

BIOSENSOR DENGAN AMOBILISASI ENZIM TERMOSTABIL ISOLAT BANYUWEDANG UNTUK DETEKSI TRIGLISERIDA DALAM SERUM DARAH

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

¹Jurusan Pendidikan Kimia, FMIPA, Universitas Pendidikan Ganesha,
Singaraja, Indonesia

^{2,3}Jurusan PGSD, FIP, Universitas Pendidikan Ganesha, Singaraja, Indonesia

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

Abstrak

Tujuan penelitian tahun pertama adalah (1) Untuk mengetahui hasil pembentukan silikon berpori yang cocok untuk amobilisasi lipase termostabil, (2) Untuk mengetahui sensitivitas metode fabrikasi terhadap pembentukan EISCAPs mini sensor, (3) Untuk mengetahui daya stabilitas enzim lipase amobil terhadap penggunaan ulang dalam sistem EISCAPs pada larutan gliserida standar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa efisiensi amobilisasi multi enzim pada silikon berpori sebesar 89%, sedangkan aktivitasnya sebesar 73%. pH dan suhu optimum enzim amobil berturut-turut 7,0 dan 40°C selain itu didapatkan hasil (1) rentang kerja biosensor didapatkan pada pH 6,5 hingga 7,5 dan rentang suhu adalah 30-40°C. (2) Modifikasi elektroda enzim dengan matrik silikon berpori dapat digunakan dalam sistem biosensor pada alat DO meter untuk mendeteksi gliserida. (3) Konsentrasi enzim lipase termostabil Banyuwedang jenuh pada 20 Unit/mL, sedangkan Gliserol Kinase jenuh pada konsentrasi 2 unit/mL dan Gliserol 3 posfat oksidase pada konsentrasi enzim 4 unit/mL. (3) Konsentrasi enzim optimum dan kejenuhan permukaan silikon berpori yang stabil dapat digunakan sebagai parameter keberhasilan respon biosensor. (4) Konsentrasi DG 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 dapat digunakan untuk mengukur DG dalam serum darah.

Abstract

The aims of research are the first year (1) To know the results of the formation of porous silicon that is suitable for thermostable lipase immobilization, (2) To determine the sensitivity of the method of fabrication of the sensor mini EISCAPs formation, (3) is to determine the stability of lipase immobilized on the re-use in the system EISCAPs on standard glycerides solution. The results showed that the efficiency of multi-enzyme immobilization on porous silicon by 89%, while its activity by 73%. The optimum pH and temperature of immobilized enzyme respectively 7.0 and 40 ° C than that obtained results (1) the working range of the biosensor obtained at pH 6.5 to 7.5 and the temperature range is 30-40°C. (2) Modification of the enzyme electrode with a porous silicon matrix can be used in biosensor system on the DO meter tool to detect glycerides. (3) The concentration of thermostable lipase Bishops court saturated at 20 units / mL, whereas Glycerol

Kinase saturated at a concentration of 2 units / mL and glycerol 3-phosphate oxidase in enzyme concentration of 4 units / mL. (3) The optimum enzyme concentration and saturation stable porous silicon surface can be used as parameters of the success of the biosensor response. (4) DG concentration measured in the range between 0-25 μ M in phosphate buffer showed a straight line. Therefore, disposable biosensor system with immobilization of enzymes combined with porous silicon can be used to measure the DG in the blood serum.

Keywords: biosensors, diglycerides, the enzyme lipase, porous silicon

PENDAHULUAN

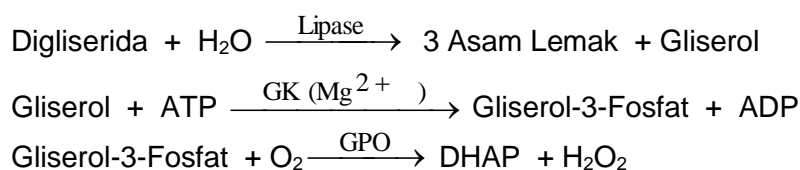
Penentuan gliserida dalam serum darah secara cepat dan murah terus diupaya. Hal ini didasarkan pada karakteristik digliserida yang berbeda dengan jenis lipid yang lain. Digliserida (DG) merupakan lipid sederhana, yang mengandung molekul gliserol dan dua asam lemak dengan ikatan ester. Dari aspek ukuran 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). 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 tahap sederhana dimana suatu stimulus luar bersifat spesifik dan melibatkan aktivasi enzim fosfolipase hasil hidrolisis membrane fosfolipid 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), proliferasi (Hajri T., Abumrad

N.A, 2002). Menghambat pembentukan sel tumor (Belgacem *et al.*, 2007), dan respon yang lain dalam berbagai jenis sel mamalia.

Hasil observasi beberapa peneliti menemukan 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. Get *et al.*, 2001). DG juga dapat membantu mengurangi *diabetic postprandial lipid* (Takase *et al.*, 2005). DG telah digunakan sebagai diet pengganti 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 dapat mengurangi keracunan dan karsinogenesis. 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 perak kromatografi (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 : Tika *et al.*, 2007). Deteksi gliserida menggunakan reaksi gabungan enzim, dengan reaksi seperti gambar 1



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 O₂ dengan kerja enzim gliserol-3-fosfat oksidase (E.C. 11.3.21) diinkubasi pada suhu 45°C selama 1 jam. diubah menjadi dehidroksiaseton fosfat (DHAP) dan H₂O₂ 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, & Selamat, 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 silikon berpori.

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 30-40°C. (Tika *et al.*, 2014). Melihat pentingnya kandungan digliserida dalam

diet dan serum darah, maka penentuan digliserida seara cepat dan murah terus diupayakan.

Selain itu silikon berpori dapat juga lebih spesifik untuk menentukan analisis digliserida dalam serum darah dengan rentang kerja biosensor didapatkan pada pH 6,5 hingga 7,5 dan rentang suhu adalah 30-40°C. Oleh karena itu kajian terhadap sinergisme untuk analisis kolesterol dalam serum darah dengan menggabungkan enzim kolesterol oksidase dalam matrik nanopartikel silikon berpori perlu dikaji lebih jauh. Kelemahan ini hendak diatasi dengan lipase dari Isolat Banyuwedang (*Bacillus* BYW2) yang mampu menghasilkan lipase berdaya tahan tinggi pada suhu tinggi (termostabil). Lipase termostabil BYW2 ini dapat bertahan pada suasana asam, berbeda dengan lipase dari kelas *Bacillus* yang pernah ditemukan (Tika dkk, 2011) Atas dasar itu penelitian untuk efektivitas amobil enzim kolesterol oksidase pada matrik nano silikon berpori, serta mengetahui karakteristik kolesterol oksidase amobil dari aspek suhu, pH, dan penggunaan berulang (reusable) perlu dikaji.

Makalah inibertujuan untuk mengetahui kondisi optimum reproduksibilitas sistem biosensor disposable seperti pH terhadap konsumsi oksigen pada pengukuran digliserida dan respon optimum serta hubungan linear antara konsentrasi digliserida dengan konsentrasi oksigen (mg/mL) yang terbentuk oleh rangkaian lipase termostabil yang dikaitkan dengan silikon berpori dalam sistem biosensor yang dikaitkan dengan alat DO meter.

METODE

Alat dan Bahan

Semua bahan yang digunakan memiliki tingkat proanalisis dan tingkat biologik, kecuali bila disebutkan khusus dalam teks. NH₄Cl, 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.

Aktifasi silikon berpori

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 glutaraldehida 2,5%. Setelah membran diaktivasi, kelebihan glutaraldehida 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 mengaktifasi 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

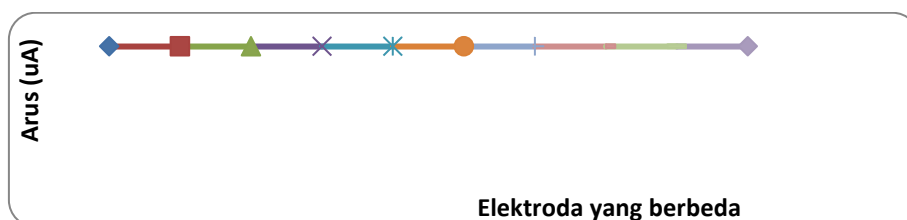
DG, ATP, lipoprotein lipase (22U mL⁻¹), GK (1U mL⁻¹) ditambahkan 600 µL tabung centrifuge dengan 300 µL buffer phosphate buffer, 1:1 larutan serum-buffe dikocok sampai homogeny selanjutnya diinkubasi pada 45 °C selama 1 jam. Larutan buffer serum dengan perbandingan 1:1 sebagai medium control, bovine 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

Enzim (lipase, GK dan GPO) diko-amobilisasi dengan silikon berpori pada berbagai konsentrasi, aktivitas elektroda menunjukkan bahwa pada konsentrasi 2µg/mL memiliki aktivitas 1,2 g/mL, konsentrasi 2 µg/mL memiliki aktivitas 1,4 µg/mL, dan konsentrasi optimum ditunjukkan pada konsentrasi 4 µg/mL yaitu sebesar 5,1 g/mL, dan peningkatan konsentrasi menjadi 5

$\mu\text{g/mL}$ kadar oksigen yang terukur sebesar 4,3 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 sekaligus 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).

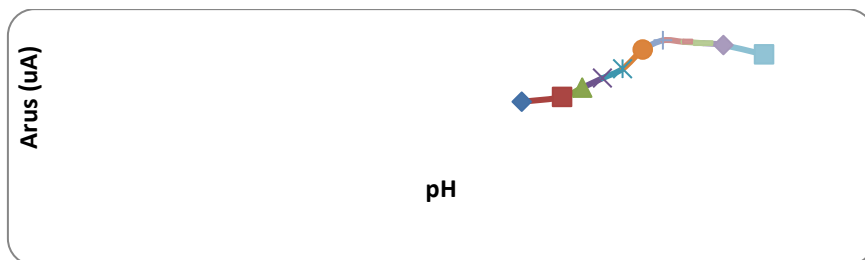
Selanjutnya pada konsentrasi optimum kinerja biosensor, dilakukan uji reproduibilitas dari prototype biosensor dengan silikon berpori. Dilakukan pengukuran terhadap berbagai jenis elektroda. Pada masing-masing tabung diisi dengan 5 μM Digliserida. Hasil pengukuran diperoleh kekuatan arus sebesar 0,0421 μA . Kondisi ini menandakan bahwa biosensor 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 silikon berpori

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 termostabil yang diamobilisasi dengan silikon berpori menunjukkan aktivitas yang relative sama dengan lipase yang

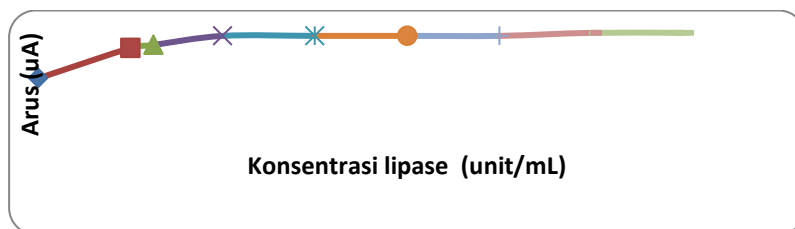
diamobil dengan PVC, Artinya, silikon berpori dapat meningkatkan kinerja enzim lipase bebas dari pH 7,0, berubah menjadi pH 7,75. Lebih jauh ini menunjukkan bahwa beberapa aktif site yang optimum dibawah pH rata-rata enzim terlindungi oleh permukaan matrik.



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

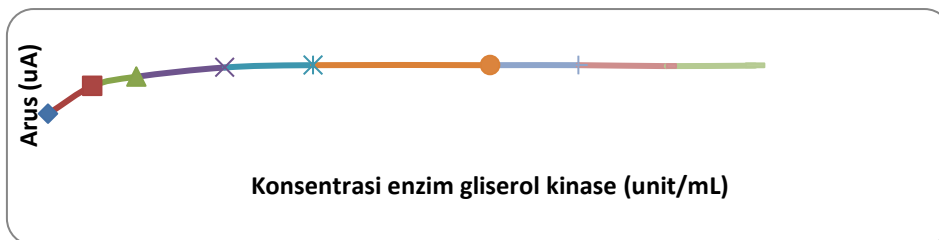
unit/mL itu relative telah mengalami kejenuhan. Artinya dengan penambahan enzim berapapun tidak mempengaruhi kinerja biosensor.



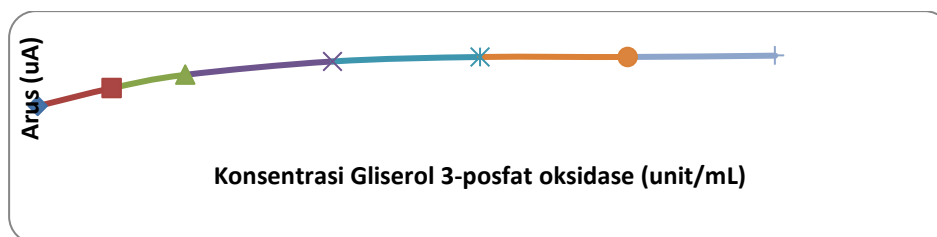
Gambar 4. Efek amobilisasi lipase pada elektroda kerja dalam bovin serum

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



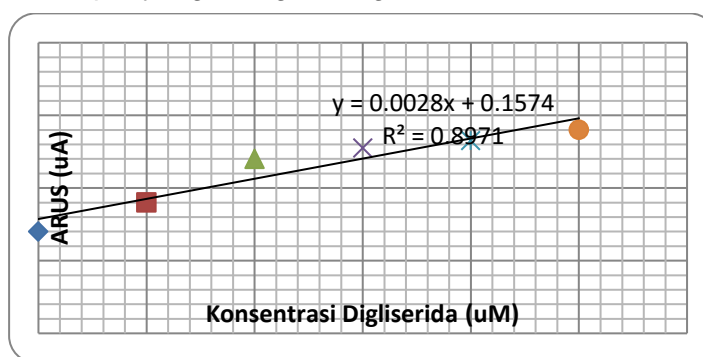
Gambar 5. Efek amobilisasi gliserol kinase pada matrik silikon berpori



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 gambar 7



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

Seperti terlihat dalam reaksi pada Gambar 1, ada tiga jenis enzim yang digunakan yaitu lipase yang berasal dari *Bacillus* BYW2 (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 (Dihidroksi Aseton Fosfat) 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 H₂O₂ (konsumsi oksigen). Hasil pengukuran seperti pada gambar 7 menunjukkan garis linear. Hal ini dapat disimpulkan bahwa sistem biosensor disposable dengan amobilisasi gabungan enzim dengan silikon berpori dapat digunakan untuk mengukur DG dalam serum

SIMPULAN

Berdasarkan hasil pembahasan di atas dapat disimpulkan bahwa rentang kerja biosensor didapatkan pada pH 6,5 hingga 7,5 dan rentang suhu adalah 30-40°C. Modifikasi elektroda enzim dengan matrik silikon berpori dapat digunakan dalam sistem biosensor pada alat DO meter untuk mendeteksi gliserida. Konsentrasi enzim lipase termostabil Banyuwedang jenuh pada 20 Unit/mL, sedangkan Gliserol Kinase jenuh pada konsentrasi 2 unit/mL dan Gliserol 3 posfat oksidase pada konsentrasi enzim 4 unit/mL. Konsentrasi enzim optimum dan kejenuhan permukaan silikon berpori yang stabil dapat digunakan sebagai parameter keberhasilan respon biosensor. Konsentrasi DG 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 dapat digunakan untuk mengukur DG dalam serum.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih dihatorkan setinggi-tingginya kepada Ketua Lemlit Undiksha, Dekan MIPA, Direktur Pascasarjana, Ketua Jurusan Pendidikan Kimia Undiksha atas sarana, dorongan dan arahnya dalam kegiatan penelitian ini, serta DIKTI atas Hibah Kompetensi yang diberikan

kepada penulis tahun 2014 dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penugasan Program Penelitian No. 187/UN48.14/PL/014, tertanggal 16 Mei 2014.

DAFTAR PUSTAKA

- 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.
- 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., Vandebark 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.
- 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.
- 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.
- Hajri T., Abumrad N.A. Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu. Rev. Nutr.* 2002;22:383–415.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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, Proseding 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. Proseding 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.
- 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.
- 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.