



**ISOLASI DAN PURIFIKASI ENZIM URIKASE DARI HATI KAMBING**

*(Capra aegagrus hircus)*

**SKRIPSI**

Oleh

**Nur Rizkiyatuz Sa'idah  
NIM 161810301033**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2021**



**ISOLASI DAN PURIFIKASI ENZIM URIKASE DARI HATI KAMBING**  
(*Capra aegagrus hircus*)

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Nur Rizkiyatuz Sa'idah**

**NIM 161810301033**

**JURUSAN KIMIA**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**2021**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada:

1. Ayahanda H. Agus Sugihartono dan Ibunda Nunung Iswatun Chasanah tercinta;
2. kakak dan adik yang selalu memberikan semangat dan mendukung penuh dalam keadaan apapun;
3. Bapak dan ibu guru/dosen yang telah memberikan ilmu di masing-masing jenjang Pendidikan;
4. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
5. teman-teman kimia Angkatan 2016 (Extasy) yang telah memberikan kenangan, *support* dan telah membantu dalam hal apapun sehingga bisa sampai dititik ini;
6. Alfi Rizkiyatuz S., Widya Palupi, dan Safira Maulidina A., sebagai saudara kandung sekaligus sahabat hidup yang selalu ada sampai kapanpun;
7. tim riset kimia analitik, fisik, organik, anorganik, dan biokimia yang telah menjadi tempat berbagi pengalaman suka duka saat penelitian;
8. Siti Adlha H. N., Achmad Fudhali, M. K. A. Joenata, dan Riki Juni K., sebagai tim riset urikase yang telah membantu, bertukar pikiran selama penelitian;
9. Salma Rona Abidah yang telah menjadi teman kosan yang selalu ada selama masa kuliah;
10. Siti Aisah yang telah menjadi sahabat sejak SMA, saling berbagi suka duka di kehidupan perkuliahan, memberikan dukungan sekaligus doa hingga bisa mencapai di titik ini;
11. Ika Far'ah Farizhi M. yang telah menjadi teman mencari inspirasi dan teman melepaskan keluh kesah selama perkuliahan;
12. Silvia Oniga S., Yunita Wahyuningtyas, Alfi Hidayati, Intan Diah P., dan Amanda Widyatmiko yang telah menjadi sahabat semenjak kuliah, saling

*support*, dan selalu membantu mempersiapkan dalam hal keberlangsungan ujian skripsi ini;

13. kak Eka Safitri dan Kak Nasrul Amaliyatun N. yang telah mengajari dan menyemangati saat penelitian;
14. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu



**MOTTO**

“Dan Tuhan memelihara ketidakpastian itu pada seluruh umat manusia agar manusia terus belajar, terus bermimpi dan ujung-ujungnya kita akan kembali padanya”<sup>1</sup>



---

<sup>1</sup> Dhirgantoro, Donny. 5cm. Indonesia: Grasindo

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nur Rizkiyatuz Sa'idah

NIM : 161810301033

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Isolasi dan Purifikasi Enzim Urikase dari Hati Kambing (*Capra aegagrus hircus*)” 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, 02 Februari 2021

Yang menyatakan,

Nur Rizkiyatuz Sa'idah

NIM 161810301033

**SKRIPSI**

**ISOLASI DAN PURIFIKASI ENZIM URIKASE DARI HATI KAMBING  
(*Capra aegagrus hircus*)**

Oleh

Nur Rizkiyatuz Sa'idah

NIM 161810301033

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : Ika Oktavianawati, S.Si., M.Sc.

**PENGESAHAN**

Skripsi yang berjudul “Isolasi dan Purifikasi Enzim Urikase dari Hati Kambing (*Capra aegarus hircus*)” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

hari, tanggal :  
tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas  
Jember

Tim penguji:

Ketua,

Anggota I,

drh. Wuryanti Handayani, M.Si  
NIP 196008221985032002

Ika Oktavianawati, S.Si., M.Sc  
NIP 197003031999032001

Anggota II,

Anggota III,

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

Asnawati, S.Si., M.Si  
NIP 196808141999032001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Jember

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



## RINGKASAN

**Isolasi dan Purifikasi Enzim Urikase dari Hati Kambing (*Capra aegagrus hircus*):** Nur Rizkiyatuz Sa'idah; 161810301033; 2020: 70 Halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Asam urat merupakan merupakan produk akhir dari metabolisme purin yang tidak dapat dimetabolisme lebih lanjut, hal ini dikarenakan pada manusia tidak memiliki agen pendegradasi asam urat. Asam urat yang tidak dapat didegradasi akan adanya penumpukan asam urat yang berlebih yang mengakibatkan penyakit hiperurisemia dan gout. Permasalahan penyakit hiperurisemia maupun gout dapat diatasi jika pada manusia memiliki agen pendegradasi asam urat dengan bantuan aktivitas enzim urikase yang berasal dari sumber lain. Penelitian ini menggunakan hati kambing sebagai sumber penghasil urikase yang dilakukan tahapan isolasi (ekstraksi). *Crude enzyme* yang diperoleh, dilanjutkan dengan tahapan purifikasi yaitu fraksinasi menggunakan ammonium sulfat 0-20% dan dialisis pada variasi pH 7,5 dan 8,5 maupun waktu *running* dialisis 8, 12 serta 16 jam guna mengetahui aktivitas urikase terbaik.

Aktivitas urikase *crude enzyme* terbesar ada pada Supernatan 1 (0,0243 U/mL). Supernatan 2 (0,0159 U/mL) dan Supernatan campuran (0,0215 U/mL) memiliki aktivitas urikase yang lebih kecil dibandingkan Supernatan 1 dengan nilai yield berturut-turut sebesar 65,43% dan 88,48% terhadap Supernatan 1. Nilai yield terbesar dimiliki oleh Supernatan 1 yang menandakan bahwa jumlah  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  yang terbentuk per menitnya oleh enzim urikase semakin banyak sehingga bisa disimpulkan bahwa urikase semakin terkonsentrasi.

Aktivitas urikase hasil purifikasi terbesar dimiliki oleh dialisat pada natrium borat pH 8,5 selama 16 jam sebesar 0,0281 U/mg. Besarnya aktivitas urikase sangat dipengaruhi oleh pH buffer natrium borat pada keadaan optimumnya. Keadaan dibawah pH optimum urikase seperti pada saat dialisis dilakukan dalam buffer natrium borat pH 7,5 memiliki nilai aktivitas urikase yang lebih kecil jika dibandingkan aktivitas urikase dialisat pada buffer natrium borat pH 8,5 dan fraksi

urikase 0-20%. Waktu running dialisis yang semakin lama pada kondisi optimum urikase (pH 8,5) maka aktivitas urikase akan semakin meningkat, akan tetapi berbanding terbalik pada saat dialisis di *running* dalam buffer natrium borat pH 7,5. Urikase yang berinteraksi dengan ion buffer natrium borat dibawah pH optimum urikase akan memungkinkan terjadinya denaturasi.



## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Isolasi dan Purifikasi Enzim Urikase dari Hati Kambing (*Capra aegagrus hircus*)”. 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. Bapak Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
2. Bapak Dr. Bambang Piluharto, S.Si., M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
3. Ibu drh. Wuryanti Handayani, M.Si. selaku dosen pembimbing utama sekaligus dosen pembimbing akademik dan Ibu Ika Oktavianawati, S.Si., M.Sc. selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran dan perhatiannya dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi ini;
4. Bapak I Nyoman Adi Winata, S.Si., M.Si. selaku dosen penguji utama dan Ibu Asnawati S.Si., M.Si. selaku dosen penguji anggota yang telah meluangkan waktu dan memberikan masukan maupun kritik dalam penelitian ini;
5. Bapak/Ibu dosen Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang telah mengajar, memberikan ilmu pengetahuan serta telah menginspirasi dalam hal pendidikan;

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

Jember, 02 Februari 2021

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>ii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>iv</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian .....</b>	<b>3</b>
<b>1.5 Batasan Masalah .....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Kambing .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Hati Kambing .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Asam Urat .....</b>	<b>6</b>
2.3.1 Pengertian Asam Urat .....	6
2.3.2 Mekanisme Kerja Terbentuknya Asam Urat .....	8
<b>2.4 Urikase .....</b>	<b>9</b>
<b>2.5 Teknik Isolasi .....</b>	<b>11</b>
2.5.1 Sentrifugasi .....	11
2.5.2 Frakisanasi .....	11
2.5.3 Dialisis .....	11
<b>2.6 Uji Aktivitas .....</b>	<b>13</b>
2.6.1 Spektrofotometer UV/Vis .....	13
<b>BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Alat dan Bahan .....</b>	<b>15</b>
3.2.1 Alat .....	15
3.2.2 Bahan .....	15

<b>3.3 Rancangan Penelitian .....</b>	<b>16</b>
<b>3.4 Skema Kerja .....</b>	<b>17</b>
3.4.1 Scanning Panjang Gelombang Quinonimine .....	17
3.4.2 Pembuatan Kurva Standar .....	17
3.4.3 Preparasi Sampel .....	18
3.4.4 Isolasi Enzim Urikase .....	18
3.4.5 Fraksinasi dengan Ammonium Sulfat .....	18
3.4.6 Dialisis .....	19
3.4.7 Karakterisasi Enzim .....	19
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Aktivitas Urikase <i>Crude Enzyme</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2 Aktivitas Urikase Hasil Purifikasi .....</b>	<b>24</b>
<b>BAB 5. PENUTUP .....</b>	<b>30</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>30</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>30</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>31</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>36</b>

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Kambing kacang .....	5
2.2 Struktur asam urat .....	7
2.3 Katabolisme purin membentuk asam urat .....	9
2.4 Pembentukan asam urat dari purin .....	10
2.5 Mekanisme degradasi asam urat menjadi allantoin .....	11
2.6 Pemisahan dengan dialisis .....	13
2.7 Reaksi pembentukan senyawa <i>quinonimine</i> .....	14
4.1 Grafik perbandingan aktivitas total supernatan .....	22
4.2 Grafik perbandingan kadar protein supernatan .....	22
4.3 Grafik perbandingan aktivitas spesifik supernatan .....	23
4.4 Grafik perbandingan aktivitas total fraksi urikase dan dialisat .....	25
4.5 Grafik perbandingan kadar protein fraksi urikase dan dialisat .....	27
4.6 Grafik perbandingan aktivitas spesifik fraksi urikase dan dialisat .....	28

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Preparasi Larutan .....	36
1.1 Pembuatan larutan standar hydrogen peroksida .....	36
1.2 Pembuatan larutan asam urat 2 mM .....	36
1.3 Pembuatan larutan fenol 1,5% .....	36
1.4 Pembentukan buffer kalium fosfat 0,1 M pH 7 .....	36
1.5 Pembuatan reagen Bradford .....	37
1.6 Pembuatan larutan 4-aminoantipirin 30 mM .....	37
1.7 Pembuatan larutan enzim peroksidase 15 U/mL .....	37
1.8 Pembuatan buffer natrium borat 0,1 M pH 8,5 .....	37
1.9 Pembuatan larutan standar Bovin Serum Albumin (BSA) .....	37
Lampiran 2 Tabel Persen Kejenuhan Ammonium Sulfat .....	39
Lampiran 3 Preparasi Kantung Dialisis .....	40
Lampiran 4 Data dan Perhitungan .....	41
4.1 Tabel pengukuran absorbansi larutan standar Bovine Serum Albumin (BSA) .....	41
4.2 Kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA) .....	41
4.3 Kurva <i>scanning</i> panjang gelombang maksimum <i>quinonimine</i> .....	42
4.4 Tabel pengukuran absorbansi larutan standar H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	42
4.5 Kurva standar H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	43
4.6 Perhitungan konsentrasi H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	43
4.7 Perhitungan aktivitas total urikase .....	44
4.8 Tabel aktivitas total urikase .....	45
4.9 Perhitungan kadar protein .....	46
4.10 Perhitungan aktivitas spesifik urikase .....	46
4.11 Tabel kadar protein .....	47
4.12 Tabel aktivitas spesifik urikase .....	48
4.13 Perhitungan nilai yield .....	49
4.14 Perhitungan faktor purifikasi .....	49



4.15 Tabel efektivitas urikase .....	50
Lampiran 5 Dokumentasi Penelitian .....	51



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Asam urat (*2,6,8-trioxypurine*) merupakan produk akhir dari metabolisme purin. Senyawa asam urat tersusun dari karbon, nitrogen, dan oksigen (Abou-Elela, 2017). Asam urat didalam tubuh manusia tidak dapat dimetabolisme lebih lanjut, hal ini dikarenakan pada manusia tidak memiliki aktivitas pendegradasi asam urat. Akibat yang akan terjadi yaitu adanya penumpukan asam urat dan tidak dapat dikeluarkan melalui saluran pencernaan sehingga berdampak pada penyakit hiperurisemia maupun gout terhadap akumulasi yang melebihi batas normal (Barsoum and El-Khatib, 2017). Asam urat yang tidak dapat terdegradasi secara langsung menyebabkan pada manusia membutuhkan mikroorganisme atau sumber lain yang mampu mendegradasi asam urat menjadi senyawa yang lebih sederhana (Li *et al.*, 2012).

Degradasi asam urat terjadi pada tanaman, hewan, maupun mikroorganisme. Beberapa peneliti melakukan penelitian untuk mengisolasi dan mempurifikasi enzim urikase, salah satunya berasal dari organ hewan seperti pada organ hati atau ginjal. Ekstraksi dan karakterisasi enzim pepsin dari lambung ikan oleh (Pasaribu *et al.*, 2018) menghasilkan nilai aktivitas spesifik terbesar yaitu sebesar 5,138 U/mg pada waktu dialisis selama 12 jam. Rajoka *et al.* (2006) melakukan isolasi, purifikasi dan karakterisasi enzim urikase dari ginjal sapi memberikan hasil berat molekul sebesar 70 kDa, dan stabil pada pH 8,5. Isolasi yang dilakukan merupakan isolasi bertingkat dengan menggabungkan 4 supernatan hasil ekstraksi berikutnya terhadap residu atau pelet yang diperoleh dan selanjutnya dilakukan pengujian. Beberapa isolasi selain bersumber dari organ yaitu pada penelitian Geweely and Nawar (2011) telah melakukan isolasi urikase pada spesies jamur yaitu *Aspergillus niger* menghasilkan pH optimum sebesar 8,0 dengan aktivitas enzim urikase terbesar yaitu 12,90 U/mL. Abdullah and Flayyih (2015) melakukan isolasi urikase dari *Pseudomonas aeruginosa* dengan aktivitas spesifik urikase terbesar sebesar 2337,5 U/mg yang diperoleh pada suhu 45°C dan pada pH optimal 9,0. Sumber lain menurut Al-Atraqchi and Al-Mosawi (2012) juga melakukan isolasi enzim urikase

dari *Pseudomonas aeruginosa* dan memperoleh pH optimum yaitu pada rentang pH 8,5-9. Urikase yang bersumber dari hati babi menurut Sanders *et al* (1980) dan hati unta menurut Osman *et al* (1989) juga telah berhasil di isolasi. Murray *et al* (2012) menyatakan bahwa pH larutan yang bernilai lebih kecil akan memiliki konsentrasi garam yang lebih rendah, begitu juga sebaliknya. Stabilitas urikase menurut Yelchuri (2012) berada pada kisaran pH 5,0-11,0.

Aktivitas spesifik urikase dapat meningkat setelah dilakukan tahapan purifikasi melalui fraksinasi dengan ammonium sulfat dan dialisis (Al-Atraqchi and Al-Mosawi, 2012). Purifikasi enzim urikase dilakukan terhadap *crude enzyme* urikase yang diperoleh melalui tahapan ekstraksi menggunakan larutan buffer. Fraksinasi didasarkan pada sifat enzim sebagai protein yang memiliki perbedaan kelarutan dengan menggunakan kadar garam tinggi untuk mengendapkan protein (Lehninger, 1995). Purifikasi selanjutnya yaitu dialisis untuk meningkatkan kemurnian enzim urikase. Tahapan dialisis menggunakan bantuan sebuah membran semi-permeabel yang akan menekan terjadinya proses migrasi molekul berukuran kecil untuk keluar ataupun masuk melalui membran. Aktivitas spesifik urikase meningkat dari 16,34 U/mg protein menjadi 28,52 U/mg protein setelah dilakukan tahapan purifikasi (Al-Atraqchi and Al-Mosawi, 2012).

Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya banyak menggunakan hati hewan. Hal ini dikarenakan sel-sel hati merupakan salah satu tempat berlangsungnya proses metabolisme asam urat atau metabolisme purin yang menghasilkan senyawa allantoin (senyawa lebih sederhana) dari pemecahan senyawa asam urat (Usuda *et al.*, 1994). Degradasi asam urat terbesar ditemukan pada jenis mamalia kecuali primata karena mampu mengubah senyawa asam urat menjadi senyawa allantoin (senyawa 10-100 kali lebih mudah larut dalam air) oleh bantuan enzim urikase (Abou-Elela, 2017). Pemilihan hati kambing sebagai sumber untuk isolasi enzim urikase dikarenakan kambing merupakan hewan berjenis mamalia dan hati dipilih sebagai salah satu tempat berlangsungnya proses metabolisme asam urat (Pribadiningtyas *et al.*, 2012).

Berdasarkan keterangan diatas maka dapat dilakukan penelitian mengenai isolasi dan pemurnian enzim urikase dari jenis hati kambing. Karakteristik urikase

pada jenis hati kambing akan memiliki hasil yang berbeda ketika diberikan perlakuan yang berbeda seperti diberikan perlakuan variasi pH buffer saat dialisis dan lamanya waktu *running* dialisis, sehingga memungkinkan adanya perbedaan aktivitas enzim total maupun aktivitas spesifik urikase. Tahap awal pemurnian ini dilakukan dengan pengendapan enzim menggunakan ammonium sulfat optimum selanjutnya dilakukan tahapan dialisis untuk mengetahui aktivitas spesifik urikase dari hati kambing.

### 1.2 Rumusan Masalah

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

1. Bagaimana aktivitas *crude enzyme* dari hasil isolasi hati kambing?
2. Bagaimana aktivitas enzim urikase yang telah dilakukan purifikasi?

### 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan adalah:

1. Mengetahui aktivitas *crude enzyme* dari hasil isolasi hati kambing.
2. Mengetahui aktivitas enzim urikase yang telah dilakukan purifikasi.

### 1.4 Manfaat

Manfaat yang dapat diberikan dari hasil penelitian yaitu dapat dijadikan sebagai informasi baru mengenai kondisi optimum pada saat pemurnian enzim urikase dalam metode dialisis, sehingga untuk prospek jangka panjangnya dapat diaplikasikan pada pencegahan penumpukan asam urat didalam tubuh manusia dengan terapi urikolitik.

### 1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah yang dapat diberikan adalah sebagai berikut:

1. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur produk yang terbentuk hasil hidrolisis asam urat (senyawa  $H_2O_2$ ).

2. Purifikasi yang dilakukan adalah fraksinasi dan dialisis.
3. Jenis kambing yang digunakan adalah kambing kacang yang diperoleh dari tempat penyembelihan kambing di jalan HOS Cokroaminoto IV Kelurahan Jember Kidul Kecamatan Kaliwates.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kambing

Kambing merupakan salah satu jenis ternak ruminansia yang berperan penting dalam penyediaan daging untuk masyarakat (Yustendi *et al.*, 2016).

Kambing diklasifikasikan ke dalam :

Kerajaan	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Artiodactyla
Famili	: Bovidae
Genus	: Capra
Spesies	: <i>C. aegagrus</i>
Upaspecies	: <i>Capra aegagrus hircuss</i>

Jenis pakan hewan ruminansia secara garis besar dikelompokkan ke dalam dua golongan, yaitu berupa hijauan dan konsentrat. Contoh pakan ternak golongan hijauan seperti rumput (*graminae*), daun-daunan serta kacang-kacangan (*leguminosa*) dengan kandungan air rata-rata 70-80% (Januardi, 2010). Pakan ternak golongan pakan penguat (konsentrat) mampu menyumbangkan energi, protein, mineral dan vitamin. (Sarwono, 2007). Kambing kacang dapat ditunjukkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Kambing Kacang

## 2.2 Hati

Fungsi hati secara kompleks yaitu dalam metabolisme karbohidrat, lemak, protein, maupun zat besi. Hati juga memiliki peranan penting dalam sekresi empedu, detoksifikasi, pembentukan sel darah merah, dan penyerapan vitamin. Berat, ukuran, serta warna hati dapat dibedakan tergantung dari bangsa, umur, dan status nutrisi individu ternak. Individu ternak yang memiliki hati dengan kondisi baik akan berwarna coklat kemerahan atau coklat terang sedangkan jika individu ternak mengkonsumsi makanan berlemak tinggi maka hati akan berwarna kuning (Hamdani dan Reza, 2015). Mamalia sebagian besar memiliki aktivitas urikase dan mampu merombak asam urat menjadi allantoin. Enzim urikase secara spesifik dikaitkan dengan inti kristaloid yang ada di peroksisom dalam sel parenkim hepatik (hati). Allantoin hasil perombakan asam urat oleh enzim urikase dalam peroksisom akan diekskresikan dalam urin (Usuda *et al.*, 1994).

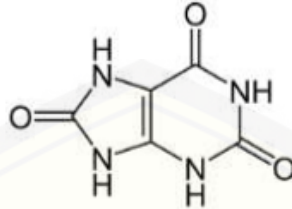
Hati memiliki tiga lobus antara lain lobus dorsalis, lobus caudatus, dan lobus ventralis. Hati dikelilingi oleh kapsula fibrosa yang dinamakan kapsul glisson dan dibungkus peritoneum pada sebagian besar permukaanya (Hadi, 2002). Menurut (Usuda *et al.*, 1994) hati kambing memiliki enzim pendegradasi asam urat yaitu enzim urikase yang terletak dalam organ hati.

## 2.3 Asam Urat

### 2.3.1 Pengertian Asam Urat

Asam urat merupakan suatu senyawa kimia hasil akhir dari metabolisme *nucleic acid* atau metabolisme purin dalam tubuh. Asam urat merupakan senyawa dengan rumus molekul  $C_5H_4N_4O_3$  (7,9-dihidro-1H-purin-2,6,8(3H)-trione) dan merupakan senyawa organik heterosiklik. Asam urat memiliki kelarutan dalam air yang rendah (Maiuolo *et al.*, 2016). Struktur senyawa asam urat dengan rumus molekul  $C_5H_4N_4O_3$  dapat ditunjukkan pada Gambar 2.2. Asam urat pada pH salkali kuat akan membentuk ion urat dua kali lebih banyak daripada pH asam. Purin yang berasal dari katabolisme asam nukleat dalam diet diubah menjadi asam urat secara langsung. Pemecahan nukleotida purin terjadi di semua sel, tetapi asam urat hanya dihasilkan oleh jaringan yang mengandung *xhantine oxidase* terutama di hepar dan

usus kecil. Rerata sintesis asam urat endogen setiap harinya adalah 300-600 mg per hari, dari diet 600 mg per hari lalu dieksresikan ke urin rerata 600 mg per hari dan ke usus sekitar 200 mg per hari (Nasrul and Sofitri, 2012).



Gambar 2.2 Struktur Asam Urat (Sumber: Nasrul and Sofitri, 2012).

Asam urat pada pH alkali kuat akan membentuk ion urat dua kali lebih banyak daripada pH asam. Purin yang berasal dari katabolisme asam nukleat dalam diet diubah menjadi asam urat secara langsung. Pemecahan nukleotida purin terjadi di semua sel, tetapi asam urat hanya dihasilkan oleh jaringan yang mengandung *xanthine oxidase* terutama di hepar dan usus kecil. Rerata sintesis asam urat endogen setiap harinya adalah 300-600 mg per hari, dari diet 600 mg per hari lalu dieksresikan ke urin rerata 600 mg per hari dan ke usus sekitar 200 mg per hari (Nasrul and Sofitri, 2012).

Asam urat di lingkungan merupakan suatu sumber yang kaya akan nitrogen (33% dari berat asam urat total) pada kehidupan tanaman, oleh karena itu asam urat memiliki peranan penting dalam rantai makanan secara universal. Asam urat bagi hewan lebih banyak di eksresikan, akibatnya pencukupan nutrisi dapat terjamin pada suatu ekosistem. Hewan yang tidak mampu memenuhi kebutuhan energi untuk ekskresi asam urat akan lebih suka mengubahnya menjadi senyawa yang mudah larut dengan bantuan enzim urikase fungsional. Mamalia selain primata dan dipteras karnivora mampu mengubah asam urat menjadi allantoin dengan bantuan enzim urikase fungsional tersebut. Asam urat bagi primata, salah satunya pada manusia memilih untuk menyimpan asam urat dalam lingkungan internalnya sendiri. Penyimpanan asam urat yang berlebihan atau penimbunan asam urat akan berdampak buruk bagi manusia itu sendiri (Barsoum and El-Khatib, 2017).

Menurut (Suhendi and Sutrisna, 2011) bahwa 90% dari asam urat merupakan hasil katabolisme purin yang dibantu oleh enzim guanase dan *xanthin oxidase*. Banyaknya purin yang dikonsumsi oleh manusia mengakibatkan asam urat akan

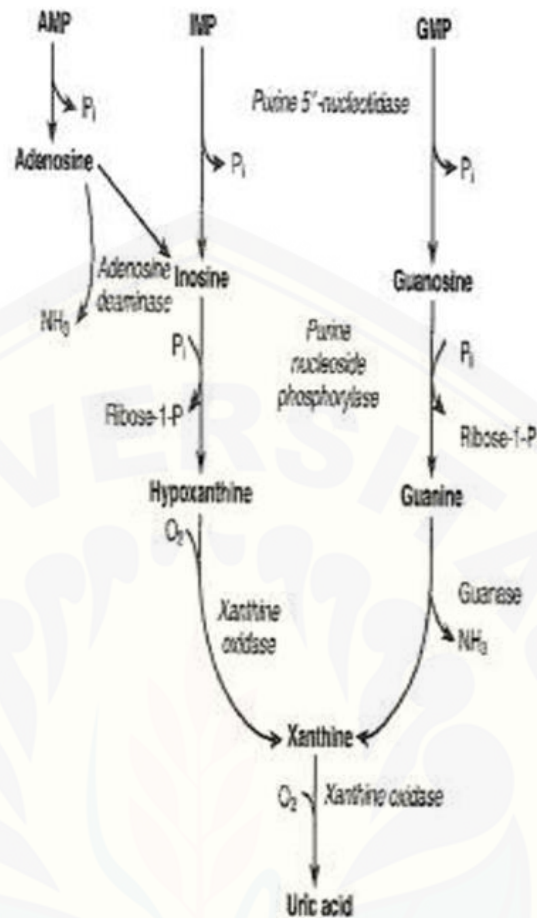


terbentuk semakin banyak juga. Asam urat akan dibawa ke ginjal melalui aliran darah untuk dikeluarkan bersama air seni. Ginjal akan mengatur kadar asam urat dalam darah agar selalu dalam keadaan normal. Asam urat yang berlebihan tidak mampu ditampung dan dimetabolisme seluruhnya oleh tubuh, maka akan terjadi peningkatan kadar asam urat dalam darah sehingga dapat menimbulkan berbagai penyakit salah satunya yaitu penyakit hiperurisemia. Hiperurisemia yang lanjut dapat berkembang menjadi gout (Suhendi and Sutrisna, 2011). Hiperurisemia adalah keadaan kadar asam urat dalam darah lebih dari 7,0 mg/dL (Nasrul and Sofitri, 2012).

### 2.3.2 Mekanisme Kerja Terbentuknya Asam Urat

Sintesis asam urat dimulai dari terbentuknya basa purin dari gugus ribosa, yaitu *5-phosphoribosyl-1-pirophosphat* (PRPP) yang didapat dari ribose-5-fosfat ketika disintesis dengan ATP (*Adenosine triphosphate*) dan merupakan sumber gugus ribose. *Inosine monophosphate* (IMP) merupakan nukleotida purin pertama yang dibentuk dari gugus glisin dan mengandung basa *hipoxanthine*. *Inosine monophosphate* berfungsi sebagai titik cabang dari nukleotida adenin dan guanin. *Adenosine monophosphate* (AMP) berasal dari IMP melalui penambahan sebuah gugus amino aspartat ke karbon enam cincin purin dalam reaksi yang memerlukan GTP (*Guanosine triphosphate*). *Guanosine monophosphate* (GMP) berasal dari IMP melalui pemindahan satu gugus amino dari amino glutamin ke karbon dua cincin purin, reaksi ini membutuhkan ATP.

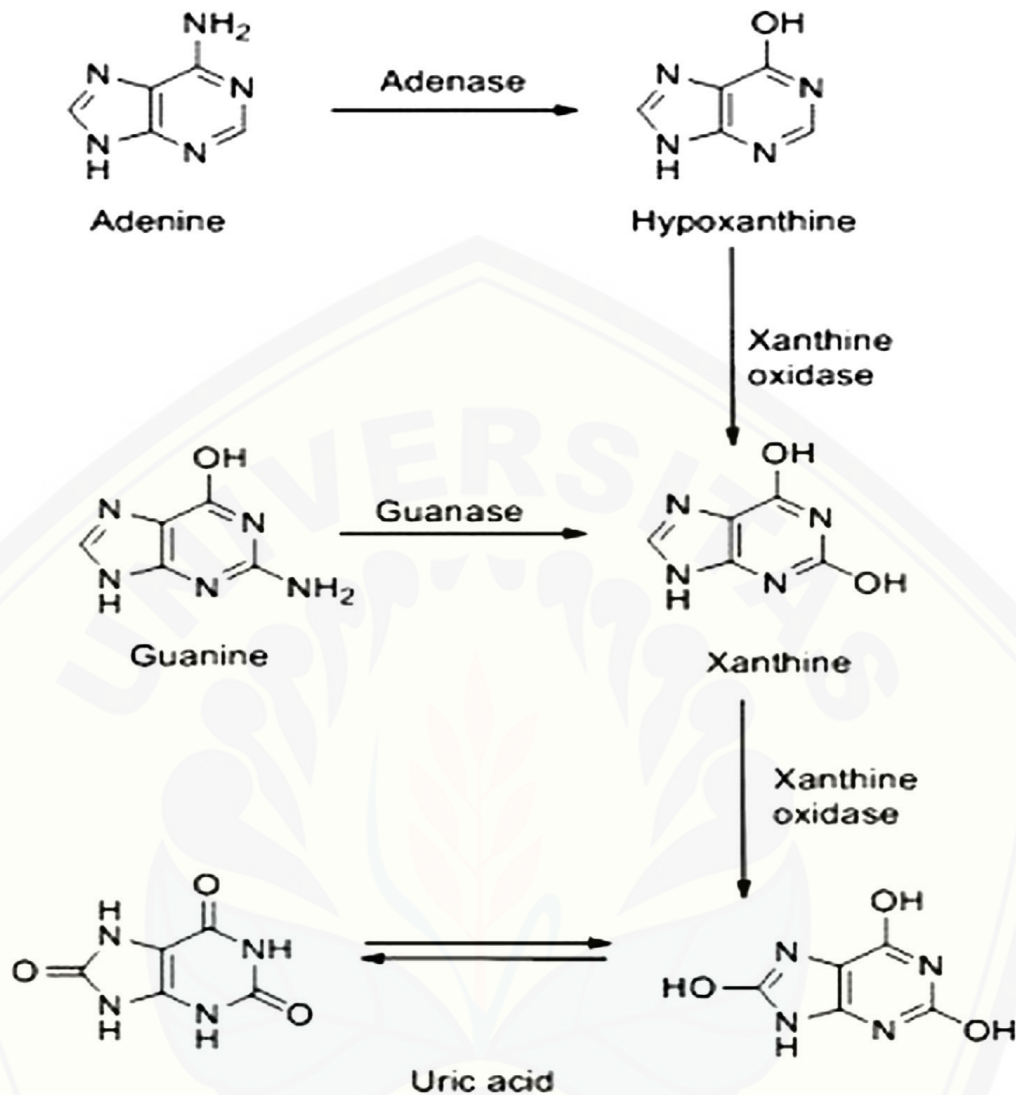
*Adenosine monophosphate* mengalami deaminasi menjadi inosin, kemudian IMP dan GMP mengalami defosforilasi menjadi inosin dan guanosin. Basa hipoxanthine terbentuk dari IMP yang mengalami defosforilasi dan diubah oleh *xhantine oxidase* menjadi *xhantine* serta guanin akan mengalami deaminasi yang juga akan menghasilkan *xhantine*. *Xhantine* akan diubah oleh *xhantine oxidase* menjadi asam urat. Rangkaian proses mekanisme pembentukan asam urat yang bersumber dari senyawa purin dapat disimpulkan berdasarkan Gambar 2.3 dan Gambar 2.4 (Nasrul and Sofitri, 2012).



Gambar 2.3 Katabolisme purin membentuk asam urat (Sumber: Nasrul and Sofitri, 2012).

## 2.4 Urikase

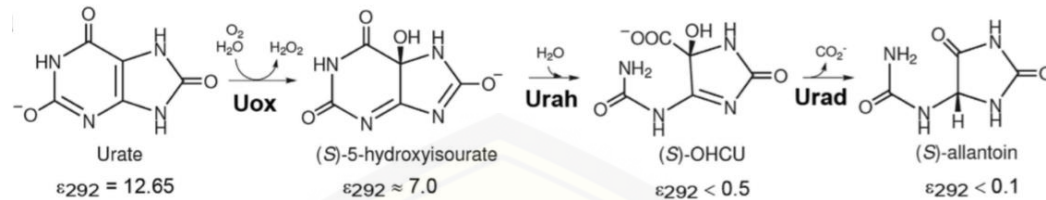
Asam urat dikatabolisme menjadi allantoin oleh urikase pada kebanyakan vertebrata kecuali manusia, beberapa primata, burung, dan beberapa spesies reptil. Oksidase asam urat atau biasa yang disebut urikase merupakan enzim homotetramer tidak berkofaktor yang bekerja untuk mengkatalisis hidroksilasi urat menjadi senyawa 5-hydroxyisourate dengan bantuan molekul oksigen (Estarellas *et al.*, 2011). Mekanisme degradasi asam urat atau perombakan asam urat dengan bantuan urikase dapat ditunjukkan pada Gambar 2.5. Urikase adalah enzim dengan ikatan tembaga yang mengkatalisis pembukaan cincin purin pada asam urat untuk membentuk allantoin, dimana senyawa allantoin merupakan senyawa yang memiliki tingkat kelarutan yang besar (5-10 kali lebih larut daripada asam urat) (Pfrimer *et al.*, 2010).



Gambar 2.4 Pembentukan asam urat dari purin (Sumber: Hafez *et al.*, 2017).

Urikase adalah enzim yang penting secara medis dan evolusi. Ketidakmampuan untuk mendegradasi asam urat menyebabkan peningkatan konsentrasi urat dalam darah. Kondisi ini yang membedakan parameter hematologis antara hominoid dan mamalia lainnya. Kelebihan urat serum (hiperurisemia) umumnya didefinisikan pada manusia untuk konsentrasi melebihi  $400 \mu\text{M}$ , sedangkan konsentrasi normal urat dalam serum manusia ( $160\text{-}360 \mu\text{M}$ ) sekitar sepuluh kali lebih tinggi daripada mamalia yang memiliki enzim urikase fungsional (Marchetti *et al.*, 2016). Pada burung, reptil, dan beberapa mamalia yang tinggal di gurun (tikus dan kanguru) asam urat juga merupakan produk akhir

dari metabolisme purin, tetapi diekskresikan dalam tinja sebagai massa kering (Suryanarayana and Mistry, 2016).



Gambar 2.5 Mekanisme degradasi asam urat menjadi allantoin (Sumber: Marchetti *et al.*, 2016).

## 2.5 Teknik Isolasi

### 2.5.1 Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan salah satu metode yang menggunakan prinsip mekanik (Chairil and Anwar, 2016). Gaya sentrifugal didefinisikan sebagai gaya semu pendorong benda untuk menjauhi titik pusat putar terhadap benda yang berputar pada kerangka non-inersia. Kerangka non-inersia pada alat sentrifugasi adalah botol tempat suspensi ditempatkan seperti tabung eppendorf atau tabung reaksi, dimana botol tersebut berfungsi untuk menjaga suspensi agar tidak tumpah. Efek gaya sentrifugal akan mendorong setiap molekul-molekul menjauhi titik pusat putar (Aji *et al.*, 2019).

Partikel-partikel koloid yang biasa disebut suspensi sebagai contoh protein yang diendapkan dalam larutan dapat dipisahkan dengan memutar sampel dalam sentrifus, sehingga akan terbentuk dua fase. Fraksi yang terbentuk disebut sebagai supernatan yaitu fraksi berupa larutan yang mengandung protein target dan pelet yaitu fraksi berupa endapan yang mengumpul di dasar tabung dan mengandung pengotor. Sampel biokimia beberapa tidak tahan terhadap panas dan jika terkena panas berlebih bisa mengalami denaturasi protein, akibatnya sampel tersebut membutuhkan sentrifugasi pada suhu rendah dan dipertahankan selama proses sentrifugasi berlangsung (Aji *et al.*, 2019).

### 2.5.2 Fraksinasi

Purifikasi parsial (fraksinasi) merupakan tahapan purifikasi awal pada enzim target yang bertujuan untuk pemekatan konsentrasi enzim. Tahapan purifikasi

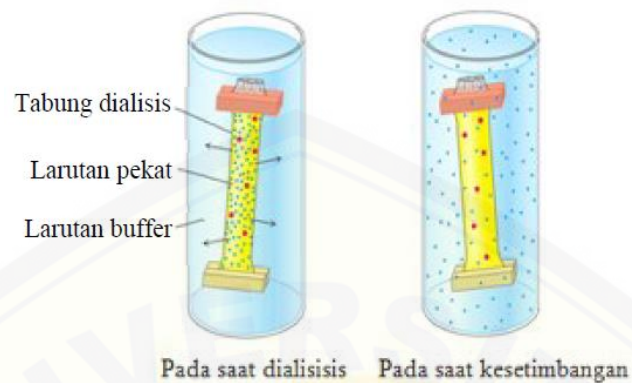
parsial enzim bisa dilakukan melalui cara pengendapan protein. Pengendapan protein bertujuan untuk memisahkan protein dengan komponen non protein. Pengendapan protein secara *salting out* dilakukan dengan penambahan garam ammonium sulfat (Poernomo *et al.*, 2014). Senyawa amonium sulfat merupakan jenis garam dengan kekuatan ionik yang tinggi, kelarutan tinggi dalam air, murah, tidak berbahaya, memiliki efek penstabil enzim serta tidak merusak protein sehingga metode fraksinasi banyak dimanfaatkan (Nurhayati *et al.*, 2018).

Konsentrasi ammonium sulfat yang ditambahkan untuk mendapatkan aktivitas spesifik enzim yang maksimum dan nilai aktivitas spesifik bervariasi untuk setiap sampel (Poernomo *et al.*, 2014). Tahapan fraksinasi akan menghasilkan supernatan maupun pelet setelah dilakukan penambahan ammonium sulfat yang selanjutnya di sentrifugasi. Supernatan yang dihasilkan mengandung beberapa protein target dan banyak protein lainnya sedangkan pelet mengandung lebih banyak protein target. Protein target yang masih berada di dalam larutan dilakukan proses pengulangan pada tahapan fraksinasi kembali untuk mendapatkan protein target keseluruhan. Protein target yang telah terkumpul sebagai pelet yang nantinya akan dilanjutkan pada tahapan dialisis guna mendapatkan protein target murni (Wang *et al.*, 2007).

### 2.5.3 Dialisis

Penghilangan garam amonium sulfat berlebih dilakukan melalui tahapan dialisis dalam larutan buffer dengan kadar garam rendah dan menggunakan bantuan membran selofan (Wang *et al.*, 2007). Dialisis merupakan suatu proses perpindahan garam ammonium sulfat maupun molekul kecil seperti pelarut melalui membran. Konsentrasi buffer di luar membran selofan lebih rendah dibandingkan di dalam membran selofan, sehingga akan terjadi perpindahan garam ammonium sulfat dari dalam membran dan membawa garam tersebut keluar dari membran. Garam melalui proses adsorpsi pada permukaan membran dan selanjutnya bergerak dari sisi membran yang satu ke sisi membran yang lain. Tahapan dialisis juga bisa dipengaruhi berdasarkan ukuran molekul yang melewati pori membran. Molekul-molekul kecil akan mampu berdifusi melintasi membran, sedangkan enzim (protein

target) yang memiliki ukuran lebih besar akan tertahan di dalam membran selofan (Kasmawati, 2017). Pemisahan dengan dialisis dapat ditunjukkan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Pemisahan dengan dialisis (Sumber: Rohishoh, 2012).

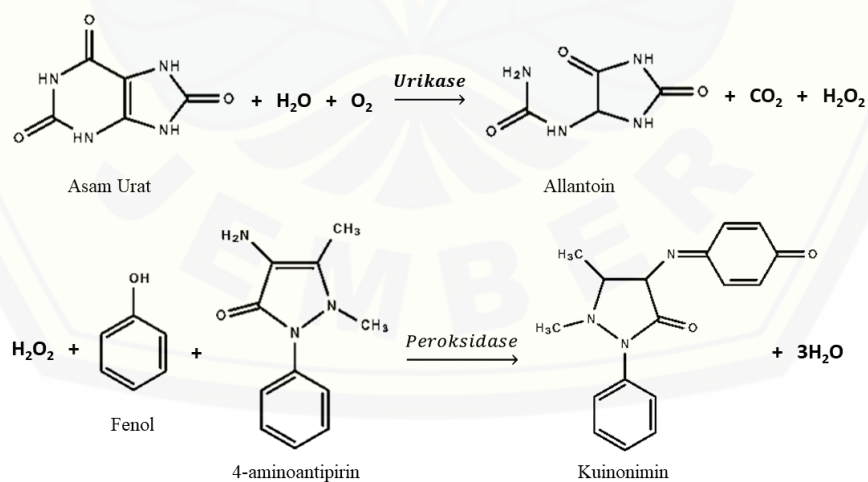
## 2.6 Uji aktivitas

### 2.6.1 Spektrofotometer UV/Vis

Metode spektrofotometri merupakan metode pengukuran secara kuantitatif yang didasarkan pada sifat pantulan atau transmisi suatu material sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrofotometer merupakan jenis alat fotometer (alat untuk mengukur intensitas cahaya) yang dapat mengukur intensitas sebagai fungsi dari panjang gelombang sumber cahaya. Peralatan spektrofotometer UV-vis beberapa dimanfaatkan untuk penentuan asam urat dalam urin karena merupakan prosedur yang menarik dan banyak digunakan dalam analisis, salah satunya analisis suatu percobaan dalam laboratorium (Hamzah, 2013).

Radiasi atau cahaya putih yang dilewatkan melalui larutan berwarna, maka radiasi dengan panjang gelombang tertentu akan diserap (absorpsi) secara selektif dan radiasi lainnya akan diteruskan (transmisi). Absorbansi adalah perbandingan intensitas sinar yang diserap dengan intensitas sinar datang. Nilai absorbansi ini akan bergantung pada kadar zat yang terkandung di dalamnya, semakin banyak kadar zat yang terkandung dalam suatu sampel maka semakin banyak molekul yang akan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu sehingga nilai absorbansi semakin besar (absorbansi akan berbanding lurus dengan konsentrasi zat yang terkandung didalam suatu sampel). (Neldawati *et al.*, 2013).

Cahaya yang diserap dan dapat terukur disebut sebagai absorbansi (A) sedangkan cahaya yang dihamburkan dapat terukur sebagai transmitansi (T) melalui dasar-dasar hukum Lambert-Beer. Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa jumlah radiasi cahaya tampak yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan merupakan suatu fungsi eksponen dari konsentrasi zat dan ketebalan dari sel (kuvet) (Neldawati *et al.*, 2013). Proses analisis spektrofotometri beberapa membutuhkan sensitivitas terhadap warna reaksi. Metode umum pada spektrofotometer membutuhkan adanya kurva standar. Penentuan kurva standar dilakukan sama seperti tahapan pada larutan sampel dengan bantuan scanning panjang gelombang maksimum untuk mengetahui absorbansi maksimum. Panjang gelombang maksimum itulah yang digunakan sebagai acuan pengukuran absorbansi pada larutan sampel. Salah satu aplikasi yang menggunakan metode spektrofotometri adalah penentuan asam urat. Pengukuran asam urat ditentukan dengan cara mengukur absorbansi pada panjang gelombang 540 nm (Hamzah, 2013). Penelitian oleh Lee *et al* (2015) menggunakan spektrofotometri visibel dengan dasar pengukuran pada pembentukan senyawa *quinoneimine*. Reaksi pembentukan *quinoneimine* dapat dilihat pada Gambar 2.7. Satu unit urikase setara dengan jumlah enzim yang menghasilkan 1,0  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  per menit .



Gambar 2.7 Reaksi pembentukan senyawa *quinoneimine* (Sumber: Suhendi *et al.*, 2011)

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Juli 2020 sampai November 2020. sedangkan tempat yang digunakan pada saat penelitian adalah laboratorium biokimia, laboratorium analitik, laboratorium fisik, laboratorium organik dan laboratorium CDAST Universitas Jember.

### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

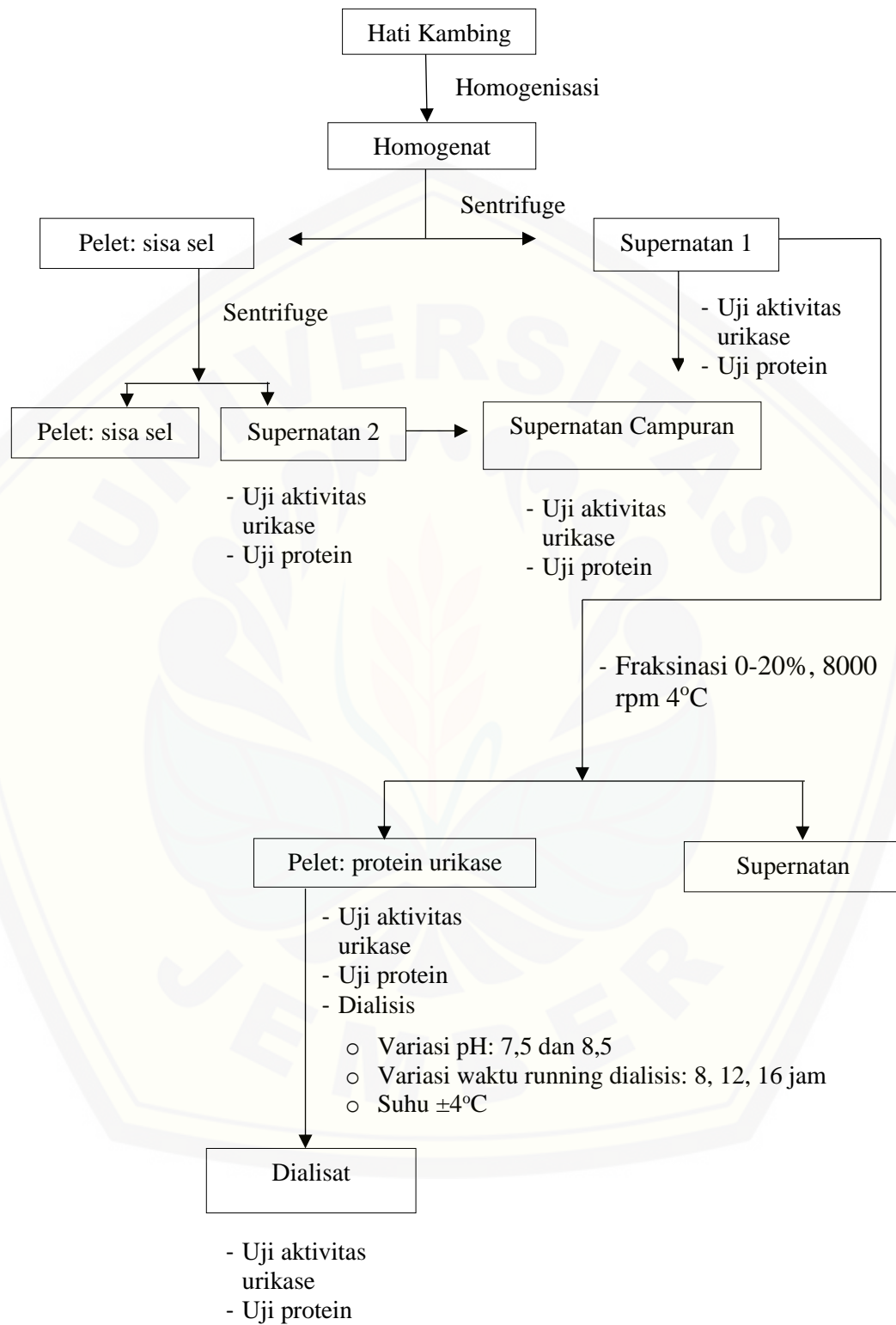
Alat-alat yang digunakan untuk ini meliputi sentrifuge, spektrofotometer visibel, labu ukur, batang pengaduk, spatula, *beaker glass*, corong gelas, gelas ukur, pipet tetes, pipet mohr, kaca arloji, pH meter, mikropipet, *magnetic stirrer*, botol semprot, inkubator, *ice bath*, timbangan analitik, alu, dan mortar.

#### 3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian isolasi dan karakterisasi enzim urikase pada hati kambing adalah sebagai berikut: hati kambing; hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ); asam urat (sigma-aldrict); 4-aminoantipirin; fenol; *horse radish peroxidase* (merck); asam fosfat ( $H_3PO_4$ ) 85%; akuades; NaOH; asam borat; Coomassie Brilliant Blue G-250; Etanol 97%; Ammonium sulfat  $(NH_4)_2SO_4$  (merck); Bovine Serum Albumin (BSA);  $K_2HPO_4$ ;  $KH_2PO_4$ ; kantung dialisis (membran).



### 3.3 Rancangan Penelitian



### 3.4 Skema Kerja

#### 3.4.1 Scanning Panjang Gelombang *Quinonimine*

Panjang gelombang *quinoneimine* yang berbeda pada beberapa literatur menurut Abdullah and Flayyih (2015) yaitu sebesar 540 nm dan Varadaraju *et al* (2018) sebesar 500 nm mengakibatkan dilakukannya scanning panjang gelombang untuk memperoleh panjang gelombang yang sesuai. *Quinoneimine* yang diperoleh dari hasil reaksi larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standar 0,015 mg/mL dengan 0,15 mL 4-*aminoantipirrine* (30 mM), 0,1 mL fenol (1,5%) dan 0,05 mL peroksidase (15 U/mL) yang diinkubasi pada suhu 37 °C dan waktu 4 jam diukur absorbansinya pada panjang gelombang dengan kisaran 400-800 nm. Panjang gelombang maksimum (panjang gelombang pada absorbansi tertinggi) yang diperoleh akan digunakan untuk pengukuran selanjutnya.

#### 3.4.2 Pembuatan Kurva Standar

##### a. Kurva standar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Variasi konsentrasi larutan standar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang digunakan yaitu sebesar 0,005; 0,01; 0,015; 0,02; 0,025 (mg/mL). Berdasarkan reaksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada gambar 2.7 dapat menghasilkan senyawa *quinoneimine* melalui pereaksian larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standar sebanyak 0,6 mL ditambah 0,1 mL buffer natrium borat pH 8,5 (0,1 M), 0,15 mL 4-*aminoantipirrine* (30 mM), 0,1 mL fenol (1,5%) dan 0,05 mL peroksidase (15 U / mL), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Penambahan 1 mL etanol dilakukan setelah inkubasi selesai. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh. Data absorbansi yang didapatkan kemudian digunakan untuk membuat kurva standar yang menyatakan hubungan absorbansi *quinoneimine* dengan konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

##### b. Kurva standar BSA

Variasi konsentrasi larutan standar BSA yaitu sebesar 0,15; 0,3; 0,45; 0,6; 0,75; 0,9; 1,05; 1,2; 1,35; 1,5 (mg/mL). Larutan standar sebanyak 0,039 mL ditambahkan dengan 1,95 mL reagen Bradford, selanjutnya diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Larutan blanko yang digunakan melalui metode yang sama

tanpa BSA dan selanjutnya dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer visible pada panjang gelombang sebanyak 595 nm.

#### 3.4.3 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari kambing yang diambil hatinya. Hati kambing diperoleh dari tempat penyembelihan kambing di jalan HOS Cokroaminoto IV Kelurahan Jember Kidul Kecamatan Kaliwates. Pengambilan hati pada kambing dilakukan dengan penyembelihan biasa yang dilakukan langsung dilokasi pembelian dan hati kambing langsung dipindahkan ke gelas dingin yang berisi es. Hati kambing dibawa ke laboratorium dalam kondisi tersebut dan langsung digunakan secepat mungkin. Hati kambing yang digunakan adalah hati kambing yang diperoleh ketika dalam keadaan *fresh*.

#### 3.4.4 Ekstraksi Urikase

Hati kambing sebanyak 100 g digerus atau ditumbuk menggunakan mortar dan alu serta diberikan tambahan pasir kuarsa. Hati kambing yang telah digerus dilarutkan dalam 1000 ml 0,1 M buffer natrium borat pH 8,5, selanjutnya disentrifugasi selama 30 menit (4°C, 8000 rpm). Ekstraksi kedua dilakukan terhadap pelet yang dihasilkan dari ekstraksi pertama. Buffer natrium borat 0,1 M pH 8,5 ditambahkan dengan volume yang sesuai ke dalam pelet untuk mencapai konsentrasi sebesar 10% dan disentrifugasi selama 30 menit (4°C, 8000 rpm). Supernatan hasil ekstraksi pertama dan kedua dilakukan pencampuran dengan perbandingan yang sama untuk menghasilkan supernatan campuran. Tiap supernatan dilakukan uji protein dengan metode Bradford menggunakan standar bovine serum albumin dan uji aktivitas.

#### 3.4.5 Fraksinasi Urikase dengan Ammonium sulfat

Supernatan dengan aktivitas urikase terbesar diendapkan menggunakan padatan ammonium sulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) konsentrasi 0-20%. Padatan ammonium sulfat 0-20% ditambahkan ke supernatan pada 4°C dengan pengadukan lembut menggunakan *magnetic stirrer* pada penangas es. Pelarutan ammonium sulfat yang

telah selesai dilakukan, selanjutnya campuran dibiarkan tetap pada suhu 4°C selama 16 jam, dan disentrifugasi pada 8000 rpm selama 30 menit pada 4°C. Fraksinasi menghasilkan pelet (Fraksi 0-20%) dan supernatan. Selanjutnya (Fraksi 0-20%) dilakukan uji aktivitas urikase dan uji protein dengan menggunakan metode Bradford.

#### 3.4.6 Dialisis

Langkah awal sebelum dilakukan tahapan dialisis yaitu perlunya mengaktivasi kantung dialisis (membran). Aktivasi kantung dialisis dijelaskan pada Lampiran 3 tentang preparasi kantung dialisis. Aktivasi diperlukan untuk menghilangkan senyawa-senyawa dari logam berat dan juga senyawa sulfur yang ada dalam kantung dialisis pada proses pembuatannya.

Endapan hasil presipitasi dimasukkan ke dalam kantung dialisis dengan ukuran 10 cm sebanyak 6 mL dan selanjutnya didialisis dengan merendam kantung dialisis dalam 500 mL larutan buffer natrium borat 0,1 M pH 7,5 dan 8,5. Dialisis dilakukan dengan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan yang tidak terlalu cepat agar tidak merusak kantung dialisis. Dialisis dilakukan pada suhu dingin selama 8, 12, 16 jam dengan penggantian pelarut setiap 4 jam sekali (Pasaribu *et al.*, 2018). Dialisat yang diperoleh, dilakukan uji aktivitas enzim dan uji protein.

#### 3.4.7 Karakterisasi Enzim

##### a. Uji protein

Uji protein dilakukan dengan melarutkan 0,039 mL pelet kedalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan 1,95 mL reagent Bradford dan diinkubasi selama 5 menit. Setelah itu dilakukan pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV/Vis pada panjang gelombang 595 nm.

$$\text{Kadar Protein (mg/ml)} = \frac{\text{Abs} \pm C}{m} \times fp$$

Keterangan:

m = nilai gradient dari persamaan kurva standar BSA

C = nilai intersept dari persamaan kurva standar BSA

Abs = nilai absorbansi larutan

(Zain, 2018).

b. Uji aktivitas urikase

Prinsip pengukuran enzim adalah sebagai berikut: urikase dapat mengkatalisis oksidasi asam urat menjadi allantoin, CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Suspensi urikase sebanyak 0,1 mL diinkubasi dalam 0,6 mL asam urat 2 mM, 0,15 mL 4-*aminoantipirrine* (30 mM), 0,1 mL fenol (1,5%) dan 0,05 mL peroksidase (15 U / mL). Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 4 jam. Untuk menghentikan reaksi, ditambahkan 1 mL etanol. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan secara spektrofometri visibel yang didasarkan pada pengukuran *quinoneimine* sebagai representasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang terbentuk selama proses reaksi enzimatik asam urat oleh urikase. Satu unit urikase setara dengan jumlah enzim yang menghasilkan 1,0 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per menit (Abdullah & Flayyih, 2015).

$$\text{Aktivitas enzim (U.ml}^{-1}\text{)} = \frac{([s]-[k]) \times Fp \times \left(\frac{V_{total}}{V_{enzim}}\right)}{t \times BM \text{ Allantoin}}$$

$$\text{Aktivitas spesifik (U.mg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{aktivitas enzim}}{\text{kadar protein}}$$

(Zain, 2018).

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian isolasi dan purifikasi enzim urikase dari hati kambing (*Capra aegagrus hircus*) adalah:

1. Aktivitas *crude enzyme* urikase terbesar ditentukan melalui aktivitas total urikase. Aktivitas total Supernatan 1 (0,0243 U/mL) memiliki aktivitas yang paling besar dibandingkan Supernatan 2 (0,0159 U/mL dengan yield sebesar 65,43%) dan Supernatan campuran (0,0215 U/mL dengan yield sebesar 88,48%).
2. Aktivitas spesifik urikase hasil purifikasi dari fraksi urikase (0,0163 U/mg, yield sebesar 1857,6%) dan dialisis pada kondisi optimum (0,0281 U/mg, yield sebesar 2734,6%) memiliki nilai yang semakin besar dibandingkan *crude enzyme*/Supernatan 1 (0,00081 U/mg, yield sebesar 100%).

### 5.2 Saran

Tahapan dialisis pada penelitian isolasi dan purifikasi enzim urikase dari hati kambing (*Capra aegagrus hircus*) menghasilkan aktivitas enzim yang relatif kecil. Hal ini memungkinkan adanya faktor-faktor lain yang mempengaruhi aktivitas urikase, seperti suhu saat *running* dialisis. Suhu *running* dialisis diusahakan harus tetap terjaga pada suhu 4°C agar kondisi enzim tetap baik, tidak terdenaturasi sehingga tidak terjadi penurunan aktivitas enzim. Aktivitas urikase bisa meningkat dengan dilakukannya pemurnian lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom atau kromatografi penukar ion agar kemurnian enzim lebih besar.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Abdullah, S. K. dan M. T. Flayyih. 2015. Production, purification and characterization of uricase produced by pseudomonas aeruginosa. *Iraqi Journal of Science*. 56(3B):2253–2263.
- Abou-Elela, A. 2017. Epidemiology, pathophysiology, and management of uric acid urolithiasis: a narrative review. *Journal of Advanced Research*. 8(5):513-527.
- Ahmad, Syahril. 2010. Pengaruh berat molekul aditif polivinil pirolidon terhadap karakteristik membran datar polisulfon. *Jurnal Sains Materi Indonesia*. 12(3):159-161.
- Ainiyah, S., E. N. Prasetyo, P. Lisdiyanti, dan M. P. Koentjoro. 2014. Biogrouting: Produksi urease dari bakteri laut (*Oceanobacillus* sp.) pengendap karbonat. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 3(2): 87-92.
- Aji, G.K., D. Purwanto, dan M. Rivai. 2018. Pengendali kecepatan alat sentrifugasi menggunakan metode logika fuzzy. *Jurnal Teknik ITS*. 7(2):325-330.
- Al-Atraqchi, S. A. Mahdi dan E. A. A. Al-Mosawi. 2012. Purification and characterization of uricase enzyme produced from pseudomonas aeruginosa 7. *Kerbala Journal of Pharmaceutical Science*. (3).
- Anwar, C, dan R. Salima. 2016. Perubahan rendemen dan muru virgin coconut oil (VCO) pada berbagai kecepatan putar dan lama waktu sentrifugasi. *Jurnal Teknotan*. 10(2): 51-60.
- Barsoum, R. dan M. El-Khatib. 2017. Uric acid and life on earth. *Journal of Advanced Research*. 8:471–474.
- Budiman, H., T. R. Ferasyi, Tapelaniari, M. N. Salim, U. Balqis, dan M. Hambal. 2015. Pengamatan lesi makroskopis pada hati aya broiler yang dijual di pasar lambaro aceh besar dan hubungannya dengan keberadaan mikroba. *Jurnal Medika Veterinaria*. 9(1): 51-53.
- Caves, M. S., B. K, Derham, J. Jezek, and R. B. Freedman. 2013. Thermal Inactivation of uricase (urate oxidase): mechanism and effects of additives. *Biochemistry*. 52: 497-507.
- Duong-Ly, K. C, and S.B. Gabelli. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation chapter seven. *Methods in Enzymology*. 541: 85-94.

- Elfita, Lina. 2014. Analisis profil protein dan asam amino sarang burung walet (*Collocalia fuchipaga*) asal painan. *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*. 1(1):27-37.
- Estarellas, C. Frontera, A. Quiñonero, D. Deyã, Pere M. 2011. Relevant anion- $\pi$  interactions in biological systems: The case of urate oxidase. *Angewandte Chemie - International Edition*. 50: 415-418.
- Geweely, N.S, dan L.S. Nawar. 2011. Production, optimization, purification and properties of uricase isolated from some fungal flora in saudi arabian soil. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5(10):220-230.
- Hafez, R. M., T. M. Abdel-Rahman, dan R. M. Naguib. 2017. Uric acid in plants and microorganisms: biological applications and genetics-a review. *Journal of Advanced Research*. 8:475-486.
- Hamzah, Hairul H. Zain, Zainiharyati Mohd. Musa, Nor Lailatul Wahidah. Lin, Yun-Chun. Trimbee, Emma. 2013. Spectrophotometric determination of uric acid in urine based-enzymatic method uricase with 4-aminodiphenylamine diazonium sulfate (variamine blue RT salt). *Journal Analytical Bioanalytical Technique*. (S7):1-6.
- Hatimah, Husnul. 2017. Isolasi dan Purifikasi Fitase dari Bakteri Endofit Asal Tanaman Jagung. *Skripsi*. Makassar: UIN Alauddin Makassar.
- Hermanto, S., F.R. Saputra, dan Zilhadia. 2015. Aplikasi metode SDS\_PAGEE (Sodium dodecyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis) untuk mengidentifikasi sumber asal gelatin pada kapsul keras. *Jurnal Kimia Valensi*. 1(1): 26-32.
- Januardi. 2010. Pertambahan Bobot Badan dan Mortalitas Anak Kambing Persilangan Boer-Jawarandu pada Umur Induk yang Berbeda di UPTD Balai Pembibitan Ternak Ruminansia Kecil Dinas Peternakan Kabupaten Kampar. *Skripsi*. Pekanbaru: Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau.
- Jianguo, L., L. Gaoxiang, L. Hong, and Z. Xiukai. 1994. Purification and properties of uricase from *Candida* sp. and its application in uric acid analysis in serum. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 47: 57-63.
- Joenata, M. K. A. 2020. Fraksinasi Urikase Hati Kambing menggunakan Ammonium Sulfat dengan Variasi Waktu Pengendapan. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Karso, Wuryanti, dan Sriatun. 2014. Isolasi dan karakterisasi kitinase isolat jamur akuatik kitinolitik KC3 dari kecoa. *Jurnal Sains dan Aplikasi*. 17(2): 51-57.



- Kasmawati. 2017. Karakterisasi Berat Molekul Protein Hasil Fermentasi Enzim Selulase dari *Candida utilis*. *Skripsi*. Makassar: Universitas Alauddin Makassar.
- Katili, A. S. 2009. Struktur dan fungsi kolagen. *Jurnal Pelangi Ilmu*. 2(5): 19-29.
- Li, X., Q.Y. Tan, J. Q. Zhang, N. Wang, H. Yang, H. R. Xiong, J.Y. Wu, C. J. Zhao, H. Wang, dan H. F. Yin. 2012. Improved biological properties and hypouricemic effects of uricase from *Candida utilis* loaded in novel alkaline enzymsomes. *International Journal of Nanomedicine*. 7: 3939-3938.
- Maiuolo, J., F. Oppedisano, S. Gratteri, C. Muscoli, dan V. Mollace. 2015. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology*. (7): 1-7.
- Marchetti, M., A. Liuzzi, B. Fermi, R. Corsini, C. Folli, V. Speranzini, F. Gandolfi, S. Bettati, L. Ronda, L. Cendron, R. Berni, G. Zanotti, dan R. Percudani. 2016. Catalysis and structure of zebrafish urate oxidase provide insights into the origin of hyperuricemia in hominoids. *Scientific Reports*. 6: 1-13.
- Masri, Mashuri. 2013. Isolasi dan pengukuran aktivitas enzim bromelin dari ekstrak kasar bonggol nanas (*Ananas comosus*) pada variasi suhu dan pH. *Jurnal Biology Science and Education*. 2(1): 70-79.
- Murray, R., D. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennely, V. W. Rodwell, P. A. Weil. 2012. *Biokimia Harper Edisi 29*. Indonesia: Buku Kedokteran EGC.
- Nasrul, E. dan Sofitri. 2012. Hiperurisemia pada pra diabetes. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 1(2).
- Neldawati, Ratnawulan, dan Gusnedi. 2013. Analisis nilai absorbansi dalam penentuan kadar flavonoid untuk berbagai jenis daun tanaman obat. *Pillar of Physics*. 2:76-83.
- Nurhayati, Mappiratu, dan Musafira. 2018. Pembuatan konsentrat protein dari biji kelor (*Moringa oleifera L*) dan analisis profil asam amino. *Jurnal Kimia Riset*. 4(1): 24-32.
- Ohe, Tatsuhiko, and Y. Watanabe. 1981. Purification and properties of urate oxidase from *Streptomyces cyanogenus*. *Biochem*. 89: 1769-1776.
- Orinda, E., I. D. Puspita, M. P. Putra, Ustadi, dan I. Y. B. Lelana. 2015. Aktivitas enzim pendegradasi kitin dari isolate SDI23 asal petis serta karakterisasi pH dan suhu aktivitas enzim hasil purifikasi parsial. *Jurnal Perikanan*. 17(2): 96-102.

- Osman, A. M., A. D. Corso, P. L. Spata, and U. Mura. 1989. Liver uricase in *Camelus diomedarius*: purification and properties. *Journal Biochem.* 94B(3): 469-474.
- Pasaribu, E., T. Nurhayati, dan M. Nurilmala. 2018. Ekstraksi dan karakterisasi enzim pepsin dari lambung ikan tuna (*Thunnus albacares*). *JPHPI.* 21(3): 486-496.
- Pfrimer, P., L. M. D. Moraes, A. S. Galdino, L. P. Palles, V. C. B. Reis, J. L. D. Marco, M. V. Prates, C. B. Jr, and F. A. G. Torres. 2010. Cloning, purification, and partial characterization of bacillus subtilis urate oxidase expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*: 1-6.
- Pribadiningtyas, P. A., T. H. Suprayogi, P. Sambodo. 2012. Hubungan antara bobot badan, volume ambung terhadap produksi susu kambing perah laktasi peranakan ettawa. *Animal Agricultural Journal.* 1(1): 99-105.
- Rachmadani, Dian. 2007. Mempelajari Enzim Kitosanase Termotabil dari Isolat *Bacillus licheniformis* MB-2 Asal Tompaso, Manado, Sulawesi Utara. *Skripsi.* Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Rajoka, M. I., K. Ur-Rehman, M. Mehraj, M. W. Akhtar, dan M. A. Zia. 2006. Purification and properties of a bovine uricase. *Protein and Peptide Letters.* 13:363-368.
- Rohishoh, Nur. 2012. Produksi dan Pemurnian Enzim Pektinase (Poligalakturonase) dari Bakteri *Pseudomonas stutzeri*. *Skripsi.* Surabaya: Universitas Airlangga.
- Sanders, G. T. B., A. J. Pasma, and F. J. Hoek. 1980. Denaturation of uric acid with uricase and peroxidase. *Journal of Clinica Chimica Acta.* 101: 299-303.
- Sarwono, B. 2007. *Beternak Kambing Unggul.* Jakarta: Penebar Swadaya.
- Sauterer, Roger. 2011. From backwater to center stage: using electronegativity as a central concept for understanding chemical principles in biology classes. *The American Biology Teacher.* 73(8): 480-483.
- Suhendi, A., Nurcahyanti, Muhtadi, dan E. M. Sutrisna. 2011. Aktivitas antihiperurisemia ekstrak air jinten hitam (*Coleus ambonicus Lour*) pada mencit jantan galur balb-c dan standarisasinya. *Majalah Farmasi Indonesia.* 22(2): 77-84.
- Suryanarayana, T. M. V, and Mistry. 2016. Review of Literature. *Springer Briefs in Applied Sciences and Technology*: 27-37.

- Usuda, N., S. Hayashi, S. Fujiwara, T. Noguchi, T. Nagata, M. S. Rao, K. Alvares, J. K. Reddy, and A. V. Yelnandi. 1994. Uric acid degrading enzymes urate oxidase and allantoinase, are associated with different subcellular organelles in frog liver and kidney. *Journal of Cell Science*. 107: 1073-1081.
- Vadaraju, C., G. Tamilselvan, I. V. M. V. Enoch, and P. M. Selvakumar. 2018. Phenol using studies by 4-aminoantipyrine method. *Organic and Medicinal Chemistry International Journal*. 5(2): 1-7.
- Wang, W., Q. J. Liu, dan H. Culi. 2007. Rapid desalting and protein recovery with phenol after ammonium sulfate fractionation. *Electrophoresis*. 28: 2358-2360.
- Warono, D dan Syamsudin. 2013. Unjuk kerja spektrofotometer untuk Analisa zat aktif ketoprofen. *Konversi*. 2(2): 57-65.
- Wilson, K. dan J. Walker. 2010. *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology Seventh Edition*. New York: Cambridge University Press.
- Yelchuri, R. Kumar. 2012. Characterization of uricases of yeast with special emphasis on *Kluveromyces lactis*. *Prasad*.
- Yustendi, D., Dasrul, dan D. Rachmadi. 2013. Penambahan tepung daun katuk (*Saururus androgynus l. merr*) dalam ransum terhadap pertambahan berat badan dan lingkaran skrotum kambing jantan peternakan etawa. *Agripet*. 13(2): 7-14.
- Zhao, Y., X. Yang, W. Lu, H. Liao, and F. Liao. 2009. Uricase based methods for determination of uric acid in serum. *Microchim Acta*. 164:1-6.
- Zain, M.H.A. 2018. Analisis Potensi Xilooligosakarida (XOS) Hasil Hidrolisis Xilan Ekstrak Kulit Kopi Sebagai Prebiotik Secara In-Vitro. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1 Preparasi Larutan

#### 1.1 Pembuatan larutan standar hidrogen peroksida

Larutan stok dibuat dari larutan induk hidrogen peroksida dengan cara melarutkan  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (w/v) sebanyak 0,233 mL dalam labu ukur 100 mL menggunakan buffer natrium borat pH 8,5 hingga tanda batas. Konsentrasi larutan stok diperoleh sebesar 1 mg/mL. Larutan stok 1 mg/mL dilakukan pengenceran untuk mendapatkan variasi konsentrasi 0,005; 0,01; 0,015; 0,02; 0,025 mg/mL menggunakan labu ukur.

#### 1.2 Pembuatan larutan asam urat 2 mM

Asam urat ditimbang sebanyak 0,0168 g. Asam urat yang telah ditimbang selanjutnya dilarutkan dalam labu ukur 50 mL menggunakan buffer natrium borat pH 8,5 hingga tanda batas. Larutan asam urat yang telah disiapkan lalu disimpan untuk penggunaan selanjutnya.

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

Padatan fenol ditimbang sebanyak 1,5 g. Padatan fenol yang telah ditimbang selanjutnya dilarutkan dalam labu ukur 100 mL menggunakan  $\text{dH}_2\text{O}$  hingga tanda batas. Larutan fenol diletakkan dalam botol gelap dan dilapisi menggunakan aluminium foil.

#### 1.4 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. Padatan  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (bm: 174,18 g/mol) dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (bm: 192,1 g/mol) ditambahkan berturut-turut sebanyak 0,934 g dan 0,631g kedalam gelas beaker yang telah berisi  $\text{dH}_2\text{O}$ . Larutan kemudian diatur pH menggunakan  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  atau  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M dan ditambahkan dengan  $\text{dH}_2\text{O}$  ke dalam labu ukur 100 mL hingga tanda batas.

### 1.5 Pembuatan reagen Bradford

Reagen Bradford dibuat dengan menimbang 0,05 g Comassie Brilliant Blue G-250 yang kemudian dilarutkan dalam 25 mL etanol 95 %. Larutan selanjutnya ditambahkan 50 mL asam fosfat 85 % dan ditambahkan dH<sub>2</sub>O dalam labu ukur 500 mL hingga tanda batas. Penyaringan dilakukan menggunakan kertas saring whatman no 1 dan disimpan dalam botol gelap yang telah dilapisi alumunium foil.

### 1.6 Pembuatan larutan 4-Aminoantipirin 30 mM

Padatan 4-aminoantipirin ditimbang sebanyak 0,3049 g. 4-aminoantipirin yang telah ditimbang selanjutnya dilarutkan dalam labu ukur 50 mL menggunakan dH<sub>2</sub>O hingga tanda batas. Larutan 4-aminoantipirin yang telah disiapkan lalu disimpan untuk penggunaan selanjutnya.

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

Enzim peroksidase 170 U/mg ditimbang sebanyak 0,5 mg dan dilarutkan dalam 1 mL buffer kalium fosfat pH 7. Larutan diambil 0,882 mL dan ditambahkan buffer kalium fosfat pH 7 dalam labu ukur 5 mL hingga tanda batas. Penyimpanan dilakukan pada suhu 4 °C.

### 1.8 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. Padatan H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (bm: 61,83 g/mol) dan NaOH (bm: 39,997 g/mol) ditambahkan berturut-turut sebanyak 6,183 g dan 1g kedalam gelas beaker yang telah berisi dH<sub>2</sub>O. Larutan kemudian diatur pH menggunakan NaOH 1M dan ditambahkan dengan dH<sub>2</sub>O ke dalam labu ukur 100 mL hingga tanda batas.

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

Larutan stok dibuat dari larutan induk BSA dengan cara melarutkan BSA sebanyak 20 mg dalam labu ukur 10 mL menggunakan buffer natrium borat pH 8,5 hingga tanda batas. Konsentrasi larutan stok diperoleh sebesar 2 mg/mL. Larutan

stok 2 mg/mL dilakukan pengenceran untuk mendapatkan variasi konsentrasi 0,15; 0,3; 0,45; 0,6; 0,75; 0,9; 1,05; 1,2; 1,35; 1,5 mg/mL menggunakan labu ukur.



## Lampiran 2 Tabel Persen Kejenuhan Ammonium Sulfat pada Tahapan Fraksinasi

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 Preparasi Kantung Dialisis

Kantung dialisis sebelum digunakan pada tahapan dialisis dilakukan aktivasi terlebih dahulu. Aktivasi kantung dialisis dilakukan dengan cara merendam kantung dialisis dalam ddH<sub>2</sub>O yang dipanaskan pada suhu kisaran 70-80 °C selama 2 jam sambil diaduk perlahan menggunakan stirrer. Kantung dialisis setelah direndam selama 2 jam, kemudian ddH<sub>2</sub>O di dekantasi dan diulangi sebanyak 3 kali dengan cara yang sama. Kantung dialisis yang telah teraktivasi lalu disimpan dalam wadah berisi ddH<sub>2</sub>O. Preparasi awal sebelum dialisis di *running* yaitu kantung dialisis dibilas menggunakan buffer saat isolasi. Dialisis yang telah selesai dilakukan, lalu kantung dialisis dibilas menggunakan ddH<sub>2</sub>O dan disimpan kembali dalam wadah yang berisi ddH<sub>2</sub>O. Kantung dialisis rentan sobek sehingga harus diperlakukan dengan sangat hati-hati.

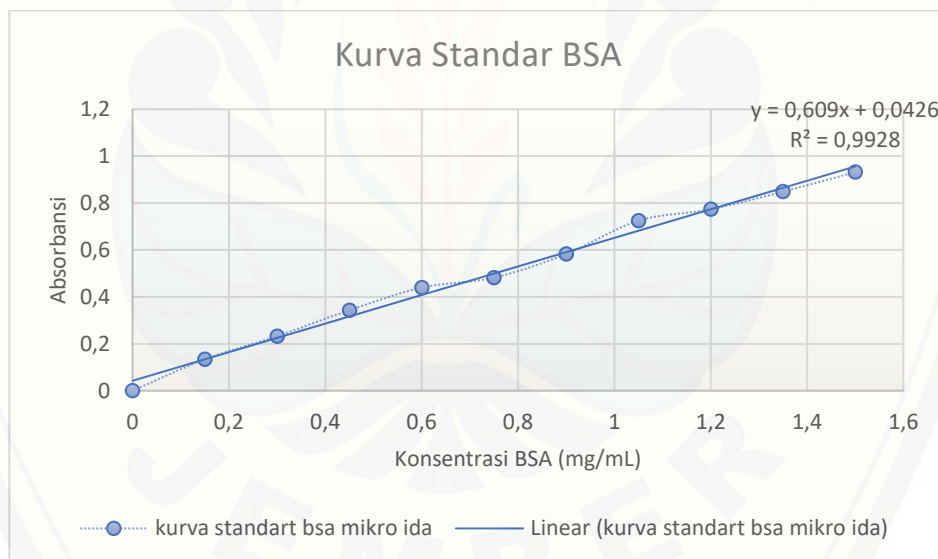


## Lampiran 4 Data dan Perhitungan

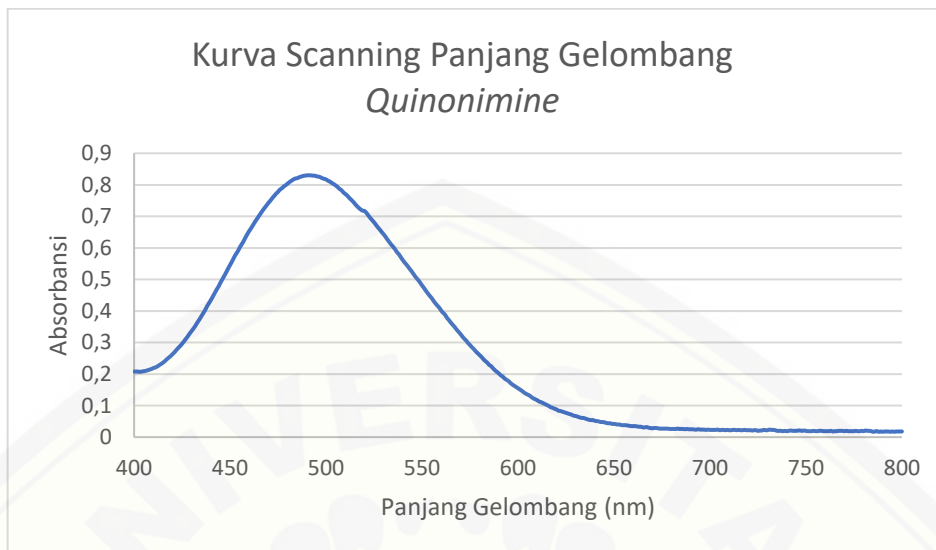
### 4.1 Tabel Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Bovine Serum Albumin (BSA)

Konsentrasi BSA (mg/mL)	Absorbansi
0	0,000
0,15	0,134
0,3	0,233
0,45	0,343
0,6	0,440
0,75	0,482
0,9	0,583
1,05	0,725
1,2	0,773
1,35	0,849
1,5	0,932

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



#### 4.3 Kurva Scanning Panjang Gelombang Maksimum *Quinonimine*



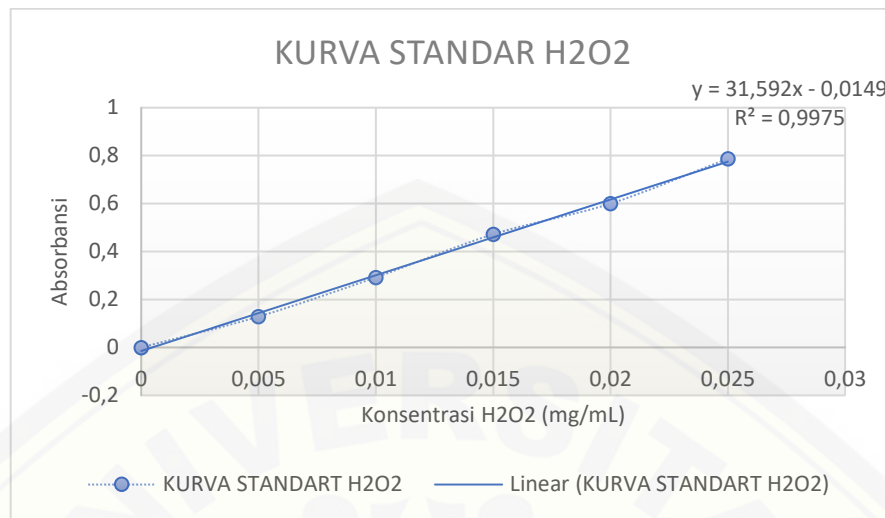
Keterangan:

Konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 0,015 mg/mL  
 Rentang Panjang Gelombang : 400-800 nm  
 Interval Panjang Gelombang : 1 nm  
 Panjang Gelombang Maksimum : 490 nm  
 Absorbansi Maksimum : 0,830

#### 4.4 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	0,129
0,01	0,292
0,015	0,472
0,02	0,600
0,025	0,787

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



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

Persamaan Kurva Standar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:  $y = 31,592x - 0,0149$

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{sampel}}(\text{mg/mL}) = \frac{\text{Absorbansi H}_2\text{O}_2 \text{ sampel} + 0,0149}{31,592}$$

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{kontrol}}(\text{mg/mL}) = \frac{\text{Absorbansi H}_2\text{O}_2 \text{ kontrol} + 0,0149}{31,592}$$

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

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{sampel}}(\text{mg/mL}) = \frac{0,554 + 0,0149}{31,592}$$

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{sampel}}(\text{mg/mL}) = 0,0180 \text{ mg/mL}$$

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

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{kontrol}}(\text{mg/mL}) = \frac{0,241 + 0,0149}{31,592}$$

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{kontrol}}(\text{mg/mL}) = 0,0081 \text{ mg/mL}$$

## 4.7 Perhitungan Aktivitas Total Urikase

$$\text{Aktivitas Total (U/mL)} = \frac{([\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{sampel}} - [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{kontrol}}) \times F_p \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{enzim}}}}{t_{\text{inkubasi}} \times \text{BM H}_2\text{O}_2}$$

$F_p$  : Faktor Pengenceran

$\text{BM H}_2\text{O}_2$  : Berat Molekul  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,034 mg/ $\mu\text{mol}$ )

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

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

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

Contoh perhitungan aktivitas total Supernatan 1:

$$\text{Aktivitas Total (U/mL)} = \frac{(0,0180 - 0,0081) \text{ mg/mL} \times 1 \times \frac{2 \text{ mL}}{0,1 \text{ mL}}}{240 \text{ menit} \times 0,034 \text{ mg}/\mu\text{mol}}$$

$$\text{Aktivitas Total (U/mL)} = 0,0243 \mu\text{mol} \cdot \text{menit}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$\text{Aktivitas Total (U/mL)} = 0,0243 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$$

4.8 Tabel Aktivitas Total Urikase

Proses	Sampel	Ulangan	Abs. S	SD	Abs. K	SD	[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)	AT (U/mL)	AT rata2 (U/mL)
Isolasi Enzim	Supernatan 1	-	0,554	-	0,241	-	0,0180	0,0081	0,0243	0,0243
	Supernatan 2	-	0,316	-	0,111	-	0,0105	0,0040	0,0159	0,0159
	Supernatan Campuran	-	0,435	-	0,158	-	0,0142	0,0055	0,0215	0,0215
Fraksinasi Ammonium Sulfat 0-20%	F <sub>20t16</sub>	-	0,697	-	0,115	-	0,0225	0,0041	0,4514	0,4514
Dialisis Enzim pH 8,5	D <sub>8,5t8</sub>	1	0,163		0,006		0,0056	0,0007	0,6089	
		2	0,164	0,0026	0,006	0,0000	0,0057	0,0007	0,6127	0,6166
		3	0,168		0,006		0,0058	0,0007	0,6283	
	D <sub>8,5t12</sub>	1	0,167		0,005		0,0058	0,0006	0,6283	
		2	0,167	0,0000	0,006	0,0006	0,0058	0,0007	0,6244	0,6257
		3	0,167		0,006		0,0058	0,0007	0,6244	
	D <sub>8,5t16</sub>	1	0,174		0,006		0,0060	0,0007	0,6515	
		2	0,179	0,0029	0,006	0,0000	0,0061	0,0007	0,6709	0,6645
		3	0,179		0,006		0,0061	0,0007	0,6709	
Dialisis Enzim pH 7,5	D <sub>7,5t8</sub>	1	0,056		0,012		0,0022	0,0009	0,1706	
		2	0,056	0,0000	0,013	0,0006	0,0022	0,0009	0,1668	0,1681
		3	0,056		0,013		0,0022	0,0009	0,1668	
	D <sub>7,5t12</sub>	1	0,053		0,016		0,0021	0,0010	0,1435	
		2	0,047	0,0035	0,01	0,0042	0,0020	0,0008	0,1435	0,1409
		3	0,053		0,018		0,0021	0,0010	0,1357	
	D <sub>7,5t16</sub>	1	0,053		0,019		0,0021	0,0011	0,1319	
		2	0,055	0,0012	0,023	0,0021	0,0022	0,0012	0,1241	0,1280
		3	0,053		0,02		0,0021	0,0011	0,1280	

#### 4.9 Perhitungan Kadar Protein

Persamaan Kurva Standar BSA:  $y = 0,609x + 0,0426$

$$\text{Kadar Protein (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbansi} - 0,0426}{0,609} \times F_p$$

Contoh perhitungan kadar protein pada Supernatan 1:

Diketahui absorbansi Supernatan 1 = 0,226

$$\text{Kadar Protein (mg/mL)} = \frac{0,226 - 0,0426}{0,609} \times 100$$

$$\text{Kadar Protein (mg/mL)} = 30,11 \text{ mg/mL}$$

#### 4.10 Perhitungan Aktivitas Spesifik Urikase

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

Contoh perhitungan aktivitas spesifik pada Supernatan 1:

$$\text{Aktivitas Spesifik (U/mg)} = \frac{0,0243 \text{ (U/mL)}}{30,11 \text{ (mg/mL)}}$$

$$\text{Aktivitas Spesifik (U/mg)} = 0,00081 \text{ U/mg}$$

4.11 Tabel Kadar Protein

Proses	Sampel	Ulangan	Abs protein	SD	Faktor Pengenceran (kali)	Kadar Protein (mg/mL)	Kadar Protein rata2 (mg/mL)
Isolasi Enzim	Supernatan 1	-	0,226	-	100	30,11	30,11
	Superatan 2	-	0,171	-	50	10,54	10,54
	Supernatan Campuran	-	0,283	-	75	29,61	29,61
Fraksinasi Ammonium Sulfat 0-20%	F20t16	-	0,211	-	100	27,65	27,65
Dialisis Enzim pH 8,5	D <sub>8,5t8</sub>	1	0,184	0,0006	100	23,22	23,27
		2	0,184			23,22	
		3	0,185			23,38	
	D <sub>8,5t12</sub>	1	0,182	0,0006	100	22,89	22,84
		2	0,182			22,89	
		3	0,181			22,73	
	D <sub>8,5t16</sub>	1	0,186	0,0006	100	23,55	23,66
		2	0,187			23,71	
		3	0,187			23,71	
Dialisis Enzim pH 7,5	D <sub>7,5t8</sub>	1	0,322	0,0006	50	22,94	22,88
		2	0,321			22,86	
		3	0,321			22,86	
	D <sub>7,5t12</sub>	1	0,323	0,0000	50	23,02	23,02
		2	0,323			23,02	
		3	0,323			23,02	
	D <sub>7,5t16</sub>	1	0,334	0,0006	50	23,92	23,87
		2	0,333			23,84	
		3	0,333			23,84	

4.12 Tabel Aktivitas Spesifik Urikase

Proses	Sampel	Aktivitas Total (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Aktivitas Spesifik rata2 (U/mg)	
Isolasi Enzim	Supernatan 1	0,0243	30,11	0,00081	0,00081	
	Supernatan 2	0,0159	10,54	0,00151	0,00151	
	Supernatan Campuran	0,0215	29,61	0,00073	0,00073	
Fraksinasi Ammonium Sulfat 0-20%	F <sub>20t16</sub>	0,4514	27,65	0,0163	0,0163	
Dialisis Enzim pH 8,5	D <sub>8,5t8</sub>	0,6089	23,22	0,0262	0,0265	
		0,6127	23,22	0,0264		
		0,6283	23,38	0,0269		
	D <sub>8,5t12</sub>	0,6283	22,89	0,0274	0,0274	
		0,6244	22,89	0,0273		
		0,6244	22,73	0,0275		
	D <sub>8,5t16</sub>	0,6515	23,55	0,0277	0,0281	
		0,6709	23,71	0,0283		
		0,6709	23,71	0,0283		
	Dialisis Enzim pH 7,5	D <sub>7,5t8</sub>	0,1706	22,94	0,0074	0,0073
0,1668			22,86	0,0073		
0,1668			22,86	0,0073		
D <sub>7,5t12</sub>		0,1435	23,02	0,0062	0,0061	
		0,1435	23,02	0,0062		
		0,1357	23,02	0,0059		
D <sub>7,5t16</sub>		0,1319	23,92	0,0055	0,0054	
		0,1241	23,84	0,0052		
			0,1280	23,84	0,0054	



#### 4.13 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:

$$\begin{aligned}\text{Yield (\%)} &= \frac{0,0159}{0,0243} \times 100\% \\ &= 65,43\%\end{aligned}$$

#### 4.14 Perhitungan Faktor Purifikasi

$$\text{Purifikasi (kali)} = \frac{\text{Aktivitas Spesifik Sampel}}{\text{Aktivitas Spesifik Bahan Awal}} \times 100\%$$

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

Contoh Perhitungan Faktor Purifikasi Supernatan 2

$$\begin{aligned}\text{Purifikasi (kali)} &= \frac{0,00151}{0,00081} \times 100\% \\ &= 1,86 \text{ kali}\end{aligned}$$

## 4.15 Tabel Efektivitas Urikase

Sampel	Aktivitas Total (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Yield (%)	Purifikasi (kali)
Supernatan 1	0,0243	30,11	0,00081	100	1,00
Supernatan 2	0,0159	10,54	0,00151	65,43	1,86
Supernatan Campursn	0,0215	29,61	0,00073	88,48	0,90
F <sub>20t16</sub>	0,4514	27,65	0,0163	1857,61	20,12
D <sub>8,5t8</sub>	0,6089	23,22	0,0262	2537,45	32,72
	0,6127	23,22	0,0264		
	0,6283	23,38	0,0269		
D <sub>8,5t12</sub>	0,6283	22,89	0,0274	2574,90	33,83
	0,6244	22,89	0,0273		
	0,6244	22,73	0,0275		
D <sub>8,5t16</sub>	0,6515	23,55	0,0277	2734,57	34,69
	0,6709	23,71	0,0283		
	0,6709	23,71	0,0283		
D <sub>7,5t8</sub>	0,1706	22,94	0,0074	691,77	9,01
	0,1668	22,86	0,0073		
	0,1668	22,86	0,0073		
D <sub>7,5t12</sub>	0,1435	23,02	0,0062	579,84	7,53
	0,1435	23,02	0,0062		
	0,1357	23,02	0,0059		
D <sub>7,5t16</sub>	0,1319	23,92	0,0055	526,75	6,67
	0,1241	23,84	0,0052		
	0,1280	23,84	0,0054		

**Lampiran 5 Dokumentasi Penelitian**



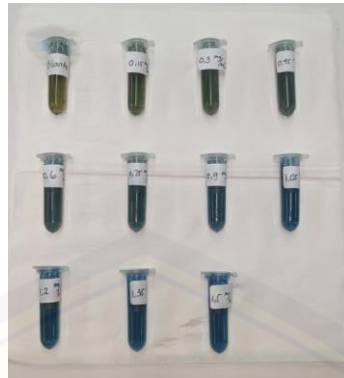
Gambar 1. Sampel kambing



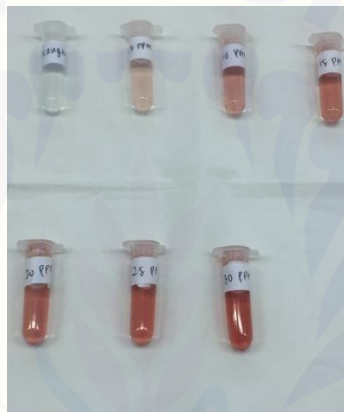
Gambar 2. Sampel hati kambing yang digunakan



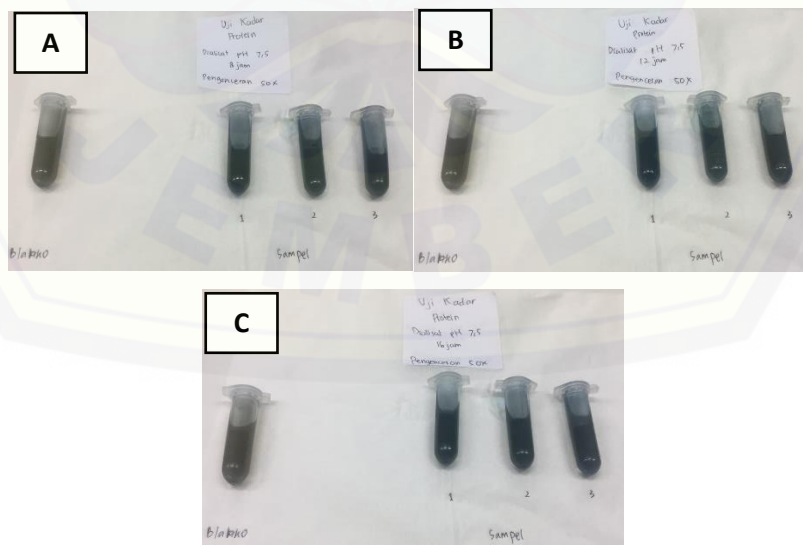
Gambar 3. Hati kambing yang telah ditumbuk



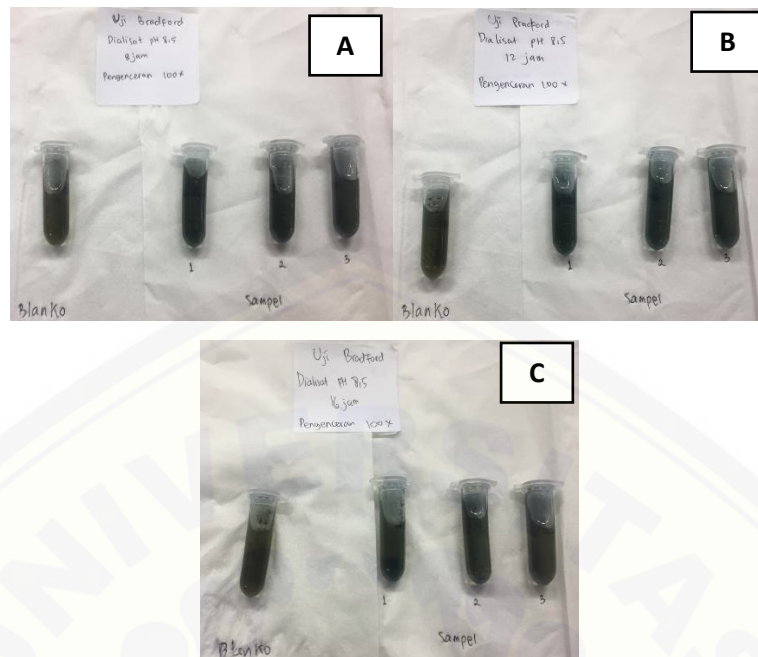
Gambar 4. Larutan standar BSA dengan variasi konsentrasi



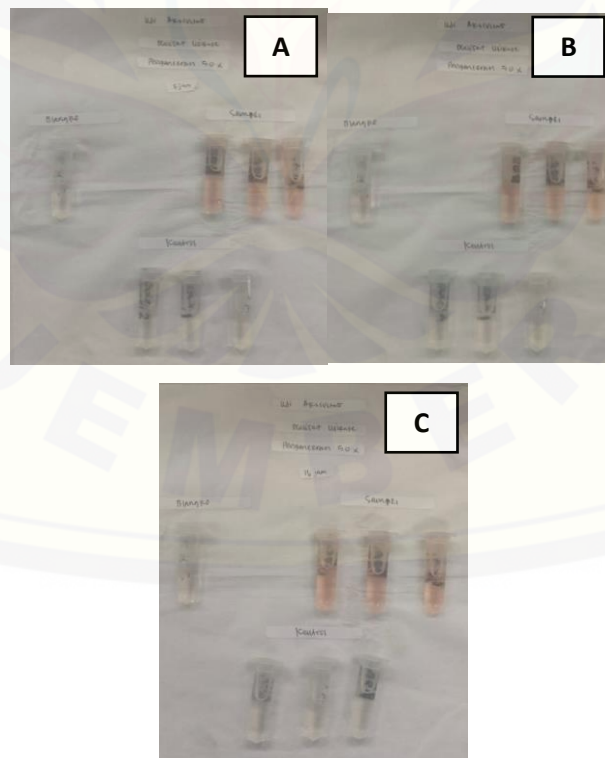
Gambar 5. Larutan standar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan variasi konsentrasi



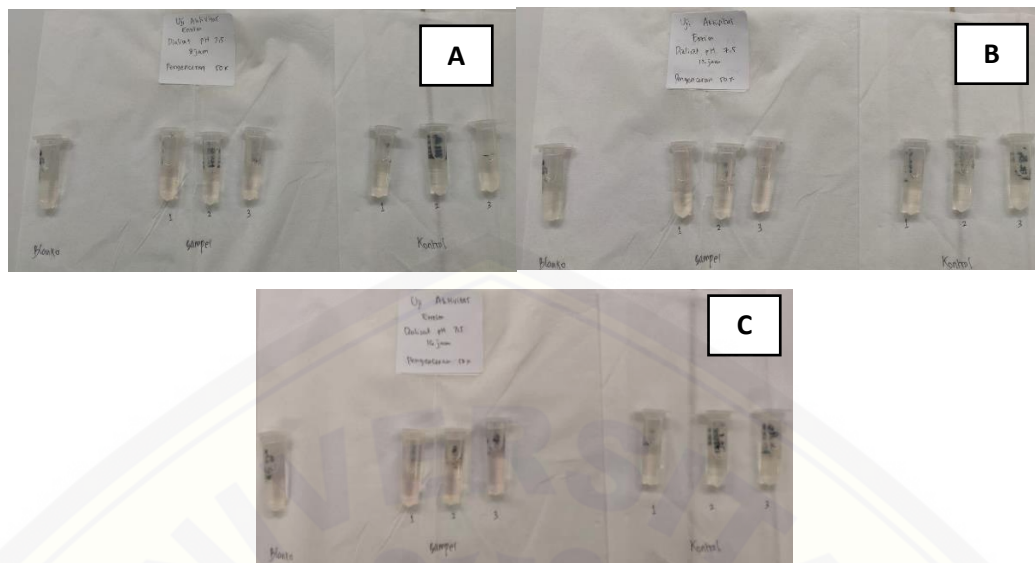
Gambar 9. Uji kadar protein dialisat pH 7,5 dengan waktu *running* dialisis selama 8 jam (A), 12 jam (B), dan 16 jam (C)



Gambar 10. Uji kadar protein dialisat pH 8,5 dengan waktu *running* dialisis selama 8 jam (A), 12 jam (B), dan 16 jam (C)



Gambar 11. Uji aktivitas dialisat pH 8,5 dengan waktu *running* dialisis selama 8 jam (A), 12 jam (B), dan 16 jam (C)



Gambar 11. Uji aktivitas dialisat pH 7,5 dengan waktu *running* dialisis selama 8 jam (A), 12 jam (B), dan 16 jam (C)