

**PENAPISAN HEMAGGLUTININ DARI ALGA HIJAU GENUS *Codium*
(Chlorophyceae, Codiaceae)**

**SCREENING OF HEMAGGLUTININS FROM THE GREEN ALGAL GENUS *Codium*
(Chlorophyceae, Codiaceae)**

Danar Praseptiangga¹⁾

¹⁾ Staf Pengajar Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Pertanian
Universitas Sebelas Maret Surakarta

email: dpraseptiangga@uns.ac.id

ABSTRACT

*Lectins (hemagglutinins) are widely distributed in nature and also good candidates in such prospecting of marine algae. The most important property of a lectin is the ability to bind to carbohydrates and hence agglutinate cells. Lectins are useful as convenient tools to discriminate differences in carbohydrate structures and reveal various biological activities through binding and interacting to carbohydrates. There is a considerable interest in discovering and isolating novel lectins from the perspective of their applications, particularly in glycomics and in the medical field. Crude lectin fractions from six green algae of the genus *Codium* were prepared and examined for their hemagglutination activities with trypsin-treated rabbit erythrocytes. The positive result of five crude lectin fractions of the green algal genus *Codium* on hemagglutination assay indicates that lectins (hemagglutinins) are present in these species. However, further researches on lectins purification and characterization of their biochemical properties are still needed.*

Keywords: *lectins (hemagglutinins), the green algal genus *Codium*, hemagglutination activity*

ABSTRAK

Lektin (hemagglutinin) tersebar secara luas di alam dan memiliki potensi yang baik terkait dengan prospeksinya dari alga laut. Sifat terpenting lektin adalah kemampuannya untuk mengikat karbohidrat dan mengaglutinasi sel. Lektin dapat berguna sebagai alat yang mudah digunakan untuk menunjukkan perbedaan struktur karbohidrat dan mempunyai berbagai macam aktifitas biologis terkait dengan pengikatan dan interaksinya dengan karbohidrat, sehingga terdapat ketertarikan yang besar dalam upaya untuk menemukan dan mengisolasi lektin baru dari perspektif penggunaan lektin, khususnya dalam bidang *glycomics* dan medis. Fraksi kasar lektin dari enam spesies alga hijau genus *Codium* disiapkan dan diuji aktifitas hemagglutinasinya dengan menggunakan *trypsin-treated rabbit erythrocytes*. Hasil positif pada lima spesies alga hijau genus *Codium* yang diuji dalam *hemagglutination assay* mengindikasikan keberadaan lektin (hemagglutinin) pada spesies-spesies tersebut. Namun demikian, masih diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai pemurnian lektin dan karakterisasi sifat biokimianya.

Kata kunci : *lektin (hemagglutinin), alga hijau genus *Codium*, aktifitas hemagglutinasi*

PENDAHULUAN

Lektin (hemagglutinin) atau *carbohydrate-binding proteins* tersedia melimpah di alam pada berbagai organisme, dari tanaman, hewan, bakteri, fungi, virus, sampai ke manusia dan memegang peranan penting sebagai molekul pengenalan atau pelacak dalam interaksi antara sel-sel atau sel-matriks (Hori *et al.*, 2000, Sharon dan Lis, 2003). Lektin mengikat karbohidrat dengan spesifitas yang tinggi, namun tidak memiliki aktifitas katalitik seperti halnya enzim. Lektin berbeda dengan antibody dan bukan merupakan produk dari respon imun. Setiap molekul lektin biasanya mempunyai dua atau lebih *carbohydrate-binding sites*, oleh karena itu ketika mereka bereaksi

dengan sel, sebagai contoh eritrosit, mereka tidak hanya akan berinteraksi dengan gula yang ada pada permukaan, melainkan juga akan berinteraksi membentuk ikatan silang dengan molekul-molekul polisakarida atau glikoprotein dan menginduksi terjadinya presipitasi dalam interaksinya tersebut yang merupakan fenomena yang disebut sebagai aglutinasi (Sharon dan Lis, 2003, Brooks *et al.*, 2002., Varki *et al.*, 1999). Aglutinasi eritrosit oleh lektin (hemagglutinin) adalah sifat utama dari protein ini dan umum digunakan secara rutin untuk deteksi dan karakterisasi lektin (hemagglutinin).

Sejumlah kegunaan lektin telah ditemukan dalam riset kimiawi dan biokimiawi, termasuk kegunaannya dalam proses pemurnian dan analisa glikoprotein

yang memberikan kontribusi signifikan terhadap bidang *glycobiology* serta sebagai alat untuk memecahkan kode struktur karbohidrat pada permukaan sel dan dalam cairan tubuh yang disebabkan oleh keragaman lektin yang terkait dengan spesifisitas pengikatannya terhadap karbohidrat sehingga sangat memungkinkan untuk digunakan di bidang kedokteran dalam era *glycomics* (Brooks *et al.*, 2002., Varki *et al.*, 1999).

Lektin (hemagglutinin) dari alga pertama kali dilaporkan melalui survei alga di Puerto Rico (Boyd *et al.*, 1966). Penelitian selanjutnya di beberapa negara, antara lain Inggris (Blunden *et al.*, 1975, 1978, Rogers *et al.*, 1980), Jepang (Hori *et al.*, 1981, 1986), Spanyol (Fabregas *et al.*, 1985, 1992), Amerika (Chiles dan Bird 1989, Bird *et al.*, 1993), dan Brasil (Ainouz dan Sampaio 1991, Ainouz *et al.*, 1992., Freitas *et al.*, 1997) menunjukkan bahwa lektin (hemagglutinin) dapat ditemukan pada lebih dari dua ratus spesies alga (Hung *et al.*, 2009).

Apabila lektin dari alga dibandingkan dengan lektin dari tanaman darat dan hewan yang telah berhasil dimurnikan dan dikarakterisasi dengan baik, memang masih ada keterbatasan informasi terkait dengan karakteristik kimia-biokimia dan molekulernya. Namun, akhir-akhir ini jumlah lektin dari alga yang telah berhasil dimurnikan dan dikarakterisasi mengalami peningkatan. Selama dua dekade terakhir dilaporkan bahwa lektin telah berhasil dimurnikan dari lebih dari lima puluh spesies alga (Sato dan Hori, 2009, Hung *et al.*, 2009.). Penelitian akhir-akhir ini juga mengungkapkan bahwa lektin dari alga memiliki spesifisitas tinggi terhadap beberapa struktur oligosakarida tertentu dan dapat dikelompokkan menjadi beberapa jenis berdasarkan spesifisitas pengikatan terhadap oligosakarida (Sato *et al.*, 2007, Hori *et al.*, 2007). Oleh karena itu, alga berpotensi untuk menjadi sumber penemuan lektin baru yang dapat dimanfaatkan secara luas dalam penelitian dasar dan terapan antara lain di bidang kimia-biokimia, biologi molekuler, kesehatan, dan juga ilmu pangan. Namun demikian, terlepas dari kemajuan yang telah

dicapai dalam karakterisasi kimia-biokimia dan molekuler lektin dari alga, informasi tambahan masih diperlukan untuk mendapatkan pemahaman yang lebih komprehensif tentang sifat, struktur, dan fungsi biologis serta peranan fisiologis lektin dari alga (Hori *et al.*, 2000, 2007).

Lektin dari alga (khususnya alga merah) pada umumnya mempunyai karakteristik seperti berat molekul rendah, tidak memerlukan adanya kation divalen untuk aktifitas hemagglutinasinya, dan memiliki afinitas untuk glikoprotein tetapi tidak untuk monosakarida (Hori *et al.*, 1990, 2000, 2007). Namun uniknya, beberapa lektin yang telah berhasil dimurnikan dan dikarakterisasi dari alga hijau genus *Codium* mempunyai kemiripan karakteristik dengan lektin yang berasal dari tanaman darat, antara lain mempunyai afinitas terhadap monosakarida dan berat molekul relatif besar, sehingga terkadang dapat dijumpai dalam bentuk polimerik dan memiliki struktur sub unit. Kemiripan karakteristik antara lektin dari alga hijau genus *Codium* dan tanaman darat ini mungkin disebabkan oleh kedekatan jarak evolusi antara dua kelompok ini. Hal ini dimungkinkan oleh karena alga hijau genus *Codium* berada pada posisi menengah di antara alga (alga coklat, merah, dan yang lainnya) dan tanaman darat dalam posisi filogenetiknya (Verbruggen *et al.*, 2007). Selain itu, sejauh ini hanya beberapa lektin dari genus *Codium* seperti *Codium fragile* ssp. *tomentosoides*, *C. fragile* ssp. *atlanticum*, *C. tomentosum*, *C. girrafa*, dan *C. barbatum* (Rogers *et al.*, 1986., Fabregas *et al.*, 1988, Alvarez-Hernandez *et al.*, 1999, Praseptiangga *et al.*, 2012) yang berhasil dimurnikan dan dikarakterisasi secara parsial, sehingga dalam penelitian ini akan dilaporkan hasil penapisan lektin (hemagglutinin) dari alga hijau genus *Codium* dari persepektif bioprospeksi alga, khususnya alga hijau dari genus *Codium* sebagai kajian pendahuluan dalam upaya penemuan sumber lektin baru.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Beberapa spesies alga hijau dari genus *Codium* yaitu, *Codium intricatum*, *C. spongiosum*, *C. subtubulosum*, *C. arabicum*, *C. latum* dan *C. cylindricum* yang diperoleh dari hasil *sampling* di pantai dan perairan laut pulau Kyushu dan Shikoku, Jepang digunakan sebagai bahan baku utama dalam penelitian ini. Bahan pendukung yang digunakan antara lain larutan buffer *phosphate buffered saline* (PBS), ammonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), sodium azide (NaN_3), sodium klorida (NaCl), darah (eritrosit) kelinci, *trypsin*, nitrogen cair, air miliQ, dan bahan kimia untuk pengujian protein. Semua bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah *analytical grade* dengan tingkat kemurnian tertinggi.

Alat yang digunakan dapat dibedakan menjadi dua macam, yaitu alat yang digunakan untuk preparasi ekstrak alga dan presipitat ammonium sulfat, antara lain blender (Hamilton dan Waring), gunting, pinset, spatula, tabung nitrogen cair, gelas beker, gelas ukur, neraca, neraca analitik, *magnetic stirrer*, *refrigerated centrifuged* (tipe Sakuma dan Sorvall), *centrifuge tubes*, *hot plate*, pH meter, pipet, *dialysis tubes*, penjepit *dialysis tubes*, *sample tubes* dan alat yang digunakan untuk analisa, antara lain 96-well microtiter V-plate, vortek, *micro mixer*, tabung reaksi, spektrofotometer UV-vis, inkubator, dan mikropipet.

Tahapan Penelitian

Preparasi Ekstrak Alga dan Presipitat Ammonium Sulfat

Sampel beku dari beberapa spesies alga hijau, *Codium intricatum*, *C. spongiosum*, *C. subtubulosum*, *C. arabicum*, *C. latum*, dan *C. Cylindricum* dikeluarkan dari lemari pendingin suhu -30°C , dicairkan, dan kemudian ditimbang masing-masing 50 gram. Pengcilaan ukuran dilakukan dengan memotong-motong sampel yang telah dipersiapkan dan selanjutnya digunakan blender serta ditambahkan nitrogen cair dengan maksud agar sampel lebih cepat menjadi bubuk dan homogen.

Proses ekstraksi dilakukan dengan cara menambahkan 20 mM larutan *phosphate buffer* yang mengandung 0,85% NaCl dan 0,02% NaN_3 (PBSA, pH 7.0) ke dalam sampel yang telah menjadi bubuk dengan rasio 1:2 (b/v). Campuran sampel dan buffer PBSA kemudian diaduk dengan menggunakan stirer selama semalam pada suhu 4°C . Setelah itu, campuran tersebut disentrifugasi (13,500 g) pada suhu 4°C selama 30 menit dan ammonium sulfat padat yang telah dihaluskan ditambahkan ke dalam supernatan yang diperoleh untuk mendapatkan konsentrasi akhir kejenuhan 75%. Selanjutnya campuran disimpan semalam pada suhu 4°C dan disentrifugasi kembali (13,500 g) pada suhu 4°C selama 30 menit. Presipitat yang diperoleh kemudian dilarutkan kembali dengan penambahan buffer sesedikit mungkin dan didialisis dengan menggunakan PBSA. Setelah dialisis, fraksi bagian dalam (*inner fraction*) disentrifugasi lebih lanjut (10,000 g) pada suhu 4°C selama 30 menit dan supernatant yang diperoleh disebut sebagai fraksi kasar lektin atau sering disebut *salting-out fraction*. *Salting-out fraction* ini kemudian disimpan dalam lemari pendingin suhu -30°C setelah digunakan untuk analisa lebih lanjut, yaitu uji aktifitas hemaglutinasi dan kandungan protein.

Preparasi *Trypsin-treated Rabbit Erythrocytes* (TRBC)

Trypsin-treated Rabbit Erythrocytes (TRBC) disiapkan dari darah (eritrosit) kelinci yang diperoleh dari laboratorium penelitian hewan (Hiroshima, Jepang). Eritrosit dicuci tiga kali dengan 50 volum *saline* (0,85 % NaCl) dan disuspensikan ke dalam *saline* untuk memberikan 2% (v/v) suspensi dari *native* eritrosit. Kemudian 0,5 % (w/v) *trypsin* dalam *saline* (1/10 bagian volum) ditambahkan ke dalam 2 % suspensi dari *native* eritrosit dan campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah itu, campuran dicuci empat kali dengan *saline* dan 2 % suspensi TRBC dipersiapkan dalam *saline*.

Hemagglutination Assay

Pengujian aktifitas hemaglutinasi ditentukan berdasarkan metode Hori *et al.* (1986). Aktifitas hemaglutinasi ini dilakukan dalam 96-well microtiter V-plate dengan menggunakan TRBC dan dilakukan dengan tiga kali ulangan. Pengenceran dua kali lipat secara seri (masing-masing 25 µl) dilakukan dari sampel yang dianalisa dan dipersiapkan di dalam saline terlebih dahulu, kemudian ke dalam tiap sumuran ditambahkan 25 µl TRBC. Microtiter plate kemudian diguncang perlahan dan merata serta diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam. Hemaglutinasi diamati secara makroskopik dan dinilai positif apabila lebih dari 50 % dari TRBC dalam sumuran teraglutinasi. Aktifitas hemaglutinasi ini dinyatakan sebagai titer, yang berarti kebalikan dari pengenceran dua kali lipat tertinggi yang menunjukkan hemaglutinasi positif.

Penentuan Kandungan Protein

Kandungan protein ditentukan dengan metode Lowry *et al.* (1951) dengan menggunakan bovine serum albumin (BSA) sebagai standar dan dilakukan dengan dua kali ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktifitas hemagglutinasi dan kandungan protein dari beberapa alga hijau genus *Codium* dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Hasil pengujian aktifitas hemagglutinasi yang dilakukan pada beberapa fraksi kasar lektin (*salting-out fraction*) spesies alga hijau genus *Codium* menunjukkan bahwa lima spesies *Codium intricatum*, *C. spongiosum*, *C. subtubulosum*, *C. arabicum*, dan *C. latum* mampu mengaglutinasi *trypsin-treated rabbit erythrocytes* (TRBC). Aktifitas hemagglutinasi yang kuat diperlihatkan oleh *Codium latum* (2⁹ atau 512) dan *Codium spongiosum* (2⁸ atau 256). Sedangkan *Codium intricatum*, *Codium subtubulosum*, dan *Codium arabicum* menunjukkan aktifitas hemagglutinasi yang relatif kuat, akan tetapi *Codium cylindricum* tidak menunjukkan aktifitas hemagglutinasi pada pengujian ini (**Tabel 1**). Dari hasil pengamatan aktifitas

hemaglutinasi tersebut, dapat diindikasikan bahwa *Codium latum* dan *C. spongiosum* mempunyai potensi yang lebih besar dibandingkan spesies alga hijau genus *Codium* yang diuji lainnya untuk dapat memasuki tahapan lanjut pemurnian lektin (hemagglutinin). Kandungan protein tertinggi diperlihatkan oleh *Codium latum* (3.9 mg/ml) (**Tabel 1**).

Sebagaimana telah diketahui bahwa karakteristik yang paling penting dari lektin adalah kemampuan mereka untuk mengikat karbohidrat dan mengaglutinasi sel. Aglutinasi ini disebabkan oleh fakta bahwa lektin setidaknya memiliki dua sisi pengikatan sehingga dapat berikatan silang dengan sel melalui interaksinya dengan karbohidrat pada membran sel (Sharon dan Lis, 2003). Sebagian besar peneliti telah mendeteksi lektin melalui penelitian mengenai aglutinasi dengan menggunakan eritrosit manusia dan hewan dan / atau sel lainnya. Oleh karena itu, pengujian aktifitas hemagglutinasi pada penelitian ini menggunakan eritrosit dari kelinci dengan perlakuan enzim tripsin (*trypsin-treated rabbit erythrocytes*) berdasarkan pertimbangan bahwa lektin (hemagglutinin) dari alga lebih sensitif terhadap eritrosit hewan, terutama eritrosit kelinci daripada eritrosit manusia dan perlakuan enzim yang dalam hal ini digunakan tripsin (meskipun enzim lain dapat digunakan, seperti misalnya papain) mengakibatkan sensitifitasnya menjadi semakin tinggi (Hori *et al.*, 1988). Hal ini didukung dengan penelitian Hori *et al.* (1990) yang mengungkapkan bahwa ketika ekstrak dari spesies alga diuji aktifitas hemaglutinasinya terhadap *native* eritrosit dan berbagai perlakuan enzim (*enzyme-treated erythrocytes*), mereka menunjukkan kecenderungan untuk menggumpalkan lebih kuat pada eritrosit, terutama eritrosit kelinci, yang sebelumnya telah dilakukan perlakuan dengan enzim (*enzyme-treated erythrocytes*), khususnya tripsin. Penelitian yang dilakukan oleh Blunden *et al.* (1975) juga menunjukkan bahwa lektin (hemagglutinin) dari sejumlah besar spesies alga dapat ditunjukkan pada saat eritrosit yang digunakan untuk mendeteksi aktifitas hemaglutinasinya telah

Tabel 1. Aktifitas Hemaglutinasi dan Kandungan Protein Alga Hijau Genus *Codium*

No.	Spesies alga	Aktifitas Hemaglutinasi (HA) ^a	Kandungan Protein ^b (mg/ml)
1.	<i>Codium intricatum</i>	32	2.6
2.	<i>Codium spongiosum</i>	256	0.6
3.	<i>Codium subtubulosum</i>	64	2.2
4.	<i>Codium arabicum</i>	32	2.6
5.	<i>Codium latum</i>	512	3.9
6.	<i>Codium cylindricum</i>	- ^c	1.3

^a Aktifitas Hemaglutinasi (HA), dinyatakan sebagai titer, yang berarti kebalikan dari pengenceran dua kali lipat tertinggi yang menunjukkan hemaglutinasi positif

^b Kandungan protein ditentukan dengan metode Folin-Lowry (1951)

^c Tidak terdeteksi

diberi perlakuan dengan enzim, seperti papain.

Berdasarkan laporan yang disampaikan oleh Verbruggen *et al.* (2007), alga hijau genus *Codium* telah digunakan sebagai sumber senyawa bioaktif yang di antaranya berpotensi sebagai *anti-cancer agents* dan antibiotik. Lebih lanjut, terkait dengan kegunaan lektin dari alga hijau genus *Codium*, Wu *et al.* (1997) mengungkapkan bahwa *N*-asetil galaktosamin spesifik lektin dari *Codium fragile* ssp. *tomentosoides* menunjukkan afinitas khusus pada *forsmann antigen sugar chain* yang merupakan penanda kanker dan dapat dimanfaatkan dalam bidang medis. Selain itu, sejauh ini baru beberapa lektin (hemagglutinin) yang berhasil dimurnikan dari alga hijau genus *Codium*, sehingga lektin dari genus *Codium* ini merupakan target yang menarik untuk dikaji lebih lanjut, khususnya yang terkait dengan aplikasinya di bidang kesehatan dalam era *glycomics* dan bidang pangan gizi, mengingat beberapa spesies dari genus ini dapat dikonsumsi sebagai bahan pangan, selain juga diharapkan dapat memberikan wawasan secara menyeluruh dan komprehensif untuk mengungkap hubungan evolusi antara alga dan tanaman darat.

DAFTAR PUSTAKA

- Ainouz, I.L., Sampaio, A.H., 1991. *Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins*. Bot. Mar. 34, 211–214.
- Ainouz, I.L., Sampaio, A.H., Benevides, N.M.B., Freitas, A.L.P., Costa, F.H.F., Carvalho, M.C., Pinheiro-Joventino, F., 1992. *Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine algae*. Bot. Mar. 35, 475–479.
- Alvarez-Hernandez, S., De Lara-Isassi, G., Arreguin-Espinoza, R., Arreguin, B., Hernandez-Santoyo, A., Rodriguez-Romero, A., 1999. *Isolation and partial characterization of giraffine, a lectin from the Mexican endemic alga Codium giraffe Silva*. Bot. Mar. 42, 573–580.
- Bird, K.T., Chiles, T.C., Longley, R.E., Kendrick, A.F., Kinkema, M.D., 1993. *Agglutinins from marine macroalgae of the Southeastern United States*. J. Appl. Phycol. 5, 212–213.
- Blunden, G., Rogers, D.J., Farnham, W.F., 1975. *Survey of British seaweeds for hemagglutinins*. Lloydia. 38, 162–168.
- Blunden, G., Rogers, D.J., Farnham, W.F., 1978. *Hemagglutinins in British marine algae and their possible taxonomic value*. In: Irvine, D.E.G., Price, J.H. (eds), *Modern approaches to the taxonomy of red and brown algae*, pp 21–45. Academic, London.
- Boyd, W.C., Almodovar, L.R., Boyd, L.G., 1966. *Agglutinins in marine algae for human erythrocytes*. Transfusion. 6, 82–83.
- Brooks, S.A., Dwek, M., Schumacher, U., 2002. *Functional and molecular glycobiology*. Garland Science. UK.
- Chiles, T.C., Bird, K.T., 1989. *A comparative study of the animal erythrocyte agglutinins from marine algae*. Comp. Biochem. Physiol. B. 94, 107–111.

- Fabregas, J., Llovo, J., Muñoz, A., 1985. *Hemagglutinins in red seaweeds*. Bot. Mar. 28, 517-520. .
- Fabregas, J., Muñoz, A., Llovo, J., Carracedo, A., 1988. *Purification and partial characterization of tomentine. An N-acetylglucosamine specific lectin from the green alga Codium tomentosum (Huds.) Stackh.* J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 124, 21-30.
- Freitas, A.L.P., Teixeira, D.I.A., Costa, F.H.F., Farias, W.R.L., Lobato, A.S.C., Sampaio, A.H., Benevides, N.M.B., 1997. *A new survey of Brazilian marine algae for agglutinins*. J. Appl. Phycol. 9, 495-501.
- Hori, K., Miyazawa, K., Ito, K., 1981. *Hemagglutinins in marine algae*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 49, 793-398.
- Hori, K., Miyazawa, K., Ito, K., 1986. *Preliminary characterization of agglutinins from seven marine algal species*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 52, 323-331.
- Hori, K., Oiwa, C., Miyazawa, K., Ito, K., 1988. *Evidence for wide distribution of agglutinins in marine algae*. Bot. Mar. 31, 133-138.
- Hori, K., Miyazawa, K., Ito, K., 1990. *Some common properties of lectins from marine algae*. Hydrobiologia. 204/205, 561-566.
- Hori, K., Matsubara, K., Miyazawa, K., 2000. *Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, Hypnea japonica*. Biochim. Biophys. Acta 1474, 226-236.
- Hori, K., Sato, Y., Ito, K., Fujiwara, Y., Iwamoto, Y., Makino, H., Kawakubo, A., 2007. *Strict specificity for high mannose-type N-glycans and primary structure of a red alga Eucheuma serra lectin*. Glycobiology. 17, 479-491.
- Hung, L.D., Hori, K., Nang, Q., 2009. *Screening and preliminary characterization of hemagglutinins in Vietnamese marine algae*. J. Appl. Phycol. 21, 89-97.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Praseptiangga, D., Hirayama, M., Hori, K., 2012. *Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel lectin from the green alga, Codium barbatum*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 76:805-811.
- Rogers, D.J., Blunden, G., Topliss, J.A., Guiry, M.D., 1980. *A survey of some marine organisms for haemagglutinins*. Bot. Mar. 23:569-577.
- Rogers, D.J., Loveless, E.W., Balding, P., 1986. *Isolation and characterization of the lectins from subspecies of Codium fragile*. In: Kilpatrick, D.C., Van Driessche, E., Bog Hansen, T.C. (eds.), Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, vol. 5, pp. 155-160. Walter de Gruyter, Berlin, Germany.
- Sato, T., Hori, K., 2009. *Cloning, expression, and characterization of a novel anti-HIV lectin from the cultured cyanobacterium, Oscillatoria agardhii*. Fish. Sci. 75, 743-753.
- Sato, Y., Okuyama, S., Hori, K., 2007. *Primary structure and carbohydrate binding specificity of a potent anti-HIV lectin isolated from the filamentous cyanobacterium, Oscillatoria agardhii*. J. Biol. Chem. 282, 11021-11029.
- Sharon, N., Lis, H., 2003. *Lectins 2nd ed.* Kluwer, The Netherlands.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J., 1999. *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Verbruggen, H., Leliaert, F., Maggs, C.A., Shimada, S., Schils, T., Provan, J., Booth, D., Murphy, S., Clerck, O., Littler, D.S., Littler, M.M., Coppejans, E., 2007. *Species boundaries and phylogenetic relationships within the green algal genus Codium (Bryopsidales) based on plastid DNA sequences*. Mol. Phyl. Evol. 44, 240-254.
- Wu, A.M., Song, S.C., Chang, S.C., Wu, J.H., Chang, K.S., Kabat, E.A., 1997. *Further characterization of the binding properties of a GalNAc specific lectin from Codium fragile subspecies tomentosoides*. Glycobiology 7, 1061-1066.