

Analisis Profil Protein Ekstrak Aquades dan Etanol Daun Mimba (*Azadirachta Indica A. Juss*) dengan Metode SDS-PAGE (*Protein Profile Analysis of Aquadest and Ethanol Extract of Neem Leaves by Means of SDS-PAGE Method*)

Miftah Dewi Masyitoh, I. D. A. Ratna Dewanti, Dyah Setyorini
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
e-mail korespondensi: drg.dyahsetyorini.fkg@unej.ac.id

Abstract

Background: *Neem leaf is used to increase body immune response, antivirus, antifungi, antibacterial, dan antioxidant. These biology activities was suspected because of protein in neem leaf. Protein in plants can be used as pharmacogenetic identification because some proteins in plants posse characteristic can defense to some pathogen mroorganism. The way to know protein in the organism is using profile protein analytic through SDS-PAGE method. SDS-PAGE separates protein molecules by size and particular shapping and also can determine protein molecular weight. Protein profiles can be obtained with protein extracts using solvents. Protein is a polar compound which is bonded to a polar solvent therefore chosen ethanol and aquadest as a liquid as extraction solvent .* **Purpose:** *To know the protein profile of aquadest and ethanol extracts of neem leaf by using SDS-PAGE.* **Method:** *This study uses neem leaf as a sample, aquadest and 70% ethanol as the extraction solvent then analyzed using SDS-PAGE.* **Result:** *The results showed 9 protein bands on the aquadest extract of neem leaf and 8 of protein bands on the ethanol extract of neem leaf.* **Conclusion:** *From the study, there is a difference between the amount of protein bands aquadest extracts of neem leaf with ethanol extract of neem leaf.*

Keywords: *aquadest extract, ethanol extract, neem leaf, protein profile, SDS-PAGE*

Latar Belakang: Daun mimba dimanfaatkan untuk meningkatkan imunitas tubuh, antivirus, antijamur, antibakteri, dan antioksidan. Aktivitas biologi tersebut diduga berkaitan dengan kandungan protein yang ada pada daun mimba. Protein pada tanaman dapat digunakan sebagai identifikasi secara farmakogenetik karena beberapa protein dalam tanaman memiliki sifat dapat melawan mikroorganisme patogen. Salah satu cara untuk mengetahui keberadaan protein dapat dilakukan dengan analisis profil protein SDS-PAGE. SDS-PAGE memisahkan molekul-molekul protein berdasarkan ukuran dan bentuk partikelnya serta dapat menentukan berat molekul suatu protein. Profil protein dapat diperoleh dengan bentuk ekstrak protein dengan menggunakan pelarut. Protein merupakan suatu senyawa polar yang mudah berikatan dengan pelarut polar maka dari itu dipilih etanol dan aquades sebagai cairan pengekstraksinya. **Tujuan Penelitian:** Mengetahui profil protein ekstrak aquades dan etanol daun mimba melalui metode SDS-PAGE. **Metode Penelitian:** Penelitian ini menggunakan daun mimba sebagai sampel, aquades dan etanol 70% sebagai pelarut ekstraksi yang selanjutnya dilakukan analisis dengan metode SDS-PAGE. **Hasil Penelitian:** Hasil menunjukkan 9 pita protein pada ekstrak aquades daun mimba dan 8 pita protein pada ekstrak etanol daun mimba. **Kesimpulan:** Dari penelitian tersebut didapatkan bahwa terdapat perbedaan jumlah pita protein antara ekstrak aquades daun mimba dengan ekstrak etanol daun mimba.

Kata Kunci: daun mimba, ekstrak aquades, ekstrak etanol, profil protein, SDS-PAGE

Pendahuluan

Mimba (*Azadirachta indica A. Juss*) merupakan tanaman obat yang tersebar di beberapa negara dan dikenal sebagai tanaman obat yang memiliki aktivitas biologi dengan spektrum luas [1]. Bagian tanaman yang banyak dimanfaatkan sebagai obat adalah daun mimba [2]. Daun mimba dimanfaatkan untuk meningkatkan imunitas tubuh, antivirus, antijamur, antibakteri, dan antioksidan [3]. Aktivitas biologi tersebut diduga berkaitan dengan kandungan protein yang ada pada daun mimba. Daun mimba dewasa memiliki kandungan protein yang lebih banyak daripada daun mimba muda [4]. Adapun komposisi daun mimba segar antara lain protein 7,1%, lemak 1%, serat 6,2%, karbohidrat 22,9%, dan mineral 3.4% [5]. Sampai saat ini belum banyak peneliti yang fokus pada molekul yang lebih besar dan lebih kompleks sebagai bahan terapi seperti protein pada tanaman.

Protein adalah suatu polipeptida yang mempunyai berat molekul yang sangat bervariasi, dari 5 kDa hingga lebih dari satu juta. Suatu protein terdiri dari asam amino yang terikat satu dengan yang lain oleh ikatan peptida [6]. Protein pada tanaman dapat digunakan sebagai identifikasi secara farmakogenetik karena beberapa protein dalam tanaman memiliki sifat dapat melawan mikroorganisme patogen [7;8]. Tanaman dapat memproduksi sejumlah bahan protein yang dapat digunakan sebagai terapi suatu penyakit, baik langsung dikonsumsi sebagai makanan atau pun perlu pemrosesan yang lebih rumit seperti, ekstraksi atau pemurnian protein [7]. Peneliti sebelumnya [9;10] mengatakan bahwa salah satu cara untuk mengetahui keberadaan protein dapat dilakukan dengan analisis profil protein.

Salah satu metode analisis profil protein yang dapat dilakukan adalah metode SDS-PAGE. SDS-PAGE dapat mengidentifikasi pola pita protein tanaman menggunakan gel poliakrilamid dengan *buffer* sodium dedosil sulfat (*Sodium Dodecyl Sulphate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis/ SDS-PAGE*) [8]. Metode ini merupakan metode terbaik untuk analisis protein karena digunakan *gel polyacrylamide* dalam pemurnian proteinnya [11]. SDS-PAGE memisahkan molekul-molekul protein berdasarkan ukuran dan bentuk partikelnya serta dapat menentukan berat molekulnya [12]. Profil protein dapat diperoleh dengan bentuk ekstrak protein dengan menggunakan pelarut.

Kelarutan zat dalam pelarut dipengaruhi oleh ikatan polar dan non polar. Zat yang polar hanya larut dalam pelarut polar, sedangkan zat non polar hanya larut dalam pelarut non polar [13]. Protein merupakan suatu senyawa polar yang mudah berikatan dengan pelarut polar, sehingga pada penelitian ini dilakukan ekstraksi dengan pelarut aquades dan etanol karena keduanya merupakan zat pelarut polar [14]. Perbedaan keduanya terletak pada banyaknya jumlah bahan ekstrak yang terlarut pada aquades, sehingga aquades diduga lebih banyak mengikat molekul protein. Banyaknya jumlah bahan ekstrak yang terlarut pada aquades tersebut disebabkan oleh banyaknya ikatan hidrogen yang terbentuk antara aquades dan molekul protein sedangkan pada etanol jumlah ikatan hidrogen terbentuk sedikit karena adanya ikatan hidrokarbon yang tidak dapat membentuk ikatan hidrogen [15]. Perbedaan kedua pelarut ini dapat menunjukkan jumlah protein mana yang lebih banyak, berat molekul masing-masing pita protein, dan intensitas profil protein yang menunjukkan kandungan protein pada masing-masing pita protein pada gel elektroforesis.

Metode Penelitian

Penelitian dilakukan di *Center for Development of Advanced Sciences and Technology (CDAST)* Universitas Jember dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan September – Desember 2015.

Ekstraksi Protein Daun Mimba

Satu gram daun mimba digerus menggunakan mortar dengan menambahkan aquades sebagai pelarut sebanyak 3 ml dan SDS 2% sebanyak 50µl. Setelah itu disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit dan dihasilkan pelet dan supernatan. Supernatan dijadikan ekstrak aquades sedangkan peletnya ditambahkan etanol 3 ml dan Tris HCl sebanyak 100µl dan disentrifus dengan kecepatan 4000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan lalu dijadikan ekstrak etanol.

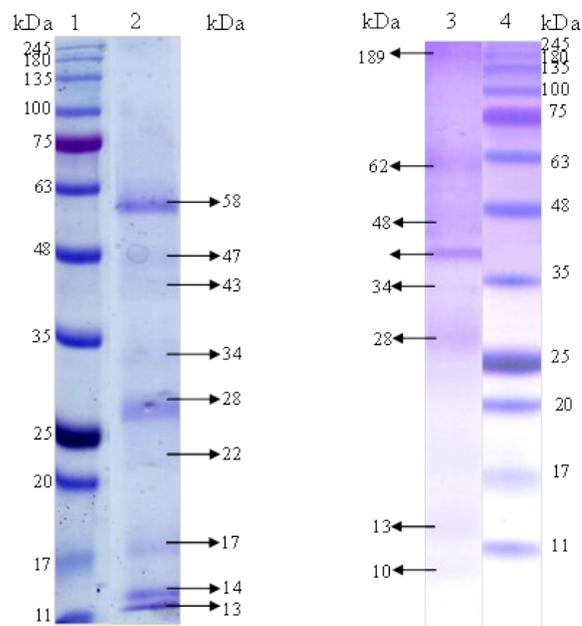
Proses SDS-PAGE

Elektroforesis dimulai dengan memasang *glassplate* dan dirangkai dengan *frame* dari *bio-Rad*, mencetak *separating gel* 12,5%. Bahan-bahan *separating gel* 12,5% dicampur sampai homogen (akrilamid 30% 2 ml; Tris HCl 1,5 M ph 8,8 1 ml; aquades 1,6 ml; TEMED 10 µl; APS 10% 50 µl, SDS 10% 50 µl) kemudian campuran tersebut dimasukkan dalam *glassplate* melalui dindingnya agar tidak terbentuk gelembung, sampai kira-kira 1 cm dari atas. Selanjutnya dimasukkan aquades dengan pipet untuk mengetahui bentukan *gel*. Apabila terbentuk *gel*, akan terlihat garis tipis di antara aquades dan *separating gel* [16].

Membuat *stacking gel* yang terdiri dari akrilamid 30% 0,5 ml; Tris HCl 1,5 M ph 6,8 0,6 ml; aquades 1,3 ml; TEMED 2,5 µl; APS 10% 7,5 µl, SDS 10% 25 µl. Bahan-bahan tersebut dicampur hingga homogen kemudian dimasukkan di atas *separating gel* yang telah mengeras hingga penuh. *Comb* dimasukkan untuk membuat sumur-sumur dalam *buffer*. Sampel yang akan di running ditambah RSB dengan perbandingan 1:1, kemudian dipanaskan dalam air mendidih selama ± 5 menit. *Sample* untuk ekstrak aquades sebanyak 15 µl dan ekstrak etanol 15 µl dimasukkan ke dalam sumur-sumur pada *glassplate* elektroforesis. *Marker* yang telah siap dimasukkan ke dalam sumur. Elektroforesis dijalankan pada 120 V. Proses ini dihentikan setelah warna biru turun (*Laemmli* turun) selama kurang lebih 60-80 menit. Proses *staining* atau pewarnaan dilakukan dengan menggunakan methanol 40%, asam asetat 10%, dan 0,1% *Commassive Blue* ® 0,1%. Proses dilanjutkan dengan tahapan *destaining* yaitu menggunakan metanol 20% dan asam asetat 10% [16].

Hasil Penelitian

Hasil dari SDS-PAGE protein ekstrak aquades dan ekstrak etanol daun mimba menunjukkan perbedaan jumlah pita protein. Pada ekstrak aquades teridentifikasi 9 pita, sedangkan pada ekstrak etanol teridentifikasi 8 pita protein. Dari hasil analisis tersebut terdapat tiga berat molekul yang sama pada kedua ekstrak (Gambar 1 dan Tabel 1).



Gambar 1. Profil protein ekstrak aquades dan ekstrak etanol daun mimba pada gel akrilamid. Keterangan:1, 4 = Marker Protein, 2 = Ekstrak aquades daun mimba, dan 3 = Ekstrak etanol daun mimba.

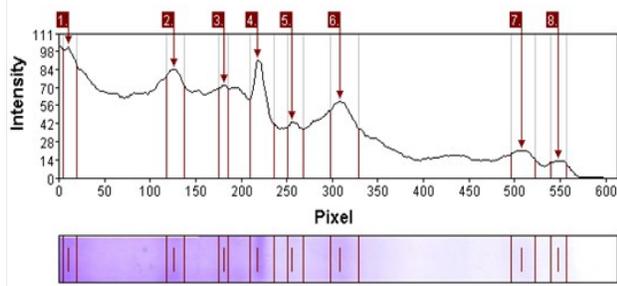
Tabel 1. Berat molekul protein ekstrak aquades dan ekstrak etanol daun mimba

No	Berat Molekul Protein	
	Ekstrak aquades daun mimba (kDa)	Ekstrak etanol daun mimba (kDa)
1	-	189
2	-	62
3	58	-
4	-	48
5	47	-
6	43	-
7	-	41
8	34	34
9	28	28
10	22	-

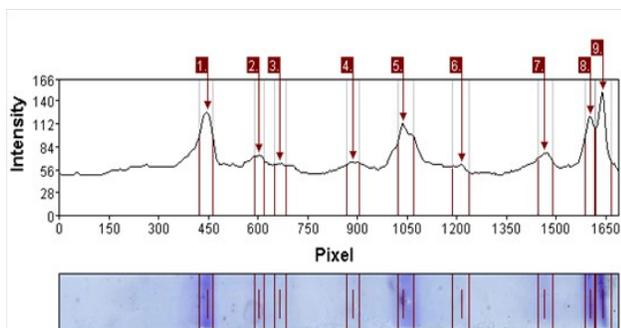
11	17	-
12	14	-
13	13	13
14	-	10

2	3085	1608
3	2938	844
4	3605	1838
5	5162	737
6	2578	1664
7	3929	531
8	3665	226
9	5370	-
Jumlah	35049	8898

Interpretasi dari Gambar 2 dan 3 disajikan dalam Tabel 2 yang menunjukkan intensitas gambaran pita protein. Titik tertinggi pada hasil proyeksi menunjukkan pita yang paling tebal pada gel akrilamid sedangkan hasil intensitas tertinggi menunjukkan tebal dan lebarnya pita. Semakin tinggi titik pada hasil proyeksi maka semakin tebal pita pada gel akrilamid. Pada gambar 2 dan tabel 2 diketahui bahwa protein pada pita ke 4, yaitu 41 kDa paling tinggi titik proyeksinya dan intensitasnya. Pada gambar 3 dan tabel 2 diketahui bahwa protein pada pita ke 9, yaitu 13 kDa paling tinggi titik proyeksinya dan intensitasnya.



Gambar 2. Hasil analisis berat molekul protein ekstrak etanol daun mimba menggunakan Software GelAnalyzer2010.



Gambar 3. Hasil analisis berat molekul protein ekstrak aquades daun mimba menggunakan Software GelAnalyzer.

Tabel 2. Intensitas Pita Protein Ekstrak Aquades dan Etanol Daun Mimba

No.	Intensitas Pita Protein	
	Aquades (Pixel)	Etanol (Pixel)
1	4717	1450

Pembahasan

Hasil dari SDS-PAGE protein ekstrak aquades dan ekstrak etanol daun mimba terdapat perbedaan jumlah pita protein. Pada ekstrak aquades teridentifikasi 9 pita protein dan ekstrak etanol teridentifikasi 8 pita protein. Perbedaan jumlah pita protein yang didapatkan pada hasil SDS-PAGE ini diduga disebabkan oleh sifat kelarutan aquades dan etanol terhadap protein. Sifat kelarutan suatu pelarut terhadap bahan pelarut dipengaruhi oleh ikatan hidrogen karena ikatan hidrogen memungkinkan pelarut melarutkan biomolekul organik [17]. Air merupakan pelarut yang sangat baik bagi molekul-molekul polar seperti protein. Etanol merupakan alkohol rantai lurus dengan rumus molekul C₂H₅OH [18]. Keduanya dapat melarutkan protein karena keduanya mampu membentuk ikatan hidrogen yang dengan mudah dapat terbentuk bila atom H terikat dengan atom elektronegatif seperti O dan N [18], namun jumlah ikatan hidrogen aquades lebih banyak dibandingkan dengan etanol karena pada etanol terdapat ikatan hidrokarbon yang tidak dapat membentuk ikatan hidrogen dan kepolaran rantai hidrokarbon sangat rendah sehingga tidak dapat mengikat protein. Beberapa fakta juga mengatakan bahwa beberapa senyawa organik dengan gugus hidroksil -OH atau gugus amina -NH₂ (contohnya protein) relatif lebih larut dalam air karena pembentukan ikatan hidrogen dengan molekul air yang sangat kuat [15]. Air dapat membentuk ikatan hidrogen yang sangat kuat dengan senyawa protein karena protein memiliki atom nitrogen yang merupakan salah satu atom pembentuk ikatan hidrogen [18], sehingga protein sebagian besar dapat larut pada aquades dan didapatkan pita protein yang lebih banyak daripada ekstrak etanol daun mimba.

Hasil SDS-PAGE ekstrak aquades dan ekstrak etanol daun mimba ada yang menunjukkan pita yang tebal dan yang tipis. Pita protein ekstrak aquades daun mimba pada gel akrilamid terlihat lebih tebal daripada pita protein etanol daun mimba. Ketebalan pita protein pada gel akrilamid berhubungan dengan kandungan atau kuantitas protein pada ekstrak tersebut karena tebal tipisnya sebuah pita protein yang terbentuk menunjukkan kandungan atau volume protein yang mempunyai berat molekul yang sama. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa molekul bermuatan positif maupun negatif dapat bergerak bebas dibawah pengaruh medan listrik, sehingga molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang sama atau berdekatan [19]. Pita yang paling tebal pada hasil SDS-PAGE ekstrak aquades yaitu protein dengan berat molekul 13 kDa dan pada ekstrak etanol yaitu protein dengan berat molekul 41 kDa yang ditunjukkan dengan paling tinggi titik proyeksinya. Pada penelitian ini teridentifikasi juga berat molekul yang sama antara ekstrak aquades dan etanol daun mimba, yaitu 34 kDa, 28 kDa, dan 13 kDa. Protein dengan berat molekul yang sama belum tentu merupakan jenis protein yang sama karena setiap protein memiliki perbedaan jenis asam amino, jumlah asam amino, dan urutan asam amino sebagai penyusun protein [7].

Keberadaan protein dalam ekstrak aquades dan etanol daun mimba dapat dilihat dari munculnya pita-pita protein pada gel akrilamid. Keberadaan tersebut juga berhubungan dengan berat molekul yang teridentifikasi karena berat molekul pita protein juga dapat dilihat dari letak pita protein pada gel akrilamid hasil SDS-PAGE. Pita yang terletak pada bagian atas menunjukkan berat molekul yang besar dibandingkan dengan pita yang berada di bawahnya karena molekul yang lebih kecil dari pori gel dapat bergerak dengan mudah di dalam gel, sedangkan molekul yang lebih besar hampir tidak bergerak. Protein kecil bergerak cepat ke bawah dan protein besar tinggal di atas [20]. Hal itu juga menjadi alasan tersebarnya keberadaan pita-pita protein yang muncul pada gel akrilamid.

Perbedaan jumlah dan ketebalan pita protein pada hasil penelitian ini juga dapat dipengaruhi oleh sifat dari larutan aquades dan larutan etanol sebagai larutan ekstraksi. Air memiliki gaya ekstraksi yang menonjol untuk banyak bahan kandungan implisia yang aktif secara terapan, tetapi sekaligus juga mampu mengekstraksi sejumlah besar bahan balas [14] sehingga pita protein pada ekstrak aquades ditemukan lebih banyak dan lebih tebal. Keburukannya adalah dapat menyebabkan reaksi pemutusan secara hidrolitik dan *fermentative* yang mengakibatkan cepatnya perusakan bahan aktif. Etanol tidak menyebabkan pembengkakan membran sel dan memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut. Keuntungan lainnya adalah sifatnya yang mampu mengendapkan albumin dan menghambat kerja enzim, tetapi etanol hanya dapat mengekstraksi zat-zat tertentu. Etanol 70% sangat efektif dalam menghasilkan sejumlah zat-zat bahan aktif tertentu di mana bahan balas hanya sedikit turut ke dalam cairan pengestraksi [14] sehingga pita protein yang terbaca pada ekstrak etanol lebih sedikit dan tipis. Sebagai evaluasi dari hasil penelitian ini, maka diperlukan penelitian lanjutan untuk mengetahui perbedaan profil protein pada ekstrak daun mimba dengan pelarut aquades dan etanol dengan konsentrasi gel elektroforesis yang sama.

Protein tanaman dengan berat molekul tertentu dapat menunjukkan sifat imunogenik sebagai antigen. Imunogenik adalah kemampuan suatu bahan (antigen) dalam menginduksi respon imun [21]. Substansi yang bersifat imunogenik harus memiliki empat karakter, salah satunya adalah berat molekul yang tinggi. Semakin tinggi berat molekul suatu substansi semakin tinggi sifat imunogeniknya, sebaliknya semakin rendah berat molekul suatu substansi semakin rendah sifat imunogeniknya [21]. Berat molekul yang memiliki sifat imunogenik adalah lebih dari 6 kDa [22]. Berdasarkan penjelasan tersebut, protein ekstrak aquades dan etanol daun mimba pada penelitian ini memiliki potensi bersifat imunogenik.

Penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa protein tanaman dapat digunakan sebagai terapi suatu penyakit, baik langsung dikonsumsi sebagai makanan atau pun perlu pemrosesan yang lebih rumit seperti, ekstraksi atau pemurnian protein [7]. Antibodi juga dapat ditemukan dalam protein tanaman dan sudah diujicobakan dalam melawan karies, kolera, diare *E. coli*, malaria, influenza, HIV, herpes simpleks, dan beberapa kanker. Protein tanaman juga digunakan untuk menginduksi respon imun untuk melindungi tubuh dari mikroorganisme patogen. Protein tanaman dapat dijadikan suatu vaksin untuk mencegah beberapa penyakit tersebut. Vaksin yang berasal dari turunan tanaman mampu melawan beberapa mikroorganisme patogen seperti *E. coli*, virus hepatitis, virus rabies, dan lain-lain [7]. Berdasarkan penjelasan tersebut, protein pada daun mimba dapat berpotensi dalam melawan beberapa penyakit.

Simpulan dan Saran

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstraksi protein daun mimba dengan bahan pelarut yang berbeda menghasilkan profil protein yang berbeda antara pelarut aquades dan etanol. Hal tersebut ditunjukkan dengan perbedaan jumlah pita protein, berat molekul pita protein, dan ketebalan pita protein yang dihasilkan dengan metode SDS-PAGE.

Saran yang dapat diberikan yaitu perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui nama-nama protein yang ditemukan berdasarkan berat molekulnya, menentukan efektifitas ekstrak aquades daun mimba dan etanol daun mimba pada suatu mikroorganisme, mengetahui sifat imunogenik daun mimba, mengetahui sifat antimikroba dari protein ekstrak aquades dan etanol daun mimba.

Daftar Pustaka

- [1] Biswas, Kausik. *Biological Activities and Medicinal Properties of Neem (Azadirachta indica)*. India. Current Science, Vol. 82, No. 11. 2002
- [2] Sukrasno. *Mimba Tanaman Obat Multifungsi*. Jakarta. Agromedia Pustaka. 2003.

- [3] Brototi B., dan Kaplay R.D. *Azadirachta indica (Neem): It's Economic utility and chances for commercial planned plantation in Nanded District*. Int. J. Pharma, 1(2), pp. 100 – 104. 2011.
- [4] Goud, Prashanth B., dan Kachole, Manvendra. *Antioxidant Enzyme Changes in Neem, Pigeonpea, and Mulberry Leaves in Two Stages of Maturity*. Plant Signaling & Behavior Volume 7, Issue 10, pp 1258 – 1262. ISSN: 1559-2324. 2012.
- [5] Subathra, K. *Aqueous Two Phase Extraction of Protease from Neem Leaves (Azadirachta indica)*. International Journal of Chemical Sciences and Applications. Vol 3, Issue 3, pp. 346-351. ISSN 0976-2590, Online ISSN 2278-6015. 2012.
- [6] Poedjiadi, Anna. *Dasar-dasar Biokimia* hal 81 – 124. Jakarta. Universitas Indonesia Press. 1994.
- [7] Thomas, Bruce R., Deynze, Allen Van, Bradford, Kent J. *Production of Therapeutic Proteins in Plants*. Oakland. The Regents of The University of California Division of Agriculture and Natural Resources. 2002.
- [8] Kristina, Natalini Nova. *Analisis Fitokimia dan Penampilan Polapita Protein Tanaman Pegagan Hasil Konservasi InVitro*. Bogor. Bul. Littro. Vol. 20 No. 1, 2009, 11 – 20. 2009.
- [9] Rodriguez, E. Lozano, L. E. Hernandez, P. Bonay dan R. O. Carpena-Ruiz. *Distribution of Cadmium In Shoot and Root Tissues of Maize And Pea Plants: Physiological Disturbances*. Oxford. Oxford University Press. 1996.
- [10] Jemal, L. Didierjean, R.Ghrir, M. H. Ghorbal, G. Burkard. *Characterization of Cadmium Binding Peptides From Pepper (Capsicum annuum)*. Plant Science. 137, pp 143–154. 1998.

- [11] Wibowo, Agus Danang. Fraksionasi dan Penentuan Profil Protein Bungkil Kelapa dengan SDS-PAGE. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* Vol. XXIII No. 1. 2012.
- [12] Pomarenz Y., Meloan C. L. *Food Analysis: Theory and Practice*. 3rd ed. New York. Chapman and Hall an International Thomson Publ. Co. 1994.
- [13] Houghton P.J., Raman A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts* 1st Edition. London. Chapman and Hall. 1998.
- [14] Voigt, Rudolf. Penerjemah Soendani Noerono. Buku Pelajaran Teknologi Farmasi. Yogyakarta. Gadjah Mada University Press. 1995.
- [15] Yoshito, Ikada. *Tissue Engineering Fundamental and Application*. California. Academic Press. 2006.
- [16] Wang, Scali, Vignani, Spadafora, Sensi, Mazzuca, Cresti. *Protein Extraction for Two-Dimensional Electrophoresis from Olive Leaf, A Plant Tissue Containing High Levels of Interfering Compounds*. Siena, Italy. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. pp. 2369-2375. 2003.
- [17] Murray, Robert K., Granner, Daryl K., dan Rodwell, Victor W. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 27th Edition. The McGraw-Hill Companies Inc. 2006.
- [18] Feigl, Dorothy M., dan Hill, John William. *General, Organic, and Biological Chemistry: Foundation of Life*. Burgess Pub. 1986
- [19] Soedarmadji, S. Teknik Analisa Biokimiawi. Edisi Pertama. Yogyakarta. Liberty. 1996.
- [20] Stryer, Lubert. Biokimia Edisi 4 Volume 1. Jakarta. EGC. 2000.
- [21] Elgert, Klaus D. Immunology: Understanding The Immune System 2nd edition. New Jersey. John Wiley & Sons, Inc. 2009.
- [22] Coico, Richard, dan Sunshine, Geoffrey. Immunology: A short Course, 6th edition. New Jersey. John Wiley & Sons, Inc. 2009,