

PENENTUAN GLISERIDA SECARA ENZIMATIS DENGAN SISTEM *DISPOSABLE* BIOSENSOR

I Nyoman Tika¹⁾, I.Gusti Ayu Triagustiana²⁾, dan I.D.Raka Rasana³⁾

¹⁾ Jurusan Pendidikan Kimia, FMIPA, Universitas Pendidikan Ganesha

²⁾ Jurusan PGSD, FIP, Universitas Pendidikan Ganesha

³⁾ Jurusan PGSD, FIP, Universitas Pendidikan Ganesha

nyoman.tika.@pasca.undiksha.ac.id

Abstrak: Penentuan gliserida secara enzimatis menggunakan disposable biosensor telah dilakukan. Gabungan enzim (enzim lipase, gliserol kinase dan gliserol-3-fosfat oksidase) diamobilisasi pada matrik pendukung PVC (polyvinyl Chloride) dan silikon berpori. Enzim amobil dirangkaikan pada elektroda dari sistem disposable biosensor. Dalam penelitian ini, substrat yang mengandung gliserida dikatalisis secara bertingkat dengan enzim berturut-turut yaitu enzim lipase termostabil yang dihasilkan bakteri termofilik isolate Banyuwedang (*Baccillus* BYW2), gliserol kinase dan gliserol-3-fosfat oksidase) menghasilkan hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida selanjutnya bereaksi dengan O₂ membentuk H₂O. Pengurangan kadar oksigen dalam sistem diukur menggunakan alat DO meter. Arus akibat reaksi oksidasi digunakan untuk mengukur konsentrasi gliserida. Konsentrasi enzim optimum dan kejenuhan permukaan PVC dan silikon berpori yang stabil digunakan sebagai parameter keberhasilan respon sensor. Konsentrasi gliserida dengan dua matrik PVC dan silikon pada rentang antara 0-25 μ M dalam buffer posfat menunjukkan garis lurus. Hal ini menunjukkan matrik PVC dan silikon dapat digunakan untuk mengukur gliserida system disposable biosensor

Kata-kata kunci : biosensor, digliserida, lipase, PVC, silikon berpori.

Abstract: Determination of glycerol enzymatically using a disposable biosensor has been done. Combined enzyme (lipase, glycerol kinase and glycerol-3-phosphate oxidase) immobilized on a supporting matrix of PVC (polyvinyl chloride) and porous silicon. Immobilized enzyme coupled to the electrodes of a disposable biosensor system. In this study, the substrate containing glycerides multilevel catalyzed by the enzyme consecutive thermostable lipase produced by thermophilic bacteria isolates Bishops court (*Baccillus* BYW2), glycerol kinase and glycerol-3-phosphate oxidase) produces hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide then reacts with O₂ to form H₂O. Reduction of the oxygen content in the system was measured using a DO meter. Flow due to the oxidation reaction is used to measure the concentration of glycerides. The optimum enzyme concentration and saturation PVC surface and a stable porous silicon is used as a parameter of success of the sensor response. Concentrations of glycerides with two matrices PVC and silicon in the range between 0-25 mM in phosphate buffer showed a straight line. This shows the matrix of PVC and silicon can be used to measure the disposable biosensor system glycerides.

Key words: biosensors, diglycerides, lipase PVC, porous silicon

PENDAHULUAN

Gliserida dalam darah dapat berbentuk Digliserida (DG) dan trigliserida (TG). Keberadaan DG dalam yang dominan sangat diharapkan oleh tubuh, karena kesehatan seseorang tergantung pada DG. DG merupakan lipid sederhana, yang mengandung molekul gliserol dan dua asam lemak dengan ikatan ester. Dari aspek ukuran molekul DG merupakan lipida yang

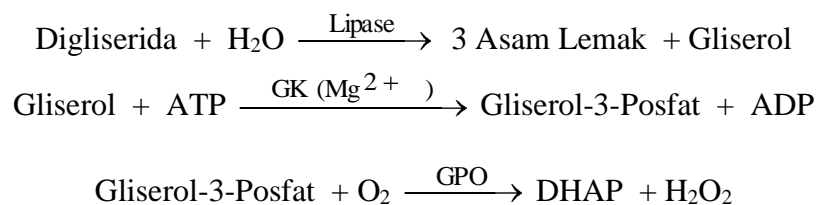
paling kecil, sehingga berfungsi sebagai senyawa antara (*intermediet*) dalam metabolisme. DG juga sebagai komponen utama membrane yang berfungsi sebagai pembawa pesan kedua (*secondary messenger*) (Wang *et al.*, 1999). Sedangkan TG lebih kepada mekanisme LDL (*Low density Livoprotein*), Pesan sekunder ini mengantarkan stimulus ekstraseluler dengan aktivasi reseptor dan

membutuhkan respon intraseluler seperti pada inti sel, sistoskeleton, otot dan peralatan kontraktile. Studi awal aliran sinyal ini menghasilkan penampilan linear seri merupakan tahap sederhana dimana suatu stimulus luar bersifat spesifik melibatkan aktivasi enzim posfolipase hasil hidrolisis membrane posfolipid dan menghasilkan pesan sekunder. Pesan sekunder ini merupakan fungsi dari DG yang memacu aktivitas enzim proteinkinase C, suatu enzim yang mengendalikan aktivitas differensiasi sel (Ebeling J.G, 2005), profilerasi (Hajri T., Abumrad N.A, 2002). Menghambat pembentukan sel tumor (Belgacem et al., 2007), dan respon yang lain dalam berbagai jenis sel mamalia.

Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa sinyal sel dapat memberikan efek kesehatan dengan melibatkan DG. Meningkatnya konsentrasi DG dalam darah dapat mereduksi trigliserida (TG). Akibat tekanan terhadap konsentrasi TG dalam aliran darah dapat menurunkan resiko penyakit diabetes tipe 2. Selain itu, penambahan DG dalam darah dapat mengakibatkan modifikasi glikosilat hemoglobin (Glikosilat Hb). Perubahan Glikosilat Hb membantu mencegah akumulasi lemak dalam tubuh (Murase et al., 2001; Taguchi et al., 2000), kondisi ini menunjukkan konsumsi DG secara rutin dapat menjaga kesehatan (Soni M.G et al., 2001). DG juga dapat membantu mengurangi diabetic

postprandial lipid (Takase et al., 2005). DG telah digunakan sebagai diet mengganti TG untuk mengendalikan diabetes (Tada et al., 2005), untuk mencegah arteriosklerosis, dan penyakit lainnya (Takase et al., 2005; Tada et al., 2005). Pemberian DG dalam diet makanan menyebabkan mengurangi keracunan dan karsinogenitas. Dalam hewan percobaan (Chengelis C.P., 2006) dan pada manusia (Yasunaga et al., 2004).

Metode analitik telah dilakukan dengan menggunakan HPLC (Moh M.H et al., 2001) dan menggunakan HPLC yang dikopel dengan perakromatografi (Ag-HPLC) (Fliszar K.A., et al, 2006). Pemisahan mono dan digliserida juga telah dilakukan dengan HPLC-gel kromatografi (Tietz R., Hartel R, 2000). Penggunaan teknologi tick film dengan sensor (Photinon & Wang S.H.2006), Cara terakhir menggunakan pasta yang mengandung katalis logam yang mengandung pasta karbon, alat ini sudah diproduksi secara pabrikasi, namun kondisi tinta belum optimal bila dikaitkan layar printing. Modifikasi perlu dilakukan untuk menggunakan enzim-enzim termostabil, salah satu yang dimodifikasi adalah lipase, yang berasal dari *Bacillus BYW2*, merupakan isolate bakteri termofilik dari sumber air panas Banyuwedang Grokgak Buleleng Bali (Tika & Ngadiran, 2006). Deteksi gliserida menggunakan reaksi gabungan enzim, dengan reaksi sebagai berikut



Gambar 1. Reaksi-Reaksi yang terjadi pada Elektrode Eksperimen

Lipase (E.C.3.1.1.34) yang digunakan untuk menghidrolisis DG menjadi asam lemak dan gliserol. Gliserol yang

dihasilkan dengan bantuan ATP kemudian dipecah oleh enzim gliserol kinase (E.C.2.7.1 30,) menjadi gliserol-

3-fosfat dan ADP, selanjutnya gliserol 3-fosfat dan O_2 dengan kerja enzim gliserol-3-fosfat oksidase (E.C. 11.3.21) diinkubasi pada suhu $45\text{ }^\circ\text{C}$ selama 1 jam. diubah menjadi dehidroksiaseton fosfat (DHAP) dan H_2O_2 berkurangnya kelarutan oksigen dalam sistem reaksi diukur sebagai parameter penting dalam biosensor. Titik kritis menggunakan rangkaian enzim sebagai elektroda enzim terletak pada matrik yang digunakan untuk pengamobil enzim (Tika, dkk, 2008). Sistem biosensor multi enzim memenuhi hambatan relatif tinggi pada matrik., sehingga kurang efisien. Langkah yang dikembangkan adalah merancang alat deteksi biosensor yakni dengan menggunakan sistem amobilisasi enzim dengan bebragai matrik khususnya PVC dan silikon berpori menarik untuk dikaji. .

Matrik PVC dan Silikon berpori memiliki keunikan tersendiri. PVC adalah polimer termoplastik urutan ketiga dalam hal jumlah pemakaian di dunia, dan telah digunakan sebagai matrik multi enzim untuk biosensor (Bhambi, et al., 2006), Sebagai pengamobil enzim lipase termostabil dengan aktivitas yang meningkat (Tika et al., 2008). Silikon efektif untuk biosensor (Guan, 2011). Dalam system biosensor silikon sebagai pengamobil enzim lipase larutan berperan sebagai elektroda-enzim. Selama ini biosensor dengan matrik silikon berpori menggunakan enzim lipase dari *Pseudomonas cepacia* (Vemulachedu et al., 2008), kendalanya tidak tahan panas. Penggunaan enzim termostabil untuk rangkaian biosensor telah dilakukan dengan substrat trigliserida /gliserida menunjukkan rentang kerja biosensor didapatkan pada pH 6,5 hingga 7,5 dan rentang suhu adalah $30\text{-}40^\circ\text{C}$. (Tika et al., 2014). Melihat pentingnya kandungan digliserida dalam diet dan serum darah, maka penentuan digliserida seara cepat dan murah terus diupayakan.

Makalah ini bertujuan mengungkapkan hasil analisis kadar gliserida baik menggunakan matrik PVC dan silikon berpori sebagai pengamobil multi enzim dengan system disposable biosensor. yang dikaitkan dengan silikon dalam sistem biosensor yang dikaitkan dengan DO meter.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Semua bahan yang digunakan memiliki tingkat proanalisis dan tingkat biologik, kecuali bila disebutkan khusus dalam teks. NH_4Cl , Tris (Hidroksimetil)-amino metan dan HCl (Asam klorida) DTT, EDTA, EGTA, PSMF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*), pepstatin dan leupeptin (Sigma, USA). Natrium pirofosfat (Sigma, USA), TCA (Sigma, USA), etanol 70%. Uji protein menggunakan kit reagen Bio-rad). Isolat lipase dari *Bacillus* BYW2 (Isolat Air panas Banyuwedang) yang memiliki suhu optimum 70°C . EGTA(Sigma) dan digliserida., enzim gliserol kinase (GK) dan enzim gliserol-3-fosfat oksidase (GPO) dan silikon berpori.

Pembuatan membranPVC

Membran yang diujicobakan dalam penelitian ini adalah membran yang diujicobakan dalam penelitian ini adalah PVC. PVC sebanyak 0,06 g dan 150 mL *isopropil miristat* dilarutkan dalam 5 mL *tetrahidrofuran* (THF). Larutan polimer ditempatkan dalam *Petri dish* (diameter 9 cm). Larutan polimer diratakan pada permukaan petri untuk mendapatkan distribusi polimer yang merata. Larutan polimer ditutupi dengan gelas sehingga terjadi penguapan pelan-pelan, sehingga dihasilkan yang tipis, kemudian dilapisi dengan senyawa organik *macrophotoiniferter*. Membran PVC yang diperoleh dipotong dengan bentuk batang-batang kecil (2x1 cm) dicuci dengan air dan diaktivasi dengan glutaraldehida 2,5%. Setelah membran

diaktivasi, kelebihan glutaraldehid didekantasi, lalu membran dicuci dengan buffer Natrium Fosfat 0,1 M (pH 7,0), sampai air cucian pH 7,0.

Penentuan Silikon Berpori (PSi)

Struktur pori dibentuk dengan menggunakan “electrochemical etching process” untuk silikon, yaitu menggunakan larutan elektrolit HF dan IPA dengan perbandingan 1:1 Untuk membuat PSi yang didasari alat mini-EISCAP ((Vemulachedu *et al.*, 2008). PSi dibentuk dengan berbagai tahap sesuai dengan protokol fabrikasi setelah dihilangkan lapisan SiO₂. Selanjutnya dilakukan dengan “Electrochemical Etching” yang dilakukan selama 10 menit. Setelah terbentuk PSi sampel dikeringkan dengan etanol dan pentana. warna orange akan muncul bila disinari dengan sinar UV.

Amobilisasi Lipase

Silikon berpori dicuci dengan air dan diaktivasi dengan glutaraldehid 2,5%. Setelah membran diaktivasi, kelebihan glutaraldehid didekantasi, lalu membran dicuci dengan buffer Natrium fosfat 0,1 M (pH 7,0), sampai air cucian pH 7,0. Sebanyak 1 mL enzim lipase termostabil Banyuwedang ditambahkan untuk mengaktivasi membran dan disimpan pada suhu 4°C. Enzim yang tidak terikat didekantasi dan diuji untuk menentukan kadar protein sesuai prosedur yang dikembangkan oleh Voysey dan Wilton (1994) dan Lowry (1951). Membran dicuci 3-4 kali dengan menambahkan bufer (Na-fosfat 0,1 M; pH 7) sampai tidak ada aktivitas yang terdeteksi pada air cucian.

Karakterisasi enzim amobil

Untuk karakterisasi amobil menggunakan metode yang dikembangkan oleh (Bhambi *et al.*, 2006),.. yaitu dibuat substrat digliserida

dalam berbagai pH kemudian ditentukan aktivitasnya, yaitu 6,0; 6,25; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,50; 7,75; 8,0; 8,25; 8,5; 8,75; 9,0. Setelah diketahui pH optimum kerja enzim amobil dilakukan pengujian pada masing-masing enzim yang diamobil.

Penyiapan Elektroda

Setelah enzim diamobil, dilanjutkan dengan karakterisasi elektroda enzim. Silikon-enzim dicampur dengan gel kemudian ditempelkan pada salah satu elektroda dari DO meter. Elektroda enzim disimpan dalam buffer reaksi 0,1 M Natrium Fosfat (pH 7,0) pada suhu 4°C bila tidak digunakan. Penggunaan kembali elektroda, melalui proses pencucian terlebih dahulu elektroda dengan air destilasi pada suhu kamar dan dilanjutkan dengan bufer reaksi, selanjutnya dikeringkan dengan tisu.

Konstruksi dan Pengujian Biosensor

Elektroda enzim yang telah dihubungkan dengan alat Voltameter DO meter siap digunakan. Dipepet sebanyak 1,8 mL Na-Fosfat (0,1 M pH 7) kedalam gelas kimia. Ditambahkan 0,1 mL campuran digliserida ditambahkan ke dalam buffer reaksi. Kelarutan hidrolisis gliserida dapat dideteksi dengan mencelupkan elektroda enzim.

Penentuan DG dalam media

DG, ATP, lipoprotein lipase (22U mL⁻¹), GK (1U mL⁻¹) ditambahkan 600 µL tabung centrifuge dengan 300 µL buffer phosphate buffer, 1:1 larutan serum-bufo dikocok sampai homogeny selanjutnya diinkubasi pada 45 °C selama 1 jam. Larutan buffer serum dengan perbandingan 1:1 sebagai medium control, bovine serum dilarutkan dengan volume yang sama dengan PBS untuk mendeteksi DG. Periode inkubasi dibutuhkan untuk reaksi enzim yang lengkap dengan larutan DG. Setelah inkuasi, ditetaskan

larutan testing solution (6 μL) ditempatkan pada permukaan biosensor menggunakan pipet, kemudian tiga elektroda dan dilakukan pengukuran dengan alat DO meter.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amobilisasi enzim dengan PVC menunjukkan efisiensi 67 %, dengan aktivitas sebesar 88 Unit /mg, Sedangkan amobilisasi enzim dengan silikon berpori menunjukkan efisien 83%, dengan aktivitas sebesar 89% unit /mg protein enzim, secara garis besar menunjukkan bahwa silikon berpori lebih efisien dan efektif sebagai matrik pendukung gabungan (multi) enzim Tabel 1

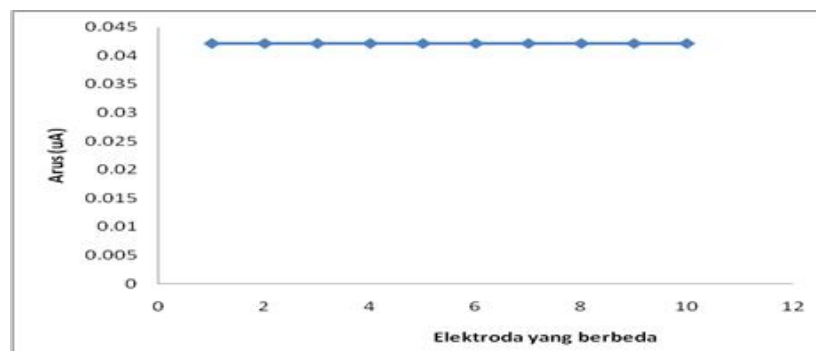
Tabel 1 Efisiensi amobil dari multi enzim pada matrik PVC dan Silikon berpori

Matrik	Efisiensi (%)	Aktivitas (Unit/mg)
PVC	67	88
Silikon berpori	86	89

Enzim (lipase, GK dan GPO) diko-amobilisasi dengan silikon berpori pada berbagai konsentrasi, aktivitas elektroda menunjukkan bahwa pada konsentrasi $2\mu\text{g/mL}$ memiliki aktivitas $1,2\text{ g/mL}$, konsentrasi $2\mu\text{g/mL}$ memiliki aktivitas $1,4\mu\text{g/mL}$, dan konsentrasi optimum ditunjukkan pada konsentrasi $4\mu\text{g/mL}$ yaitu sebesar $5,1\text{ g/mL}$, dan peningkatan konsentrasi menjadi $5\mu\text{g/mL}$ kadar oksigen yang terukur

sebesar $4,3\text{ g/mL}$. Artinya terjadi penurunan kemampuan enzim terikat pada silikon berpori. Kondisi ini menunjukkan bahwa kenaikan jumlah enzim yang terikat pada matrik silikon berpori tidak seklaigus meningkatkan konsentrasi oksigen terukur. Matrik silikon berpori yang mengikat enzim lipase termostabil itu telah mengalami kondisi jenuh dan berpengaruh pada kerja enzim. Penelitian ini paralel dengan penelitian Song *et al.* (2010), yaitu kejenuhan terjadi pada matrik pengikat enzim sehingga menyebabkan konformasi yang padat. Kondisi ini akan mengganggu aktivitas gabungan enzim sehingga aktivitas berantai gabung enzim menjadi menurun (Cui L. *et al.*, 2010).

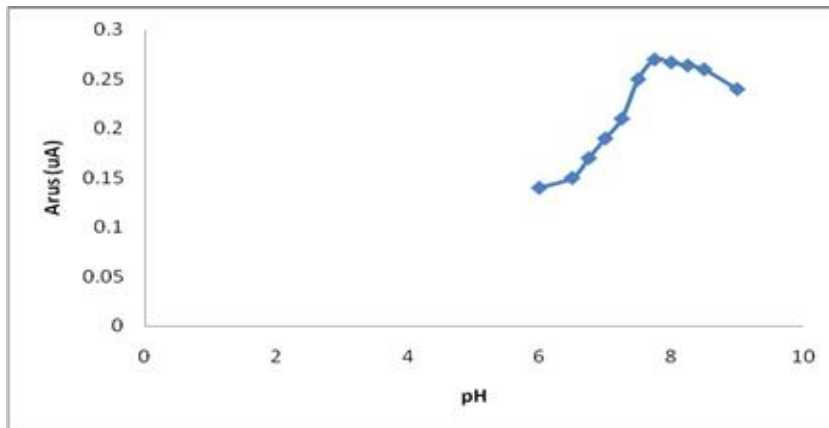
Selanjutnya pada konsentrasi optimum kinerja biosensor, dilakukan uji reproduibilitas dari prototype biosensor dengan silikon berpori. Dilakukan pengukuran terhadap berbagai jenis elektroda. Pada masing-masing tabung diisi dengan 5 uM Digliserida. Hasil pengeukuran diperoleh kekuatan arus sebesar $0,0421$. Kondisi ini menandakan bahwa biosesnsor prototype dengan silikon berpori bersifat stabil (gambar 2), penelitian ini sejalan dengan penelitian Shu Yi Hsu *et al.*, (2010), bedanya adalah prototype ini menggunakan lipase termostabil Isolat lokal (Banyuwedang), prototype ini relative tahan terhadap perubahan panas yang diakibatkan oleh lingkungan



Gambar 2. Reprodusibilitas biosensor disposable dengan elektroda berbeda

Pengaruh pH terhadap biosensor dengan matrik silikon berpori optimum terjadi pada pH 7,75, data secara lengkap dapat dilihat pada gambar 3. Kondisi ini menunjukkan bahwa lipase termstabil yang diamobilisasi dengan silikon berpori menunjukkan aktivitas yang relative sama dengan lipase yang

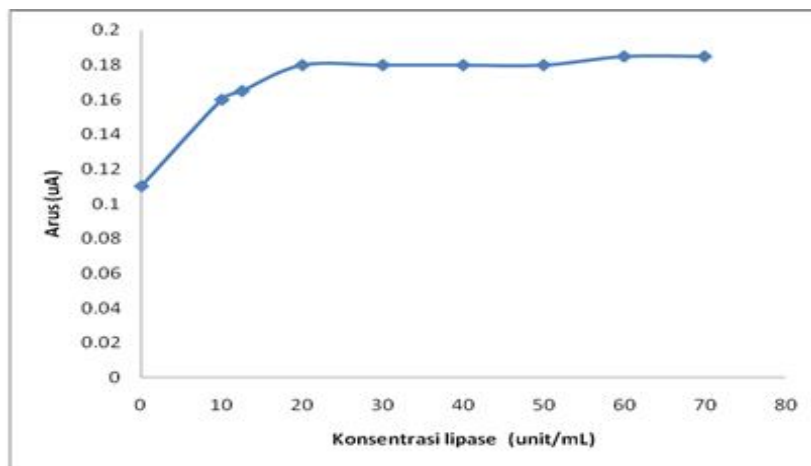
diamobil dengan PVC, Artinya, silikon berpori dapat meningkatkan kinerja enzim lipase bebas dari pH 7,0, berubah menjadi pH 7,75. Lebih jauh ini menunjukkan bahwa beberapa aktif site yang optimum dibawah pH rata-rata enzim terlindungi oleh permukaan matrik.



Gambar 3. Pengaruh pH terhadap respon biosensor

Pengaruh efek amobilisasi enzim lipase termstabil isolate Banyuwedang ditunjukkan pada konsentrasi enzim 20 unit/mL. Konsentrasi enzim lipase banyuwedang lebih tinggi dari 20

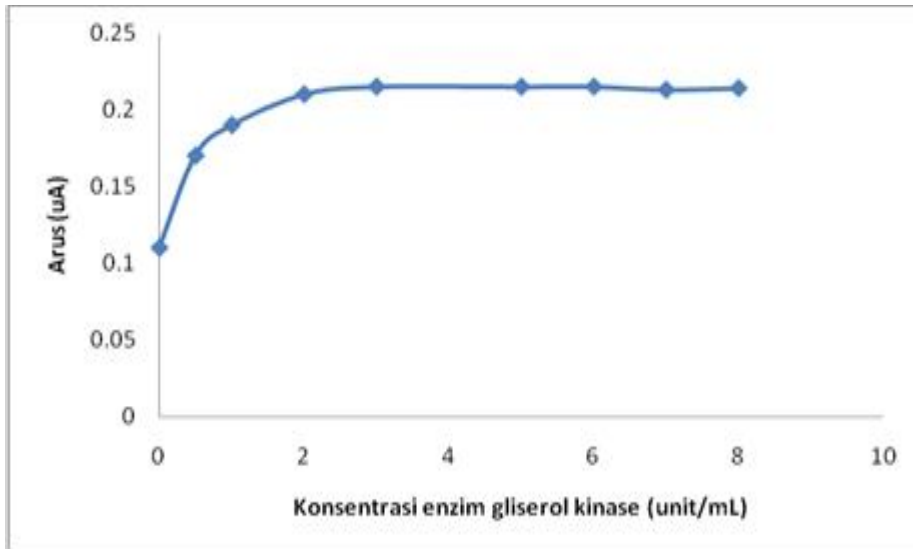
unit/mL itu relative telah mengalami kejenuhan. Artinya dengan penambahan enzim berapapun tidak mempengaruhi kinerja biosensor.



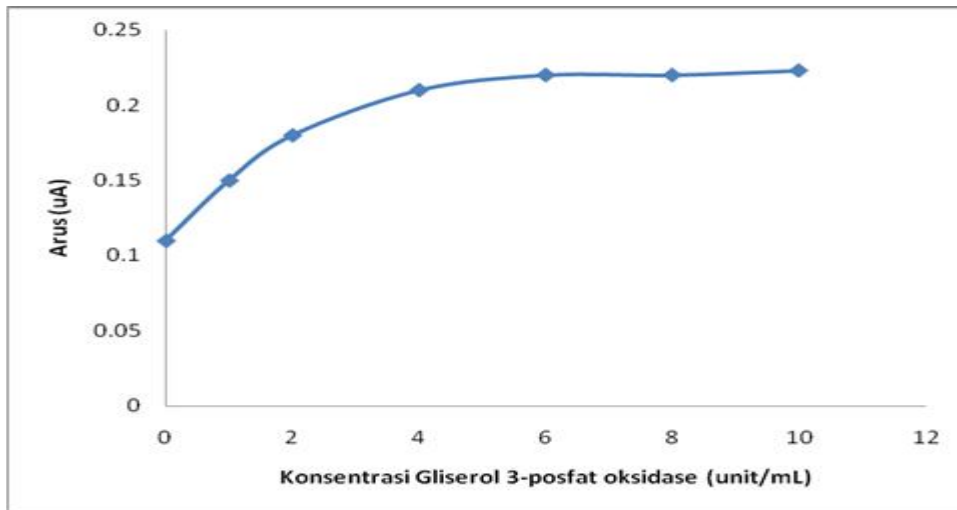
Gambar 4. Efek amobilisasi lipase pada elektroda kerja dalam bovin serum

Efek amobilisasi silikon berpori terhadap aktivitas gliserol kinase ditemukan bahwa aktivitas optimal pada konsentrasi 2 Unit/mL terhadap

konsentrasi DG. Aktivitas meningkat dengan seiring meningkatnya konsentrasi enzim gliserol kinase. Seperti ditampilkan gambar 5



Gambar 5. Efek amobilisasi gliserol kinase pada matrik silikon berpori

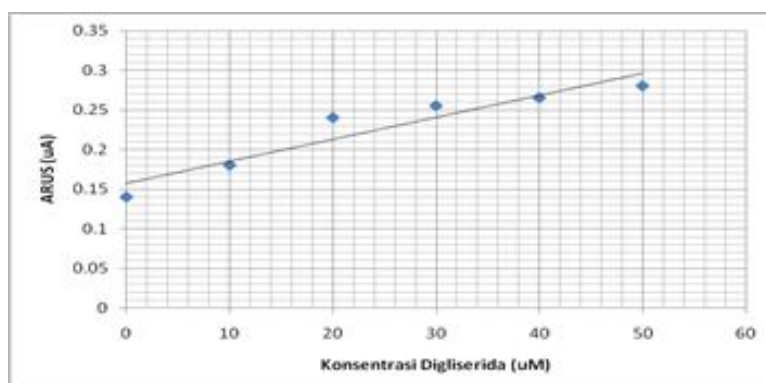


Gambar 6. Efek amobilisasi enzim Gliserol 3-Fosfat oksidase (GPO) pada matrik silikon berpori

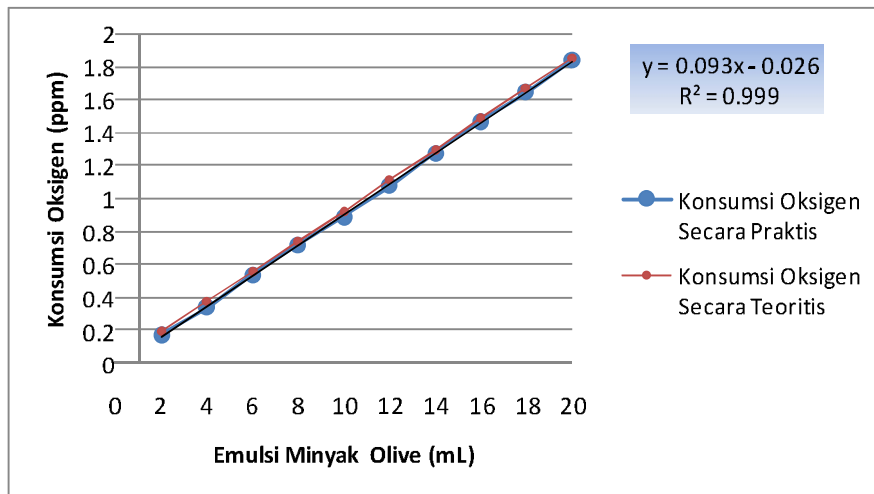
Dari grafik terlihat bahwa aktivitas optimum GPO terhadap larutan DG, adalah pada konsentrasi 6 unit/mL.

Hasil sampel yang mengandung DG yang diukur dengan menggunakan

biosensor dengan pengamobil silikon berpori, dapat ditunjukkan pada table 7 berikut



Gambar 7. Pengukuran sampel DG dengan Biosensor dengan matrik silikon berpori



Gambar 8. Pengukuran Sampel TG standar dengan biosensor dengan matrik PVC

Seperti terlihat dalam reaksi pada Gambar 1. ada tiga jenis enzim yang digunakan yaitu lipase yang berasal dari Isolat Banyuwedang yang berfungsi mengubah gliserida menjadi asam lemak dan gliserol. Kemudian gliserol yang dihasilkan akan diubah menjadi gliserol-3-posfat dan ADP oleh enzim Gliserol Kinase (GK) dengan prekursor Mg^{2+} dimana pada proses tersebut terlebih dahulu ditambahkan ATP. Kemudian proses terakhir adalah perubahan gliserol-3-posfat menjadi DHAP dan H_2O_2 oleh enzim GPO (gliserol-3-posfat Oksidase). Reaksi tersebut mengakibatkan berkurangnya konsentrasi kelarutan oksigen yang terukur pada elektrode eksperimen jika dibandingkan dengan elektrode kontrol. Berkurangnya konsentrasi kelarutan oksigen disebabkan karena oksigen dalam larutan berubah membentuk H_2O_2 . Jika hasil pengukuran konsentrasi oksigen terlarut dari elektrode kontrol (elektrode silikon -tanpa enzim) dikurangi hasil pengukuran konsentrasi oksigen terlarut dari elektrode eksperimen (elektrode- silikon-enzim) maka akan diperoleh konsentrasi oksigen yang berkurang karena berubah menjadi H_2O_2 (konsumsi oksigen). Hasil pengukuran seperti pada gambar 7 dan menunjukkan garis linear. Hal ini

dapat disimpulkan bahwa sistem biosensor disposable dengan amobilisasi gabungan enzim dengan silikon berpori dan PVC dapat digunakan untuk mengukur DG dalam gliserida

SIMPULAN

Dengan menggunakan matrik PVC dan silikon berpori pada konsentrasi gliserida terukur pada rentang antara 0-25 μM dalam buffer posfat menunjukkan garis lurus. Oleh karena itu, sistem biosensor disposable dengan amobilisasi gabungan enzim dengan silikon berpori dan PVC keduanya dapat digunakan untuk mengukur gliserida dalam serum.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diucapkan setinggi-tingginya kepada DIKTI atas Hibah Kompetensi yang diberikan kepada penulis tahun 2014. Ketua Lemlit Undiksha, Dekan MIPA, Direktur Pascasarjana, Ketua Jurusan Pendidikan Kimia Undiksha atas sarana, dorongan dan arahannya dalam kegiatan penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

Belgacem O., Stubiger G., Allmaier G., Buchacher A., Pock K. Isolation of

- esterified fatty acids bound to serum albumin purified from human plasma and characterised by MALDI mass spectrometry. *Biologicals*. 2007;35:43–49. [PubMed]
- Bhambi, M., Minakshi and C.S Pundir (2006), Preparation of Oxygen Meter Based Biosensor for Determination of Triglyceride in Serum, *Sensor & Transducers Magazine (S & T e-Digest)*, Vol. 67, issue 5 pp.561-567 Ebeling J.G., Vandenbark G.R., Kuhn L.J., Ganong B.R., Bell R.M., Niedel J.E. Diacylglycerols mimic phorbol diester induction of leukemic cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985;82:815–819. [PMC free article] [PubMed]
- Chengelis C.P., Kirkpatrick J.B., Bruner R.H., Freshwater L., Morita O., Tamaki Y., Suzuki H. A 24-month dietary carcinogenicity study of DAG (diacylglycerol) in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2006;44:98–121. [PubMed]
- Cui L, Yin H, Dong J, Fan H, Liu T, Ju P, Ai S., 2010 A mimic peroxidase biosensor based on calcined layered double hydroxide for detection of H₂O₂. **Biosens Bioelectron** 31.
- Fliszar K.A., Wuelfing W.P., Li Z., Reed R.A. Profiling of medium chain glycerides used in pharmaceutical formulation development by reversed-phase HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006;40:896–900. [PubMed]
- Hajri T., Abumrad N.A. Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu. Rev. Nutr.* 2002;22:383–415. [PubMed]
- Guan B, Magenau A, Kilian KA, Ciampi S, Gaus K, Reece PJ, Gooding JJ. 2011. Mesoporous silicon photonic crystal microparticles: towards single-cell optical biosensors. *Faraday Discuss.* 2011;149:301-17; discussion 333-56
- Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L Farr., and R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 (1951), pp. 265-275.
- Moh M.H., Tang T.S., Tan T.H. Simultaneous determination of free fatty acids, partial acylglycerols and tocopherols in palm oil products using high-performance liquid chromatography. *J. Food Lipids*. 2001;8:179–190.
- Murase T., Mizuno T., Omachi T., Onizawa K., Komine Y., Kondo H., Hase T., Tokimitsu I. Dietary diacylglycerol suppresses high fat and high sucrose diet-induced body fat accumulation in C57BL/6J mice. *J. Lipid Res.* 2001;42:372–378. [PubMed]
- Shu-Yi Hsu, Brandon Bartling, Christina Wang, Fuh Sheng Shieu, and Chung-Chiun Liu. 2010. Enzymatic Determination of Diglyceride Using an Iridium Nano Particle Based Single Use, Disposable Biosensor, *Sensor*, 10 5758-5773.
- Soni M.G., Kimura H., Burdock G.A. Chronic study of diacylglycerol oil in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2001;39:317–329. [PubMed]
- Song W, Li DW, Li YT, Li Y, Long YT. 2010, Disposable biosensor based on graphene oxide conjugated with tyrosinase assembled gold nanoparticles. *Biosens Bioelectron.* Dec 30
- Tada N., Shoji K., Takeshita M., Watanabe H., Yoshida H., Hase T., Matsuo N., Tokimitsu I. Effects of diacylglycerol ingestion on postprandial hyperlipidemia in

- diabetes. *Clinica Chimica Acta*. 2005;353:87–94. [PubMed]
- Taguchi H., Watanabe H., Onizawa K., Nagao T., Gotoh N., Yasukawa T., Tsushima R., Shimasaki H., Itakura H. Double-blind controlled study on the effects of dietary diacylglycerol on postprandial serum and chylomicron triacylglycerol responses in healthy humans. *J. Amer. Coll. Nutr.* 2000;19:789–796. [PubMed]
- Takase H., Shoji K., Hase T., Tokimitsu I. Effect of diacylglycerol on postprandial lipid metabolism in non-diabetic subjects with and without insulin resistance. *Atherosclerosis*. 2005;180:197–204. [PubMed].
- Tietz R., Hartel R. Effects of minor lipids on crystallization of milk fat-cocoa butter blends and bloom formation in chocolate. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 2000;77:763–771.
- Tika. I N. dan Ngadiran K. 2006. Isolasi dan Identifikasi bakteri termofilik dari Sumber Air Panas di provinsi Bali. *Prosiding seminar Kimia Nasional* (SENAKI) VII. ITS, Surabaya
- Tika, I N. dan I N.Selamat, 2008. Pembuatan Elektroda Enzim Untuk Biosensor dengan Modifikasi Lipase termostabil Isolat Banyuwedang yang diamobil dengan PVC, Prosiding Seminar Kimia Nasional, UNS 2008.
- Tika, I N, W. Redhana, N.Pt. Ristiati, 2007. Isolasi , Pemurnian dan Karakterisasi Lipase Termostabil dari Bakteri termofilik Yang diisolasi dari Sumber air Panas Banyuwedang , Keamatan Gerogak Buleleng Bali. *Dikti*, 2007.
- Tika, I N., I G.A Tri Agustiana, I.D.R.Raksana, 2014. Modifikasi Elektroda Enzim Lipase Dari *Bacillus* Byw2 (Isolat Banyuwedang) Dengan Silikon Berpori Untuk Biosensor Pada Penentuan Gliserida. Prosiding Seminar Pendidikan Sains, Unesa, 18 Januari 2014.
- Photinon K., Wang S.H., Liu C.C. Development of a dimethyl ether (DME) sensor using platinum nanoparticles and thick-film printing. *Biosens. Bioelectron.* 2006;22:501–505. [PubMed]
- Wang J., Wang K., Bartling B., Liu C.C. The detection of alkaline phosphatase using an electrochemical biosensor in a single-step approach. *Sensors*. 2009;9:8709–8721. [PMC free article] [PubMed]
- Vemulachedu, H Æ Renny Edwin Fernandez Æ Enakshi Bhattacharya Æ Anjub Chadha 2008. Miniaturization of EISCAP sensor for triglyceride detection, *J Mater Sci: Mater Med*, DOI 10.1007/s10856-008-3534-y
- Voysey, and D.C. Wilton, Rapid, sensitive fluorometric determination of serum triglyceride by measuring lipase liberated fatty acids, *Clin. Chem.*, 40 (1994), pp. 14-17.
- Yasunaga K., Glinsmann W.H., Seo Y., Katsuragi Y., Kobayashi S., Flickinger B., Kennepohl E., Yasukawa T., Borzelleca J.F. Safety aspects regarding the consumption of high-dose dietary diacylglycerol oil in men and women in a double-blind controlled trial in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil. *Food Chem. Toxicol.* 2004;42:1419–1429. [PubMed]