

# Optimasi Isolasi dan Karakterisasi Jakalin dari Biji Nangka

\*Tri Suciati, Niknik Widanengsih, Catur Riani, Tutus Gusdinar

Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10 Bandung 40132

## Abstrak

Telah diisolasi jakalin dari biji nangka (*Artocarpus heterophyllus*) menggunakan metode kromatografi afinitas dengan matriks guar gum yang telah dipaut silang dengan epiklorohidrin, isolasi dilakukan dengan menggunakan pengelusi D-galaktosa. Hasil karakterisasi jakalin menggunakan SDS-PAGE menunjukkan bahwa jakalin memiliki dua pita dengan bobot molekul 14,1 dan 15,5 kDa, antar subunitnya tidak dihubungkan dengan ikatan disulfida. Jakalin yang diisolasi memiliki kemampuan mengaglutinasi eritrosit, kemampuan hemaglutinasi jakalin tidak berkurang setelah diinkubasi pada suhu 20°C dan 30°C, tetapi setelah inkubasi pada suhu 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, aktivitasnya turun masing-masing 75%, 87,5%, 93,75% dan 98,4%. Kemampuan hemaglutinasi jakalin tidak berkurang setelah diinkubasi pada pH 5, 6, dan 7, tetapi aktivitasnya turun 75% setelah inkubasi pada pH 2, 3, 4, dan 8, serta turun 96,9% pada pH 9 dan 10. Kemampuan hemaglutinasi jakalin dihambat oleh D-galaktosa dengan kemampuan inhibisi hemaglutinasi sebesar 6,25 mM, aktivitas hemaglutinasi jakalin tidak dihambat oleh D-manosa, D-glukosa, fruktosa, laktosa, arabinosa, maltosa, dan manitol. Diperoleh jakalin dengan perolehan rata-rata sebesar 0,32% b/b dari serbuk kering biji nangka

**Kata kunci:** Jakalin, lektin, *Artocarpus heterophyllus*, D-galaktosa.

## Abstract

Jacalin from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) had been isolated using affinity chromatography method with epichlorohydrin crosslinked guar gum as the matrix, isolation carried out using D-galactose as the eluen. Characterization jacalin using SDS-PAGE showed that jacalin has two bands with molecular weights 14.1 and 15.5 kDa, intersubunit not connected with disulfide bonds. Jacalin isolates have the ability to haemagglutination erythrocytes, haemagglutination activity of jacalin maintained after incubation at 20°C and 30°C, but the activity decreased at 40, 50, 60, and 70 °C of incubation, which were 75%, 87.5%, 93.75% and 98.4% , respectively. Jacalin hemagglutination ability is not reduced after incubation at pH 5, 6, and 7, but the activity down 75% after incubation at pH 2, 3, 4, and 8, and down 96.9% at pH 9 and 10. The haemagglutination activity of jacalin was inhibited by D-galactose with the capacity inhibition value was 6.25 mM, but it was not inhibited by D-mannose, D-glucose, fructose, lactose, arabinose, maltose, and manitol. Average recovery of jacalin is 0.32% w/w of jackfruit dry powder.

**Keywords:** Jacalin, lectin, *Artocarpus heterophyllus*, D-galactose.

## Pendahuluan

Di Indonesia *Artocarpus heterophyllus* dikenal sebagai nangka, tanaman ini merupakan tanaman yang tersebar didaerah tropis, pada biji nangka dikandung lektin yang dinamakan jakalin, dan bersifat spesifik terhadap D-galaktosa serta memiliki spesifisitas yang tinggi terhadap antigen *Thomsen-Friedenreich* (Mahanta *et al.* 1990). Jakalin memiliki kemampuan dalam mengaglutinasi darah (Chatterjee *et al.* 1979) disamping keberadaan jakalin, pada biji nangka juga terdapat sejumlah kecil lektin yang bersifat spesifik terhadap D-manosa yang dinamakan artokarpin.

Jakalin telah digunakan untuk mendeteksi kanker (Vijayakumar *et al.* 1992), isolasi IgA1 dari serum (Roque-Barreira dan Campos-Neto 1985), penelitian AIDS karena dilaporkan dapat memblokir infeksi HIV-1 secara in vitro (Favero *et al.* 1993).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengarakterisasi jakalin dari biji nangka (*A.heterophyllus*), sehingga diharapkan dapat diperoleh kondisi isolasi yang optimum untuk memperoleh jakalin serta mengetahui karakteristik jakalin.

## Percobaan

### Bahan

Biji nangka, PBS (pH 7,4), amonium sulfat, epiklorohidrin, guar gum, aquadeion, D-galaktosa, D-manosa, D-glukosa, fruktosa, laktosa, arabinosa, maltosa, manitol, HCl, NaOH, air suling, eritrosit, buffer pH 2-10, pereaksi bradford, fenol, asam sulfat 96%, *bovine serum albumin*.

\*Penulis korespondensi. E-mail: tri.suciati@fa.itb.ac.id

## Alat

Alat timbang (Mettler Toledo), pH meter (Beckman™ 50), *freeze dryer* (Eyela), spektrofotometer ultra violet-sinar tampak (Beckman Coulter), sentrifuge, oven, *waterbath*, membran dialisis, *fluidised bed dryer* (Aeromatic Fielder AG), kolom gelas, serta alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

## Pembuatan Kolom Guar Gum Sambung Silang

Dibuat emulsi epiklorohidrin 6% dalam NaOH 3 M. Emulsi dituangkan ke dalam labu 250 mL kemudian ditambahkan 10 g guar gum serbuk. Campuran diaduk dengan cepat sampai menjadi padatan dan disimpan pada *waterbath* suhu 40°C selama 24 jam, aduk sesekali kemudian dikeringkan pada oven bersuhu 70°C selama 8 jam. Padatan direndam dalam dicuci dengan dengan aquadest sampai pH 7. Padatan diblender sampai ukuran partikel  $\pm$  300 um dan dicuci kembali beberapa kali dengan PBS (pH 7,4). Guar gum yang telah dihomogenkan di masukkan kedalam kolom gelas berukuran panjang 30 cm dan diameter 1 cm dilusi dengan PBS sampai absorbansi efluen pada 280 nm mencapai *baseline*.

## Isolasi dan Pemurnian Jakalin

Dua puluh lima gram biji nangka yang telah dikeringkan dan dihaluskan diaduk dengan menggunakan magnetik stirer dalam 250 mL PBS pH 7,4 pada suhu 4°C selama satu malam. Ekstrak kemudian disaring dan disentrifugasi 30 menit pada 10.000 g, supernatan yang diperoleh dikumpulkan dan ditambahkan amonium sulfat sampai konsentrasi 40%, diaduk konstan dan didiamkan semalam. Endapan dipisahkan dengan sentrifugasi pada 20.000 g selama 30 menit, pada lapisan supernatan ditambahkan amonium sulfat sampai konsentrasi 60%, aduk konstan dan diamkan semalam. Endapan yang terbentuk dikumpulkan dengan sentrifugasi seperti diatas dan dilarutkan dalam PBS kemudian di dialisis tiga kali melawan PBS (pH 7,4).

Endapan yang terbentuk dipisahkan dengan senrifugasi dan supernatan dikumpulkan. Ekstrak kasar yang diperoleh kemudian dimurnikan dengan kromatografi afinitas dengan matriks guar gum disambung silang untuk mendapatkan jakalin. Ekstrak kasar dimasukkan ke dalam kolom kemudian dicuci dengan PBS sampai absorbansi efluen  $\leq$ 0,05 pada 280 nm. Lektin yang telah diabsorpsi lalu dilusi dengan larutan D-galaktosa dalam PBS. Efluen dikumpulkan dalam 3-5 mL aliquot dan absorbansi tiap fraksi dibaca pada 280 nm. Fraksi dengan absorbansi maksimum dikumpulkan dan didialisis beberapa kali melawan aquadest. Lektin yang telah didialisis kemudian diliofilisasi dan disimpan dalam desikator.

## Uji Hemaglutinasi

Pengujian aktivitas hemaglutinasi dilakukan dengan menggunakan pelat mikrotiter menggunakan suspensi eritrosit 2% dan menggunakan PBS pH 7,4 sebagai kontrol. Konsentrasi ekstrak minimum yang dapat menyebabkan hemaglutinasi dicatat sebagai titer aglutinasi. Pengujian aktivitas hemaglutinasi dilakukan pada ekstrak kasar, lektin yang dilusi D-galaktosa, dan lektin hasil liofilisasi.

## Penentuan Kandungan Protein Total

Penentuan kandungan protein total dilakukan menggunakan *Bio-Rad® Protein Assay*. Dibuat larutan standar BSA dengan konsentrasi berseri, masing-masing larutan standar diambil 100  $\mu$ L dan ditambahkan pereaksi *Bio-Rad® Protein Assay* larutan di vortex dan diukur pada panjang gelombang 595 nm dengan blanko 100  $\mu$ L aquadeion dan diberi perlakuan seperti pada standar. Sampel diencerkan sampai konsentrasi berada pada rentang absorbansi standar kemudian diberi perlakuan yang sama dengan standar.

## Penentuan Kandungan Gula Total

Kadar gula total dilakukan dengan metode fenol-asam sulfat (Dubois *et al.* 1956), menggunakan glukosa sebagai standar. Dibuat larutan standar glukosa dengan konsentrasi berseri, masing-masing larutan standar diambil 0,1 mL, ditambahkan 0,5 mL fenol 4%, dan asam sulfat 96% sebanyak 2,5 mL, larutan di vortex dan diamkan sampai mencapai suhu kamar, kemudian diukur pada panjang gelombang 490 nm dengan blanko 0,1 mL aquadest yang ditambahkan 0,5 mL fenol 4%, dan asam sulfat 96% sebanyak 2,5 mL. Sampel diencerkan sampai konsentrasi berada pada rentang absorbansi standar kemudian diberi perlakuan yang sama dengan standar.

## Uji Stabilitas Suhu

Disiapkan larutan lektin (1 mg/mL) dalam PBS. Sejumlah larutan dimasukkan ke dalam beberapa tabung dan disimpan dalam *waterbath* dan dijaga dalam suhu bervariasi dari 30°C-70°C selama 15 menit, kemudian didinginkan sampai suhu kamar selanjutnya diuji aktivitas hemaglutinasi.

## Uji Stabilitas pH

Larutan lektin (1 mg/mL) diberi perlakuan dengan beberapa buffer yang berbeda selama 2 jam di suhu 25°C, kemudian diuji aktivitas hemaglutinasi.

## Uji Daya Hambat Gula

Pengujian dilakukan dengan menggunakan berbagai jenis gula dengan pengenceran berseri, konsentrasi

gula terendah yang mampu menghambat terjadinya hemaglutinasi oleh jakalin dicatat setelah diinkubasi selama 2 jam pada suhu kamar.

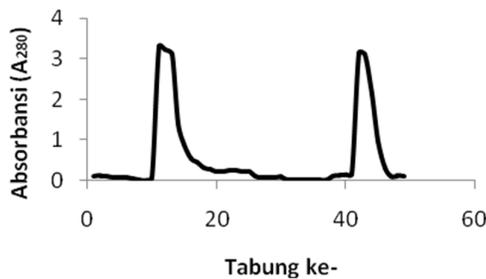
### Analisis Elektroforesis

SDS-PAGE dilakukan menggunakan 12,5% *separating gel* dan 5% *stacking gel*. Gel hasil elektroforesis diwarnai dengan *coomassie brilliant blue*. Setelah di destaining dibandingkan jarak migrasi marker protein dan jakalin hasil isolasi. Bobot molekul lektin ditentukan dari kurva standar antara jarak migrasi marker protein dan bobot molekulnya.

### Hasil dan Pembahasan

Isolasi lektin dari biji *A. heterophyllus* dilakukan dengan mengekstraksi biji dari *A. heterophyllus* menggunakan PBS pH 7,4. Dalam percobaan, ekstrak kasar biji nangka diberi dua perlakuan yang berbeda yaitu dengan pemekatan terlebih dahulu dengan menggunakan amonium sulfat perlakuan kedua dilakukan dengan pemurnian ekstrak tanpa mengalami pemekatan terlebih dahulu, dengan konsentrasi yang sama kedua ekstrak menunjukkan aktivitas hemaglutinasi yang sama.

Pada tahap awal dilakukan optimasi pengkondisian kolom untuk memastikan kolom dapat digunakan untuk pemurnian.

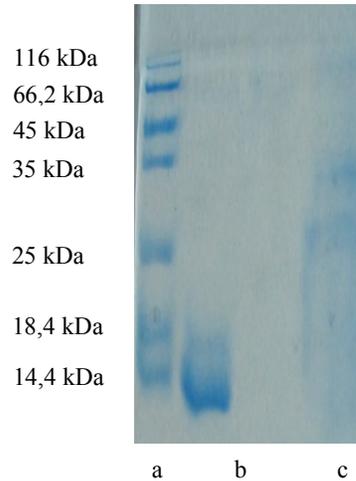


**Gambar 1.** Kurva elusi lektin dari biji nangka. Puncak pertama merupakan puncak yang dicuci oleh PBS (a), puncak kedua merupakan puncak yang dielusi oleh D- galaktosa (b).

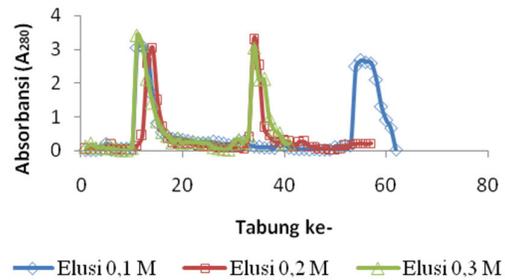
Dilakukan analisis elektroforesis untuk memastikan bahwa tidak ada jakalin pada fraksi puncak yang dielusi PBS pH 7,4, dari uji elektroforesis tidak ditemukan pita yang dicurigai sebagai jakalin.

Optimasi pengelusi dilakukan menggunakan konsentrasi D-galaktosa yang berbeda untuk mencari konsentrasi optimum untuk mendapatkan jakalin. Ekstrak diinkubasi selama 1 jam di dalam kolom selanjutnya dilakukan pencucian dengan PBS pH 7,4

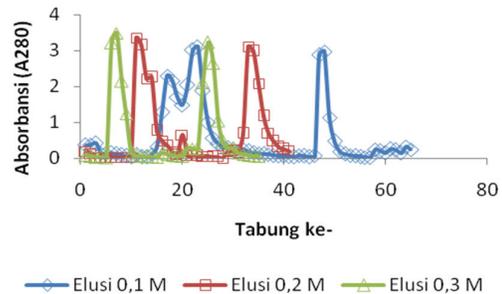
kemudian dilakukan elusi dengan D-galaktosa. Fraksi yang diperoleh diukur pada panjang gelombang 280 nm, fraksi dengan absorbansi tinggi dikumpulkan.



**Gambar 2.** Hasil elektroforesis optimasi kolom. Marker protein (a), jakalin dari biji *A. heterophyllus* (b), Fraksi puncak hasil pencucian dengan PBS (c).



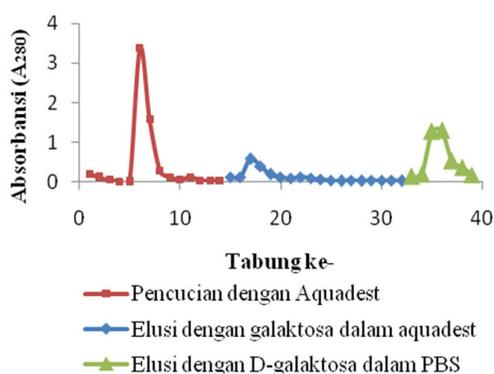
**Gambar 3.** Kurva perbandingan elusi jakalin dengan konsentrasi D-galaktosa bervariasi dari ekstrak biji nangka yang diendapkan dengan amonium sulfat.



**Gambar 4.** Kurva perbandingan elusi jakalin dengan konsentrasi D-galaktosa bervariasi dari ekstrak biji nangka yang tidak diendapkan.

Penggunaan amonium sulfat sebagai pengendap didasarkan pada sifat protein yang akan mengendap pada konsentrasi garam tinggi (*salting out*). Ion garam yang ditambahkan akan mempengaruhi kelarutan protein, pada konsentrasi rendah ion-ion ini akan melingkungi molekul-molekul protein dan mencegah bersatunya molekul-molekul ini sehingga protein melarut peristiwa ini disebut *salting in*. Pada konsentrasi tinggi, terjadi peningkatan muatan listrik di sekitar protein yang akan menarik mantel air dari koloid protein. Interaksi hidrofobik di antara sesama molekul protein pada suasana ionik tinggi akan menurunkan kelarutan protein, peristiwa ini disebut *salting out*. Pada ekstrak yang tidak diendapkan terlebih dahulu, jakalin tetap dapat terikat oleh kolom dan terelusi dari kolom walaupun protein dalam ekstrak tidak dipekatkan terlebih dahulu, sebab metode isolasi dan pemisahannya didasarkan pada afinitas kolom untuk mengikat ligan atau senyawa target. Ketika dilakukan elusi pada berbagai konsentrasi terlihat bahwa semakin pekat pengelusi yang digunakan, makin cepat waktu yang diperlukan oleh jakalin untuk keluar dari kolom.

Elusi jakalin dari kolom guar gum dipengaruhi oleh keberadaan komponen buffer fosfat, ketika dilakukan elusi dengan D-galaktosa dalam aquadest, tidak diperoleh kenaikan puncak absorbansi pada  $\lambda$  280 nm, kenaikan absorbansi diperoleh setelah dilakukan elusi oleh D-galaktosa dalam PBS pH 7,4. Komponen buffer fosfat diperlukan untuk membantu pengikatan protein pada matriks kolom dan membantu proses elusi, dengan keberadaan PBS, komponen dalam PBS akan memodulasi afinitas protein dan interaksi protein terhadap permukaan matriks pada kolom dengan memberikan halangan muatan.



**Gambar 5.** Pengaruh keberadaan buffer fosfat dalam proses elusi. Awal dielusi D-galaktosa dalam aquadest (a), awal dielusi D-galaktosa dalam PBS (b).

Dari hasil pengukuran terhadap konsentrasi protein, elusi dengan D-galaktosa 0,2 M dengan perlakuan pengendapan protein terlebih dahulu memberikan perolehan serbuk jakalin terbesar, dengan dilakukan pengendapan protein terlebih dahulu terjadi tahap penyeleksian sehingga hanya protein yang berinteraksi dengan kolom dan mengefektifkan kolom untuk berinteraksi dengan jakalin. D-galaktosa dengan konsentrasi 0,3 M sebagai pengelusi walaupun memiliki konsentrasi yang lebih tinggi tidak memberikan perolehan kembali yang lebih besar. Dari tabel juga terlihat bahwa konsentrasi optimum untuk mengelusi jakalin dari ekstrak tanpa pemekatan terlebih dahulu diperoleh pada konsentrasi D-galaktosa 0,2 M sebagai pengelusi. Walaupun perolehan kembali dari sampel ekstrak tanpa pengendapan terlebih dahulu lebih kecil akan tetapi proses lebih ekonomis dan lebih cepat karena kita dapat menghilangkan penggunaan komponen pengendap dan mengurangi tahap dialisis untuk menghilangkan amonium sulfat yang berlebih, selain itu penggunaan amonium sulfat sebagai pengendap dapat memberikan beberapa kerugian diantaranya kurang efisien dalam menghilangkan pengotor, dia tidak bersifat buffer dan dapat meningkatkan pH larutan serta dapat menyebabkan terbentuknya agregat protein yang tidak mengendap yang sulit dipisahkan dari larutannya. Densitas larutan jenuh amonium sulfat dalam air murni adalah sebesar 1,235 g/mL sedangkan agregat protein sebesar 1,29 g/mL akan tetapi karena adanya garam dan senyawa lain maka densitas larutan 75-100% amonium sulfat pada proses pengendapan protein akibatnya agregat protein yang memiliki densitas lebih rendah dari larutan akan sulit dipisahkan dengan sentrifugasi (Widhyastuti 2007).

Jakalin bisa mencapai lebih dari 50 % terhadap total protein dalam ekstrak kasar biji nangka (Kabir 1998). Kandungan jakalin bisa bervariasi bergantung pada kematangan biji dan kondisi tempat tumbuh, jakalin yang berasal dari daerah yang berbeda juga bisa menunjukkan reaktivitas yang berbeda (Lim *et al.* 1997). Pemurnian dengan menggunakan HPLC penukar ion dengan matriks PA-DEAE dilaporkan dapat memperoleh jakalin 135-165 mg untuk 500 mg ekstrak protein terlarut dengan perolehan kembali 27-33% (relatif terhadap kolom DEAE) (De Simone *et al.* 1994). Isolasi jakalin dengan kolom sepharose yang digabungkan dengan IgA menghasilkan 60 mg jakalin setiap 200 mg ekstrak biji nangka (Kabir 1995). Jakalin yang diperoleh lebih rendah apabila dibandingkan dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya hal ini dapat disebabkan karena adanya perbedaan kandungan protein pada sampel yang digunakan serta teknik pemisahan dan pengelusi yang digunakan berbeda.

**Tabel 1.** Estimasi Perolehan Kembali Protein

	Protein total (mg)	% Perolehan kembali
<b>Dengan pengendapan oleh amonium sulfat</b>		
Ekstrak kasar	1028,2	-
Elusi dengan D-galaktosa 0,1M	369,6	35,87
Ekstrak kasar	960,3	-
Elusi dengan D-galaktosa 0,2M	419,0	43,42
Ekstrak kasar	1011,0	-
Elusi dengan D-galaktosa 0,3M	393,3	38,90
<b>Tanpa pengendapan oleh amonium sulfat</b>		
Ekstrak kasar	2511,5	-
Elusi dengan D-galaktosa 0,1M	836,3	33,71
Ekstrak kasar	2801,2	-
Elusi dengan D-galaktosa 0,2M	1080,3	38,75
Ekstrak kasar	1511,0	-
Elusi dengan D-galaktosa 0,3M	530,5	35,11

**Tabel 2.** Perolehan Jakalin Hasil Isolasi

Percobaan ke-	Massa (mg)/100 g serbuk	Kadar (%)
1	373	0,373
2	236	0,236
3	364	0,364
Rata – Rata		0,324
SD		0,077

Artokarpin (artin-M) dalam biji nangka yang bersifat spesifik terhadap manosa tidak berhasil diperoleh dengan menggunakan kolom guar gum walaupun telah dilakukan elusi terhadap ekstrak kasar menggunakan D-manosa.

Aktivitas hemaglutinasi antara puncak hasil elusi yang telah didialisis dibandingkan dengan ekstrak kasar dari hasil percobaan terlihat aktivitas hemaglutinasi dari hasil elusi dari *A. heterophyllus* lebih tinggi dibandingkan ekstrak kasar, uji hemaglutinasi dilakukan dengan menggunakan konsentrasi protein dengan jumlah yang sama.

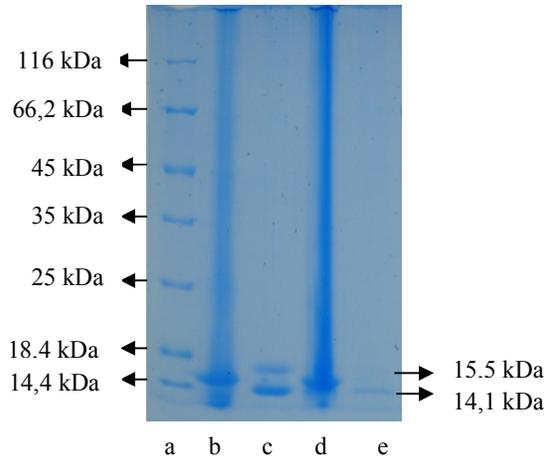
**Tabel 3.** Perbandingan Aktivitas Hemaglutinasi Ekstrak Kasar dengan Hasil Elusi

Sampel	Titer HA	Protein terendah yang menyebabkan aglutinasi ( $\mu\text{g/mL}$ )
Ekstrak kasar (diendapkan amonium)	1024	0,98
Hasil elusi dengan D-galaktosa	2048	0,49
Ekstrak kasar biji nangka (tanpa pengendapan)	1024	0,98
Hasil elusi dengan D-galaktosa	2048	0,49

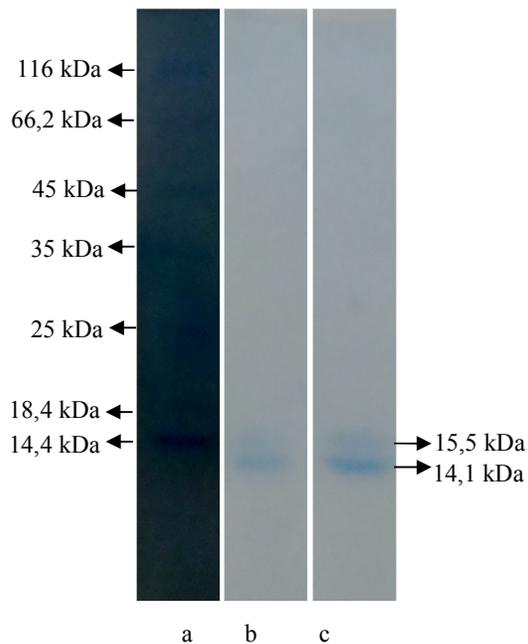
Hasil dialisis dikeringkan dengan metode kering beku, metode kering beku merupakan metode pengeringan suatu larutan dengan menggunakan pendinginan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  kemudian dilakukan penyubliman pelarut sehingga menghasilkan residu serbuk kering bebas air. Jakalin hasil pengeringan diuji kandungan protein total, kandungan gula total, aktivitas hemaglutinasi jakalin, stabilitas jakalin pada berbagai suhu, stabilitas jakalin pada beberapa pH, uji hambat gula, dan analisis elektroforesis.

Analisis protein menggunakan elektroforesis SDS-PAGE terlihat bahwa jakalin dari *A. heterophyllus* memberikan dua pita dengan bobot molekul sekitar 15,5 kDa dan 14,1 kDa. Kedua pita ini berasal dari rantai berat  $\alpha$  dan  $\alpha'$ , rantai  $\alpha$  memberikan pita pada dengan bobot molekul 14,1 kDa dan rantai  $\alpha'$  memberikan pita dengan bobot molekul 15,5 kDa, bobot molekul rantai  $\alpha$  dan rantai  $\alpha'$  telah dilaporkan sebesar 14,7 kDa dan 15,8 kDa (Kabir 1998) dan penentuan bobot molekul yang ditentukan dengan spektrometri massa diperoleh bobot molekul rantai  $\alpha$  sebesar 14663 Da dan rantai  $\alpha'$  15802 Da. Ketebalan pita yang berbeda disebabkan rantai  $\alpha$  dan  $\alpha'$  berada dalam perbandingan yang berbeda, perbandingan rantai  $\alpha$  dan  $\alpha'$  sekitar 3:1 (Ruffet et al. 1992).

Analisis keberadaan ikatan sulfida dilakukan dengan menggunakan elektroforesis SDS-PAGE dengan dan tanpa penambahan  $\beta$ -merkaptotanol. Hasil elektroforesis menunjukkan jakalin yang ditambahkan dan tidak ditambahkan pereduksi  $\beta$ -merkaptotanol tetap diperoleh dua pita, hal ini menunjukkan bahwa jakalin tidak memiliki ikatan sulfida.



**Gambar 6.** Analisis elektroforesis jakalin dari biji *A. heterophyllus*. Marker (a), ekstrak kasar biji *A. heterophyllus* yang diendapkan amonium (b), jakalin dari biji *A. heterophyllus* yang diendapkan amonium (c), ekstrak kasar biji *A. heterophyllus* tanpa pengendapan (d), jakalin dari biji *A. heterophyllus* tanpa pengendapan (e).



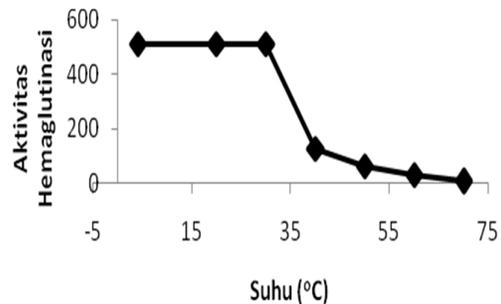
**Gambar 7.** Analisis elektroforesis lektin dari biji *A. heterophyllus*. Marka (a), Jakalin dengan  $\beta$ -merkpto etanol (b), jakalin tanpa  $\beta$ -merkptoetanol (c).

Kestabilan jakalin terhadap suhu dilakukan dengan menggunakan larutan jakalin 1 mg/mL dalam PBS. Aktivitas jakalin berkurang dengan meningkatnya suhu.

Pada suhu 20°C dan 30°C jakalin masih menunjukkan aktivitas hemaglutinasi yang sama dengan jakalin yang disimpan di suhu 4°C, aktivitas berkurang setelah jakalin diinkubasi pada suhu 40, 50, 60, dan 70°C. Penurunan aktivitas ini dapat disebabkan karena terjadinya denaturasi pada jakalin. Seiring kenaikan suhu larutan, terjadi pergeseran kesetimbangan bentuk terlipat dan tidak terlipat yang cenderung bergeser kedalam bentuk tidak terlipat. Dalam bentuk tidak terlipat, residu hidrofob yang biasanya terlindung dari pelarut polar ketika berada dalam bentuk terlipat menjadi terpapar terhadap pelarut. Kenaikan suhu juga meningkatkan tumbukan antara molekul yang dapat menyebabkan terjadinya oligomerisasi diikuti agregasi potein kemudian terjadi pengendapan. Stabilitas jakalin terhadap pH dilakukan dengan merendam jakalin 1 mg/mL pada buffer pH 2-10 selama 2 jam kemudian dilihat aktivitas hemaglutinasi.

**Tabel 4.** Stabilitas Jakalin Terhadap Suhu

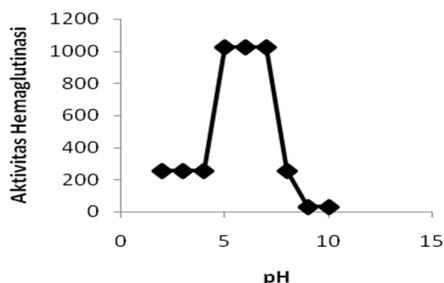
Suhu	Titer HA	Konsentrasi terendah yang menyebabkan aglutinasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Penurunan Aktivitas (%)
4°C	512	1,95	
20°C	512	1,95	-
30°C	512	1,95	-
40°C	128	7,81	75
50°C	64	15,62	87,50
60°C	32	31,25	93,75
70°C	8	125	98,40



**Gambar 8.** Pengujian stabilitas lektin terhadap suhu.

**Tabel 5.** Stabilitas Jakalin Terhadap pH

pH	Titer HA	Konsentrasi terendah yang menyebabkan aglutinasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Penurunan Aktivitas (%)
2	256	3,91	75
3	256	3,91	75
4	256	3,91	75
5	1024	0,98	-
6	1024	0,98	-
7	1024	0,98	-
8	256	3,91	75
9	32	31,25	96,9
10	32	31,25	96,9

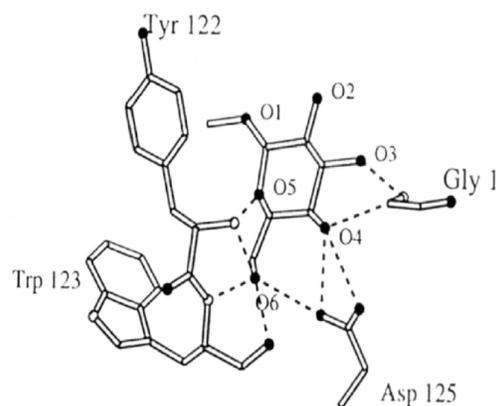
**Gambar 9.** Pengujian stabilitas lektin terhadap pH.

Kemampuan selektifitas jakalin dalam berikatan dengan gula diuji menggunakan gula dengan pengenceran berseri. Tes dilakukan dengan beberapa jenis gula diantaranya D-galaktosa, D-manosa, D-glukosa, fruktosa, laktosa, arabinosa, maltosa, dan manitol. Konsentrasi gula terendah yang menghambat aktivitas hemaglutinasi dicatat setelah 2 jam inkubasi di suhu kamar. Dari hasil pengamatan terlihat bahwa kemampuan hemaglutinasi jakalin dihambat oleh keberadaan D-galaktosa dengan konsentrasi 6,25 mM.

Keberadaan galaktosa yang telah bergabung dengan gula yang lain dalam bentuk disakarida tidak mampu menghambat aktivitas dari jakalin dalam menghemaglutinasi eritrosit. Keberadaan gugus hidroksi pada D-galaktosa diperlukan untuk pembentukan ikatan hidrogen dengan jakalin, hidroksi yang terikat pada atom karbon nomor tiga dan empat pada D-galaktosa berikatan dengan glisin yang berada pada posisi N-terminal dari jakalin, rantai asparagin pada posisi 125 berinteraksi dengan gugus hidroksi pada posisi atom karbon nomor 4 dan nomor 6, ikatan hidrogen juga dibentuk oleh tirosin 122 dan triptofan 123.

**Tabel 6.** Kapasitas Inhibisi Berbagai Jenis Gula Terhadap Aktivitas Jakalin

Jenis Gula	Konsentrasi gula terendah yang menghambat aglutinasi (mM)
D-galaktosa	6,25
D-manosa	> 200
D-glukosa	> 200
Fruktosa	> 200
Laktosa	> 200
Arabinosa	> 200
Maltosa	> 200
Manitol	> 200

**Gambar 10.** Situs penggabungan D-galaktosa pada jakalin. Garis putus-putus menggambarkan ikatan hidrogen, (Sharon 2007).

Penentuan kadar protein total dilakukan menggunakan *Bio-Rad® Protein Assay* yang memiliki prinsip kerja serupa dengan metode Bradford (1967). Pewarna Coomassie Brilliant Blue G-250 dalam metanol akan mengalami perubahan warna dari merah menjadi biru ketika berikatan dengan protein dalam sampel. Intensitas warna yang dihasilkan kemudian ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-visibel pada panjang gelombang maksimum 595 nm. Kadar protein total dalam sampel ditentukan menggunakan perbandingan terhadap kurva standar protein perbandingan, yaitu *bovine serum albumin* dengan berbagai konsentrasi.

Berdasarkan kurva kalibrasi BSA diperoleh persamaan regresi  $y = 0,001326 x + 0,002824$  dengan  $r^2$  adalah 0,9987. Persamaan tersebut kemudian digunakan untuk menghitung kadar protein dalam sampel, kadar protein yang diperoleh dari hasil liofilisasi diperoleh sebesar 36,43%.

Kandungan gula total ditentukan dengan metode fenol-asam sulfat, prinsip penentuannya berdasarkan pengukuran absorbansi pada 490 nm dari kompleks aromatik yang terbentuk antara fenol dan karbohidrat, metode ini dapat dilakukan untuk gula pereduksi maupun gula non pereduksi. Kadar gula ditentukan dengan menggunakan perbandingan terhadap kurva standar gula pembanding, yaitu glukosa dengan berbagai konsentrasi.

Berdasarkan kurva kalibrasi glukosa diperoleh persamaan regresi  $y = 0,0012x - 0,00198$  dengan  $r^2$  adalah 0,998. Persamaan tersebut kemudian digunakan untuk menghitung kadar gula dalam sampel, kadar gula yang diperoleh dari hasil liofilisasi diperoleh sebesar 3,3 %.

## Kesimpulan

Diperoleh kondisi optimum isolasi jakalin dari biji nangka (*Artocarpus heterophyllus*) menggunakan pengendapan dengan amonium sulfat dan elusi dengan D-galaktosa 0,2 M. Jakalin yang diperoleh pada percobaan berkisar pada 0,3% b/b terhadap serbuk biji nangka kering. Pada elektroforesis SDS-PAGE diperoleh dua pita dengan bobot molekul rantai  $\alpha$  14,1 kDa dan rantai  $\alpha'$  15,5 kDa. Kemampuan hemaglutinasi jakalin dipengaruhi oleh pH dan suhu, kemampuan hemaglutinasi jakalin dihambat oleh D-galaktosa pada konsentrasi 6,25 mM dan tidak dihambat oleh D-manosa, D-glukosa, fruktosa, laktosa, arabinosa, maltosa, dan manitol. Jakalin yang diisolasi memiliki perkiraan kandungan protein 36,43%, dan gula sebesar 3,3%.

## Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih ditujukan sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah membantu dari awal penelitian hingga dibuatnya artikel ini, terutama kepada Prof. Dr. Tutus Gusdinar Kartawinata, Dr. Tri Suciati, Dr. Catur Riani selaku pembimbing atas bimbingan dan ilmu yang diberikan penelitian berlangsung hingga saat ini serta seluruh staf akademik dan staf karyawan atas arahan dan bantuan yang diberikan selama penelitian dan penulisan karya tulis ini.

## Daftar Pustaka

Bradford MM, 1976, A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Chatterjee BP, Uhlenbruck G, 1982, Occurrence of an Antihuman Friedenreich Like Lectin in Jack Fruit Seeds Reacting With A Receptor in Anti EGG Glycoprotein, *Exp* 38: 1225-1226.

De Simone SG, Santos R, Araujo MF, Pinho RT, 1994, Preparative Isolation of The Lectin Jacalin by Anion Exchange High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. A* 688: 357-362.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F, 1956, Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem.* 28: 350-356.

Favero J, Corbeau P, Nicolas M, Benkirane M, Trave G, Dixon JFP, Aucouturier P, Rasheed S, Liautard JP, Devaux C, Dornand J, 1993, Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Infection by The Lectin Jacalin and by a Derived Peptide Showing a Sequence Similarity With GP120, *Eur. J. Immunol.* 23: 179.

Kabir S, 1995, The Isolation and Characterization of Jacalin (*Artocarpus heterophyllus* (Jackfruit) Lectin) Based on Its Charge Properties, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27: 147-156.

Kabir S, 1998, Jacalin: a Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) Seed-Derived Lectin of Versatile Applications in Immunobiological Research, *J. Immunol.* 212: 193-211.

Lim SB, Chua CT, Hashim OH, 1997, Isolation of a Mannose-binding and IgE- and IgM-reactive Lectin from The Seeds of *Artocarpus integerifolia*, *J. Immunol.* 209: 177-186.

Mahanta SK, Sastry MV, Surolia A, 1990, Topography of The Combining Region of a Thomsen-Friedenreich-antigen-specific Lectin Jacalin (*Artocarpus integerifolia* agglutinin): A Thermodynamic and Circular-dichroism Spectroscopic study, *J. Biochem.* 265(3): 831-40.

Roque-Barreira MC, Campos-Neto A, 1985, Jacalin: An IgA Binding Lectin, *J. Immunol.* 134, 1740.

Ruffet E, Paquet N, Frutiger S, Hughes GJ, Jaton JC, 1992, Structural and Electron-microscopic Studies of Jacalin from Jackfruit (*Artocarpus integerifolia*) Show that this Lectin is A 65 kDa Tetramer, *J. Biochem.* 286 (Pt 1): 131-4.

Sharon N, Lis H, 2007, *Lectins*, 2<sup>nd</sup> ed. AA Dordrecht, Netherlands, 206.

Vijayakumar T, Augustine J, Mathew L, Aleykutty MA, Nair MMB, Remani P, Nair MK, 1992, Tissue Binding Pattern of Plant Lectins in Benign and Malignant Lesions of Thyroid, *J. Exp. Pathol.* 6: 11.

Widhyastuti N, 2007, Purifikasi dan karakterisasi Xilanase ekstraseluler *Streptomyces* sp. Skk1-8 Asal Sukabumi, tesis magister, Fakultas MIPA-IPB, Bogor.