

## UJI AKTIVITAS ENZIM DEHIDROGENASE LAKTAT (DHL) YANG TERENKAPSULASI DALAM SILIKA DARI ABU SEKAM PADI

### THE ACTIVITY OF ENCAPSULATED LACTATE DEHYDROGENASE (LDH) ENZYME IN SILICA FROM RICE HULL ASH

Noor Hindryawati

PS. Kimia F.MIPA Universitas Mulawarman  
Jln. Barong Yongkok No. 4 Kampus Gn. Kelua Samarinda  
Telp. 0541-749152

#### Abstract

A research has been conducted in testing the enzymatic activity of the encapsulated Lactate dehydrogenase (LDH) in silica by sol-gel process using sodium silicate from rice hull ash. The encapsulation was carried out by mixing sodium silicate ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) sol solution and phosphate buffer pH 7 containing both LDH enzyme and coenzyme of nicotinamide adenine dinucleotide ( $\text{NAD}^+$ ). After 2-6 minute of shaking, the mixture was then transferred into a 96-microwell plate and stored overnight. The encapsulation activity of encapsulation product was quantified by measuring absorption of NADH, as coenzyme hydrogenation product, at 340 nm utilizing an ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) reader. For comparison similar experiment was also carried out for free enzyme. The result of the research shows that the  $k_{\text{kat}}$  for encapsulated LDH enzyme (ET) is smaller than free enzyme (EB), which means that the encapsulation enzyme will affect the velocity of product reaction. The velocity of the encapsulation enzyme (ET) reaction is lower than free enzyme (EB) as the consequence of weak interaction between the substrate and enzyme or influenced by  $k_1$ .

**Keywords :** *enzyme encapsulation, lactate dehydrogenase, rice hull ash, sol-gel process*

#### A. PENDAHULUAN

Pembuatan silika gel dari abu sekam padi relatif lebih ekonomis dibandingkan dengan pembuatan silika gel dari pasir dan bahan kimia murni. Oleh karena itu, pengembangan penelitian tentang pemanfaatan abu sekam padi untuk memperoleh silika gel dengan karakter tertentu yang disesuaikan dengan aplikasinya terus dilakukan. Salah satu penelitian pengembangan modifikasi silika dari berbagai sumber silika adalah dengan mengenkapsulasi atau mengurung biomolekul sebagai bioreseptor dalam biosensor yang digunakan luas dalam bidang kedokteran, industri obat-obatan dan makanan.

Biomolekul terutama enzim merupakan protein yang dikhususkan untuk mengkatalisis reaksi metabolik tertentu, enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel dan mempunyai daya katalisis yang tinggi. Berdasarkan kespesifikannya maka enzim dapat digunakan sebagai bioreseptor yang melakukan pengenalan/deteksi zat tertentu, yang kemudian perubahan sifat fisika-kimia pada biomolekul yang mempresentasikan informasi ditransduksikan dengan transduser fisis menjadi besaran elektronik. Untuk menghubungkan antara bioreseptor dengan transduser diperlukan suatu membran yang berupa matriks (Wicaksono, 2000).

Matriks silika yang dibuat dengan proses sol-gel, memberi harapan untuk enkapsulasi biomolekul

seperti enzim, antibodi, dan sel. Enzim lebih stabil dalam lingkungan yang terenkapsulasi pada matriks silika karena kerangka polimeriknya berkembang di sekitar biomolekul, membentuk kurungan dan mencegah enzim dari agregasi dan denaturasi (Bhatia *et al.*, 2000).

Pemilihan silika sebagai matriks pendukung (*host matrix*) untuk enkapsulasi biomolekul dikarenakan selain murah untuk disintesis, juga menunjukkan kekuatan mekanik dan stabilitas termal yang tinggi. Dengan demikian, kemungkinan aktivitas biologi dari enzim, antibodi, dan sel yang masuk dapat dipertahankan (Nguyen *et al.*, 2002).

Untuk menjaga stabilitas dan aktivitas biomolekul dalam matriks silika dikembangkan enkapsulasi biomolekul dengan metode sol gel yang menggunakan bahan dasar natrium silikat. Dengan bahan dasar ini, timbulnya alkohol dapat dihindari dan bersamaan itu pula enkapsulasi biomolekul dapat dilakukan pada pH netral serta aktivitas biologi dari biomolekul dapat dijaga. Proses tersebut terbagi menjadi dua langkah, yang pertama adalah preparasi sol dengan pH rendah menggunakan natrium silikat sebagai bahan dasar, kemudian langkah kedua adalah enkapsulasi enzim. Enzim dimasukkan dalam larutan bufer yang sesuai dan dimasukkan ke dalam sol dengan pH rendah (Bhatia *et al.*, 2000).

Berbagai biomolekul telah dienkapsulasi untuk digunakan sebagai biosensor. Salah satu enzim yang

telah dienkapsulasikan adalah dehidrogenase laktat (Chia-I *et al.*, 2002). Enzim ini, termasuk kelompok enzim oksidoreduktase dengan nikotinamida adenina dinukleotida ( $\text{NAD}^+$ ) sebagai kofaktor untuk mendeteksi L-laktat melalui pengukuran absorbansi NADH pada 340 nm. Penentuan L-laktat terus berkembang khususnya dalam bidang kimia klinis, perusahaan susu, industri anggur, bioteknologi, atau obat-obatan. Secara umum darah yang mengandung laktat dapat mengindikasikan adanya beberapa penyakit, seperti shock, penyakit jantung dan hati, diabetes dan pernafasan yang tidak normal. Pendeteksian yang murah, gampang dan selektif sangat dibutuhkan.

Dalam penelitian ini dilakukan enkapsulasi enzim dehidrogenase laktat (DHL) dan nikotinamida adenina dinukleotida ( $\text{NAD}^+$ ) dalam silika hasil pengolahan abu sekam padi. Penelitian ini juga diharapkan dapat mengungkap pengaruh enkapsulasi enzim DHL dan  $\text{NAD}^+$  dalam silika terhadap aktivitas enzim DHL.

## B. METODOLOGI PENELITIAN

### 2.1. Alat

Pada penelitian ini digunakan alat-alat sebagai berikut : Oven (Fischer 655P, USA), *Eppendorf*, Pipet mikro, Pengaduk magnetik, Plat sumur mikro (*microwell*) isi 96, ELISA Reader (Benchmark, Bio-rad), Alat penggojok (*Shaker*), Alat pemanas (Marmet), pH meter (T.P.S Digital titrator, Hanna tipe HI 9214), Timbangan elektrik (Mettler AS 200, USA), Corong dan gelas dari bahan plastik.

### 2.2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk enkapsulasi enzim: Natrium silikat sintesis dari abu sekam padi, Resin penukar kation asam kuat Amberlite IR 120 (Merck), Kertas Indikator Universal, Natrium dihidrogen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (Merck), Dinatrium hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Merck), Dehidrogenase L-laktat (Sigma),  $\beta$ -Nikotinamida adenina dinukleotida ( $\text{NAD}^+$ )-Garam Natrium (Sigma), Akuabides, Tris (hidroksimetil) aminometan (Sigma), Etilendiamintetraasetatdinatrium ( $\text{Na}_2$ -EDTA) (Merck), Triton X-100 (isooktilfenoksipolietoksietanol) (Merck), Hidrazin monohidrat (Sigma),  $\beta$ -Nikotinamida Adenina

dinukleotida ( $\text{NAD}^+$ )-Garam Natrium (Sigma), L(+)-Laktat (Sigma).

### 2.3. Prosedur

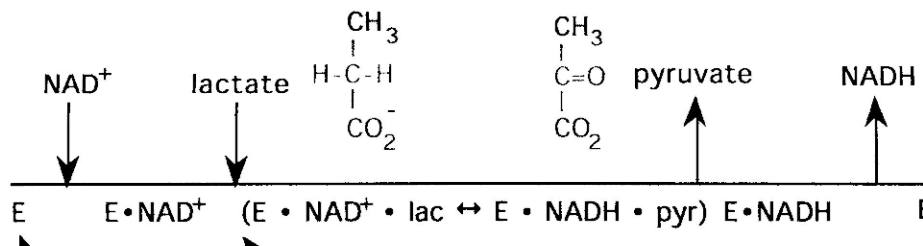
Natrium silikat hasil destruksi ditambah dengan akuabides 40,25 mL, lalu ditambah lagi resin penukar kation disertai pengadukan sampai mencapai pH 4. Selanjutnya resin dihilangkan melalui penyaringan. Larutan yang terbentuk disebut larutan sol.

Proses enkapsulasi dilakukan dengan mencampur larutan sol dengan larutan DHL dan  $\text{NAD}^+$  yang telah dilarutkan dengan bufer fosfat pH 7. Larutan kemudian digojok (*shaker*) 2-6 menit dalam temperatur dibawah  $4^\circ\text{C}$ , lalu dimasukkan ke dalam plat sumur mikro (*microwells*). Setiap 1 lubang berisi 50  $\mu\text{L}$  yang terdiri dari larutan sol, larutan enzim DHL (0,0305 g dalam 5 mL bufer fosfat 89 mM (pH=7)); dan 15  $\mu\text{L}$  larutan  $\text{NAD}^+$  0,1M, kemudian dibiarkan pada temperatur kamar selama 5 menit. Gel yang terbentuk disimpan pada temperatur  $4^\circ\text{C}$  selama 24 jam. *Aging* dilakukan pada wadah tertutup untuk menghindari dehidrasi dari gel yang telah mengenkapsulasi enzim (ET). Untuk gel yang tidak mengandung enzim, ke dalam sumur dimasukkan larutan sol 16,4  $\mu\text{L}$ .

## C. HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan penuaan selama 24 jam, dilakukan uji aktivitas enzim yang terenkapsulasi pada silika. Hasil pengujian ini akan dibandingkan dengan enzim bebas untuk mengetahui pengaruh enkapsulasi terhadap aktivitas enzim.

Enzim dehidrogenase L-laktat merupakan salah satu tipe enzim oksidoreduktase, yang mengkatalisis substrat bergugus fungsional CHO. Enzim mengkatalisis reaksi perpindahan atom H untuk diterima oleh senyawa lain. Pada reaksi perubahan L-laktat menjadi piruvat, enzim mentransfer H dengan menggunakan koenzim  $\text{NAD}^+$ . Mekanisme reaksi enzimatik DHL disajikan dalam Gambar 1  $\text{NAD}^+$  merupakan substrat yang utama dan harus terikat terlebih dahulu pada situs aktif, kemudian substrat L-laktat terikat.  $\text{NAD}^+$  dapat berikatan dengan enzim tanpa L-laktat tapi L-laktat tidak dapat berikatan dengan enzim jika enzim tidak berikatan terlebih dahulu dengan  $\text{NAD}^+$ .



Gambar 1. Mekanisme reaksi enzimatik DHL

Dengan adanya  $\text{NAD}^+$  dan pada pH tertentu terjadi pembentukan piruvat sebagai produk selain NADH (Schwartz dalam Chia-I *et al.*, 2002). NADH

menyerap pada panjang gelombang 340 nm sehingga aktivitas enzimatik DHL yang sebanding dengan

jumlah substrat L-laktat yang bereaksi dapat ditunjukkan oleh besarnya absorbansi dari NADH.

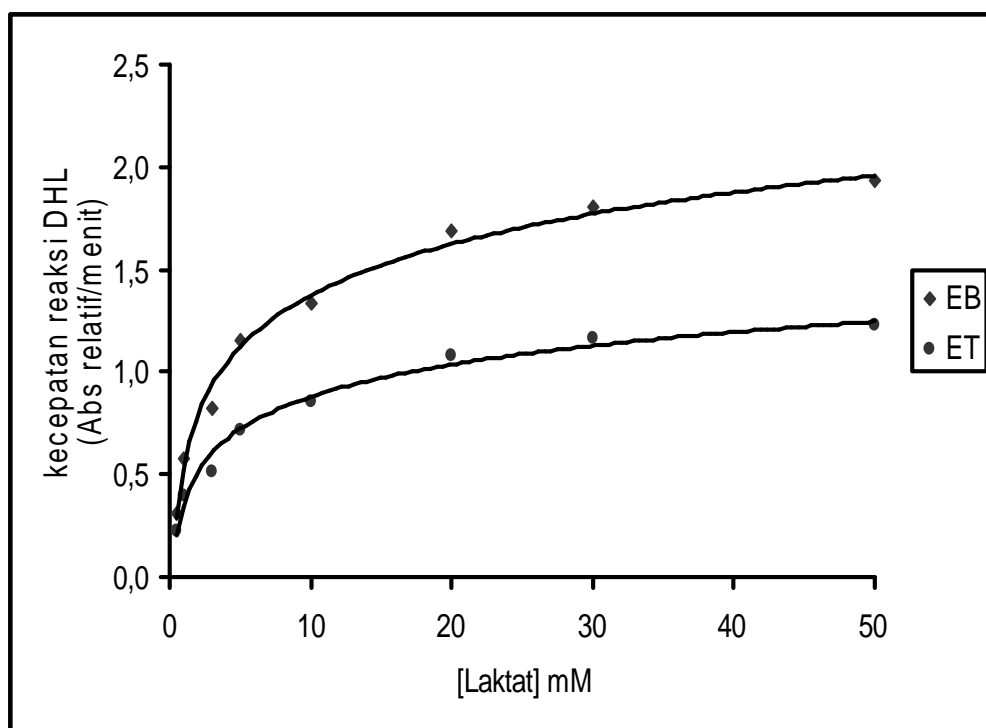
### Pengaruh enkapsulasi terhadap aktivitas enzim DHL

Pada bagian ini dikaji pengaruh enkapsulasi terhadap aktivitas enzimatis dengan mempelajari kinetiknya menggunakan model Michaelis-Menten. Kecepatan reaksi enzimatis dapat dipelajari dengan memvariasikan konsentrasi substrat L-laktat dan menjaga konsentrasi koenzim  $\text{NAD}^+$  tetap atau sebaliknya. Hasil aktivitas enzim DHL terenkapsulasi

(ET) kemudian akan dibandingkan dengan enzim DHL bebas (EB).

Kecepatan awal ( $V$ ) dalam reaksi enzimatis diperoleh dari koefisien arah garis lurus pada grafik antara absorbansi relatif NADH lawan waktu pengamatan. Waktu pengamatan kecepatan awal reaksi dilakukan pada menit ke 0 sampai menit ke 20 pada berbagai konsentrasi L-Laktat atau  $\text{NAD}^+$ .

Pengaruh konsentrasi L-laktat dan menjaga konsentrasi  $\text{NAD}^+$  tetap 0,1 M terhadap kecepatan reaksi enzim DHL bebas (EB) dan enzim DHL terenkapsulasi (ET) disajikan pada Gambar 3.2.

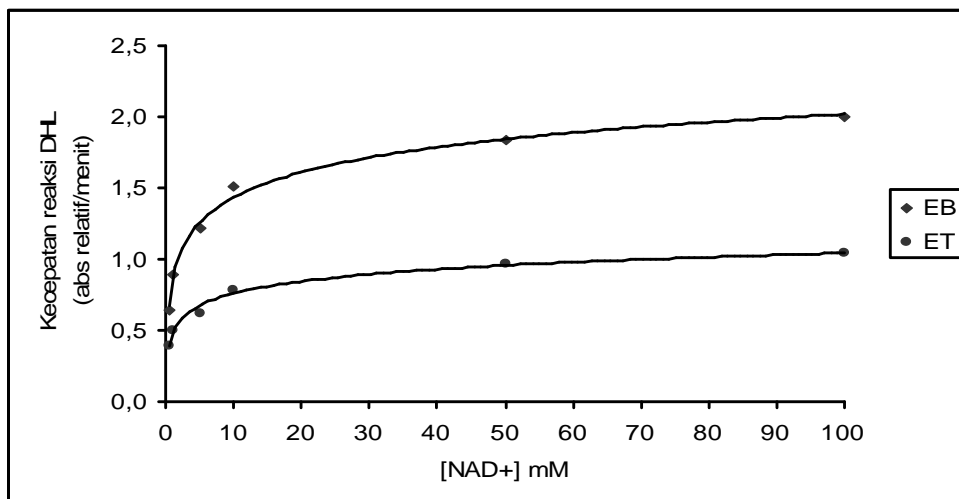


Gambar 2. Pengaruh variasi konsentrasi L-laktat dengan menjaga konsentrasi  $\text{NAD}^+$  tetap 0,1 M terhadap kecepatan reaksi enzim DHL bebas (EB) dan enzim DHL terenkapsulasi (ET)

Gambar 2 menunjukkan bahwa semakin bertambahnya konsentrasi L-laktat meningkatkan kecepatan reaksi. Kecepatan reaksi bergantung pada konsentrasi L-laktat ketika konsentrasi L-laktat 0,5–20 mM. Pada konsentrasi L-laktat 20–50 mM kecepatan reaksi sudah tidak bergantung pada konsentrasi L-laktat, hal ini menunjukkan enzim DHL telah terjenuhkan oleh L-laktat dan mencapai kecepatan maksimum. Hal ini sesuai dengan hukum Michaelis-Menten bahwa konsentrasi substrat mempengaruhi kecepatan reaksi. Semakin besar konsentrasi L-laktat

maka semakin meningkatkan kecepatan reaksi, ini menunjukkan pada saat kecepatan reaksi semakin besar, maka semakin banyak situs aktif enzim DHL yang berikatan dengan L-laktat untuk membentuk kompleks ES (enzim-substrat) dan terurai menjadi enzim + produk.

Selanjutnya, pengaruh variasi konsentrasi  $\text{NAD}^+$  yang terenkapsulasi dalam matrik silika dan menjaga konsentrasi L-laktat tetap 0,1 M terhadap kecepatan reaksi enzim DHL bebas (EB) dan enzim DHL terenkapsulasi (ET) disajikan pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Pengaruh variasi konsentrasi  $\text{NAD}^+$  dengan menjaga konsentrasi L-laktat tetap 0,1 M terhadap kecepatan reaksi enzim DHL bebas (EB) dan enzim DHL terenkapsulasi (ET)

Gambar 3 diperoleh informasi bahwa kecepatan reaksi bergantung pada konsentrasi  $\text{NAD}^+$  0,5–10 mM dan pada konsentrasi  $\text{NAD}^+$  50–100 mM kecepatan reaksi tidak bergantung pada konsentrasi  $\text{NAD}^+$ . Hal ini sesuai dengan hukum Michael-Menten. Laju katalitik yang dikatalisis suatu enzim mula-mula meningkat dengan bertambahnya substrat. Fenomena penambahan konsentrasi substrat ini bila dinaikkan lebih lanjut, akan tercapai laju limit atau laju maksimum. Suatu penambahan konsentrasi substrat lebih lanjut tidak mempunyai akibat terhadap laju reaksi. Gejala ini disebut kinetika penjumlahan. Pada konsentrasi-konsentrasi substrat yang menghasilkan laju reaksi maksimum, kita dapat menganggap bahwa katalis telah dalam keadaan jenuh dengan substrat (Page, 1985).

Dari data pada Gambar 2 dan 3, dapat ditentukan nilai kecepatan maksimum ( $V_{\text{maks}}$ ) dan konstanta Michaelis-Menten ( $K_m$ ) dengan menggunakan kurva Lineweaver Burk. Konstanta laju

reaksi enzimatik ( $k_{\text{kat}}$ ) diperoleh dari perkalian antara kecepatan maksimum dan konsentrasi enzim total. Kurva Lineweaver Burk dipilih untuk menentukan  $K_m$  dan  $V_{\text{maks}}$ , karena bila menggunakan kurva Michaelis-Menten,  $V_{\text{maks}}$  tidak dapat ditentukan secara pasti dan teliti karena bentuk kurva hiperbolik. Oleh karena itu, untuk mempermudah perhitungan nilai konstanta pada reaksi enzimatik, data yang didapat diplotkan dengan didasarkan persamaan garis lurus. Persamaan Lineweaver Burk sebagai berikut :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{maks}}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{maks}}} \dots\dots\dots(1)$$

Nilai  $V_{\text{maks}}$ ,  $K_m$  dan  $k_{\text{kat}}$  untuk enzim DHL bebas (EB) dan enzim DHL terenkapsulasi (ET) dengan variasi konsentrasi L-laktat dan menjaga konsentrasi  $\text{NAD}^+$  tetap 0,1 M disajikan pada Tabel 3.1.

**Tabel 3.1** Paramater model kinetik Michaelis-Menten enzim DHL bebas (EB) dan enzim DHL terenkapsulasi (ET) pada variasi konsentrasi L-laktat.

Jenis Enzim	Parameter Model Kinetika Michaelis-Menten			$R^2$
	$K_m$ (mM)	$V_{\text{maks}}$ (Abs relatif/menit)	$k_{\text{kat}}$ (per menit)	
EB	4,41	2,05	57,40	0,9937
ET	4,74	1,32	36,96	0,9957

Dari perhitungan menggunakan persamaan Lineweaver Burk untuk EB pada variasi konsentrasi L-laktat dan konsentrasi  $\text{NAD}^+$  tetap 0,1 M diperoleh nilai  $V_{\text{maks}}$  sebesar 2,05 Abs relatif/menit,  $K_m$  sebesar 4,41 mM dan  $k_{\text{kat}}$  sebesar 57,40 permenit, sedangkan untuk ET pada variasi konsentrasi L-laktat dan konsentrasi  $\text{NAD}^+$

tetap 0,1 M, nilai  $V_{\text{maks}}$  sebesar 1,35 Abs relatif/menit,  $K_m$  sebesar 4,74 mM dan  $k_{\text{kat}}$  sebesar 36,96 permenit. Berikut disajikan Tabel 3.2 berupa parameter model kinetika Michaelis-Menten enzim DHL bebas (EB) dan enzim DHL terenkapsulasi (ET) pada variasi konsentrasi  $\text{NAD}^+$  terenkapsulasi dan menjaga konsentrasi L-laktat tetap 0,1 M.

**Tabel 3.2 Paramater model kinetik Michaelis-Menten enzim DHL bebas (EB) dan enzim DHL terenkapsulasi (ET) pada variasi konsentrasi NAD<sup>+</sup>**

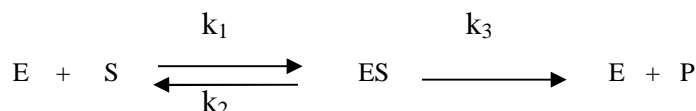
Jenis Enzim	Parameter Model Kinetika Michaelis-Menten			R <sup>2</sup>
	K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>maks</sub> (Abs relatif/menit)	k <sub>kat</sub> (per menit)	
EB	3,31	2,01	56,28	0,9989
ET	3,55	1,05	29,4	0,9994

Pengaruh aktivitas enzimatik dapat dilihat dari nilai parameter model kinetika Michaelis-Menten pada Tabel 3.2 menunjukkan nilai sebesar V<sub>maks</sub> 2,01 Abs relatif/menit, K<sub>m</sub> sebesar 3,31 mM dan k<sub>kat</sub> sebesar 56,28 permenit, sedangkan untuk ET nilai V<sub>maks</sub> sebesar 1,05 Abs relatif/menit K<sub>m</sub> sebesar 3,55 mM dan k<sub>kat</sub> sebesar 29,4 permenit.

Konstanta Michaelis-Menten mempunyai hubungan dengan tetapan kesetimbangan untuk disosiasi kompleks enzim-substrat. Suatu harga yang kecil bagi K<sub>m</sub> berarti substrat mempunyai aktivitas tinggi terhadap enzim yang menggambarkan mantapnya kompleks enzim-substrat. Sebaliknya harga yang besar bagi K<sub>m</sub> berarti substrat mempunyai

aktivitas yang rendah terhadap enzim. Pada Tabel 3.1 dan 3.2 nilai K<sub>m</sub> enzim DHL terenkapsulasi (ET) lebih besar dibanding enzim DHL bebas (EB) hal ini menunjukkan bahwa aktivitas substrat terhadap enzim pada ET lebih rendah dibanding EB, yang menyebabkan rendahnya nilai V<sub>maks</sub> dan k<sub>kat</sub> ET dibanding EB.

Konstanta laju reaksi (k<sub>kat</sub>) merupakan jumlah molekul substrat yang diubah oleh satu molekul enzim menjadi produk dalam satu satuan waktu, bila enzim terjenuhkan oleh substrat. Nilai ini sama dengan tetapan kinetika k<sub>3</sub> pada model yang diajukan oleh Michaelis Menten persamaan berikut :



Pada Tabel III.1 dan III.2 nilai k<sub>kat</sub> untuk ET lebih kecil dibanding EB. Hal ini menunjukkan bahwa enkapsulasi enzim akan mempengaruhi kecepatan reaksi produk yang dihasilkan. Kecepatan reaksi ET lebih rendah dibanding EB dapat dipahami karena lemahnya interaksi antara substrat dan enzim atau dipengaruhi oleh k<sub>1</sub>. Adanya beberapa alasan yang memungkinkan hal tersebut terjadi. Pertama, dimungkinkan karena adanya interaksi elektrostatik antara matriks silika dengan enzim yang menyebabkan interaksi enzim dengan substrat L-laktat tidak maksimal. Kedua, mungkin dipengaruhi oleh kemampuan difusi substrat ke enzim. Adanya pori yang berukuran kecil sehingga memungkinkan enzim terkubur karena substrat tidak bisa masuk ke dalam pori atau kemacetan pada pori yang berukuran besar dapat mengurangi koefisien difusi dari substrat dan produk secara signifikan dalam matriks silika, ini akan menimbulkan keterbatasan difusi dalam ruang matriks silika dimana laju reaksi tidak hanya ditentukan oleh konstanta laju reaksi (k<sub>kat</sub>) dari enzim tapi juga oleh laju transpor dari substrat ke enzim.

#### D. KESIMPULAN

1. Dari perhitungan menggunakan persamaan Lineweaver Burk untuk enzim bebas pada variasi konsentrasi L-laktat dan konsentrasi NAD<sup>+</sup> tetap 0,1 M diperoleh nilai V<sub>maks</sub> sebesar 2,05 Abs relatif/menit, K<sub>m</sub> sebesar 4,41 mM dan k<sub>kat</sub> sebesar 57,40 permenit, sedangkan untuk enzim terenkapsulasi pada variasi konsentrasi L-laktat dan konsentrasi NAD tetap 0,1 M, nilai V<sub>maks</sub> sebesar 1,35 Abs relatif/menit, K<sub>m</sub> sebesar 4,74 mM dan k<sub>kat</sub> sebesar 36,96 permenit.
2. Dari perhitungan menggunakan persamaan Lineweaver Burk untuk enzim bebas pada konsentrasi L-laktat tetap 0,1 M dan variasi konsentrasi NAD<sup>+</sup> menunjukkan nilai sebesar V<sub>maks</sub> 2,01 Abs relatif/menit, K<sub>m</sub> sebesar 3,31 mM dan k<sub>kat</sub> sebesar 56,28 permenit, sedangkan untuk enzim terenkapsulasi nilai V<sub>maks</sub> sebesar 1,05 Abs relatif/menit K<sub>m</sub> sebesar 3,55 mM dan k<sub>kat</sub> sebesar 29,4 permenit.
3. Enkapsulasi enzim akan mempengaruhi kecepatan reaksi produk yang dihasilkan. Kecepatan reaksi enzim terenkapsulasi lebih rendah dibanding enzim bebas dapat dipahami karena lemahnya interaksi antara substrat dan enzim atau dipengaruhi oleh k<sub>1</sub>.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Bhatia, R., Gupta, A.K., Anup K.S., and C.J. Brinker, 2000. Aqueous Sol-Gel Process for Protein Encapsulation, *Chem. Mater*, 12 2434-2441.
2. Brinker, C.J., Scherer, G.W., 1990, *Application in; Sol-Gel Science, The Physis and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, San Diego.
3. Chaubey, A., Pande, K., Malhotra, B., 2003, Application of Polyaniline/Sol-gel Derived Tetraethylortosilicate Film to an Amperometric Lactate Biosensor, *Analytical Sciences*, 19.
4. Carr, P. W., and Bowers, L.D., 1980, *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry*, Jhon Wiley & Sons.
5. Chia-I. Li., Yi-Hua Lin, Cheng-Ling Shih, Jeng-Pyng Tsaur, and lai-Kwan Chau, 2002, Sol Gel Encapsulation of Lactate Dehydrogenase for Optical Sensing of L-Lactate, *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 323-330.
6. Coiffeier, A., Coradin, T., Roux, C., Bouvet, O., Livage, J., 2001, Sol-gel Encapsulation of Bacteria; A Comparison Between Alkoxide and Aqueous Routes, *J. Mater. Chem.* 11, 2039-2044.
7. Dunn, B., Miller, J., Dave, B., Valentive, J., and Zink, J., 1998, Strategies for Encapsulating Biomolecules in Sol-gel Matrices, *Acta mater*, 46, 737-741.
8. Eggers, D., Valentine, J., 2001, Molecular Confinement Influences Protein Structure and Enhances Thermal Protein Stability, *Protein Science*, 10, 250-261.
9. Lan, E., Dave, B., Fukuto, J., Dunn, B., Zink, J., 1998, Synthesis of Sol-gel Encapsulated Heme Proteins With Chemical Sensing Properties, *J. Mater, Chem*, 9, 45-53.
10. Livage, J., Coradin, T., and Roux, C., 2001, Encapsulation of Biomolecules in Silica Gels, *J. Physics; Condens. Matter*, 13; R673-R691.
11. Martoharsono, S., 1994, *Biokimia Jilid 1*, Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
12. Murray, R., Granner, D., Mayes, P., Rodwell, V., 2003, *Biokimia Harper*, Penerbit Buku Kedokteran.
13. Nguyen, D.T., Mark S., Bruce D., and Jeffrey I.Z., 2002. Stabilization of Creatine Kinase Encapsulation in Silicate Sol gel Materials and Unusual Temperature Effect on its Activity, *Chem. Mater.*, 14 4300-4306.
14. Wicaksono, D.H.B., 2000, Mengenal Biosensor dan Generasi Terbaru Biosensor, *Seminar on Air – PPI Tokyo Institute of Technology* No. 1, Tokyo.
15. Williams., A.K., and Joseph T. Hupp, 1998, Sol Gel Encapsulation Alcohols Dehydrogenase as a Versatile. *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 4366-4371.