dot eritrosit (eritrosit mengendap) di dasar sumuran mikroplat. Uji aktivitas hemaglutinasi dikerjakan tiga kali ulangan dan hasilnya dinyatakan sebagai titer, yaitu kebalikan dari angka pengenceran tertinggi yang memberikan hasil hemaglutinasi positif.

Uji penghambatan hemaglutinasi/uji spesifisitas pengikatan karbohidrat

Untuk mengetahui spesifitas lektin dalam mengikat berbagai jenis gula dan glikoprotein dilakukan uji penghambatan hemaglutinasi menurut metode Praseptiangga et.al. (2012). Uji ini dilakukan dalam 2 tahap, yaitu uji kualitatif dan uji kuantitatif, masing-masing dengan 3 kali ulangan. Uji kualitatif dilakukan untuk mengetahui jenis gula dan glikoprotein yang positif berikatan dengan lektin. Jenis gula dan glikoprotein yang positif berikatan dengan lektin *S. polycystum* dan *T. ornata* akan dilanjutkan dengan uji kuantitatif untuk mendapatkan data konsentrasi

minimum untuk menghambat aktivitas hemaglutinasi (*minimum inhibitory concentration/ MIC*). Sembilan (9) jenis gula (monosakarida *D-galactose*, *D-glucose*, *D-mannose*, *D-xylose*, *L-fucose*, *L-rhamnose*, *N-acetyl-D-galactosamine*, *N-acetyl-D-glucosamine* dan disakarida *Lactose*), 6 jenis glikoprotein (*fetuin from fetal bovine serum* (Fe), *mucin from bovine submaxillary gland* (BSM), *thyroglobulin from bovine thyroid gland* (BTG), *thyroglobulin from porcine thyroid gland* (PTG), *transferin human* (Tf), dan *yeast mannan*, serta bentuk asialo dari 5 jenis glikoprotein (asialo BSM (aBSM), asialo BTG (aBTG), asialo Fe (aFe), asialo PTG (aPTG), dan asialo Tf (aTf)) digunakan untuk uji penghambatan hemaglutinasi. Seluruh reagen gula dan glikoprotein yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Sigma-Aldrich.

Pengujian penghambatan hemaglutinasi secara kualitatif dilakukan dengan memasukkan 25 µl larutan gula (100 mM) atau glikoprotein (2 mg/mL) ke dalam sumuran mikroplat dengan dasar V. Selanjutnya, 25 µl ekstrak kaya lektin (yang sudah diencerkan ke titer 4) ditambahkan ke dalam tiap sumuran tersebut. Mikroplat kemudian digoyang perlahan agar tercampur dan diinkubasi pada suhu ruang (25-28 °C) selama 1 jam. Setelah 1 jam inkubasi, 25 µl TRBC kelinci ditambahkan ke dalam sumuran tersebut. Selanjutnya mikroplat digoyang perlahan, diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang, dan diamati secara makroskopis.

Pengujian penghambatan hemaglutinasi secara kuantitatif dilakukan dengan menyiapkan serial dua kali pengenceran (25 µL) dari setiap jenis gula maupun glikoprotein pada sumuran mikroplat. Larutan gula disiapkan dengan konsentrasi tertinggi 100 mM, sedangkan glikoprotein disiapkan dengan konsentrasi tertinggi 2 mg/mL dalam PBS. Pada setiap sumuran ditambahkan 25 µL ekstrak kaya lektin dengan titer hemaglutinasi 4. Mikroplat kemudian digoyang dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang (25-28 °C). Selanjutnya, 25 µL TRBC ditambahkan ke dalam tiap sumuran, mikroplat kembali digoyang perlahan dan diinkubasi kembali selama 1 jam. Penghambatan aktivitas hemaglutinasi lektin oleh gula ataupun glikoprotein diamati secara makroskopis. Aktivitas penghambatan dinyatakan sebagai *minimum inhibitory concentration* (MIC, mM untuk gula dan µg/mL untuk glikoprotein), yaitu konsentrasi terkecil dari larutan gula atau glikoprotein yang dapat menghambat hemaglutinasi.

Pengaruh pH, suhu dan kation divalen terhadap aktivitas hemaglutinasi

Pengaruh pH

Sebanyak 500 µl sampel ekstrak kaya lektin didialisis (*SnakeSkin dialysis tubing 10K MWCO*) dengan 100 ml 50 mM larutan buffer berbagai pH (3

hingga 10) selama semalam pada suhu 4 °C. Sampel tersebut kemudian didialisis dengan PBS selama 10 jam sebelum diuji aktivitas hemaglutinasinya. Pengujian aktivitas hemaglutinasi dilakukan dengan menyertakan kontrol sampel tanpa perlakuan pH dan kontrol negatif, masing-masing dikerjakan 3 kali ulangan. Buffer yang digunakan adalah: Glisin-HCl 2 M pH 3.0, Asetat 2 M pH 4.0 dan 5.0, Fosfat 2 M pH 6.0 dan 7.0, Tris-HCl 2 M pH 8.0 dan Karbonat 2 M pH 9.0 dan 10.0.

Pengaruh Suhu

Untuk mengetahui efek suhu terhadap aktivitas hemaglutinasi, 500 µl sampel ekstrak kaya lektin dimasukkan ke dalam tabung mikro, kemudian diinkubasi dalam *thermo block* selama 30 menit pada rentang suhu 30 °C hingga 100 °C. Setelah inkubasi selesai, sampel kemudian didinginkan langsung dengan es, dilanjutkan dengan diuji aktivitas hemaglutinasinya. Pengujian aktivitas hemaglutinasi dilakukan dengan menyertakan kontrol sampel tanpa perlakuan suhu dan kontrol negatif, masing-masing dikerjakan 3 kali ulangan.

Pengaruh kation divalen

Untuk mengetahui pengaruh kation divalent pada aktivitas hemaglutinasi lektin, 500 µl sampel ekstrak kaya lektin didialisis (*SnakeSkin dialysis tubing 10K MWCO*) selama sepuluh jam pada suhu 4 °C dengan 50 mM EDTA dalam PBS. Selanjutnya sampel diuji aktivitas hemaglutinasinya dengan tiga perlakuan yaitu tanpa penambahan larutan kation divalen, dengan penambahan 25 µl 20 mM CaCl₂, dan dengan penambahan 25 µl 20 mM MgCl₂. Setelah diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam, aktivitas hemaglutinasinya diamati. Pengujian aktivitas hemaglutinasi dilakukan dengan menyertakan kontrol sampel tanpa perlakuan kation divalen dan kontrol negatif, masing-masing dikerjakan 3 kali ulangan.

HASIL DAN BAHASAN

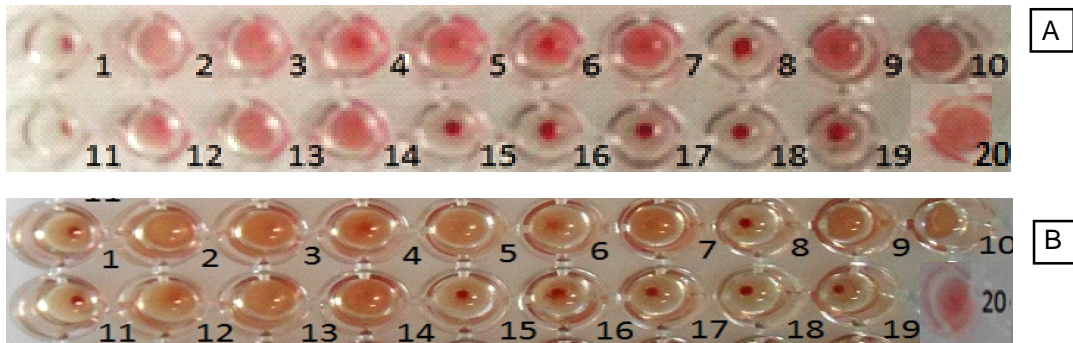
Identifikasi spesies makroalga *Sargassum polycystum* dan *Turbinaria ornata* yang kami gunakan pada penelitian ini dilakukan oleh Pusat Penelitian Oceanografi LIPI. Berdasarkan penelitian sebelumnya (Fajarningsih et al., 2015), penggunaan PBS dan TBS tidak berpengaruh pada rendemen kadar protein yang dihasilkan. Oleh karena itu, pada penelitian ini hanya digunakan satu jenis buffer, PBS, untuk mengekstraksi kandungan lektin kedua makroalga tersebut. Ekstraksi tersebut menghasilkan rendemen protein sebesar 0,0019% untuk *S. polycystum* dan 0,0065% untuk *T. ornata*. Walaupun ekstrak kaya lektin *T. ornata* mempunyai kadar protein yang lebih tinggi

dibandingkan *S. polycystum* namun tidak berkorelasi positif dengan aktivitas hemagglutinasinya. Hal tersebut diduga berkaitan dengan kadar lektin pada ekstrak *S. polycystum* yang lebih tinggi dibandingkan pada ekstrak *T. ornata*.

Telah dilaporkan sebelumnya (Anam et al., 2016) bahwa ekstrak kaya lektin *S. polycystum* dan *T. ornata* memiliki aktivitas hemaglutinasi terhadap eritrosit kelinci dengan titer 256 (2⁸) dan 2⁷. Lektin *S. polycystum* dan *T. ornata* juga memiliki aktivitas hemaglutinasi terhadap eritrosit manusia golongan A, B dan O berturut-turut dengan titer 2¹⁰, 2⁷, 2¹⁰ (*S. polycystum*) dan 2⁵, 2⁷, 2¹⁰ (*T. ornata*). Hasil penelitian tersebut mengindikasikan bahwa lektin makroalga *S. polycystum* dan *T. ornata* mampu mengikat berbagai jenis karbohidrat yang terdapat pada membran sel eritrosit sehingga menarik untuk diteliti lebih lanjut karakteristik biokimianya.

Pada penelitian ini telah dilakukan karakterisasi spesifisitas pengikatan ekstrak kaya lektin *S. polycystum* dan *T. ornata* terhadap berbagai jenis karbohidrat. Kemampuan lektin dalam mengikat karbohidrat secara spesifik, dapat dipelajari dengan pendekatan uji penghambatan hemaglutinasi. Pada uji ini, lektin direaksikan dengan gula atau glikoprotein tertentu. Jika lektin mempunyai sisi pengikatan (*binding site*) untuk jenis gula atau glikoprotein yang diujikan, maka akan terjadi ikatan antara keduanya sehingga ketika eritrosit (TRBC) kelinci ditambahkan pada langkah uji berikutnya, hemaglutinasi tidak akan terjadi (terjadi penghambatan hemaglutinasi). Ekstrak kaya lektin *S. polycystum* dan *T. ornata* telah diuji kemampuannya dalam mengikat 9 jenis gula, 6 jenis glikoprotein serta 5 bentuk asialo glikoprotein secara kualitatif (Gambar 1) dan kuantitatif (Tabel 1).

Berdasarkan hasil uji penghambatan hemaglutinasi secara kualitatif terhadap 20 jenis gula dan glikoprotein, ekstrak kaya lektin *S. polycystum* dan *T. ornata* tidak mempunyai afinitas terhadap berbagai gula sederhana (mono dan di-sakarida) yang diujikan. Hal ini selaras dengan yang dilaporkan oleh beberapa grup peneliti (Hung, Hirayama, Ly, & Hori, 2015; Mu, Hirayama, Sato, Morimoto, & Hori, 2017; Singh & Walia, 2018), dimana lektin makroalga secara umum tidak memiliki afinitas terhadap gula sederhana namun lebih mempunyai afinitas terhadap glikokonjugat seperti glikoprotein. Kedua lektin *S. polycystum* dan *T. ornata* mempunyai kemampuan mengikat 3 jenis glikoprotein yaitu *fetuin from fetal bovine serum* (Fe), *thyroglobulin from bovine thyroid* (BTG), dan *thyroglobulin from porcine thyroid gland* (PTG) serta 5 jenis glikoprotein dalam bentuk asialonya yaitu asialo Fe (aFe), asialo BTG (aBTG), asialo PTG (aPTG), asialo *mucin from bovine*



Keterangan/Annotation:

- | | |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 1 : Fetuin/Fetuin from fetal bovine serum (Fe) | 11 : Thyroglobulin from porcine thyroid gland (PTG) |
| 2 : Laktosa/Lactose | 12 : Yeast mannan |
| 3 : D-galaktosa/D-galactose | 13 : N asetil-d-galaktosamin/N-acetyl-D-galactosamine |
| 4 : Transferin/Transferin human (Tf) | 14 : D-silosa/D-xylose |
| 5 : L-ramnosa/L-rhamnose | 15 : Asialo-Fetuin (aFe) |
| 6 : Mucin from bovine submaxillary gland (BSM) | 16 : Asialo-BSM (aBSM) |
| 7 : N-asetil-D-glukosamin/N-acetyl-D-glucosamine | 17 : Asialo-PTG (aPTG) |
| 8 : Thyroglobulin from bovine thyroid gland (BTG) | 18 : Asialo-Tf (aTf) |
| 9 : D-glukosa/D-glucose | 19 : Asialo-BTG (aBTG) |
| 10: L-fukosa/L-fucose | 20 : D-mannosa/D-mannose |

Gambar 1. Penghambatan aktivitas hemaglutinasi ekstrak kaya lektin *S. polycystum* (A) dan *T. ornata* (B) oleh berbagai jenis gula dan glikoprotein (uji kualitatif)

Figure 1. The inhibitory effects of sugars and glycoproteins on hemagglutination activity of the *S. polycystum* (A) and *T. ornata* (B) lectin (qualitative assay)

Tabel 1. Penghambatan aktivitas hemaglutinasi lektin *S. polycystum* dan *T. ornata* oleh berbagai jenis gula dan glikoprotein

Table 1. Inhibition of hemagglutination activity of *S. polycystum* and *T. ornata* lectin by various sugars and glycoproteins

Gula atau Glikoprotein/ Sugars or Glycoprotein	Konsentrasi Penghambatan Minimum/ Minimum Inhibitory Concentration	
	<i>S. polycystum</i>	<i>T. ornata</i>
1 Monosakarida dan disakarida/ Monosaccharide and disaccharide (mM)	>100	>100
2 Glikoprotein/Glycoprotein (µg/mL)		
N-Glycan		
Complex type		
Transferin human	>2000	>2000
Asialo-Transferin human	250	62.5
High-mannose type		
Yeast mannan	>2000	>2000
Complex type and high-mannose type		
Bovine thyroglobulin (BTG)	500	250
Asialo-BTG	500	1000
Porcine thyroglobulin (PTG)	500	125
Asialo-PTG	500	31.25
O-Glycan		
Bovine submaxillary mucin (BSM)	>2000	>2000
Asialo-BSM	2000	1000
N/O-Glycan		
Fetuin	2000	1000
Asialo-fetuin	250	375

submaxillary glands (aBSM), dan asialo *transferrin human* (aTf). Selanjutnya, lektin *S. polycystum* dan *T. ornata* dikarakterisasi lebih lanjut kemampuannya dalam mengikat kedelapan jenis glikoprotein tersebut secara kuantitatif.

Berdasarkan uji penghambatan hemaglutinasi secara kuantitatif, lektin *S. polycystum* dapat mengenali fetuin (glikoprotein tipe N/O-glikan) dalam bentuk *native* maupun dalam bentuk asialonya. Lektin *S. polycystum* mengenali asialo fetuin (MIC 250 µg/ml) lebih baik dibandingkan bentuk *nativenya* (MIC 2000 µg/ml). Asialo glikoprotein adalah glikoprotein yang telah dihilangkan residu asam sialic (*sialic acid*) pada bagian terminalnya. Selain lebih spesifik untuk mengikat aFe, lektin *S. polycystum* juga lebih spesifik untuk mengenali dan mengikat asialo transferrin (glikoprotein tipe kompleks N-glikan) dengan MIC 250 µg/ml, dibandingkan glikoprotein lain (BTG, a-BTG, PTG, a-PTG dan a-BSM).

Sementara itu, lektin *T. ornata* memiliki spesifisitas pengikatan terbaik terhadap PTG (glikoprotein tipe kompleks *high-mannose*), baik dalam bentuk asialo (MIC 31.25 µg/ml) ataupun *native* (MIC 125 µg/ml). Selain itu, lektin *T. ornata* juga mampu mengenali dan mengikat asialo transferrin (MIC 62.5 µg/ml) dan BTG (MIC 250 µg/ml) lebih baik dibanding glikoprotein tipe lain yang diujikan. Seperti yang dijelaskan oleh Berg, Tymoczko, & Stryer (2002), pada umumnya lektin mempunyai dua atau lebih sisi pengikatan (*binding site*) untuk karbohidrat sehingga memungkinkannya untuk mengenali dan mengikat beberapa jenis karbohidrat. Semakin kecil MIC, maka semakin spesifik kemampuan lektin untuk mengikat jenis karbohidrat tersebut.

Berbagai jenis enzim, hormon, immunoglobulin, antigen, reseptor hingga transport protein pada berbagai organisme terikat secara kovalen dengan oligosakarida (glikan) membentuk glikoprotein (Engelking, 2015). Kemampuan lektin untuk mengenali karbohidrat tertentu secara spesifik dapat dijadikan sebagai dasar untuk potensi pemanfaatannya. Misalnya, penggunaan lektin sebagai resin dalam

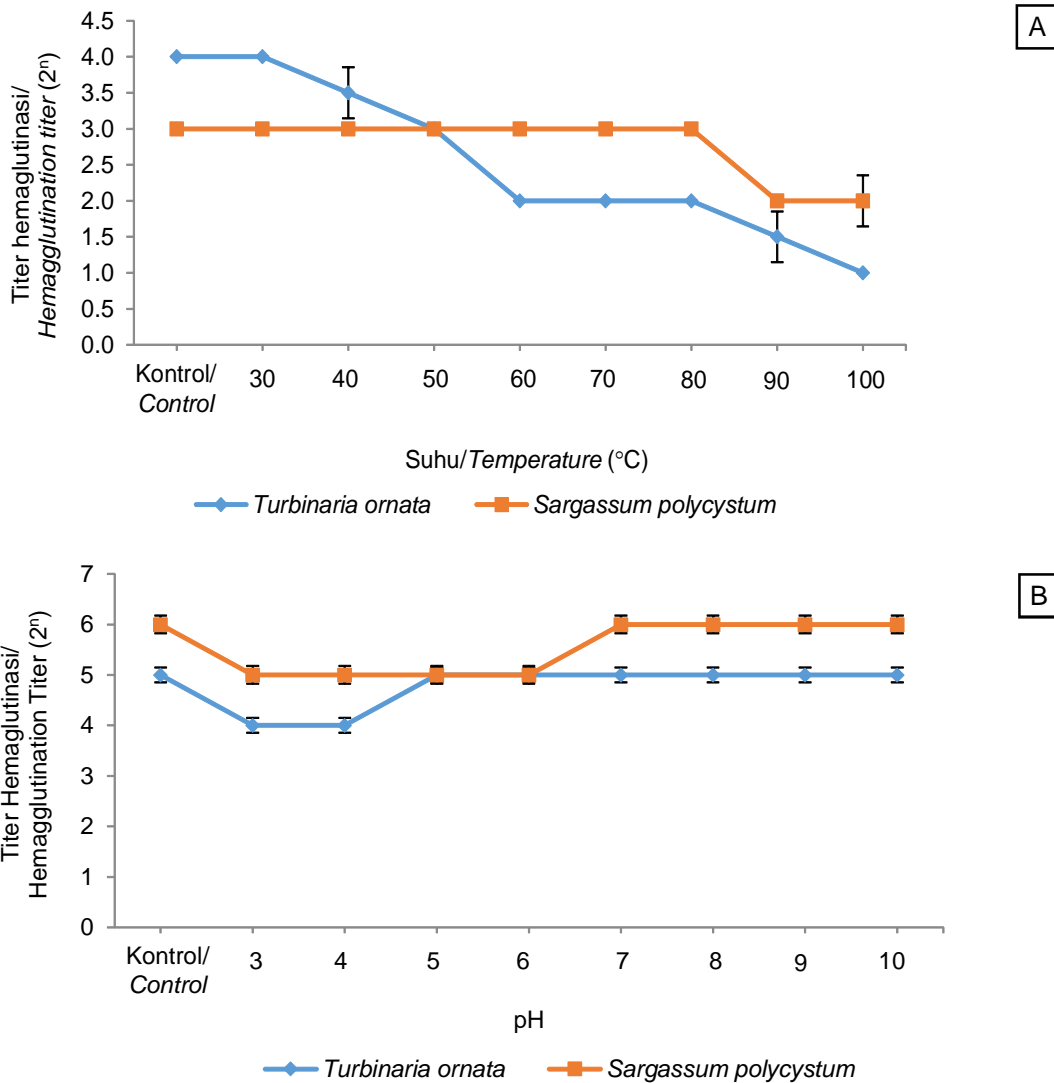
pemurnian glikoprotein dengan kromatografi afinitas (Freeze, 1995; Kaji et al., 2003; Mao, Qin, & Lin, 2007). Kemampuan lektin untuk mengenali glikan secara spesifik, juga menjadi dasar untuk pemanfaatannya sebagai alat diagnostik kanker (Bertolini, Shaked, Mancuso, & Kerbel, 2006; Drake et al., 2006; Mody, 1995). Lektin *T. ornata* yang mampu mengenali *thyroglobulin* (Tg), dalam bentuk PTG dan BTG, menarik untuk diteliti lebih lanjut pemanfaatannya sebagai alat diagnostik kanker tiroid. Tg merupakan penanda tumor primer yang digunakan untuk memonitor pasien kanker tiroid (Spencer, 2011). Sementara itu, lektin *S. polycystum* yang mempunyai spesifisitas pengikatan terhadap fetuin berpotensi untuk dikembangkan sebagai protein penghantar obat (*drug delivery protein*). Fetuin yang diproduksi di liver dan dialirkan ke seluruh pembuluh darah merupakan bagian dari kelompok protein pembawa (*carrier protein*) yang memediasi transport berbagai substansi dalam pembuluh darah (Han et al., 2015).

Stabilitas aktivitas hemaglutinasi lektin *S. polycystum* dan *T. ornata* pada berbagai rentang suhu dan pH (Gambar 2), serta pengaruh kation divalen (Tabel 2) juga dipelajari. Aktivitas lektin *S. polycystum* stabil pada rentang suhu 30-80 °C dan aktivitasnya baru sedikit menurun pada suhu 90 °C. Aktivitas lektin *S. polycystum* stabil pada suasana netral hingga basa, namun kurang stabil pada suasana asam. Sementara itu, aktivitas hemaglutinasi lektin *T. ornata* relatif tidak stabil pada berbagai rentang suhu yang diujikan, dimana aktivitasnya menurun pada suhu 40-100 °C. Walaupun aktivitas hemaglutinasi lektin *T. ornata* sedikit menurun pada pH sangat asam (3 dan 4), namun stabil pada rentang pH 5-10.

Perbedaan karakter stabilitas kedua lektin makroalga ini kemungkinan berkaitan erat dengan perbedaan struktur kedua protein tersebut, misalnya susunan asam aminonya ataupun struktur sekunder dan tersiernya. Lektin *S. polycystum* yang aktivitas hemaglutinasinya baru menurun pada suhu 80 °C mengindikasikan bahwa struktur lektin tersebut tidak berubah oleh pemanasan hingga suhu 80 °C,

Tabel 2. Pengaruh kation divalent terhadap aktivitas hemaglutinasi lektin *S. polycystum* dan *T. ornata*
 Table 2. The effects of divalent cations on the hemagglutination activity of the *S. polycystum* and *T. ornata* lectin

Makroalga/ Macroalgae	Titer Hemaglutinasi/Hemagglutination titer (2 ⁿ)			
	Sebelum perlakuan/ Pre-treatment	EDTA	MgCl ₂	CaCl ₂
<i>Sargassum polycystum</i>	2 ⁴	2 ⁴	2 ¹	2 ¹
<i>Turbinaria ornata</i>	2 ⁵	2 ⁵	2 ¹	2 ¹



Gambar 2. Pengaruh suhu (A) dan pH (B) terhadap aktivitas hemaglutinasi lektin *S. polycystum* dan *T. ornata*
 Figure 2. The effects of temperature (A) and pH (B) on the hemagglutination activity of the *S. polycystum* and *T. ornata* lectin

sementara lektin *T. ornata* mulai mengalami denaturasi pada suhu 40 °C yang ditandai dengan penurunan aktivitas hemaglutinasinya. Pada penelitian ini diketahui pula bahwa kedua lektin makroalga menurun aktivityasnya pada suasana asam, yang mengindikasikan pH asam mengubah struktur lektin kedua makroalga yang mengakibatkan menurunnya aktivitas hemaglutinasi keduanya. Biswas & Chattopadhyaya (2014) melaporkan bahwa pada pH 7 lektin yang diisolasi dari kunyit mempunyai struktur dimer namun berubah menjadi monomer pada pH 2.

Seperti halnya protein pada umumnya, keberadaan berbagai jenis ion metal untuk menjaga aktivitas biologi lektin telah banyak dilaporkan. Berbagai studi melaporkan bahwa kation divalen dapat menjaga konformasi dan menstabilkan residu asam

amino pada sisi pengikatan gula lektin (Borrebaeck, Lonnerdal, & Etzler, 1981; Palharini et al., 2017; Yin, Wong, & Ng, 2015). Walaupun secara umum, lektin makroalga dilaporkan tidak memerlukan kation divalen untuk aktivityasnya (Rogers & Hori, 1993; Singh et al., 2015), namun pada penelitian ini keberadaan kation Ca²⁺ dan Mg²⁺ justru sedikit menurunkan aktivityas lektin *S. polycystum* dan *T. ornata*. Seperti halnya dilaporkan oleh Hong et al. (2015), keberadaan metal ion tertentu juga dilaporkan dapat menurunkan aktivityas biologi lektin, misalnya keberadaan kation divalen Ba²⁺ yang justru menurunkan aktivityas lektin biji daun bawang (*Chinese leek seeds*).

Seperti telah dijelaskan sebelumnya, lektin *S. polycystum* dengan spesifisitas pengikatan terhadap asialo fetuin dan lektin *T. ornata* dengan spesifisitas

pengikatan terhadap *thyroglobulin* berpotensi untuk dikembangkan pemanfaatannya sebagai protein penghantar obat (*drug delivery protein*) dan alat diagnostik kanker tiroid. Untuk mencapai tujuan pemanfaatan tersebut, kedua lektin makroalga ini perlu dimurnikan, diteliti lebih lanjut berkaitan dengan karakteristiknya dan potensi pemanfaatannya misalnya untuk kit diagnosis kanker.

KESIMPULAN

Lektin *S. polycystum* yang memiliki spesifisitas pengikatan terhadap fetuin berpotensi untuk diteliti potensinya sebagai protein penghantar obat. Sementara lektin *T. ornata* yang memiliki spesifisitas pengikatan terhadap *thyroglobulin* (PTG, aPTG, dan BTG) mempunyai potensi untuk dimanfaatkan sebagai kit diagnostik kanker tiroid. Aktivitas hemaglutinasi lektin *S. polycystum* relatif stabil pada rentang suhu yang luas dan suasana netral hingga basa, namun kurang stabil pada suasana asam. Aktivitas lektin *T. ornata* mulai menurun pada suhu di atas 40 °C, namun stabil pada rentang sedikit asam hingga basa. Lektin *S. polycystum* dan *T. ornata* tidak memerlukan kation divalent untuk aktivitasnya, keberadaan kation divalen Ca^{2+} dan Mg^{2+} justru menurunkan aktivitasnya. Kedua lektin makroalga ini perlu dimurnikan, diteliti lebih lanjut karakteristiknya dan dikembangkan potensi pemanfaatannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexandre, K. B., Gray, E. S., Pantophlet, R., Moore, P. L., McMahon, J. B., Chakauya, E., ... Morris, L. (2011). Binding of the Mannose-Specific Lectin, Griffithsin, to HIV-1 gp120 Exposes the CD4-Binding Site. *Journal of Virology*, 85(17), 9039–9050. <http://doi.org/10.1128/JVI.02675-10>
- Amano, K., Katayama, H., Saito, A., Ando, A., & Nagata, Y. (2012). *Aleuria aurantia* lectin exhibits antifungal activity against *mucor racemosus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(5), 967–970. <http://doi.org/10.1271/bbb.110982>
- Anam, C., Praseptianga, D., Fajarningsih, N. D., & Intaqta, N. C. (2016). Bioprospecting of brown macroalgae from Java Island's Southern Coast, Gunung Kidul Coast of Yogyakarta and Binuangeun Coast of Banten as source of lectins. In R. P. Nugrahehi, K. Ardanawari, & I. E. Fernandez (Eds.), *The 2nd International Conference on Sustainable Global Agriculture and Food* (pp. 192–205). Semarang: Faculty of Agricultural Technology Soegijapranata Catholic University.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry* (fifth edit). New York: W.H. Freeman and Company.
- Bertolini, F., Shaked, Y., Mancuso, P., & Kerbel, R. S. (2006). The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nature Reviews*, 6(November), 835–845. <http://doi.org/10.1038/nrc1971>
- Biswas, H., & Chattopadhyaya, R. (2014). Thermal, chemical and pH induced unfolding of turmeric root lectin: Modes of denaturation. *PLoS ONE*, 9(8), 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0103579>
- Borrebaeck, C. A. K., Lonnerdal, B., & Etzler, M. E. (1981). Metal ion content of *Dolichos biflorus* lectin and effect of divalent cations on lectin activity. *Biochemistry*, 20, 4119–4122.
- Boyd, C., Var, L. R. A., & Boyd, A. N. D. L. G. (1966). Agglutinins in marine algae for human erythrocytes. *transfusion*, 6(1), 82–83.
- Brooks S.A. (2017). Lectin histochemistry: historical perspectives, state of the art, and the future. In C. Pellicciari & M. Biggiogera (Eds.), *Histochemistry of single molecules. methods in molecular biology*. Humana Press, New York, NY. http://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6788-9_6
- Chikalovets, I. V., Chernikov, O. V., Pivkin, M. V., Molchanova, V. I., Litovchenko, A. P., Li, W., & Lukyanov, P. A. (2015). A lectin with antifungal activity from the mussel *Crenomytilus grayanus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 42(2), 503–507. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.11.036>
- Drake, R. R., Schwegler, E. E., Malik, G., Diaz, J., Block, T., Mehta, A., & Semmes, O. J. (2006). Lectin capture strategies combined with mass spectrometry for the discovery of serum glycoprotein biomarkers. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1957–1967. <http://doi.org/10.1074/mcp.M600176-MCP200>
- Engelking, L. R. (2015). *Textbook of veterinary physiological chemistry* (third edit). Burlington: Academic Press/Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-391909-0.50020-7>
- Fajarningsih, N. D., Yamin, D. F., Yunita, I., Fahriza, A., Praseptianga, D., Sarnianto, P., & Chasanah, E. (2015). Penapisan senyawa hemagglutinin dari makroalga asal Pantai Binuangeun, Banten, Indonesia. *JPB Kelautan Dan Perikanan*, 10(1), 19–26. <http://doi.org/10.15578/jpbkp.v10i1.241>
- Freeze, H. H. (1995). Lectin Affinity Chromatography. In J. Coligan, B. M. Dunn, H. L. Ploegh, D. W. Speicher, & P. T. Wingfield (Eds.), *Current protocols in protein science* (1-9). John Wiley & Sons.
- Hamid, R., Masood, A., Wani, I. H., & Rafiq, S. (2013). Lectins: proteins with diverse applications. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(4), 93–103. <http://doi.org/10.7324/JAPS.2013.34.S18>
- Han, J. W., Jung, M. G., Shim, E. Y., Shim, J. B., Kim, Y. M., & Kim, G. H. (2015). Functional recombinants designed from a fetuin/asialofetuin-specific marine algal lectin, Rhodobindin. *Marine Drugs*, 13(4), 2183–2195. <http://doi.org/10.3390/md13042183>
- Holanda, E., Sousa Arruda, F. V., do Nascimento, K. S., Alves, V., Shiniti, C., da Silva, B. R., ... Sousa, B. (2012). Biological applications of plants and algae lectins: an overview. *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*, 533–558. <http://doi.org/10.5772/50632>

- Hong, J., Chen, T. T., Hu, L., Yang, J., Hu, P., & Wang, S. Y. (2015). Purification and characterization of a novel lectin from chinese leek seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(5), 1488–1495. <http://doi.org/10.1021/jf5046014>
- Hung, L. D., Hirayama, M., Ly, B. M., & Hori, K. (2015). Purification, primary structure, and biological activity of the high-mannose N-glycan-specific lectin from cultivated *Eucheuma denticulatum*. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1657–1669. <http://doi.org/10.1007/s10811-014-0441-0>
- Hung, L. D., Ly, B. M., Trang, V. T. D., Ngoc, N. T. D., Le Hoa, T., & Trinh, P. T. H. (2012). A new screening for hemagglutinins from Vietnamese marine macroalgae. *Journal of Applied Phycology*, 24(2), 227–235. <http://doi.org/10.1007/s10811-011-9671-6>
- Kaji, H., Saito, H., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Taoka, M., Hirabayashi, J., ... Isobe, T. (2003). Lectin affinity capture , isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins. *Nature Biotechnology*, 21(6), 667–672.
- Lam, S. K., & Ng, T. B. (2011). Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(1), 45–55. <http://doi.org/10.1007/s00253-010-2892-9>
- Mao, X., Qin, J., & Lin, B. (2007). Lectins: Analytical Technologies. In C. L. Nilsson (Ed.), *Lectins: Analytical Technologies* (pp. 213–238). Elsevier B.V. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-53077-6.50010-7>
- Marques, D. N., Almeida, A. S. de, Sousa, A. R. de O., Pereira, R., Andrade, A. L., Chaves, R. P., ... Sampaio, A. H. (2018). Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1292–1301. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.140>
- Mody, R. (1995). Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 33, 1-10.
- Mu, J., Hirayama, M., Sato, Y., Morimoto, K., & Hori, K. (2017). A novel high-mannose specific lectin from the green alga *Halimeda renschii* exhibits a potent anti-influenza virus activity through high-affinity binding to the viral hemagglutinin. *Marine Drugs*, 15(8). <http://doi.org/10.3390/md15080255>
- Palharini, J. G., Richter, A. C., Silva, M. F., Ferreira, F. B., Pirovani, C. P., Naves, K. S. C., ... Santiago, F. M. (2017). Eutirucallin: a lectin with antitumor and antimicrobial properties. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(April), 1–13. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00136>
- Praseptiangga, D., Hirayama, M., & Hori, K. (2012). Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel lectin from the green alga, *Codium barbatum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(4), 805–811. <http://doi.org/10.1271/bbb.110944>
- Rogers, D. J., & Hori, K. (1993). Marine algal lectins/ : new developments. *Hydrobiologia*, 260(261), 589–593.
- Seco-Rovira, V., Beltran-Frutos, E., Hernandez-Martinez, J., Ferrer, C., & Pastor, L. M. (2017). The use of lectin histochemistry for detecting apoptotic cells in the seminiferous epithelium. In C. Pellicciari & M. Biggiogera (Eds.), *Histochemistry of Single Molecules. Methods in Molecular Biology* (p. 133). Humana Press, New York, NY.
- Singh, R. S., Thakur, S. R., & Bansal, P. (2015). Algal lectins as promising biomolecules for biomedical research. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(1), 77–88. <http://doi.org/10.3109/1040841X.2013.798780>
- Singh, R. S., & Walia, A. K. (2018). Lectins from red algae and their biomedical potential. *Journal of Applied Phycology*, 30(3), 1833–1858. <http://doi.org/10.1007/s10811-017-1338-5>
- Spencer, C. A. (2011). Clinical utility of Thyroglobulin antibody (TgAb) measurements for patients with differentiated thyroid cancers (DTC). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(12), 3615–3627. <http://doi.org/10.1210/jc.2011-1740>
- Vasconcelos, M. A., Arruda, F. V. S., Carneiro, V. A., Silva, H. C., Nascimento, K. S., Sampaio, A. H., ... Pereira, M. O. (2014). Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts. *BioMed Research International*, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/365272>
- Wolters-Eisfeld, G., & Schumacher, U. (2017). Lectin histochemistry for metastasizing and non-metastasizing cancer cells. in C. Pellicciari & M. Biggiogera (Eds.), *Histochemistry of Single Molecules. Methods in Molecular Biology* (pp. 121). Humana Press, New York, NY. http://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6788-9_6
- Yin, C., Wong, J. H., & Ng, T. B. (2015). Isolation of a Hemagglutinin with potent antiproliferative activity and a large antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* CV. Hokkaido large pinto beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(22), 5439-5448. <http://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00475>
- Zió³kowska, N. E., & Wlodawer, A. (2006). Structural studies of algal lectins with anti-HIV activity. *Acta Biochimica Polonica*, 53(4), 617–626. <http://doi.org/20061399> [pii]

