

Isolasi dan Karakterisasi Kasein dari Susu Sapi Segar dengan Metode Pengendapan pada pI dan Pemanfaatannya sebagai Substrat Enzim Protease

Isolation and Characterization of Casein from Cow Milk with Deposition Method on pI and Its Utilization to Substrate of Protease Enzyme

Yoga Pratama, Evi Susanti*, Suharti

¹Jurusan Kimia, Universitas Negeri Malang, email: pratamayoga286@gmail.com

*E-mail corresponding author: evi.susanti.fmipa@um.ac.id

Abstrak: Isolasi kasein dari susu sapi segar dengan metode pengendapan pada pI merupakan salah satu pokok bahasan pada mata kuliah Praktikum Biokimia Umum khususnya di Jurusan Kimia Universitas Negeri Malang (UM). Tujuan pada penelitian ini adalah mengkaracterisasi kasein yang diisolasi dari susu sapi melalui metode pengendapan pada titik isoelektrik yang dilakukan pada Praktikum Biokimia Umum di Jurusan Kimia FMIPA UM dan membandingkan kemampuan kasein hasil isolasi tersebut sebagai substrat untuk uji aktivitas beberapa enzim protease dengan kasein komersial. Tahapan penelitian terdiri dari: (1) isolasi kasein dari susu sapi dengan pengaturan atau kontrol pH pada titik isoelektriknya; (2) karakterisasi kasein hasil isolasi dari susu sapi meliputi kadar air, warna, spektrum FT-IR, kelarutan dan dayasimpan; (3) uji potensi kasein yang diperoleh sebagai substrat protease terhadap ekstrak kasar protease dari isolat H_{TR-10}, papain, bromelin, elszym, dan vitazym. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kasein hasil isolasi berwarna putih dengan rata-rata rendemen hasil sebesar $0,039 \pm 0,010$ g/mL susu, rata-rata kadar air yang didapatkan sebesar $6,44 \pm 0,91$ %. Spektrum FT-IR menunjukkan adanya pita yang muncul pada panjang gelombang 2500-3700 cm⁻¹ dan 1600-1850 cm⁻¹ yang memberikan informasi tentang gugus fungsional seperti C=O, CN, dan NH dari protein kasein. Kelarutan kasein terendah pada pH 4 dan 5 dan sangat tinggi pada pH 3, 6, 7, dan 8. Dayasimpan kasein hasil isolasi hanya 9 minggu. Uji aktivitas pada bromelin, elszym, vitazym, papain, dan ekstrak kasar protease dari isolat H_{TR-10} menggunakan kasein hasil isolasi sebanding dengan menggunakan substrat kasein komersial, sehingga kasein hasil isolasi dari susu sapi dapat digunakan sebagai substrat protease pada pengujian aktivitas protease.

Kata kunci: kasein, protease, kadar air, rendemen, uji FT-IR, warna

Abstract: Isolation of casein from cow's milk by deposition method on pI in one of the subjects in the Research of General Biochemistry at the Chemistry Department of the State University of Malang (UM). Casein from the lab results has never been characterized and not stored for a long time, so it is easily damaged and thrown away. In this study characterization of casein isolated from cow's milk will be carried out through depositional methods at the isoelectric point carried out on the General Biochemistry Practicum in the Department of Chemistry FMIPA UM and comparing the ability of isolated casein as a substrate to test the activity of several protease enzymes with commercial casein.

The research stages consisted of: (1) isolating casein from cow's milk by setting or controlling pH at its isoelectric point; (2) characterization of casein from isolation from cow's milk includes water content, color, FT-IR spectrum, and solubility; (3) potential casein test obtained as a protease substrate against crude protease extract from H_{TR-10}, papain, bromelin, elszym, and vitazym isolates.

The results showed that casein from isolation was white with an average yield of 0.039 ± 0.010 g / mL of milk, the average water content obtained was 6.44 ± 0.91 %. The FT-IR spectrum showed bands that appeared at wavelengths of 2500-3700 cm⁻¹ and 1600-1850 cm⁻¹ which provided information about functional groups such as C=O, CN, and NH from casein proteins. The solubility of casein in different pH

showed casein to have a low solubility at pH 4 and 5 respectively at 5.51% and 3.45%; Even though the solubility is very high at pH 3, 6, 7, and 8 in a row of 96.23%; 96.08%; 96.55%; and 94.44%. Activity tests on bromelin, elszym, vitazym, papain, and crude protease extracts from H_{TR-10} isolates were 4.11 ± 0.14 U / mL; 4.37 ± 0.25 U / mL; 5.06 ± 0.06 U / mL; 5.77 ± 0.07 U / mL; and 5.65 ± 0.24 U / mL. This result is almost the same as the results of the protease activity test using a commercial casein substrate, which is 3.99 ± 0.19 U / mL; 4.28 ± 0.15 U / mL; 5.06 ± 0.03 U / mL; 5.71 ± 0.14 U / mL; and 5.85 ± 0.09 U / mL. From the results of these studies, the results of isolation from cow's milk can be used as a protease substrate in testing protease activity.

Keywords: casein, protease, water content, yield, FT-IR spectrum, color.

PENDAHULUAN

Kasein memiliki berbagai fungsi khususnya dalam penelitian Biokimia maupun bidang penelitian lainnya yang serumpun. Kasein digunakan sebagai substrat standar untuk menguji aktivitas enzim protease yang banyak dilakukan di kajian Biokimia (Ahyari, 2010); menjadi sumber nitrogen pada berbagai medium pertumbuhan bakteri (Naiola dan Widhyastutik, 2002); digunakan sebagai material untuk teknik enkapsulasi enzim atau sel. Kumaresan dkk. (2017) menjelaskan bahwa κ -kasein dapat diendapkan, sehingga mudah diolah menjadi keju. Kasein sering digunakan sebagai bahan pembuatan lem dan roti. Hidrolisat kasein atau kasein yang telah diproses oleh enzim diketahui dapat mempunyai fungsi emulsifikasi, pengikatan air, dan penciptaan busa dalam makanan. Penambahan kasein yang dihidrolisis oleh asam telah dilaporkan mampu meningkatkan kualitas roti (Crowley dkk., 2005).

Isolasi kasein dari susu sapi segar merupakan salah satu pokok bahasan pada mata kuliah Praktikum Biokimia Umum di Jurusan Kimia Universitas Negeri Malang (UM). Pokok bahasan ini mengkaji konsep pengendapan kasein pada titik isoelektrik dan aplikasinya untuk isolasi protein. Konsep tersebut sangat penting, sehingga pokok bahasan ini selalu disajikan pada mata kuliah tersebut. Berdasarkan data terakhir, pokok bahasan ini telah disajikan sejak tahun 2005 hingga tahun 2018 di FMIPA UM.

Kuliah Praktikum Biokimia Umum semester 6 tahun ajaran 2017/2018 diikuti oleh 6 offering (A, B, C, G, H dan I). Rata-rata kasein yang dihasilkan oleh keenam offering tersebut yaitu 5,566; 4,933; 5,613; 4,860; 4,699; dan 5,284 g/mL susu sapi. Setiap offering terdiri dari 8 kelompok, maka kasein yang dihasilkan dalam satu semester sebesar 247,64 g. Jika diasumsikan setiap tahun dihasilkan 247,64 g kasein, maka kasein yang telah dihasilkan melalui mata kuliah Praktikum Biokimia Umum sejak tahun 2005 hingga 2018 sebesar 3,7146 kg. Kasein hasil praktikum tersebut tidak pernah dikarakterisasi dan tidak dimanfaatkan. Penyimpanannya pun tidak diperlakukan secara khusus, sehingga pada jangka waktu tertentu akan menimbulkan bau dan dibuang begitu saja. Padahal, kasein memiliki fungsi yang penting dalam penelitian biokimia dan bernilai jual tinggi secara ekonomis.

Berdasarkan uraian di atas diduga kasein yang dihasilkan dengan metode pengendapan pada titik isoelektrik seperti pada Praktikum Biokimia Umum tersebut kemungkinan dapat digunakan sebagai substrat protease menggantikan kasein komersial yang harganya mahal.

Sebelum digunakan sebagai alternatif pengganti kasein komersial, maka kasein hasil isolasi menggunakan metode yang dilakukan pada Praktikum Biokimia tersebut perlu dikarakterisasi. Beberapa parameter yang harus perlu dikarakterisasi diantaranya warna, kadar air, spektrum FT-IR, kelarutan, dan daya simpan. Selanjutnya, dibandingkan kemampuan kasein hasil isolasi tersebut sebagai substrat protease dibandingkan kasein komersial. Oleh karena itu, peneliti telah melakukan penelitian dengan judul “Isolasi dan Karakteristik dari Susu Sapi Segar dengan Metode Pengendapan pada pI dan Pemanfaatannya sebagai Substrat Enzim Protease.”

1. Metode

1.1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi gelas kimia 250 mL, batang pengaduk, kertas saring, pipet tetes, indikator universal, corong kaca, erlenmeyer 250 mL dan 100 mL, spatula, tabung reaksi, stirer, vorteks, botol semprot akuades, oven, neraca digital, dan rak tabung reaksi.

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini meliputi susu sapi segar, buffer asetat 0,2 M pH 4,7, HCl 0,5 M, etanol 95%, heksana, akuades, kasein komersial *Merck*, ekstrak kasar kasein, papin, bromelin, tirosin standar, asam trikloroasetat atau TCA (CCl_3COOH) 10%, Na_2CO_3 0,5 M, dan Reagen Folin-Ciocalteu.

1.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2018 sampai bulan April 2019. Isolasi kasein dari susu sapi segar dan uji aktivitas enzim protease dilakukan di Laboratorium Penelitian Biokimia Jurusan Kimia FMIPA UM. Uji kadar air dan kelarutan dilakukan di Laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia FMIPA UM. Pengukuran FT-IR dilakukan di Laboratorium Bersama FMIPA

1.3. Tahapan Penelitian

1.3.1. Isolasi dan Penentuan Rendemen Kasein dari Susu Sapi Segar dengan Metode Pengendapan pada Titik Isoelektriknya

Susu sapi segar sebanyak 50 mL dihangatkan pada suhu 40 °C dan ditambahkan 50 mL larutan buffer asetat 0,2 M pH 4,7. Diatur pH-nya dengan HCl 0,5 M hingga pH-nya mencapai titik isoelektriknya, yakni pada pH 4,5-4,7. Pengecekan pH menggunakan indikator universal. Endapan yang terbentuk dibiarkan untuk memperbesar ukuran dan didekantasi untuk diambil residunya. Residu dicuci dengan akuades, dilanjutkan etanol, campuran etanol-heksana, dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 70 °C selama 2 jam. Hasil pengeringan dibiarkan selama beberapa menit. Hasil yang didapatkan dihaluskan dan diayak dengan ayakan 100 mesh. Penentuan rendemen kasein hasil isolasi dari susu sapi ditentukan dengan membagi berat kasein hasil isolasi dengan berat awal dari susu sapi. Rumus menghitung rendemen kasein adalah:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat kasein (g)}}{\text{volume susu (L)}}$$

1.3.2. Spektrum FT-IR

Sampel kasein hasil isolasi dan kasein komersial diamati spektrum FT-IR di Laboratorium Bersama FMIPA UM.

1.3.3. Uji Kelarutan Kasein Hasil Isolasi

Kelarutan dapat dilakukan dengan memasukkan sampel 0,5 gram dalam tabung reaksi yang masing-masing berisi 10 mL bufer pada berbagai pH, yaitu antara pH 2 hingga 8, kemudian dilarutkan selama 20 menit. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 1 jam. Residu yang diperoleh ditentukan beratnya dengan metode gravimetri. Kelarutan ditentukan berdasarkan jumlah protein yang terdapat di dalam supernatan, ditentukan dengan cara:

$$\text{Kelarutan (\%)} = \frac{\text{Massa Sampel Awal} - \text{Massa Sampel Kering (g)}}{\text{Massa Sampel Awal (g)}} \times 100\%$$

1.3.4. Penentuan Kadar Air dari Kasein Hasil Isolasi

Penentuan kadar air dilakukan dengan cara sebanyak 0,5 gram kasein yang kering dipanaskan dalam oven dengan suhu 100 °C selama 2 jam, dimasukkan dalam desikator selama 15 menit, lalu ditimbang. Proses ini dilakukan hingga diperoleh berat konstan. Kadar air dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar Air (\%)} = \frac{\text{berat yang hilang (g)}}{\text{berat sampel sebelum dipanaskan (g)}} \times 100\%$$

1.3.5. Uji Daya Simpan Kasein Hasil Isolasi dari Susu Sapi

Uji dilakukan dengan mengamati secara langsung bau dan warnanya setiap minggu.

1.3.6. Potensi Kasein Hasil Isolasi sebagai Substrat pada Uji Aktivitas Enzim Protease

Sebanyak 0,5 gram kasein kering ditambahkan dengan 0,2 mL ekstrak kasar protease. Campuran diinkubasi pada suhu 40°C selama 20 menit. Hasil yang telah diinkubasi tersebut dihentikan dengan penambahan TCA 10% sebanyak 1 mL. Campuran diaduk dan dibiarkan dalam suhu ruang selama 15 menit. Campuran tersebut disentrifugasi selama 20 menit pada suhu kamar dengan 2500 rpm. Supernatan yang diperoleh ditambahkan dengan 2,5 mL Na₂CO₃ dan 1 mL Reagen Folin-Ciocalteu. Hasil pencampuran tersebut diinkubasi lagi selama 30 menit pada suhu kamar di ruang gelap. Hasil dari inkubasi akhir diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 660 nm. Data absorbansi yang didapatkan digunakan untuk menghitung unit aktivitas protease terhadap kasein yang digunakan. Pengujian diulang kembali dengan mengganti ekstrak kasar protease dengan sumber protease lainnya seperti papain dan bromelin.

Aktivitas protease dihitung dalam satuan unit (U) per mL ekstrak enzim protease. Aktivitas enzim protease ditentukan dengan cara:

$$\text{Aktivitas Enzim (U/menit)} = \frac{\text{Asb} - \text{Abl}}{\text{Ast} - \text{Abl}} \times \text{FP} \times \frac{1}{T}$$

Keterangan: Asb = Absorbansi sampel; Ast = Absorbansi standar; Abl = Absorbansi blanko; FP = Faktor pengenceran; T = Waktu Inkubasi (menit)

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Rendemen Kasein dengan Metode Pengendapan pada Titik Isoelektrik

Isolasi kasein dari susu sapi dengan metode pengendapan pada titik isoelektrik dilakukan sebanyak 6 kali ulangan menggunakan susu sapi dari sumber yang sama, yaitu berasal dari UD. Lembu Makmur Malang. Rendemen rata-rata yang diperoleh sebesar 0.039 ± 0.010 g/mL susu atau diantara 0.029 hingga 0.049 g/mL susu (Tabel 1). Berdasarkan hasil tersebut dapat dikatakan proses isolasi yang dilakukan *reproducible* karena deviasi antar pengulangan cukup rendah.

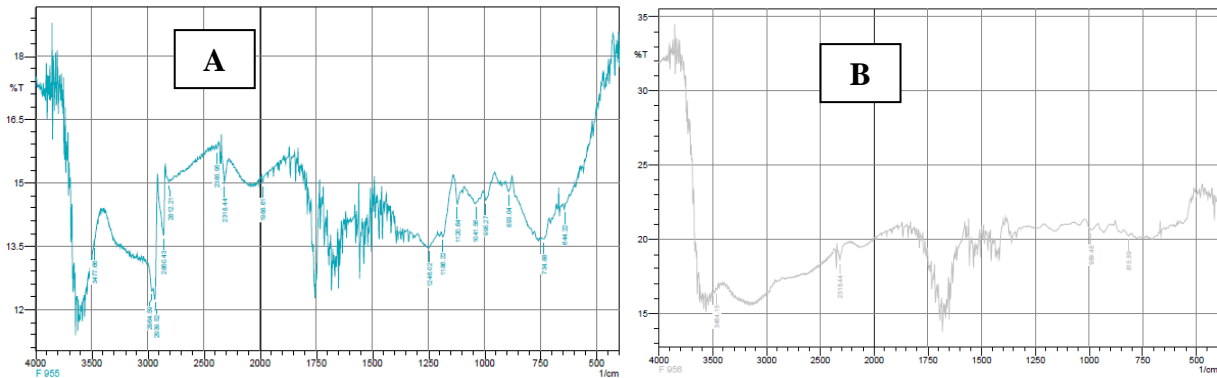
Kandungan kasein secara teoritis sebesar 80% dari total kandungan protein pada susu sapi dan 2,8% dari kandungan 100 mL susu sapi. Rendemen kasein yang didapatkan secara teoritis sebesar 0,028 g/mL susu sapi. Rendemen kasein secara teoritis tersebut berbeda dengan hasil penelitian. Hal ini dapat dijelaskan berdasarkan Oka dkk. (2017) yang menyatakan bahwa susu sapi perah dari KUD yang berbeda memiliki kadar protein yang berbeda. Susu sapi dari KUD Batu Leppa, KUD Batu Pangkaiya, dan KUD Pattiroang berturut-turut menghasilkan kadar protein sebesar 0,036 g/mL, 0,035 g/mL dan 0,030 g/mL. Ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi hasil tersebut diantaranya jenis sapi penghasil susu, waktu pemerahan dan jenis pakan yang diberikan pada sapi. Analogi ini yang dapat menjelaskan mengapa rendemen kasein yang diperoleh dari penelitian ini lebih tinggi daripada rendemen secara teoritis.

Tabel 1. Rendemen Kasein Hasil Isolasi

Ulangan ke-	Rendemen (g/mL)	Rerata rendemen (g/mL±SD)
1	0.037	
2	0.040	
3	0.039	
4	0.038	0.039 ± 0.010
5	0.040	
6	0.039	

3.2. Karakterisasi Kasein Hasil Isolasi dari Susu Sapi

3.2.1. Spektrum FT-IR



Gambar1. Hasil Uji FT-IR Sampel (A) dan Merck (B)

Hasil pengujian FT-IR menunjukkan beberapa puncak penting untuk identifikasi adanya protein muncul pada kasein hasil isolasi dan kasein komersial sebagai kontrol positif. Puncak antara $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus fungsional N-H dari ($-\text{NH}_2$) dan O-H dari ($-\text{COOH}$); puncak antara $1700\text{-}1710\text{ cm}^{-1}$ Keberadaan pita tersebut memberikan informasi bahwa adanya gugus fungsional C=O dari gugus karboksilat; secara spesifik puncak pada $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan gugus C=N yang khas bagi ikatan peptida (Sirocic dkk., 2016).

3.2.2. Kelarutan Kasein pada Berbagai pH

Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa kasein hasil isolasi dari susu sapi memiliki kelarutan yang rendah pada pH 4 dan 5 berturut-turut sebesar 5.51% dan 3.45%, dan sangat tinggi pada pH 3, 6, 7, dan 8 berturut-turut sebesar 96.23%, 96.08%, 96.55%, dan 94.44% (Gambar 3.2). Hasil ini sejalan dengan pI kasein yaitu pada pH 4,7-5,0 (Glab dan Boratynski, 2017). Shah dkk. (2010) menjelaskan bahwa kasein memiliki kelarutan terendah dan mudah sekali mengendap pada titik isoelektriknya yaitu pada pH 4,7-5,0.

3.2.3. Kadar Air Kasein Hasil Isolasi dari Susu Sapi

Penentuan kadar air sangat penting dalam penelitian ini. Tinggi rendahnya kadar air menentukan kualitas kasein yang diisolasi. Kadar air rata-rata yang diperoleh sebesar $6.44 \pm 0.91\%$ atau diantara 5.53 hingga 7.35% (Tabel 2).

Tabel 2. Kadar Air Kasein Hasil Isolasi

Ulangan	Kadar air (%)	Rerata kadar air (% \pm SD)
1	6.67	6.44 \pm 0.91
2	5.29	
3	5.81	
4	6.59	
5	6.33	
6	7.97	

3.2.4. Daya Simpan

Pengamatan pada bau dan warna dari kasein hasil isolasi menunjukkan terjadinya perubahan warna dan bau pada minggu ke-9 (Tabel 3). Warna kasein hasil isolasi dari susu sapi mengalami perubahan dari putih menjadi kecoklatan dan timbul bau menyengat. Hal ini diduga karena kadar air yang tinggi memudahkan terjadinya proses hidrolisis kasein oleh enzim protease yang kemungkinan dihasilkan oleh bakteri proteolitik yang terpapar pada kasein selama penyimpanan. Degradasi selanjutnya mengakibatkan terbentuknya H₂S yang menimbulkan bau menyengat. Berdasarkan hal ini disarankan untuk menurunkan kadar air kasein sebelum penyimpanan. Kadar air yang rendah akan memperlambat pertumbuhan bakteri proteolitik yang berasal saat kasein terpapa udara bebas. Penyimpanan kasein hasil isolasi juga harus ditempatkan dalam wadah vakum dan hermetis, serta perlu ditambahkan senyawa anti bakteri saat penyimpanan untuk mempertahankan kualitas kasein yang telah diisolasi.

Tabel 3. Pengamatan Warna dan Bau Saat Penyimpanan

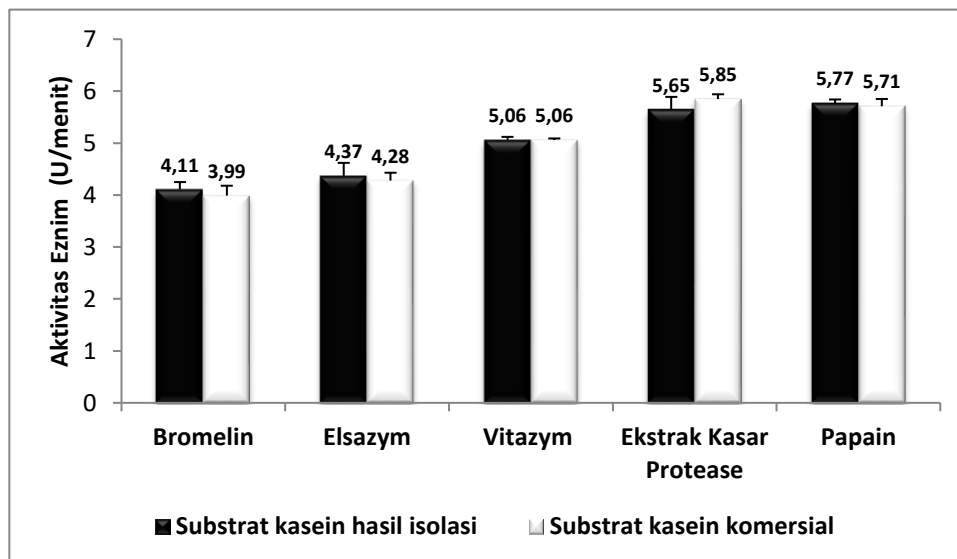
Sampel	Penyimpanan Minggu ke-				
	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10
Kasein hasil isolasi	Warna putih; bau (+)	Warna putih; bau (+)	Warna putih; bau (+)	Warna putih agak kecoklatan; bau (+)	Warna putih kecoklatan; bau (++)

Keterangan : (+) = normal; (++) = agak menyengat

3.3. Perbandingan Kemampuan Kasein Hasil Isolasi dengan Kasein Komersial sebagai Substrat Protease

Kemampuan kasein sebagai substrat protease dapat diketahui efektifitasnya dengan menggunakannya sebagai substrat untuk pengujian beberapa protease diantaranya ekstrak kasar protease dari bakteri proteolitik, bromelin, papain, dan beberapa obat pencernaan yang mengandung protease (Elsazym dan vitazym) dan dibandingkan dengan aktivitasnya dengan menggunakan kasein komersial sebagai substrat. Aktivitas enzim protease ditentukan berdasarkan banyaknya jumlah tirosin bebas yang dihasilkan per menit per mL enzim. Pengulangan pada penelitian ini dilakukan sebanyak 10 kali. Uji aktivitas dengan substrat kasein hasil isolasi pada bromelin, elsazym, vitazym, papain, dan ekstrak kasar protease dari

isolat H_{TR-10} berturut-turut sebesar $4,11 \pm 0,14$ U/mL; $4,37 \pm 0,25$ U/mL; $5,06 \pm 0,06$ U/mL; $5,77 \pm 0,07$ U/mL; dan $5,65 \pm 0,24$ U/mL; dan menggunakan substrat kasein komersial sebesar $3,99 \pm 0,19$ U/mL; $4,28 \pm 0,15$ U/mL; $5,06 \pm 0,03$ U/mL; $5,71 \pm 0,14$ U/mL; dan $5,85 \pm 0,09$ U/mL (Gambar 3). Hasil penelitian tersebut menunjukkan konsistensi yang baik, ditandai dengan nilai standar deviasi minimal 0,03 dan maksimal 0,25. Besarnya nilai aktivitas protease yang diuji relatif sebanding antara yang diuji menggunakan substrat kasein hasil isolasi dengan kasein komersial, hanya pada protease dari bakteri proteolitik yang sedikit berbeda. Aktivitas protease pada bakteri proteolitik dengan substrat kasein komersial lebih tinggi dari pada yang diuji dengan kasein hasil isolasi. Perbedaan ini diduga karena protease dari bakteri proteolitik masih terdiri dari beberapa jenis protease. Ada kemungkinan protease tersebut memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap kasein komersial dibandingkan kasein hasil isolasi, sehingga aktivitasnya menjadi lebih tinggi.



Gambar 3 Aktivitas Beberapa Enzim Protease yang Diuji dengan Substrat Kasein Hasil Isolasi dan Kasein Komersial

4. Simpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kasein hasil isolasi berwarna putih dengan rata-rata rendemen hasil sebesar $0,039 \pm 0,010$ g/mL susu, rata-rata kadar air yang didapatkan sebesar $6,44 \pm 0,91$ %. Spektrum FT-IR menunjukkan adanya pita yang muncul pada panjang gelombang $2500-3700$ cm^{-1} dan $1600-1850$ cm^{-1} yang memberikan informasi tentang gugus fungsional seperti C=O, CN, dan NH dari protein kasein. Kelarutan kasein terendah pada pH 4 dan 5 dan sangat tinggi pada pH 3, 6, 7, dan 8. Daya simpan kasein hasil isolasi hanya 9 minggu. Uji aktivitas pada bromelin, elszym, vitazym, papain, dan ekstrak kasar protease dari isolat H_{TR-10} menggunakan kasein hasil isolasi sebanding dengan menggunakan substrat kasein komersial, sehingga kasein hasil isolasi dari susu sapi dapat digunakan sebagai substrat protease pada pengujian aktivitas protease.

Daftar Rujukan

- Ardiyanto, T. 2011. *Rumus Struktur Asam Amino*. (Online), (<http://taufik-ardiyanto.blogspot.com/2011/10/rumus-struktur-asam-amino.html>), diakses pada tanggal 22 Mei 2019.
- Crowley, P., O'Brien, C., Slattery, H., Chapman, D., Arendt, E., dan Stanton, C. 2002. *Functional Properties of Casein Hydrolysates in Bakery Applications*. **2(1)**: 131-137.
- Dalgleish, D. G. 1998. *Casein Micelles as Colloids: Surface Structures and Stabilities*. **81(11)**: 3013-3018.
- Genius. 2010. *Imunohistokimia untuk Model Kasein*. (Online), (http://farisnh.com/2010/04/imunohistokimia-imunohistokimia_16.html), diakses pada tanggal 17 Mei 2019.
- Glab, T. K. dan Boratynski, J. 2017. *Potential of Casein as a Carrier for Biologically Active Agents*. **3(5)**: 71.
- Holt, C., Carver, J. A., Ecroyd, H., dan Thorn, D. C. 2013. *Interview Review: Caseins and the Caseins Micelle: Their Biological Functions, Structures, and Behavior in Foods*. **9(6)**: 6127-6146.
- Horne, D. S. 2002. *Casein Structure, Self-Assembly and Gelation*. **7(5)**: 456-461.
- Kumaresan, A., Selma, C., Resham, N. V., dan Jacinth, N. A. 2017. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. **9(9)**: 113-115.
- Lawrence, K. dan Creamer, L. K. 1998. *Journal of Dairy Science*. **81**: 3004-3012.
- Lehninger. 1992. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1*. Jakarta : Erlangga.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta : UI-Press.
- Sirocic, A. P., Krehula, K. Lj., Katancic, Z., dan Hrnjak-Murgic, Z. 2016. *Characterization of Casein Fractions. Comparison of Commercial Casein and Casein Extracted from Cow's Milk*. *Chemistry of Biochemistry England Q*. **30(4)**: 501-509.
- Triwibowo, Y. 2005. *Biologi Molekuler*. Yogyakarta: Penerbit Erlangga.
- Wang, J., Su, Y., Jia, F., dan Jin, H. 2013. *Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis*. *Chemistry Central Journal*. **7(1)**: 62.