



Perbedaan Profil Protein Plasma Darah Mencit Menggunakan SDS-PAGE Tanpa Penambahan dan dengan Penambahan 2-Mercaptoethanol

Khaerunissa Anbar Istiadi¹, Iffa Afiqa Khairani^{1*}, Silvia Andriani²

¹Program Studi Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sumatera, Jalan Terusan Ryacudu Des Way Huwi, Lampung Selatan, Lampung, Indonesia

²Program Studi Teknologi Laboratorium Medis, Fakultas Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Pringsewu, Pringsewu Utara, Pringsewu, Lampung, Indonesia

* iffa.khairani@bi.itera.ac.id

Abstract

SDS-PAGE is a method used to analyze proteins based on differences in molecular weight. Sample preparation in SDS-PAGE with 2-mercaptoethanol will reduce disulfide bonds in proteins. The sulfide bond reduction process will cause differences in protein conformation and profile. The purpose of this study was to compare the pattern of blood plasma protein profiles of mice analyzed using SDS-PAGE, with the addition of 2-mercaptoethanol and without the addition of 2-mercaptoethanol in a mixture of sample buffer solutions. The results of SDS-PAGE showed that the blood plasma protein profile of mice without the addition and with the addition of 2-mercaptoethanol showed differences in the number of protein bands, the molecular weight of several proteins and the thickness of the protein bands. There were nine protein bands with a molecular weight above 52 kDa in the profile without the addition of 2-mercaptoethanol, while there were only five protein bands with a molecular weight above 52 kDa in the profile with the addition of 2-mercaptoethanol. The difference in protein profile patterns shows that mouse blood plasma contains proteins containing disulfide bonds that can be reduced by 2-mercaptoethanol.

Keywords: 2-mercaptoethanol; mice; protein profile; blood plasma; SDS-PAGE.

Abstrak

SDS-PAGE merupakan metode yang digunakan untuk menganalisis protein berdasarkan perbedaan berat molekulnya. Penambahan 2-mercaptoethanol pada analisis profil protein menggunakan SDS-PAGE berfungsi untuk mereduksi ikatan disulfida pada protein. Proses reduksi ikatan sulfida tersebut akan menyebabkan perbedaan konformasi dan profil protein. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan pola profil protein plasma darah mencit yang dianalisis menggunakan SDS-PAGE, dengan penambahan 2-mercaptoethanol dan tanpa penambahan 2-mercaptoethanol pada campuran larutan buffer sampel. Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa profil protein plasma darah mencit tanpa penambahan dan dengan penambahan 2-mercaptoethanol memperlihatkan adanya perbedaan pada jumlah pita protein, berat molekul beberapa protein dan ketebalan pita protein. Terdapat 9 pita protein dengan berat molekul diatas 52 kDa pada profil tanpa penambahan 2-mercaptoethanol, sementara hanya terdapat 5 pita protein dengan berat molekul diatas 52 kDa pada profil dengan penambahan 2-mercaptoethanol. Perbedaan pola profil protein tersebut menggambarkan bahwa plasma darah mencit memiliki protein-protein yang mengandung ikatan disulfida yang dapat tereduksi oleh pemberian 2-mercaptoethanol.

Kata-kata kunci: 2-mercaptoethanol; mencit; profil protein; plasma darah; SDS-PAGE.

Pendahuluan

SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) merupakan metode yang sering digunakan untuk menganalisis protein berdasarkan perbedaan berat molekulnya. SDS-PAGE tersusun atas dua jenis gel, yaitu stacking gel yang berada di bagian atas dengan fungsi sebagai tempat protein terkonsentrasi sebelum memasuki gel pemisah (resolving gel), dan resolving gel yang berada dibagian bawah dengan fungsi memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya (O'Connor, 2022). SDS merupakan jenis deterjen anionik yang dapat mengikat dan mengganggu ikatan non-kovalen protein, mendenaturasi protein, dan memberikan muatan negatif pada protein, sehingga akan menghasilkan rantai polipeptida linier. Bentuk polipeptida yang seragam pada analisis akan menyebabkan pemisahan protein hanya dipengaruhi oleh berat molekul saja. SDS atau sodium dodecyl sulfate adalah detergen yang kuat. Ketika ditambahkan ke sampel protein, SDS membuat linierisasi protein, memecah struktur dua dimensi dan tiga dimensinya serta melapisinya dengan muatan negatif yang seragam. Molekul protein yang dilapisi SDS dan bermuatan larut dalam air, memungkinkan mereka untuk dengan mudah dipisahkan pada pemberian arus listrik pada proses elektroforesis.

Agen denaturan lainnya yang digunakan pada analisis SDS-PAGE yaitu 2-mercaptoethanol. 2-mercaptoethanol secara efektif membelah dan mengurangi banyak ikatan sistein-sistein disulfida dan mendenaturasi protein yang diinginkan secara ireversibel. 2-mercaptoethanol akan mendenaturasi protein dengan memutuskan ikatan-ikatan disulfida dan membuka struktur lipatan-lipatan protein. Ikatan disulfida merupakan ikatan kovalen yang hanya terdapat dalam asam amino sistein dan berperan penting dalam membentuk struktur sekunder protein (Carson *et al.*, 2019). Adanya pemutusan ikatan pada asam amino akan menyebabkan perbedaan pola protein yang dihasilkan. Perlakuan protein pada daging dengan menggunakan enzim protease menyebabkan adanya perbedaan pola protein pada SDS PAGE (Susanti *et al.*, 2019). Perbedaan penggunaan reagen pada preparasi sampel akan menyebabkan perbedaan analisis profil protein. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan pola profil protein plasma darah mencit jantan yang dianalisis menggunakan SDS-PAGE, dengan penambahan 2-mercaptoethanol dan tanpa penambahan 2-mercaptoethanol pada campuran larutan buffer sampel. Perbedaan pola profil protein tanpa pemberian 2-mercaptoethanol dan dengan pemberian 2-mercaptoethanol dapat menduga apakah plasma darah mencit mengandung protein-protein multimer yang memiliki ikatan disulfida. Protein multimer tersebut dapat tereduksi menjadi protein monomer dengan pemutusan ikatan disulfida oleh 2-

mercaptoethanol sebagai agen pereduksi protein, sehingga akan mengakibatkan perbedaan pola profil protein

Metode

Elektroforesis SDS-PAGE Plasma Darah Mencit

Elektroforesis SDS-PAGE plasma darah mencit bertujuan untuk mengamati profil protein pada plasma darah mencit. Penelitian ini menggunakan hewan uji berupa mencit jantan (*Mus musculus* L.) berjumlah 9 ekor. Penggunaan hewan uji dalam penelitian ini telah memperoleh persetujuan etik oleh Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor 2910/UN26.18/PP.05.02.00/2023. Pengambilan plasma darah mencit dilakukan dengan cara cardiac puncture, kemudian dikumpulkan di dalam tabung vacutainer EDTA. Plasma darah mencit disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Sebanyak 1 µl plasma diencerkan dengan 50 µl NaCl fisiologis (pengenceran 50x). 10 µl plasma yang telah diencerkan ditambahkan loading buffer sebanyak 10 µl (loading buffer merupakan campuran antara buffer sampel *Laemmli* dan 2-mercaptoethanol dengan perbandingan 19:1). Pada perlakuan tanpa 2-mercaptoethanol 10 µl plasma yang telah diencerkan ditambahkan buffer sampel *Laemmli* sebagai loading buffer sebanyak 10 µl.

Running elektroforesis SDS-PAGE dilakukan menggunakan gel *Bolt 12% BT Plus 10w* dengan buffer elektroforesis 10x Tris/Glycine/SDS. Setiap wells diisi dengan 10 µl *marker protein: Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder 10 kDa - 260 kDa*, dan plasma sembilan ekor mencit masing-masing sebanyak 20 µl. *Running* menggunakan listrik 100 Volt sampai buffer sampel menyentuh dasar gel. Gel diletakkan pada *Rocking Platform Mixer* dengan kecepatan goyangan 40 rpm untuk diwarnai dengan commasie blue selama 1 jam, kemudian diberi destainer sampai seluruh pita protein terlihat jelas.

Analisis Berat Molekul Protein Plasma Darah Mencit

Pita protein plasma darah mencit diamati dan dihitung nilai Rf (*Retardation factor*) untuk menentukan berat molekul pita protein. Nilai Rf dari pita marker dihitung dengan mengukur jarak total migrasi marker dibagi dengan jarak pita dari sumuran sebagai nilai absis (sumbu x) dan berat molekul pita marker sebagai nilai ordinat (sumbu y). Jarak pita diukur dalam satuan pixel menggunakan software GIMP 2.10.32. Data nilai Rf marker dibuat suatu kurva standar Regresi. Berat molekul pita protein profil plasma darah mencit dihitung dengan konversi dari persamaan tersebut. Penentuan berat molekul menggunakan BioMed MW

Converter©- *Molecular Weight Conversion Tool*. Analisis profil protein dilakukan dengan mengamati banyaknya pita protein dan ketebalan pita protein.

Hasil dan Pembahasan

Hasil perhitungan nilai Rf marker protein masing-masing perlakuan tanpa 2-mercaptoethanol dan dengan penambahan 2-mercaptoethanol disajikan pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Nilai Rf dan Berat molekul marker protein (perlakuan tanpa 2-mercaptoethanol)

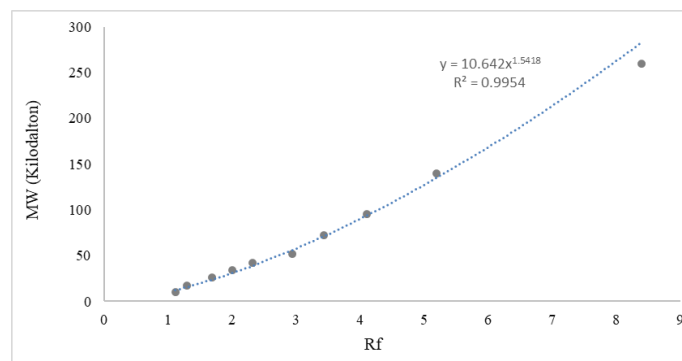
Jarak Marker (pixel)	Total Migrasi <i>loading dye</i>	Rf <i>Marker</i>	Berat Molekul <i>Marker</i> (kDa)
252	2116	8,3968	260
408		5,1863	140
516		4,1008	95
616		3,4351	72
720		2,9389	52
912		2,3202	42
1056		2,0038	34
1260		1,6794	26
1632		1,2966	17
1900		1,1137	10

Tabel 2. Nilai Rf dan Berat molekul marker protein (perlakuan penambahan 2-mercaptoethanol)

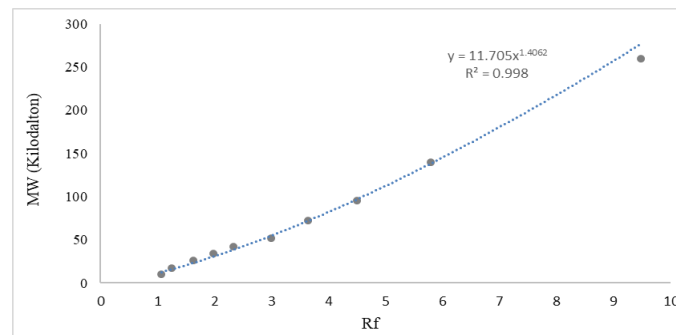
Jarak Marker (pixel)	Total Migrasi <i>loading dye</i>	Rf <i>Marker</i>	Berat Molekul <i>Marker</i> (kDa)
165	1563	9,4727	260
270		5,7889	140
348		4,4914	95
429		3,6434	72
522		2,9943	52
672		2,3259	42
789		1,9810	34

Jarak Marker (pixel)	Total Migrasi <i>loading dye</i>	Rf <i>Marker</i>	Berat Molekul <i>Marker</i> (kDa)
960		1,6281	26
1251		1,2494	17
1464		1,0676	10

Data hasil pengukuran Rf marker protein kemudian diplotkan dalam bentuk kurva regresi terhadap berat molekul marker protein. Berikut ini merupakan kurva regresi standar marker protein pada masing-masing perlakuan sampel (Gambar 1 dan Gambar 2).

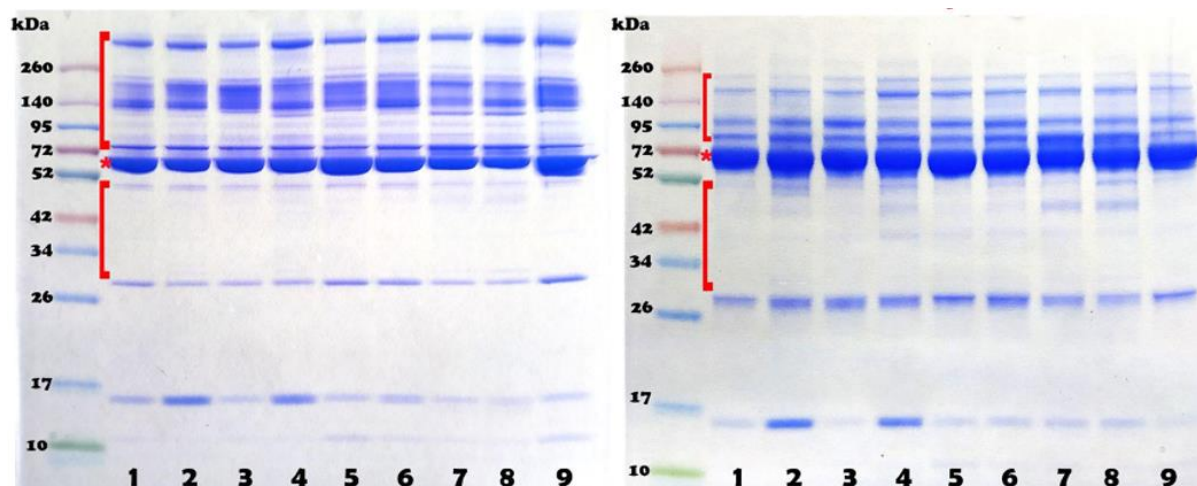


Gambar 1. Kurva standar protein marker (perlakuan tanpa 2-mercaptoethanol)



Gambar 2. Kurva standar protein marker (perlakuan dengan penambahan 2-mercaptoethanol)

Penentuan berat molekul protein sampel plasma darah mencit dihitung dengan mencari nilai Rf (*Retardation factor*) dari masing-masing pita yang muncul, selanjutnya disubstitusikan pada persamaan regresi *marker* protein yang ada pada Gambar 1 dan Gambar 2. Visualisasi hasil profil protein plasma darah mencit SDS-PAGE tanpa 2-mercaptoethanol dan dengan penambahan 2-mercaptoethanol tertera pada Gambar 3.



Gambar 3. Profil protein plasma darah mencit SDS-PAGE a) kiri: tanpa pemberian 2-mercaptoethanol dan b) kanan: dengan pemberian 2-mercaptoethanol

Hasil SDS-PAGE plasma darah mencit menunjukkan adanya perbedaan profil protein tanpa pemberian 2-mercaptoethanol dan dengan pemberian 2-mercaptoethanol. Perbedaan profil protein plasma darah mencit terlihat pada jumlah pita protein dan berat molekul beberapa protein. Plasma darah yang tidak diberikan penambahan 2-mercaptoethanol menunjukkan adanya 9 pita protein dengan berat molekul di atas 52 kDa (diantaranya yaitu, 62 kDa, 74 kDa, 83 kDa, 97 kDa, 112 kDa, 130 kDa, 185 kDa, 216 kDa, dan 570 kDa), sedangkan pada plasma darah yang diberikan penambahan 2-mercaptoethanol hanya menunjukkan 5 pita protein dengan berat molekul di atas 52 kDa (yaitu pita protein 66 kDa, 84 kDa, 101 kDa, 155 kDa, dan 206 kDa). Pada kedua perlakuan, profil pita protein pada rentang berat molekul 10-52 kDa cenderung menunjukkan kesamaan, yakni adanya 4 pita protein yang muncul yaitu dengan berat molekul 13 kDa, 15 kDa, 26 kDa, dan 50 kDa.

Hasil analisis profil protein plasma darah mencit yang diberikan penambahan 2-mercaptoethanol pada penelitian ini, serupa dengan profil protein plasma darah tikus yang dianalisis dengan metode SDS-PAGE oleh (Hidayati *et al.*, 2017), yaitu menunjukkan adanya 12 pita protein yang teridentifikasi dengan berat molekul berkisar antara 13 kDa - 200 kDa. Penelitian lainnya oleh (Hidayati *et al.*, 2017) mengenai profil protein plasma darah mencit yang dianalisis dengan metode SDS-PAGE menunjukkan adanya 13 pita protein yang teridentifikasi dengan berat molekul 7 kDa - 162 kDa.

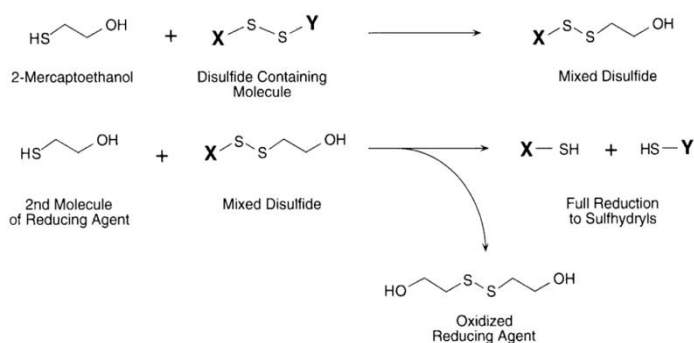
Pada penelitian ini, pita protein yang terlihat paling tebal dan konsisten muncul pada kedua perlakuan (tanpa penambahan 2-mercaptoethanol dan dengan penambahan 2-mercaptoethanol) yaitu pita dengan berat molekul antara 52 kDa - 72 kDa. Pita protein tersebut diduga merupakan pre-albumin, albumin, post-albumin, dan globulin. Albumin merupakan protein plasma darah dengan jumlah terbanyak yaitu sekitar 55-60% dari total protein plasma. Pre-albumin memiliki berat molekul sekitar 55 kDa, albumin memiliki berat molekul berkisar 60 kDa – 69 kDa, dan post-albumin memiliki berat molekul berkisar 70 kDa (Çolak *et al.*, 2002; Hidayati *et al.*, 2017; Kreyling *et al.*, 2014). Adapun protein globulin berdasarkan penelitian Çolak *et al.*, (2002) teridentifikasi melalui profil SDS-PAGE dengan membentuk zona globulin yang berisi empat hingga tujuh pita protein dengan berat molekul berkisar antara 97,4 kDa - 205 kDa, dan tiga pita protein dengan berat molekul di atas 205 kDa.

Perbedaan pola profil protein tanpa pemberian 2-mercaptoethanol dan dengan pemberian 2-mercaptoethanol menggambarkan bahwa plasma darah mencit diduga memiliki protein-protein multimer yang mengandung ikatan disulfida. Protein multimer dapat tereduksi menjadi protein monomer dengan pemutusan ikatan disulfida oleh 2-mercaptoethanol sebagai agen pereduksi protein. Teknik SDS-PAGE pada kondisi non-reduksi dan tereduksi (dengan β -mercaptoethanol) digunakan untuk mempelajari perubahan profil dan komposisi protein. Protein-protein dengan berat molekul besar terlihat jelas pada gel yang tidak tereduksi (tanpa β -mercaptoethanol) (Qi & Onwulata, 2011).

Pada sampel darah manusia teridentifikasi 4594 ikatan disulfida pada protein darah. Struktur ikatan disulfida tersebut berperan dalam pengontrolan protein darah soluble dan reseptor pada sel darah pada sistem sirkulasi, salah satunya melalui mekanisme kontrol alosterik (Butera *et al.*, 2014). Ikatan disulfida pada protein merupakan ikatan yang menghubungkan dua residu asam amino sistein melalui gugus sampingnya (Mthembu *et al.*, 2020). Asam amino sistein merupakan salah satu asam amino yang sedikit jumlahnya namun memiliki peran penting sebagai salah satu agen pereduksi ekstrasel dan berperan dalam respon stres oksidatif, proses sintesis protein (Kleinman & Richie, 2000).

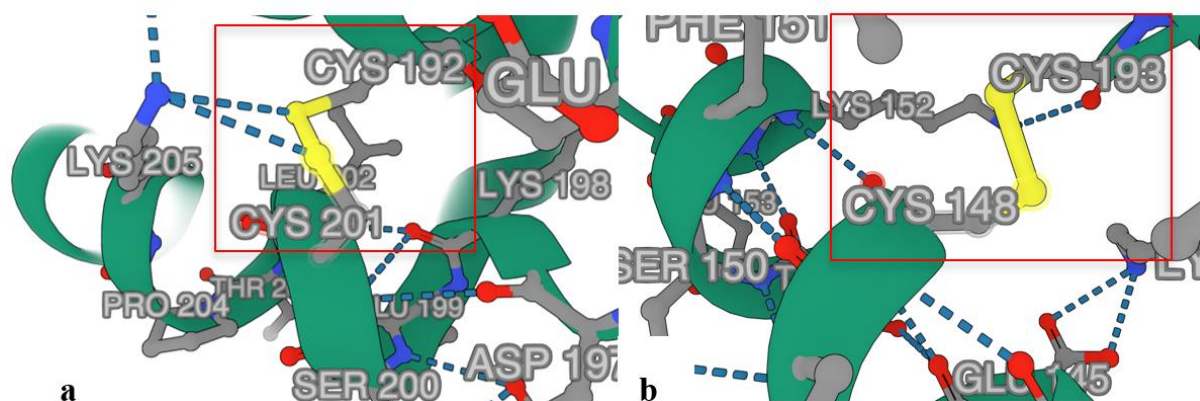
Pemutusan ikatan disulfida oleh 2-mercaptoethanol dilakukan dengan mereduksi gugus thiol pada ikatan disulfida pada residu sistein (Clark *et al.*, 2019). Ikatan disulfida merupakan ikatan kovalen yang mendukung fungsi secara struktural dan fungsional (Xu *et al.*, 2021). Gugus sulfur pada sistein berada dalam fase aktif yang dapat tereduksi maupun teroksidasi sesuai dengan kondisi lingkungan. Pemutusan ikatan disulfida oleh 2-mercaptoethanol (HS-CH₂-CHOH) terjadi melalui proses reduksi pada unsur sulfur melalui pertukaran disulfida

antara 2ME dan ikatan asam amino serta melibatkan substitusi nukleofilik yang menyerang gugus thiol pada disulfida (Gambar 4) (Mthembu *et al.*, 2020).



Gambar 4. Reaksi pemutusan ikatan disulfida oleh 2-mercaptoethanol (Hermanson, 2013)

Hasil analisis protein pada SDS-PAGE menunjukkan bahwa terdapat pita dengan ukuran 52 kDa - 72 kDa yang diperkirakan merupakan protein albumin. Protein albumin diketahui memiliki asam amino penyusun berupa sistein yang dapat membentuk ikatan disulfida dengan asam amino sistein. Prediksi secara komputasi menunjukkan keberadaan ikatan disulfida antar asam amino sistein pada model protein albumin dari *Mus musculus* (Gambar 5). Ikatan disulfida pada protein albumin tersebut yang menjadi target dari 2-mercaptoethanol sehingga adanya pemberian reduktan tersebut akan menyebabkan linearisasi protein dan perbedaan profil protein.



Gambar 5. Prediksi posisi ikatan disulfida antara a) sistein 192 (cys 192) dan sistein 201 (cys 201); b) sistein 148 (cys 148) dan sistein 193 (cys 193) pada model protein albumin *Mus musculus* (Uniprot ID: P07724).

Penelitian terdahulu mengenai pembuktian reduksi ikatan disulfida oleh 2-mercaptoethanol dilakukan oleh Shibata *et al.*, (1998) yaitu melihat efek substitusi residu sistein pada mutan protein aktivator lipase bakteri *Pseudomonas* (Y99C dan R115C) yang dianalisis menggunakan SDS-PAGE dengan pemberian dan tanpa pemberian 2-mercaptoethanol. Dengan tidak adanya reduktor (2-mercaptoethanol), kedua mutan (Y99C dan R115C) muncul sebagai dua pita protein yang mendekati ukuran monomer (36 kDa) dan dimer (72 kDa). Sebaliknya, ukuran pita dimer menghilang dengan penambahan 2-mercaptoethanol. Hal ini dikarenakan kedua mutan hanya memiliki satu residu sistein, sehingga dengan penambahan reduktor akan menghilangkan pita dimer pada hasil SDS-PAGE.

SDS-PAGE dengan dan tanpa penambahan 2-mercaptoethanol juga dilakukan untuk melihat profil protein subunit hemoglobin *Glossoscolex paulistus* (HbGp). Beberapa pita protein yang muncul pada profil SDS-PAGE tanpa pemberian 2-mercaptoethanol, terlihat tidak muncul pada profil protein yang diberikan 2-mercaptoethanol, begitu pula sebaliknya. Hal ini menunjukkan telah terjadi pengurangan ikatan disulfida oleh 2-mercaptoethanol pada protein trimer, sehingga menyebabkan adanya penambahan pita-pita baru di atas pita monomer. Pola migrasi protein subunit HbGp yang berbeda dengan dan tanpa penambahan 2-mercaptoethanol dikaitkan dengan adanya struktur lipatan protein subunit HbGp yang dapat terbuka melalui penginduksian zat pereduksi ikatan disulfida (2-mercaptoethanol) (Carvalho *et al.*, 2011).

Penelitian lainnya dilakukan oleh Ekawasti *et al.* (2015), yaitu terdapat perbedaan profil protein pada *Trypanosoma evansi* Isolat S371 dengan dan tanpa penambahan B-mercaptoethanol, dimana penambahan B-mercaptoethanol mereduksi ikatan disulfida pada protein multimer isolat S371 menjadi protein monomer, sehingga menyebabkan adanya perbedaan profil dan perbedaan ketebalan pita-pita protein pada profil SDS-PAGE dengan metode reduksi dan non-reduksi ikatan disulfida menggunakan b-mercaptoethanol.

Penutup

Profil protein plasma darah mencit tanpa penambahan dan dengan penambahan 2-mercaptoethanol memperlihatkan adanya perbedaan pada jumlah pita protein, berat molekul beberapa protein dan ketebalan pita protein. Perbedaan pola profil protein tersebut menggambarkan bahwa plasma darah mencit memiliki protein-protein yang mengandung ikatan disulfida yang dapat tereduksi oleh pemberian 2-mercaptoethanol.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kepada drh. Didik T. Subekti, M.Kes yang telah membantu analisis parameter dalam penelitian ini, dan semua pihak yang telah membantu dalam proses penyelesaian penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Butera, D., Cook, K. M., Chiu, J., Wong, J. W. H., & Hogg, P. J. (2014). Control of blood proteins by functional disulfide bonds. *Blood*, *123*(13), 2000–2007. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-549816>
- Carson, S., Miller, H. B., Witherow, D. S., & Srougi, M. C. (2019). *Molecular Biology Techniques A Classroom Laboratory Manual Fourth Edition*. Academic Press.
- Carvalho, F. A. O., Carvalho, J. W. P., Santiago, P. S., & Tabak, M. (2011). Further characterization of the subunits of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus* (HbGp) by SDS-PAGE electrophoresis and MALDI-TOF-MS. *Process Biochemistry*, *46*(11), 2144–2151. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.08.013>
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & McGehee, M. . (2019). *Molecular Biology*. Academic Cell.
- Çolak, R., Yigit, N., Çolak, E., Gattermann, R., & Neumann, K. (2002). SDS-PAGE Patterns of Blood Serum Proteins in some Species of the Genus *Meriones* (Mammalia: Rodentia). In *Turk Journal Zoology* (Vol. 26, pp. 177–181). <http://journals.tubitak.gov.tr/zoology/issues/zoo-02-26-2/zoo-26-2-5-0110-2.pdf>
- Hermanson, G. . (2013). *Bioconjugate Techniques*. Academic Press.
- Hidayati, D., Abdulgani, N., Setiyawan, H., Trisnawati, I., Ashuri, N. M., & Sa'adah, N. N. (2017). Analysis of protein profiles in diabetic rat blood plasma that induced by alloxan. *Proceeding of International Biology Conference AIP*, 020016. <https://doi.org/10.1063/1.4985407>
- Kleinman, W. A., & Richie, J. P. (2000). Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma. *Biochemical Pharmacology*, *60*(1), 19–29. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00293-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00293-8)
- Kreyling, W. G., Fertsch-Gapp, S., Schäffler, M., Johnston, B. D., Haberl, N., Pfeiffer, C., Diendorf, J., Schleh, C., Hirn, S., Semmler-Behnke, M., Epple, M., & Parak, W. J. (2014). In vitro and in vivo interactions of selected nanoparticles with rodent serum proteins and their consequences in biokinetics. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *5*, 1699–1711. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.180>
- Mthembu, S. N., Sharma, A., Albericio, F., & de la Torre, B. G. (2020). Breaking a Couple: Disulfide Reducing Agents. *ChemBioChem*, *21*(14), 1947–1954. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000092>
- O'Connor, C. M. (2022). *INVESTIGATIONS IN MOLECULAR CELL BIOLOGY*. Boston College
- Qi, P. X., & Onwulata, C. I. (2011). Physical properties, molecular structures, and protein quality of texturized whey protein isolate: Effect of extrusion moisture content. *Journal of Dairy Science*, *94*(5), 2231–2244. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-394>
- Shibata, H., Kato, H., & Oda, J. (1998). Random mutagenesis on the *Pseudomonas* lipase activator protein, LipB: exploring amino acid residues required for its function. *Protein Engineering Design and Selection*, *11*(6), 467–472.

<https://doi.org/10.1093/protein/11.6.46>

Susanti, A. M., Darmawati, S., & Maharani, E. T. W. (2019). Profil Protein Lima Jenis Daging yang Direndam Daun Pepaya Berbasis SDS-PAGE. *Gorontalo Journal of Public Health*, 2(1), 132. <https://doi.org/10.32662/gjph.v2i1.482>

Xu, X., Chiu, J., Chen, S., & Fang, C. (2021). Pathophysiological roles of cell surface and extracellular protein disulfide isomerase and their molecular mechanisms. *British Journal of Pharmacology*, 178(15), 2911–2930. <https://doi.org/10.1111/bph.15493>