

Monograf

**ISOLASI DAN PURIFIKASI
PROTEIN IKAT FOLAT DARI
AIR SUSU IBU**

dr. Subandrate, M.Biomed
Dr. dr. Mgs. M. Irsan Saleh, M.Biomed
Dr. drg. Dwirini Retno Gunarti, MS
Prof. Hermansyah, S.Si, M.Si, PhD



Isolasi dan Purifikasi Protein Ikat Folat dari Air Susu Ibu

dr. Subandrate, M.Biomed

Bagian Biokimia dan Kimia Medik/
Program Sains Biomedik Program Doktor
Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya

Dr. dr. Mgs. M. Irsan Saleh, M.Biomed

Bagian Farmakologi
Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya

Dr. drg. Dwirini Retno Gunarti, MS

Bagian Biokimia dan Biologi Molekuler
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Prof. Hermansyah, S.Si, M.Si, PhD

Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Sriwijaya

Editor :

dr. Subandrate, M.Biomed



UU No 28 tahun 2014 tentang Hak Cipta

Fungsi dan sifat hak cipta Pasal 4

Hak Cipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3 huruf a merupakan hak eksklusif yang terdiri atas hak moral dan hak ekonomi.

Pembatasan Pelindungan Pasal 26

Ketentuan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 23, Pasal 24, dan Pasal 25 tidak berlaku terhadap:

- i. penggunaan kutipan singkat Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait untuk pelaporan peristiwa aktual yang ditujukan hanya untuk keperluan penyediaan informasi aktual;
- ii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk kepentingan penelitian ilmu pengetahuan;
- iii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk keperluan pengajaran, kecuali pertunjukan dan Fonogram yang telah dilakukan Pengumuman sebagai bahan ajar; dan
- iv. penggunaan untuk kepentingan pendidikan dan pengembangan ilmu pengetahuan yang memungkinkan suatu Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait dapat digunakan tanpa izin Pelaku Pertunjukan, Produser Fonogram, atau Lembaga Penyiaran.

Sanksi Pelanggaran Pasal 113

1. Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).
2. Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

ISOLASI DAN PURIFIKASI PROTEIN IKAT FOLAT DARI AIR SUSU IBU

dr. Subandrate, M.Biomed
Dr. dr. Mgs. M. Irsan Saleh, M.Biomed
Dr. drg. Dwirini Retno Gunarti, MS
Prof. Hermansyah, S.Si, M.Si, PhD

Desain Cover :
Subandrate

Sumber :
<https://www.rcsb.org/3d-sequence/4LRH?assemblyId=1>

Tata Letak :
Subandrate

Editor :
dr. Subandrate, M.Biomed

Ukuran :
x + 66, Uk: 15.5x23 cm

ISBN :
978-623-399-101-8

Cetakan Pertama:
November 2022

Hak Cipta 2022, Pada Penulis

Isi diluar tanggung jawab percetakan

Copyright © 2022 by Unsri Press
All Right Reserved

Hak cipta dilindungi undang-undang
Dilarang keras menerjemahkan, memfotokopi, atau
memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini
tanpa izin tertulis dari Penerbit.

Unsri Press

Anggota APPIT (No. 005.140.1.6.2021)
Anggota IKAPI (No. 001/SMS/96)
UPI. Penerbitan dan Percetakan Universitas Sriwijaya
Jalan Sriwijaya Negara, Bukit Besar, Palembang 30139 Telp 0711-360969
Email: unsri.press@yahoo.com, penerbitunsri@gmail.com
Website: www.unsripress.unsri.ac.id

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamin, puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah Swt. Selawat dan salam semoga selalu tercurah kepada nabi Muhammad saw. Atas berkah dan rahmat Allah Swt, buku monograf dengan judul "Isolasi dan Purifikasi Protein Ikat Folat dari ASI" dapat disusun.

Sesuai dengan judulnya, buku ini membahas tentang air susu ibu (ASI) dan protein ikat folat (PIF). Dari buku ini dapat diketahui bahwa ASI merupakan cairan yang disekresikan oleh kelenjar payudara ibu. ASI adalah makanan terbaik bagi bayi karena mengandung banyak nutrisi. Salah satu kandungan ASI yang bermanfaat bagi bayi adalah protein ikat folat (PIF). Keberadaan PIF dalam ASI tidak hanya menjamin ketersediaan asam folat dalam ASI tetapi juga membantu proses penyerapan dan pengangkutan asam folat.

Buku ini juga memberikan informasi bahwa protein ikat folat tidak hanya terdapat dalam ASI tetapi juga terdapat dalam susu sapi, susu kambing, atau dalam daun tumbuhan. Protein ikat folat dari sumber-sumber tersebut memiliki karakteristik yang tidak sama persis. Keberadaan PIF dari susu sapi telah dipelajari secara luas. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengeksplorasi karakteristik PIF melalui isolasi dan purifikasi. Banyak teknik dan cara yang telah dilakukan untuk mengisolasi dan memurnikan PIF dari berbagai sumber tersebut.

Isolasi dan purifikasi protein merupakan rangkaian proses yang panjang. Pilihan-pilihan teknik yang dipakai berpengaruh terhadap hasil yang diperoleh. Oleh karena itu, perlu dipilih cara dan teknik yang tepat sehingga diperoleh hasil yang baik. Buku ini tidak hanya menyajikan teknik dan cara yang dapat dipilih untuk isolasi protein ikat folat dari ASI tetapi juga membahas secara umum teknik isolasi dan purifikasi protein. Teknik isolasi protein terutama *salting out* dengan garam amonium sulfat dibahas secara rinci dalam buku ini. Selain itu,

teknik purifikasi protein dengan kromatografi seperti kromatografi pertukaran ion dan kromatografi afinitas dibahas secara luas dalam buku ini.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dan memberikan inspirasi dalam penyusunan buku ini terutama kepada Prof. dr. Mohamad Sadikin, D.Sc, Guru Besar Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya. Akhir kata, penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari para pembaca untuk kesempurnaan penulisan buku ini di masa yang akan datang. Penulis berharap buku ini memberikan manfaat bagi pembaca khususnya di bidang protein dan umumnya di bidang biokimia.

Palembang, November 2022
Tim Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI.....	ix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II AIR SUSU IBU	5
A. Pengertian ASI	5
B. Produksi ASI.....	5
C. Kandungan ASI	7
D. Manfaat Pemberian ASI	13
BAB III PROTEIN IKAT FOLAT	17
A. Sejarah Protein Ikat Folat	18
B. Penentuan Kadar FBP.....	20
C. Berat Molekul FBP	22
D. Struktur FBP.....	23
E. Peran FBP.....	26
BAB IV ISOLASI PROTEIN IKAT FOLAT	31
A. <i>Salting Out</i>	32
B. Dalisis	36
BAB V PURIFIKASI PROTEIN IKAT FOLAT	39
A. Kromatografi	39
B. Elektroforesis	47
BAB VI PENUTUP	54
DAFTAR PUSTAKA.....	58
BIODATA PENULIS	66

BAB I

PENDAHULUAN

Air susu ibu (ASI) merupakan cairan yang disekresikan oleh kelenjar payudara ibu menyusui. ASI dikatakan sebagai sumber nutrisi terbaik bagi bayi. ASI adalah cairan biologis yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan bayi yang optimal. ASI manusia mengandung karbohidrat, protein, lemak, vitamin, mineral, enzim pencernaan dan hormon. Selain nutrisi ini, ASI kaya akan sel imun, termasuk makrofag, *stem cell*, antibodi dan banyak molekul bioaktif lainnya. Beberapa molekul bioaktif ini berasal dari oligosakarida dan lipid, sementara yang lain diturunkan dari protein.[1–3]

Protein utama dalam ASI adalah kasein dan *whey*. Kasein menggumpal dengan adanya asam lambung, sementara *whey* tetap sebagai cairan dan lebih mudah dicerna. Rasio *whey*/kasein dalam ASI berfluktuasi antara 80/20 sampai 50/50. Selain *whey* dan kasein, dalam ASI terdapat banyak protein lain yang memiliki peran sebagai molekul bioaktif. Salah satu protein tersebut yang penting bagi bayi adalah protein ikat folat.[1,4,5]

Protein ikat folat (*folate binding protein*, FBP) merupakan salah satu protein yang terdapat dalam susu, baik susu sapi, susu kambing maupun ASI (air susu ibu). Selain dalam susu, FBP juga terdapat dalam plasma, membran sel intestinal, plasenta, cairan serebrospinal dan sel kanker. FBP juga terdapat di dalam daun tumbuh-tumbuhan. Di dalam susu FBP terdapat dalam bentuk berikatan dengan asam folat atau dalam bentuk bebas sebagai partikel. Di daun *Arabidopsis*, FBP terdapat dalam bentuk terikat dengan asam folat. FBP pertama kali ditemukan dalam susu sapi pada tahun 1967 oleh Ghitis. Pada tahun 1969, FBP dapat diisolasi

dari susu sapi dan ASI. Selain itu, FBP dapat diisolasi dari berbagai sel seperti sel intestinum, sel plasenta dan sel kanker. Kadar FBP di dalam susu sekitar 160-250 nmol/L.[6–10]

Protein ikat folat merupakan suatu keluarga protein yang terdiri dari *folate receptor* atau FBP dan *folate reduced carrier* (FRC). Kedua jenis protein tersebut sebagian besar berperan pada membran sel sebagai transportasi folat. Pada membran sel intestinal, RF/RFC berperan sebagai reseptor untuk penyerapan asam folat. Sedangkan dalam sistem transportasi plasma, FBP bersama dengan albumin berperan sebagai pembawa asam folat ke seluruh sel. Keberadaan FBP/FR atau FRC menjamin ketersediaan asam folat dalam tubuh.[8,11–13]

FBP merupakan suatu glikoprotein. Sekitar 20% FBP mengalami glikolasi. Glikolasi pada FBP berperan melindungi FBP dari proses pencernaan proteolitik dalam lambung. Pada kambing yang baru lahir, FBP terbukti dapat menoleransi pH lambung yang rendah dan dapat menghindari proteolisis. FBP ASI mungkin sama stabilnya pada bayi manusia. Percobaan menggunakan sel usus tikus telah menunjukkan bahwa penyerapan folat lebih tinggi sebagai kompleks dengan FBP daripada dalam bentuk bebas. Hal tersebut menunjukkan bahwa FBP dapat memfasilitasi penyerapan folat. FBP juga dapat mengatur pelepasan dan penyerapan folat di usus halus untuk memungkinkan pelepasan dan penyerapan folat secara bertahap yang dapat meningkatkan pemanfaatan jaringan.[8,9,14–17]

FBP terutama yang berasal dari susu sapi telah dipelajari secara ekstensif dengan baik. FBP memiliki kesamaan urutan yang signifikan dengan protein pengikatan riboflavin ayam (RfBP). Upaya untuk melaporkan konstanta kesetimbangan untuk interaksi antara folat dan FBP terbukti tidak meyakinkan selama bertahun-tahun. Perkembangan teknik biosensor telah memungkinkan untuk mempelajari kinetika pengikat dari berbagai bentuk folat. Protein ini memiliki berat molekul dengan rentang 25.000-35.000 Da, tersusun atas 222-255 asam amino dan memiliki sekitar delapan ikatan

disulfida. Protein ini berinteraksi dengan asam folat dalam rentang pH fisiologi.[6,8,15,16]

Penemuan dan peran FBP sebagai pengikat folat mendorong pemanfaatannya dalam analisis folat serum. Saat ini pengukuran asam folat serum dengan metode mikrobiologi masih menjadi baku emas. Sebuah uji pengikatan radioprotein dikembangkan dan menggantikan uji mikrobiologi atau folat dalam sampel klinis dari pertengahan tahun 1970-an. Aplikasi analisis lain muncul pada tahun 1980-an, ketika FBP digunakan dalam kromatografi afinitas untuk menentukan konsentrasi dan pemurnian asam folat dari sampel biologis.[8,15,16]

Struktur, peran dan pemanfaatan FBP dari susu sapi telah dijelaskan secara luas. Baru-baru ini isolasi dan purifikasi protein ikat folat dari daun tumbuhan juga telah dilakukan. Pada manusia isolasi dan purifikasi FBP lebih banyak berasal dari serum atau jaringan. Belum ada pembahasan terbaru dan terperinci mengenai FBP dari ASI. Oleh karena itu, perlu dikaji atau ditulis ulang mengenai protein ikat folat dari ASI. Tujuan penulisan pustaka ini adalah untuk mengetahui struktur, peran, dan kemungkinan teknik yang dapat digunakan untuk isolasi dan purifikasi FBP dari ASI. Pustaka ini juga bertujuan merangkum dan membandingkan beberapa teknik isolasi dan purifikasi protein ikat folat dari berbagai sumber baik manusia, hewan atau tumbuhan.

BAB II

AIR SUSU IBU

A. Pengertian ASI

Air susu ibu (ASI) merupakan cairan yang dihasilkan oleh kelenjar payudara ibu menyusui yang mengandung nutrisi dan faktor bioaktif yang dibutuhkan oleh bayi. ASI biasanya menyediakan semua nutrisi yang dibutuhkan bayi manusia selama 6 bulan pertama kehidupan. Selain makronutrisi dan mikronutrisi esensial, ASI mengandung banyak molekul bioaktif khas yang melindungi bayi baru lahir dari patogen dan peradangan, dan berkontribusi pada pematangan sistem kekebalan, perkembangan organ, dan kolonisasi mikroba yang sehat.[3,18]

B. Produksi ASI

Kelenjar payudara adalah organ kelenjar unik yang mengalami perubahan anatomi dan fisiologi selama fase kehidupan manusia. Perubahan tersebut terjadi sejak fase pubertas sampai fase laktasi dan mempengaruhi produksi ASI. Produksi dan sekresi ASI diregulasi oleh sistem hormonal yang kompleks.[19,20]

Selama masa pubertas, hormon estrogen memulai perkembangan kelenjar payudara untuk mendukung laktasi. Pada saat ovulasi, sel epitel alveolus kelenjar payudara bertambah besar dan memulai sekresi komponen ASI sebagai respons terhadap peningkatan estrogen. Pada awal kehamilan, peningkatan konsentrasi estrogen menyebabkan penurunan jaringan adiposa pada payudara. Peningkatan estrogen juga menyebabkan proliferasi dan elongasi duktus sel kelenjar payudara. Unit lobular-duktal ini

menggantikan cukup banyak jaringan adiposa selama perkembangan kelenjar sel payudara pada kehamilan. Peningkatan konsentrasi progesteron menginduksi percabangan lobular dan pembesaran pada payudara. Proses ini disebut diferensiasi sekretori dan berlanjut selama kehamilan.[19,20]

Kadar estrogen juga memengaruhi ukuran dan aktivitas kelenjar hipofisis anterior di hipotalamus. Stimulasi estrogen menyebabkan peningkatan jumlah dan ukuran sel laktotrof di kelenjar hipofisis anterior. Stimulasi ini menyebabkan sel laktotrof menghasilkan dan sekresi prolaktin. Prolaktin adalah hormon yang menginduksi laktasi dalam sel alveolar lobulus di kelenjar payudara ibu. Stimulasi prolaktin menyebabkan sel kelenjar payudara sudah cukup memproduksi ASI pada awal trimester ketiga kehamilan. Pengeluaran ASI secara tiba-tiba dapat terjadi ketika sel-sel mioepitel merespons oksitosin dan menyebabkan kontraksi sel alveolus. Namun, konsentrasi estrogen dan progesteron yang masih tinggi pada masa kehamilan menghambat produksi ASI.[19,20]

Pada trimester kedua kehamilan, sudah terjadi akumulasi kolostrum di kelenjar payudara ibu. Kolostrum merupakan ASI yang dilepaskan selama beberapa hari pertama setelah melahirkan. Ciri utama kolostrum adalah banyak antibodi yang dihasilkan oleh limfosit dibandingkan dengan jumlah lipid yang diproduksi oleh sel epitel. Bersamaan dengan pembesaran kelenjar payudara, sel limfosit, sel eosinofil, dan sel plasma berkumpul di dalam jaringan ikat jaringan yang berkontribusi pada pelepasan senyawa antibakteri ke dalam alveolus. Kolostrum terus mengisi duktus kelenjar payudara ibu sampai trimester ketiga kehamilan. Bila produksi sel imun dan plasma berhenti menumpuk di payudara, maka produksi kolostrum menurun, dan kandungan lipid dalam ASI meningkat.[19,20]

Setelah melahirkan, perubahan hormonal memulai sekresi susu dari sel epitel kelenjar susu. Tahap ini disebut aktivasi sekresi. Pada tahap ini, terjadi penurunan progesteron yang cepat dan terjadi peningkatan prolaktin dan oksitosin. Prolaktin mendorong produksi

ASI, dan oksitosin memicu *let-down reflex* yang memungkinkan bayi untuk menghisap ASI dari duktus alveolus kelenjar payudara. *Let-down reflex* adalah refleks neuroendokrin yang menyebabkan pelepasan ASI ketika kompleks puting-areola distimulasi. Hisapan bayi pada puting payudara menyebabkan rangsangan pada saraf interkostal keempat sehingga menstimulasi hipotalamus untuk merangsang pelepasan oksitosin. Oksitosin merupakan hormon yang dilepaskan oleh kelenjar hipofisis posterior. Oksitosin merangsang sel mioepitel sekitar alveolus berkontraksi dan memeras ASI keluar, mendorongnya ke duktus alveolus dan keluar dari puting susu.[19,20]

C. Kandungan ASI

Komposisi ASI secara keseluruhan berbeda di antara ibu menyusui baik kandungan makronutrien, mikronutrien ataupun faktor bioaktif. Variasi komposisi multidimensi ini diyakini sebagai adaptasi terhadap kebutuhan bayi yang terus berubah, wilayah geografis dan makanan ibu. Perbedaan komposisi ASI antara ibu menyusui dan populasi telah dilaporkan sebagai respons terhadap keberagaman budaya seperti diet dan faktor gaya hidup lainnya, faktor lingkungan, seperti kandungan mineral tanah yang kemudian tercermin dalam kepadatan mineral dari makanan yang tumbuh di sana, dan perbedaan genetik manusia.[3,18,21,22]

Tabel 1. Komposisi ASI pada Berbagai Etnik

Kandungan[23]	Kepulauan Pasifik	Eropa	Asia	Nilai p
Air (%)	87,4 ± 0,4	87,4 ± 0,2	86,6 ± 0,4	0,262
Protein (%)	1,16 ± 0,07	1,20 ± 0,04	1,13 ± 0,12	0,739
Lemak (%)	3,72 ± 0,42	3,72 ± 0,16	4,48 ± 0,45	0,296
Karbohidrat (%)	7,55 ± 0,06	7,53 ± 0,05	7,61 ± 0,16	0,835

Secara umum, kandungan makronutrien dalam ASI adalah 87% air, 1% protein (0,9-1,2g/dL), 4% lemak (3,2-3,6 g/dL), dan 7% karbohidrat (6,7-7,8 g/dL).[3,4,18] Komposisi kolostrum lebih rendah lemak dan kalori, tetapi lebih tinggi oligosakarida dan protein. Sebaliknya, Komposisi ASI matur lebih tinggi lemak dan kalori, tetapi lebih rendah oligosakarida dan protein.[24] Kandungan makromolekul dalam ASI pada beberapa etnik tampak tidak bervariasi jauh karena dipengaruhi faktor nutrisi yang sama. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Butt *et al* tahun 2018 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan($p>0,05$) komposisi ASI pada etnis Asia, Kepulauan Pasifik, New Zealand dan Eropa (Tabel 1).[23] Setiap 1 dL ASI diperkirakan menyediakan energi sebesar 65-70 kkal. Jumlah kalori dalam ASI berkorelasi dengan kandungan lemak ASI.[3,4,18]

Tabel 2. Jenis dan Peran Protein dalam ASI

Jenis Protein[5]	Peran
κ -Kasein	Sebagai ion carrier, menghambat adhesi mikroba ke membran mukosa
α -Laktalbumin	Membawa ion Ca^{2+} , bagian enzim laktosa sintase
Laktoferin	Antiinfeksi, pembawa zat besi
Lisozim	Antiinfeksi
<i>Folate binding Protein</i>	Membawa asam folat dan utilisasi folat
<i>Bile salt-dependent lipase</i>	Produksi asam lemak bebas dengan aktivitas antiprotozoa dan antibakteri
Glutation peroksidase	Antioksidan, Antiinflamasi (mencegah oksidasi lipid)
Asetilhidrolase	Melindungi dari enterokolitis nekrotikans
Sitokin	Memodulasi fungsi dan pematangan sistem kekebalan tubuh
SIgA, IgM, IgD, IgG, IgE	Imunoproteksi

Kandungan protein dalam ASI cukup tinggi dan komposisinya berbeda dengan protein dalam susu sapi. Protein utama dalam ASI adalah *whey* dan kasein. Selain itu, ada protein ikat folat, laktoferin, IgA, dan lisozim. Kadar FBP dalam ASI sekitar 180-250 nmol/L. Tabel 2 memperlihatkan jenis protein di dalam ASI. ASI mengandung nukleotida yang lebih banyak dan lebih baik daripada susu sapi. Kandungan lemak dalam ASI cukup untuk setengah kalori untuk bayi. Lemak utama dalam ASI adalah trigliserida (98%). Asam lemak dalam ASI terutama asam palmitat, asam linoleat, asam oleat, asam alfa-linolenat, asam dokosaheksaenoat (DHA), dan asam arakidonat (ARA). Lemak ASI terutama ditemukan di *hindmilk*. Karbohidrat utama yang terkandung dalam ASI adalah laktosa. Komposisi makronutrien dalam ASI berbeda antara ibu yang melahirkan bayi prematur dan bayi cukup bulan, ASI pada ibu yang melahirkan bayi prematur cenderung lebih tinggi protein dan lemaknya. Konsentrasi makronutrien ASI juga dikaitkan dengan rasio berat badan ibu terhadap tinggi badan atau indeks massa tubuh, asupan protein, paritas, kembalinya menstruasi, dan frekuensi menyusui.[3,4,18]

ASI memberikan standar normatif untuk nutrisi bayi. Namun demikian, banyak vitamin yang bervariasi dalam ASI tergantung pada makanan ibu dan simpanan tubuh termasuk vitamin A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, D, E, dan K. Namun, pola makan ibu tidak selalu optimal sehingga masih dianjurkan konsumsi multivitamin selama menyusui. Terlepas dari pola makan ibu, vitamin A, B, C, dan E dalam ASI memiliki kadar yang cukup untuk memenuhi kebutuhan bayi. Kadar rata-rata vitamin A, vitamin B₁, vitamin B₂, vitamin B₃, vitamin B₆, vitamin B₉, vitamin B₁₂, vitamin C, vitamin E, dan vitamin K dalam ASI secara berturut-turut adalah 485 ng/ml, 210 ng/ml, 350 ng/ml, 1.800 ng/ml, 130 ng/ml, 141,4 ng/ml, 0,42 ng/ml, 60.000 ng/ml, 4.900 ng/ml dan 2,5 ng/ml.[3,24–26] ASI memiliki kadar vitamin D yang rendah, terutama pada ibu yang kurang mendapatkan paparan sinar matahari. Keadaan ini hampir terjadi pada semua populasi ibu menyusui di

dunia. Kadar vitamin D dalam ASI kurang dari 1 mg/L (40 IU/L). Rekomendasi pediatrik saat ini menargetkan suplementasi vitamin D pascanatal untuk bayi yang disusui. Selain vitamin D, kadar vitamin K dalam ASI juga rendah. Oleh karena itu, *American Academy of Pediatrics* (AAP) merekomendasikan suntikan vitamin K untuk menghindari perdarahan pada bayi baru lahir.[3,4,18,21,24]

Mineral utama yang ditemukan dalam ASI adalah kalsium. Kadar kalsium dalam ASI lebih rendah dari pada susu sapi tetapi penyerapannya lebih besar. Mineral lain yang ditemukan dalam ASI adalah zat besi, seng, dan selenium. Mineral dalam ASI memiliki kualitas yang lebih baik dan lebih mudah diserap daripada mineral dalam susu sapi. Kandungan mineral dalam ASI lebih rendah tetapi memiliki bioavailabilitasnya yang tinggi sehingga bayi tidak perlu suplemen selama menyusui penuh.[4,21,24]

Tabel 3. Kandungan Mineral dalam ASI

Mineral[24]	Kolostrum	ASI Matur
Fosfor	120–160 mg/L	120–140 mg/L
Iron	0,5–1,0 mg/L	0,3–0,7 mg/L
Kalium	600–700 mg/L	400–550 mg/L
Kalsium	250 mg/L	200–250 mg/L
Klor	600–800 mg/L	400–450 mg/L
Magnesium	30–35 mg/L	30–35 mg/L
Mangan	5–12 µg/L	3–4 µg/L
Natrium	300–400 mg/L	150–250 mg/L
Selenium	25–32 µg/L	10–25 µg/L
Tembaga	0,5–0,8 µg/L	0,1–0,3 µg/L
Yodium	40–50 µg/L	140–150 µg/L
Zink	5–12 µg/L	1–3 µg/L

Tabel 4. Komponen Bioaktif dalam ASI

Komponen [3,24]	Fungsi
Sel	
Makrofag	Perlindungan terhadap infeksi, pengaktifan sel-T
<i>Stem cell</i>	Regenerasi dan perbaikan
Imunoglobulin	
IgA/sIgA, IgG, IgM	Inhibisi patogen, antimikroba, aktivasi komplemen
Sitokin	
IL-6, IL-7, IL-8, IL-10	Stimulasi respon fase akut, pro-inflamasi, induksi produksi antibodi
IFN γ	Pro-inflamasi, merangsang respon Th1
TGF β	Anti-inflamasi, stimulasi sel T saklar fenotipe
TNF α	Merangsang aktivasi imun inflamasi
Kemokin	
G-CSF	Faktor trofik di usus
MIF	Meningkatkan aktivitas antipatogen makrofag
Inhibitor sitokin	
TNFR1 dan II	Penghambatan TNF α , anti-inflamasi
Faktor pertumbuhan	
EGF	Stimulasi proliferasi sel dan pematangan
HB-EGF	Pelindung terhadap kerusakan akibat hipoksia/iskemik
VEGF	Promosi angiogenesis dan perbaikan jaringan
NGF	Promosi pertumbuhan dan pematangan neuron
IGF	Stimulasi pertumbuhan dan perkembangan
Eritropoietin	Eritropoiesis, perkembangan usus
MikroRNA	Diferensiasi, proliferasi dan metabolisme
Hormon	
Kalsitonin	Perkembangan neuron enterik
Somatostatin	Regulasi pertumbuhan epitel lambung

Komponen [3,24]	Fungsi
Antimikroba	
Laktoferin	Mengikat besi, antibakteri, antioksidan
Laktaderin/MFG E8	Antivirus, meningkatkan fagositosis sel apoptosis
Hormon	
Adiponektin	Penurunan IMT dan berat badan bayi
Leptin, Ghrelin	Regulasi energi dan IMT bayi, pengaturan nafsu makan
Karbohidrat	
HMOS	Prebiotik, mengurangi peradangan
Gangliosida	Perkembangan otak, antiinfeksi
Glikosaminoglikan	Antiinfeksi
Musin	
MUC1, MUC4	Menghalangi infeksi oleh virus dan bakteri

Secara khusus, kandungan zat besi dalam ASI matur adalah 0,3-0,7 mg/L, tetapi bioavailabilitasnya adalah 20%-50%. Dengan bioavailabilitas tersebut, zat besi dalam ASI lebih efektif daripada dalam susu formula (bioavailabilitas 4%-7%). Oleh karena itu, pada bayi yang mendapat ASI eksklusif, umumnya tidak diperlukan untuk tambahan zat besi sebelum usia 6 bulan. Pemberian tambahan zat besi dianjurkan dilakukan secara bertahap melalui makanan padat yang diperkaya zat besi. Kandungan mineral yang terdapat di dalam ASI tampak pada tabel 3.[3,4,18,21,24]

Selain makronutrien dan mikronutrien, ASI mengandung berbagai faktor bioaktif seperti sel, antibodi, sitokin, faktor pertumbuhan, oligosakarida, dan hormone. Tabel 4 memperlihatkan jenis dan peran komponen bioaktif dalam ASI. Komponen bioaktif dalam ASI berasal dari berbagai sumber. Sebagian faktor bioaktif diproduksi dan disekresikan oleh sel epitel, beberapa diproduksi oleh sel-sel yang dibawa dalam susu, dan sebagian yang lain diambil dari serum ibu dan dibawa melintasi epitel susu melalui transportasi yang

diperantarai reseptor. Faktor bioaktif adalah elemen yang memiliki efek pada proses biologis dan berdampak pada fungsi atau kondisi tubuh dan kesehatan bayi.[3,4]

D. Manfaat Pemberian ASI

Manfaat menyusui bagi kesehatan dan kesejahteraan bayi telah diketahui dengan baik dan mencakup pencegahan infeksi, perkembangan saraf yang optimal, dan dapat membatasi perkembangan alergi, obesitas, dan diabetes di kemudian hari. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), Ikatan Dokter Anak Indonesia (IDAI) dan Pemerintah Indonesia secara aktif mendukung dan mempromosikan pemberian ASI dengan rekomendasi kuat bahwa semua bayi harus disusui secara eksklusif selama enam bulan pertama kehidupan. Pemberian ASI dilanjutkan dengan makanan pendamping ASI yang sesuai sampai bayi berumur 2 tahun. Bagi bayi yang tidak diberi ASI, komposisi ASI digunakan sebagai acuan penting dalam pengambilan keputusan kecukupan produk nutrisi pengganti ASI untuk bayi.[3,18,27,28]

Komposisi ASI sesuai dengan kebutuhan bayi baik dalam nutrisi maupun faktor bioaktif untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan bayi yang sehat. Komponen ASI terdiri dari makronutrisi, mikronutrisi, sel, faktor antiinfeksi dan antiinflamasi, faktor pertumbuhan, prebiotik dan faktor bioaktif lainnya. Manfaat beberapa protein dalam ASI terdapat tabel 2. Komposisi ASI bersifat dinamis dan bervariasi selama menyusui, sepanjang hari, dan antara ibu dan populasi. Komposisi ASI berbeda dengan susu formula yang memiliki komposisi yang baku dan dalam rentang yang sempit. Komposisi ASI tersebut berguna untuk mencukupi kebutuhan kalori, tumbuh kembang dan proteksi bagi bayi. Pemberian ASI juga

memberikan manfaat psikologis bagi bayi seperti rasa aman dan percaya diri.[3,18]

Pemberian ASI memiliki manfaat untuk bayi baik dalam jangka pendek maupun jangka panjang. Pemberian ASI juga tidak hanya bermanfaat bagi bayi lahir cukup bulan, tetapi juga penting bagi pertumbuhan dan perkembangan bayi kurang bulan. Selain itu, pemberian ASI memberikan manfaat bagi ibu.[5,21,22]

Manfaat jangka pendek pemberi ASI bagi bayi adalah menurunnya risiko terinfeksi penyakit menular seperti diare, infeksi saluran pernafasan atas (ISPA), dan otitis media. Angkat kematian bayi akibat penyakit menular menurun sampai dengan 88% dengan pemberian ASI eksklusif dibandingkan dengan bayi yang tidak diberi ASI. Menyusui secara eksklusif dikaitkan dengan penurunan risiko kematian pada bayi sebesar 48-78% dibandingkan dengan menyusui parsial dan pra-dominan. Bayi yang tidak diberikan ASI secara eksklusif sampai usia 6 bulan berisiko kematian sebesar 3,5-4,1 kali dibandingkan bayi yang diberikan ASI eksklusif baik pada bayi laki-laki maupun bayi perempuan. Menyusui juga melindungi bayi dari sindrom kematian mendadak. Selain itu, menyusui juga mengurangi risiko maloklusi pada bayi sampai dengan 68%. [5,21,22]

Manfaat jangka panjang pemberi ASI bagi bayi adalah penurunan risiko diabetes melitus tipe 2 sampai dengan 35%. Menyusui yang lebih lama menurunkan risiko obesitas dan berat badan lebih pada bayi sebesar 26%. Ada penelitian yang melaporkan bahwa risiko terjadinya leukemia berkurang sebesar 19% pada bayi yang diberi ASI dibandingkan dengan bayi yang tidak pernah diberi ASI. Pemberian ASI juga berkaitan dengan fungsi kognitif bayi. Kecerdasan pada bayi yang diberi ASI lebih lama telah dilaporkan 3,4 kali lebih tinggi daripada bayi yang tidak pernah diberi ASI atau menyusui lebih pendek.[5,21]

Menyusui juga bermanfaat bagi bayi prematur. Komplikasi *necrotizing enterocolitis*, *retinopathy of prematurity*, *bronchopulmonary dysplasia* dan *late-onset sepsis* pada bayi

prematur menurun dengan menyusui. Pemberian ASI juga meningkatkan toleransi makan dengan pengurangan jumlah hari yang dibutuhkan untuk mencapai pemberian makan enteral penuh. Manfaat jangka panjang pemberian ASI pada bayi prematur juga termasuk penurunan risiko rawat inap ulang karena penyakit menular, terutama infeksi saluran pernafasan dan peningkatan perkembangan otak dan neurokognitif.[21,22]

Menyusui juga memberikan manfaat bagi ibu. Menyusui berperan dalam mengatur jarak kelahiran. Menyusui lebih lama, dan terutama menyusui eksklusif, dikaitkan dengan periode amenore yang lebih lama sehingga menurunkan peluang terjadinya kehamilan. Menyusui juga dikaitkan dengan penurunan risiko kanker payudara pada wanita. Menyusui selama 12 bulan atau lebih selama seumur hidup mengurangi risiko kanker payudara pada wanita sebesar 4,3%-7%. Selain kanker payudara, menyusui lebih lama juga mengurangi risiko kanker ovarium sampai dengan 30%. Menyusui memiliki efek proteksi bagi ibu terhadap diabetes tipe 2. Terdapat hubungan jangka panjang antara menyusui dan adipositas. Menyusui selama 6 bulan atau lebih menurunkan indeks massa tubuh ibu sebesar 1%.[5,21,22]

BAB III

PROTEIN IKAT FOLAT

Protein merupakan heteropolimer asam amino. Asam amino penyusun protein terdiri dari 20 macam yang merupakan hasil ekspresi kode genetik dalam gen. Protein sebagai molekul fungsional memiliki berbagai macam struktur. Struktur protein terbentuk sebagai hasil ikatan antar asam amino penyusun protein. Ikatan utama dalam struktur protein adalah ikatan peptida. Ikatan peptida dalam protein membentuk struktur primer protein. Ikatan lain antar asam amino seperti ikatan hidrogen, ikatan disulfida atau interaksi hidrofobik merupakan pembentuk struktur sekunder atau tersier protein. Struktur protein menentukan bentuk dan fungsi protein baik sebagai protein regulator (globuler) atau sebagai protein penyusun (fibriler).[29]

Salah satu protein yang berperan sebagai protein regulator adalah protein ikat vitamin. Protein ikat vitamin merupakan protein yang berperan untuk mengikat vitamin, baik sebagai transportasi maupun sebagai reseptor. Umumnya vitamin-vitamin bersifat hidrofobik membutuhkan pengangkut khusus seperti *retinol binding protein* dan *vitamin D binding protein*. Namun, ada juga vitamin bersifat hidrofilik yang membutuhkan protein ikat. Vitamin B₁ (tiamin) banyak ditemukan terikat dengan protein ikat tiamin, yang terutama terdapat dalam biji-bijian, kacang-kacangan atau sereal. Vitamin B₉ (asam folat) ditemukan juga terikat dengan protein ikat folat atau *folate binding protein* yang terdapat susu sapi, ASI atau serum manusia[7,30–32]

Protein ikat folat merupakan protein yang berperan penting dalam distribusi asam folat. Protein ini telah diidentifikasi dalam berbagai sel, cairan ekstraseluler, dan jaringan dari sumber mamalia.

Protein ikat folat disandi oleh gen yang terletak pada kromosom 11 lengan pendek pada pita ke 13 (kromosom 11q13). Protein ini diidentifikasi oleh Ghitis pada tahun 1967 sebagai molekul besar yang mengikat asam folat dalam susu.[7,8] FBP atau dikenal sebagai *folate receptor* merupakan suatu famili protein yang terdapat dalam bentuk larut atau partikel di membran sel. Pada manusia ada 3 famili protein yakni reseptor folat alfa (FR- α), reseptor folat beta (FR- β), dan reseptor folat gamma (FR- γ). FBP dalam ASI termasuk dalam alfa.[8,33]

A. Sejarah Protein Ikat Folat

Pada tahun 1967, Ghitis dan Lora mengamati asam folat bebas dalam susu. Asam folat dalam susu berikatan dengan protein ikat. Ikatan tersebut tampak kuat dan spesifik dan tidak dapat dilepaskan dengan pemanasan melalui autoklaf.[34] Pada tahun 1969, Ford *et al* menyatakan bahwa folat dalam susu sapi berikatan kuat dan spesifik dengan protein kecil di dalam *whey*. Ford *et al* mengisolasi protein tersebut dengan konsentrasi ammonium sulfat 40-60% dan memurnikan dengan kromatografi penukar anion (DEAE-cellulose chromatography) dan kromatografi filtrasi gel (Sephadex G150). Ford *et al* berhasil melakukan karakterisasi protein ikat folat dengan mengetahui berat molekul (38 kDa) dan kemampuan mengikat folat (50 μg added folic acid/l).[35]

Salter *et al* berhasil mengisolasi dan memurnikan protein ikat dari susu sapi dengan kromatografi afinitas pada tahun 1972. Salter *et al* menggunakan agarosa terikat asam folat yang diaktifkan dengan karbodiimida.[36] Pada tahun 1973, Waxman & Schreiber melakukan karakterisasi protein ikat folat pada pasien yang mengalami defisiensi folat serum. Mereka mendapatkan protein dengan berat molekul di bawah 100.000 Dalton.[37] Pada tahun 1975, mereka juga melakukan purifikasi dan karakterisasi protein ikat

folat dari manusia dengan kromatografi afinitas. Mereka menggunakan asam folat yang diikatkan pada *CNBr-activated Sepharose*. [38] Pada tahun 1977, Rubinoff *et al* melakukan isolasi dan purifikasi protein ikat folat dari susu kambing. [39] Pada tahun 1979, Svendsen *et al* melakukan isolasi dan purifikasi protein ikat folat dari susu sapi. Mereka mendapatkan protein dengan berat molekul sekitar 32.000 Dalton, dengan enam ikatan disulfida dan tanpa gugus sulfhidril. [40]

Tahun 1981, Salter *et al* menentukan beberapa karakteristik protein ikat folat dari susu sapi, seperti berat molekul (35.000 Dalton), rasio ikatan FBP-asam folat dan penggunaan dialisis kesetimbangan untuk mengukur ikatan FBP-asam folat. [41] Protein ikat folat pada ginjal mulai dipelajari pada tahun 1984. [42] Pada tahun 1987, peran protein ikat folat pada proses absorpsi folat pada ginjal mulai diteliti. [43] Tahun 1989, sekuens lengkap asam amino protein ikat folat dari *KB cell* berhasil diidentifikasi. Jumlah asam aminonya adalah 226. [44]

Sadasivan *et al* melakukan penelitian mengenai gen protein ikat folat pada tahun 1992. [45] Pada tahun 1997, protein ikat folat ditemukan pada pasien kanker ovarium. Pada kanker ovarium terjadi peningkatan ekspresi protein ikat folat sehingga dipertimbangkan sebagai marker diagnosis atau prognosis. [46] Pada tahun 2000, dipelajari peran protein ikat folat dalam menjaga kestabilan asam folat dalam susu sapi. [47]

Tahun 2004, Nygren-Babol *et al* mempelajari faktor-faktor yang mempengaruhi kadar asam folat dalam susu sapi. [48] Tahun 2005, para peneliti memanfaatkan protein ikat folat untuk analisis folat dalam makanan. [49] Pada tahun 2006, para peneliti melakukan upaya deteksi kadar protein ikat folat dengan menggunakan teknik biosensor. [50] Pada tahun 2006 juga, Christensen mempelajari kinetika interaksi FBP dan Folat sebagai kemungkinan biomarker untuk diagnosis penyakit. [51]

Struktur dan peran protein ikat folat dari susu sapi dipelajari secara ekstensif pada tahun 2012.[8] Pada tahun 2014, para peneliti mulai mengamati pemanfaatan protein ikat folat sebagai vaksin untuk mencegah kekambuhan kanker.[52] Pada tahun 2015, penelitian mengenai protein ikat folat membahas tentang peran protein ikat folat dalam penghantaran obat.[17] Metotreksat disarankan untuk diikatkan terlebih dahulu ke FBP sebelum dipakai untuk pengobatan kanker.[53] Tahun 2018, Budiman *et al* memanfaatkan protein ikat folat dari susu sapi untuk mengukur kadar asam folat serum.

B. Penentuan Kadar FBP

Para peneliti telah melakukan pengukuran kadar FBP dalam susu sapi, ASI, atau sumber-sumber lain. Hasil pengukuran kadar FBP yang berbeda-beda diantara peneliti diduga karena metode yang digunakan tidak sama atau sumber FBP yang berbeda. Nygren-Babol menyatakan bahwa kadar FBP dalam susu sapi adalah 250 nmol/L (8 mg/L), sedangkan kadar FBP dalam ASI sekitar 180-250 nmol/L.[8] Peneliti lain juga menyebutkan bahwa kadar FBP dalam susu sapi sekitar 10-60 mg/kg atau 10 mg/L.[6–8] Merzel *et al* menyebutkan kadar FBP dalam serum manusia sekitar 1-2 nM dan dalam ASI sekitar 100 nM.[13] Kadar FBP dalam susu sapi tinggi pada awal menyusui (kolostrum), kemudian menurun dan stabil setelah beberapa lama menyusui (susu matur). Kadar awal FBP dalam susu sapi sekitar 30-35 µg/mL kemudian turun 75% menjadi sekitar 5-10 µg/mL.[8]

Pada awalnya penentuan kadar FBP dilakukan secara tidak langsung yakni dengan mengukur kadar folat setelah adsorpsi kelebihan folat bebas ke arang aktif. FBP diukur dengan memperhatikan kapasitas pengikatan dengan penambahan asam folat atau dengan inkubasi folat berlabel radioaktif. Asam folat terikat kemudian

dianalisis setelah dialisis atau setelah terperangkap secara selektif dengan menyaring selulosa-nitrat.[8]

Tenik langsung pertama yang digunakan untuk menentukan konsentrasi FBP dalam susu sapi dan produk susu adalah *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). ELISA dikembangkan adalah dari jenis “sandwich” dan didasarkan pada pengenalan FBP oleh antibodi poliklonal yang dibangkitkan terhadap FBP dari susu sapi. Metode ini telah menunjukkan spesifisitas yang tinggi karena tidak adanya reaktivitas silang, dan memiliki reproduktifitas dan sensitivitas yang tinggi. Metode ini tidak membedakan FBP bebas atau mengikat folat. Dengan metode ini, kandungan FBP yang terdeteksi menurun seiring dengan meningkatnya fraksi asam folat bebas. Hal ini mungkin disebabkan oleh peningkatan agregasi FBP setelah pelepasan ligan, sehingga terjadi pengurangan jumlah epitop antigen yang terpapar.[8] Teknik ELISA ini dapat juga digunakan untuk mengukur kadar folat serum.

Teknik lain yang dikembangkan untuk mengukur FBP adalah teknologi biosensor SPR (*Surface Plasmon Resonance*). Teknologi biosensor SPR memungkinkan interaksi antara biomolekul untuk dipantau secara *real time* menggunakan format pengujian bebas label. Salah satu molekul yang berinteraksi diimobilisasi pada permukaan sensor. Molekul lain (analit) kemudian disuntikkan dalam larutan di atas permukaan sensor. Saat analit dari sampel yang disuntikkan berikatan dengan pasangan yang berinteraksi yang diimobilisasi pada permukaan sensor, perubahan dalam respons SPR terdeteksi. Tingkat respons sebanding dengan perubahan massa di permukaan. Perubahan jumlah massa terikat dapat dideteksi hingga pikogram per milimeter persegi permukaan, sesuai dengan konsentrasi dalam rentang pikomolar hingga nanomolar dalam larutan sampel. Biosensor SPR memberikan juga informasi tentang afinitas dan kinetika pengikatan dari suatu interaksi dan konsentrasi molekul spesifik yang ada dalam sampel.[8]

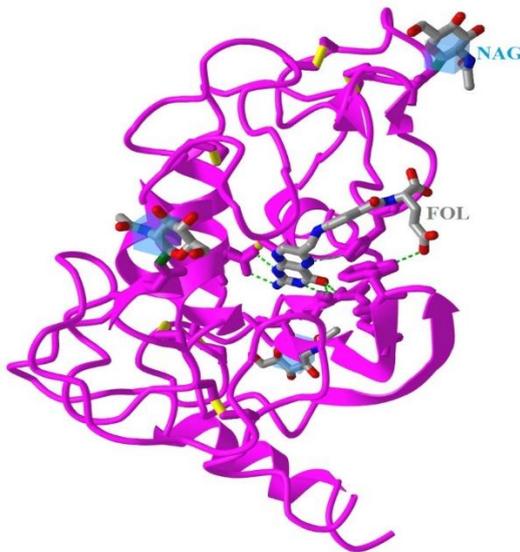
Sampai saat ini teknik yang umum untuk mendeteksi FBP dalam susu sapi adalah ELISA dan biosensor. Untuk pengukuran kadar FBP juga dapat digunakan teknik *radioimmunoassay*. Teknik ELISA dapat juga digunakan untuk mengukur kadar FBP dalam ASI. Antibodi poliklonal dapat dikembangkan dengan pengenalan terhadap FBP dari ASI. Selain itu, pengukuran kadar FBP dapat didasarkan pada interaksi yang spesifik antara FBP dan asam folat. Teknik ini mirip dengan teknik yang dikembangkan *Sadikin et al* dan *Budiman et al* untuk mengukur kadar asam folat serum. Untuk mengukur kadar asam folat digunakan FBP murni sebagai pengikat, sebaliknya untuk mengukur FBP dapat digunakan asam folat sebagai pengikat. Deteksi akhir kadar FBP dapat dilakukan dengan metode enzimatik seperti pada ELISA.[54,55]

C. Berat Molekul FBP

Berat molekul FBP bervariasi bergantung pada sumbernya. FBP memiliki berat molekul sekitar 25.000-35.000 Dalton.[6–8,16] Nygren-Babol menyebutkan berat molekul FBP dari susu sapi sekitar 25-34 kDa, sedangkan berat molekul FBP dari ASI sekitar sekitar 27 kDa.[8,9] Agak berbeda dengan Nygren-Babol, penelitian yang dilakukan oleh *Jaiswal et al* tahun 2012 menunjukkan bahwa berat molekul protein ikat folat dari susu sapi sekitar 30 kDa sedangkan berat molekul protein ikat folat dari ASI lebih tinggi.[56] *Antony et al* menyebutkan bahwa protein ikat folat dari plasenta manusia memiliki berat molekul 38,5 kDa.[57]

Holm dan Hansen menyebutkan bahwa berat molekul reseptor folat yang terdapat di dalam ASI, saluran reproduksi pria dan wanita, cairan asites, cairan kista, cairan serebrospinal dan saliva manusia adalah sekitar 25 kDa.[33] Hasil tersebut agak berbeda dengan penelitian *O'Shannessy et al* yang menyatakan bahwa reseptor folat

Pada tahun 2012 Jaiswal *et al* melaporkan bahwa FBP yang berasal dari sapi dan ASI mengandung banyak manosa dan glikan tipe hibrid/kompleks. Penelitian tersebut juga menyebutkan terdapat 17 struktur N-glikan spesifik untuk FBP dari susu sapi dan terdapat 19 struktur N-glikan spesifik untuk FBP dari ASI, serta terdapat 7 struktur N-glikan yang terdapat pada FBP dari susu sapi dan ASI. FBP dari susu sapi kebanyakan tidak mengandung fukosa dan asam sialat, sebaliknya FBP dari ASI banyak mengandung fukosa dan asam sialat.[56]



Gambar 2. Struktur Kristalografi FBP (4LRH)

Asam folat berwarna abu-abu-biru-merah, tempat pengikatan folat tampak oleh garis putus-putus berwarna hijau, karbohidrat ditandai oleh kubus biru, jembatan disulfida berwarna kuning.[61]

FBP dari susu memiliki urutan asam amino mirip dengan urutan asam amino protein pengikat riboflavin ayam (RBP). Semua

residu triptofan dan 16 residu sistein di FBP juga ada di RBP. Hal ini menunjukkan adanya kesamaan struktural dan fungsional antara FBP dan RBP. Pada RBP, semua residu sistein dan beberapa residu triptofan berada di sekitar domain pengikatan ligan. Oleh karena itu, daerah pengikatan antara FBP dan asam folat mungkin juga berada pada posisi asam amino triptofan, karena asam folat juga memiliki struktur yang mirip dengan riboflavin, dan keduanya memiliki cincin aromatik hidrofobik.[8,62]

Penelitian yang dilakukan oleh Subandrate *et al.* menunjukkan bahwa gugus aktif FBP mengandung gugus imidazol atau sulfhidril. Selain itu, ikatan belerang dalam FBP penting untuk mempertahankan struktur tiga dimensi asam folat yang mengikat FBP. FBP dikombinasikan dengan asam folat tidak memerlukan ion kalsium sebagai kofaktor. FBP negatif pada pH netral, larut dalam susu dan cairan tubuh lainnya serta memiliki ketahanan terhadap enzim pencernaan. FBP dari sapi dan manusia memiliki afinitas konstan terhadap asam folat. Derajat disosiasi ikatan antara FBP dan asam folat adalah 10^{-9} - 10^{-10} M, dan rasio stoikiometri antara FBP dan asam folat adalah 1:1 mol.[6-8,13,33,62]

Pada manusia, FBP dari susu sapi mirip dengan folat reseptor alfa. Folat reseptor merupakan famili protein yakni reseptor folat alfa, reseptor folat beta dan reseptor folat gamma. Reseptor folat alfa terdiri dari 255-257 asam amino, reseptor folat beta terdiri dari 207 asam amino dan reseptor folat gamma terdiri dari 245 asam amino. Uji keselarasan rantai asam amino antara FBP (reseptor folat alfa) dengan reseptor folat beta, reseptor folat gamma dan FBP susu sapi masing-masing adalah 98,07%, 81,17% dan 74,09%. Hasil uji keselarasan rantai asam amino tersebut tampak pada gambar 1.[59-62]

FBP tidak membutuhkan ion dalam mengikat asam folat, sedangkan FR- γ membutuhkan ion klorida dan potasium. FBP memiliki 4 gugus karbohidrat (*N-acetylglucosamine*) dan 16 jembatan

disulfida (Gambar 2).[59,60,62] Pada konsentrasi tinggi dan kekuatan ion rendah, FBP murni dapat mengendap dengan cepat. FBP mengikat folat dengan erat pada kisaran pH 5,5 hingga 8,0 (1 mol folat per mol protein pada pH 7,2). FBP melepaskan folat pada nilai pH asam (pH 4,5) tetapi setelah netralisasi dapat mempertahankan aktivitas pengikatannya dan membentuk kembali kompleks dengan folat. Ketika memasuki lambung, FBP melepaskan asam folat. FBP tidak mengalami hidrolisis oleh enzim protease di lambung dan intestinum karena ada gugus karbohidrat. Di duodenum dan jejunum, FBP dapat berikatan lain dengan folat, dan diserap dengan baik ileum.[6–8,13,33,61]

E. Peran FBP

FBP memiliki beberapa peran penting dalam regulasi bioavailabilitas dan penyerapan folat makanan. Peran FBP adalah untuk mengambil asam folat dari darah untuk menjamin ketersediaan asam folat dalam ASI cukup bagi neonatus meskipun konsentrasi asam folat dalam darah relatif rendah. Peran fisiologis FBP terlarut adalah sebagai pengangkut asam folat dalam susu dan ASI. Sedangkan, Partikulat FBP ditemukan dalam membran sel dan berperan selama transportasi membran. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa FBP berperan sebagai reservoir folat.[8,33]

Peran FBP sebagai protein pengikat folat dalam susu telah didokumentasikan dengan baik dalam beberapa penelitian. Percobaan menggunakan sel usus tikus telah menunjukkan bahwa penyerapan folat lebih tinggi sebagai kompleks FBP dibandingkan dengan bentuk bebas. Hal ini mempertegas bukti bahwa FBP dapat memfasilitasi penyerapan folat. Demikian pula bukti dari penelitian pada anak kambing menunjukkan bahwa folat terikat FBP memainkan peran fisiologis selama menyusui melalui proses penyerapan di usus halus. Ini kemungkinan besar juga merupakan

mekanisme penting untuk mencukupi kebutuhan folat bayi baru lahir. Folat ASI ketika terikat pada protein diserap dengan cara yang sama, sebagian besar utuh, melalui usus bayi yang permeabel setelah lahir dengan konsentrasi berkisar antara 109-204 nmol/L, yang lima hingga sepuluh kali lipat lebih tinggi daripada plasma ibu (13,6-45,3 nmol/L). Ada hubungan positif antara folat ASI dan konsentrasi protein pengikat folat. Kapasitas pengikatan folat dari ASI dilaporkan berkisar antara 180 dan 270 nmol/L. Kapasitas pengikatan folat berlebih dapat bertindak untuk mengkonsentrasikan folat ASI untuk sekresi melawan gradien konsentrasi. Konsentrasi folat plasma pada bayi yang diberi ASI umumnya tinggi (45-68 nmol/L) dalam 6 bulan pertama kehidupan dan menurun menjadi 23-45 nmol/L pada usia 12 bulan, ketika makanan selain ASI dikonsumsi. Pergeseran ini menunjukkan peran penting FBP dalam meningkatkan bioavailabilitas folat dari ASI.[8,16,33]

Studi pada tikus yang menggunakan folat kompleks FBP susu sapi menunjukkan bahwa, meskipun FBP melepaskan folat di bawah kondisi asam lambung, kompleks itu terbentuk kembali di jejunum. Namun, folat terikat FBP diserap dengan buruk di jejunum, sedangkan folat bebas diserap dengan cepat. Kedua bentuk folat bebas dan terikat diserap pada tingkat yang sama di ileum. Tingkat kecepatan penyerapan folat bebas menyebabkan kadar folat darah tinggi, yang pada gilirannya, menyebabkan ekskresi folat urin dan bilier yang cepat. Kadar folat darah terkontrol yang lebih rendah yang dicapai dengan menggunakan folat terikat FBP meningkatkan waktu retensi folat, memungkinkannya mencapai jaringan targetnya. Dengan demikian, FBP dapat dikatakan meningkatkan retensi dan bioavailabilitas folat.[8,63]

Studi tentang efek FBP susu kambing pada penyerapan folat pada anak kambing neonatal telah mengarah pada kesimpulan bahwa FBP kambing dapat menghindari pencernaan enzimatik di saluran pencernaan dan memediasi penyerapan folat melalui

interaksi dengan reseptor spesifik di *intestine brush border*. Kondisi asam yang ada di lingkungan mikro permukaan mukosa usus halus memfasilitasi pengikatan reseptor FBP dan memungkinkan pelepasan folat yang terikat. FBP juga dapat meningkatkan bioavailabilitas folat dengan melindungi folat terikat dari bakteri usus yang membutuhkan folat, serta mengambil beberapa folat yang disintesis oleh mikroorganisme lain (mikroflora usus) dari usus besar. Dengan demikian, FBP susu dapat berkontribusi dalam beberapa cara untuk mempertahankan status folat neonatus.[8,12,14]

Peran protein ikat folat tidak hanya terbatas dalam tubuh sebagai pembawa atau reseptor penyerapan folat. FBP telah diketahui meningkat pada kanker ovarium sehingga dijadikan sebagai salah satu marker dalam menentukan diagnosis kanker ovarium. Bahkan hasil penelitian menunjukkan bahwa vaksin FBP dapat digunakan untuk mencegah kekambuhan pada pasien kanker ovarium dan kanker endometrium. Selain itu, perkembangan dalam pengobatan kanker telah menemukan bukti bahwa FBP dapat dijadikan target dalam kemoterapi kanker ovarium.[52,64,65] Pemanfaatan FBP juga dalam *drug delivery*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa reseptor folat beta pada sel makrofag memiliki potensi sebagai rute pengiriman antifolat dalam terapi artritis reumatoid. Dalam pengobatan kanker, pra-pengikatan metotreksat ke protein ikat folat disarankan untuk mendapatkan terapi yang efektif. Metotreksat-FBP dapat menjadi vektor terapeutik yang ditargetkan, meningkatkan penyerapan ke dalam sel tumor dan meningkatkan kemanjuran terapeutik. Bahkan penelitian yang dilakukan oleh Samadian *et al* menunjukkan bahwa FBP memiliki kemampuan sebagai antitumor baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. [9,13,17,53,66]

Pengetahuan tentang struktur dan peran FBP sebagai protein pengikat folat telah mendorong upaya pengembangan FBP untuk analisis folat serum. Saat ini, metode pengukuran folat serum yang menjadi standar emas adalah pemeriksaan mikrobiologis. Pada pertengahan tahun 1970an, telah dikembangkan uji pengikatan

radioprotein untuk menggantikan uji asam folat dalam sampel klinis mikrobiologis. Pada tahun 1980-an, FBP diperkenalkan melalui kromatografi afinitas untuk pemurnian asam folat dari bahan biologis, sehingga bermunculan aplikasi pengujian kadar folat dalam sampel klinis.[8,15,16] Pada tahun 2008, Sadikin *et al* berhasil menggunakan protein ikat folat dari susu sapi untuk mengukur kadar asam folat serum. Pada penelitian tersebut, kadar asam folat serum standar yang digunakan berkisar antara 25-100 ng/mL, padahal normal kadar asam folat serum normal adalah antara 6-20 ng/mL. Selain itu, Sadikin *et al* menggunakan protein ikat folat dari susu sapi yang belum dimurnikan. Pada tahun 2018, Budiman *et al* menggunakan protein ikat folat dari susu sapi yang sudah dimurnikan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein ikat folat dari susu sapi dapat digunakan untuk mengukur kadar asam folat serum. Hasil tersebut juga menunjukkan bahwa pengukuran dengan protein ikat folat relatif sama baiknya dengan metode ELISA. Budiman *et al* menggunakan metode *enzyme labeled protein ligand binding assay* (ELPLBA). Kadar rata-rata asam folat serum yang diukur dengan metode ELISA adalah $13,86 \pm 3,64$ ng/mL, sedangkan kadar rata-rata asam folat serum yang diukur dengan metode ELPLBA adalah $14,80 \pm 2,79$ ng/mL ($p=0,363$).[7,54,55]

BAB IV

ISOLASI PROTEIN IKAT FOLAT

Isolasi protein merupakan rangkaian proses untuk mendapatkan protein baik bentuk murni atau belum murni dari berbagai macam sampel. Untuk tujuan diagnostik, protein dapat diperoleh dari sel atau jaringan pasien, sedangkan untuk penggunaan eksperimental di laboratorium, protein dapat berasal dari mikroorganisme, sel yang berasal dari serangga, hewan vertebrata, atau tumbuhan. Protein murni dapat dipisahkan tidak hanya dari campuran makromolekul tetapi juga dari campuran protein lain. Isolasi protein dapat dilakukan dengan berbagai cara tergantung sumber, tujuan atau bentuk protein yang ingin didapatkan.[6,8,67]

Isolasi protein bukanlah suatu proses yang sederhana dan singkat. Selain faktor sumbernya, ada beberapa alasan yang menyebabkan isolasi protein tidak mudah. Pertama, tidak ada sifat umum yang dapat diterapkan dalam pemurnian protein. Berbeda dengan cara isolasi asam nukleat yang dapat menggunakan teknik adsorpsi muatan positif karena asam nukleat memiliki muatan negatif. Pada isolasi protein prinsip isolasi tersebut terbatas karena sifat hidrofobisitas atau elektrostatis spesifik dapat ditemukan dalam berbagai molekul, termasuk lipid, asam nukleat, dan karbohidrat. Kedua, kadar protein yang diisolasi cenderung sedikit. Dalam beberapa kasus, protein target mungkin ada dalam konsentrasi pikomol atau femtomol. Metode spektroskopi atau kalorimetri biasanya memerlukan sampel protein dengan konsentrasi berkisar antara 0,01 hingga 1 mM (atau hingga puluhan mg/mL). Ketiga, tidak ada cara untuk memperbanyak protein. Jika suatu protein tidak diproduksi secara berlebihan, protein tersebut dapat hilang terus-menerus selama proses isolasi, hingga tidak dapat dideteksi pada

tahap analisis akhir. Keempat, masalah kontaminasi tidak bisa dihindari. Protein tertentu merupakan bagian yang sangat besar dari protein yang ada dalam sel. Protein yang diklasifikasikan sebagai kontaminan hadir dalam jumlah yang jauh lebih besar daripada protein target, yang sering membuat analisis data menjadi sulit. Kelima, protein tidak stabil. Protein dapat terdegradasi oleh enzim baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Tidak mudah untuk menghambat semua aktivitas proteolitik dengan menambahkan inhibitor protease. Jika suhu, pH, atau konsentrasi garam tidak sesuai, protein kemungkinan besar akan terdenaturasi. Jika kondisi eksperimental bufer tidak optimal, protein dapat beragregasi sebelum atau setelah analisis.[8,33,67]

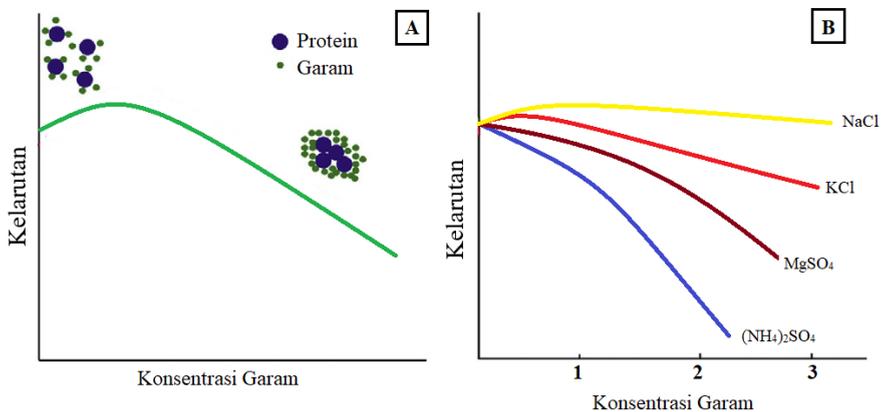
Secara umum, tahap-tahap isolasi protein meliputi *salting out* dan dialisis. Namun, sebelum tahap *salting out*, beberapa protein membutuhkan tahap-tahap persiapan tergantung pada sumbernya. Protein yang bersumber dari dalam atau memberan sel membutuhkan tahap pemisahan atau lisis sel. Setelah lisis sel, kadang-kadang dibutuhkan penambahan inhibitor enzim protease, untuk menghindari proteolisis. Pemisahan komponen-komponen nonprotein yang memiliki berat molekul yang sangat besar dapat dilakukan dengan sentrifugasi tanpa melibatkan penambahan garam atau senyawa khusus.

Isolasi dan purifikasi protein ikat folat juga mengikuti tahap-tahap isolasi dan protein secara umum. Nygren-Babol menyatakan bahwa secara umum peneliti menggunakan *salting out* dalam mengisolasi protein ikat folat dari susu, baik ASI, sapi atau kambing.[6–8,33,55,67]

A. Salting Out

Tahap awal dalam isolasi protein adalah dengan mengendapkan protein. Banyak senyawa yang dapat digunakan

untuk presipitasi protein seperti asam trikloroasetat (TCA), alkohol, aseton, polietilenglikol, dekstran sulfat, dan garam (*salting out*). Beberapa metode tersebut relatif tidak dapat untuk diterapkan pada beberapa protein karena menyebabkan protein denaturasi dan sulit dilarutkan kembali. Selain itu, faktor biaya menjadi penyebab bahan-bahan tersebut tidak dapat digunakan secara luas.[68,69]



Gambar 3. Hubungan Konsentrasi Garam dan Kelarutan Protein

Kelarutan protein tergantung pada konsentrasi garam. Semakin tinggi konsentrasi garam, protein akan mengalami *salting out* (A). Kemampuan garam dalam menurunkan kelarutan protein berbeda-beda. Dengan konsentrasi yang sama (NH₄)₂SO₄ memiliki kemampuan yang lebih cepat dalam menurunkan kelarutan protein (B).[69]

Salting out merupakan salah satu metode dalam precipitasi protein. Metode ini digunakan karena relatif mudah, murah, dan tidak merusak struktur protein. Prinsip dari metode ini adalah pengendapan protein karena tertariknya air dari protein. Protein merupakan koloid hidrofilik sehingga dikelilingi oleh mantel air. Semakin besar ukuran molekul protein, semakin sedikit mantel airnya sehingga dapat lebih mudah diendapkan. Begitupun sebaliknya, semakin kecil ukuran

protein, semakin banyak mantel air yang mengelilinginya sehingga membutuhkan garam konsentrasi tinggi untuk mengendapkannya. *Salting out* dapat menggunakan berbagai jenis garam seperti natrium klorida, kalium klorida, magnesium sulfat dan amonium sulfat. *Salting out* umumnya menggunakan kristal amonium sulfat karena amonium sulfat memiliki kemampuan mengendapkan lebih cepat dibandingkan dengan garam-garam yang lain. Untuk dapat mengendapkan protein, dibutuhkan amonium sulfat dengan konsentrasi hingga 50-100% tergantung pada berat protein yang diisolasi. Kemampuan *salting out* kristal amonium sulfat dan beberapa garam yang lain tampak pada gambar 3.[6,8,67]

Isolasi protein ikat folat dengan *salting out* telah dilakukan dalam berbagai penelitian. Penggunaan garam amonium sulfat lebih dianjurkan untuk isolasi protein karena dapat mengendapkan protein realtif lebih cepat dibandingkan garam lain.[6,8,54,55,57] Tahap awal dalam isolasi protein ikat folat dari ASI adalah memisahkan krim dari ASI. Teknik yang dapat dilakukan untuk memisahkan krim dari ASI adalah dengan melakukan sentrifugasi. Sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 35 menit menyebabkan krim terpresipitasi pada bagian atas sehingga didapatkan laktoserum pada bagian bawah. Komponen utama laktoserum adalah protein *whey* dan kasein, termasuk juga protein ikat folat. Pemisahan *whey* dari kasein dapat dilakukan dengan menambahkan larutan asam dan sentrifugasi. Pemisahan tersebut menghasilkan endapan berupa protein kasein dan supernatan berupa protein *whey*. Protein ikat folat terkandung di dalam *whey*.[6,55]

Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa protein ikat folat dapat diisolasi dengan menggunakan garam amonium sulfat dengan konsentrasi 95%[6,8,55] Isolasi protein ikat folat dari *whey* mengikuti kurva saturasi amonium sulfat (Gambar 4). Amonium sulfat dilarutkan dalam *whey* secara bertahap mulai konsentrasi 0%, 50%, 75% hingga 95%. Sentrifugasi dan filtrasi dengan kertas saring juga menjadi prosedur yang dapat dilakukan untuk mendapatkan hasil

yang optimal. Secara umum, protein dengan berat molekul di atas 60 kDa dapat diendapkan dengan penambahan amonium sulfat hingga 50%. Protein ikatan folat merupakan protein dengan berat molekul 25-34 kDa sehingga membutuhkan penambahan amonium sulfat hingga 95%. Protein ikatan folat yang presipitasi dengan amonium sulfat dapat dilarutkan kembali dalam larutan bufer.[6,55,68,69]

Konsentrasi Awal Amonium Sulfat	25	35	45	50	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Jumlah amonium sulfat (gram) yang ditambahkan per 100 mL larutan												
0	13.4	19.4	25.8	29.1	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
10	8.1	13.9	20.0	23.3	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
20	2.7	8.3	14.3	17.5	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
25	0	5.6	11.5	14.6	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
35		0	5.7	8.7	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3
45			0	2.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3
50				0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.3	30.8	34.8
60					0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	20.1	23.9	27.6
65						0	3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4
70							0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9
75								0	3.2	6.6	10.1	13.7	17.4
80									0	3.3	6.7	10.3	13.9
85										0	3.4	6.8	10.5
90											0	3.4	7.0
95												0	3.5
100													0

Gambar 4. Saturasi Amonium Sulfat

Penambahan amonium sulfat mulai dari tingkat saturasi 0% sampai dengan saturasi 100%.[69]

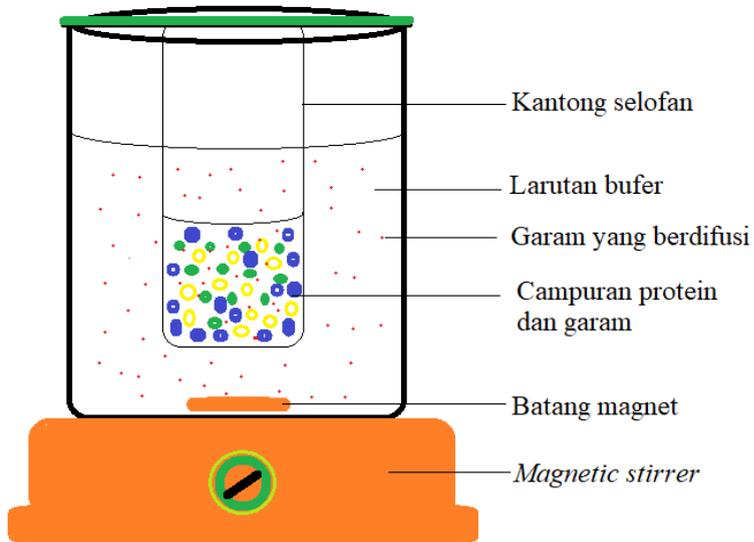
Agak berbeda dengan metode atau teknik isolasi protein dari susu sapi, isolasi protein ikat folat yang dilakukan oleh Puthusseri *et al* dari daun tanaman Arabidopsis menggunakan garam CaCl_2 . Garam CaCl_2 memiliki valensi yang sama dengan garam amonium sulfat. Penambahan inhibitor enzim protease perlu dilakukan untuk menghindari kerusakan oleh aktivitas enzim tersebut.[10]

B. Dalisis

Isolasi protein menyebabkan protein target bercampur atau berikatan dengan garam yang digunakan. Garam-garam tersebut perlu dipisahkan dari protein. Dalam isolasi dan purifikasi protein, garam perlu dihilangkan karena keberadaan garam mengganggu afinitas atau interaksi protein dengan ligan. Untuk menghilangkan garam dari protein yang diisolasi, dilanjutkan dengan dialisis. Gambaran proses dialisis tampak seperti gambar 5.[6,68]

Dialisis adalah teknik pemisahan yang digunakan untuk menghilangkan senyawa kecil yang tidak diinginkan dari makromolekul dalam larutan dengan difusi selektif dan pasif melalui membran semipermeable/kantong selofan. Kantong selofan yang berisi sampel diletakkan dalam larutan bufer. Kantong selofan yang dipilih memiliki pori-pori yang lebih kecil dari molekul sampel tetapi lebih besar dari senyawa kecil/garam yang akan dibuang. Molekul sampel dipertahankan di dalam kantong selofan tetapi molekul kecil dan garam penyangga melewati kantong selofan dengan bebas. Agar proses difusi selektif dan pasif melalui membran semipermeable/kantong selofan terjadi lebih cepat maka dialisis dilakukan di atas pemutar magnetik. Volume bufer yang tinggi juga dapat mempercepat proses dialisis. Oleh karena itu, dialisis dilakukan dengan penambahan dan penggantian bufer secara periodik dalam jumlah tertentu. Hasil dialisis disebut dialisat. Untuk membuktikan dalam dialisat tidak ada lagi garam amonium sulfat dapat dilakukan

uji sulfat. Tidak terbentuknya warna putih pada uji sulfat menunjukkan dialisat telah bebas dari garam amonium sulfat. Dialisat dijadikan sampel untuk tahap pemurnian protein selanjutnya.[6,8,67]



Gambar 5. Dialisis Protein

Dialisis protein bertujuan untuk membuang garam yang digunakan dalam proses *salting out*. Garam memiliki berat molekul yang sangat kecil dibandingkan protein sehingga berdifusi keluar dari kantong selofan.[6,68]

BAB V

PURIFIKASI PROTEIN IKAT FOLAT

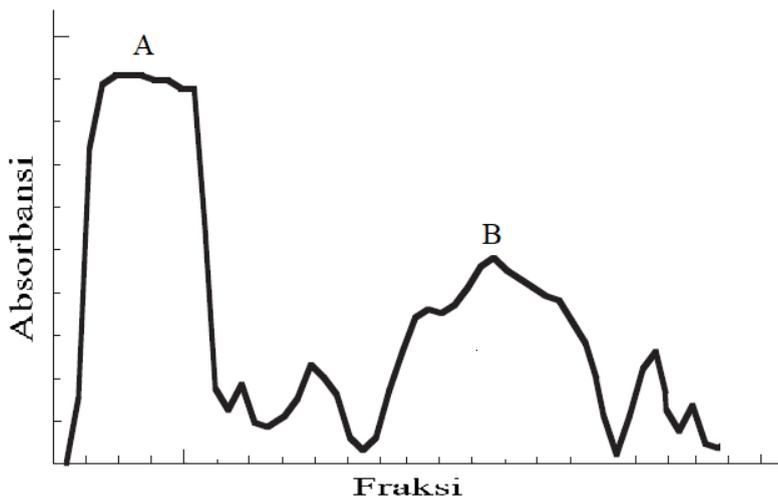
Salting out dan dialisis tidak dapat memurnikan protein. Tahapan selanjutnya untuk memurnikan protein adalah kromatografi. Nygren-Babol menyatakan bahwa kromatografi yang umum digunakan dalam isolasi FBP adalah kromatografi afinitas yang dapat dioptimalkan dengan kromatografi pertukaran ion atau kromatografi kolom.[6–8,33,55,67]

A. Kromatografi

Kromatografi merupakan teknik pemisahan molekul berdasarkan perbedaan pola pergerakan protein pada fase gerak dan fase diam. Dalam isolasi dan purifikasi protein, proses pemurnian tidak hanya mengukur kadar molekul tetapi juga mengumpulkan protein yang diisolasi. Oleh karena itu, kromatografi yang digunakan sebaiknya bukan kromatografi yang membuang hasil pemisahan atau hanya mengukur kadar. Dalam hal ini, kromatografi yang umumnya dapat digunakan untuk pemurnian protein adalah kromatografi kolom seperti kromatografi filtrasi gel, kromatografi pertukaran ion, dan kromatografi afinitas.[6–8,55,67]

Kromatografi kolom adalah kromatografi yang paling berguna untuk memisahkan protein. Kromatografi kolom terdiri dari matriks padat sebagai fase diam yang diletakkan dalam kolom silinder yang dilewati oleh larutan (fase gerak). Dasar pemisahan pada kromatografi kolom adalah perbedaan interaksi berbagai senyawa dalam larutan dengan matriks. Pemisahan terjadi ketika berbagai komponen dalam larutan dilewatkan melalui matriks. Kolom

kromatografi dikembangkan dengan mengalirkan larutan ke bagian atas kolom lalu mengumpulkannya dari bagian bawah kolom. Pengumpulan biasanya dilakukan dalam jumlah kecil yang disebut fraksi. Adanya protein target dapat dilihat dengan menilai kadar protein dalam fraksi. Hasil kromatografi dapat disusun dalam kromatogram yang memperlihatkan konsentrasi protein yang keluar dari kolom pada tiap fraksi. Gambar 6 memperlihatkan grafik hasil kromatografi kolom. Biasanya, protein total diukur dengan mengukur absorbansi tiap fraksi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm. Kromatografi kolom sangat cocok untuk isolasi protein karena proses pemisahan protein terjadi secara baik dan pelarutan kembali protein sangat baik. Pemisahan protein dengan kromatografi kolom bergantung pada berbagai prinsip kimia dan fisika seperti adsorpsi selektif, interaksi hidrofobik, ukuran, muatan, dan afinitas spesifik untuk molekul tertentu.[67,68]



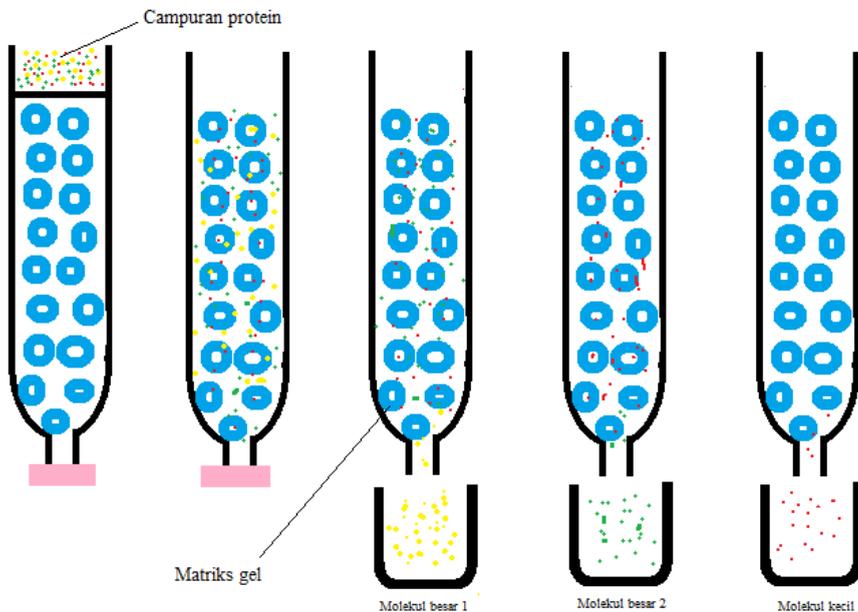
Gambar 6. Contoh Kromatogram Kromatografi Kolom
Protein A terkumpul pada puncak A. Protein B terkumpul pada puncak B.[68]

1. Kromatografi Filtrasi Gel

Kromatografi filtrasi gel disebut juga *size exclusion chromatography*, *gel permeation chromatography*, atau kromatografi saringan molekuler. Prinsip kromatografi filtrasi gel adalah pemisahan molekul berdasarkan ukuran atau hidrodinamika volume. Kromatografi ini menggunakan fase diam berupa matriks berpori dengan rentang ukuran tertentu. Matriks gel berpori memisahkan protein berdasarkan ukuran protein yang dapat masuk atau tidak dapat masuk ke dalam pori-pori gel. Protein yang lebih besar yang tidak bisa masuk ke pori-pori karena tidak seimbang dengan volume interior manik-manik gel sehingga bergerak melalui kolom lebih cepat. Protein yang lebih kecil yang bisa masuk ke pori-pori sehingga tertahan sementara dan mengalir keluar dari kolom lebih lambat. Deskripsi proses kromatografi filtrasi gel tampak pada gambar 7.[67,68]

Molekul yang sepenuhnya tidak masuk ke dalam pori-pori gel dielusikan dalam volume eluen yang disebut volume kosong atau *void volume* (V_0). Besar *void volume* sekitar 30% dari volume eluen atau larutan yang digunakan (*bed volume*). Molekul yang sepenuhnya dapat menyeimbangkan di dalam pori-pori gel terelusikan dalam volume inklusi atau *inclusion volume* (V_i). Besar *inclusion volume* sekitar 80% dari eluen atau larutan yang digunakan (*bed volume*). Gambaran kromatogram hasil pemisahan kromatografi filtrasi gel dapat dilihat pada gambar 8. Proses pergerakan molekul melalui matriks gel berlangsung terus-menerus. Oleh karena itu, kromatografi filtrasi gel membutuhkan dimensi yang sesuai untuk menghasilkan pemisahan molekul yang lebih baik. Kolom yang lebih panjang menghasilkan hasil pemisahan yang lebih baik. Kolom yang dapat digunakan dapat berukuran 3 cm x 100 cm dengan kecepatan alir 1-2 ml/menit. Kromatografi ini sangat baik untuk menganalisis berat molekul protein

subunit atau protein kompleks. Seperti gel kromatografi pertukaran ion, gel kromatografi filtrasi gel terbuat dari bahan serupa termasuk selulosa, agarosa, dekstran, dan akrilamida. Ukuran gel yang digunakan sesuai dengan ukuran molekul protein yang dipisahkan.[8,67,68]

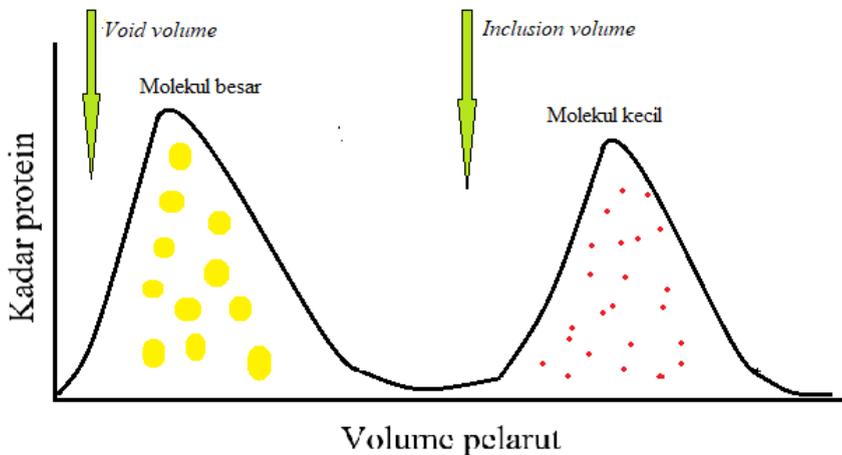


Gambar 7. Kromatografi Filtrasi Gel

Molekul yang besar tidak masuk ke dalam pori-pori gel sehingga bergerak lebih cepat, sedangkan molekul kecil masuk ke dalam pori-pori gel sehingga bergerak lebih lambat dari kolom.[68]

Protein ikat folat memiliki berat molekul sekitar 30 kDa, sehingga dapat menggunakan dekstran (*sephadex G-50*). Protein dengan berat molekul di atas 30 kDa akan masuk dalam *void volume*, sedangkan protein dengan berat molekul di bawah 30 kDa akan

masuk dalam *inclusion volume*. [8,67,68] Tidak banyak peneliti yang menggunakan kromatografi filtrasi gel untuk pemisahan protein ikat folat. Dari studi literatur, hanya Holm & Hansen yang menggunakan kromatografi filtrasi gel untuk memisahkan protein ikat folat yang diisolasi dari serum atau cairan tubuh manusia. [33]



Gambar 8. Kromatogram Hasil Kromatografi Filtrasi Gel

Molekul besar tidak masuk dalam pori-pori gel dielusi dalam *void volume*, sedangkan molekul kecil yang masuk dalam pori-pori gel dielusi dalam *inclusion volume*. [68]

2. Kromatografi Pertukaran Ion

Kromatografi pertukaran ion merupakan kromatografi yang bergantung pada interaksi antara muatan pada permukaan protein dengan muatan pada matriks yang ada di dalam kolom. Matriks

yang digunakan sebagai fase diam adalah matriks yang bermuatan negatif atau positif. Bila protein yang diinginkan bermuatan negatif, maka digunakan matriks bermuatan positif sehingga disebut kromatografi pertukaran anion. Sedangkan bila protein yang diinginkan bermuatan positif, maka digunakan matriks bermuatan negatif sehingga disebut kromatografi pertukaran kation. Matriks yang digunakan biasanya dietilaminoetil (DEAE) dan kuarteneraminoetil (QAE) untuk penukar anion. Untuk penukar kation biasanya digunakan karboksimetil (CM) dan sulfopropil (SP). Interaksi antara protein dan matriks bergantung kepada pH, sehingga digunakan larutan bufer dengan pH yang dapat ditoleransi seperti pH 4-9. Selain pH, hal yang harus diperhatikan adalah komponen di dalam bufer. Bufer yang mengandung komponen banyak ion seperti EDTA dapat mengganggu interaksi antara protein dan matriks.[6,67,68]

Pada kromatografi pertukaran ion, dimensi kolom tidak perlu sepanjang atau selebar seperti pada kromatografi filtrasi gel. Kapasitas dan pilihan kolom yang baik adalah kolom yang panjangnya 4-5 kali diameternya. Diameter kolom sebaiknya cukup besar sehingga protein menyerap ke bagian atas 20-30% dari matriks kolom. Namun, dimensi kolom yang panjang dapat memberikan hasil yang lebih baik karena mengurangi peluang terelusnya protein target pada fraksi-fraksi puncak pertama kromatogram. Secara umum, semakin luas kolom semakin tinggi laju aliran yang dapat dicapai. Semakin tinggi laju aliran akan memungkinkan protein untuk melewati kolom dengan cepat sehingga kromatografi dapat diselesaikan dalam waktu singkat.[68]

Protein biasanya dikeluarkan dari kolom dengan meningkatkan kekuatan ionik bufer dengan meningkatkan konsentrasi garam. Konsentrasi garam ditingkatkan secara perlahan-lahan secara linier. Konsentrasi protein dalam fraksi terus dipantau sampai protein yang diinginkan dapat dilepaskan ke dalam fraksi. Hasil akhir kromatografi pertukaran ion biasanya ditunjukkan oleh kromatogram dalam dua puncak. Puncak pertama adalah protein

yang muatannya sama dengan matriks, dan puncak yang kedua adalah protein yang muatannya berlawanan dengan muatan matriks. Penggunaan garam sebagai eluen dalam kromatografi menyebabkan tingginya konsentrasi garam dalam larutan protein. Tingginya garam mungkin berpengaruh pada struktur, kelarutan, dan fungsi protein. Proses dialisis dapat digunakan lagi untuk mengeluarkan garam dari larutan protein.[6,67,68]

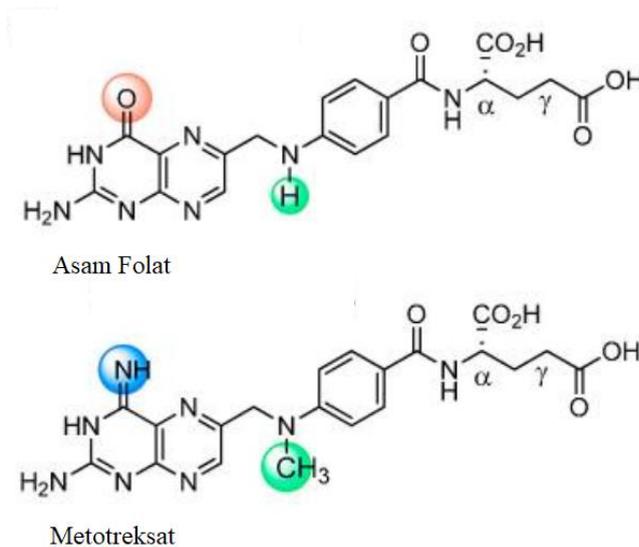
Protein ikat folat memiliki muatan negatif pada pH netral. Untuk memisahkan protein ikat folat dapat digunakan kromatografi penukar anion dengan matriks dietilaminoetil (DEAE) dan kuarteraminoetil (QAE). Purifikasi protein ikat folat dari susu sapi banyak menggunakan *DEAE-cellulose chromatography*,[6,54,55] tetapi ada juga peneliti yang menggunakan *QAE-cellulose chromatography*. [33]

3. Kromatografi Afinitas

Kromatografi afinitas adalah kromatografi yang didasarkan pada afinitas spesifik molekul tertentu terhadap gugus tertentu seperti antibodi, karbohidrat, atau vitamin pada fase diam. Pemisahan protein ikat folat dengan kromatografi afinitas dapat didasarkan afinitas protein dengan antibodi atau afinitas protein dengan ligan. Folat yang diikat pada agarosa dapat dijadikan matriks fase diam pada kromatografi afinitas untuk pemisahan protein ikat folat.

Subandrate *et al* dan Budiman *et al*, menggunakan matriks kromatografi afinitas berupa aminoheksil-agarosa dan asam folat yang dihubungkan dengan karbodiimida. Sedangkan Holm & Hansen dan Puthusseri *et al* menggunakan *methotrexate-sepharose 4B* yang diaktifkan dengan CNBr sebagai matriks kromatografi afinitas.[6,10,54] Asam folat dan metotreksat (berat molekul 454,4) memiliki struktur yang mirip yakni sama-sama terdiri dari cincin

pteridin, asam p-aminobenzoat dan asam glutamat. Struktur yang berbeda adalah gugus yang terikat pada cincin pteridin dan asam p-aminobenzoat. Gugus hidroksil pada cincin pteridin asam folat disubstitusi dengan gugus amina pada metotreksat. Nitrogen ke-10 asam p-aminobenzoat pada metotreksat mendapat tambahan gugus gugus metil sedangkan pada asam folat tidak ada penambahan gugus.[70,71] Perbandingan struktur asam folat dan metotreksat tampak pada gambar 9. Ikatan antara protein ikat folat dan folat/metotreksat pada matriks dapat dilepaskan dengan mengubah pH pelarut yang digunakan. Keuntungan utama kromatografi afinitas adalah protein ikat folat berikatan sangat spesifik dengan asam folat sehingga memberikan hasil kromatogram yang sangat bersih.[6,8,54,68]



Gambar 9. Kemiripan Struktur Asam Folat dan Metotreksat

Asam folat dan metotretat memiliki struktur yang mirip. Pada metotretat ada substitusi gugus amina dan tambahan gugus metil.[70]

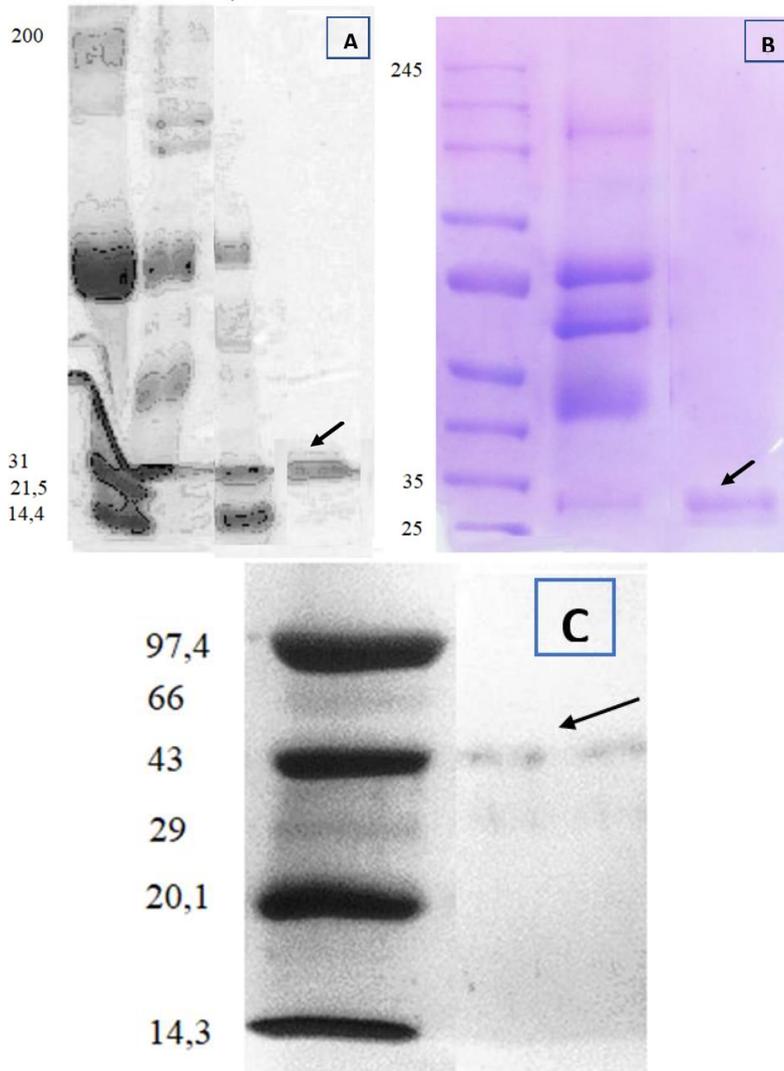
B. Elektroforesis

Tahap akhir dalam purifikasi protein adalah membuktikan bahwa protein yang diisolasi sudah murni. Metode yang dapat digunakan untuk tahap ini adalah elektroforesis. Elektroforesis merupakan teknik pemisahan molekul dalam muatan listrik. Dasar pemisahan dalam elektroforesis dapat berupa perbedaan muatan atau perbedaan berat molekul. Gel yang digunakan dalam elektroforesis biasanya agarosa dan poliakrilamid. Agarosa umumnya dipakai untuk memisahkan DNA/RNA, sedangkan poliakrilamid digunakan untuk memisahkan protein.[67,68]

Elektroforesis protein biasanya menggunakan SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*). SDS-PAGE merupakan salah satu teknik elektroforesis yang digunakan untuk pemisahan protein berdasarkan ukuran berat molekul dalam gel poliakrilamida yang tidak larut. Prinsip SDS-PAGE adalah memisahkan protein berdasarkan berat molekul. Dalam SDS-PAGE, protein didenaturasi dan dipisahkan oleh SDS, sehingga protein menjadi bermuatan negatif dan dapat bermigrasi melalui gel berdasarkan berat molekul kovalennya.[6,8,55,67]

Pada SDS-PAGE, gambaran satu pita pada gel menunjukkan bahwa protein yang diisolasi sudah murni. Dalam melakukan elektroforesis, hal penting yang tidak boleh dilupakan adalah meletakkan marker. Marker merupakan campuran protein dengan berat molekul beraneka ragam, mulai dari 10 kDa - 200 kDa tergantung perkiraan berat molekul sampel yang diuji. Jarak migrasi protein marker (R_f) dapat

dihitung dan digunakan untuk menilai berat molekul protein yang diuji.[6,8,55,67]



Gambar 10. Hasil SDS-PAGE Protein Ikat Folat dari Susu Sapi

Protein ikat folat menunjukkan satu pita pada SDS-PAGE dengan rentang berat molekul 21,5-31 kDa (A), 25-35 kDa (B) dan 43 kDa (C).[6,10,54] Tanda panah menunjukkan protein ikat folat.

Pada SDS-PAGE, FBP tampak satu pita dengan berat molekul di bawah 35 KDa. Hasil penelitian Subandrate *et al* menunjukkan bahwa protein ikat folat berada pada rentang 21,5-35 kDa pada SDS-PAGE (Gambar 10A). Budiman *et al* menyebutkan bahwa protein ikat folat berada pada rentang 25-35 kDa pada SDS-PAGE (Gambar 10B). Agak berbeda dengan Subandrate *et al* dan Budiman *et al*, hasil penelitian Puthusseri *et al*, menunjukkan bahwa protein ikat folat yang diisolasi dari daun tanaman memiliki berat molekul 43 kDa. (Gambar (10C). [6,8,54,55,67]

Hasil SDS-PAGE dapat dikonfirmasi dengan menggunakan *western blot*. Prinsip *western blot* adalah ikatan antara antigen-antibodi secara kualitatif melalui membran selulosa. Hasil *western blot* dapat mengonfirmasi bahwa protein yang diisolasi adalah protein tunggal atau protein subunit. Protein subunit memperlihatkan dua pita atau lebih, sedangkan protein tunggal menunjukkan satu pita pada *western blot*. Hasil *western blot* yang dilakukan oleh Budiman *et al* dan Puthusseri *et al* menunjukkan bahwa protein ikat folat bukan protein subunit tetapi protein tunggal.[6,8,54,55,67]

Teknik dan hasil isolasi dan purifikasi protein ikat folat dari beberapa penelitian menunjukkan hasil yang beraneka ragam. Sumber dan tujuan isolasi menyebabkan para peneliti menggunakan metode yang berbeda. Sumber dari susu sapi atau ASI menunjukkan berat moleku sekitar 25-35 kDa, sedangkan sumber dari tumbuhan menunjukkan bereat molekul 43 kDa. Perbandingan metode isolasi

dan purifikasi protein dari beberapa penelitian tampak pada tabel 5.[6,10,33,54,55,58]

Tabel 5. Perbandingan Isolasi dan Purifikasi Protein

Peneliti	Sumber	Isolasi	Purifikasi	SDS-PAGE
Sadikin <i>et al</i> tahun 2008.[55]	Susu sapi	<i>Salting out</i> dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	<i>DEAE- Cellulose Chromatography</i>	-
O'Shannessy <i>et al</i> tahun 2011.[58]	Sel jaringan	<i>Salting out</i> dengan NaCl	<i>Anti-FRA affinity chromatography.</i> Dielusi dengan 10mM MOPS, 3M MgCl_2 , 1mM CHAPS, pH 6,8	38 kDa
Subandrate <i>et al</i> tahun 2012.[6]	Susu sapi	<i>Salting out</i> dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	<i>DEAE-Cellulose Chromatography elution with phosphate buffer pH 7.2 containing 5 mM NaCl.</i> <i>Folic acid was immobilized on to pre-activated agarose affinity chromatography.</i> Dielusi dengan bufer asetat pH 3,5.	31 kDa
Budiman <i>et al</i> tahun 2018.[54]	Susu sapi	<i>Salting out</i> dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	<i>DEAE-Cellulose Chromatography.</i> Dielusi dengan 100 mM bufer fosfat salin pH	25-35 kDa

Peneliti	Sumber	Isolasi	Purifikasi	SDS-PAGE
			7,2. <i>Affinity chromatography using aminohexyl-agarose and folic acid linked using carbodiimide</i>	
Puthusseri <i>et al</i> / tahun 2018.[10]	Daun tanaman Arabidopsis	<i>Salting out</i> CaCl ₂ , dan isolasi dengan PEG (Triton X-100)	<i>Methotrexate-sepharose 4B CNBr-activated affinity chromatography</i>	43 kDa
Holm dan Hansen tahun 2020.[33]	ASI/Serum	Isolasi dengan Triton X-100	Kromatografi filtrasi gel, <i>Cation-anion exchange chromatography Methotrexate affinity chromatography</i>	25 kDa/ 29 kDa

BAB VI

PENUTUP

Air susu ibu memberikan manfaat yang banyak bagi bayi. Komposisi ASI yang sesuai dengan kebutuhan bayi membantu proses pertumbuhan dan perkembangan bayi. ASI mengandung berbagai macam protein yang berperan sebagai faktor bioaktif. Salah satu protein dalam ASI yang berperan sebagai faktor bioaktif adalah protein ikat folat.

Pembahasan tentang protein ikat folat sudah memasuki enam dasawarsa sejak pertama kali diidentifikasi dalam susu sapi oleh Ghitis pada tahun 1967. Perkembangan pembahasn protein ikat folat tidak hanya dari susu sapi, tetapi juga pada sumber-sumber lain dari sel manusia dan tumbuhan. Protein ikat folat berhasil diidentifikasi dalam susu kambing, ASI, dan daun tumbuhan. Protein ikat folat juga ditemukan di dalam berbagai sel tubuh manusia termauk sel kanker. Bahkan, penelitian-penelitian selanjutnya mengungkapkan bahwa banyak keluarga protein ikat folat.

Secara nomenklatur FBP dari ASI memiliki nama yang sama dengan FBP dari susu sapi. Namun, FBP dari susu sapi memiliki struktur yang berbeda dengan FBP dari ASI. Pada manusia, protein pengikat folat termasuk dalam famili protein reseptor folat (FR- α , FR- β dan FR- γ). FBP dikenal juga sebagai reseptor folat alfa. FBP dari ASI memiliki keselarasan sekuen asam amino dengan FBP dari susu sapi sebesar 74,09%.

Pada manusia FBP berperan sebagai reservoar dan menjaga bioavailabilitas asam folat. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa FBP berperan menjaga ketersediaan asam folat dalam ASI atau serum dengan cara menghindarkan pencernaan enzimatik folat di lambung, meningkatkan penyerapan folat di intestinum dan meningkatkan retensi folat di serum. Selain itu, peningkatan ekspresi

FBP (FR- α) pada kanker ovarium telah mendorong upaya penggunaan FR- α sebagai marker kanker ovarium. Hasil studi terbaru juga menyebutkan bahwa FBP berpeluang besar sebagai penghantaran obat dalam terapi artritis reumatoid. FBP juga dapat dimanfaatkan sebagai tambahan vaksin untuk mengurangi kekambuhan pada kanker ovarium dan endometriosis. FBP dari susu sapi juga telah dimanfaatkan untuk pengukuran asam folat serum baik dalam bentuk murni atau tidak murni. Teknik yang digunakan untuk pengukuran tersebut adalah *enzyme labeled protein ligand binding assay*.

Isolasi dan purifikasi FBP dari susu sapi telah berhasil dilakukan dengan baik dengan teknik *salting out*, dialisis, kromatografi dan SDS-PAGE. Isolasi dan purifikasi protein ikat folat juga dapat dilakukan dari daun tanaman. Metode dan teknik isolasi protein ikat folat yang digunakan beraneka ragam. Isolasi protein ikat folat dari sel jaringan manusia atau daun tumbuhan memerlukan tahap persiapan sampel terlebih dahulu seperti pembuatan homogenat dan pemberian anti-enzim protease. Sedangkan isolasi protein ikat folat dari susu sapi, ASI atau serum tidak membutuhkan tahapan persiapan. Beberapa peneliti menggunakan amonium sulfat untuk *salting out*, dan beberapa lagi menggunakan polietilen glikol untuk isolasi protein. Penggunaan amonium sulfat lebih dipilih untuk isolasi protein ikat folat dari sumber yang banyak seperti susu sapi, sedangkan penggunaan polietilen glikol lebih dipilih untuk untuk isolasi protein ikat folat dari sumber yang sedikit seperti serum, sel atau jaringan. Beberapa penelitian menggunakan satu jenis kromatografi untuk purifikasi FBP, beberapa lagi menggunakan dua jenis kromatografi. Hasil dari penggunaan satu atau dua kromatografi tidak jauh berbeda, karena peneliti yang menggunakan satu jenis kromatografi lebih memilih kromatografi afinitas. Hasil dari berbagai penelitian juga menunjukkan bahwa protein ikat folat memiliki berat molekul yang beraneka ragam tergantung sumber isolasinya.

Belum ditemukan data terbaru mengenai isolasi protein ikat folat dari ASI. Melihat kemiripan struktur antara FBP dari ASI dan susu sapi, besar kemungkinan FBP dari ASI dapat diisolasi dan dipurifikasi dengan teknik yang sama. Teknik yang digunakan sebaiknya adalah teknik yang paling sederhana, murah dan lebih mudah dilakukan. Teknik *salting out* dengan amonium sulfat 60% dapat dipakai untuk mengisolasi protein ikat folat dari ASI. Untuk pemurnian FBP, satu jenis kromatografi yakni kromatografi afinitas yang direkomendasikan untuk dipilih. Untuk melihat kemurnian hasil isolasi protein ikat folat dapat dilakukan SDS-PAGE.

Dalam mencari literatur terkait protein protein ikat folat disarankan dari sumber-sumber luar negeri seperti *ScienceDirect* atau *PubMed*. Sumber dari *ScienceDirect* lebih banyak menyediakan artikel terkait protein ikat folat dibandingkan *PubMed*. Sumber dari *google scholar* menyediakan lebih banyak literatur daripada *ScienceDirect* atau *PubMed*. Literatur mengenai protein ikat folat belum begitu banyak terutama yang bersumber dari ASI. Oleh karena itu, sangat terbuka peluang untuk menulis artikel atau penelitian mengenai protein ikat folat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Martin CR, Ling PR, Blackburn GL. Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula. *Nutrients* [Internet]. 2016 May 11 [cited 2022 Jun 10];8(5). Available from: [/pmc/articles/PMC4882692/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24882692/)
2. Fields DA, Demerath EW. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin North Am*. 2013;
3. Ballard O, Morrow AL. Human Milk Composition. *Nutrients and Bioactive Factors*. *Pediatric Clinics of North America*. 2013.
4. Gila-Diaz A, Arribas SM, Algara A, Martín-Cabrejas MA, Pablo ÁLL de, Pipaón MS de, et al. A review of bioactive factors in human breastmilk: A focus on prematurity. *Nutrients*. 2019;11(6):1–23.
5. Hendricks GM, Guo M. Bioactive components in human milk [Internet]. *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*. Woodhead Publishing Limited; 2014. 33–54 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857099150.1.33>
6. Subandrate, Gunarti DR, Sadikin M. Properties of Folate Binding Protein Purified from Cow's Milk. *HAYATI J Biosci* [Internet]. 2012;19(3):105–9. Available from: <https://doi.org/10.4308/hjb.19.3.105>
7. Subandrate, Gunarti DR, Sadikin M. Karakteristik dan Peran Protein Ikat Folat (PIF). *J Kedokt dan Kesehat* [Internet]. 2016;3(1):341–6. Available from: <https://ejournal.unsri.ac.id/index.php/jkk/article/view/2849>
8. Nygren-Babol L, Jägerstad M. Folate-Binding Protein in Milk: A Review of Biochemistry, Physiology, and Analytical Methods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2012;52(5):410–25.
9. Van Der Heijden JW, Oerlemans R, Dijkmans BAC, Qi H, Van Der Laken CJ, Lems WF, et al. Folate receptor β as a potential delivery route for novel folate antagonists to macrophages in the synovial tissue of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum*. 2009;60(1):12-21.
10. Puthusseri B, Divya P, Lokesh V, Kumar G, Savanur MA,

- Neelwarne B. Novel Folate Binding Protein in Arabidopsis Expressed during Salicylic Acid-Induced Folate Accumulation. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2018 Jan 17 [cited 2022 Jun 9];66(2):505–11. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jafc.7b04236>
11. Washington RW, Knecht DA. Actin binding domains direct actin-binding proteins to different cytoskeletal locations. *BMC Cell Biol*. 2008;9(10):1–16.
 12. Scaglione F, Panzavolta G. Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. *Xenobiotica*. 2014;44(5):480–8.
 13. Merzel RL, Frey C, Chen J, Garn R, Van Dongen M, Dougherty CA, et al. Conjugation Dependent Interaction of Folic Acid with Folate Binding Protein. *Bioconjug Chem*. 2017;28(9):2350–2360.
 14. Verwei M, Arkbåge K, Mocking H, Havenaar R, Groten J. The Binding of Folic Acid and 5-Methyltetrahydrofolate to Folate-Binding Proteins during Gastric Passage Differs in a Dynamic in Vitro Gastrointestinal Model. *J Nutr*. 2004;134(1):31–37.
 15. Bisseling TM, Steegers EAP, van den Heuvel JJM, Siero HLM, van de Water FM, Walker AJ, et al. Placental folate transport and binding are not impaired in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Placenta*. 2004;25(6):588–93.
 16. Luka Z. Methyltetrahydrofolate in Folate-Binding Protein Glycine N-Methyltransferase. *Vitam Horm*. 2008;79:325–45.
 17. Merzel RL, Chen JJ, Marsh ENG, Holl MMB. Folate binding protein - Outlook for drug delivery applications. *Chinese Chem Lett*. 2015;26(4):426–30.
 18. Dror DK, Allen LH. Overview of Nutrients in Human Milk. *Adv Nutr* [Internet]. 2018 May 1;9(suppl_1):278S-294S. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29846526>
 19. Golan Y, Assaraf YG. Genetic and Physiological Factors Affecting Human Milk Production and Composition. *Nutrients* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2022 Jun 21];12(5). Available from: [/pmc/articles/PMC7284811/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/344811/)
 20. Alex A, Bhandary E, McGuire KP. Anatomy and physiology of the breast during pregnancy and lactation. *Adv Exp Med Biol*

- [Internet]. 2020 [cited 2022 Jun 21];1252:3–7. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-41596-9_1
21. Mosca F, Gianni ML. Human milk: composition and health benefits. *La Pediatria medica e chirurgica: Medical and surgical pediatrics*. 2017.
 22. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*. 2015.
 23. Butts CA, Hedderley DI, Herath TD, Paturi G, Glyn-Jones S, Wiens F, et al. Human milk composition and dietary intakes of breastfeeding women of different ethnicity from the manawatu-wanganui region of New Zealand. *Nutrients*. 2018;10(9):1–16.
 24. Kim SY, Yi DY. Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. *Clin Exp Pediatr* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2022 Jun 11];63(8):301–9. Available from: <http://www.e-cep.org/journal/view.php?doi=10.3345/cep.2020.00059>
 25. Perrella S, Gridneva Z, Lai CT, Stinson L, George A, Bilston-John S, et al. Human milk composition promotes optimal infant growth, development and health. *Semin Perinatol*. 2021 Mar 1;45(2):151380.
 26. Allen LH, Donohue JA, Dror DK. Limitations of the Evidence Base Used to Set Recommended Nutrient Intakes for Infants and Lactating Women. *Adv Nutr* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2022 Jul 12];9(Suppl 1):295S. Available from: </pmc/articles/PMC6008957/>
 27. Kementerian Kesehatan. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 28 Tahun 2019 tentang Angka Kecukupan Gizi yang Dianjurkan Untuk Masyarakat Indonesia [Internet]. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2019. Available from: <https://peraturan.bpk.go.id/Home/Details/138621/permenkes-no-28-tahun-2019>
 28. Pemerintah RI. Peraturan Pemerintah RI No 33 Tahun 2012 Tentang Pemberian Air Susu Ibu Eksklusif. Pemerintah RI. Jakarta: Pemerintah RI; 2012.
 29. Kennelly PJ, Rodwell VW. Proteins: Determination of Primary Structure. In: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly

- PJ, Weil PA, editors. Harper's Illustrated Biochemistry, 31e [Internet]. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2018. Available from: <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1160188691>
30. Bender D. Micronutrients: Vitamins & Minerals. In: Harper's Illustrated Biochemistry. 31st ed. New York: McGraw-Hill Education; 2018. p. 1289–319.
 31. Gunarti DR, Rahmi H, Sadikin M. Isolation and Purification of Thiamine Binding Protein from Mung Bean. HAYATI J Biosci [Internet]. 1970 Jan 1;20(1 SE-Articles):1. Available from: <https://journal.ipb.ac.id/index.php/hayati/article/view/6639>
 32. Combs Gerald F. J, McClung JP. Chapter 3 - General properties of vitamins. In: Combs Gerald F. J, McClung JPBT-TV (Sixth E, editors. Academic Press; 2022. p. 35–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323904735000148>
 33. Holm J, Hansen SI. Characterization of soluble folate receptors (folate binding proteins) in humans. Biological roles and clinical potentials in infection and malignancy. Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics [Internet]. 2020;1868(10):140466. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140466>
 34. Ghitis J, Lora C. The Folate Binding in Milk. Am J Clin Nutr [Internet]. 1967 Jan 1 [cited 2022 Jun 21];20(1):1–4. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/20/1/1/4787601>
 35. Ford JE, Salter DN, Scott KJ. The folate-binding protein in milk. J Dairy Res [Internet]. 1969 [cited 2022 Jun 21];36(3):435–48. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research/article/abs/folatebinding-protein-in-milk/5E98598384ABF4296AF479289A5D02F3>
 36. Salter DN, Ford JE, Scott KJ, Andrews P. Isolation of the folate-binding protein from cow's milk by the use of affinity chromatography. Febs Lett. 1972;20(3):302–6.
 37. Waxman S, Schreiber C. Characteristics of Folic Acid-binding Protein in Folate-deficient Serum. Blood [Internet]. 1973 Aug 1

- [cited 2022 Jun 21];42(2):291–301. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/42/2/291/40216/Characteristics-of-Folic-Acid-binding-Protein-in>
38. Waxman S, Schreiber C. Purification and Characterization of the Low Molecular Weight Human Folate Binding Protein Using Affinity Chromatography. *Biochemistry* [Internet]. 1975 Dec 1 [cited 2022 Jun 21];14(25):5422–8. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00696a007>
 39. Rubinoff M, Schreiber C, Waxman S. The isolation and characterization of the folate binding protein from goat milk. *FEBS Lett.* 1977;75(1–2):244–8.
 40. Svendsen IB, Martin B, Pedersen TG, Hansen SI, Holm J, Lyngbye J. Isolation and characterization of the folate-binding protein from cow's milk. *Carlsberg Res Commun.* 1979;44(2):89–99.
 41. Salter DN, Scott KJ, Slade H, Andrews P. The preparation and properties of folate-binding protein from cow's milk. *Biochem J* [Internet]. 1981 Feb 1 [cited 2022 Jun 21];193(2):469–76. Available from: [/biochemj/article/193/2/469/17267/The-preparation-and-properties-of-folate-binding](https://pubs.rsc.org/doi/10.1039/c1bm00017a)
 42. Selhub J, Franklin WA. The folate-binding protein of rat kidney. Purification, properties, and cellular distribution. *J Biol Chem.* 1984 May 25;259(10):6601–6.
 43. Selhub J, Nakamura S, Carone FA. Renal folate absorption and the kidney folate binding protein. II. Microinfusion studies. <https://doi.org/10.1152/ajprenal19872524F757> [Internet]. 1987 [cited 2022 Jun 21];252(4). Available from: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.1987.252.4.F757>
 44. Sadasivan ES, Rothenberg SP. The Complete Amino Acid Sequence of a Human Folate Binding Protein from KB Cells Determined from the cDNA. *J Biol Chem.* 1989 Apr 5;264(10):5806–11.
 45. Sadasivan E, Cedeno M, Rothenberg SP. Genomic organization of the gene and a related pseudogene for a human folate binding protein. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr.* 1992 May 7;1131(1):91–4.
 46. Toffoli G, Cernigoi C, Russo A, Gallo A, Bagnoli M, Boiocchi M.

- Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers. *Int J Cancer*. 1997;
47. Hutchinson ML, Jones M, Nixon PF. Stability of labile folate is enhanced by binding milk folate-binding protein - UQ eSpace. *Aust J Dairy Technol* [Internet]. 2000 [cited 2022 Jun 21];55(2):98–98. Available from: <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:140779>
 48. Nygren-Babol L, Sternesjö Å, Björck L. Factors influencing levels of folate-binding protein in bovine milk. *Int Dairy J*. 2004 Sep 1;14(9):761–5.
 49. Arcot J, Shrestha A. Folate: Methods of analysis. *Trends Food Sci Technol*. 2005;16(253–266).
 50. Henne WA, Doorneweerd DD, Lee J, Low PS, Savran C. Detection of Folate Binding Protein with Enhanced Sensitivity Using a Functionalized Quartz Crystal Microbalance Sensor. *Anal Chem* [Internet]. 2006 Jul 15 [cited 2022 Jun 21];78(14):4880–4. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac060324r>
 51. Christensen U, Holm J, Hansen SI. Stopped-Flow Kinetic Studies of the Interaction of Bovine Folate Binding Protein (FBP) and Folate. *Biosci Reports* 2006 264 [Internet]. 2006 Sep 22 [cited 2022 Jun 21];26(4):291–9. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10540-006-9023-y>
 52. Greene J, Schneble E, Berry J, Trappey A, Vreeland T, Clifton G, et al. Preliminary results of the Phase IIa trial of a folate binding protein (FBP) adjuvant cancer vaccine (E39+GM-CSF) in ovarian and endometrial cancer patients to prevent recurrence. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2014;2(3):P74. Available from: <https://doi.org/10.1186/2051-1426-2-S3-P74>
 53. Merzel RL, Boutom SM, Chen J, Frey C, Shedden K, Marsh ENG, et al. Folate binding protein: therapeutic natural nanotechnology for folic acid, methotrexate, and leucovorin. *Nanoscale* [Internet]. 2017 Feb 16 [cited 2022 Jun 21];9(7):2603–15. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/nr/c6nr09060e>
 54. Budiman M, Sadikin M, Prijanti A. Human Serum Folate can be Measured Using Folate Binding Protein Linked to Enzyme-

- Labeled Protein Ligand Binding Assay (ELPLBA) as well as ELISA. *Acta Biochim Indones*. 2018;1(2):59–67.
55. Sadikin M, Mardiana, Harahap IP. Folic Acid Technique by Protein-ligand Binding Method Using Folate Binding Protein from Cow's Milks as Binder Protein. In: *The 4th Indonesian Biotechnology Conference*. Bogor: Indonesian Biotechnology; 2008.
 56. Jaiswal N, Saraswat S, Ratnam M, Isailovic D. Analysis of Folate Binding Protein N-linked Glycans by Mass Spectrometry. *J Proteome Res [Internet]*. 2012 Mar 2;11(3):1551–60. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr2006044>
 57. Antony AC, Utley C, Van Horne KC, Kolhouse JF. Isolation and characterization of a folate receptor from human placenta. *J Biol Chem*. 1981;
 58. O'Shannessy DJ, Somers EB, Albone E, Cheng X, Park YC, Tomkowicz BE, et al. Characterization of the human folate receptor alpha via novel antibody-based probes. *Oncotarget*. 2011;
 59. Standard Protein BLAST [Internet]. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
 60. Multiple Sequence Alignment [Internet]. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
 61. Yi W, Brunzelle JS, Li J, Yong L, Xu HE, Melcher K, et al. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. *Nature*. 2013;500(7463):486–9.
 62. Della-Longa S, Arcovito A. Structural and functional insights on folate receptor a (FRa) by homology modeling, ligand docking and molecular dynamics. *J Mol Graph Model*. 2013;44:197–207.
 63. Alpers DH. Absorption and blood/cellular transport of folate and cobalamin: Pharmacokinetic and physiological considerations. *Biochimie [Internet]*. 2016 Jul;126:52–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908415003533>
 64. Lutz RJ. Targeting the folate receptor for the treatment of ovarian cancer. *Transl Cancer Res*. 2015;4(1):118–26.
 65. Kalli KR, Oberg AL, Keeney GL, Christianson TJH, Low PS,

- Knutson KL, et al. Folate receptor alpha as a tumor target in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;108(3):619–26.
66. Samadian H, Merzel RL, Dyson JM, Chen J, Frey C, Jones A, et al. Anti-tumor Effect of Folate-Binding Protein: In Vitro and in Vivo Studies. *Mol Pharm* [Internet]. 2022 Mar 7 [cited 2022 Jun 21];19(3):843–52. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00794>
67. Lee CH. A simple outline of methods for protein isolation and purification. *Endocrinol Metab.* 2017;32(1):18–22.
68. Grant GA. Isolation/Purification of Proteins. *Encycl Cell Biol.* 2016;1:66–74.
69. Duong-Ly KC, Gabelli SB. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods Enzymol.* 2014;541(March):85–94.
70. Wong PT, Choi SK. Mechanisms and Implications of Dual-Acting Methotrexate in Folate-Targeted Nanotherapeutic Delivery. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2015 Jan 13 [cited 2022 Jun 20];16(1):1772. Available from: [/pmc/articles/PMC4307333/](http://pmc/articles/PMC4307333/)
71. Lima A, Sousa H, Monteiro J, Azevedo R, Medeiros R, Seabra V. Genetic polymorphisms in low-dose methotrexate transporters: current relevance as methotrexate therapeutic outcome biomarkers. <http://dx.doi.org/10.2217/pgs14116> [Internet]. 2014 Oct 23 [cited 2022 Jun 20];15(12):1611–35. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/pgs.14.116>

BIODATA PENULIS

dr. Subandrate, M.Biomed dilahirkan di Desa Tempirai, Kec. Talang Ubi, Muara Enim, Sumatera Selatan, tanggal 16 Mei 1984. Penulis menyelesaikan pendidikan dasar di SD negeri 2 Tempirai pada tahun 1996, pendidikan menengah pertama di SLTP negeri 1 Talang Ubi pada tahun 1999, dan pendidikan menengah atas di SMA negeri 1 Palembang pada tahun 2002. Penulis mendapatkan gelar dokter dari Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya pada tahun 2008, dan magister biomedik kekhususan biokimia pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia pada tahun 2011. Pada tahun 2020, penulis melanjutkan pendidikan strata tiga di Program Studi Sains Biomedik Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya. Sejak tahun 2009, penulis mengabdikan diri sebagai dosen pada Bagian Biokimia dan Kimia Medik Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya.



Dr. dr. Mgs. M. Irsan Saleh, M.Biomed dilahirkan di Palembang, Sumatera Selatan, pada tanggal 29 September 1966. Penulis menyelesaikan pendidikan dokter di Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya pada tahun 1993, pendidikan magister ilmu biomedik di Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia pada tahun 2003, dan pendidikan doktor biomedik di Program Studi Doktor Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia pada tahun 2009. Sejak tahun 1996, penulis berprofesi sebagai dosen pada Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya.



Dr. drg. Dwirini Retno Gunarti, MS

dilahirkan di Pati, Provinsi Jawa Tengah, pada tanggal 23 Januari 1961. Penulis menyelesaikan pendidikan profesi dokter gigi pada tahun 1985 pada Program Studi Kedokteran Gigi Universitas Indonesia, pendidikan magister sains tahun 1996 pada Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, dan pendidikan doktor ilmu biomedik tahun 2016 pada Program Studi Doktor Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Penulis merupakan dosen pada Bagian Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia sejak tahun 1989.



Prof. Hermansyah, S.Si, M.Si, PhD

dilahirkan di Palembang, Sumatera Selatan, pada tanggal 19 November 1971. Penulis menyelesaikan pendidikan strata satu di Program Studi Kimia Fakultas MIPA, Universitas Sriwijaya, pada tahun 1996, pendidikan strata dua di Program Studi Kimia Fakultas MIPA, Institut Teknologi Bandung, pada tahun 2002, dan pendidikan strata tiga di Departement Advanced Science and Biotechnology, Osaka University, pada tahun 2010. Sejak tahun 1997, penulis berprofesi sebagai dosen pada Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Sriwijaya. Penulis dikukuhkan sebagai guru besar bidang ilmu kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Sriwijaya pada tanggal 2 Maret 2022 dengan judul orasi "Eksplorasi Yeast Untuk Produksi Bioetanol".

