

## Karakteristik Kimia Biskuit Berbahan Baku Tepung *Whey* untuk Penderita Autis

Fitri M. Manihuruk<sup>1</sup> dan Zakiah Wulandari<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Pelatihan Peternakan Kupang

<sup>2</sup>Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor

e-mail: [fitry0391@gmail.com](mailto:fitry0391@gmail.com)

### Abstrak

Penderita autis memiliki reaksi alergi terhadap makanan yang mengandung gluten dan kasein sehingga inovasi dalam pengolahan pangan bagi penderita penting dilakukan. Tepung *whey*, suatu tepung dari hasil ikutan pembuatan keju, mengandung protein tinggi dan aman dikonsumsi bagi penderita autis. Tujuan penelitian ini adalah mengevaluasi karakteristik organoleptik dan kimia biskuit berbahan baku tepung *whey* yang berbeda sehingga diperoleh formulasi terbaik sebagai makanan khusus bagi penderita autis. Formulasi biskuit dengan perbedaan penambahan tepung *whey* 5%, 10%, 15%, dan 20% diamati karakteristik organoleptik dan kimia. Protein kasein dan gluten pada formulasi biskuit terbaik dianalisis dengan metode SDS-PAGE. Hasil analisis menunjukkan bahwa penambahan tepung *whey* berpengaruh terhadap karakteristik organoleptik, kadar abu, kadar protein, dan kadar asam lemak bebas. Analisis SDS-PAGE menunjukkan bahwa fraksi protein kasein dan gluten tidak terlihat nyata sejajar dengan pita standar pada biskuit dengan penambahan tepung *whey* 5%.

**Kata Kunci :** *Autis; Biskuit; SDS-PAGE; Tepung whey*

### Abstract

People with autism have an allergic reaction to foods containing gluten and casein. Food processing innovation is needed. Whey powder, the by-product of cheese, have a high protein but can be consumed by people with autism safely. The objectives of this research to evaluate organoleptic and chemical characteristics of different whey powder-based biscuits to obtain the best formulation as a special food for people with autism. Biscuit formulations with the different addition of whey powder 5%, 10%, 15%, and 20% was observed organoleptic and chemical characteristics. Casein and gluten protein of the best formulation biscuit was analysed by SDS-PAGE method. The results of this research showed that the addition of whey powder had a significant difference to organoleptic characteristics, the content of ash, protein, and free fatty acid. The SDS-PAGE analysis showed that protein fraction of casein and gluten were not seen significantly with band protein standard on 5% whey powder-based biscuit.

**Keywords:** Autism; Biscuit; SDS-PAGE; Whey powder

## 1. PENDAHULUAN

Autisme merupakan gejala fisik yang kompleks akibat gangguan saluran pencernaan, alergi, daya tahan tubuh yang menurun, dan keracunan logam berat. Gangguan ini menyebabkan otak mengalami kelainan struktur dan disfungsi yang berpengaruh negatif terhadap fungsi tubuh (Wasilewska & Klukowski, 2015). Gangguan saluran pencernaan timbul akibat tubuh penderita autis tidak mampu mencerna protein, khususnya kasein dan gluten. Enzim *dipeptidylpeptidase IV* (DPP-IV), sebagai pencerna kasein dan gluten, tidak bekerja aktif dan tidak terdapat pada saluran pencernaan pada sebagian besar penderita. Gangguan pada enzim ini menyebabkan penumpukan opioid pada otak sehingga penderita kehilangan kontrol pada dirinya (McCandless, 2003).

Pangan yang mengandung kasein (protein susu) dan gluten (protein gandum) dapat menyebabkan alergi dan menurunkan kesehatan penderita autis (Cieślińska, Kostyra, & Savelkoul, 2017). Penerapan diet bebas gluten dan kasein secara bertahap yang diikuti dengan pemilihan

makanan yang selektif dapat menjadi terapi awal untuk penderita autis. Salah satu tahap pemilihan makanan untuk penderita autis adalah menghindari konsumsi susu dan bahan pangan yang mengandung susu, tetapi bahan pangan yang memenuhi persyaratan tersebut masih jarang ditemukan. Hal ini dapat diatasi dengan upaya pemberian produk olahan susu bebas kasein yaitu *whey*.

*Whey* mengandung protein penting dan belum banyak dimanfaatkan secara optimal (Miller, Jarvis, & McBean, 2006). Pemanfaatannya dapat ditingkatkan dengan cara mengolah *whey* menjadi tepung sehingga dapat digunakan sebagai bahan pembuatan produk pangan yang bebas kasein. Tepung jagung digunakan sebagai bahan substitusi tepung terigu pada produk pangan. Tepung jagung mengandung protein tinggi dan bebas gluten (Richana, 2010). Tepung *whey* bebas kasein dan tepung jagung bebas gluten diformulasikan untuk memperoleh inovasi olahan pangan khusus bagi penderita autis, yaitu biskuit. Biskuit mempunyai formulasi yang mudah divariasikan dengan perubahan komposisi pada bahan penyusunnya dan sudah dikenal luas oleh masyarakat pada semua golongan umur dan tingkat sosial.

Formulasi jajanan sehat berupa biskuit yang berbahan dasar tepung *whey* dan tepung jagung dikembangkan dan diteliti untuk memenuhi kebutuhan gizi khusus bagi penderita autis. Penelitian ini mengenai karakteristik kimia biskuit berbahan baku tepung *whey* sehingga diperoleh formulasi terbaik jajanan sehat bebas kasein dan gluten bagi penderita autis.

## 2. METODE PENELITIAN

Penelitian ini diawali dengan pembuatan biskuit dengan persentase penambahan tepung *whey* berbeda. Biskuit dianalisis karakteristik kimia untuk mengetahui pengaruh perbedaan penambahan tepung *whey* terhadap karakteristik biskuit sehingga diperoleh formulasi terbaik. Kandungan protein kasein dan gluten pada biskuit formulasi terbaik selanjutnya dianalisis dengan metode *sodium dodesyl sulfate-polycrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE).

### 2.1. Pembuatan biskuit

Biskuit dibuat dengan penambahan tepung *whey* dan tepung jagung dengan persentase berbeda dari jumlah tepung. Acuan formulasi biskuit yang digunakan berdasarkan formulasi dari Codex Alimentarius (1991) dapat dilihat pada Tabel 1. Prosedur pembuatan biskuit dimodifikasi dari Hermiani (2005) yang menghasilkan biskuit kering.

**Tabel 1.** Perlakuan variasi formulasi biskuit

Bahan (gram)	Biskuit A (5% tepung <i>whey</i> )	Biskuit B (10% tepung <i>whey</i> )	Biskuit C (15% tepung <i>whey</i> )	Biskuit D (20% tepung <i>whey</i> )
Tepung <i>whey</i>	7.2	14.4	21.6	28.8
Tepung Jagung	136.8	129.6	122.4	115.2
Margarin	60.0	60.0	60.0	60.0
Gula halus	36.0	36.0	36.0	36.0
Kuning telur	60.0	60.0	60.0	60.0

Sumber : Modifikasi Codex Alimentarius (1991)

### 2.2. Uji karakteristik kimia

Uji karakteristik kimia yang dilakukan adalah analisis kadar air, kadar protein, dan kadar asam lemak bebas (Badan Standar Nasional, 2011), kadar abu, kadar lemak, serta karbohidrat (Badan Standar Nasional, 1992). Hasil uji karakteristik kimia selanjutnya dilakukan skoring untuk menentukan formulasi terbaiknya yang mengacu pada Badan Standar Nasional (1992) dan Badan Standar Nasional (2011).

### 2.3. Analisis protein kasein dan gluten

Pengendapan protein dilakukan setelah memperoleh formulasi biskuit terbaik hasil uji karakteristik dan kimia. Pengendapan protein dilakukan dengan menggunakan 100% *trichloroacetic acid* (TCA), 500 gram TCA dalam 350 mililiter H<sub>2</sub>O. Sebanyak lima gram sampel dilarutkan dalam lima mililiter akuades. TCA 500 µL kemudian ditambahkan dalam satu mililiter sampel tersebut. Pengendapan ini dilakukan untuk memperoleh protein murni yang terbebas dari zat pengotor (Sanchez, 2001).

Analisis protein kasein dan gluten dilakukan dengan teknik penentuan berat molekul protein melalui metode *sodium dodesyl sulfate-polycrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Berat molekul standar protein kasein 25-35 kDa (Trewick, 2010). Berat molekul standar protein gluten terdiri atas berat masa molekul kecil atau LMM (Low Molecular Mass) 36-38 kDa dan 42-44 kDa serta berat masa molekul besar atau HMM (High Molecular Mass) 64-70 kDa dan 95-136 kDa (Jakubauskiene & Juodeikiene, 2005).

### 2.4. Analisis data

Data diolah dengan analisis ragam (ANOVA) menggunakan software Statistical Analysis System's Procedures. Jika analisis menunjukkan perlakuan berpengaruh nyata terhadap peubah yang diamati, maka dilanjutkan uji perbandingan berganda menggunakan uji Tukey (Steel & Torrie, 1991).

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Formulasi biskuit menghasilkan perbandingan tepung *whey* dan tepung jagung pada pembuatan biskuit. Formulasi biskuit yang diperoleh adalah persentase penambahan tepung *whey* 5%, 10%, 15%, dan 20% dari total tepung (Tabel 1). Penambahan tepung *whey* ini dilakukan sampai 20% dari total tepung karena pada taraf yang lebih tinggi akan menghasilkan biskuit dengan rasa asam yang tinggi dan warna coklat yang lebih gelap sehingga mengurangi tingkat penerimaan biskuit tersebut. Parate, Kawadkar, & Sonawane (2011) menyatakan bahwa tingkat penggunaan *whey* pada biskuit semakin meningkat makan akan menurunkan tingkat kesukaan penampilan biskuit. Selain itu, bahan dasar *whey* dapat meningkatkan dan membantu pencoklatan lapisan luar pada produk biskuit.

### 3.1. Karakteristik kimia biskuit

Karakteristik kimia yang dianalisis adalah kadar air, kadar abu, kadar protein, kadar lemak, karbohidrat, dan asam lemak bebas. Hasil uji karakteristik kimia biskuit dapat dilihat pada Tabel 2. Perlakuan penambahan tepung *whey* yang berbeda tidak berpengaruh terhadap kadar air biskuit ( $P>0.05$ ). Hal ini disebabkan karena setiap biskuit mendapat perlakuan pemanggangan dengan pemanasan yang sama yaitu pada suhu 150 °C selama 20 menit. Kadar air yang dihasilkan sesuai dengan standar yang ditetapkan oleh Badan Standar Nasional 2973:2011 (maksimal 5%). Kadar air lebih dari 5% disebabkan proses pemanggangan dilakukan hanya satu kali, sedangkan biskuit yang baik menurut Edwards (2007) diperoleh dengan dua kali pemanggangan adonan sehingga diperoleh produk dengan kadar air yang lebih rendah.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perbedaan penambahan tepung *whey* pada pembuatan biskuit berpengaruh nyata ( $P<0.05$ ) pada nilai kadar abu. Penambahan tepung *whey* 20% dari jumlah tepung yang digunakan pada adonan menghasilkan kadar abu lebih tinggi dari persentase penambahan lainnya. Hal ini disebabkan karena kadar abu tepung *whey* cukup tinggi, 8.3% (Tamime, Robinson, & Michel, 2007). Selain itu, kandungan mineral dalam tepung *whey* cukup tinggi, yang dapat mempengaruhi kadar abu suatu produk pangan (Speer, 1998). Hasil kadar

abu yang diperoleh memenuhi SNI Mutu dan Cara Uji Biskuit (1992) yang ditetapkan, maksimum 1.5%.

**Tabel 2.** Karakteristik kimia biskuit berbahan baku tepung *whey*

Peubah	Penambahan tepung <i>whey</i>				Standar
	5%	10%	15%	20%	
Kadar air (%bk)	5.14±1.95	4.09±1.30	5.03±0.55	3.92±0.88	Maks. 5
Kadar abu (%bk)	0.98±0.06b	1.12±0.04ab	1.17±0.12ab	1.44±0.31a	Maks. 1.5
Kadar protein (%bk)	4.70±0.31ab	4.46±0.24b	4.48±0.20ab	5.19±0.28a	Min. 4.5
Kadar lemak (%bk)	28.38±1.13	28.51±0.49	28.58±1.17	29.38±2.10	Min. 9.5
Karbohidrat (%bk)	65.94±1.02	65.73±0.54	65.42±1.16	63.99±1.65	Min. 70
Asam lemak bebas (%)	1.68±0.30C	1.77±0.13C	2.30±0.10B	3.04±0.22A	Maks. 1

*Keterangan : Angka dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0.05$ ) untuk (a, b) atau sangat nyata ( $P < 0.01$ ) untuk (A, B, C).*

Penambahan persentase tepung *whey* yang berbeda pada formulasi biskuit menghasilkan kadar protein yang berbeda nyata ( $P < 0.05$ ). Kadar protein biskuit dengan penambahan tepung *whey* 5%, 15% dan 20% memenuhi standar ditetapkan SNI Biskuit (2011) untuk produk biskuit yang dicampur dengan pengisi dalam adonan yaitu minimum 4.5%. Kadar protein biskuit semakin meningkat dengan meningkatnya persentase tepung *whey* yang ditambahkan pada formulasi biskuit. Hal ini disebabkan tepung *whey* merupakan sumber protein yang baik dengan kadar proteinnya 14.2% (Spreer, 1998). Selain tepung *whey*, sumber protein lain yang digunakan pada formulasi biskuit berasal dari tepung jagung 5.8% (Richana, 2010) dan kuning telur 16% (Manley, 2000).

Perlakuan penambahan tepung *whey* tidak berpengaruh nyata pada persentase kadar lemak biskuit yang dihasilkan ( $P > 0.05$ ). Hal ini disebabkan karena kandungan lemak dalam tepung *whey* sangat rendah (Miller *et al.*, 2006). Kadar lemak yang dihasilkan pada penelitian ini cukup tinggi bila dibandingkan dengan standar yang ditetapkan Badan Standar Nasional 01-2973-1992, minimum 9.5%. Kadar lemak biskuit yang tinggi disebabkan persentase penggunaan margarin dan kuning telur cukup tinggi, sekitar 40% dari total adonan.

Kadar karbohidrat biskuit yang ditambahkan tepung *whey* dengan persentase berbeda tidak berpengaruh nyata ( $P > 0.05$ ) dan tidak memenuhi standar yang ditetapkan Badan Standar Nasional (1992) yaitu minimum 70%. Peningkatan persentase tepung *whey* dalam formulasi biskuit berbanding terbalik dengan peningkatan kadar karbohidrat biskuit. Hal ini disebabkan karena persentase bahan sumber karbohidrat (gula halus, kuning telur, dan margarin) yang ditambahkan dalam biskuit hampir sama.

Persentase penambahan tepung *whey* yang berbeda pada formulasi biskuit menghasilkan kadar asam lemak bebas yang berpengaruh sangat nyata ( $P < 0.01$ ) dan tidak memenuhi standar Badan Standar Nasional (2011) yaitu maksimum 1%. Penambahan tepung *whey* yang semakin meningkat berbanding lurus dengan kadar asam lemak bebas dalam biskuit. Hal ini disebabkan karena terdapat enzim lipase dalam tepung *whey* yang merupakan enzim dalam pembuatan keju. Enzim ini dapat mempercepat pelepasan asam lemak bebas dari gliserol yang bekerja pada suhu beragam (Chandra, Enespa, Singh, & Arora, 2020). Kadar asam lemak biskuit yang tinggi juga disebabkan karena penambahan lemak dan proses pemanasan pada biskuit. Pemanasan yang berlebihan pada lemak menyebabkan terjadi oksidasi lemak yang dapat memecah struktur lemak menjadi gliserol dan asam lemak bebas pada biskuit (Chandra *et al.*, 2020).

### 3.2. Penentuan formulasi terbaik biskuit

Penentuan formulasi terbaik dari keempat perlakuan biskuit diperoleh dengan skoring berdasarkan hasil uji karakteristik kimia biskuit. Formulasi terbaik ditentukan dengan jumlah skor tertinggi (Tabel 3).

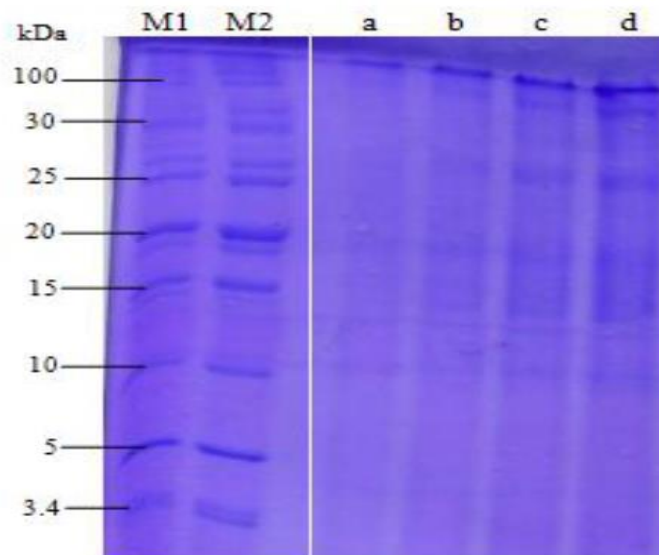
**Tabel 3.** Hasil skoring biskuit berdasarkan karakteristik kimia

Skoring peubah	Penambahan tepung <i>whey</i>			
	5%	10%	15%	20%
Kadar air	4	4	4	4
Kadar abu	2	1.5	1.5	1
Kadar protein	1.5	1	1.5	2
Kadar lemak	4	4	4	4
Karbohidrat	1	1	1	1
Asam lemak bebas	3	3	2	1
Total skoring	22.5	19	19.5	19

Biskuit dengan penambahan tepung *whey* 5% dari total tepung merupakan biskuit dengan formulasi terbaik karena memiliki skor tertinggi yaitu 22.5. Formulasi terbaik dalam penelitian ini dianalisis protein kasein dan glutennya sehingga dapat menjadi salah satu inovasi olahan pangan khusus bagi penderita autisme.

### 3.3. Hasil analisis protein kasein dan gluten

Formulasi biskuit terbaik hasil uji karakteristik organoleptik dan kimia adalah biskuit dengan penambahan tepung *whey* 5%.



**Gambar 1.** Profil SDS-PAGE protein biskuit. M1: *marker* standar protein 15  $\mu$ L, M2: *marker* standar protein 20  $\mu$ L, a: fraksi protein biskuit dengan konsentrasi 5  $\mu$ L, b: fraksi protein biskuit dengan konsentrasi 10  $\mu$ L, c: fraksi protein biskuit dengan konsentrasi 15  $\mu$ L, dan d: fraksi protein biskuit dengan konsentrasi 20  $\mu$ L.

Protein kasein dan gluten biskuit tersebut dianalisis dengan metode *sodium dodesyl sulfate-polycrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Analisis dilakukan dengan menggunakan

supernatan yang diperoleh dari pengendapan protein dengan menggunakan *trichloroacetic acid* (TCA). Profil SDS-PAGE untuk protein yang terendapkan dari sampel biskuit dengan penambahan tepung *whey* 5% dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil analisis SDS-PAGE menunjukkan bahwa fraksi protein pada marker standar tidak terlihat secara nyata memiliki pita protein dengan berat molekul yang sejajar dengan fraksi protein biskuit, baik dengan konsentrasi 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 15  $\mu$ L, maupun 20  $\mu$ L. Gambar 1 menunjukkan bahwa pada fraksi protein biskuit tidak terdeteksi adanya pita protein gluten dengan berat molekul 36-38 kDa, 42-44 kDa, dan 64-70 kDa (Jakubauskiene & Juodeikiene, 2005), serta protein kasein 25-35 kDa (Treweek, 2010). Hal ini menunjukkan bahwa biskuit dengan penambahan tepung *whey* 5% dari jumlah tepung tidak mengandung protein kasein dan gluten. Hal ini disebabkan karena bahan baku biskuit, tepung *whey* dan tepung jagung, tidak mengandung protein kasein dan gluten (Speer, 1998; Richana, 2010).

Protein kasein dan gluten yang tidak terdeteksi dalam biskuit yang ditambahkan tepung *whey* menunjukkan bahwa biskuit yang diproduksi dapat menjadi inovasi olahan pangan khusus untuk penderita autisme. Hal ini disebabkan karena olahan pangan bebas gluten dan kasein tidak menimbulkan alergi bagi penderita dan menjadi alternatif terapi diet bebas gluten dan kasein. Hasil penelitian Kern, Grannemann, Gutman, & Trivedi (2008) menyatakan bahwa tepung *whey* dapat digunakan sebagai suplemen untuk penderita autisme dan tidak menimbulkan efek samping tingkat tinggi. Tepung *whey* yang diolah dalam makanan penderita autisme dapat memberikan perubahan tindakan dan perilaku penderita autisme ke arah yang positif, serta peningkatan kemampuan penderita untuk berkomunikasi dan berinteraksi dengan orang lain. Edwards (2011) juga menyatakan bahwa resep yang mengandung tepung *whey* dapat digunakan sebagai alternatif diet kasein dan gluten bagi penderita autisme, karena dapat meningkatkan glutathione yang sangat sedikit dalam tubuh penderita autisme. Protein *whey* juga memiliki kualitas yang lebih baik dan mudah dicerna dibanding kasein (Purwanti, 2004).

#### 4. KESIMPULAN

Formulasi terbaik biskuit yang memenuhi persyaratan sebagai makanan untuk penderita autisme adalah penambahan 5% tepung *whey* dari jumlah tepung yang digunakan berdasarkan karakteristik organoleptik dan kimia. Fraksi protein kasein dan gluten biskuit penambahan 5% tepung *whey* tidak terlihat nyata sejajar dengan pita standar dengan menggunakan metode SDS-PAGE. Pengujian efektivitas produk biskuit dengan cara *in vivo* perlu dilakukan untuk mengetahui kualitas protein pada penambahan tepung *whey* dengan analisis daya cerna protein dan pengaruhnya pada mukosa usus.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Badan Standar Nasional. (1992). *Mutu dan Cara Uji Biskuit (SNI 01-2973-1992)*. Jakarta, ID: Badan Standar Nasional.
- Badan Standar Nasional. (2011). *Biskuit (SNI 2973-1992)*. Jakarta, ID: Badan Standar Nasional.
- Chandra, P., Enespa, Singh, R., and Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/S12934-020-01428-8>.
- Cieślińska, A., Kostyra, E., and Savelkoul, H. F. J. (2017). Treating autism spectrum disorder with gluten-free and casein-free diet: the underlying microbiota-gut-brain axis mechanisms. *Journal of Clinical Immunology and Immunotherapy*, 3(9).

- Codex Alimentarius. (1991). *Guidelines on Formulated Supplementary Foods for Older Infants and Young Children*. CAC/GL 08-1991.
- Edwards, W. P. (2007). *The Science of Bakery Products*. Cambridge, UK: RSC Publishing.
- Edwards, R. (2011). *Autism Spectrum Disorders: Non-Pharmaceutical Approaches*. Madison, US: University of Wisconsin-Madison School of Medicine and Public Health.
- Herminiati, A. (2005). *Pengembangan biskuit dari campuran dekstrin garut dan tepung pisang untuk terapi gizi tikus penderita autis*. Bogor, ID: Tesis Institut Pertanian Bogor.
- Jakubauskiene, L., and Juodeikiene, G. (2005). The relationship between protein fractions of wheat gluten and the quality of ring-shaped rolls evaluated by the echolocation method. *Food Technology and Biotechnology*, 43(3).
- Kern, J. K., Grannemann, B. D., Gutman, J., and Trivedi, M. H. (2008). Oral tolerability of cysteine-rich whey protein isolate in autism-a pilot study. *JANA*, 11(1).
- Manley, D. (2000). Milk products and egg as biscuit ingredients. In D. Manley (Eds), *Manley's Technology of Biscuits, Crackers and Cookies*. Oxford, UK: Woodhead Publishing.
- Miller, G. D., Jarvis, J. K., and McBean, L. D. (2006). *Handbook of Dairy Foods and Nutrition* (3 ed). New York, NY: CRC Press.
- McCandless, J. (2003). *Children with Starving Brains* (F. Siregar). Jakarta, ID: Gramedia Widiasarana Indonesia. (Original work published 2003).
- Miller, G. D., Judith, K. J. and Lois, D. M. (2007). *Handbook of Dairy Foods and Nutrition* (3 ed). New York, NY: CRC Press.
- Parate, V.R., Kawadkar, D. K., and Sonawane, S. S. (2011). Study of whey protein concentrate fortification in cookies variety biscuits. *International Journal of Food Engineering*, 7(2). <https://doi.org/10.2202/1556-3758.1638>.
- Purwanti, H. S. (2004). *Konsep Penerapan ASI Eksklusif*. Jakarta, ID: EGC.
- Richana, N. (2010). Tepung jagung termodifikasi sebagai pengganti terigu. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*, 32(6).
- Sanchez L. (2001). TCA protein precipitation protocol. APA Style. *Reference list: Electronic sources (web publications)*. Retrieved 06 August 2013, from [http://www.its.caltech.edu/~bjorker/Protocols/TCA\\_ppt\\_protocol.pdf](http://www.its.caltech.edu/~bjorker/Protocols/TCA_ppt_protocol.pdf)
- Speer, E., and Axel, M. (1998). *Milk and Dairy Product Technology* (First ed). New York, NY: Routledge.
- Steel, R. G. D., and Torrie, J. H. (1991). Prinsip dan prosedur statistika. (B. Sumantri). Jakarta, ID: Gramedia Pusaka Utama. (Original work published 1991).
- Tamime, A. Y., Robinson, R. K., and Michel, M. (2007). Microstructure of concentrated and dried milk products. In A. Tamime (Eds), *Structure of dairy science*. Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Treweek, T. (2010). Alpha-casein as a molecular chaperone. In W. Hurley (Eds), *Milk protein*. London, UK: IntechOpen.
- Wasilewska, J., and Klukowski, M. (2015). Gastrointestinal symptoms and autism spectrum disorder: links and risks – a possible new overlap syndrome. *Pediatric Health, Medicine and Therapeutics*, 6. <https://doi.org/10.2147/PHMT.S85717>.