

IMMOBILISASI ENZIM *GLUCOSE OXIDASE* (GOD) dan *HORSE RADISH PEROXIDASE* (HRP) UNTUK APLIKASI BIOSENSOR DENGAN METODE SOL-GEL

Adrian Nur, Wahyu Dhini S.U, Yeni Febriana, Heru Setyawan*)

Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember
Kampus ITS Sukolilo, Surabaya 60111, Telp/Fax: (031)5946240

Abstrak

Mahalnya sensor glukosa untuk penderita kencing manis (diabetes) yang diderita 6,4 % (14 juta) penduduk Indonesia mendorong penelitian mengenai biosensor glukosa yang dikembangkan dengan metode sol gel. Teknik sol-gel menawarkan fleksibilitas yang tinggi untuk membentuk sensor yang dapat dipasangkan dengan teknik elektrokimia dengan harga murah dan sederhana. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh kondisi operasi pembuatan sol-gel yaitu konsentrasi silika dalam sol terhadap diameter pori lapisan sol gel silika serta mempelajari pengaruh diameter pori, suhu, dan pH terhadap aktivitas dan stabilitas enzim yang diimmobilisasi. Prosedur immobilisasi enzim ke dalam silika gel terdiri dari dua tahap, yaitu pertama tahap pembuatan sol, dengan menghidrolisa silikon alkoksida dalam air demineral dengan pelarut etanol dan katalis HCl selama ± 15 jam dilanjutkan dengan evaporasi untuk menghilangkan etanol. Tahap kedua adalah tahap pembuatan gel dan immobilisasi enzim. Larutan buffer pH 7 yang telah mengandung enzim glucose oxidase (GOD) dan horse radish peroxidase (HRP) ditambahkan ke dalam sol dengan jumlah yang divariasi untuk memperoleh berbagai konsentrasi silika dari 1,31% sampai 5,25%. Larutan kemudian dilapiskan pada plat kaca untuk membentuk lapisan yang tipis. Luas permukaan dan diameter pori lapisan matriks silika diukur dengan metoda adsorpsi/desorpsi nitrogen. Aktivitas enzim terimmobilisasi diuji dengan prosedur Sigma Protocol. Dengan metode adsorpsi/desorpsi nitrogen didapatkan bahwa semakin besar konsentrasi silika dalam larutan sol, maka semakin kecil diameter pori. Dari analisa aktivitas enzim dengan sigma protocol, didapatkan hasil aktivitas enzim yang terimmobilisasi paling bagus (4,361 unit/ml) pada konsentrasi 1,5% berat SiO₂ dengan diameter pori 2896 Å. Untuk stabilitas enzim terimmobilisasi mengalami penurunan karena adanya treatment pada suhu 25 °C menjadi 36,96% dan perendaman pada pH 6 menjadi 17,06%.

Kata kunci: biosensor glukosa; glucose oxidase; horse radish peroxidase; immobilisasi enzim; metode sol gel

1. Pendahuluan

Penderita kencing manis - diabetes di Indonesia mencapai 14 juta penderita (6,4% penduduk Indonesia) yang menempatkan Indonesia menduduki ranking ke-4 terbesar di dunia (menurut hasil survey WHO). Setiap tahunnya jumlah penderita terus bertambah seiring dengan berubahnya gaya hidup masyarakat. Diabetes, yang sebelumnya dianggap sebagai penyakit orang tua dan sebagian besar dianggap disebabkan oleh kegemukan, telah tumbuh pada laju epidemik akhir-akhir ini dan terus meningkat di antara remaja dan bahkan anak-anak. Pendekatan baru untuk mendiagnosis, mengobati, mengenali lebih awal, dan pencegahan penyakit tersebut diperlukan untuk menghadapi tantangan ini.

Untuk menjaga tingkat glukosa darah pada daerah aman, diperlukan alat untuk memantau glukosa darah. Saat ini, sensor untuk keperluan tersebut sangat mahal sehingga masyarakat banyak yang tidak mampu untuk membelinya. Oleh karena itu, dibutuhkan penelitian yang intensif untuk mengembangkan pemenuhan biosensor yang murah, akurat dan mudah penggunaannya karena keadaan diabetes dicirikan oleh tingkat glukosa yang tinggi baik dalam darah (> 4,7 mM) maupun dalam kencing (> 11mM). Glukosa dapat dianalisa dengan sejumlah metode berbeda-beda. Akan tetapi, metode yang dipilih biasanya melibatkan enzim yang sangat khusus untuk glukosa dan dengan begitu, tidak mudah terganggu dengan gula lain yang mungkin ada. Oleh karena itu, dibutuhkan penelitian dasar yang kuat untuk mengembangkan strategi baru untuk biosensor glukosa darah.

Keberhasilan suatu biosensor tergantung pada sebaik apa suatu enzim terikat pada permukaan biosensor yang diinginkan dan tetap aktif selama digunakan (Coradin dkk, 2006). Dua aspek yang paling bermasalah dalam pengembangan biosensor adalah penyisipan enzim dalam matriks yang sesuai dan pemantauan/pengkuantifikasian

*) Penulis dimana surat-menyurat dialamatkan. E-mail: sheru@chem-eng.its.ac.id

interaksi antara analit dan enzim tersebut (Gupta & Chaudhury, 2007). Untuk biostabilitas dan efisiensi reaksi yang optimal, matrik penyangga diinginkan mampu mengisolasi biomolekul, melindunginya dari agregasi antar molekul sendiri dan serangan mikroba. Immobilisasi yang bagus dicirikan oleh aktivitas enzimatis yang tinggi dari molekul yang terperangkap dengan perembesan keluar yang dapat diabaikan dan hampir tidak terhambat difusi seleksi molekul analit dan produk reaksi. Selain itu, stabilitas kimia dan mekanis matriks harus memenuhi syarat untuk aplikasi khusus, misalnya: tipe transducer, stabilitas ketika disimpan dan mediator sensor.

Berbagai macam teknik immobilisasi telah digunakan, meliputi adsorpsi pada penyangga padat (Yao dkk., 2007; Wang dkk., 2009), pengikatan kovalen (Kunzelmann & Botther, 2007; Wu dkk., 1999) dan pemerangkapan dalam polimer (Fei dkk., 2003; Li dkk., 2004; Pan dkk., 2005; Hiratsuka dkk., 2008). Pada umumnya, teknik adsorpsi mudah dilakukan, tetapi ikatan enzim seringkali lemah yang menyebabkan perembesan keluar dan biokatalis seperti itu derajat kestabilannya kurang. Sebaliknya, teknik kovalen membutuhkan waktu yang sangat lama dan seringkali memerlukan beberapa tahap kimia. Immobilisasi, meskipun mencegah perembesan keluar tetapi seringkali mengarah kepada kehilangan aktivitas dan stabilitas enzim seiring dengan berjalannya waktu (Gupta dkk., 2007). Dari beberapa teknik immobilisasi yang telah dilakukan di atas, dapat disimpulkan bahwa proses pemerangkapan enzim harus memperhatikan aktifitas dan kestabilan enzim yang akan digunakan.

Sol-gel menawarkan cara yang lebih baik untuk mengimmobilisasi biomolekul dengan matriksnya yang berpori dan menunjukkan aktivitas fungsional biomolekul yang terselubungi (Coardin dkk., 2006; Gupta dkk., 2007). Hal ini disebabkan kondisi proses sol-gel yang sederhana dan kemungkinan untuk merancang sesuai kebutuhan. Fleksibilitas sol-gel memungkinkan membentuk sensor sebagai monolith dan lapisan tipis yang dapat dipasangkan dengan serat optik atau dideposisikan pada elektroda, maupun sebagai nanopartikel.

Pengembangan teknik sol-gel terutama berbasis pada silikon alkoksida $\text{Si}(\text{OR})_n$, dimana R adalah gugus organik ($-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$, ...) (Hench, 1998). Dengan kehadiran air, terjadi hidrolisis gugus Si-OR yang menciptakan gugus silanol Si-OH dan melepaskan molekul alkohol ROH terkait. Kemudian terjadi kondensasi antara gugus silanol yang membentuk ikatan Si-O-Si. Reaksi kondensasi yang mengikuti proses polimerisasi anorganik menghasilkan pembentukan nanopartikel SiO_2 . Setelah sol menjadi gel, enzim terperangkap dalam jaringan polimerik gel berpori. Molekul enzim terperangkap dalam jaringan kovalen daripada terikat secara kimia pada matriks silika gel sehingga aktivitas fungsional biomolekul masih tetap tinggi (Coradin dkk., 2006).

Pada umumnya biosensor glukosa berbasis sol-gel melibatkan pemerangkapan serempak enzim *glucose oxidase* (GOD) dan *horse radish peroxidase* (HRP) dalam silika gel berbasis *tetramethyl orthosilicate* (TMOS) dan *tetraethyl orthosilicate* (TEOS) (Singh dkk., 2007; Liang dkk., 2008). TEOS dan TMOS merupakan precursor yang efektif untuk pembentukan sol-gel dan berbagai macam biosensor berbasis sol-gel yang berdasarkan pada prinsip transduksi yang berbeda yang membentang dari elektrokimia (amperometric dan coulometric), optic, piezo-electric, dan thermal, telah dikembangkan (Mehrvan & Abdi, 2004). Transducer merupakan alat yang penting untuk mengkonversi perubahan yang terjadi karena reaksi redoks. Sensor optik memantau reaksi melalui reaksi $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HRP dye organic}$ yang dimasukkan dalam *supernatant gel*. Sensor thermal memantau reaksi enzimatis berdasarkan pada perubahan entalpi dari sistem reaksi (Ramanathan dkk., 2001). Teknik yang paling populer adalah dengan teknik elektrokimia. Keunggulan utama teknik elektrokimia untuk pemantauan glukosa darah adalah bahwa bagian aktif biosensor dimana darah tidak perlu berkontak langsung dengan alat ukurnya sendiri. Hal ini mengurangi kebutuhan untuk membersihkan alat dan mengurangi peluang untuk kontaminasi dengan spesimen darah yang mungkin terinfeksi oleh penyakit lain.

Akan tetapi, biosensor berbasis sol-gel ini mempunyai beberapa kelemahan, yaitu langkah pembentukan sol gel melibatkan pH yang ekstrim dan konsentrasi alkohol yang tinggi yang dapat merusak stabilitas enzim dan struktur lapisan sol-gel silika yang porous cenderung menyebabkan enzim merembes keluar sehingga stabilitas sensor menjadi jelek (Coradin dkk., 2007; Gupta & Chaudury, 2007). Hal ini mendorong perlunya mengembangkan suatu teknik dimana kedua kendala tersebut dapat diatasi.

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan teknik immobilisasi enzim GOD/HRP ke dalam silika gel dengan teknik sol-gel untuk aplikasi biosensor glukosa dengan mempelajari pengaruh kondisi operasi pembuatan sol-gel yaitu konsentrasi silika dalam sol terhadap diameter pori lapisan sol gel silika serta mempelajari pengaruh diameter pori, suhu, dan pH terhadap aktivitas dan stabilitas enzim yang diimmobilisasi. Metode sol gel yang menawarkan fleksibilitas yang tinggi untuk membentuk sensor, sederhana, dan murah diharapkan mampu menyediakan biosensor yang terjangkau masyarakat luas. Hal ini jelas merupakan upaya yang sangat berharga untuk menyelesaikan isu nasional tentang mahalnya alat kesehatan.

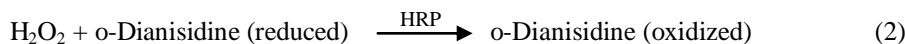
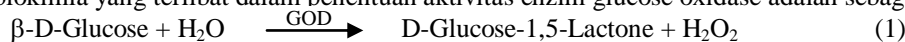
2. Bahan dan Metode Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah *tetraethyl orthosilicate* / TEOS dari Aldrich sebagai sumber silika dan air demineralisasi. Selain itu, juga digunakan HCl sebagai katalis dan etanol sebagai pelarut yang diperoleh dari Merck. Potassium phosphate dan KOH sebagai larutan buffer serta enzim *glucose oxidase* (GOD) *crude* dari *Aspergillus niger* dan *horse radish peroxidase* (HRP) diperoleh dari Sigma. Pengujian aktifitas enzim menggunakan *o-dianisidine dihydrochloride* (Sigma-Aldrich) dan D(+)-Glucose (Merck).

TEOS 7,8 ml dihidrolisa dengan 12,43 ml air demineralisasi menggunakan pelarut etanol sebanyak 38,2 ml dan katalis HCl 0,005 M sebanyak 1,75 ml. Reaksi hidrolisa ini dilakukan selama 15 jam. Setelah reaksi hidrolisa selesai, maka etanol diuapkan pada suhu ruang dengan hembusan udara. Larutan buffer pH 7 yang telah dilarutkan GOD dan HRP ditambahkan ke dalam larutan sol yang sudah bebas etanol dengan jumlah yang divariasikan untuk mendapatkan berbagai konsentrasi silika (1,31 % sampai 5,25 %). Campuran kemudian dilapiskan pada plat kaca untuk membentuk lapisan tipis. Proses aging dilakukan dengan cara membiarkan plat kaca yang sudah terlapisi larutan sol di suhu 25°C selama 12 jam. Setelah itu, plat kaca tersebut disimpan pada suhu 4-5°C sampai waktu pengukuran aktivitas.

Lapisan tipis diuji karakterisasi, uji aktifitas dan uji stabilitas. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi silika dalam sol terhadap volume pori, luas permukaan spesifik, ukuran pori, dan porositas, dilakukan dengan menggunakan Quantachrome Instruments NOVA 1200 (*High Speed Gas Sorption Analyser Versions 10.0 – 10.03*). Pada pengukuran aktifitas enzim yang terimmobilisasi, larutan uji ini terdiri dari o-dianisidine 2,5 ml dan D(+)-Glucose 0,5 ml dalam berbagai persen berat (0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; dan 10%). Larutan uji yang dimasukkan pada plat yang telah dilapisi matriks silika yang mengandung enzim diukur absorbansinya pada 500 nm dengan menggunakan alat GENESYS 10 Spectrophotometer pada sebelum dan sesudah kontak. Larutan uji setelah kontak selama 5 menit di-centrifuge terlebih dahulu selama 2 menit untuk memisahkan padatnya untuk kemudian diukur absorbansinya. Stabilitas enzim diuji terhadap pH, suhu, dan perembesan.

Reaksi biokimia yang terlibat dalam penentuan aktivitas enzim glucose oxidase adalah sebagai berikut :



dimana GOD adalah enzim *glucose oxidase* dan HRP adalah enzim *horse radish peroxidase*. Pengukuran aktivitas enzim glucose oxidase akan diukur baik dalam larutan dan dalam keadaan terimmobilisasi menggunakan Sigma protocol (*Sigma Quality Control Test Procedure*) dengan sedikit modifikasi.

Aktivitas enzim (unit/ml) *glucose oxidase* dapat ditentukan dengan persamaan :

$$\text{aktivitas enzim (unit / ml)} = \frac{\Delta A \times 3,1 \times df}{7,5 \times 0,02} \quad (3)$$

Keterangan :

ΔA = selisih nilai Absorbansi pada saat awal (strip enzim belum dimasukkan) dengan nilai Absorbansi pada saat konstan (1/menit).

3,1 = volume total assay (ml).

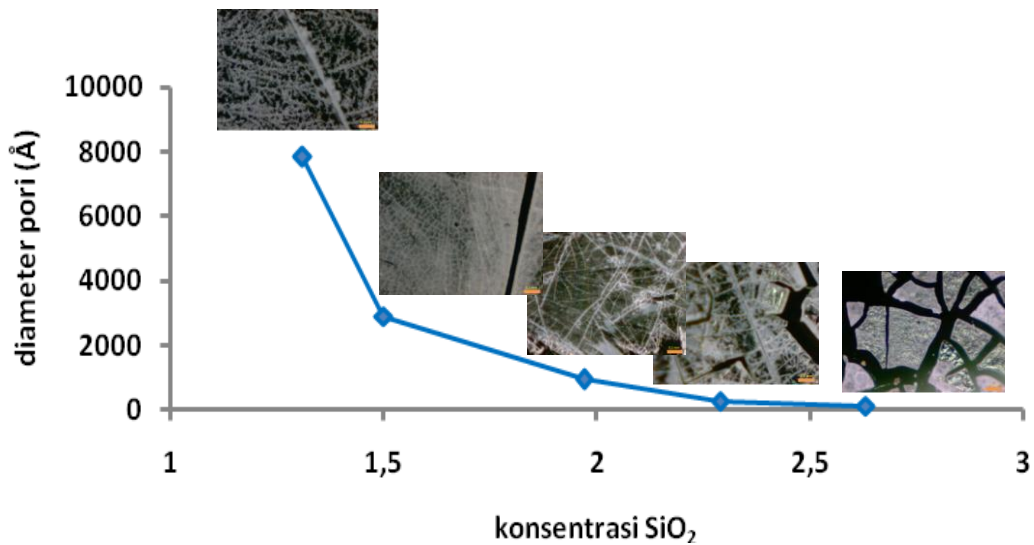
df = faktor pengenceran. Dalam penelitian ini df = 1

7,5 = nilai extinction O-dianisidine teroksidasi pada 500 nm (ml/ μmol).

0,02 = volume enzim yang digunakan (ml). Uji stabilitas enzim terhadap pH dan suhu dilakukan dengan menguji aktifitas enzim pada plat kaca yang dilapisi matriks setelah direndam pada pH 5, 6, dan 7 dan dioven pada suhu 25 °C dan 50 °C selama 20 menit. Untuk uji perembesan dilakukan dengan pengukuran kenaikan absorbansi terhadap enzim yang terimmobilisasi pada matriks silika yang direndam di dalam larutan buffer pH 7 selama 10 menit.

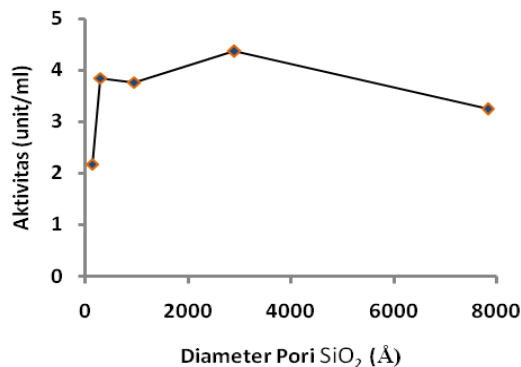
3. Hasil dan Pembahasan

Pengaruh konsentrasi silika dalam sol terhadap diameter pori ditunjukkan pada gambar 1. Dari gambar tersebut, terlihat bahwa konsentrasi silika dalam sol berbanding terbalik dengan diameter pori. Semakin besar konsentrasi silika menyebabkan diameter pori semakin kecil. Hal ini disebabkan semakin tinggi konsentrasi silika dalam sol partikel silika yang terbentuk semakin besar sehingga diameter porinya semakin kecil. Bagian insert pada gambar 1 menunjukkan foto mikroskopis matriks silika pada berbagai konsentrasi silika di dalam sol dengan perbesaran 200 kali yang memperlihatkan bahwa untuk konsentrasi silika yang lebih tinggi tampak lebih retak. Setelah enzim terimmobilisasi di dalam matriks dengan berbagai konsentrasi silika mulai dari 2,63 % - 1,31 % W SiO₂, dilakukan uji terhadap aktivitas enzim yang terimmobilisasi kemudian dibandingkan dengan aktivitas enzim ketika tidak terimmobilisasi (dalam larutan). Hasil uji aktivitas menunjukkan perbandingan aktivitas enzim dalam larutan dan enzim terimmobilisasi sama-sama mempunyai nilai aktivitas yang tertinggi ketika diuji pada larutan uji dengan konsentrasi D-glukosa 1%W. Untuk enzim dalam larutan, aktivitasnya sebesar 30,525 unit/ml, sedangkan untuk enzim yang terimmobilisasi aktivitasnya berkisar dari 2,17 sampai 4,361 unit/ml, untuk konsentrasi silika dari 2,63 % sampai 1,31 %.



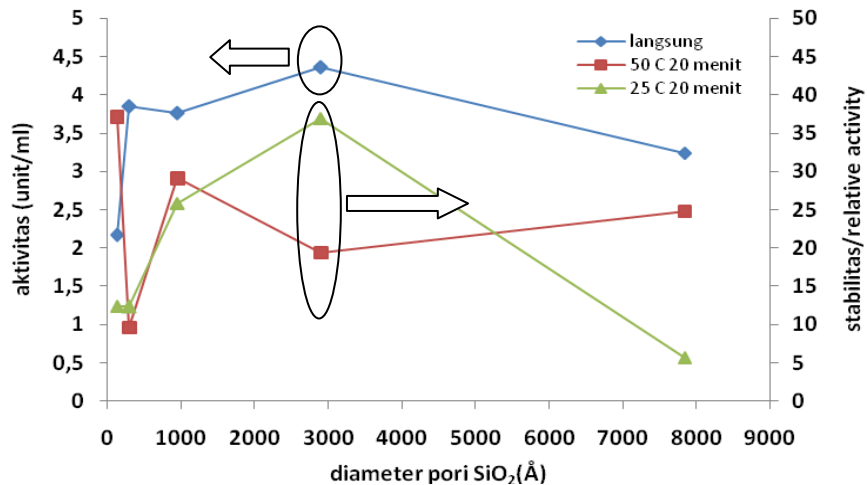
Gambar 1. Pengaruh variasi konsentrasi silika dalam sol terhadap diameter pori (Foto insert adalah hasil foto hasil mikroskopik pembesaran 200 kali)

Gambar 2 menunjukkan bahwa aktivitas enzim yang tertinggi pada diameter pori 2896 Å dengan aktivitasnya sebesar = 4.361 unit/ ml. Ini menunjukkan bahwa pada diameter pori yang terlalu besar atau terlalu kecil maka aktivitas enzim akan lebih rendah karena perembesan dan penurunan kemampuan difusi umpan ataupun produk.



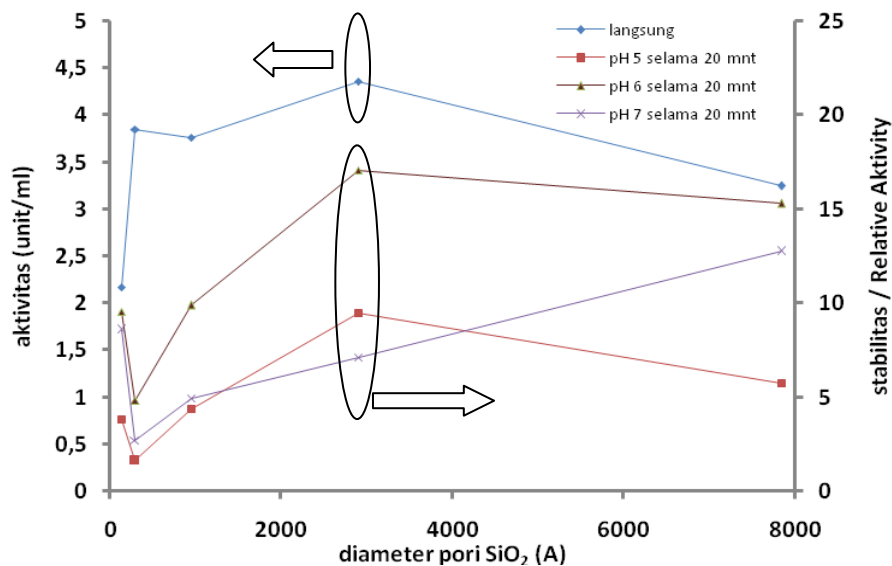
Gambar 2. Grafik pengaruh diameter pori silika terhadap aktivitas enzim yang terimmobilisasi.

Pada uji stabilitas terhadap suhu, tingkat kestabilan enzim yang terimmobilisasi dalam matriks silika didapatkan dengan mengukur absorbansi setelah matriks diletakkan pada suhu 25°C dan dioven pada suhu 50°C. Gambar 3 menunjukkan pengaruh diameter pori terhadap aktivitas dan stabilitas enzim (*relative activity*). Dalam hal ini, *relative activity* didefinisikan sebagai tingkat keaktifan enzim yang sudah diletakkan dalam suhu 25 dan 50°C (dalam %) terhadap aktivitas enzim tanpa perlakuan suhu tersebut (langsung). Terlihat bahwa terjadi penurunan aktivitas jika sebelumnya matriks silika diletakkan pada suhu 25°C (menjadi 36,96 %) dan pada suhu 50°C (menjadi 19,43%). Penurunan nilai ini disebabkan oleh terjadinya denaturasi enzim yang terimmobilisasi pada matriks silika.



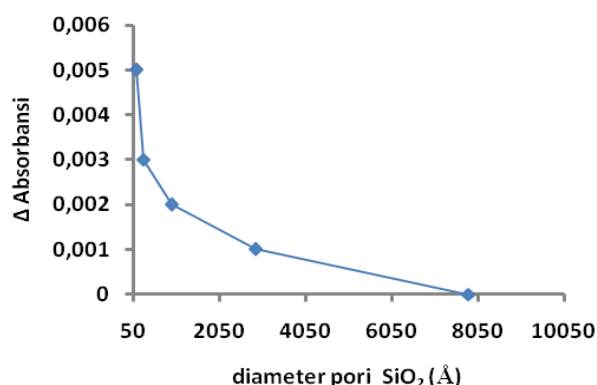
Gambar 3 Grafik pengaruh diameter pori terhadap aktivitas dan stabilitas enzim pada suhu 25 dan 50°C

Pada uji kestabilan terhadap pH, tingkat kestabilan enzim yang terimmobilisasi dalam matriks silika didapatkan dengan mengukur absorbansinya setelah direndam pada larutan buffer pH 5, 6, dan 7 selama 20 menit. Gambar 4 menunjukkan bahwa aktifitas enzim menurun dengan proses perendaman pada pH 5, 6, dan 7 dengan perendaman pada pH 6 menunjukkan tingkat kestabilan yang paling baik. Untuk perlakuan pada pH 6 yaitu pada matriks silika diameter pori 2896 Å terlihat nilai aktivitas sebesar 4,361 unit/ml dan stabilitas sebesar 17,06 %.



Gambar 4 Grafik pengaruh diameter pori SiO₂ terhadap aktivitas dan stabilitas enzim pada berbagai pH.

Pada uji stabilitas perembesan, dilakukan pengukuran absorbansi terhadap enzim yang terimmobilisasi pada matriks silika yang direndam di dalam larutan buffer pH 7 selama 10 menit. Gambar 5 menunjukkan hubungan diameter pori SiO₂ terhadap kemampuan enzim merembes keluar matriks silika. Semakin kecil diameter pori SiO₂, maka semakin banyak enzim yang keluar. Hal ini ditunjukkan melalui kenaikan absorbansi pada grafik. Semakin besar Δ absorbansi, maka semakin banyak enzim yang merembes. Hal ini seharusnya tidak terjadi karena semakin kecil diameter pori maka semakin sulit enzim keluar. Namun jika dilihat dari foto mikroskopik, terlihat bahwa semakin kecil diameter pori, maka semakin besar juga retakan matriks yang terjadi. Inilah yang menyebabkan semakin banyak enzim yang keluar. Untuk memastikan penyebab naiknya absorbansi dari larutan tersebut adalah adanya enzim yang merembes keluar, dilakukan uji aktivitas kembali pada larutan buffer pH 7 tersebut. Dan hasil yang didapat menunjukkan bahwa kenaikan absorbansi lagi dari absorbansi sebelumnya, hal ini dikarenakan adanya reaksi enzimatik di dalam larutan tersebut. hal ini menunjukkan adanya enzim yang merembes keluar sehingga mampu bereaksi dengan larutan uji.



Gambar 5 Grafik pengaruh diameter pori terhadap kemampuan enzim merembes keluar

4. Kesimpulan

Dari hasil pembahasan di atas, semakin besar konsentrasi SiO₂, maka semakin kecil diameter pori matriks silika yang dihasilkan. Aktivitas enzim yang terimmobilisasi paling bagus pada konsentrasi 1,5% W SiO₂ yaitu sebesar 4,361 unit/ml dengan diameter pori 2896 Å. Aktivitas dan stabilitas enzim yang terimmobilisasi mengalami penurunan jika sebelumnya direndam dalam suhu 25 °C dan 50 °C serta pada pH 5, 6, dan 7. Pada uji perembesan terlihat bahwa semakin kecil diameter pori maka semakin besar enzim yang merembes keluar.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi yang telah membantu pendanaan penelitian ini melalui Insentif Riset Terapan. Selain itu, Wahyu Dhini S.U. dan Yeni Febriana juga mengucapkan terima kasih kepada IMHERE ITS atas bantuan pendanaan skripsi melalui program Penelitian Student Grant.

Daftar Pustaka

- Coradin, T., Boissierre, M., and Livage, J, (2006), "Sol-Gel Chemistry in Medicinal Science.", *Current Medicinal Chemistry*, 13, 99-108.
- Fei, J., Wu, Y., Ji, X., Wang, J., Hu, S., and Gao, Z, (2003), "An Amperometric Biosensor for Glucose Based on Electrodeposited Redox polymer/Glucose Oxidase Film on a Gold Electrode.", *Analytical Sciences*, 19, p 1259 – 1263
- Gupta, R. and Chaudhury, N.K, (2007), "Entrapment of Biomolecules in Sol-Gel Matrix for Applications in Biosensors: Problems and Future Prospects.", *Biosensors and Bioelectronics*, 22, p. 2387-2399.
- Hiratsuka, A., Fujisawa, K., and Muguruma, H, (2008), "Amperometric Biosensor based on Glucose Dehydrogenase and Plasma-polymerized Thin Films.", *Analytical sciences*, 24, p. 483 – 486.
- Kunzelmann, U. and Bottcher, H., (1997), "Biosensor Properties of Glucose Oxidase Immobilized within SiO₂ gels.", *Sensors and Actuators*, 38-39, 222-228.
- Liang, R., Jiang, J., and Qiu, J., (2008) "An Amperometric glucose Biosensor Based on Titania Sol-Gel/Prussian Blue Composite Film.", *Analytical sciences*, 24, p. 1425 – 1430
- Li, C. X., Deng, K. Q., Shen, G. L., and Yu, R. Q., (2004), "Amperometric Hydrogen Peroxide Biosensor Based on Horse Peroxidase labeled Nano-Au Colloids Immobilized on Poly(2,6-pyridinedicarboxylic acid) Layer by Cysteamine", *Analytic Sciences*, 20, 1277-1281.
- Mehrvar, M. and Abdi, M, (2004), "Recent Development, Characteristics, and Potential applications of Electrochemical Biosensors", *Analytical sciences*, 20, p. 1113 – 1126
- Pan, D., Chen, J., Yao, S., Tao, W., and Nie, L., (2005), "An Amperometric Glucose Biosensor Based on Glucose Oxidase Immobilized in Electropolymerized Poly(o-aminophenol) and Carbon Nanotubes Composite Film on a Gold Electrode", *Analytical Sciences*, 21, p. 367 – 371
- Ramanathan, K., Jonsson, B.R., and Danielsson, B., (2000), "Sol-Gel based Thermal Biosensor for Glucose.", *Analytica Chimica Acta*, 427, 1-10
- Singh, S., Singhal, R., and Malhotra, B.D, (2007), "Immobilization of Cholesterol Esterase and Cholesterol Oxidase onto Sol-Gel Films for Application to Cholesterol Biosensor.", *Analytica Chimica Acta*, 582, p. 335-343.
- Wang, K., Yang, H., Zhu, L., Liao, J., Lu, T., Xing, W., Xing, S., and Lv, Q., (2009), "Direct Electrochemistry and Electrocatalysis of Glucose Oxidase Immobilized on Glassy Carbon Electrode Modified by Nafion and Ordered Mesoporous", *Journal of molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58, 194-198.
- Yao, K., Zhu, Y., Wang, P., Yang, X., Cheng, P., and Lu, H., (2007), "ENFET Glucose Biosensor Produced with Mesoporous Silica Microspheres", *Materials Science and Engineering C*, 27, p. 736 – 740