



**FRAKSINASI URIKASE HATI KAMBING MENGGUNAKAN  
AMMONIUM SULFAT DENGAN VARIASI WAKTU  
PENGENDAPAN**

**SKRIPSI**

Oleh

**Muhamad Kiki Afindia Joenata**

**NIM 161810301035**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2020**



**FRAKSINASI URIKASE HATI KAMBING MENGGUNAKAN  
AMMONIUM SULFAT DENGAN VARIASI WAKTU  
PENGENDAPAN**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Kimia (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

**Muhamad Kiki Afindia Joenata**

**NIM 161810301035**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2020**

## PERSEMBAHAN

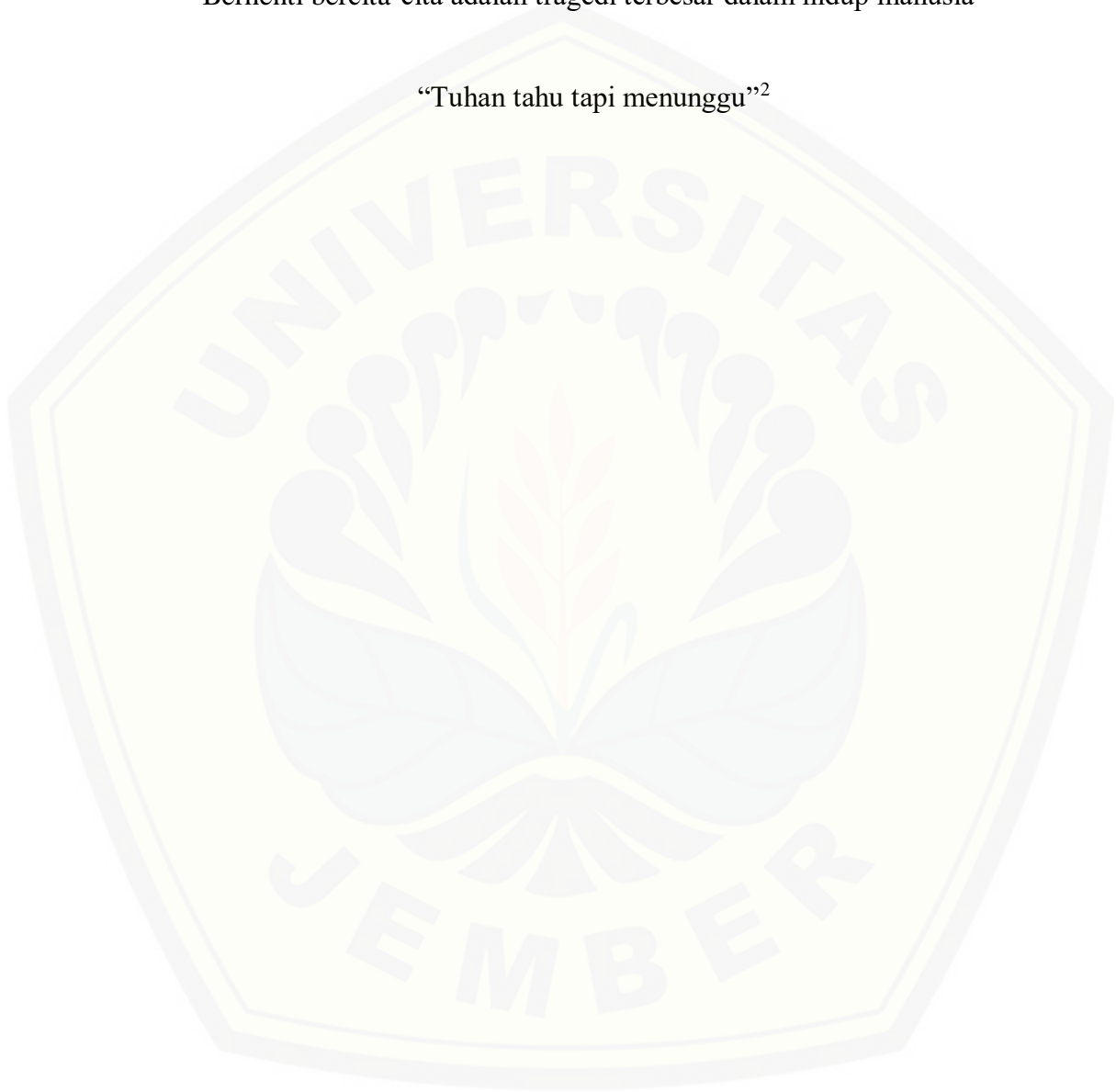
Skripsi ini saya persembahkan kepada:

1. Ayahanda Sudarno dan Ibunda Masriah tercinta;
2. Kakak dan adik yang senantiasa mendukung dan memberikan semangat;
3. Nicola Pero yang telah banyak membantu selama menempuh jenjang pendidikan;
4. Bapak dan Ibu guru/dosen yang telah memberikan ilmu selama menempuh semua jenjang pendidikan;
5. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

**MOTTO**

“Berhenti bercita-cita adalah tragedi terbesar dalam hidup manusia”<sup>1</sup>

“Tuhan tahu tapi menunggu”<sup>2</sup>



---

<sup>1</sup> Hirata, Andrea 1. 2008. *Sang Pemimpi*. Yogyakarta: Bentang

<sup>2</sup> Hirata, Andrea 2. 2008. *Edensor*. Yogyakarta: Bentang

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Muhamad Kiki Afindia Joenata

NIM : 161810301035

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Fraksinasi Urikase Hati Kambing Menggunakan Ammonium Sulfat dengan Variasi Waktu Pengendapan” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang telah disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan atau paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 27 Juli 2020

Yang menyatakan,



Muhamad Kiki Afindia Joenata

NIM 161810301035

**SKRIPSI**

**FRAKSINASI URIKASE HATI KAMBING MENGGUNAKAN  
AMMONIUM SULFAT DENGAN VARIASI WAKTU  
PENGENDAPAN**

Oleh

Muhamad Kiki Afindia Joenata

NIM 161810301035

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drh. Wuryanti Handayani, M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Esti Utarti, S.P., M.Si.

**PENGESAHAN**

Skripsi yang berjudul “Fraksinasi Urikase Hati Kambing Menggunakan Ammonium Sulfat dengan Variasi Waktu Pengendapan” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Universitas  
Jember

Tim penguji,

Ketua,

Anggota I,

drh. Wuryanti Handayani, M.Si.  
NIP 196008221985032002

Dr. Esti Utarti, S.P., M.Si.  
NIP 197003031999032001

Anggota II,

Anggota III,

I Nyoman Adi Winata, S.Si., M.Si.  
NIP 197105011998021002

Ika Oktavianawati, S.Si., M.Sc.  
NIP 198010012003122001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Jember

Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D.  
NIP 195910091986021001

## RINGKASAN

**Fraksinasi Urikase Hati Kambing Menggunakan Ammonium Sulfat dengan Variasi Waktu Pengendapan:** Muhamad Kiki Afindia Joenata; 161810301035; 2020: 59 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Asam urat merupakan produk akhir dari proses metabolisme purin yang tidak dapat didegradasi lebih lanjut oleh tubuh manusia karena tidak adanya aktivitas enzim urikolitik. Hal ini mengakibatkan tubuh manusia cenderung mengalami penumpukan asam urat yang mengakibatkan hiperurisemia. Permasalahan hiperurisemia dapat diatasi dengan terapi urikolitik dengan menggunakan urikase yang berasal dari sumber lain sebagai agen urikolitik. Penelitian ini menggunakan sampel hati kambing sebagai sumber urikase yang diawali dengan proses ekstraksi. Ekstrak kasar urikase yang diperoleh kemudian dilakukan fraksinasi menggunakan ammonium sulfat 0-20% dan 20-40% dengan variasi waktu pengendapan 12, 16, 20, dan 24 jam guna memperoleh nilai aktivitas enzim yang optimum.

Ekstrak kasar urikase memiliki nilai aktivitas spesifik terbesar pada proses ekstraksi pertama yaitu sebesar 0,00106 U/mg. Nilai total protein yang diperoleh dari proses fraksinasi baik menggunakan ammonium sulfat 0-20% maupun 20-40% menunjukkan kecenderungan yang sama pada lama waktu pengendapan yang diterapkan dimana semakin lama waktu pengendapan menghasilkan nilai total protein yang semakin tinggi. Nilai aktivitas spesifik dari kedua proses fraksinasi menunjukkan nilai optimum pada variasi waktu pengendapan 16 jam yakni 0,02014 U/mg dan 0,00183 U/mg

Efektivitas fraksinasi pada penelitian ini dapat dilihat berdasarkan nilai yield dan faktor purifikasi. Proses fraksinasi menggunakan ammonium sulfat 0-20% efektif pada variasi waktu pengendapan 16 jam dengan persen yield sebesar 284,3% dan kemurnian 18,9 kali dari ekstrak kasar enzim, sedangkan untuk proses



fraksinasi menggunakan ammonium sulfat 20-40% juga efektif pada variasi waktu pengendapan 16 jam dengan persen yield sebesar 104,0% dan kemurnian 1,7 kali ekstrak kasar enzim. Hasil ini mengindikasikan bahwa proses fraksinasi urikase hati kambing menggunakan ammonium sulfat efektif pada proses fraksinasi 0-20% dengan lama waktu pengendapan 16 jam.

Nilai total protein yang diperoleh pada proses fraksinasi menggunakan ammonium sulfat 0-20% lebih rendah dibandingkan dengan nilai total protein pada proses fraksinasi menggunakan ammonium sulfat 20-40%, sebaliknya nilai aktivitas total dan aktivitas spesifik urikase pada proses fraksinasi menggunakan ammonium sulfat 0-20% lebih tinggi dibandingkan dengan nilai total protein pada proses fraksinasi menggunakan ammonium sulfat 20-40%. Nilai aktivitas spesifik urikase optimum yang diperoleh pada penelitian ini sebesar 0,02014 U/mg.

## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Fraksinasi Urikase Hati Kambing Menggunakan Ammonium Sulfat dengan Variasi Waktu Pengendapan”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Dr. Bambang Piluharto, S.Si., M.Si. selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
3. drh. Wuryanti Handayani, M.Si. selaku dosen pembimbing utama sekaligus dosen pembimbing akademik dan Dr. Esti Utarti, S.P., M.Si. selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, tenaga, serta pikiran dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi ini;
4. I Nyoman Adi Winata, S.Si., M.Si. selaku dosen penguji utama dan Ika Oktavianawati, S.Si., M.Si. selaku dosen penguji anggota yang telah meluangkan waktunya untuk meberikan kritik dan saran untuk perbaikan demi kesempurnaan skripsi ini;
5. Prof. Tri Agus Siswoyo, S.P., M.Agr., Ph.D selaku Ketua Laboratorium *Nutraceutical and Pharmaceutical* yang telah membimbing dan ikut serta dalam membantu melancarkan penelitian untuk skripsi ini;
6. Bapak/Ibu dosen Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang telah mengajar dan memberikan ilmu pengetahuan;
7. Teman-teman kimia angkatan 2016 (Extasy) yang telah memberikan semangat, bantuan, saran, dan kenangan;

8. Tim riset kimia fisik, analitik, organik, anorganik, dan biokimia yang telah menjadi tempat untuk berbagi kisah suka duka saat penelitian;
9. Siti Adlha H. N., Achmad Fudhali, Nur Rizkiyatuz S., dan Riki Juni K., yang telah menjadi teman seperjuangan sebagai tim riset urikase;
10. Yeni Kartikasari, Bella Amelia, dan teman-teman di Laboratorium N&P CDAST yang telah menjadi teman saat kerja laboratorium;
11. Ersya Yanu R. dan Trilaksono yang telah menjadi teman untuk belajar bersama saat masa kuliah;
12. Hanang Prayogi dan Aji Siswantoro yang telah menjadi teman di kosan selama masa kuliah;
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala bentuk kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 27 Juli 2020

Penulis

**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBING</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	4
<b>1.3 Tujuan</b> .....	4
<b>1.4 Manfaat</b> .....	4
<b>1.5 Batasan Masalah</b> .....	5
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
<b>2.1 Kambing</b> .....	6
<b>2.2 Hati</b> .....	7
<b>2.3 Asam Urat</b> .....	9

2.4	Enzim.....	11
2.5	Urikase.....	14
2.6	Fraksinasi .....	18
2.7	Uji Enzim ( <i>Enzim Assay</i> ).....	20
<b>BAB 3.</b>	<b>METODE PENELITIAN.....</b>	<b>23</b>
3.1	Waktu dan Tempat Penelitian .....	23
3.2	Alat dan Bahan.....	23
3.2.1	Alat .....	23
3.2.2	Bahan .....	23
3.3	Rancangan Penelitian.....	24
3.4	Prosedur Kerja.....	25
3.4.1	Preparasi Sampel .....	25
3.4.2	Ekstraksi Urikase.....	25
3.4.3	Fraksinasi Urikase dengan Amonium Sulfat .....	25
3.4.4	Penentuan Kadar Protein Urikase.....	26
3.4.5	Penentuan Aktivitas Urikase .....	27
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>29</b>
4.1	Aktivitas Urikase Ekstrak Kasar.....	29
4.2	Waktu Optimum untuk Fraksinasi 0-20% .....	30
4.3	Waktu Optimum untuk Fraksinasi 20-40% .....	32
4.4	Efektivitas Fraksinasi.....	34
<b>BAB 5.</b>	<b>PENUTUP .....</b>	<b>39</b>
5.1	Kesimpulan.....	39
5.2	Saran.....	39
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>40</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>		<b>44</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Data populasi ternak kecil (000 ekor) .....	6
2.2 Data pemotongan ternak tahun 2014-2018 (000 Ekor) .....	7
4.1 Hasil uji protein dan uji aktivitas total urikase ekstrak kasar hati kambing dari Supernatan 1 dan Supernatan 2 .....	30
4.2 Nilai aktivitas total, total protein, dan aktivitas spesifik urikase ekstrak kasar hati kambing fraksi 0-20% .....	30
4.3 Nilai aktivitas total, total protein, dan aktivitas spesifik urikase ekstrak kasar hati kambing fraksi 20-40% .....	33
4.4 Efektivitas fraksinasi urikase ekstrak kasar hati kambing .....	34

**DAFTAR GAMBAR**

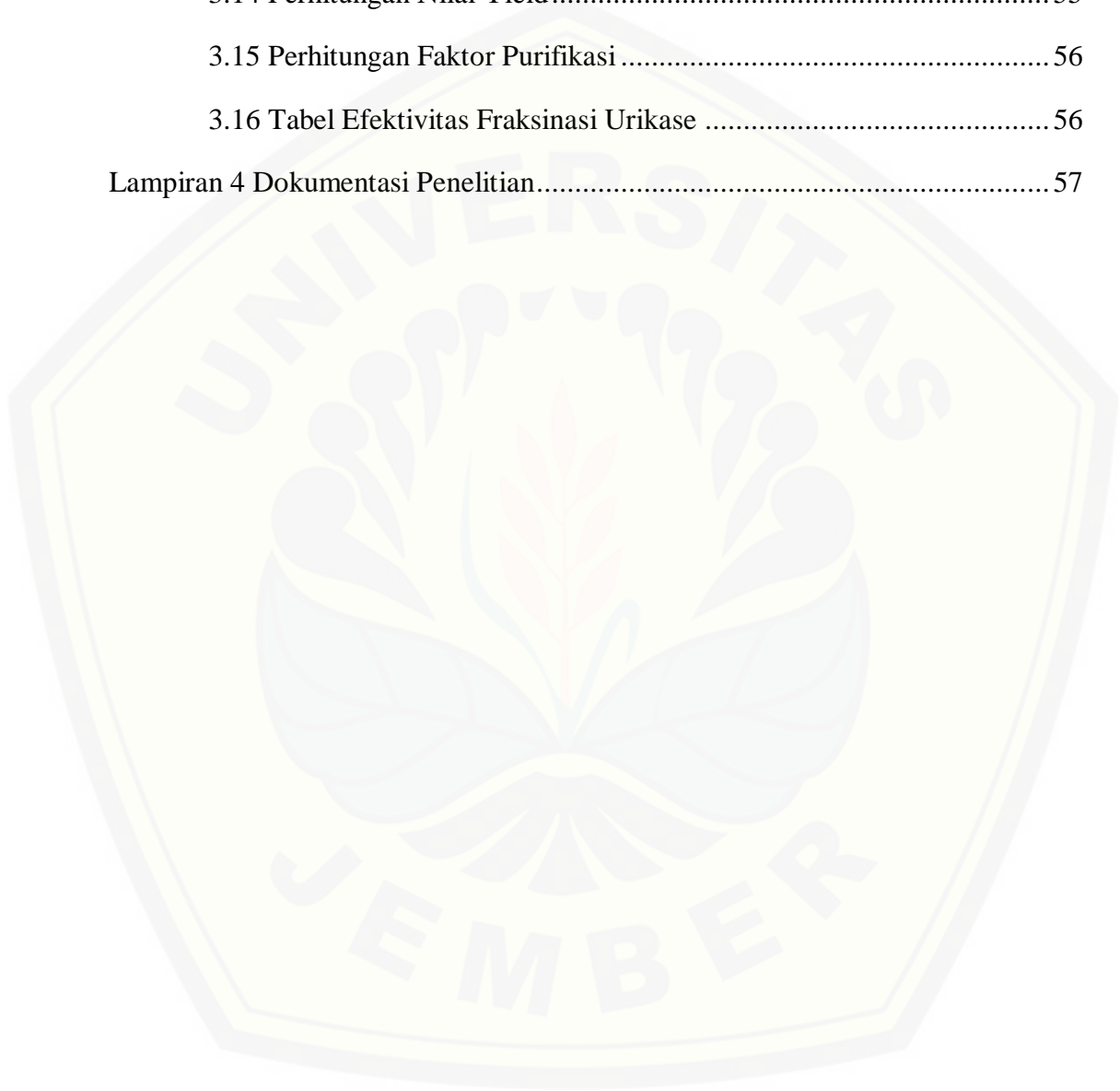
	Halaman
2.1 Katabolisme gugus amino dalam hati .....	8
2.2 Rumus struktur asam urat .....	9
2.3 Degradasi enzimatik purin pada manusia .....	10
2.4 Diagram koordinat reaksi .....	12
2.5 Perbandingan diagram koordinat reaksi dengan dan tanpa katalis .....	13
2.6 Jalur degradasi purin pada hewan .....	14
2.7 Struktur 3D urikase .....	15
2.8 Interaksi sisi aktif urikase dengan substrat asam urat .....	16
2.9 Oksidasi asam urat oleh urikase menjadi senyawa metastabil yang terurai menjadi allantoin .....	17
2.10 Jalur degradasi asam urat menjadi allantoin oleh urikase pada sebagian besar mamalia dan organisme lain .....	17
2.11 Kelarutan protein dalam larutan garam (a) dan kelarutan protein dalam berbagai jenis larutan garam (b) .....	19
2.12 Reaksi pembentukan senyawa kuinonimin .....	22
4.1 Grafik perbandingan total protein ekstrak kasar hati kambing fraksi 0-20% dan 20-40% .....	35
4.2 Grafik perbandingan aktivitas total urikase ekstrak kasar hati kambing fraksi 0-20% dan 20-40% .....	36
4.3 Grafik perbandingan aktivitas spesifik urikase ekastrak kasar hati kambing fraksi 0-20% dan 20-40% .....	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Preparasi Larutan .....	44
1.1 Pembuatan larutan standar hidrogen peroksida .....	44
1.2 Pembuatan reagen Bradford .....	44
1.3 Pembuatan buffer kalium fosfat 0,1 M pH 7 .....	44
1.4 Pembuatan buffer natrium borat 0,1 M pH 8.5.....	45
1.5 Pembuatan larutan standar Bovin Serum Albumin (BSA).....	45
1.6 Pembuatan larutan 4-aminoantipirin 30 mM.....	45
1.7 Pembuatan larutan fenol 1,5% .....	45
1.8 Pembuatan larutan asam urat 2 mM.....	45
1.9 Pembuatan larutan enzim peroksidase 15 U/mL .....	46
Lampiran 2 Tabel Persen Kejenuhan Ammonium Sulfat .....	47
Lampiran 3 Data dan Perhitungan .....	48
3.1 Tabel Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Bovine Serum Albumin (BSA) .....	48
3.2 Kurva Standar Bovine Serum Albumin (BSA) .....	48
3.3 Kurva Pemindaian Panjang Gelombang Maksimum H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	49
3.4 Tabel Pengukuran Absorbansi Larutan Standar H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	49
3.5 Kurva Standar H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	50
3.6 Tabel Massa Pelet yang Diperoleh .....	50
3.7 Perhitungan Konsentrasi H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	50
3.8 Perhitungan Aktivitas Total Urikase .....	51
3.9 Tabel Aktivitas Total Urikase.....	53
3.10 Perhitungan Total Protein.....	54



3.11 Tabel Total Protein.....	54
3.12 Perhitungan Aktivitas Spesifik Urikase .....	55
3.13 Tabel Aktivitas Spesifik Urikase .....	55
3.14 Perhitungan Nilai Yield.....	55
3.15 Perhitungan Faktor Purifikasi .....	56
3.16 Tabel Efektivitas Fraksinasi Urikase .....	56
Lampiran 4 Dokumentasi Penelitian.....	57



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Asam urat merupakan produk akhir proses metabolisme purin endogen maupun eksogen. Purin eksogen sangat bervariasi berdasarkan bahan makanan yang dikonsumsi dimana sebagian besar purin eksogen berasal dari protein hewan. Produksi asam urat dari purin melibatkan serangkaian reaksi enzimatik yang terjadi pada hati, usus, dan jaringan lain seperti, otot, ginjal, dan pembuluh darah endotel. Proses degradasi purin menjadi asam urat dapat terjadi pada semua golongan vertebrata termasuk manusia (Chaudhary et al., 2013; Hayashi et al., 2000).

Asam urat dapat didegradasi lebih lanjut menjadi allantoin oleh golongan vertebrata tertentu yang memiliki agen pendegradasi asam urat atau bersifat urikolitik. Tubuh manusia tidak memiliki aktivitas agen urikolitik pada metabolisme purin sehingga asam urat akan tetap menumpuk dan tidak terdegradasi (Hayashi et al., 2000). Hal ini menyebabkan konsentrasi asam urat dalam plasma dan jaringan manusia 5-10 kali lebih tinggi dibandingkan dengan golongan vertebrata yang dapat mendegradasi asam urat (Nuki, 2012). Akibatnya, manusia cenderung mengalami hiperurisemia karena kadar asam urat dalam plasma di atas kelarutannya, sehingga terjadi pengendapan asam urat membentuk kristal yang menyebabkan gout, *Tumor Lysis Syndrome* (TLS), dan berbagai gejala kardiovaskuler lainnya (Yang et al., 2012).

Penderita hiperurisemia rata-rata dialami oleh kaum pria dengan usia di atas 34 tahun, seperti di Amerika dengan prevalensi hiperurisemia sebesar 5,9% (6, 1 juta) pada pria dan 2,0% (2 juta) pada wanita. Hiperurisemia di Amerika mempengaruhi 3,9% (8,3 juta) populasi orang dewasa. Prevalensi hiperurisemia di Indonesia diperkirakan sebesar 1,6-13,6/100.000 orang. Prevalensi ini dapat terus meningkat dengan peningkatan umur. Kejadian hiperurisemia di Indonesia terjadi pada usia di bawah 34 tahun sebesar 32%. Prevalensi hiperurisemia di Indonesia berada pada urutan kedua setelah osteoarthritis (Thayibah et al., 2018).

Urut oksidase (Urikase) merupakan salah satu agen urikolitik. Urikase adalah enzim yang mengkatalisis oksidasi asam urat pada proses metabolisme purin menjadi 5-hidroksiisourat dan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Proses hidrolisis dan dekarboksilasi selanjutnya menghasilkan pembentukan allantoin sebagai produk akhir untuk sebagian besar organisme prokariotik dan eukariotik (Gambar 2.9) (Kahn et al., 1997). Aktivitas urikase ini mendorong penggunaannya sebagai enzim pendegradasi asam urat eksogen untuk diaplikasikan pada tubuh manusia. Pengembangan terapi urikolitik dengan urikase untuk penderita gout dan hiperurisemia telah lama diteliti (Nuki, 2012). Pengurangan sementara serum asam urat pada pasien penderita gout telah berhasil didemonstrasikan menggunakan sejumlah kecil urikase hasil purifikasi hati babi (London dan Hudson, 1957).

Urikase ditemukan dalam beberapa sumber seperti bakteri dan fungi (Atalla et al., 2009). Urikase juga dapat diperoleh dari organ hewan (Hayashi et al., 2000). Urikase terdapat di dalam hati pada sebagian besar vertebrata sebagai inti kristal dari peroksisom hati (Rajoka et al., 2006). Penelitian-penelitian sebelumnya telah berhasil mengisolasi urikase dari hati unta, hati babi dan hati beberapa jenis ikan yang meliputi ikan *rainbow trout*, makerel, *trout* danau, lele, hiu, tilapia (Kinsella et al., 1985; London dan Hudson, 1957; Osman et al., 1989).

Hati merupakan tempat metabolisme bagi sebagian besar asam amino. Asam amino di dalam hati akan dikonversi menjadi ion ammonium dimana sebagian akan didaur ulang dan digunakan kembali dalam berbagai jalur biosintesis, sedangkan sebagian lainnya akan dieksresikan ke luar tubuh karena bersifat racun. Proses ekskresi ion ammonium dapat berjalan secara langsung atau diubah terlebih dahulu menjadi urea atau asam urat (Nelson dan Cox, 2013).

Golongan mamalia selain primata dapat memecah asam urat menghasilkan produk berupa allantoin karena memiliki aktivitas urikase pada hatinya (Hayashi et al., 2000). Mamalia yang sering dijumpai di masyarakat salah satunya adalah kambing. Kambing termasuk dalam keluarga Bovidae sama seperti sapi (Lundrigan, 1996). Rajoka et al. (2006) menyatakan bahwa sapi memiliki kemampuan menghasilkan urikase untuk memecah asam urat. Hal ini mengindikasikan bahwa kambing yang satu keluarga dengan sapi juga memiliki

kemampuan menghasilkan urikase. Urikase pada kambing terdapat pada bagian hati sebagaimana pendapat Hayashi et al. (2000).

Proses isolasi urikase melibatkan beberapa tahapan yang meliputi produksi ekstrak kasar enzim, proses pengendapan/fraksinasi, proses pengkonsentrasian, dan proses purifikasi (Al-Atraqchi dan Al-Mosawi, 2012). Proses pengendapan/fraksinasi dalam isolasi enzim bertujuan untuk meningkatkan kadar enzim (protein) dalam fraksi campuran kompleks. Proses fraksinasi enzim dapat dilakukan dengan menggunakan ammonium sulfat karena memiliki beberapa sifat yang menguntungkan sebagai agen pengendap, yaitu memiliki kekuatan ionik yang relatif tinggi, tidak menyebabkan kerusakan enzim (protein), kelarutan dalam air yang cukup tinggi, relatif murah, tidak berbahaya, serta tidak menyebabkan efek penstabilan terhadap enzim (Suprihana, 2013).

Proses fraksinasi enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor yang meliputi konsentrasi dari agen pengendap (ammonium sulfat) dan lama waktu pengendapan (*aging time*) setelah penambahan agen pengendap (Mariño et al., 2015). Penelitian Al-Atraqchi dan Al-Mosawi (2012) mengenai purifikasi dan karakterisasi urikase asal *Pseudomonas aeruginosa* 7 memperoleh aktivitas enzim optimum pada konsentrasi ammonium sulfat 70% dengan waktu pengendapan selama satu malam. Penelitian Abdullah dan Flayyih (2015) mengenai produksi, purifikasi, dan karakterisasi urikase dari *P. aeruginosa* memperoleh aktivitas enzim optimum pada konsentrasi ammonium sulfat 80% menggunakan waktu pengendapan satu malam. Jagathy et al. (2016) dalam penelitiannya mengenai produksi urikase *Bacillus subtilis* dari limbah peternakan ayam memperoleh aktivitas enzim optimum pada konsentrasi ammonium sulfat 60% dengan lama waktu pengendapan satu malam. Konsentrasi agen pengendap berupa ammonium sulfat dapat berpengaruh terhadap proses penurunan kelarutan protein enzim sehingga dapat mengalami pengendapan atau biasa dikenal dengan istilah *salting-out* (Duong-Ly dan Gabelli, 2014). Lama waktu pengendapan setelah penambahan agen pengendap juga merupakan faktor penting untuk efisiensi dan efektifitas waktu dalam proses isolasi urikase. Pemberian waktu pengendapan yang lama

berfungsi untuk memberikan cukup waktu agar semua protein enzim dapat terendapkan secara optimum (Burgess, 2009).

### 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang diperoleh berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan yaitu:

1. Berapa lama waktu pengendapan (*aging time*) optimum untuk proses fraksinasi urikase dari hati kambing menggunakan ammonium sulfat 0-20% dan 20-40% terhadap aktivitas spesifik enzim?
2. Bagaimana efektivitas fraksinasi urikase dari hati kambing menggunakan ammonium sulfat 0-20% dan 20-40% terhadap aktivitas spesifik enzim?

### 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini berdasarkan rumusan masalah yang diangkat yaitu:

1. Mendapatkan lama waktu pengendapan (*aging time*) optimum untuk proses fraksinasi urikase dari hati kambing menggunakan ammonium sulfat 0-20% dan 20-40% terhadap aktivitas enzim.
2. Mengetahui efektivitas fraksinasi urikase dari hati kambing menggunakan ammonium sulfat 0-20% dan 20-40% terhadap aktivitas spesifik enzim.

### 1.4 Manfaat

Manfaat yang dapat diperoleh dari hasil penelitian ini ialah sebagai sumber informasi baru mengenai waktu pengendapan (*aging time*) yang optimum untuk proses fraksinasi ammonium sulfat pada produksi urikase dari hati kambing. Manfaat jangka panjang adalah untuk penunjang penelitian lebih lanjut mengenai urikase hati kambing guna diaplikasikan dalam terapi urikolitik untuk pencegahan penumpukan asam urat dalam tubuh manusia.

### 1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

1. Hati kambing yang digunakan berasal dari kambing jenis kacang (*Capra aegagrus hircus*) yang didapatkan dari tempat penyembelihan kambing di Jalan Hos Cokroaminoto IV Kelurahan Jember Kidul Kecamatan Kaliwates.
2. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer visibel.
3. Waktu pengendapan (*aging time*) optimum adalah waktu pengendapan untuk mendapat aktivitas spesifik urikase terbesar.
4. Variasi waktu pengendapan yang digunakan meliputi 12, 16, 20, dan 24 jam.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kambing

Kambing adalah hewan berkuku yang tergabung dalam ordo Artiodactyla (hewan berkuku terbelah), subordo Ruminantia (ruminansia atau hewan pemamah biak) dan famili Bovidae. Anggota kelompok Bovidae merupakan kelompok mamalia herbivora (Underwood et al., 2015). Taksonomi dari kambing berdasarkan data dari Integrated Taxonomic Information System (ITIS) (2019) adalah sebagai berikut.

Kingdom : Animalia  
 Subkingdom : Bilateria  
 Filum : Chordata  
 Subfilum : Vertebrata  
 Kelas : Mamalia  
 Ordo : Artiodactyla  
 Family : Bovidae  
 Genus : Capra  
 Spesies : *Capra hircus*  
 Subspesies : *Capra hircus aegragus*

Kambing menduduki posisi pertama sebagai ternak kecil dengan populasi terbanyak di Indonesia. Data populasi ternak kecil dari tahun 2014-2018 dapat dilihat pada Tabel 2.1. Kambing juga tercatat menduduki posisi ketiga pemotongan terbanyak pada rentang tahun 2014-2018. Data pemotongan ternak dari tahun 2014-2018 dapat dilihat pada Tabel 2.2. (Ditjen PKH, 2018).

Tabel 2.1 Data populasi ternak kecil (000 ekor)

Jenis Ternak	2014	2015	2016	2017	2018
Kambing	18.640	19.013	17.862	18.208	18.721
Domba	16.092	17.025	15.717	17.142	17.398
Babi	7.694	7.808	7.904	68.261	8.542

(Sumber: Ditjen PKH, 2018)

Tabel 2.2 Data pemotongan ternak tahun 2014-2018 (000 Ekor)

Tahun	Sapi Potong	Kerbau	Kambing	Domba	Babi	Kuda
2014	2.126	143	1.715	920	1.959	14
2015	2.175	143	1.919	990	2.033	13
2016	2.151	127	2.110	1.149	2.136	16
2017	1.956	119	1.897	976	1.948	18
2018	2.013	128	1.889	961	2.006	16

(Sumber: Ditjen PKH, 2018)

Jenis kambing yang ada di Indonesia salah satunya adalah kambing kacang. Kambing kacang memiliki bobot badan yang lebih kecil dibandingkan dengan jenis kambing lainnya. Kambing jenis ini memiliki ciri-ciri yang meliputi telinga kecil, bertanduk, berekor kecil yang berdiri tegak, dan profil wajah lurus serta bulu kambing jantan lebih panjang dari pada bulu kambing betina. Kambing kacang termasuk jenis kambing yang mudah beradaptasi dengan lingkungan serta memiliki keunggulan dengan tingkat reproduksinya (Abadi et al., 2015).

Kambing kacang termasuk dalam keluarga Bovidae sama seperti sapi (Lundrigan, 1996), dimana menurut Rajoka et al. (2006) sapi memiliki aktivitas urikase untuk memecah asam urat. Hal ini mengindikasikan bahwa kambing yang satu keluarga dengan sapi juga memiliki aktivitas urikase. Urikase pada kambing terdapat pada bagian hati sebagaimana pendapat Hayashi et al. (2000).

## 2.2 Hati

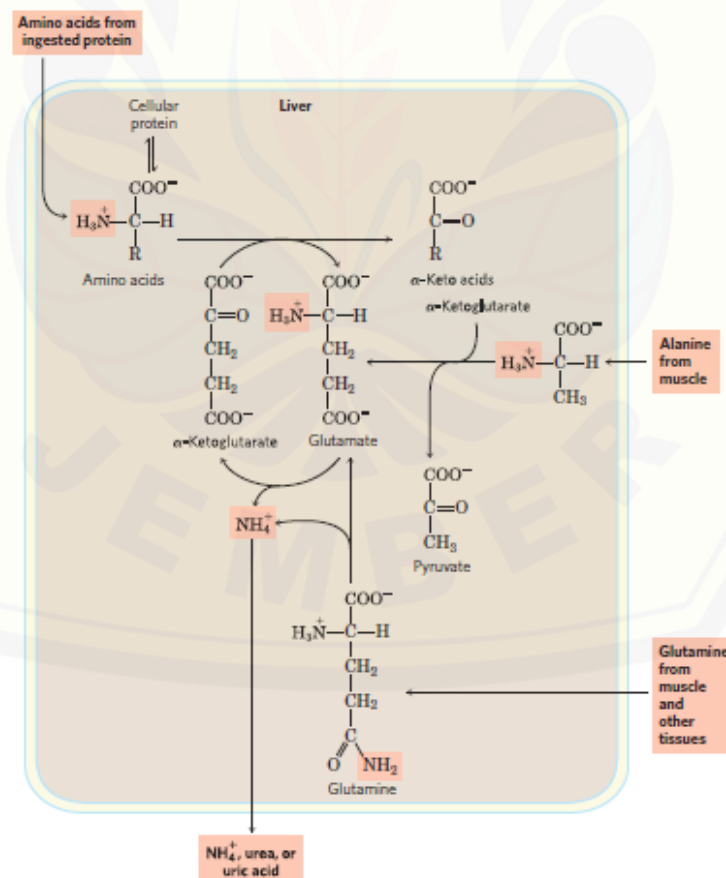
Hati merupakan organ padat dan kelenjar terbesar, serta merupakan salah satu organ paling vital yang memiliki fungsi sebagai pusat metabolisme nutrient dan ekskresi metabolit limbah. Fungsi utama hati adalah untuk mengontrol aliran dan keamanan suatu substansi yang diserap dari sistem pencernaan sebelum didistribusikan ke sistem sirkulasi sistemik. Kerusakan pada fungsi hati dapat menyebabkan kematian dalam beberapa menit. Hal ini menunjukkan betapa pentingnya fungsi hati (Ozougwu, 2017).

Hati memiliki ukuran yang bervariasi pada spesies yang berbeda. Berat hati pada golongan karnivora adalah 3-4% dari berat tubuhnya, pada golongan omnivora sebesar 2%, sedangkan pada golongan herbivora sekitar 1-1,5% dari berat tubuhnya



(Madhan dan Raju, 2014). Berat hati pada golongan vertebrata secara empiris berhubungan dengan berat tubuh. Rasio berat hati terhadap berat tubuh pada golongan vertebrata relatif konstan di antara orang dewasa dengan hati yang berfungsi penuh (Yoshizato et al., 2009).

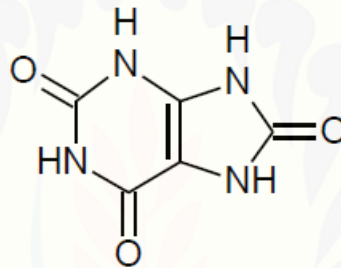
Hati merupakan tempat metabolisme bagi sebagian besar asam amino sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2.1. Asam amino di dalam hati akan dikonversi menjadi ion ammonium dimana sebagian akan didaur ulang dan digunakan kembali dalam berbagai jalur biosintesis, sedangkan sebagian lainnya akan dieksresikan karena bersifat sangat racun. Proses ekskresi ion ammonium dapat berjalan secara langsung atau diubah terlebih dahulu menjadi urea atau asam urat (Nelson dan Cox, 2013). Pada hati mamalia selain primata memiliki aktivitas urikase untuk proses pemecahan lebih lanjut dari asam urat menjadi allantoin (Hayashi et al., 2000).



Gambar 2.1 Katabolisme gugus amino dalam hati (Sumber: Nelson dan Cox, 2013)

### 2.3 Asam Urat

Asam urat atau 7,9-dihidro-1H-purin-2,6,8 (3H)-trione ( $C_5H_4N_4O_3$ ) merupakan senyawa organik heterosiklik dengan berat molekul sebesar 168 Da (Maiuolo et al., 2015). Asam urat memiliki rumus struktur sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2.2. Asam urat merupakan salah satu senyawa nitrogen yang penting dalam tubuh hewan dan tumbuhan. Senyawa ini mengandung 2,6,8-trihidropurin dalam bentuk tautomersisasi keto-enol yang dibawah kondisi fisiologis tertentu dapat dengan mudah dikonversi menjadi urat yang diinginkan (Hafez et al., 2017).

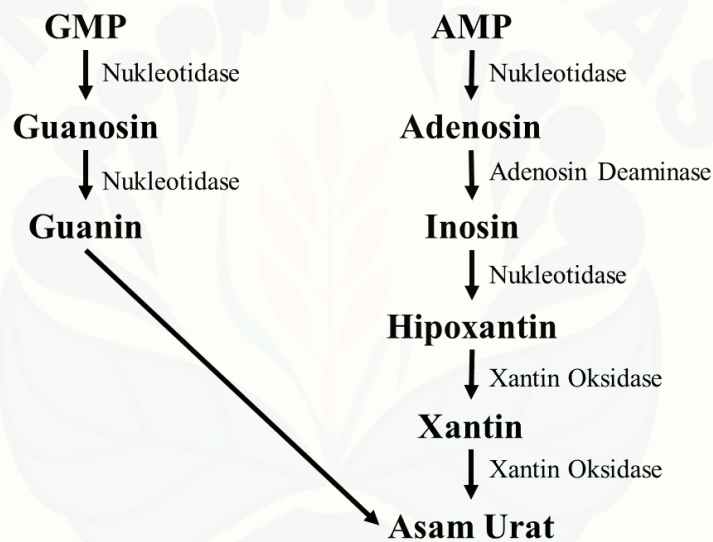


Gambar 2.2 Rumus struktur asam urat (Sumber: Nasrul dan Sofitri, 2012)

Asam urat merupakan produk akhir dari proses metabolisme purin eksogen maupun endogen. Sumber purin eksogen sangat bervariasi bergantung pada makanan yang dikonsumsi dimana didominasi oleh protein yang berasal dari hewan. Purin endogen yang memproduksi asam urat umumnya berasal dari hati, usus, dan jaringan lain seperti otot, ginjal, dan pembuluh darah endotel. Metabolisme dan produksi asam urat merupakan proses kompleks yang melibatkan berbagai faktor yang mengatur produksi senyawa ini pada hati, serta proses ekskresinya pada ginjal dan usus (Chaudhary et al., 2013).

Degradasi purin (adenin dan guanin) untuk membentuk asam urat melibatkan banyak enzim. Proses degradasi purin pada manusia dapat dilihat pada Gambar 2.3. Proses degradasi purin menjadi asam urat ini diawali dengan adenosin monofosfat (AMP) dikonversi menjadi inosin melalui dua mekanisme berbeda. Mekanisme pertama diawali dengan penghilangan satu gugus amino oleh

deaminase membentuk inosin monofosfat (IMP) dan diikuti dengan defosforilasi oleh nukleotidase membentuk inosin. Mekanisme kedua diawali dengan penghilangan satu gugus fosfat oleh nukleotidase untuk membentuk adenosin dan diikuti deaminasi untuk membentuk inosin. Guanin monofosfat (GMP) dikonversi di guanosin oleh nukleotidase. Nukleosida, inosin, dan guanosin dikonversi lebih lanjut menjadi basa purin hipoxantin dan guanin oleh purin nukleosida fosforilase (PNP). Hipoxantin kemudian dioksidasi membentuk xantin oleh xantin oksidase (XO), dan guanin dideaminasi membentuk xantin oleh guanin deaminase. Xantin yang terbentuk dioksidasi kembali oleh xantin oksidase untuk membentuk produk akhir yang berupa asam urat (Maiuolo et al., 2015).



Gambar 2.3 Degradasi enzimatik purin pada manusia (Sumber: Maiuolo et al., 2015)

Proses degradasi purin menjadi asam urat dapat terjadi pada semua golongan vertebrata termasuk manusia, tetapi untuk proses degradasi asam urat hanya dapat terjadi pada golongan vertebrata tertentu. Tubuh manusia tidak memiliki aktivitas agen pendegradasi asam urat (urikolitik) pada akhir proses degradasi purin sehingga asam urat akan tetap menumpuk dan tidak terdegradasi (Hayashi et al., 2000). Hal ini menyebabkan konsentrasi asam urat dalam plasma dan jaringan manusia 5-10 kali lebih tinggi dibandingkan dengan golongan vertebrata yang dapat mendegradasi asam urat (Nuki, 2012). Kadar asam urat

normal dalam darah berada diantara 3-7 mg/mL dimana dibutuhkan oleh tubuh manusia dan hewan sebagai antioksidan dan untuk mencegah kerusakan lapisan pembuluh darah (Hafez et al., 2017). Tingginya kadar asam urat ini mengakibatkan manusia cenderung mengalami hiperurisemia dimana kadar asam urat dalam plasma diatas kelarutannya sehingga terjadi pengendapan asam urat membentuk kristal yang menyebabkan gout, *Tumor Lysis Syndrome* (TLS), dan berbagai gejala kardiovaskuler lainnya (Yang et al., 2012).

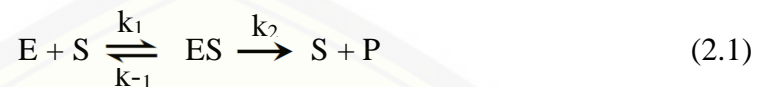
#### 2.4 Enzim

Enzim adalah molekul biologis kompleks yang berupa protein dimana memiliki perilaku sebagai katalis biologis. Enzim sebagai katalis mampu meningkatkan laju reaksi kimia tanpa ikut terkonsumsi di dalam reaksi. Enzim biasanya bersifat sangat spesifik dimana hanya mentargetkan satu spesi kimia dalam reaksi yang disebut sebagai substrat. Spesifisitas dari enzim ini mencakup stereospesifisitas atau spesifik terhadap susunan atom-atom substrat dalam ruang tiga dimensi (Moore dan Langley, 2008). Enzim memiliki berat molekul yang berkisar antara 12.000 sampai lebih dari 1 juta. Enzim merupakan protein sehingga aktivitas katalitiknya bergantung pada integritas konformasi protein asalnya. Enzim yang terdenaturasi atau terdisosiasi ke dalam sub unitnya biasanya akan kehilangan aktivitas katalitiknya, sehingga struktur primer, sekunder, tersier dan kuarterner dari enzim sangat penting bagi aktivitas katalitiknya (Nelson dan Cox, 2013).

Enzim memiliki banyak bentuk. Enzim beberapa diantaranya hanya terdiri dari protein, sedangkan beberapa lainnya memiliki bagian non-protein yang dikenal sebagai kofaktor. Kofaktor dapat berupa ion logam seperti magnesium ataupun zat organik. Enzim tanpa kofaktor disebut apoenzim, dan kombinasi antara apoenzim dengan kofaktor disebut holoenzim. Enzim dengan kofaktor yang berupa ion logam dikenal sebagai metaloenzim. Koenzim yang terikat erat pada apoenzim disebut dengan gugus prostetik (Moore dan Langley, 2008).

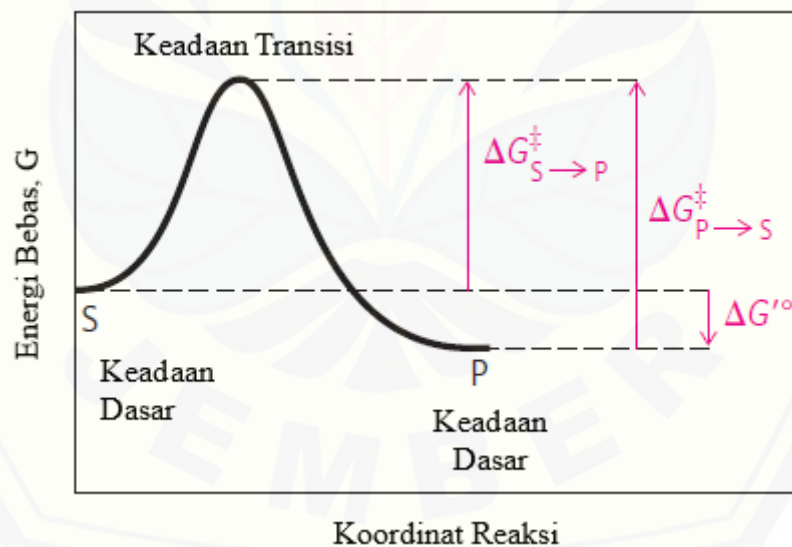
Bagian enzim yang disebut sebagai sisi aktif enzim merupakan bagian enzim yang bertanggung jawab untuk berinteraksi dengan molekul pereaksi atau substrat. Reaksi dapat terjadi ketika substrat berikatan dengan sisi aktif ini. Material

selain enzim dan substrat mungkin juga dibutuhkan untuk terjadinya reaksi. Reaksi enzimatik dimulai dengan pembentukan kompleks enzim-substrat. Substrat dalam proses ini akan berikatan dengan sisi aktif enzim dimana akan memfasilitasi reaksi dengan membuka jalur reaksi baru. Reaksi enzimatik secara sederhana dapat dituliskan sebagai persamaan 2.1. berikut.



Dimana E adalah enzim, S adalah substrat, ES adalah kompleks enzim-substrat, dan P adalah produk (Moore dan Langley, 2008).

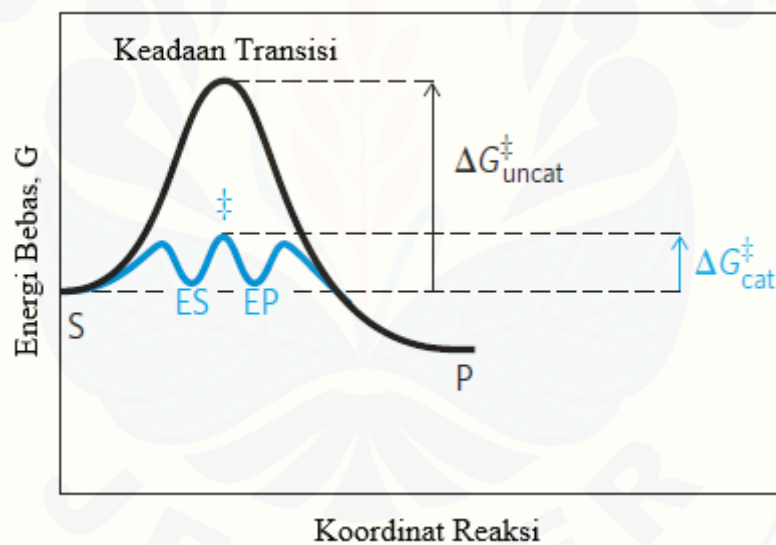
Enzim sebagai katalis berfungsi untuk meningkatkan laju reaksi dimana tidak mempengaruhi kesetimbangan reaksi. Reaksi kesetimbangan antara substrat dan produk sebagaimana persamaan reaksi  $S \rightleftharpoons P$  dapat dideskripsikan oleh diagram koordinat reaksi (Gambar 2.4) yang menggambarkan perubahan energi selama reaksi.



Gambar 2.4 Diagram koordinat reaksi (Sumber: Nelson dan Cox, 2013)

Energi dalam sistem biologis dideskripsikan sebagai energi bebas ( $G$ ). Energi bebas pada sistem dalam diagram koordinat diplotkan terhadap progres reaksi (koordinat reaksi). Titik mulai baik pada reaksi maju maupun reaksi balik disebut sebagai keadaan dasar (*ground state*) dimana merupakan kontribusi energi bebas sistem

oleh molekul rata-rata ( $S$  atau  $P$ ) pada kondisi yang diberikan. Kestimbangan antara  $S$  dan  $P$ . Reaksi konversi  $S$  menjadi  $P$  ataupun sebaliknya dapat berlangsung ketika masing-masing molekul dapat menyediakan energi sebesar “bukit” energi diantara keadaan dasar  $S$  dan  $P$ . Puncak dari bukit energi ini disebut sebagai keadaan transisi (*transition state*). Perbedaan tingkat energi antara keadaan dasar dengan keadaan transisi disebut sebagai energi aktivasi ( $\Delta G^\ddagger$ ). Laju dari suatu reaksi digambarkan oleh energi aktivasi dimana semakin tinggi energi aktivasi akan menghasilkan laju yang semakin lambat. Laju reaksi dapat ditingkatkan dengan peningkatan temperatur dan/atau tekanan yang menyebabkan peningkatan jumlah molekul dengan cukup energi untuk melewati bukit energi. Katalis sendiri juga dapat mempercepat laju reaksi melalui proses penurunan energi aktivasi reaksi seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.5 (Nelson dan Cox, 2013).



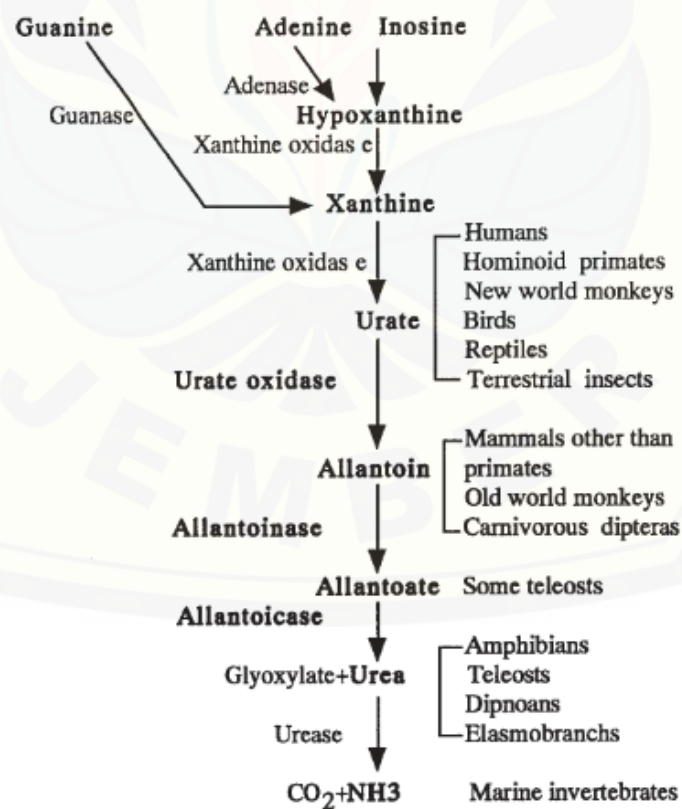
Gambar 2.5 Perbandingan diagram koordinat reaksi dengan dan tanpa katalis (Sumber: Nelson dan Cox, 2013)

Sel pada awalnya memproduksi enzim dalam bentuk inaktif yang disebut proenzim atau zymogen, dimana harus dilakukan aktivasi untuk menjalankan fungsinya. Proses aktivasi dari enzim inaktif berfungsi sebagai salah satu bentuk kontrol enzim. Inhibisi juga merupakan salah satu metode kontrol enzim. Dua jenis inhibisi enzim yang umum ialah inhibisi kompetitif dan inhibisi nonkompetitif. Inhibisi kompetitif terjadi ketika spesi lain berkompetisi dengan substrat untuk

berinteraksi dengan sisi aktif enzim. Inhibisi nonkompetitif terjadi ketika spesi lain terikat pada sisi selain sisi aktif enzim sehingga menyebabkan keseluruhan struktur enzim berubah dan enzim kehilangan fungsi sebagai katalis (Moore dan Langley, 2008).

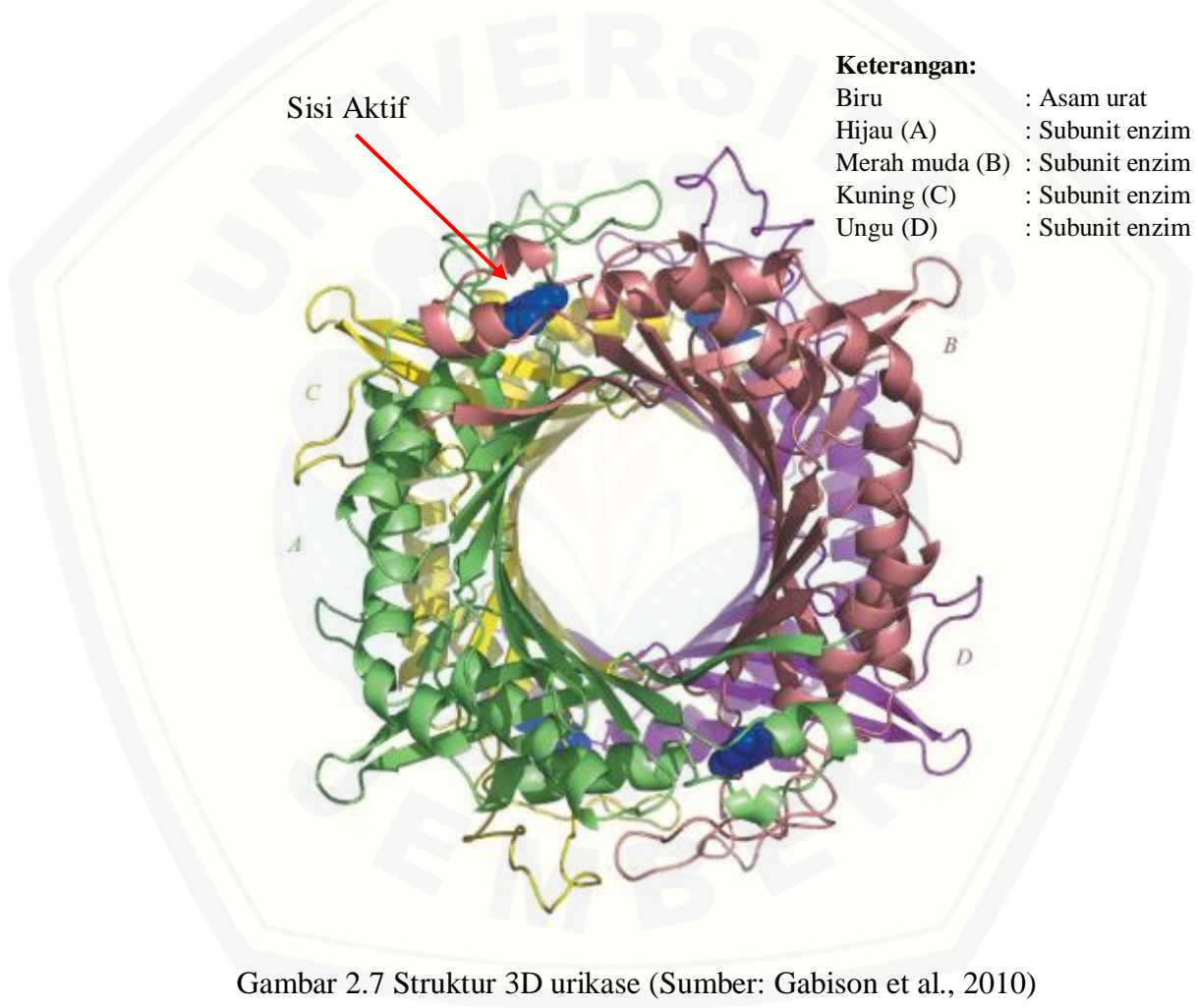
## 2.5 Urikase

Urikase atau urat oksidase merupakan enzim yang mengkatalisis oksidasi asam urat menjadi allantoin, karbon dioksida, dan hidrogen peroksida (Al-Atraqchi dan Al-Mosawi, 2012). Urikase dapat ditemukan dalam beberapa sumber alami seperti bakteri, fungi, dan sel-sel eukariotik (Atalla et al., 2009). Golongan mamalia selain primata, ikan, dan amfibi memiliki aktivitas urikase di dalam tubuhnya (Gambar 2.6), sedangkan tubuh manusia tidak memiliki aktivitas urikase karena terdapat tiga mutasi pada gen urat oksidase manusia. Mutasi pada gen ini menyebabkan tidak terbacanya gen urat oksidase (Hayashi et al., 2000).



Gambar 2.6 Jalur degradasi purin pada hewan (Sumber: Hayashi et al., 2000)

Urikase termasuk dalam kelas oksidase tanpa kofaktor dan merupakan hemotetramerik dimana memiliki empat sisi aktif yang identik sebagaimana diilustrasikan pada Gambar 2.7. Urikase memiliki sebuah *tunnel* (lubang) pada strukturnya yang dikelilingi empat rantai (subunit) A, B, C, dan D. Subunit A-B dan C-D terletak disekitar *tunnel*, sedangkan subunit A-C dan B-D terletak disepanjang *tunnel*. Sisi aktif dari urikase terletak pada antar muka (*interface*) subunit A-B (atau C-D) (Gabison et al., 2010).

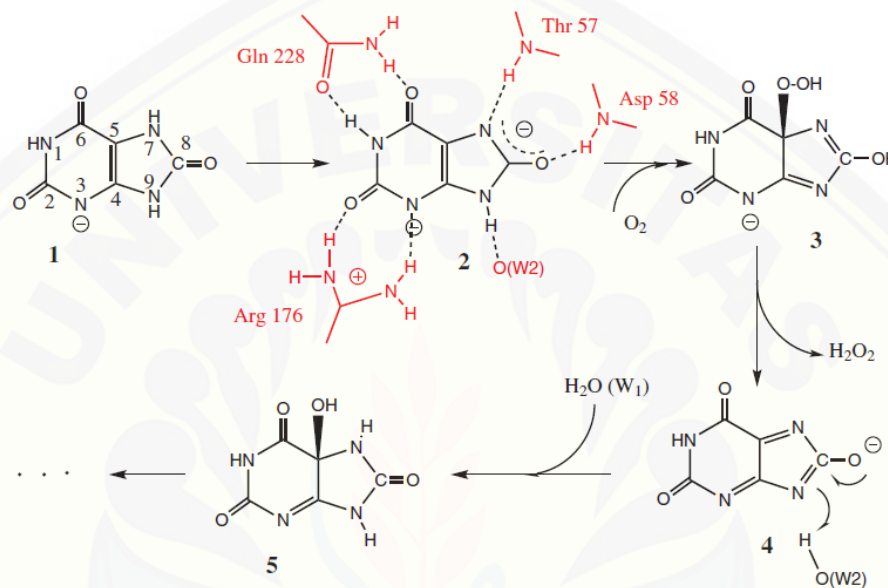


Gambar 2.7 Struktur 3D urikase (Sumber: Gabison et al., 2010)

Substrat dari urikase yang berupa asam urat terikat kuat pada satu sub unit enzim melalui interaksi dengan arginin (Arg180), leusin (Leu222), dan glutamin (Gln223) sementara pada sub unit yang lain dengan threonine (Thr67) dan Aspartat (Asp68) (Meraj et al., 2014). Proses degradasi asam urat oleh urikase dilakukan dengan menggunakan oksigen tanpa bantuan dari logam apapun maupun kofaktor



lainnya. Interaksi sisi aktif urikase dengan substrat asam urat dapat dilihat pada Gambar 2.8. Asam urat memiliki beberapa senyawa analog seperti xanthin (XAN), 8-nitroxanthin (8NXN), asam 8-thiourat (8THIO), dan 8-azaxanthin (8AZA) yang dapat berperan sebagai inhibitor dengan afinitas tinggi terhadap urikase (Gabison et al., 2010).

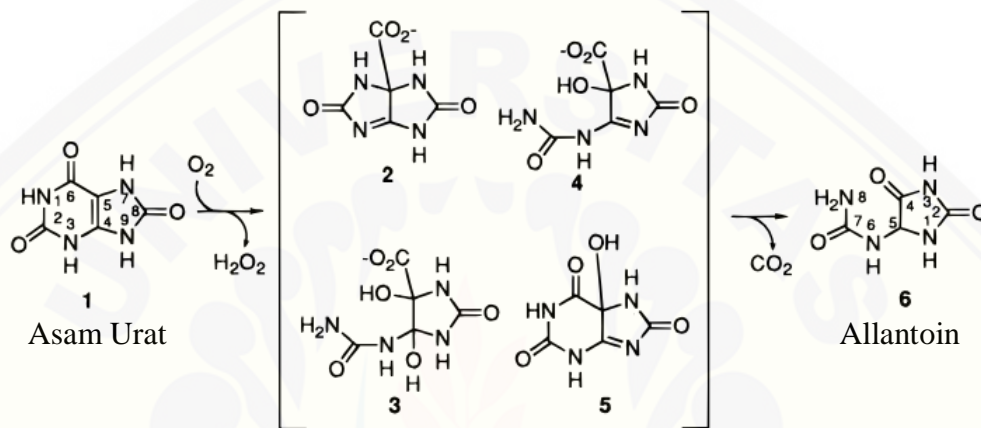


Gambar 2.8 Interaksi sisi aktif urikase dengan substrat asam urat (Sumber: Gabison et al., 2008)

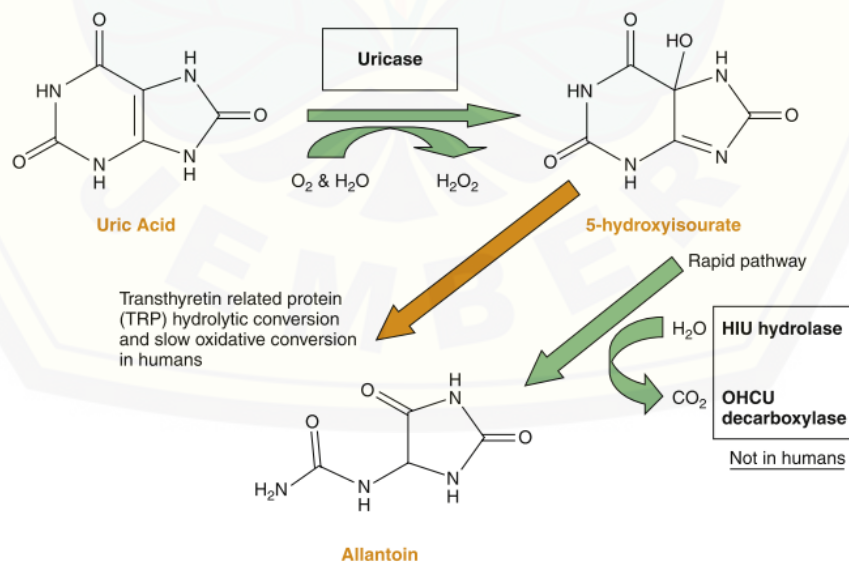
Oksidasi asam urat dikatalisis oleh urikase seiring dengan proses reduksi oksigen menjadi hidrogen peroksida. Mekanisme kimia dari reaksi oksidasi asam urat kurang begitu dipahami (Gambar 2.9). Hal ini dikarenakan produk yang sebenarnya dihasilkan dari reaksi enzimatik belum terdefiniskan. Urikase beberapa diantaranya mengandung tembaga seperti urikase pada babi, namun beberapa lainnya tidak memiliki kandungan tembaga seperti urikase pada hati sapi, bakteri, dan fungi. Keberadaan tembaga, logam transisi, dan kofaktor redok umum lainnya pada urikase menghadirkan suatu permasalahan tentang bagaimana oksigen triplet diaktivasi untuk bereaksi dengan molekul asam urat singlet (Kahn et al., 1997).

Oksidasi asam urat menjadi allantoin selain menghasilkan hidrogen peroksida juga menghasilkan karbon dioksida sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2.10 (Nuki, 2012). Hidrogen peroksida dan karbon dioksida merupakan

produk yang diturunkan dari C6 asam urat. Jalur konversi urat menjadi allantoin telah diteliti selama 50 tahun. Penelitian-penelitian tersebut menyebutkan bahwa asam 5-hidroksiisourat (5) pada Gambar 2.9 merupakan produk primer dari proses oksidasi enzimatik. Hal ini didukung dengan studi elektrokimia yang menunjukkan bahwa asam 5-hidroksiisourat terbentuk walaupun pada oksidasi asam urat non enzimatis (Kahn et al., 1997).



Gambar 2.9 Oksidasi asam urat oleh urikase menjadi senyawa metastabil yang terurai menjadi allantoin (Sumber: Kahn et al., 1997)



Gambar 2.10 Jalur degradasi asam urat menjadi allantoin oleh urikase pada sebagian besar mamalia dan organisme lain (Sumber: Nuki, 2012)

Urikase mengkatalisis reaksi oksidasi asam urat menjadi asam 5-hidroksiisourat. Pembentukan allantoin dari asam 5-hidroksiisourat berlangsung sangat cepat setelah hidrolisis enzimatis dan dekarboksilasi dalam spesi yang lebih rendah (Nuki, 2012). Tubuh manusia tidak memiliki aktivitas urikase yang mendegradasi asam urat menjadi allantoin, sehingga asam urat akan tetap menumpuk dan tidak terdegradasi (Hayashi et al., 2000).

Urikase juga digunakan dalam sediaan farmasi serta dalam pengobatan nefrolitiasis. Enzim ini juga digunakan untuk proses penentuan kadar asam urat dalam cairan biologis setelah isolasi dan pemurnian dari sumber hewan atau mikroba. Hal ini menyebabkan perlunya dilakukan ekstraksi dan produksi urikase secara berlebih (Meraj et al., 2014).

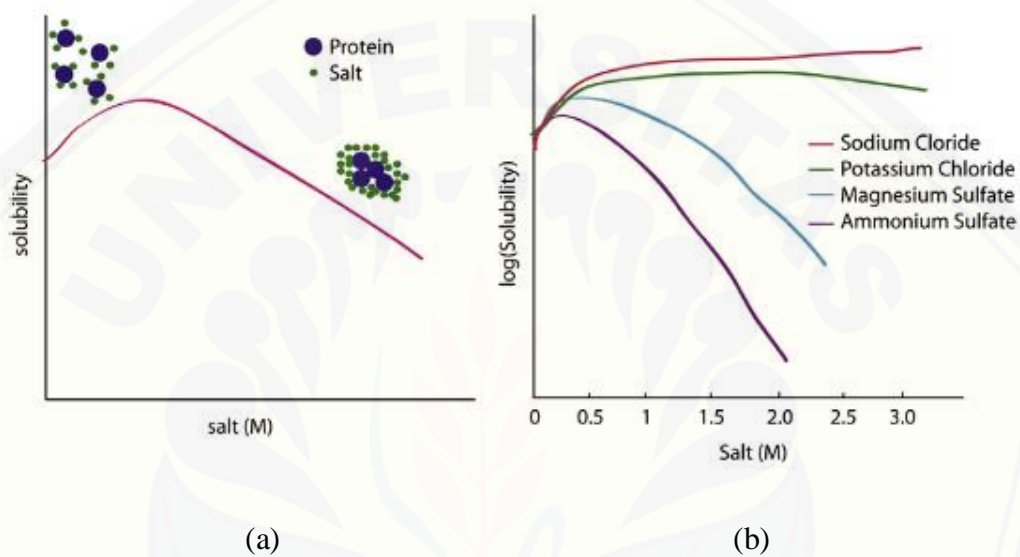
## 2.6 Fraksinasi

Fraksinasi atau disebut juga dengan pengendapan protein merupakan langkah kedua setelah proses pelisisan sel dalam pemurnian protein intraseluler. Hal ini dipengaruhi oleh kelarutan protein yang spesifik bagi protein tersebut dan makromolekul lain dalam hasil ekstraksi (Burgess, 2009). Beberapa protein yang bersifat polar memerlukan konsentrasi garam tertentu untuk menjaga stabilitas konformasinya. Konsentrasi garam yang rendah menyebabkan protein membentuk agregat yang bermuatan. Saat terdapat garam, anion dan kation menetralkan muatan pada permukaan protein dan membentuk agregat. Peningkatan konsentrasi garam lebih lanjut, akan menyebabkan permukaan protein menjadi sangat bermuatan sehingga molekul protein akan beragregat (Duong-Ly dan Gabelli, 2014).

Fraksinasi melibatkan proses destabilisasi larutan protein untuk membentuk partikel-partikel yang mudah dipisahkan dengan gravitasi, sentrifugasi, dan filtrasi. Efisiensi dari proses pemisahan dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor-faktor tersebut meliputi ukuran, bentuk, densitas, dan kekuatan dari persipitat (Fisher, 1987).

Kelarutan protein dipengaruhi oleh ion-ion sebagaimana diilustrasikan pada Gambar 2.11. Kelarutan protein meningkat seiring peningkatan kekuatan ionik pada larutan dengan konsentrasi ion rendah ( $<0,5$  M). Ion-ion dalam larutan akan

melingkupi molekul protein dari muatan protein lain. Peristiwa ini biasa disebut sebagai “*salting-in*”. Kelarutan protein akan mengalami penurunan dengan peningkatan kekuatan ionik pada saat konsentrasi ion-ion dalam larutan sangat tinggi. Peristiwa ini dikenal sebagai “*salting out*”. Peristiwa *salting-out* ini dapat digunakan dalam proses pemisahan protein yang didasarkan pada kelarutannya dalam larutan dengan konsentrasi garam tinggi (Duong-Ly dan Gabelli, 2014).



Gambar 2.11 Kelarutan protein dalam larutan garam (a) dan kelarutan protein dalam berbagai jenis larutan garam (b) (Sumber: Duong-Ly dan Gabelli, 2014)

Mekanisme *salting-out* didasarkan pada kelarutan preferensial karena pelepasan garam dari lapisan air yang terikat erat dengan permukaan protein yang disebut sebagai lapisan hidrasi. Lapisan hidrasi memiliki peranan penting dalam mempertahankan kelarutan dan konformasi terlipat dari protein. Interaksi utama antara protein dan air ada tiga jenis yang meliputi hidrasi ion antara rantai sisi bermuatan (contoh Asp, Glu, Lys), ikatan hidrogen antara gugus polar dengan air (contoh Ser, Thr, Tyr, dan rantai utama dari semua residu), dan hidrasi hidrofobik (Val, Ile, Leu, Phe) (Wingfield, 1998).

Proses fraksinasi dapat dilakukan dengan beberapa metode diantaranya pengendapan ammonium sulfat, pengendapan polietilenimin (PEI), pengendapan

etanol dan aseton, pengendapan isoelektrik, pengendapan termal, dan pengendapan polietilen glikol (polimer nonionik). Proses fraksinasi yang sering digunakan adalah pengendapan ammonium sulfat. Hal ini dikarenakan ammonium sulfat memiliki kemampuan untuk menstabilkan struktur protein, mudah larut, relatif murah, material murni sudah tersedia, dan densitas larutan jenuhnya (4,1 M) pada 25°C tidak terlalu tinggi dibandingkan dengan agen *salting-out* lainnya yaitu sebesar 1,235 g/cm<sup>3</sup> (Burgess, 2009).

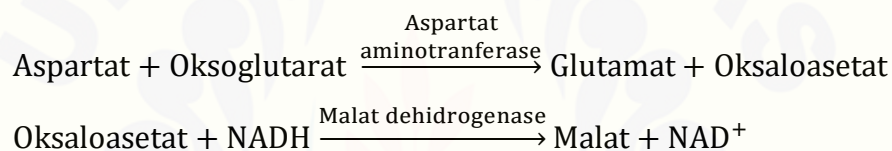
Kemampuan *salting-out* dari anion bermuatan bertingkat seperti sulfat mengikuti deret Hofmeister. Deret Hofmeister untuk anion adalah  $\text{PO}_4^{2-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{ClO}_4^- > \text{I}^- > \text{SCN}^-$ . Deret Hofmeister untuk kation adalah  $\text{NH}_4^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ . Ammonium sulfat yang tersusun atas kation  $\text{NH}_4^+$  dan anion  $\text{SO}_4^{2-}$  berada pada posisi atas dalam deret Hofmeister sehingga memiliki kemampuan *salting-out* yang cukup baik (Duong-Ly dan Gabelli, 2014). Penelitian Al-Atraqchi dan Al-Mosawi (2012) mengenai purifikasi dan karakterisasi urikase *Pseudomonas aeruginosa* 7 memperoleh aktivitas enzim optimum dengan menggunakan konsentrasi ammonium sulfat 70% serta lama waktu pengendapan satu malam.

Proses fraksinasi juga dipengaruhi oleh lama waktu pengendapan setelah proses penambahan garam. Proses ini berhubungan dengan efektivitas waktu yang digunakan dalam proses pengendapan protein, yaitu antara menunggu proses pengendapan secara perlahan dapat mencapai kesetimbangan atau langsung melakukan prosedur selanjutnya untuk menghindari waktu pengendapan yang lama (Burgess, 2009). Pengaruh lama waktu pengendapan telah diteliti oleh Farinas et al. (2011) terhadap proses pengendapan enzim endoglucanase dan xilanase menggunakan etanol dan ammonium sulfat 80% sebagai agen pengendap. Kondisi optimum dicapai setelah 12 jam pengendapan pada masing-masing agen pengendap.

## 2.7 Uji Enzim (*Enzim Assay*)

Uji enzim (*enzim assay*) merupakan uji aktivitas enzim yang dapat dilakukan dengan mengukur substrat maupun produk pada proses reaksi enzimatik.

Uji enzim yang dilakukan dengan mengukur substrat maupun produk secara langsung dikenal sebagai uji langsung. Pengujian secara langsung pada kebanyakan enzim sulit untuk dilakukan sehingga lebih sering digunakan uji gabungan (*coupled assay*). Campuran reaksi yang digunakan dalam uji gabungan meliputi substrat atau enzim yang akan diuji dan juga tambahan enzim lain dan reagen-reagen yang dibutuhkan untuk mengkonversi produk dari reaksi pertama menjadi produk yang dapat dideteksi pada akhir reaksi. Contohnya enzim aspartate aminotransferase yang menghasilkan pembentukan oksaloasetat dimana dapat dikonversi menjadi asam malat oleh enzim malat dehidrogenase yang berfungsi sebagai enzim indikator. Proses reaksi yang terjadi dapat diamati secara spektrometri pada panjang gelombang 340 nm:

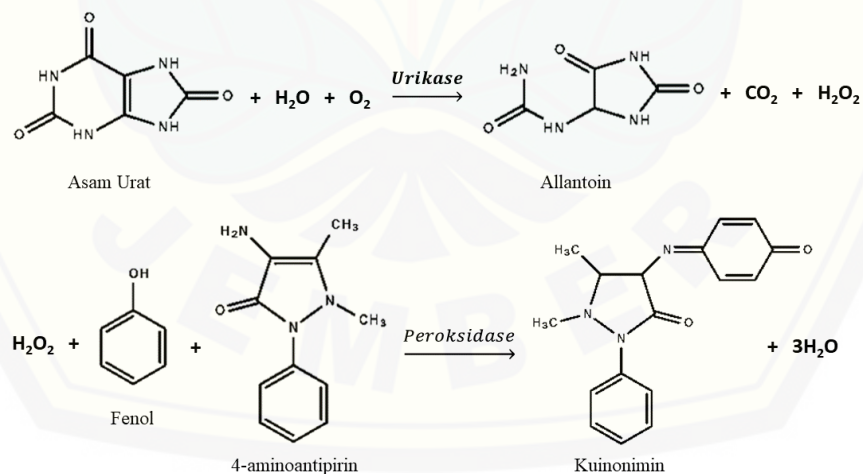


Proses pengamatan (*monitoring*) reaksi enzimatik sendiri dapat dilakukan beberapa metode yang meliputi metode gasometri, metode spektrofotometri, metode fluorometri, metode luminesensi, metode elektrokimia, dan metode mikrokolorimetri. Metode spektrofotometri merupakan metode yang sangat populer untuk pengamatan reaksi enzimatik. Hal ini dikarenakan metode spektrofotometri menggunakan teknik yang sederhana dan presisi (Holme dan Peck, 1998).

Metode pengukuran spektrofotometri yang sering digunakan dalam analisis kimia adalah spektrofotometri UV-Visibel. Spektrofotometri UV-Visibel merupakan teknik analisis yang didasarkan pada absorpsi radiasi UV-dekat (180-390 nm) atau cahaya tampak (visibel) (390-780 nm) oleh zat dalam fase larutan atau gas. Daerah UV-dekat dan cahaya tampak dalam spektrum elektromagnetik menyediakan energi untuk proses transisi elektronik ke tingkat energi yang lebih tinggi (Worsfold dan Zagatto, 2017). Metode pengukuran spektrofotometri dengan radiasi ultraviolet dan sinar tampak sangat berguna dalam analisis secara kuantitatif. Hal ini dikarenakan beberapa karakteristik yang dimilikinya yaitu pengaplikasian

luas, sangat sensitif, selektivitas tinggi, akurasi baik, serta mudah dilakukan (Skoog et al., 2014).

Uji aktivitas urikase *Pseudomonas aeruginosa* 7 telah dilakukan oleh Al-Atraqchi dan Al-Mosawi (2012) dengan menggunakan metode spektrofotometri UV. Pengukuran yang dilakukan didasarkan pada penurunan konsentrasi asam urat karena proses degradasi urikase. Penurunan konsentrasi asam urat ditentukan melalui penurunan absorbansi pada panjang gelombang 293 nm. Uji aktivitas urikase termofilik dari *Pseudomonas otidis* strain SN4 juga telah berhasil dilakukan oleh Lee et al. (2015) dengan menggunakan metode spektrofotometri visibel. Pengukuran yang dilakukan didasarkan pada pembentukan senyawa kuinonimin dye yang berwarna merah. Senyawa ini terbentuk dari hidrogen peroksida hasil aktivitas urikase yang bereaksi dengan 4-aminoantipirin dan fenol melalui bantuan peroksidase. Reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 2.12. Proses pengukuran ini dilakukan dengan menggunakan panjang gelombang 540 nm. Alishah et al. (2016) juga menggunakan metode ini untuk uji aktivitas gen sintetis urikase *Aspergillus flavus* namun dengan panjang gelombang yang berbeda yaitu 510 nm.



Gambar 2.12 Reaksi pembentukan senyawa kuinonimin (Sumber: Suhendi et al., 2011)

### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian telah dilakukan pada bulan November 2019 sampai dengan April 2020. Penelitian dilakukan di laboratorium Biokimia, laboratorium Kimia Fisik, dan laboratorium Kimia Analitik jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember serta laboratorium *Center for Development of Advance Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

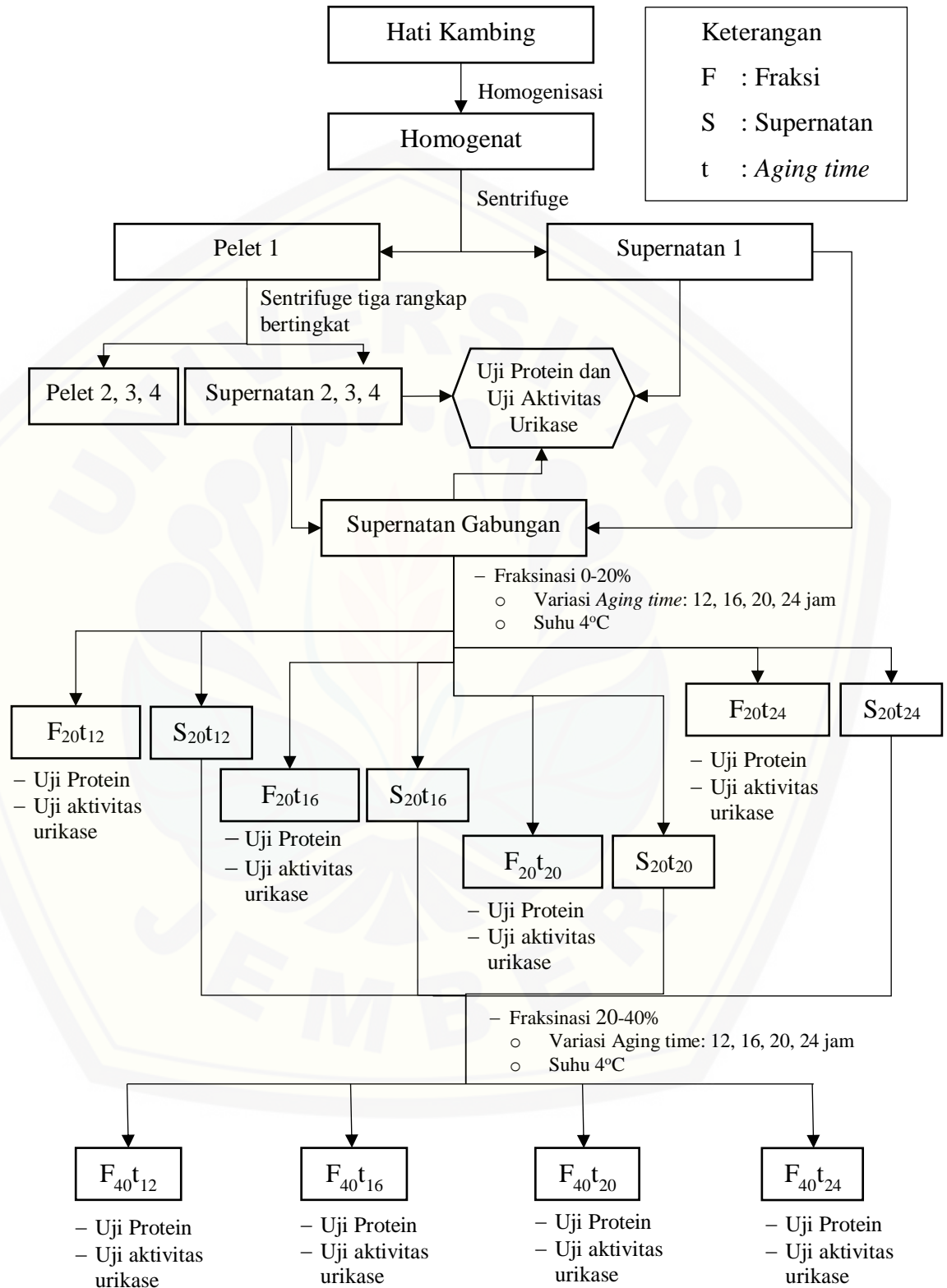
Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi Spektrofotometer Visibel, Sentrifuge, labu ukur, batang pengaduk, *beaker glass*, gelas ukur, pipet tetes, pipet mohr, gunting, kaca arloji, blender, *magnetic stirrer*, *pH meter*, mikropipet, corong gelas, botol semprot, *ice box*, timbangan analitik.

##### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi hati kambing; kertas saring whatman no. 1; aquades; pasir kuarsa; NaOH; asam urat (sigma-aldrict); hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ); asam borat; Coomassie Brilliant Blue G-250; etanol 95%; asam fosfat ( $H_3PO_4$ ) 85%; ammonium sulfat ( $(NH_4)_2SO_4$ ), Bovine Serum Albumin (BSA); asam sitrat;  $Na_2HPO_4$ ; 4-aminoantipyrine (sigma-aldrict); fenol 99%; *horse radish* peroksidase (Merck).



3.3 Rancangan Penelitian



### 3.4 Prosedur Kerja

#### 3.4.1 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa hati kambing yang diperoleh dari tempat penyembelihan kambing di Jalan Hos Cokroaminoto IV Kelurahan Jember Kidul Kecamatan Kaliwates. Pengambilan hati kambing dilakukan melalui proses penyembelihan biasa yang dilakukan langsung. Hati kambing kemudian dimasukkan ke dalam wadah dingin berisi es dan dibawa ke laboratorium.

#### 3.4.2 Ekstraksi Urikase

Ekstraksi urikase dilakukan berdasarkan metode penelitian yang dilakukan Rajoka et al. (2006). Hati kambing sebanyak 50 g dihancurkan menggunakan mortar kemudian ditambahkan dengan 500 mL buffer natrium borat 0,1 M pH 8,5. Homogenat disentrifugasi 8000 rpm pada 4°C selama 30 menit. Pelet dan supernatan yang diperoleh dipisahkan. Ekstraksi kedua dilakukan terhadap pelet yang dihasilkan pada ekstraksi pertama menggunakan buffer natrium borat 0,1 M pH 8,5 dengan volume 2 kali massa pelet. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 8000 rpm pada 4°C selama 30 menit untuk memperoleh supernatan kedua. Ekstraksi lanjut dilakukan dengan prosedur yang sama untuk memperoleh supernatan ketiga dan keempat. Supernatan yang diperoleh dari tiap tahap ekstraksi merupakan ekstrak kasar urikase. Ekstrak kasar urikase dari tiap tahap ekstraksi dilakukan analisis aktivitas total dan aktivitas spesifik urikase. Aktivitas spesifik urikase merupakan aktivitas total urikase dalam mg protein. Kadar protein ekstrak kasar urikase ditentukan berdasarkan metode Bradford (1976). Analisis aktivitas total dan aktivitas spesifik urikase juga dilakukan terhadap ekstrak kasar gabungan dari keempat supernatan tersebut.

#### 3.4.3 Fraksinasi Urikase dengan Amonium Sulfat

Supernatan gabungan yang dihasilkan dari proses homogenisasi diendapkan dengan proses fraksinasi ammonium sulfat 0-20% dan 20-40% secara paralel berdasarkan tabel persentase kejenuhan ammonium sulfat dalam Burgess (2009). Fraksinasi urikase dilakukan pada supernatan gabungan dengan menambahkan

ammonium sulfat 0-20% sedikit demi sedikit dalam *icebath* disertai pengadukan. Campuran yang dihasilkan dibagi ke dalam 4 wadah berbeda untuk dilakukan variasi waktu pengendapan 12, 16, 20, dan 24 jam pada temperatur 4°C. Campuran yang dihasilkan dari masing-masing variasi perlakuan waktu, disentrifugasi 12000 rpm selama 30 menit pada 4°C. Pelet (fraksi 0-20%) dan supernatan yang dihasilkan dipisahkan berdasarkan variasi perlakuan waktu. Pelet (fraksi 0-20%) pada masing-masing variasi perlakuan waktu dilakukan uji protein dan uji aktivitas urikase. Supernatan yang dihasilkan dari masing-masing variasi perlakuan waktu difraksinasi lanjut dengan ammonium sulfat 20-40% dan didiamkan sesuai dengan variasi waktunya. Campuran yang dihasilkan dari masing-masing variasi perlakuan waktu disentrifugasi 12000 rpm selama 30 menit pada 4°C. Pelet (fraksi 20-40%) dan supernatan yang dihasilkan dipisahkan berdasarkan variasi perlakuan waktu. Pelet (fraksi 20-40%) pada masing-masing variasi perlakuan waktu dilakukan uji protein dan uji aktivitas urikase. Setiap tahap fraksinasi urikase dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

#### 3.4.4 Penentuan Kadar Protein Urikase

##### a. Pembuatan kurva standar Bovine Serum Albumin

Pembuatan kurva standar BSA diawali dengan pembuatan stok larutan induk BSA 1 mg/mL (1000 mg/L). Stok larutan induk BSA kemudian diencerkan dengan variasi konsentrasi 0,15; 0,30; 0,45; 0,60; 0,75; dan 0,90 mg/mL. Larutan BSA pada masing-masing konsentrasi diambil 0,25 mL dan ditambahkan reagen Bradford 1,25 mL. Campuran diinkubasi 5 menit pada suhu ruang dan selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 595 nm. Hasil absorbansi terhadap masing-masing konsentrasi larutan standar BSA merupakan fungsi regresi kurva standar BSA.

##### b. Pengukuran Protein Urikase

Pengukuran protein dilakukan pada ekstrak kasar urikase dan hasil fraksinasi untuk masing-masing perlakuan. Pengukuran protein dilakukan dengan menggunakan metode Bradford (1976). Sampel dari masing-masing perlakuan sebanyak 0,25 mL ditambahkan dengan reagen Bradford 1,25 mL. Campuran diinkubasi selama 5 menit dan diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang

595 nm. Kadar protein dihitung dalam mg/mL dengan melakukan konversi nilai absorbansi sampel pada kurva standar BSA menggunakan persamaan berikut.

$$\text{Kadar Protein(mg/mL)} = \frac{A \pm C}{m}$$

Keterangan:

A : Absorbansi

C : Nilai *intercept* persamaan kurva standar BSA

m : Nilai *gradient* persamaan kurva standar BSA

(Sari, 2018).

#### 3.4.5 Penentuan Aktivitas Urikase

##### a. Pemindaian panjang gelombang hidrogen peroksida

Pembuatan kurva standar hidrogen peroksida dilakukan dengan mengukur nilai absorbansi dari hasil reaksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan 4AAP. Panjang gelombang dari hasil reaksi ini berdasarkan penelitian yang dilakukan Alishah et al. (2016) adalah 510 nm, sedangkan pada penelitian yang dilakukan Lee et al. (2015) adalah 540 nm. Perbedaan panjang gelombang menyebabkan harus dilakukannya proses pemindaian panjang gelombang maksimum untuk deteksi hasil reaksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan 4AAP. Pemindaian panjang gelombang dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan standar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang memiliki komposisi 0,6 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mg/L dalam buffer natrium borat; 0,15 mL 4AAP 30 mM; 0,1 mL fenol 1,5%; 0,05 mL peroksidase 15 U/mL; 0,1 mL buffer natrium borat 0,1 M pH 8,5; dan 1 mL etanol 95% pada rentang panjang gelombang 400-800 nm dengan interval panjang gelombang 1 nm dan ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

##### b. Pembuatan kurva standar hidrogen peroksida

Pembuatan kurva standar hidrogen peroksida dilakukan dengan pembuatan stok larutan induk hidrogen peroksida 1 mg/mL dalam buffer natrium borat pH 8,5. Stok larutan hidrogen peroksida diencerkan dengan variasi konsentrasi 0,005; 0,01; 0,015, dan 0,020 mg/mL. Larutan hidrogen peroksida pada masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 0,6 mL ditambahkan dengan 0,15 mL 4AAP 30 mM; 0,1 mL fenol (1,5%); 0,005 mL peroksidase (15 U/mL); dan 0,1 mL buffer natrium borat pH 8,5. Campuran reaksi enzimatik diinkubasi pada 37°C selama 20 menit,

kemudian ditambah 1 mL etanol untuk menghentikan aktivitas enzim. Campuran kemudian diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari proses pemindaian panjang gelombang hidrogen peroksida. Hasil absorbansi masing-masing konsentrasi larutan standar hidrogen peroksida diplotkan sebagai kurva standar hidrogen peroksida.

c. Uji Aktivitas Urikase

Uji aktivitas enzim dilakukan pada ekstrak kasar urikase dan hasil fraksinasi untuk masing-masing perlakuan. Uji aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan metode berdasarkan Lee et al. (2015). Uji aktivitas enzim didasarkan pada pengukuran  $H_2O_2$  yang dihasilkan dari proses oksidasi asam urat oleh urikase. Sampel enzim sebanyak 0,1 mL diinkubasi dalam 0,6 mL buffer natrium borat 0,1M pH 8,5 yang mengandung asam urat 2 mM; 0,15 mL 4-aminoantipirin 30 mM; 0,1 mL fenol 1,5%; dan 0,05 mL peroksidase 15 U/mL. Proses inkubasi reaksi enzimatik dilakukan pada temperatur  $37^\circ C$  selama 4 jam. Reaksi enzimatik dihentikan dengan menambahkan 1 mL etanol. Produksi hidrogen peroksida ditentukan dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang maksimum  $H_2O_2$  yang telah dilakukan proses pemindaian sebelumnya. Satu unit aktivitas urikase merupakan jumlah enzim yang menghasilkan  $1 \mu mol H_2O_2$  per menit dalam kondisi tertentu. Aktivitas urikase menurut (Sari, 2018) dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut.

$$\text{Aktivitas enzim (U. mL}^{-1}\text{)} = \frac{([S] - [K]) \times FP \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{enzim}}}}{t_{\text{inkubasi}} \times BM_{H_2O_2}}$$

Keterangan:

[S] : Konsentrasi substrat

[K] : Konsentrasi kontrol

FP : Faktor pengenceran

$V_{\text{total}}$  : Volume total

$V_{\text{enzim}}$  : Volume enzim

$t_{\text{inkubasi}}$  : Waktu inkubasi

$BM_{H_2O_2}$  : Berat Molekul  $H_2O_2$

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian fraksinasi urikase hati kambing menggunakan ammonium sulfat dengan variasi waktu pengendapan yakni:

1. Waktu pengendapan optimum untuk proses fraksinasi urikase dari hati kambing menggunakan ammonium sulfat 0-20% ialah 16 jam dengan nilai aktivitas spesifik urikase yang diperoleh sebesar 0,02014 U/mg serta yield sebesar 284,3% dan kemurnian 18,9 kali ekstrak kasar enzim. Waktu pengendapan optimum untuk proses fraksinasi urikase dari hati kambing menggunakan ammonium sulfat 20-40% ialah 16 jam dengan nilai aktivitas spesifik urikase yang diperoleh sebesar 0,00183 U/mg serta yield sebesar 104,0% dan kemurnian 1,7 kali ekstrak kasar enzim.
2. Proses fraksinasi urikase hati kambing efektif pada penggunaan ammonium sulfat 0-20% dengan lama waktu pengendapan 16 jam dimana memperoleh aktivitas spesifik urikase sebesar 0,02014 U/mg serta yield sebesar 284,3% dan kemurnian 18,9 kali ekstrak kasar enzim.

### 5.2 Saran

Proses fraksinasi urikase hati kambing menggunakan ammonium sulfat dengan variasi waktu pengendapan memperoleh nilai aktivitas spesifik yang relatif kecil. Hal ini memungkinkan untuk proses eksplorasi faktor-faktor lain berpengaruh terhadap aktivitas spesifik urikase yang dihasilkan seperti pengaruh lama waktu dan suhu inkubasi. Urikase yang telah diperoleh juga dapat dilakukan proses pemurnian yang diawali dengan proses dialisis serta pemurnian lebih lanjut menggunakan kromatografi penukar ion agar kemurnian yang diperoleh lebih tinggi serta nilai aktivitas spesifik menjadi lebih besar. Karakterisasi lebih lanjut mengenai berat molekul protein serta penentuan nilai konstanta Michaelis-Menten ( $K_M$ ) dan nilai laju maksimal ( $V_{maks}$ ) dari urikase juga perlu untuk dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abadi, T., Lestari, C., & Purbowati, E. (2015). Pola pertumbuhan bobot badan kambing kacang betina di kabupaten Grobogan. *Animal Agriculture Journal*, 4(1), 93–97.
- Abdullah, S. K., & Flayyih, M. T. (2015). Production, Purification and Characterization of Uricase Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Iraqi Journal of Science*, 56(3B), 2253–2263.
- Al-Atraqchi, S. A. M., & Al-Mosawi, E. A. A. (2012). Purification and characterization of uricase enzyme produced from *Pseudomonas aeruginosa* 7. *Kerbala Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70(3), 64–76.
- Alishah, K., Asad, S., Khajeh, K., & Akbari, N. (2016). Utilizing intein-mediated protein cleaving for purification of uricase, a multimeric enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 92–98.
- Atalla, M. M., Farag, M. M., Eman, R. H., Abd-El-Lataif, M. S., & Nehad, E. A. (2009). Optimum conditions for uricase enzyme production by *Gliomastix gueg*. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(1), 45–50.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyr binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Burgess, R. R. (2009). Protein Precipitation Techniques. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 463, pp. 331–342).
- Chaudhary, K., Malhotra, K., Sowers, J., & Aroor, A. (2013). Uric acid-key ingredient in the recipe for cardiorenal metabolic syndrome. *CardioRenal Medicine*, 3(3), 208–220.
- DitjenPKH. (2018). *Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan 2018*. Jakarta: Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan.
- Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods in Enzymology*, 541(November 2018), 85–94.
- Farinas, C. S., Scarpelini, L. M., Miranda, E. A., & Bertucci Neto, V. (2011). Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(1), 17–26.
- Fisher, R. R. (1987). *Protein precipitation with acids and polyelectrolytes: the*

*effects of reactor conditions and models of the particle size distributions*. Iowa State University.

- Gabison, L., Chiadmi, M., El Hajji, M., Castro, B., Colloc'h, N., & Prangé, T. (2010). Near-atomic resolution structures of urate oxidase complexed with its substrate and analogues: the protonation state of the ligand. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 66(6), 714–724.
- Gabison, L., Prangé, T., Colloc, N., Hajji, M. El, Castro, B., & Chiadmi, M. (2008). Structural analysis of urate oxidase in complex with its natural substrate inhibited by cyanide : Mechanistic implications. *BMC Structural Biology*, 8, 1–8.
- Hafez, R. M., Abdel-Rahman, T. M., & Naguib, R. M. (2017). Uric acid in plants and microorganisms: Biological applications and genetics - A review. *Journal of Advanced Research*, 8(5), 475–486.
- Hayashi, S., Fujiwara, S., & Noguchi, T. (2000). Evolution of urate-degrading enzymes in animal peroxisomes. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 32, 123–129.
- Holme, D. J., & Peck, H. (1998). *Analytical Biochemistry Third Edition* (Third Edit). London: Prentice Hall.
- ITIS. (2019). *Capra hircus aegagrus*, Taxonomic Serial No.: 898774. Retrieved from <http://www.itis.gov/>
- Jagathy, K., Pushparaj, A., & Ronald, J. (2016). Uricase production from *Bacillus subtilis* isolated from Poultry waste. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, 3(6), 255–262.
- Kahn, K., Serfozo, P., & Tipton, P. A. (1997). Identification of the true product of the urate oxidase reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 119(23), 5435–5442.
- Lee, N. S. I. S., Khosravi, H. M., Ibrahim, N., & Sharir, S. (2015). Isolation, partial purification and characterization of thermophilic uricase from *Pseudomonas otitidis* strain SN4. *Malaysian Journal of Microbiology*, 11(4), 352–357.
- Liu, H. S., & Cheng, Y. C. (2000). Stability enhancement of  $\alpha$ -amylase by supercritical carbon dioxide pretreatment. In *Progress in Biotechnology* (Vol. 16).
- London, M., & Hudson, P. B. (1957). Uricolytic activity of purified uricase in two human beings. *Science*, 125, 937–938.
- Lundrigan, B. (1996). Morphology of Horns and Fighting Behavior in the Family Bovidae. *Journal of Mammalogy*, 77(2), 462–475.



- Madhan, K. E., & Raju, S. (2014). Comparative histology of human and cow, goat, sheep liver. *Journal of Surgical Academia*, 4(1), 10–13.
- Maiuolo, J., Oppedisano, F., Gratteri, S., Muscoli, C., & Mollace, V. (2015). Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology*, 213, 8–14.
- Mariño, M. A., Freitas, S., & Miranda, E. A. (2015). Ethanol precipitation of glycosyl hydrolases produced by *Trichoderma harzianum* P49P11. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 32(02), 325–333.
- Meraj, M., Khalil-Ur-Rehman, Javed, S., Irfan, R., & Jahan, N. (2014). Hyperproduction and Comparison of Wild and Mutated Urate Oxidase from *Bacillus S*. *International Journal of Advances in Chemical Engineering and Biological Sciences*, 1(1), 1–5.
- Miyawaki, O., Kanazawa, T., Maruyama, C., & Dozen, M. (2016). Static and dynamic half-life and lifetime molecular turnover of enzymes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, xx(xx), 5–9.
- Moore, J. T., & Langley, R. (2008). *Biochemistry for Dummies*. Indiana: Wiley Publishing, Inc.
- Nasrul, E., & Sofitri. (2012). Hiperurisemia pada Pra Diabetes. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 1(2), 86–91.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2013). *Lehninger Principle of Biochemistry* (Sixth Edit). New York: W. H. Freeman and Company.
- Novak, P., & Havelicek, V. (2016). Protein extraction and precipitation. In *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroads* (2nd Editio, pp. 51–62).
- Nuki, G. (2012). Uricase therapy of gout. In *Gout and Other Crystal Arthropathies* (Edisi Pert, pp. 174–186).
- Osman, A. M., Corso, A. Del, Ipata, P. L., & Mura, U. (1989). Liver uricase in camelus dromedarius: Purification and properties. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 94B(3), 469–474.
- Ozougwu, J. C. (2017). Physiology of the Liver. *Intenational Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*, 4(8), 13–24.
- Rajoka, M., Meraj, M., Akhtar, M., Zia, M., & Khalil-ur-Rehman. (2006). Purification, and properties of a bovine uricase. *Protein & Peptide Letters*, 13(4), 363–368.
- Sari, R. M. (2018). *Uji Kinetika dan Optimasi Konsentrasi Enzim Endo-β-1,4-D-*

*Xilanase pada Proses Hidrolisis Xilan Kulit Kopi untuk Produksi Xilooligosakarida*. Universitas Jember.

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2014). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (Ninth Edit). New York: BROOKS/COLE.

Suhendi, A., Nurcahyanti, Muhtadi, & Sutrisna, E. M. (2011). Aktivitas antihiperurisemia ekstrak air jinten hitam ( *Coleus ambonicus* Lour ) pada mencit jantan galur balb-c dan standardisasinya. *Majalah Farmasi Indonesia*, 22(2), 77–84.

Suprihana, M. S. (2013). Fraksinasi enzim lipase dari endosperm kelapa dengan metode salting out. *AGRITECH*, 33(4), 377–383.

Thayibah, R., Ariyanto, Y., & Ramani, A. (2018). Hiperurisemia pada remaja di wilayah kerja puskesmas Arjasa Kabupaten Situbondo. *E-Jurnal Pustaka Kesehatan*, 6(1), 38–45.

Underwood, W. J., Blauwiel, R., Delano, M. L., Gillesby, R., Mischler, S. A., & Schoell, A. (2015). Chapter 15 - Biology and Diseases of Ruminants (Sheep, Goats, and Cattle). In *Laboratory Animal Medicine: Third Edition* (Third Edit, pp. 623–694).

Wingfield, P. (1998). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. In *Current Protocols in Protein Science*.

Worsfold, P. J., & Zagatto, E. A. G. (2017). Spectrophotometry: Overview. In *Encyclopedia of Analytical Science 3rd edition* (3rd ed.).

Yang, X., Yuan, Y., Zhan, C. G., & Liao, F. (2012). Uricases as therapeutic agents to treat refractory gout: Current states and future directions. *Drug Development Research*, 73(2), 66–72.

Yoshizato, K., Tateno, C., & Utoh, R. (2009). The mechanism of liver size control in mammals: A novel animal study. *International Journal of Design and Nature*, 4(2), 123–142.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1 Preparasi Larutan

#### 1.1 Pembuatan larutan standar hidrogen peroksida

Stok larutan induk hidrogen peroksida dibuat dengan cara melarutkan  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (w/v) sebanyak 0,233 mL sampai volumenya 100 mL menggunakan buffer natrium borat pH 8,5 dalam labu ukur sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/mL. Stok larutan induk hidrogen peroksida kemudian dilakukan pengenceran kembali untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi 0,005; 0,01; 0,015; dan 0,02 mg/L menggunakan labu ukur. Larutan yang telah dibuat kemudian disimpan untuk proses pengukuran lebih lanjut.

#### 1.2 Pembuatan reagen Bradford

Reagen Bradford dibuat dengan menimbang 0,01 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 yang kemudian dilarutkan dalam 5 mL etanol 95%. Campuran kemudian ditambahkan 10 mL asam fosfat 85% (w/v). Campuran yang dihasilkan kemudian ditambahkan dengan akuades hingga volumenya mencapai 100 mL dan terlarut semua. Campuran kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring *whatman* no. 1. Reagen Bradford yang telah dibuat kemudian disimpan untuk penggunaan lebih lanjut.

#### 1.3 Pembuatan buffer kalium fosfat 0,1 M pH 7

Larutan buffer kalium fosfat 0,1 M pH 7 dibuat dengan cara menyiapkan 80 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  dalam gelas beaker kemudian ditambahkan 0,934 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (BM: 174,18 g/mol). Larutan yang diperoleh kemudian ditambahkan 0,631 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (BM: 192,1 g/mol) dan diatur pH larutan menggunakan penambahan  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  atau  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 M. Larutan kemudian ditambahkan dengan  $\text{dH}_2\text{O}$  sampai volumenya mencapai 100 mL.

#### 1.4 Pembuatan buffer natrium borat 0,1 M pH 8.5

Larutan buffer natrium borat 0,1 M pH 8,5 dibuat dengan cara menyiapkan 80 mL dH<sub>2</sub>O dalam gelas beaker kemudian ditambahkan 6,183 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (bm: 61,83 g/mol). Larutan yang diperoleh kemudian ditambahkan 1 g NaOH (bm: 39,997 g/mol) dan diatur pH larutan dengan NaOH 1 M. Larutan kemudian ditambahkan dengan dH<sub>2</sub>O sampai volumenya mencapai 100 mL.

#### 1.5 Pembuatan larutan standar Bovin Serum Albumin (BSA)

Stok larutan induk BSA dibuat dengan cara menimbang BSA sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam 10 mL dH<sub>2</sub>O sehingga diperoleh konsentrasi larutan induk BSA 1 mg/mL (1000 mg/L). Stok larutan induk BSA kemudian dilakukan pengenceran dengan variasi konsentrasi 0,15; 0,30; 0,45; 0,60; 0,75; dan 0,90 mg/mL untuk memperoleh larutan standar. Larutan standar yang telah dibuat selanjutnya disimpan untuk penggunaan lebih lanjut.

#### 1.6 Pembuatan larutan 4-aminoantipirin 30 mM

4-aminoantipirin ditimbang sebanyak 0,61 g. 4-aminoantipirin yang telah ditimbang dilarutkan ke dalam 100 mL akuades menggunakan labu ukur. Larutan yang diperoleh kemudian disimpan untuk penggunaan lebih lanjut.

#### 1.7 Pembuatan larutan fenol 1,5%

Larutan fenol 1,5% dibuat melalui proses pelarutan fenol 99%. Larutan fenol 99% diambil 1,605 g kemudian dilarutkan sampai 100 mL menggunakan labu ukur. Larutan yang dihasilkan kemudian disimpan untuk penggunaan lebih lanjut.

#### 1.8 Pembuatan larutan asam urat 2 mM

Asam urat ditimbang sebanyak 0,0336 g. Larutan kemudian ditambahkan buffer natrium borat sampai volumenya 100 mL. Larutan asam urat yang dihasilkan lalu disimpan untuk penggunaan lebih lanjut.

### 1.9 Pembuatan larutan enzim peroksidase 15 U/mL

Enzim peroksidase 170 U/mg ditimbang sebanyak 0,4411 mg. Enzim peroksidase yang telah ditimbang dilarutkan ke dalam 5 mL buffer kalium fosfat pH 7 menggunakan labu ukur. Larutan yang diperoleh kemudian disimpan untuk penggunaan lebih lanjut.



## Lampiran 2 Tabel Persen Kejenuhan Ammonium Sulfat

Initial concentration of ammonium sulfate (percentage saturation at 0 °C)	Percentage saturation at 0 °C																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Solid ammonium sulfate (g) to be added to 1 l of solution																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

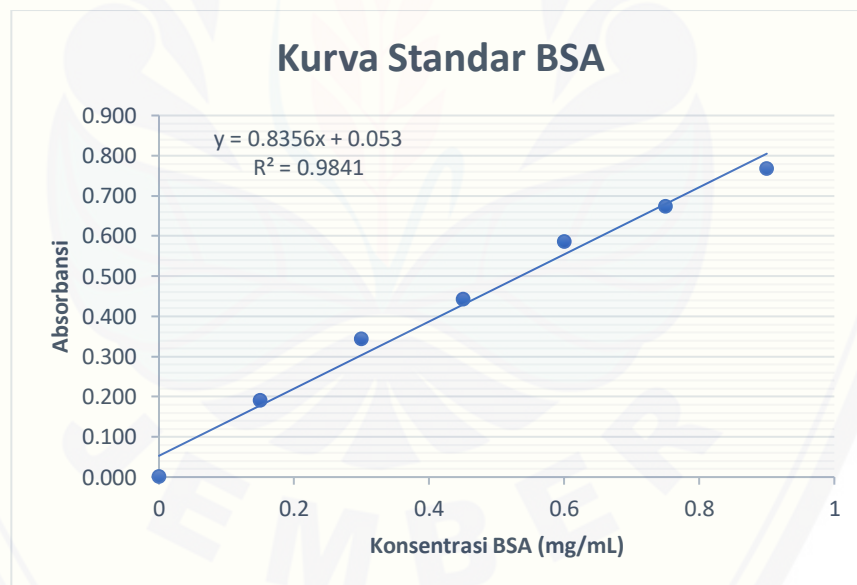
(Sumber: Burgess, 2009)

### Lampiran 3 Data dan Perhitungan

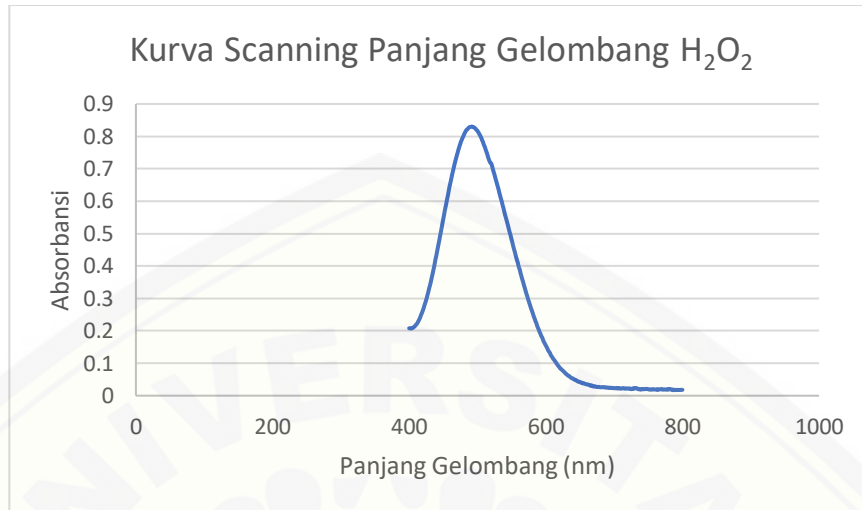
#### 3.1 Tabel Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Bovine Serum Albumin (BSA)

Konsentrasi BSA (mg/mL)	Absorbansi
0	0,000
0,15	0,191
0,30	0,343
0,45	0,443
0,60	0,585
0,75	0,673
0,90	0,768

#### 3.2 Kurva Standar Bovine Serum Albumin (BSA)



### 3.3 Kurva Pemindaian Panjang Gelombang Maksimum H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



Keterangan:

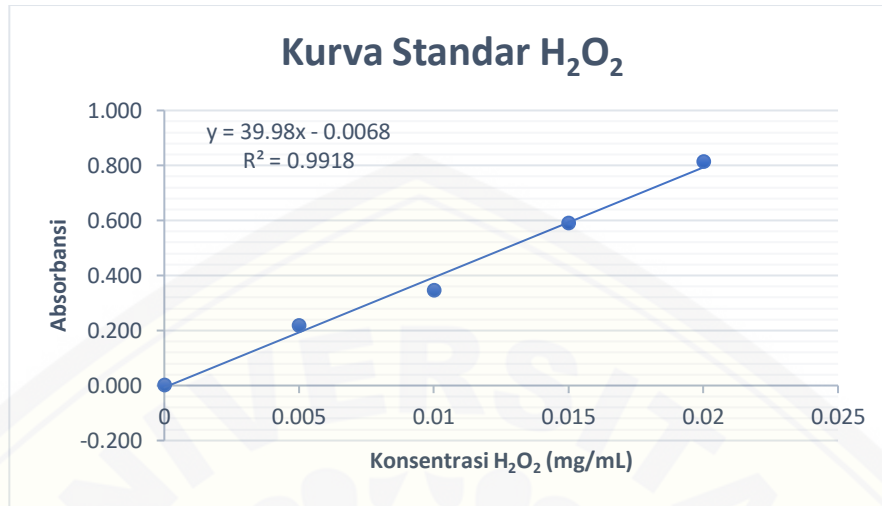
Konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 20 mg/mL  
 Rentang Panjang Gelombang : 400-800 nm  
 Interval Panjang Gelombang : 1 nm  
 Panjang Gelombang Maksimum : 490 nm  
 Absorbansi Maksimum : 0,829

### 3.4 Tabel Pengukuran Absorbansi Larutan Standar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Konsentrasi H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/mL)	Absorbansi
0	0,000
0,005	0,217
0,010	0,345
0,015	0,589
0,020	0,813



### 3.5 Kurva Standar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



### 3.6 Tabel Massa Pelet yang Diperoleh

Proses	Sampel	Massa Pelet (g)
Ekstraksi Enzim	Supernatan 1	50
	Supernatan 2	125
Fraksinasi Ammonium Sulfat 0-20%	F <sub>20t12</sub>	0,39
	F <sub>20t16</sub>	0,40
	F <sub>20t20</sub>	0,37
	F <sub>20t24</sub>	0,40
Fraksinasi Ammonium Sulfat 20-40%	F <sub>40t12</sub>	0,43
	F <sub>40t16</sub>	0,50
	F <sub>40t20</sub>	0,44
	F <sub>40t24</sub>	0,43

### 3.7 Perhitungan Konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Persamaan Kurva Standar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:  $y = 39,98x - 0,0068$

$$[H_2O_2]_{\text{sampel}}(\text{mg/mL}) = \frac{\text{Absorbansi } H_2O_2 \text{ Sampel} + 0,0068}{39,98}$$

$$[H_2O_2]_{\text{kontrol}}(\text{mg/mL}) = \frac{\text{Absorbansi } H_2O_2 \text{ Kontrol} + 0,0068}{39,98}$$

Contoh perhitungan konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sampel Supernatan 1:

Diketahui absorbansi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sampel Supernatan 1 = 0,305

$$[H_2O_2]_{\text{sampel}}(\text{mg/mL}) = \frac{0,305 + 0,0068}{39,98}$$

$$[H_2O_2]_{\text{sampel}}(\text{mg/mL}) = 0,0078 \text{ mg/mL}$$

Contoh perhitungan konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontrol Supernatan 1:

Diketahui absorbansi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kontrol Supernatan 1 = 0,168

$$[H_2O_2]_{\text{kontrol}}(\text{mg/mL}) = \frac{0,168 + 0,0068}{39,98}$$

$$[H_2O_2]_{\text{kontrol}}\left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) = 0,0044 \text{ mg/mL}$$

### 3.8 Perhitungan Aktivitas Total Urikase

$$\text{Aktivitas Total(U/mL)} = \frac{([H_2O_2]_{\text{sampel}} - [H_2O_2]_{\text{kontrol}}) \times FP \times \frac{V_{\text{Total}}}{V_{\text{Enzim}}}}{t_{\text{inkubasi}} \times BM_{H_2O_2}} \times FD$$

$t_{\text{inkubasi}}$  : Waktu Inkubasi (240 menit)

$V_{\text{Enzim}}$  : Volume Enzim (0,1 mL)

$V_{\text{Total}}$  : Volume Total (2 mL)

$BM_{H_2O_2}$  : Berat Molekul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,034 mg/μmol)

FP : Faktor Pengenceran

FD : Faktor Pelarutan

Contoh perhitungan aktivitas total Supernatan 1:

$$\text{Aktivitas Total(U/mL)} = \frac{(0,0078 - 0,0044) \text{ mg/mL} \times 1 \times \frac{2 \text{ mL}}{0,1 \text{ mL}}}{240 \text{ menit} \times 0,034 \text{ mg}/\mu\text{mol}} \times 10$$

$$\text{Aktivitas Total(U/mL)} = 0,084 \mu\text{mol. menit}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$\text{Aktivitas Total(U/mL)} = 0,084 \text{ U. mL}^{-1}$$



3.9 Tabel Aktivitas Total Urikase

Proses	Sampel	Massa Pelet (g)	Pelarutan (mL)	FD	FP	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sub>Sampel</sub> (mg/mL)	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sub>Kontrol</sub> (mg/mL)	Aktivitas Total (U/mL)
Ekstraksi Enzim	Supernatan 1	50	500	10,0	1	0,0078	0,0044	0,0843
	Supernatan 2	125	250	2,0	1	0,0045	0,0019	0,0128
Fraksinasi Ammonium Sulfat 0-20%	F <sub>20t12</sub>	0,39	5	12,7	10	0,0010	0,0003	0,2088
	F <sub>20t16</sub>	0,40	5	12,7	10	0,0011	0,0003	0,2397
	F <sub>20t20</sub>	0,37	5	13,4	10	0,0011	0,0003	0,2325
	F <sub>20t24</sub>	0,40	5	12,5	10	0,0012	0,0004	0,2375
Fraksinasi Ammonium Sulfat 20-40%	F <sub>40t12</sub>	0,43	5	11,6	10	0,0005	0,0003	0,0617
	F <sub>40t16</sub>	0,50	5	10,0	10	0,0006	0,0003	0,0877
	F <sub>40t20</sub>	0,44	5	11,5	10	0,0005	0,0003	0,0656
	F <sub>40t24</sub>	0,43	5	11,6	10	0,0007	0,0004	0,0717

### 3.10 Perhitungan Total Protein

Persamaan Kurva Standar BSA:  $y = 0,8356x + 0,0053$

$$\text{Total Protein (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbansi} - 0,053}{0,8356} \times \text{Faktor Pengenceran}$$

Contoh perhitungan total protein Supernatan 1:

Diketahui absorbansi Supernatan 1 = 0,715

$$\text{Total Protein (mg/mL)} = \frac{0,715 - 0,053}{0,8356} \times 100$$

$$\text{Total Protein (mg/mL)} = 79,3 \text{ mg/mL}$$

### 3.11 Tabel Total Protein

Proses	Sampel	Faktor Pengenceran (kali)	Total Protein (mg/mL)
Ekstraksi	Supernatan 1	100	79,3
Enzim	Supernatan 2	100	49,3
Fraksinasi	F <sub>20t12</sub>	100	11,4
Ammonium	F <sub>20t16</sub>	100	11,9
Sulfat	F <sub>20t20</sub>	100	12,7
0-20%	F <sub>20t24</sub>	100	16,4
Fraksinasi	F <sub>40t12</sub>	100	43,7
Ammonium	F <sub>40t16</sub>	100	48,0
Sulfat	F <sub>40t20</sub>	100	48,8
20-40%	F <sub>40t24</sub>	100	58,3

### 3.12 Perhitungan Aktivitas Spesifik Urikase

$$\text{Aktivitas Spesifik(U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas Total(U/mL)}}{\text{Total Protein(mg/mg)}}$$

Contoh Perhitungan aktivitas spesifik Supernatan 1:

$$\text{Aktivitas Spesifik(U/mg)} = \frac{0,084 \text{ U/mL}}{79,2 \text{ mg/mL}}$$

$$\text{Aktivitas Spesifik(U/mg)} = 0,00106 \text{ U/mg}$$

### 3.13 Tabel Aktivitas Spesifik Urikase

Proses	Sampel	Aktivitas Total (U/mL)	Total Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
Ekstraksi Enzim	Supernatan 1	0,0843	79,3	0,00106
	Supernatan 2	0,0128	49,3	0,00026
Fraksinasi Ammonium Sulfat 0-20%	F <sub>20t12</sub>	0,2088	11,4	0,01847
	F <sub>20t16</sub>	0,2397	11,9	0,02014
	F <sub>20t20</sub>	0,2325	12,7	0,01889
	F <sub>20t24</sub>	0,2375	16,4	0,01594
Fraksinasi Ammonium Sulfat 20-40%	F <sub>40t12</sub>	0,0617	43,7	0,00145
	F <sub>40t16</sub>	0,0877	48,0	0,00183
	F <sub>40t20</sub>	0,0656	48,8	0,00134
	F <sub>40t24</sub>	0,0717	58,3	0,00122

### 3.14 Perhitungan Nilai Yield

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{Aktivitas Total Sampel}}{\text{Aktivitas Total Bahan Awal}} \times 100\%$$

dimana aktivitas total bahan awal adalah aktivitas total Supernatan 1 (ekstrak kasar urikase)

Contoh perhitungan nilai Yield Supernatan 2:

$$\text{Yield (\%)} = \frac{0,0128}{0,0843} \times 100\% = 15,2\%$$

## 3.15 Perhitungan Faktor Purifikasi

$$\text{Purifikasi (kali)} = \frac{\text{Aktivitas Spesifik Sampel}}{\text{Aktivitas Spesifik Bahan Awal}}$$

dimana aktivitas spesifik bahan awal adalah aktivitas spesifik Supernatan 1 (ekstrak kasar urikase)

Contoh perhitungan Faktor Purifikasi Supernatan 2:

$$\text{Purifikasi (kali)} = \frac{0,00026}{0,00106} = 0,2 \text{ kali}$$

## 3.16 Tabel Efektivitas Fraksinasi Urikase

<b>Sampel</b>	<b>Total Protein (mg/mL)</b>	<b>Aktivitas Total (U/mL)</b>	<b>Aktivitas Spesifik (U/mg)</b>	<b>Yield (%)</b>	<b>Purifikasi (kali)</b>
Supernatan 1	79,3	0,0843	0,00106	100,0	1,0
Supernatan 2	49,3	0,0128	0,00026	15,2	0,2
F <sub>20t12</sub>	11,4	0,2088	0,01847	247,7	17,4
F <sub>20t16</sub>	11,9	0,2397	0,02014	284,3	18,9
F <sub>20t20</sub>	12,7	0,2325	0,01889	275,8	17,8
F <sub>20t24</sub>	16,4	0,2375	0,01594	281,7	15,0
F <sub>40t12</sub>	43,7	0,0617	0,00145	73,2	1,4
F <sub>40t16</sub>	48,0	0,0877	0,00183	104,0	1,7
F <sub>40t20</sub>	48,8	0,0656	0,00134	77,8	1,3
F <sub>40t24</sub>	58,3	0,0717	0,00122	85,0	1,1

**Lampiran 4 Dokumentasi Penelitian**



Gambar 1. Sampel kambing yang digunakan

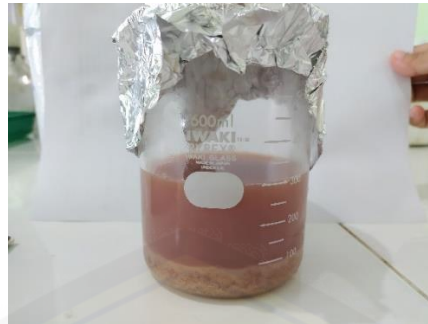


Gambar 2. Sampel hati kambing yang digunakan

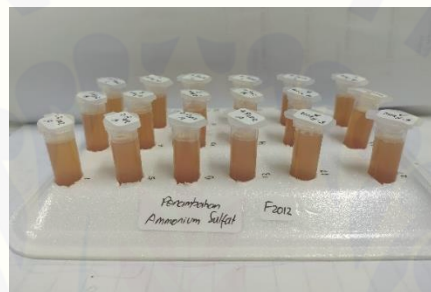


Gambar 3. Hati kambing yang sudah dihancurkan

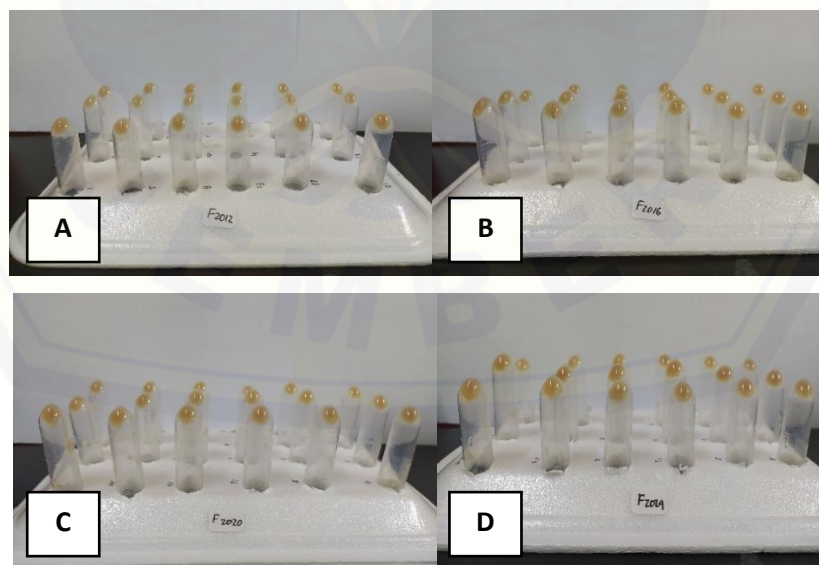




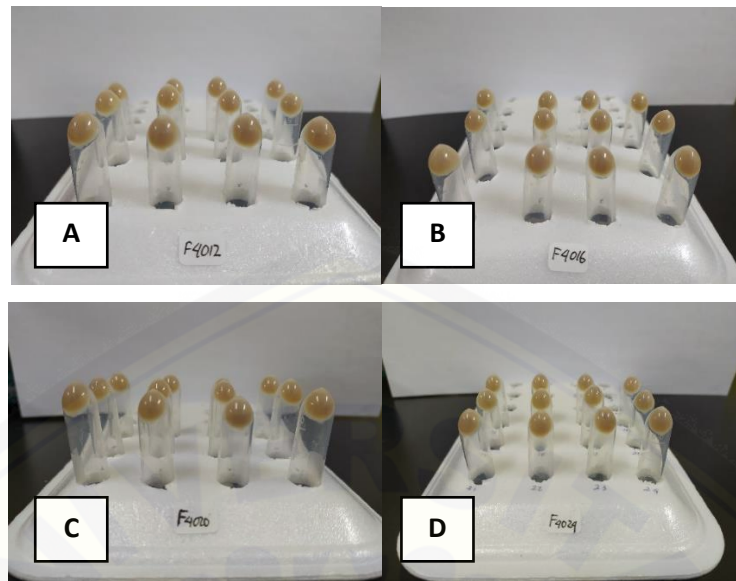
Gambar 4. Hati kambing yang telah dilarutkan dalam buffer natrium borat



Gambar 5. Penambahan ammonium sulfat pada proses fraksinasi urikase



Gambar 6. Pelet fraksi 0-20% dengan waktu pengendapan 12 jam (A), 16 jam (B), 20 jam (C), dan 24 jam (D)



Gambar 7. Pelet fraksi 20-40% dengan waktu pengendapan 12 jam (A), 16 jam (B), 20 jam (C), dan 24 jam (D)