

PENGEMBANGAN METODE ANALISIS SPEKTROFOTOMETRY UNTUK PENENTUAN KOLESTEROL DI DALAM MAKANAN TRADISIONAL

Manihar Situmorang¹ dan P. Maulim Silitonga¹, Isnaini Nurwahyuni², Linda Sari Siregar¹, Ronatiur Purba¹

¹Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Medan, Jln. Willem Iskandar Pasar V, Medan 20221

²Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Medan, Jln. Willem Iskandar Pasar V, Medan 20221

Diterima 7 Mei 2012, disetujui untuk publikasi 20 Juli 2012

Abstract *The development of analytical UV-Vis spectrophotometric method for the determination of cholesterol is explained. The assay performed by enzymatic catalytic reaction using cholesterol oxidase (COx) to oxidise cholesterol into cholestenon and hydrogen peroxide followed by catalytic reduction of hydrogen peroxide with o-dianicidine by using enzyme peroxidase (POx) to produce red colour reduced o-dianicidine that can be measured at λ 520 nm. The modified method gave sensitive response to cholesterol, where the detection linearity to cholesterol lies between 0.01–5.0 mM cholesterol, slope 0.158 au/mM cholesterol, and the detection limit of 0.01 mM cholesterol. The method has been applied for the determination of cholesterol in traditional food samples, where the concentrations of cholesterol in food are lies between 0.052-0.799 mM cholesterol)*

Kata kunci:
Analisis, kolesterol,
makanan
tradisionil,
spektrofotometry,
reaksi enzimasi

Pendahuluan

Penentuan kolesterol di dalam makanan tradisional sangat diperlukan karena diketahui kehadiran kolesterol pada kadar tertentu di dalam makanan dapat menyebabkan penyakit. Kehadiran kolesterol di dalam makanan sering tidak dapat dihindarkan, terutama pada beberapa jenis makan tradisional yang diolah dari bahan baku yang mengandung kolesterol. Informasi yang akurat terhadap kehadiran kolesterol di dalam makanan sangat penting bagi konsumen untuk mempermudah konsumen dalam memilih makanan yang sesuai dengan diet yang diperlukan. Keberadaan kolesterol pada kadar tertentu memiliki resiko besar terhadap kesehatan karena ada korelasi positif antara kadar total kolesterol dengan penyakit jantung koroner (Sniderman dan Cianflone, 1999). Di dalam analisis klinis diketahui bahwa kadar kolesterol serum tinggi merupakan indikator ketidak-normalan metabolisme lemak, dan apabila metabolisme kolesterol terganggu,

kolesterol serum terakumulasi dalam bentuk kolesterol ester pada dinding arteri yang dapat mengakibatkan penyakit *arteriosclerosis* dan darah tinggi (Gaziano, dkk., 1999; Assmann, dkk., 1999). Kehadiran kolesterol di dalam tubuh tidak hanya dari konsumsi makanan dan minuman, tetapi dapat juga berasal dari metabolisme dan dari konsumsi makanan. Provinsi Sumatera Utara didiami banyak etnik seperti Melayu, Batak Toba, Batak Mandailing, Batak Karo, Batak Simalungun, Batak Pakpak, Nias, Padang, Jawa, Aceh, Tionghoa, dan lain sebagainya. Masing-masing etnik memiliki makanan tradisional yang telah dikenal sejak lama, dan sebagian besar telah menjadi makanan nasional yang dapat ditemukan di berbagai rumah makan..

Makanan tradisional umumnya diolah secara khas berdasarkan etnis menggunakan bumbu tradisional, sehingga bahan baku makanan yang sama dapat menghasilkan

makanan dengan citarasa bervariasi sesuai dengan nama makanan tradisional. Walaupun makanan tradisional dikonsumsi secara meluas oleh masyarakat, akan tetapi informasi ilmiah tentang nutrisi penyusun makanan belum banyak yang terdokumentasi, terutama kadar kolesterol. Untuk memberikan informasi tentang kualitas makanan tradisional maka perlu dilakukan analisis terhadap keberadaan senyawa tertentu penyusun makanan, khususnya senyawa kolesterol.

Permasalahan yang dihadapi dalam analisis makanan tradisional adalah sulitnya mendapatkan instrumen analisis yang akurat, selektif dan sensitif terhadap kolesterol sehingga kontrol kualitas makanan dan minuman sulit dilakukan secara reguler terhadap makanan yang banyak dikonsumsi masyarakat di Indonesia. Beberapa metode analisis yang dipergunakan untuk menentukan kolesterol di laboratorium diantaranya metode kolorimetri (Park, 1999), metode spektrofotometri (Amundson dan Zhou, 1999), metode kromatografi (Emara, dkk. 1999; Botsoglou, dkk. 1998), dan metode elektroanalisis (Brahim, dkk. 2001, Singh, dkk. 2004; Situmorang, dkk. 1998, Situmorang dan Nurwahyuni, 2001), dan menggunakan quartz crystal acoustic wave sensor (Martin, dkk. 2003). Metode analisis kromatografi seperti HPLC diketahui memiliki sensitifitas yang sangat baik karena dapat menentukan kadar kolesterol sampai pada konsentrasi sangat rendah ($5 \mu\text{M}$), akan tetapi instrumen HPLC relatif mahal, biaya analisis tinggi, dan harus dikerjakan oleh orang yang sangat terampil sehingga tidak ekonomis untuk dipergunakan sebagai instrumen analisis untuk analisis kolesterol di makanan tradisional. Metode analisis kolorimetri dan spektrofotometri banyak dipergunakan dalam penentuan kolesterol, akan tetapi dua metode analisis ini rentan terhadap pengaruh pengganggu (*interference*), terutama senyawa berwarna yang terdapat di dalam sampel mengakibatkan hasil analisis kurang akurat.

Penentuan secara spektrofotometri relatif kurang selektif dibanding metode analisis

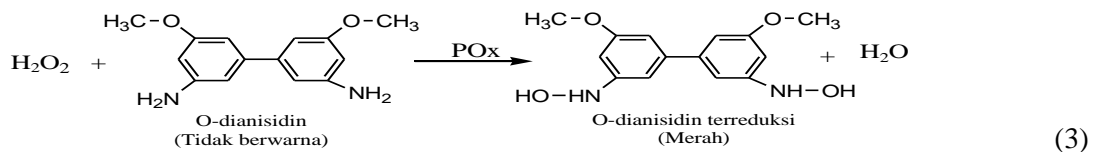
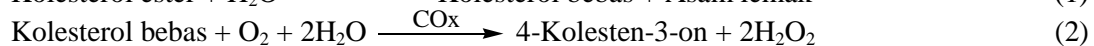
lain, karena pengukuran spektrofotometri memberi respon terhadap senyawa berwarna mengakibatkan hasil analisis cenderung tidak akurat. Akan tetapi, sampai saat ini metode analisis standar yang dipergunakan untuk penentuan kolesterol masih menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Permasalahan lain analisis spektrofotometri adalah pengukuran yang kurang sensitif karena sulit memilih senyawa kimia pengabsorpsi yang tepat. Di samping itu, senyawa kimia pengabsorpsi kebanyakan bersifat karsinogenik sehingga kurang aman bagi analisis. Analisis kolesterol secara spektrofotometri umumnya sangat lambat dan proses pelaksanaannya juga sangat kompleks, yaitu melalui tahapan perlakuan sampel dengan menggunakan zat-zat kimia mahal sebelum dianalisis menggunakan instrumen optik (Situmorang, dkk., 2009). Hal ini disebabkan karena keterulangan analisis dan ketersediaan instrumen analisis relatif terjangkau di berbagai laboratorium, sehingga metode analisis yang lebih baik seperti HPLC cenderung sulit dilakukan pada beberapa laboratorium. Ketersediaan alat spektrofotometer pada hampir semua laboratorium menjadikan spektrofotometri lebih dapat diaplikasikan untuk penentuan kolesterol. Dengan demikian perlu dilakukan modifikasi metode analisis spektrofotometri untuk meningkatkan selektifitas analisis.

Untuk mengatasi permasalahan ini perlu dikembangkan metode spektrofotometri menggunakan senyawa pengabsorpsi yang relatif aman, menggunakan pengabsorpsi *o*-dianisidin seperti dikembangkan untuk penentuan asam urat (Situmorang, dkk, 2008) dan penentuan glukosa (Situmorang, dkk, 2010). Penganalisisan menggunakan pengabsorpsi *o*-dianisidin sangat baik dikombinasikan dengan reaksi enzimasi sehingga daya analisis lebih selektif, dan hasil analisis akurat. Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan metode spektrofotometri sebagai instrumen analisis yang sensitif, selektif, akurat, sederhana dan cepat melalui reaksi enzimasi dengan menggunakan pengabsorpsi *o*-dianisidin

untuk penentuan kolesterol di dalam berbagai makanan tradisional.

Penelitian yang dikembangkan dalam studi ini adalah pengembangan metode analisis melalui reaksi enzimasi yang dideteksi secara spektrofotometri untuk penentuan kolesterol di dalam makanan tradisional yang terdapat di Sumatera Utara sehingga hasil yang diperoleh dapat memberikan informasi kepada masyarakat terhadap makanan tradisional yang mengandung kolesterol tinggi. Prinsip dasar reaksi enzimasi diperlihatkan pada persamaan reaksi reaksi (1) - (3). Kolesterol ester yang terdapat di dalam sampel diubah menjadi kolesterol bebas dan asam lemak oleh kehadiran enzim kolesterol esterase (CE) (Persamaan reaksi 1). Selanjutnya kolesterol bebas dioksidasi menjadi kolestenon dan

hidrogen peroksida melalui reaksi enzimasi dengan katalis kolesterol oksidase (COx) (Persamaan reaksi 2). Penentuan kuantitatif dilakukan melalui reaksi hidrogen peroksida dengan senyawa *o*-dianisidin dengan katalis peroksidase (POx) menghasilkan *o*-dianisidin tereduksi berwarna merah (Persamaan reaksi 3), yang dapat mengabsorpsi sinar pada $\lambda 520$ nm (Situmorang, dkk 2009). Besarnya intensitas (absorbansi) yang dihasilkan dari terbentuknya *o*-dianisidin tereduksi adalah setara dengan konsentrasi kolesterol yang terdapat di dalam sampel. Apabila yang ditentukan adalah kolesterol total maka diperlukan penambahan enzim CE di dalam reaksi enzimasi (Persamaan reaksi 1).



Metode Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia FMIPA Universitas Negeri Medan Tahun 2011. Metode penelitian meliputi penyediaan zat dan bahan, peralatan, dan prosedur penelitian (Situmorang, dkk, 2011). Bahan kimia yang dipergunakan diantaranya kolesterol (99%+), kalium klorida, isopropanol, Triton X-100, kolesterol oksidase (COx) 33 unit/mg dari *pseudomonash* (E.C.1.1.3.6), dan peroksidase (POx) 175 unit/mg dari *horse radish* (E.C.1.11.1.7.2) diperoleh dari Sigma Chem. Co. Berbagai jenis zat lain diperoleh dari Merk. Bahan lain adalah sampel makanan tradisional yang diambil secara random dari restoran di kota Medan, Sumatera Utara. Sedangkan peralatan yang diperlukan terdiri atas spektrofotometer (UV-Vis) Spektromik 21 Milton Roy, pengolah signal PowerLab 2/20 (ADInstrument) yang dilengkapi dengan *software* Scope, jarum

suntik mikro (Hamilton Co), dan gelas-gelas kimia. Peralatan pendukung adalah *water bath thermostat*.

Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan mengikuti prosedur yang dijelaskan Situmorang, dkk., (2011) meliputi penyediaan larutan, perlakuan sampel, dan analisis sampel. Larutan enzim kolesterol oksidase dibuat dengan cara melarutkan COx di dalam air. Larutan buffer fosfat 10 mM dibuat dari $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ dan pH diatur menggunakan NaOH mengikuti prosedur Situmorang, dkk., (2010). Teknik pembuatan larutan kolesterol dijelaskan secara terperinci pada studi sebelumnya (Situmorang, dkk., 2007; Situmorang dan Nurwahyuni, 2001; dan Situmorang, dkk. 1998) dengan cara melarutkan kolesterol di dalam isopropanol dan Triton X-100 (4%). Stok kolesterol standar (10 mM) disimpan di dalam kulkas (4 °C) dan selalu dihangatkan

di dalam air mendidih sampai larutan terlihat homogen apabila akan dipergunakan. Larutan *o*-Dianisidin 5 mM dibuat dengan melarutkan *o*-Dianisidin di dalam akuades mengikuti prosedur yang dijelaskan Situmorang, dkk., (2010).

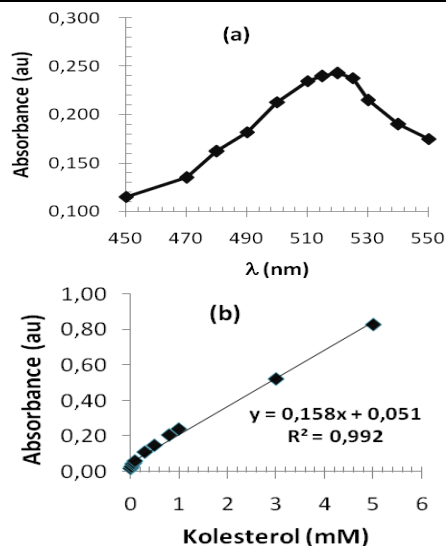
Sampel makanan tradisional sebanyak ± 100 g dikeringkan dalam oven pada suhu ± 60 °C, digerus sampai homogen, kemudian sebanyak ± 10 gram sampel dilarutkan di dalam akuades, dan diekstraksi dalam corong pisah menggunakan kloroform, dipisahkan, dikeringkan. Selanjutnya ekstrak kolesterol dilarutkan di dalam pelarut isopropanol dan Triton X-100 (4%), dan dijadikan sebagai larutan yang siap untuk dianalisis, larutan ini disebut sebagai larutan sampel untuk analisis secara spektrometri UV-Vis. Untuk mendapatkan kondisi optimum dilakukan optimasi sistem spektrofotometri seperti dijelaskan pada penelitian sebelumnya (Situmorang, dkk. 2008, dan Situmorang, dkk. 2011) menggunakan larutan standar kolesterol untuk mendapatkan absorpsi panjang gelombang optimum dan waktu inkubasi reaksi enzimasi. Analisis kolesterol di dalam larutan standar dan sampel dilakukan sebagai berikut. Ke dalam mikropipet dimasukkan 90 μ L larutan buffer fosfat (10 mM, pH 6,0) dilanjutkan dengan penambahan 50 μ L standar kolesterol yang dilarutkan di dalam 4% isopropanol-triton-X-100, kemudian ditambahkan 5 μ L enzim COx (1 unit/mL) dan 5 μ L POx (5 unit/mL), kemudian diaduk, diinkubasi selama 10 menit dan dimasukkan ke dalam spektrofotometri UV-Vis. Absorban diukur pada $\lambda 520$ nm pada larutan standar seri (0,01–5 mM kolesterol). Dengan prosedur yang sama dilakukan penentuan kolesterol di dalam sampel yang sudah diekstrak dan dilarutkan di dalam 4% isopropanol-Triton X-100 dengan cara memasukkan 90 μ L larutan buffer fosfat (10 mM, pH 6,0) ke dalam mikropipet, dilanjutkan dengan penambahan 50 μ L sampel yang sudah diperlakukan, kemudian ditambahkan 5 μ L enzim COx (1 unit/mL) dan 5 μ L POx (5 unit/mL) selanjutnya diaduk dan diinkubasi

selama 10 menit dan dimasukkan ke dalam spektrofotometri UV-Vis, diukur pada $\lambda 520$ nm.

Hasil Dan Pembahasan Spektrofotometri Penentuan Kolesterol Menggunakan *O*-dianisidin

Penggunaan senyawa *o*-dianisidin sebagai senyawa pengabsorpsi dalam penentuan secara spektrofotometri dalam reaksi enzimasi telah berhasil dilakukan untuk penentuan asam urat (Situmorang, dkk. 2008) dan senyawa glukosa (Situmorang, dkk 2010). senyawa *o*-dianisidin bersenyawa dengan hidrogen peroksida sangat baik karena perubahan warna *o*-dianisidin (tidak berwarna) menghasilkan senyawa *o*-dianisidin tereduksi yang berwarna merah muda melalui reaksi katalisasi enzimasi peroksidase (POx) sangat cepat, dan daya serap sinar pada panjang gelombang penentuan sangat stabil. Dalam reaksi enzimasi perubahan kolesterol menjadi kolestenon oleh kehadiran enzim COx dihasilkan hidrogen peroksida yang bereaksi dengan *o*-dianisidin menghasilkan *o*-dianisidin tereduksi yang dapat dideteksi pada panjang gelombang optim $\lambda 520$ nm. Intensitas warna hasil reaksi enzimasi antara hidrogen peroksida dengan *o*-dianisidin berbanding lurus dengan konsentrasi kolesterol. Bentuk kurva optimasi absorpsi reaksi enzimasi penentuan kolesterol dan kurva kalibrasi larutan standar kolesterol diperlihatkan pada Gambar 1.

Beberapa parameter yang dioptimasi diantaranya penentuan panjang gelombang maksimum, reaksi enzimasi, dan waktu inkubasi enzim. Optimasi masing-masing parameter dilakukan dengan mempertahankan kondisi optimum parameter yang lain sampai semua parameter telah dioptimasi. Penentuan panjang gelombang maksimum untuk larutan standar 1 mM kolesterol pada $\lambda 450$ -550 nm dan serapan maksimum diperoleh pada $\lambda 520$ nm seperti diperlihatkan pada Gambar 1a.



Gambar 1(a) Absorpsi hasil reaksi enzimasi 1 mM kolesterol pada panjang gelombang 450-550 nm, dan, (b) Kurva kalibrasi larutan standar kolesterol pada λ 520 nm. Reaksi enzimasi menggunakan enzim COx dan POx, dengan pengabsorpsi 5 mM *o*-dianisidin diinkubasi selama 10 menit.

Hasil ini secara konsisten optimum pada λ 520 nm sama seperti pada penentuan asam urat (Situmorang, dkk., 2008) dan penentuan glukosa (Situmorang, dkk., 2011). Hasil ini meyakinkan bahwa hasil reaksi enzimasi kolesterol dengan pengabsorpsi *o*-dianisidin seperti diperlihatkan pada persamaan reaksi (2) dan (3) berlangsung secara sempurna. Optimasi waktu inkubasi enzim juga dilakukan untuk melihat waktu yang sangat baik untuk terjadinya reaksi enzimasi secara sempurna menggunakan 1 mM kolesterol pada variasi waktu 1-20 menit, dan waktu inkubasi reaksi enzimasi yang optimum diperoleh selama 10 menit. Dalam kondisi optimum, dilakukan analisis kolesterol menggunakan larutan standar kolesterol standar dan diperoleh kurva kalibrasi larutan standar kolesterol (Gambar 1b).

Penentuan Kolesterol Dalam Makanan Tradisionil

Metode analisis spektrofotometri hasil pengembangan telah dipergunakan untuk penentuan kolesterol yang di duga mengandung kolesterol dalam berbagai jenis makanan tradisional yang terdapat di

Sumatera Utara. Makanan tradisional yang dianalisis adalah jenis makanan yang banyak dikonsumsi masyarakat dan diperjualbelikan di berbagai restoran di Kota Medan. Jenis makanan tradisional dan hasil pengukuran terhadap kadar kolesterol yang terkandung di dalam makanan yang diperoleh dari rata-rata dari 3 kali pengukuran dirangkum pada Tabel 1. Dari seluruh sampel yang dianalisis menunjukkan kadar kolesterol yang bervariasi, yaitu berada pada skala 0,051 mM-0,835 mM kolesterol. Hasil analisis kadar kolesterol menggunakan metode analisis spektrofotometri dengan pengabsorpsi *o*-dianisidin menunjukkan hasil yang baik, yaitu hampir semua jenis makanan dapat dianalisis menggunakan metode analisis yang dikembangkan dalam studi ini. Kehadiran pewarna yang terdapat pada makanan tradisional masih mempengaruhi terhadap akurasi hasil pengukuran. Akan tetapi, karena proses perlakuan sampel seperti ekstraksi kolesterol menggunakan kloroform telah dapat mengurangi kehadiran zat warna di dalam sampel. Di samping itu, oleh kehadiran enzim COx dalam proses analisis penentuan kolesterol dapat meningkatkan selektifitas analisis menggunakan metode spektrofotometri. Sedangkan penggunaan pengabsorpsi *o*-dianisidin di dalam langkah analisis secara spektrofotometri telah dapat meningkatkan sensitifitas penganalisan karena kehadiran enzim POx dalam reaksi katalisis hidrogen peroksida dengan senyawa pengabsorpsi sangat sensitif dan memberikan warna merah yang kontras yang dapat dideteksi pada panjang gelombang 520.

Tabel 1. Kadar kolesterol di dalam sampel makanan tradisional secara biosensor dan Spektrofotometri (mM per 10 gram sampel kering). Angka merupakan hasil rata-rata dari 3 kali pengukuran).

Suku dan Daerah Asal (Tradisi)	Nama Makanan	Metode Analisis spektrofotometri (Mm)	Suku dan Daerah Asal (Tradisi)	Nama Makanan	Metode Analisis spektrofotometri (Mm)
Batak Toba	Naniura	0,229	Padang	Rendang daging	0,742
	Saksang	0,468		Dendeng sapi	0,672
	Ayam napinadar	0,234		Gulai asam pade	0,354
	Tanggo-tanggo	0,467		Gulai hati	0,104
	Arsik	0,173		Gulai kikil	0,498
Batak Karo	B panggang karo	0,331		Cincang	0,409
	Cipera	0,515		Gulai usus	0,385
	Kidu-kidu	0,588		Babat	0,799
Batak Mandailing	Rendang belut	0,100		Gulai kakap	0,155
	Gulai asam aporas	0,139		Sate Padang	0,279
	Gulai ikan sale	0,206	Sunda	Gepuk iga	0,803
Batak Angkola	Holat	0,276		Ayam goreng Bogor	0,398
	Gulai mas sale	0,347	Cina	Cha sio bak	0,316
Batak Simalungun	Manuk binatur	0,571		Mie pansit	0,307
Pakpak	Pelleng Pakpak	0,660		Mie tiaw	0,052
Dairi	Pelleng Dairi	0,117	Aceh	Gulai itik	0,685
Nias	Babi kuah	0,794		Gulai ikan ke'eng	0,255
Melayu	Gulai asam manis	0,055	India	Fish curry	0,324
	Soto daging	0,136		Matton curry	0,337
Jawa	Semur ayam	0,255			
	Pecel lele	0,410			
	Bakso	0,389			
	Ayam penyet	0,328			

Dari hasil studi ini diketahui bahwa metode analisis spektrofotometri hasil pengembangan memiliki sensitifitas tinggi, yaitu dapat menentukan kolesterol di dalam sampel pada konsentrasi sangat rendah 0,01 mM kolesterol, sehingga dapat diaplikasikan untuk penentuan kolesterol pada sampel makanan dan minuman yang mengandung kadar kolesterol rendah. Akan tetapi, kecepatan analisis menggunakan metode spektrofotometri hasil pengembangan masih tergolong lambat karena membutuhkan perlakuan yang sangat lama dan prosedur yang kompleks sehingga analisis sulit

dilakukan oleh tenaga analis yang kurang berpengalaman.

Kesimpulan dan Saran

Metode analisis spektrofotometri UV-Vus menggunakan pengabsorpsi *o*-dianisidin telah berhasil dikembangkan dengan cara mengintegrasikan enzim COx dan POx sebagai katalis dalam penentuan kolesterol. Metode analisis memberikan respon sensitif dan selektif terhadap kolesterol, linearitas pengukuran berada pada skala konsentrasi 0,01–5,0 mM kolesterol, dan batas deteksi 0,01 mM kolesterol. Metode analisis telah diaplikasikan untuk penentuan kolesterol di

dalam berbagai jenis makanan tradisional di Sumatera Utara. Kadar kolesterol yang terdapat di dalam makanan tradisional berada pada 0,052-0,799 mM kolesterol. Metode spektrofotometri hasil pengembangan masih masih tergolong lambat karena membutuhkan perlakuan yang sangat lama dan prosedur yang kompleks, sehingga perlu pengembangan lebih lanjut untuk meningkatkan kesederhanaan analisis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional yang memberikan dana penelitian, sesuai dengan Surat Perjanjian Hibah Penugasan Penelitian Strategis Nasional Nomor: 423/SP2H/PL/Dit.Litabnas/IV/2011, Tanggal 4 April 2011.

DAFTAR PUSTAKA

- Amundson, D.M. dan Zhou, M.J., (1999), Fluorometric method for the enzymatic determination of cholesterol, *Journal of Biochemical Biophysical Method* **38**: 43-52.
- Assmann, G., Cullen, P., Jossa, F., Lewis, B. dan Mancini, M., (1999), Coronary heart disease: Reducing the risk - The scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease a worldwide view, *Arteriosclerosis Trombosis and Vascular Biology* **19**: 1819-1824.
- Assmann, G., Cullen, P., Jossa, F., Lewis, B. dan Mancini, M., (1999), Coronary heart disease: Reducing the risk - The scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease a worldwide view, *Arteriosclerosis Trombosis and Vascular Biology* **19**: 1819-1824
- Botsoglou, N., Fletouris, D., Psomas, I., dan Mantis, A., (1998), Rapid gas chromatographic method for simultaneous determination of cholesterol and alpha-tocopherol in eggs, *Journal of AOAC International* **81**: 1177-1183.
- Brahim, S., Narinesingh, D. dan Guiseppi-Elie, A., (2001), Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole-hydrogel membrane, *Analytica Chimica Acta* **448(1-2)**: 27-36.
- Emara, S., Hussien, S.A. dan Mohamed, F.A., (1999), Determination of cholesterol in egg yolk by high performance liquid chromatography using an automated precolumn-switching procedure, *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies* **22**: 1235-1246.
- Gaziano, J.M., Sesso, H.D., Breslow, J.L., Hennekens, C.H. dan Buring, J.E., (1999), Relation between systemic hypertension and blood lipids on the risk of myocardial infarction, *American Journal of Cardiology* **84**: 768-773.
- Martin, S.P., Lamb, D.J., Lynch, J.M. dan Reddy, S.M., (2003), Enzyme-based determination of cholesterol using the quartz crystal acoustic wave sensor, *Analytica Chimica Acta* **487(1)**: 91-100.
- Park, Y.W., (1999), Cholesterol contents of US and imported goat milk cheeses as quantified by different colorimetric methods, *Small Ruminant Research* **32**: 77-82
- Singh, S., Chaubey, A. dan Malhotra, B.D., (2004), Amperometric cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on conducting polypyrrole films, *Analytica Chimica Acta* **502(2)**: 229-234.
- Situmorang, M. dan Nurwahyuni, I., (2001), Immobilisasi enzim dalam reaktor untuk penentuan kolesterol serum, *Majalah Kedokteran Nusantara* **34**: 84-89
- Situmorang, M., (2010), Pengembangan Biosensor Untuk Menguji Kualitas Makanan Dan Minuman, *Seminar Nasional dan Rapat Tahunan (SEMIRATA 2010), di Pekanbaru*
- Situmorang, M., Sinaga, B.J., Situmorang, I.F., dan Marpaung, F.M.T., (2009), Rancang Bangun Strip Biosensor Untuk Penentuan

- Asam Urat Dalam Daging Dan Ikan Kaleng, *Jurnal Sain Indonesia* **33(1)**: 1-7.
- Situmorang, M., Siregar, T.H., Simatupang, R., dan Krisnawati, H., (2008), Spektrofotometri Penentuan Asam Urat Dalam Daging Dan Makanan Kaleng Menggunakan Pengabsorpsi O-Dianisidin, *Jurnal Sain Indonesia* **32(2)**: 109-115
- Situmorang, M., Alexander, P.W. dan Hibbert, D.B., (1998), Flow Injection Potentiometry for Enzymatic Assay of Cholesterol With a Tungsten Electrode Sensor, *Talanta* **49(3)**: 639-649
- Situmorang, M., Silitonga, P.M., Nurwahyuni, I., (2011), *Pengembangan Biosensor Sebagai Instrumen Analisis Untuk Menguji Kualitas Makanan Dan Minuman*, Laporan Penelitian, FMIPA Universitas Negeri Medan.
- Situmorang, M., Silitonga, P.M., Nurwahyuni, I., Butar-butur, A. dan Nainggolan, M., (2007), Rancang Bangun Biosensor Elektrokimia Dalam Sistem Flow Injeksi Analisis Untuk Penentuan Kolesterol di Dalam Makanan dan Minuman, *Jurnal Sain Indonesia* **30(4)**: 125-130.
- Situmorang, M., Simanjuntak, E.P., dan Silaen, D., (2010), Pengembangan Metode Analisis Spektrofotometri Melalui Reaksi Enzimasi Untuk Penentuan Glukosa Di Dalam Buah-Buahan, *Jurnal Sain Indonesia* **34(3)**: 8-14.
- Sniderman, A.D. dan Cianflone, K., (1999), Lipids and vascular disease: what we do and do not know, *Clinica Chimica Acta* **286**: 7-22.