

Optimasi Pengendapan Albumin dengan Variasi Suhu, pH dan Konsentrasi Etanol dalam Plasma Darah melalui Metode *Simplex Lattice Design*

Optimization of Albumin Precipitation with Variations in Temperature, pH and Ethanol Concentration in Blood Plasma by the Simplex Lattice Design Method

Trisna Yuliana^{1,*}, Sandi Adityawarman², Agus Setiyawan²

¹ Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Informatika, Universitas Jenderal Achmad Yani, Jl. Terusan Jenderal Sudirman, PO BOX 148, Cimahi

² Divisi Vaksin Bakteri, Bagian Hib., PT. Biofarma, Bandung

*E-mail: trisyuliana@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.26874/jkk.v2i2.36>

Received: 29 Oct 2019, Revised: 21 Nov 2019, Accepted: 22 Nov 2019, Online: 30 Nov 2019

Abstrak

Albumin digunakan untuk mengatasi kondisi hipoalbuminemia pada berbagai penyakit. Pemanfaatan bahan baku albumin dari darah hasil donor yang sudah melebihi batas waktu penggunaan dapat memberi manfaat, yaitu mengurangi ketergantungan terhadap albumin impor dan dapat mengurangi biaya pengolahan darah limbah. Kemurnian dan perolehan albumin dapat dipengaruhi oleh berbagai parameter diantaranya; suhu, pH dan konsentrasi etanol. Pada penelitian ini dilakukan proses optimasi menggunakan metode *Simplex Lattice Design* agar diperoleh komposisi variasi parameter yang optimal dari 7 (tujuh) komposisi variasi parameter untuk mendapatkan albumin dengan kadar yang cukup tinggi. Albumin dipisahkan berdasarkan metode fraksinasi etanol melalui perbedaan kelarutan protein dalam plasma. Berdasarkan uji anava, ke-7 (tujuh) komposisi variasi parameter yang dibuat menunjukkan perbedaan yang nyata dengan $p = 0,0282 (< 0,05)$ dan $F_{hitung} > F_{tabel}$. Hasil evaluasi menunjukkan bahwa komposisi formula ke-5 (lima) menunjukkan respon albumin optimal dengan parameter suhu $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 4,8 dan konsentrasi etanol 40%. Kadar albumin yang diperoleh dengan komposisi tersebut yaitu $53,59\text{ }\mu\text{g}$.

Kata kunci: Albumin, suhu, pH, etanol, dan *Simplex Lattice Design*

Abstract

Albumin is used to treat hypoalbuminemia in various diseases. The utilization of albumin raw materials from donor blood that has exceeded the time limit of use could be advantages, which are reducing dependence on imported albumin and could reduce the cost of processing waste blood. The purity and resulting of albumin can be influenced by various parameters including; temperature, pH and ethanol concentration. In this research, the optimization process is conduct using the *Simplex Lattice Design* method in order to obtain an optimal composition variation of 7 (seven) parameters variation composition to obtain albumin with a high concentration. Albumin is separated by ethanol fractionation method through differences in protein solubility in plasma. Based on Anova test, the 7 (seven) composition variations of the parameters showed significant differences with $p = 0.0282 (< 0.05)$ and $F_{test} > F_{table}$. The evaluation results show that the composition of the 5th composition formula shows the optimal albumin response with temperature parameters $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 4.8 and ethanol concentration of 40%. The albumin content obtained with the composition is $53.59\text{ }\mu\text{g}$.

Keywords: Albumin, temperature, pH, ethanol, and *Simplex Lattice Design*



1 Pendahuluan

Albumin telah dipakai sejak puluhan tahun yang lalu sebagai salah satu pilihan terapi dalam praktek medis antara lain untuk pemulihan serta menjaga kondisi volume sirkulasi darah pasien saat kondisi trauma, pembedahan, pendarahan, perawatan luka bakar, pertukaran plasma, hypoproteinemia, fetal erythroblastosis, dan ascites yang disebabkan oleh sirosis hati [1]. *Human Serum Albumin* (HSA) merupakan salah satu protein dalam plasma darah, yang berfungsi sebagai alat transpor untuk hormon, enzim, asam lemak, ion logam, dan obat. Albumin adalah protein yang mampu larut dalam air, memiliki ukuran molekul 66.000 Da dengan struktur molekul yang cukup stabil. Dalam kondisi fisiologi normal, albumin memiliki kontribusi 80% untuk tekanan osmosis koloidal (oncotic) dalam plasma darah.

Berdasarkan data IMS Health, potensi pasar nasional albumin diperkirakan mencapai Rp 400 M pada tahun 2014, dan masih dipenuhi dengan *human serum albumin* (HSA) impor. Hal ini menunjukkan bahwa kebutuhan albumin dalam negeri sangat tinggi. Salah satu sumber bahan baku albumin adalah darah hasil donor yang sudah melebihi batas waktu yang ditentukan. Secara teknologi pengolahan dan ketersediaan bahan baku albumin sendiri sudah dapat diproduksi di Indonesia. Palang Merah Indonesia menyatakan proses pengolahan darah membutuhkan biaya cukup tinggi, karena untuk mengolah limbah medis ini per tahun nya diperlukan biaya yang sangat besar. Oleh karena itu, pemanfaatan darah menjadi albumin dapat memberi manfaat, yaitu mengurangi ketergantungan terhadap albumin impor dan dapat mengurangi biaya pengolahan limbah darah [2].

Proses pemisahan albumin dari plasma darah dapat dilakukan dengan beberapa metode, diantaranya metode fraksinasi etanol yang dikembangkan oleh Cohn tahun 1946. Metode Fraksinasi etanol merupakan metode yang paling banyak digunakan, untuk memisahkan albumin berdasarkan perbedaan kelarutan protein plasma dalam campuran etanol [3]. Keuntungan dari metode Fraksinasi etanol adalah metode ini cukup sederhana, menggunakan reagen yang minimal dan dapat digunakan untuk memisahkan albumin dari plasma darah dalam jumlah besar dengan biaya yang lebih rendah [4].

Cohn, *et al.* mengembangkan proses pemisahan plasma dan menentukan lima variabel yang dapat mempengaruhi pemisahan protein plasma berdasarkan pH, kekuatan ion, konsentrasi

etanol, suhu dan konsentrasi protein. Kelarutan protein dapat berkurang dengan dipengaruhi oleh pH larutan, dan penambahan etanol, atau pelarut organik yang mudah larut dalam air sedangkan proses pemisahan dilakukan pada suhu rendah bertujuan untuk mencegah protein terdenaturasi. Hasil fraksinasi plasma protein diperoleh lima fraksi protein yaitu fraksi I (Fibrinogen, faktor VIII dan fibronectin), Fraksi II (IgG, IgA, Faktor II, Faktor VII, Faktor IX, Faktor X dan globulin), Fraksi III (α -globulin dan β -globulin, igM dan komplemen), Fraksi IV (α -globulin dan β -globulin, transferin dan haptoglobulin) dan Fraksi V (Albumin dan α -globulin dan β -globulin). Kelima fraksi tersebut dapat diperoleh dengan mengatur pH dan konsentrasi etanol [5]. Albumin memiliki kelarutan yang tinggi dan titik isoelektrik rendah dari plasma protein. Oleh karenanya perlu dilakukan penelitian untuk melihat pengaruh faktor suhu, pH, dan konsentrasi etanol terhadap kualitas hasil kemurnian albumin. Ketiga pengaruh ini dievaluasi dengan mengubah level parameter secara bersamaan kemudian diolah dengan teknik optimasi menggunakan metode *Simplex Lattice Design* agar di peroleh komposisi parameter yang optimal untuk mendapatkan albumin dengan kemurnian paling tinggi dalam plasma darah [3,6].

2 Metode Penelitian

2.1. Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan yaitu: sampel plasma darah, etanol 96%, asam asetat, water for injection (WFI), Reagen BCA Protein Assay A (Natrium karbonat, Natrium bikarbonat, asam dicinchoninat dan natrium tartrat dalam 0,1 M NaOH) dan Reagen BCA Protein Assay A (4% CuSO₄), standar albumin, reagen ladder protein, running buffer, pre cast gel, buffer sample, larutan pewarnaan gel & larutan pencuci gel, Microplate spektrofotometer dan Sodium Dodesil Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)-mini protein II Dual Slab Cell (BioRad) [7].

2.2. Tahapan Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium PT Biofarma. Sampel plasma darah beku setelah dicairkan pada suhu 2 – 4 °C kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. 140 mL bagian supernatant dibagi menjadi 7 (tujuh) bagian. Ketujuh bagian ini diberi perlakuan dengan variasi konsentrasi etanol, suhu dan pH yang berbeda. Kedalam masing masing

bagian ditambahkan etanol secara perlahan hingga mencapai konsentrasi tertentu. pH diatur dengan menggunakan larutan asam asetat 4 M. dan suhu. Pemberian perlakuan dapat dilihat pada Table 1. Masing masing bagian disentrifugasi kembali pada 6000 rpm selama 10 menit. Endapan yang diperoleh kemudian dilarutkan dalam WFI hingga volume mencapai 20mL dan ditentukan kandungan total protein menggunakan Microplate spektrofotometer serta kandungan albumin menggunakan SDS-PAGE.

Rentang konsentrasi larutan standar dibuat bervariasi dari 25 – 2000 µg/mL. campuran 25 mL reagen A dan 0,5 mL reagen B digunakan sebagai blanko pelarut. Pengukuran serapan menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 562 nm dengan cara mengambil 25 µL masing masing larutan standar dan 200 µL blanko pelarut kedalam masing masing sumur microplate. Setelah dihomogenkan dengan shaker 30 detik, microplate ditutup dan diinkubasi pada 37 °C selama 30 menit. Pembacaan serapan dilakukan setelah setiap larutan standar didinginkan pada suhu kamar.

Sebanyak 15 µL setiap variasi larutan endapan protein sampel dalam WFI ditambahkan 12,4 µL buffer sampel dalam wadah eppendorf, kemudian dipanaskan pada suhu 100 °C selama 2 menit. Setelah didinginkan, 10 µL setiap variasi larutan sampel dimasukkan kedalam masing masing sumur gel pada alat elektroforesis secara hati hati.

Setelah perangkat elektroforesis dihubungkan dengan arus listrik 120 V selama 60 menit, gel dilepaskan dan direndam dalam 50mL larutan pewarna sambal dikocok 30 menit. Berikutnya dilakukan pencucian tiga kali ulangan masing masing menggunakan 50 mL larutan pencuci sambil dishaker 30 menit. Setelah direndam dalam WFI, albumin diukur dengan densitometer yaitu dengan cara dilakukan scanning gel menggunakan alat View fix 700. Data yang diperoleh dianalisis secara densitometri dan hasilnya diolah dengan perangkat lunak total lab untuk mendapatkan nilai respon albumin. Nilai respon ini selanjutnya diolah dan dievaluasi dengan menggunakan perangkat lunak Design Expert 10.0 berdasarkan metode *simplex lattice design*.

3 Hasil dan Diskusi

Pengendapan albumin dalam plasma darah dipengaruhi oleh beberapa parameter, diantaranya suhu, pH dan konsentrasi etanol. Albumin dalam plasma darah diendapkan dengan metode fraksinasi etanol, menggunakan tujuh formula yang diperoleh dari metode simplex lattice design dengan masing – masing nilai parameter yang berbeda.

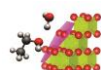
Menurut Bolton dan Bon, 2004, *simplex lattice design* secara umum terdiri dari serangkaian formula dan memvariasikan komposisi variabel formula secara sistematis. Variasi nilai parameter digunakan untuk mendapatkan hasil albumin yang optimal dari proses pengendapan yang dilakukan dalam satu tahap pada penelitian [8], berbeda dengan penelitian yang dilakukan Cohn 1946, Tanaka 1998, dan Denizli 2011 yang dilakukan dengan memisahkan plasma darah dalam beberapa tahap pengendapan [3-5]. Komposisi variasi yang dimaksud untuk kepentingan pengolahan data dengan metode smplex lattice design dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Variasi Penelitian

Formula	Parameter		
	Suhu (°C)	pH	[Etanol] (%)
Formula 1	0	3,8	20
Formula 2	-10	5,8	20
Formula 3	-10	3,8	60
Formula 4	-5	4,8	20
Formula 5	-10	4,8	40
Formula 6	-5	3,8	40
Formula 7	-3.3	4,5	46

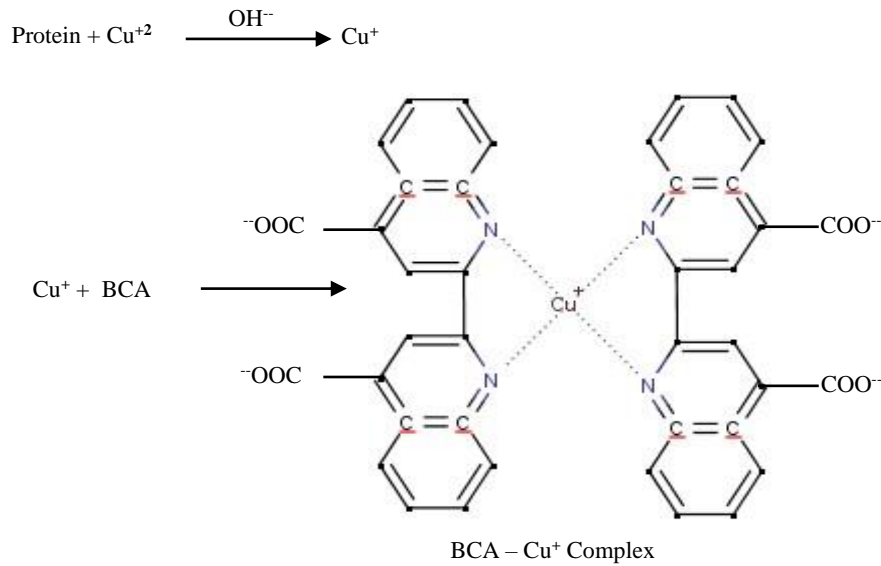
Table 2. Kandungan protein dalam setiap formula

Formula	Replikasi	[Protein] (µg/mL)
Formula 1	1	891,252
	2	838,777
Formula 2	1	398,702
	2	402,073
Formula 3	1	574,348
	2	557,364
Formula 4	1	586,092
	2	533,001
Formula 5	1	1194,913
	2	1199,676
Formula 6	1	870,244
	2	982,391
Formula 7	1	1320,788
	2	1171,401

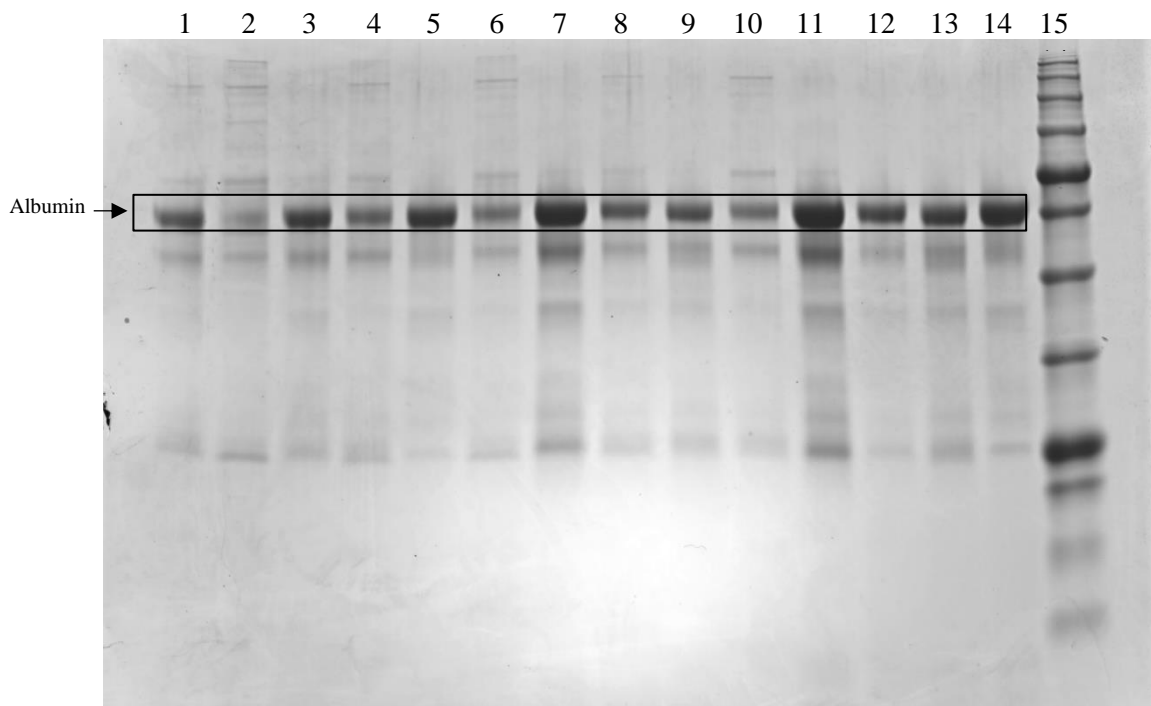


Plasma darah diendapkan dan dilakukan pengukuran kadar protein total untuk mengetahui kadar protein dalam sampel masing – masing formula penelitian, hasil pengukuran tersebut kemudian dijadikan data untuk pengujian *Sodium*

Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). Kadar protein total dalam masing masing formula dapat dilihat pada Tabel 2.

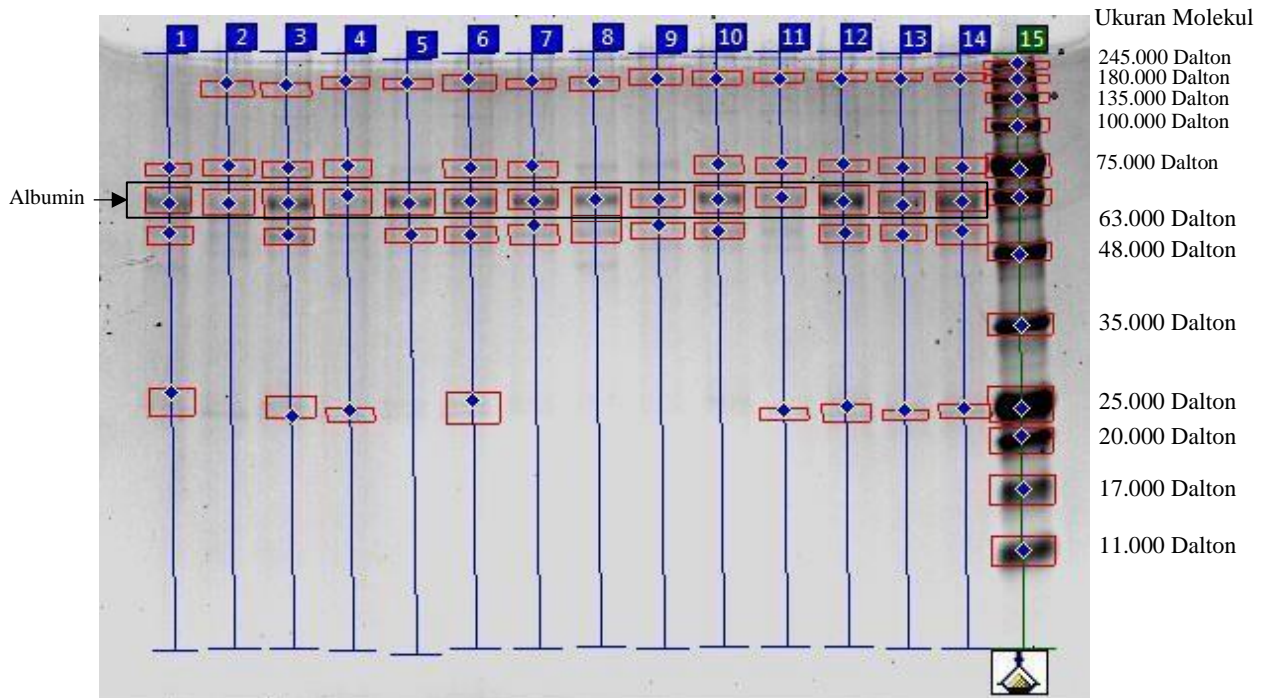


Gambar 1. Pembentukan kompleks warna ungu menggunakan reagen *bicinchoninic acid* (BCA) [10]



Gambar 2. Hasil scanning Gel Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) dengan Viewpix 700.

Keterangan : Formula 1 ; 1 dan 8, Formula 2 ; 2 dan 9, Formula 3 ; 3 dan 10, Formula 4 ; 4 dan 11, Formula 5 ; 5 dan 12, Formula 6 ; 6 dan 13, Formula 7 ; 7 dan 14, serta Protein ladder ; 15



Gambar 3. Hasil analisis Gel Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) dengan aplikasi totallab.

Keterangan : Formula 1 ; 1 dan 8, Formula 2 ; 2 dan 9, Formula 3 ; 3 dan 10, Formula 4 ; 4 dan 11, Formula 5 ; 5 dan 12, Formula 6 ; 6 dan 13, Formula 7 ; 7 dan 14, serta Protein ladder ; 15

Pengukuran protein total metode bicinchoninic acid (BCA), berdasarkan pada konversi Cu^{2+} menjadi Cu^+ dalam kondisi basa. Protein akan bereaksi dengan CuSO_4 dalam suasana basa menghasilkan Cu^+ kemudian dideteksi dengan reagen bicinchoninic acid (BCA) yang stabil dalam kondisi basa seperti dalam Gambar 1. Hasil reaksi ialah terbentuknya warna ungu yang dapat diukur pada panjang gelombang 562 nm, Cu^+ yang terbentuk dalam uji menunjukkan konsentrasi protein [9].

Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) adalah metode yang digunakan untuk menganalisis campuran protein, berdasarkan pada pemisahan protein sesuai ukuran molekul [9]. Data hasil scanning formula sampel menggunakan alat Viewfix 700 dapat dilihat pada Gambar 2. Dan pada Gambar 3 menunjukkan data hasil scanning kemudian dianalisis dengan aplikasi Totallab untuk memperlihatkan hasil ukuran molekul.

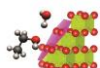
Berdasarkan data protein ladder yang dijadikan sebagai pemandu, albumin memiliki ukuran molekul 66.000 Dalton, hasil pemisahan plasma protein pada gel elektroforesis menunjukkan albumin berada diantara ukuran molekul 63.000 dan 75.000 Dalton.

Hasil pengukuran konsentrasi albumin dengan densitometer untuk setiap komposisi formula yang dirancang dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan hasil pengolahan data menggunakan analisis varian menggunakan perangkat lunak Design Expert diperoleh nilai p sebesar 0,0282 ($< 0,05$) dan nilai F hitung 4,88 ($> 3,87$: $F_{\text{tabel}} (db 6,7; 95\%)$) hal ini menunjukkan terdapat perbedaan hasil albumin yang nyata diantara komposisi formula dalam penelitian yang dirancang.

Dari hasil analisis simplex lattice design untuk albumin, kemudian dibuat contour plot seperti tampak pada Gambar 4. Notasi pada setiap sudut segitiga menunjukkan nilai maksimal untuk setiap parameter. Notasi A pada gambar segitiga menunjukkan suhu pada 0°C , Notasi B menunjukkan pH pada 5,8 dan Notasi C menunjukkan konsentrasi etanol 60%. Pada Gambar tersebut menunjukkan daerah optimal untuk respon albumin yang ditandai dengan warna kuning pada gambar. Daerah optimal tersebut berada diantara parameter pH dan konsentrasi etanol.

Hal ini pun menunjukkan hasil yang signifikan antar parameter penelitian, dari tiga variabel yang digunakan; pH, konsentrasi etanol, dan suhu,

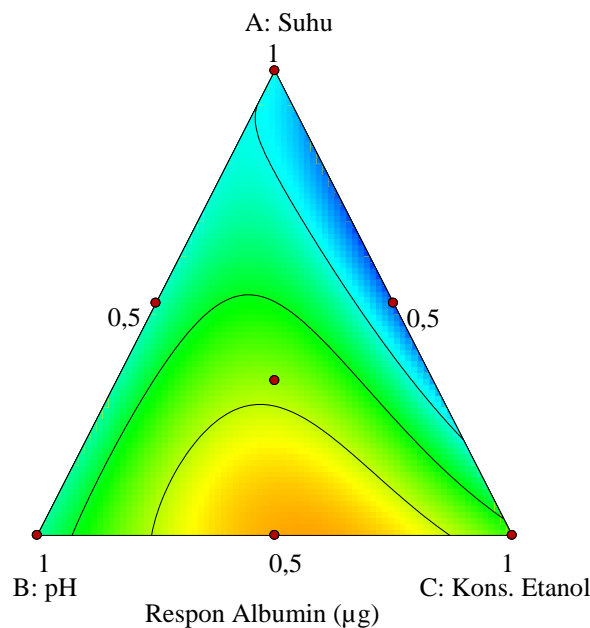


parameter pH dan konsentrasi etanol memiliki pengaruh yang lebih besar pada proses pengendapan albumin dibanding dengan suhu. Suhu yang digunakan selama proses pengendapan antara 0°C sampai -10°C untuk menjaga agar

protein tidak terjadi denaturasi. Suhu rendah selama proses pengendapan menurut Oss, 1989 membantu menurunkan konstanta dielektrik protein dengan etanol, sehingga menyebabkan berkurangnya kelarutan protein [11].

Tabel 3. Hasil Respon Albumin

Formula	Parameter			Respon Albumin (µg)	Rata-Rata Respon Albumin (µg)
	Suhu (°C)	pH	[Etanol] (%)		
Formula 1	0	3,8	20	42,252	39,724
				37,196	
Formula 2	-10	5,8	20	45,614	42,160
				38,705	
Formula 3	-10	3,8	60	49,777	46,262
				42,746	
Formula 4	-5	4,8	20	41,164	41,275
				41,385	
Formula 5	-10	4,8	40	57,497	53,590
				49,683	
Formula 6	-5	3,8	40	33,843	35,476
				37,108	
Formula 7	-3.3	4,5	46	50,959	48,842
				46,725	



Gambar 4. Contour plot respon albumin

Setiap protein mempunyai daya kelarutan yang berbeda – beda dalam air atau pelarut organik. Albumin memiliki beberapa sifat unik yang memungkinkan pemisahan relatif sederhana dan efektif dengan metode pengendapan. Albumin memiliki kelarutan tinggi dan titik isoelektrik terendah [1]. Titik isoelektrik yaitu dimana pH

protein menunjukkan jumlah muatan yang sama antara muatan positif dan negatif, sehingga pada keadaan ini kemampuan protein untuk berinteraksi dengan molekul air menjadi rendah dan mengakibatkan daya larut protein menjadi minimum [12]. Pengendapan protein dapat dilakukan berdasarkan pada pengaturan pH, setiap

jenis protein memiliki pH yang berbeda dalam proses pengendapan, sehingga tidak semua protein dapat diendapkan dalam suasana pH yang sama. Pada umumnya molekul protein mempunyai daya kelarutan minimum pada pH atau titik isoelektriknya. Pada titik isoelektriknya beberapa protein akan mengendap dari larutan, sehingga dengan cara pengaturan pH, larutan protein dalam campuran dapat dipisahkan satu dari yang lainnya [13].

Cohn, *et al.*, 1946 pada penelitiannya menggunakan lima tahap proses pengendapan albumin dengan penurunan pH dan kenaikan konsentrasi etanol pada setiap tahapnya, dalam penelitiannya Cohn memperoleh albumin pada tahap kelima dengan pH 4,8, rentang pH yang digunakan Cohn yakni 4,4 sampai 7,4. Sedangkan pada penelitian ini bermaksud untuk memperoleh albumin dari satu tahap pengendapan dengan rentang pH yang digunakan antara pH 3,8 – 5,8 bertujuan untuk mencari pH optimal dalam proses pengendapan [5]. Menurut Wirahadikusumah, 2012, nilai pH terendah protein adalah kurang dari satu yaitu pepsin dan nilai pH tertinggi 11 yaitu lisozim, albumin pada plasma darah dapat dipisahkan dari protein lain dengan mengatur pH atau titik isoelektrik larutan pada pH 4,9 keadaan di mana daya larut protein minimum [13].

Penambahan pelarut organik, seperti etanol kedalam larutan protein akan mengubah konstanta dielektrika air yang menyebabkan berkurangnya kelarutan protein, sehingga dapat mengakibatkan protein mengendap [13]. Menurut Michnik & Drzazga, 2007, struktur, kestabilan, dan fungsi protein dapat dipengaruhi oleh interaksi dengan etanol [14]. Dua efek utama etanol pada protein adalah destabilisasi struktur tersier dan stabilisasi struktur sekunder. Pada struktur tersier protein terdapat empat jenis interaksi yang membentuk ikatan pada protein, yaitu ikatan hidrogen, ikatan ionik, ikatan kovalen dan ikatan hidrofobik yang memungkinkan salah satu ikatan menjadi terganggu karena adanya etanol. Dari studi Differential Scanning Calorimetry (DSC), menyimpulkan bahwa etanol dapat secara sederhana mampu menembus molekul protein dan mengganggu kestabilan protein. Etanol akan berinteraksi dengan molekul air yang ada pada protein, sehingga terjadi proses pengikatan molekul air oleh etanol membentuk ikatan hidrogen, mengakibatkan protein mengendap.

Tanaka, *et al.*, 1998, dalam penelitiannya menggunakan konsentrasi etanol 20% pada saat pengendapan dan selanjutnya menggunakan metode kromatografi cair untuk mendapatkan

albumin [4]. Sedangkan Cohn menggunakan rentang konsentrasi etanol 0 – 53,3%, dalam penelitian ini konsentrasi etanol 60% digunakan bertujuan untuk mengetahui apakah pada konsentrasi tersebut albumin masih dapat diendapkan, sehingga digunakan rentang konsentrasi etanol antara 20 – 60% [5].

4 Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis data penelitian, pada parameter suhu -10°C , pH 4,8 dan konsentrasi etanol 40% atau komposisi formula 5 diperoleh hasil respon albumin yang optimal dengan rata - rata respon albumin $53,590\ \mu\text{g}$ dibandingkan dengan rata - rata komposisi formula yang lain.

Daftar Pustaka

- [1] Matejtschuk, P., Dash, C. H. & Gascoigne, E. W., 2000. Production of Human albumin solution: a continually developing colloid. *British Journal of Anaesthesia*, 6(85), pp. 887 - 95.
- [2] Kemenristek, 2015. Membedah Industri Albumin dari Segala Aspek. [Online] Available at: <http://www.ristek.go.id> [Diakses 04 11 2015].
- [3] Denizli, A., 2011. Plasma fractionation : conventional and chromatographic methods for albumin purification. *Hacettepe J. Biol & Chem*, Volume 39 (4), pp. 315 - 341.
- [4] Tanaka, k; Shigueoka, E.M; Sawatani, E; Dias, G. A; Arashiro, F; Campos, T.C.X.B; Nakao, H.C., 1998. Purification of Human albumin by the combination of the method of cohn with liquid chromatography. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Vol 31(11), pp. 1382 - 1388.
- [5] Cohn, E. J., Strong, L.E., Hughes, W.L., Mulford, D.J., Ashworth, J.N., Melin, M., dan Taylor, H.L., 1946. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. *Harvard Medical School*, Volume 68, pp. 459 - 475.
- [6] Prajapati, S. T., Patel, L. D. & Patel, C. N., 2011. Floating matrix tablets of domperidone: formulation and optimization using simplex lattice design. *Thai J. Pharm*, 10(3) pp. 113 - 122.
- [7] Bio-Rad, 2012. A Guide of Polyarylamide Gel Electrophoresis and Detection. *Bulleten* 6040 Rev B.
- [8] Bolton, S. & Bon, C., 2004. *Pharmaceutical*



- Statistic Practical and Clinical Applications. 4th. New York: MARCEL DEKKER, INC
- [9] Walker, J. M., 2002. The Protein Protocols Handbook. II. New Jersey: Humana Press.
- [10] Smith, P K; Krohn, R I; Hermanson, G T; Mallia, A K; Gartner, F H; Provenzano, M D; Fujimoto, E K; Goeke, N M; Olson, B J; Klenk, D C., 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. Analytical Biochemistry, Volume 150, pp. 76 - 85.
- [11] Oss, C. J. V., 1989. On the Mechanism of the cold ethanol precipitation method of plasma protein fractionation. Journal of protein chemistry, 8(5), pp. 661-668.
- [12] Buxbaum, E., 2007. Fundamentals of Protein Structure and Function. Dominica: Springer.
- [13] Wirahadikusumah, M., 2012. Biokimia protein, enzim dan asam nukleat. Bandung: ITB.
- [14] Michnik, A. & Drzazga, Z., 2007. Effect of ethanol on the thermal stability of human serum albumin. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, Volume 88, pp. 449-454.