



**OPTIMASI KECEPATAN SENTRIFUGASI DAN pH PADA EKSTRAKSI
ENZIM URIKASE DARI HATI KAMBING**

SKRIPSI

Oleh:

**Riki Juni Krismiadi
NIM 161810301034**

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

2021



**OPTIMASI KECEPATAN SENTRIFUGASI DAN pH PADA EKSTRAKSI
ENZIM URIKASE DARI HATI KAMBING**

SKRIPSI

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

Oleh:

**Riki Juni Krismiadi
NIM 161810301034**

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

2021

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada:

1. Ibunda Mistiyah tercinta yang telah memberikan segalanya
2. Ibunda Mistiyah tersayang yang sudah berjuang agar masa depan anaknya gemilang
3. Ibunda Mistiyah tekasih yang senantiasa mendoakan agar segala urusan anaknya dimudahkan
4. Ayahanda Kasnawi yang sudah menjadi Bapak terbaik
5. Kakak yang senantiasa mendukung dan memfasilitasi selama menempuh jenjang pendidikan
6. Bapak dan Ibu guru/dosen yang telah memberikan banyak ilmu selama menempuh jenjang pendidikan
7. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember
8. Seluruh umat manusia semoga penelitian ini bermanfaat

MOTTO

“Jadilah seperti bunga yang memberikan keharuman bahkan kepada tangan yang telah menghancurkannya”
(Sayyidina Ali bin Abi Thalib)^{*)}



^{*)} Al-Bantani, Imam Nawawi. 1975. *Nashaihul Ibad*. Jakarta: Pustaka Tarbiyah.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Riki Juni Krismiadi

NIM : 161810301034

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Optimasi Kecepatan Sentrifugasi dan pH pada Ekstraksi Enzim Urikase dari Hati Kambing” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 28 Januari 2021

Yang menyatakan,



Riki Juni Krismiadi

NIM 161810301034

SKRIPSI

**OPTIMASI KECEPATAN SENTRIFUGASI DAN pH PADA EKSTRAKSI
ENZIM URIKASE DARI HATI KAMBING**

Oleh

Riki Juni Krismiadi
NIM 161810301034

Pembimbing:

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

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

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Optimasi Kecepatan Sentrifugasi dan pH pada Ekstraksi Enzim Urikase Dari Hati Kambing” 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.

Esti Utarti, S.P., M.Si.

NIP 196008221985032002

NIP 197003031999032001

Anggota II,

Anggota III,

Tanti Haryati, S.Si., M.Si.

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

NIP 198010292005012002

NIP 195910091986021001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember

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

NIP 195910091986021001

RINGKASAN

Optimasi Kecepatan Sentrifugasi dan pH pada Ekstraksi Enzim Urikase Dari Hati Kambing: Riki Juni Krismiadi; 161810301034; 2021: 81 halaman; Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Asam urat merupakan produk akhir yang dihasilkan dari metabolisme purin. Manusia tidak memiliki enzim yang mampu memecah asam urat sehingga asam urat dapat mengalami akumulasi. Akumulasi asam urat pada bagian tubuh tertentu dapat menyebabkan penyakit. Permasalahan ini dapat diatasi dengan terapi urikolitik dengan memanfaatkan aktivitas enzim urikase. Pada penelitian ini enzim urikase diperoleh dari hati kambing dengan mengoptimasikan kecepatan sentrifugasi dan pH pada tahap ekstraksi. Tujuan optimasi tersebut agar mendapatkan urikase dalam jumlah yang maksimal selama ekstraksi. Optimasi kecepatan sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 7.000, 9.000, 11.000, 13.000 dan 15.000 rpm, sedangkan optimasi pH ekstraksi dilakukan pada pH 6, 7, 8, 9, 10 dan 11. Optimasi dikatakan optimum apabila menghasilkan aktivitas spesifik tertinggi.

Ekstrak kasar (*crude* enzim) yang diperoleh dari masing-masing perlakuan akan dilakukan uji aktivitas enzim dan uji kadar protein. Berdasarkan hasil yang diperoleh, peningkatan kecepatan sentrifugasi dapat meningkatkan aktivitas total dan spesifik urikase. Akan tetapi, pada kecepatan 13.000 dan 15.000 rpm perbedaan aktivitas total maupun spesifik tidak signifikan sehingga kecepatan 13.000 rpm dinilai lebih ideal dan dianggap sebagai kecepatan sentrifugasi maksimum. Aktivitas total dan spesifik yang dihasilkan pada kecepatan 13.000 rpm berturut-turut 0,0189 U/mL dan 0,0048 U/mg.

Hasil optimasi pH ekstraksi menunjukkan bahwa pH optimum untuk ekstraksi urikase adalah pH 8. Aktivitas total dan spesifik tertinggi dicapai pada pH tersebut. pH hasil optimasi ini mendekati pH optimum dari urikase yaitu pH 8,5. Nilai aktivitas total dan spesifik pada pH 8 yaitu 0,085 U/mL dan 0,0121 U/mg. Aktivitas spesifik *crude* enzim dari hati kambing pada pH 8 ini lebih rendah

daripada aktivitas spesifik *crude* enzim dari hati sapi, kuda, anjing, marmot dan tikus celurut pada pH yang sama berdasarkan penelitian (Htay *et al.*, 1989).



PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Optimasi Kecepatan Sentrifugasi dan pH pada Ekstraksi Enzim Urikase dari Hati Kambing”. 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 dan Dr. Esti Utarti, S.P., M.Si. selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, tenaga, serta pikiran dalam proses penyusunan skripsi ini
4. Tanti Haryati, S.Si., M.Si. selaku dosen penguji utama dan Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D. selaku dosen penguji anggota yang telah memberikan masukan untuk perbaikan tulisan ini
5. Bapak dan Ibu dosen Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang telah memberikan ilmu dan menginspirasi
6. Habib Fahmi Al Haddad yang senantiasa memberikan nasehat dan ilmu agar tidak salah dalam memilih jalan hidup
7. Ibu Nyai H. Liliek Istiqomah, S.H, M.H. yang selalu memberi ridho dan mendoakan agar menjadi orang-orang yang rajin dan bermanfaat
8. Seluruh Ustadz Ponpes Al Jauhar yang telah memberikan ilmu agar menjadi mahasiswa yang tidak hanya unggul dalam akademik tetapi juga unggul dalam beribadah
9. Teman-teman kimia angkatan 2016 (Extasy) khususnya lanangan Extasy yang selalu memberikan bantuan, dukungan, saran dan banyak kenangan

10. Siti Adlha H. N., Achmad Fudhali, Nur Rizkiyatuz S., dan Muhammad Kiki A. J. yang telah menjadi teman seperjuangan sebagai tim riset urikase
11. Nasrul Amaliyatun Naja, S.Si. yang sudah membagikan ilmu dan pengalamannya selama penelitian
12. Teman-teman santri Al-Jauhar khususnya teman-teman kamar 6 yang selalu memberi semangat dan guyonan disaat pikiran penat
13. Agung Susanto Jati Waseso yang sudah menjadi teman pertama dan terbaik selama diperkuliahan
14. Teman-teman PB. Garangan yang sudah menemani dalam menjaga imun tubuh selama pandemi dengan bermain badminton
15. 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, 28 Januari 2021

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan	3
1.5 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Asam Urat	5
2.1.1 Pengertian dan Pencegahan Penumpukan Asam Urat	5
2.1.2 Mekanisme Pembentukan Asam Urat	6
2.2 Enzim Urikase	8
2.3 Organisme dengan Enzim Pendegradasi Asam Urat	10
2.4 Hati Kambing	11
2.5 Lisis Sel	12
2.6 Sentrifugasi	13
2.7 Pengaruh pH pada Urikase	14

2.8 Metode Pengukuran Aktivitas Urikase.....	15
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	17
3.1 Waktu dan tempat penelitian.....	17
3.2 Alat dan Bahan	17
3.2.1 Alat.....	17
3.2.2 Bahan.....	17
3.2 Rancangan Penelitian.....	18
3.4 Prosedur kerja	19
3.4.1 Preparasi Sampel.....	19
3.4.2 Ekstraksi Urikase	19
3.4.3 Penentuan Aktivitas Urikase.....	20
3.4.4 Penentuan Kadar Protein Urikase	21
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	23
4.1 Aktivitas <i>Crude</i> Enzim Urikase Pengaruh Kecepatan Sentrifugasi	24
4.2 Aktivitas <i>Crude</i> Enzim Urikase Pengaruh pH Ekstraksi	28
BAB 5. PENUTUP	33
5.1 Kesimpulan	33
5.2 Saran	33
DAFTAR PUSTAKA.....	35
LAMPIRAN	41

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Perbandingan Data Supernatan 1 dan 2	28



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur Asam Urat	5
2.2 Mekanisme Terbentuknya Asam Urat	7
2.3 Mekanisme Enzimatis Terbentuknya Asam Urat	7
2.4 Pembentukan Alantoin dari Asam Urat	8
2.5 Lokalisasi Urikase dan Katalase pada Hati dan Ginjal Katak Dewasa	9
2.6 Rute Metabolisme Purin	10
2.7 Pengaruh Kecepatan Sentrifugasi pada Pengendapan Organel	13
2.8 Klasifikasi Metode Lisis Sel	14
2.9 Muatan Total Urikase pada Berbagai pH	15
2.10 Mekanisme Pembentukan Kuinoimin	16
4.1 Aktivitas Total Optimasi Kecepatan Sentrifugasi.....	25
4.2 Kadar Protein Optimasi Kecepatan Sentrifugasi.....	26
4.3 Aktivitas Spesifik Optimasi Kecepatan Sentrifugasi.....	27
4.4 Aktivitas Total Optimasi pH Ekstraksi.....	29
4.5 Kadar Protein Optimasi pH Ekstraksi.....	30
4.6 Aktivitas Spesifik Optimasi pH Ekstraksi.....	31

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 3.1 Preparasi Larutan.....	41
Lampiran 4.1 <i>Scanning</i> Panjang Gelombang	47
4.1.1 <i>Scanning</i> Panjang Gelombang Kuinoimin	47
4.1.2 <i>Scanning</i> Panjang Gelombang Bovine Serum Albumin (BSA)	52
Lampiran 4.2 Pembuatan Kurva Standar.....	57
4.2.1 Pembuatan Kurva Standar H ₂ O ₂	57
4.2.2 Pembuatan Kurva Standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA).....	58
Lampiran 4.3 Perhitungan Aktivitas Urikase	60
4.3.1 Optimasi Kecepatan Sentrifugasi.....	60
4.3.2 Optimasi pH Ekstraksi	66
Lampiran 4.4 Dokumentasi.....	72

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asam urat merupakan produk akhir yang dihasilkan dari metabolisme purin. Asam urat berperan sebagai antioksidan pada hewan dan manusia, namun apabila kadarnya berlebihan, asam urat akan berperan sebagai peroksidan (Francis, 2000). Manusia tidak memiliki enzim yang mampu mendegradasi asam urat dalam tubuh, sehingga asam urat tidak dapat dipecah lebih lanjut menjadi molekul yang lebih sederhana (Hayashi *et al.*, 2000). Hal ini berakibat pada peningkatan dan penumpukan asam urat dalam tubuh manusia. Peningkatan kadar asam urat (hiperuresemia) dapat menyebabkan penyakit pirai (gout) (Pagana, 2001). Akumulasi asam urat yang melebihi batas normal juga dapat berakibat pada timbulnya penyakit lainnya seperti rematik dan uricosuria (meningkatnya kadar asam urat dalam urine) yang apabila terjadi supersaturasi dan kristalisasi dapat menjadi batu saluran kencing (Koka *et al.*, 2000; Hafez *et al.*, 2017).

Permasalahan yang muncul akibat ketidakmampuan manusia dalam memecah asam urat dapat diatasi dengan beberapa solusi, diantaranya dengan aktivitas enzim urikase. Urikase dapat diperoleh dari organisme yang mampu mendegradasi asam urat, seperti mikroorganisme, hewan dan beberapa tumbuhan. Berdasarkan penelitian sebelumnya, enzim urikase dapat diperoleh dari *Bacillus fastidious*, *B. subtilis*, *Pseudomonas otitidis*, arugula (*Eruca sativa*), seledri (*Apium graveolens*), biji leek (*Allium ampeloprasum*), ginjal sapi, hati sapi, hati kuda, hati anjing, hati marmot, hati tikus celurut dan hati ikan salmon (Htay *et al.*, 1989; Andersen *et al.*, 2006; Rajoka *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006; Al-Helaly dan Mohammad, 2014; Lee *et al.*, 2015; Jagathy *et al.*, 2016).

Menurut Hayashi *et al.* (2000) golongan mamalia kecuali primata mampu memecah asam urat menjadi produk yang lebih sederhana berupa allantoin. Pembentukan allantoin dari asam urat dapat terjadi pada beberapa organ yaitu hati dan ginjal. Pemecahan asam urat menjadi allantoin dikatalisis oleh urikase. Berdasarkan hal tersebut, pada penelitian ini akan dilakukan isolasi urikase dari hati kambing. Kambing dipilih karena tergolong sebagai mamalia sehingga diduga pada

hati kambing terdapat urikase yang mampu mendegradasi asam urat. Selain itu, hati kambing dipilih karena organ hati termasuk salah satu organ yang berperan penting dalam ekskresi pada makhluk hidup terutama dalam pemecahan asam urat menjadi produk yang lebih sederhana. Hal ini dibuktikan oleh penelitian Usuda *et al.* (1994) yang menyatakan adanya degradasi asam urat oleh urikase pada inti kristaloid peroksisom organ hati.

Ekstraksi urikase dari sumbernya dapat dimaksimalkan menggunakan kondisi optimum setiap tahapannya. Variabel yang dapat dioptimasi diantaranya kecepatan sentrifugasi dan pH. Sel setelah mengalami lisis, sentrifugasi membantu memisahkan urikase dengan protein-protein pengotor dan pH berperan dalam menjaga stabilitasnya. Menurut Yelchuri (2012) urikase stabil pada range pH 5 sampai 11. Penelitian-penelitian sebelumnya menggunakan kecepatan sentrifugasi dan pH yang bervariasi saat ekstraksi urikase. Penelitian Rajoka *et al.* (2006) pada ekstraksi urikase dari ginjal sapi menggunakan bufer borat pH 10 dengan kecepatan sentrifugasi 3000 rpm dan memperoleh aktivitas *crude* enzim 53 U/mg. Lee *et al.* (2015) melakukan ekstraksi urikase dari biji leek menggunakan bufer borat pH 8,5 dengan kecepatan sentrifugasi 8000 rpm dan diperoleh aktivitas spesifik *crude* enzim 0,057 U/mg. Perbedaan penggunaan pH dan kecepatan sentrifugasi saat ekstraksi diduga mempengaruhi konsentrasi enzim yang diperoleh, sehingga perlu dilakukan optimasi agar diperoleh supernatan yang mengandung urikase dengan konsentrasi maksimum. Peningkatan konsentrasi urikase akan meningkatkan aktivitas spesifik enzim tersebut.

Berdasarkan pemaparan di atas, pada penelitian ini akan dilakukan ekstraksi urikase dari hati kambing dengan mengoptimasikan kecepatan sentrifugasi dan pH saat ekstraksi enzim. Optimasi ini dilakukan karena peran kecepatan sentrifugasi dan pH sangat penting dalam memperoleh konsentrasi dan aktivitas enzim yang optimal. Kecepatan sentrifugasi yang digunakan yaitu 7000, 9000, 11.000, 13.000 dan 15.000 rpm, sedangkan pH ekstraksinya 6, 7, 8, 9, 10 dan 11. Penelitian-penelitian sebelumnya tidak ada yang melakukan optimasi kecepatan sentrifugasi dan pH saat ekstraksi urikase dari sumbernya. Penelitian-penelitian sebelumnya lebih banyak melakukan variasi pH saat uji aktivitas, variasi pada proses pemurnian

dan karakterisasi enzim urikase. Penelitian ini akan sangat bermanfaat untuk penelitian selanjutnya karena penelitian ini berfokus pada cara memperoleh urikase dalam jumlah yang maksimal sehingga akan sangat membantu dalam produksi enzim urikase.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan terdapat beberapa permasalahan:

1. Bagaimana pengaruh kecepatan sentrifugasi terhadap aktivitas enzim urikase hati kambing?
2. Bagaimana pengaruh pH ekstraksi terhadap aktivitas enzim urikase dari hati kambing?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah yang dapat diberikan adalah sebagai berikut:

1. Hati kambing yang digunakan adalah hati kambing kacang jantan dengan nama latin *Capra aegagrus hircus* berusia dua tahun
2. Aktivitas yang diamati adalah aktivitas spesifik *crude* enzim
3. *Crude* enzim merupakan ekstrak hasil sentrifugasi satu kali (supernatan 1)

1.4 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mendapatkan kecepatan sentrifugasi optimum pada proses ekstraksi urikase dari hati kambing.
2. Memperoleh pH optimum pada ekstraksi urikase dari hati kambing yang menghasilkan aktivitas tertinggi.

1.5 Manfaat

Manfaat yang diperoleh dari hasil penelitian ini yaitu memberikan informasi mengenai kecepatan sentrifugasi dan pH optimum untuk ekstraksi urikase sehingga

dapat digunakan sebagai acuan dalam memperoleh jumlah enzim yang maksimal pada penelitian selanjutnya.

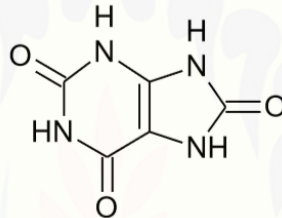


BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Asam Urat

2.1.1 Pengertian dan Pencegahan Penumpukan Asam Urat

Asam urat terbentuk dari degradasi basa purin, dua diantaranya adenin dan guanin. Ekskresi asam urat sebagian besar melalui organ ginjal dan hanya sebagian kecil diekskresikan melalui saluran cerna. Asam urat memiliki rumus kimia $C_5H_4N_4O_3$ dan tergolong sebagai senyawa organik heterosiklik yang memiliki berat molekul 168 Da. Kelarutan asam urat dalam air tergolong rendah (Pagana, 2001; Maiuolo *et al.*, 2016).



Gambar. 2.1 Struktur Asam Urat (Sumber: Nasrul dan Sofitri, 2012)

Asam urat memiliki fungsi dalam makhluk hidup yang berbeda-beda. Asam urat berperan sebagai antioksidan pada hewan dan manusia, namun apabila kadarnya berlebihan asam urat akan berperan sebagai prooksidan. Asam urat sangat berguna pada tanaman dan memiliki peran penting pada rantai makanan secara umum karena kandungan nitrogennya. Hal ini sangat berbeda pada manusia, penumpukan asam urat dapat menyebabkan beberapa penyakit. Peningkatan kadar asam urat (hiperuresemia), dapat menyebabkan pirai (gout) pada manusia. Akumulasi (penumpukan) yang melebihi batas normal dapat berakibat pada timbulnya penyakit lainnya seperti rematik dan uricosuria (meningkatkan kadar asam urat dalam urine) yang apabila terjadi supersaturasi dan kristalisasi dapat menjadi batu saluran kencing (Francis, 2000; Hafez *et al.*, 2017; Koka *et al.*, 2000; Pagana, 2001; Barsoum dan El-Khatib, 2017).

Produksi endogen utama asam urat utamanya dari hati, usus, ginjal dan jaringan lain seperti otot serta endotelium vaskular. Manusia memiliki batas normal asam urat dalam darah. Interval normal kadar asam urat pada wanita yaitu antara

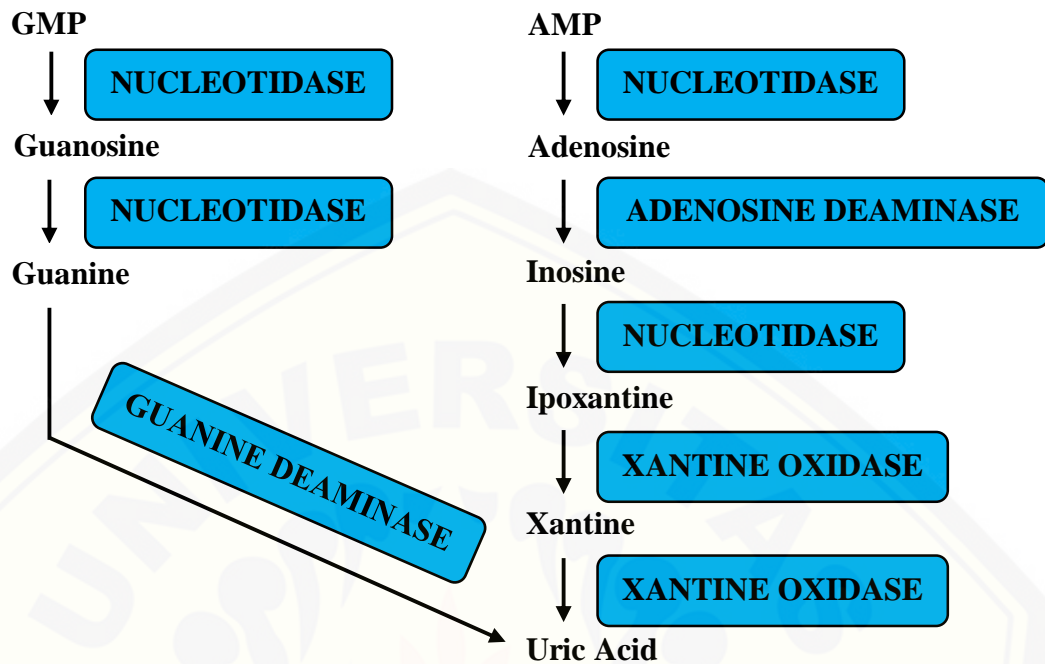
1,5-6,0 mg/dL sedangkan pada pria antara 2,5-7,0 mg/dL. Kristal asam urat terbentuk sebagai *monosodium urate* (MSU) ketika kadar asam urat darah lebih dari 6,8 mg/dL. Tubuh akan lebih mudah terkena asam urat ketika makanan yang masuk didalam tubuh tersebut memiliki kadar purin yang tinggi (Maiuolo *et al.*, 2015).

Diet purin merupakan salah satu solusi untuk mencegah penumpukan asam urat pada bagian tubuh tertentu. Diet purin dilakukan dengan cara menghindari makanan baik nabati maupun hewani yang mengandung purin tinggi. Asam urat akan dikontrol secara perlahan dengan adanya diet ini. Solusi lain adalah dengan cara pengobatan. Allupurinol adalah salah satu obat yang dapat digunakan sebagai penurun asam urat. Prinsipnya yaitu menghambat kerja dari *xanthine oxidase* pada mekanisme kerja asam urat. Namun, penggunaan obat ini memiliki efek samping yang dapat menyebabkan alergi sehingga perlu dilakukan eksplorasi untuk menemukan solusi yang lebih aman (Barsoum dan El-khatib, 2017).

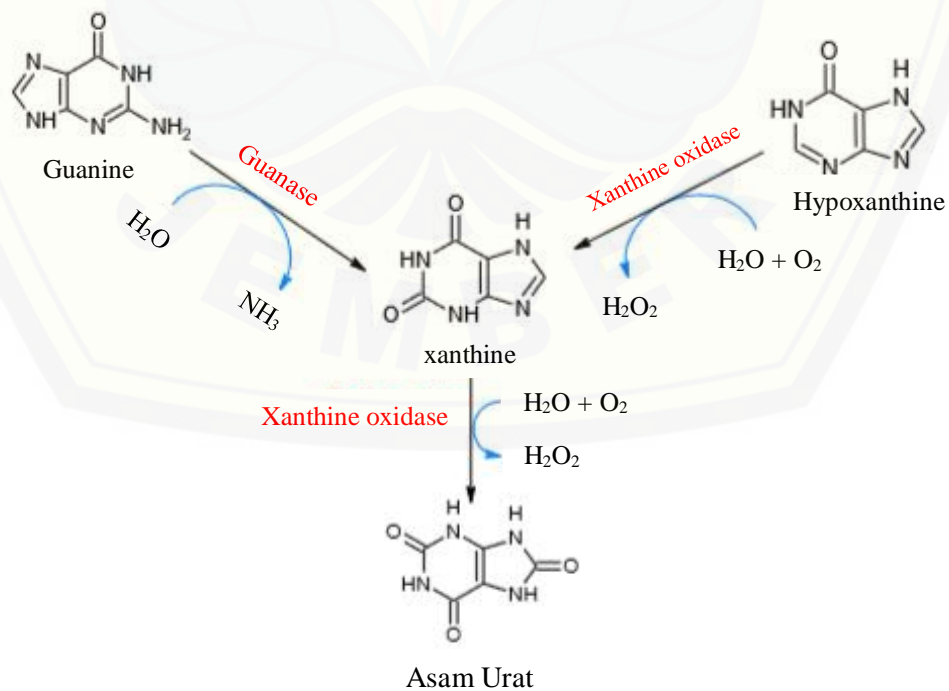
2.1.2 Mekanisme Pembentukan Asam Urat

Pembentukan asam urat dalam darah dapat mengalami peningkatan yang disebabkan oleh faktor eksternal terutama makanan dan minuman yang berpotensi untuk membentuk asam urat. Gangguan pada proses ekskresi asam urat dari tubuh akan menyebabkan penimbunan asam urat di dalam ginjal dan persendian. Proses pembentukan asam urat dalam tubuh merupakan proses yang kompleks dimulai dari *ribose 5-phosphate* (suatu *pentose* yang berasal dari *glycolic metabolism*) diubah menjadi *phosphoribosyl pyrophosphate* dan kemudian *phosphoribosilamine*. *Phosphoribosilamine* ditransformasi menjadi *inosine monophosphate* (IMP). Senyawa perantara yang berasal dari *adenosine monophosphate* (AMP) dan *guanosine monophosphate* (GMP), *purinic nucleotides* digunakan untuk sintesis DNA dan RNA, serta *inosine* yang kemudian akan mengalami degradasi menjadi *hypoxanthine*, *xanthine* dan akhirnya menjadi *uric acid* (Francis, 2000).

Mekanisme pembentukan asam urat tertera pada gambar 2.2 dan 2.3. *Hypoxanthin* atau *ipoxantine* diubah menjadi *xanthine* melalui proses oksidasi oleh *xanthine oksidase* sedangkan senyawa guanin kemudian diubah menjadi senyawa *xanthine* melalui reaksi deaminasi dengan bantuan enzim *guanine deaminase*.



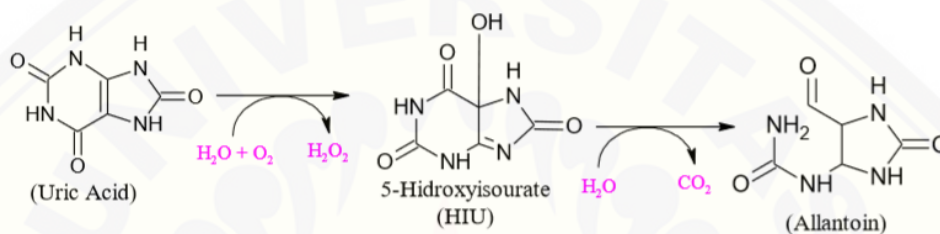
Gambar 2.2 Mekanisme Terbentuknya Asam Urat (Sumber: Maiuolo *et al.*, 2016)
 Senyawa *xanthine* mengalami oksidasi oleh enzim *xanthine oksidase* sehingga dihasilkan produk akhir berupa asam urat (Maiuolo *et al.*, 2016). Mekanisme reaksinya dapat dilihat pada gambar 2.3 berikut.



Gambar 2.3 Mekanisme Enzimatis Terbentuknya Asam Urat (Sumber: Moran *et al.*, 2012)

2.2 Enzim Urikase

Menurut Meraj *et al.* (2014) enzim *urate oxidase* atau urikase merupakan enzim yang mampu mendegradasi asam urat membentuk allantoin, hidrogen peroksida dan karbon dioksida. Enzim ini mempunyai sisi aktif yang identik sebanyak empat. Asam urat sebagai substrat mengikat erat pada satu subU enzim melalui interaksi dengan leusin (Leu222), arginin (Arg180), dan glutamin (Gln223) sementara untuk subU lainnya dengan aspartat (Asp68) dan treonin (Thr67). Mekanisme pembentukan allantoin dari asam urat sebagai berikut.

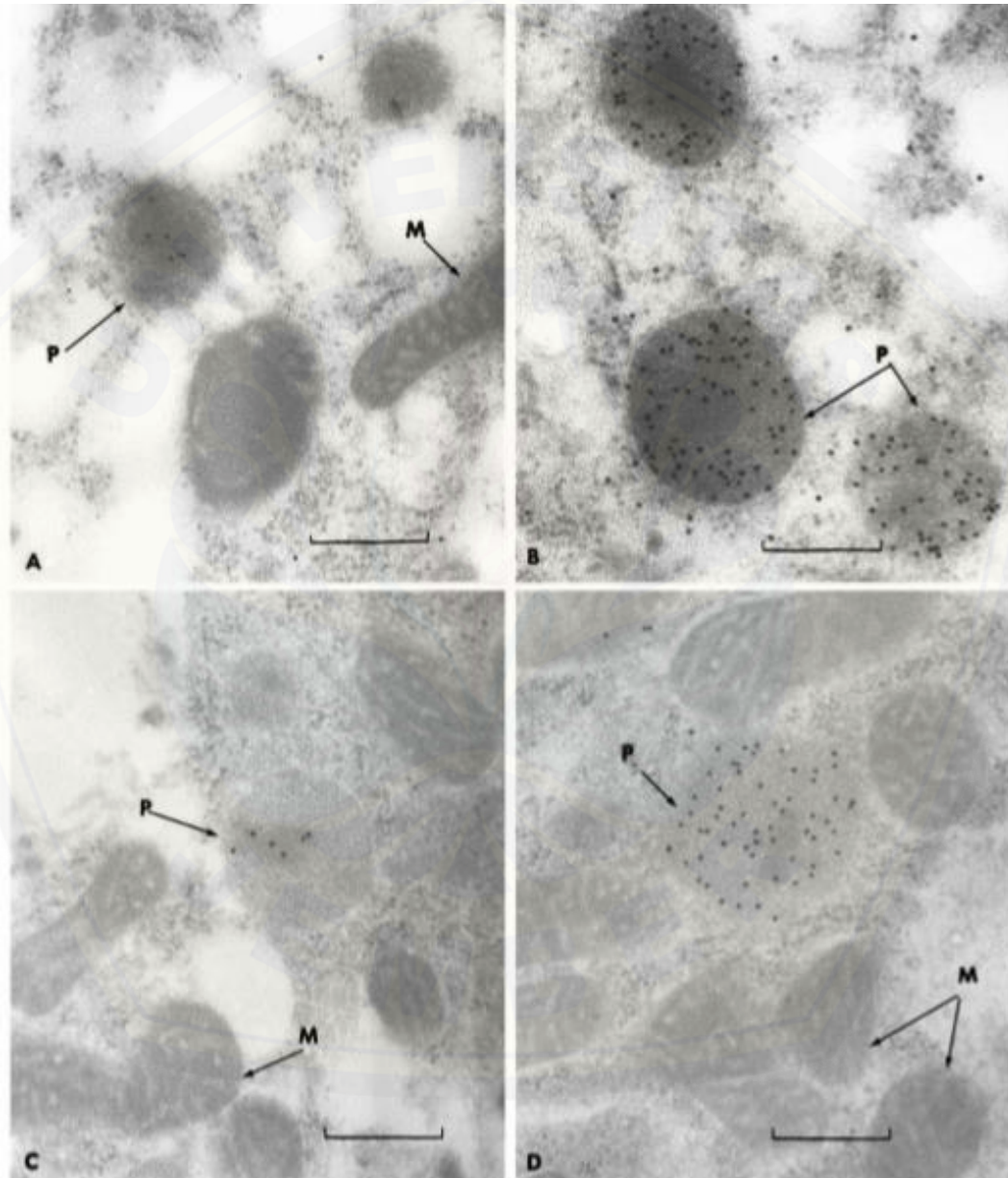


Gambar 2.4 Pembentukan Allantoin dari Asam Urat (Sumber: Retailleau *et al.*, 2012)

Kelarutan allantoin 5-10 kali lebih besar dari asam urat. Hal ini yang menyebabkan manusia secara instrinsik lebih rentan mengalami pengendapan kristal urat dan asam urat. Urikase memiliki peran penting salah satunya pada bidang farmasi digunakan untuk menentukan kadar asam urat dalam cairan biologis setelah urikase tersebut isolasi dari sumber hewan atau mikroba dan dimurnikan. Aplikasi urikase ini tergolong penting dan kebutuhan terhadap enzim tersebut besar, sehingga perlu dilakukan ekstraksi dan produksi urikase dari sumber lokal (Pfmier *et al.*, 2009; Terkeltaub, 2012; Meraj *et al.*, 2014).

Menurut Creative Enzymes (2017) enzim urikase stabil pada pH 7,0 sampai 11 dan memiliki aktivitas optimum pada pH 8,5. Enzim ini stabil pada suhu dibawah 55 °C dan aktivitas optimum pada suhu 45 °C. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Rajoka *et al.* (2006) urikase yang diisolasi dari ginjal sapi stabil pada pH 8, aktivitas optimal tercapai pada suhu 35-40 °C dan aktivitas *crude* enzim 53 U/mg. Aktivitas optimum pada pH 7,0 sebesar 4237 IU/mL setelah dilakukan pemurnian dengan amonium sulfat, *ion exchange* dan kromatografi kolom. Urikase bersifat termostabil karena pada suhu 100 °C masih menunjukkan adanya aktivitas 25%.

Usuda *et al.* (1994) melakukan penelitian pada organel-organel sel dari hati dan ginjal katak. Berdasarkan penelitian tersebut dilaporkan bahwa urikase terdapat pada peroksisom hati lebih tepatnya pada inti kristaloid peroksisom dalam sel parenkim, sedangkan urikase ginjal terdapat pada epitelium tubular proksimal. Hasil pengamatan subseluler sel hati dan ginjal katak dapat dilihat pada gambar 2.6.

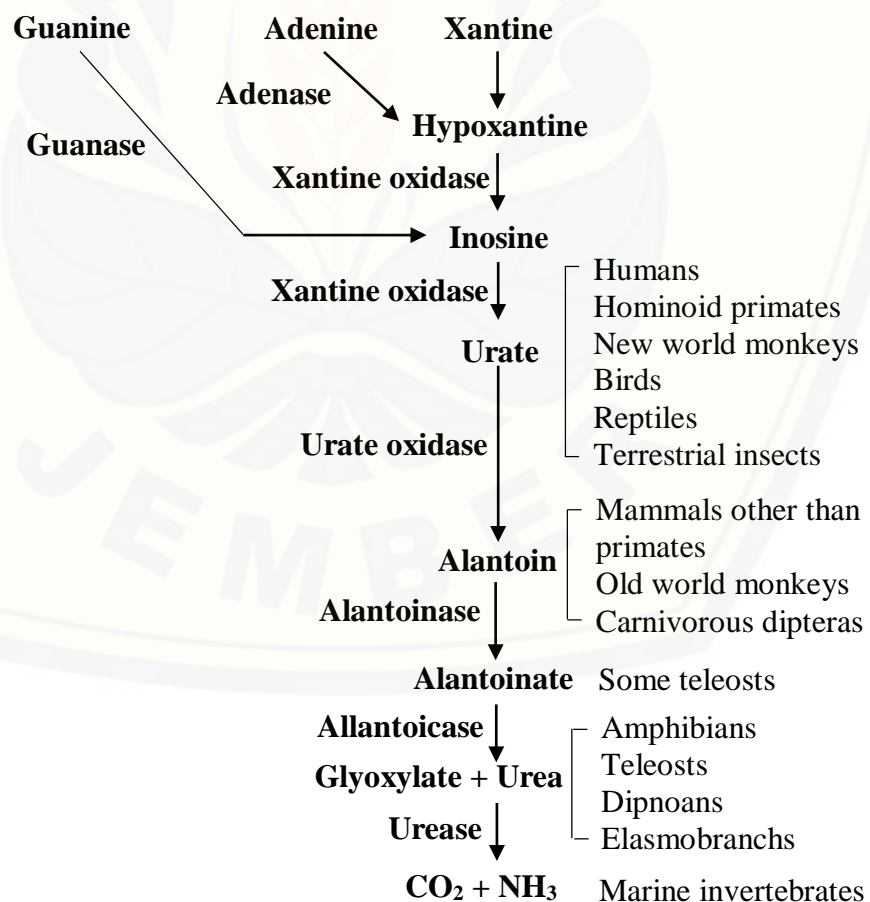


Gambar 2.5 Lokalisasi Urikase dan Katalase pada Hati dan Ginjal Katak Dewasa (Sumber: Usuda *et al.*, 1994)

Bagian A dan B pada gambar 2.7 adalah gambar subseluler hati katak, sedangkan subseluler ginjal katak ditunjukkan pada bagian C dan D. Bagian A dan C menunjukkan lokalisasi urikase sedangkan bagian B dan D menunjukkan lokalisasi katalase pada sel hati dan ginjal katak. Berdasarkan gambar 2.6 bagian A dan C, urikase terdapat pada organel peroksisom (P) dan tidak terdapat pada organel mitokondria (M). Katalase juga terdapat pada organel peroksisom jika dilihat pada bagian B dan D.

2.3 Organisme dengan Enzim Pendegradasi Asam Urat

Metabolisme purin menghasilkan produk akhir yang berbeda-beda pada setiap spesies. Degradasi purin pada hewan umumnya menjadi asam urat, namun degradasi asam urat menjadi senyawa yang lebih sederhana tidak semua spesies hewan mampu melakukannya.



Gambar 2.6 Rute Metabolisme Purin (Sumber: Hayashi *et al.*, 2000)

Berdasarkan gambar 2.1 degradasi asam urat hanya mampu dilakukan oleh beberapa kelompok hewan saja. Burung, reptil, primata dan manusia tidak memiliki kemampuan untuk mendegradasi asam urat. Golongan mamalia mampu mengubah asam urat menjadi produk yang lebih sederhana, namun primata dan karnivora tidak memiliki kemampuan itu. Kelompok amfibi, invertebrata laut, *dipnoans*, *teleost*, dan *elasmobranchs* mampu memecah asam urat menjadi urea dan amonia. Urea dan amonia merupakan senyawa yang lebih sederhana dari alantoin.

Enzim-enzim tertentu seperti *urate oxidase*, *allantoicase* dan *alantoinase* mampu melakukan degradasi asam urat. *Liver urate oxidase* (urikase), *allantoicase* dan *alantoinase* merupakan enzim-enzim yang terdapat pada organ hati. *Liver urate oxidase* (urikase) terdapat pada organel peroksisom sel hati dari semua hewan yang memiliki *urate oxidase*. *Alantoinase* dan *allantoicase* merupakan enzim yang membentuk kompleks pada hati amfibi, tetapi termasuk protein yang berbeda dalam hati ikan. Letak *alantoinase* dan *allantoicase* dalam sel (subseluler) berbeda pada beberapa kelompok ikan. *Alantoinase* hati terletak pada organel peroksisom dan di sitosol untuk kelompok ikan air asin, tetapi hanya ada pada organel sitosol untuk kelompok ikan air tawar. *Allantoicase* hati pada kelompok makarel terdapat pada permukaan luar membrane peroksisomal sedangkan pada kelompok sarden terletak di dalam matriks peroksisomal. Kompleks *alantoinase-allantoicase* hepatic amfibi terletak di dalam organel mitokondria (Hayashi *et al.*, 2000).

2.4 Hati Kambing

Organ hati terletak dibelakang diafragma. Hati memiliki beberapa fungsi dalam proses tubuh. Hati berperan dalam metabolisme karbohidrat, organ pencernaan, efek antimicrobial, metabolisme bahan kimia dan obat-obatan. Hati juga berperan penting dalam proses penyerapan nutrien. Hati berperan sebagai organ sekresi (tempat ekskresi cairan empedu) dan sebagai organ pencernaan yang berfungsi untuk menetralkan keadaan asam saluran usus dan pembentukan emulsi saat memulai pencernaan (Aziza, 2012).

Hati merupakan salah satu organ penghasil asam urat dengan dikatalis oleh enzim *xanthine oxidase*. Produksi asam urat endogen dilakukan pada organ-organ

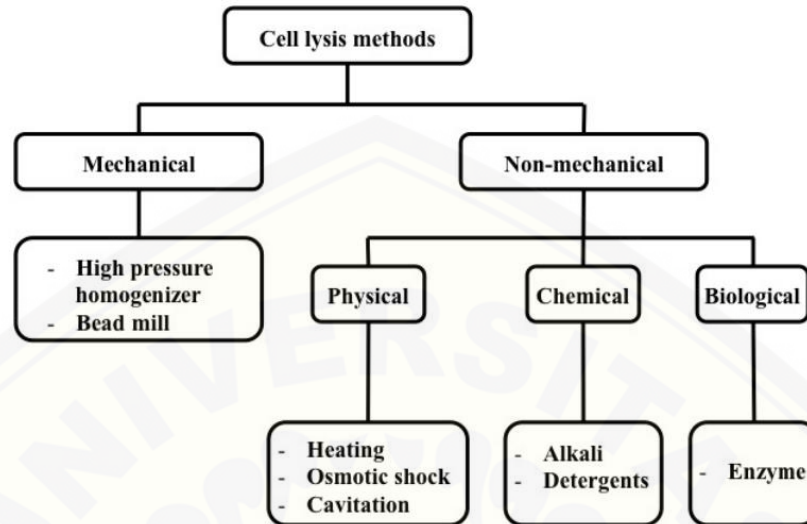
tubuh terutama di hati, ginjal, usus, dan jaringan otot dan endotelium vascular. Asam urat yang terbentuk di dalam hati dapat dipecah menjadi molekul yang lebih sederhana oleh beberapa golongan hewan. Mamalia selain primata memiliki enzim *urate oxidase* (urikase) yang berfungsi mendegradasi asam urat menjadi allantoin. Enzim ini terdapat pada peroksisom sel hati. Namun, bentuk lokalisasi intraperoksisomal dari *liver urate oxidase* bervariasi dari spesies satu dengan spesies lain. Urikase pada katak terdapat pada inti kristaloid peroksisom dalam sel parenkim. Kambing tergolong sebagai mamalia, sehingga kambing mampu menghasilkan asam urat di dalam hati dan mampu mendegradasinya sendiri menjadi allantoin (Chaudhary *et al.*, 2013; Usuda *et al.*, 1994; Hayashi *et al.*, 2000; Rini, 2017).

2.5 Lisis Sel

Lisis sel merupakan metode pemecahan atau penghancuran batas luar sel untuk melepaskan materi antar sel seperti DNA, RNA, protein atau organel sel. Berbagai macam metode dibuat untuk melisis sel bergantung pada tujuan penerapannya. Secara garis besar metode lisis sel dibagi menjadi dua, yaitu metode mekanik dan non-mekanik. Klasifikasi metode lisis sel tertera pada gambar 2.8. Karakteristik sel juga menjadi pertimbangan dalam memilih metode lisis sel. Sel mamalia memiliki struktur membran pembungkus sel yang rapuh, sehingga metode kejutan osmosis cocok untuk karakteristik sel mamalia. Perubahan konsentrasi garam di sekitar sel secara tiba-tiba yang menyebabkan perbedaan konsentrasi antara bagian dalam dan luar sel, menjadikan sel permeabel terhadap air karena proses osmosis. Jika konsentrasi garam di luar sel lebih rendah, air akan masuk ke dalam sel sehingga sel membengkak dan kemudian meledak (Islam *et al.*, 2017).

Larutan bufer dengan konsentrasi rendah dapat berperan dalam proses lisis sel. Garam pada larutan bufer akan mempengaruhi konsentrasi garam di luar sel. Kadar garam yang rendah dalam larutan bufer memungkinkan air mengalami osmosis dan masuk ke dalam sel. Sel akan mengeluarkan organel sel dan materi lainnya termasuk protein target yang dalam penelitian ini adalah urikase pada organel peroksisom. Berdasarkan hal ini larutan bufer selain menjaga kestabilan

protein target karena pH yang digunakan, juga berfungsi dalam proses lisis sel (Islam *et al.*, 2017).

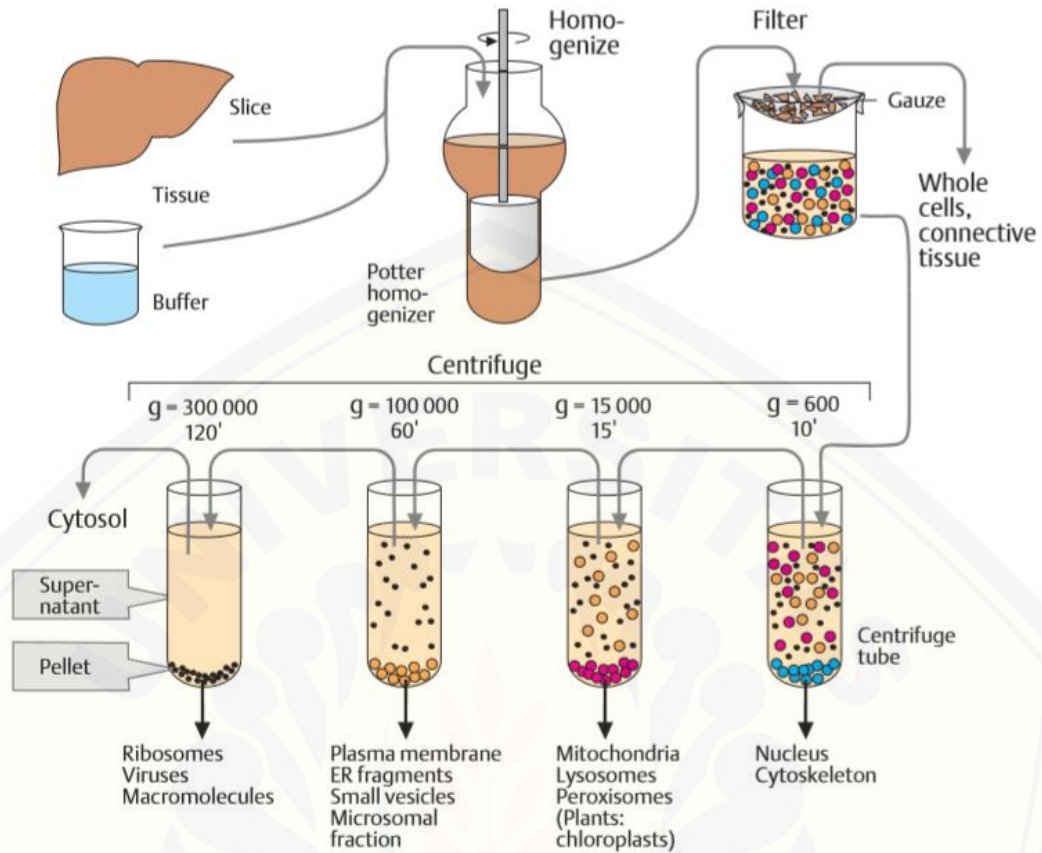


Gambar 2.8 Klasifikasi Metode Lisis Sel (Sumber: Islam *et al.*, 2017)

2.6 Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan pemisahan komponen-komponen sel oleh gaya sentrifugal dalam alat sentrifugator. Sentrifugasi memiliki peran penting pada proses isolasi dan purifikasi. Sentrifugasi berfungsi dalam pemecahan sel secara halus. Sentrifugasi juga merupakan tahap awal pemurnian enzim. Sentrifugasi akan menghasilkan supernatan yang jernih dan endapan yang terikat kuat padadasar tabung, yang kemudian dipisahkan secara normal (Scopes, 1982; Walsh dan Headon, 1994; Campbell *et al.*, 2002).

Partikel yang memiliki densitas lebih besar akan lebih mudah mengendap daripada partikel dengan densitas kecil. Kecepatan sentrifugasi berperan penting pada proses pengendapan ini. Kecepatan sentrifugasi yang tinggi akan mampu mengendapkan komponen-komponen sel yang ukuran dan densitasnya relatif kecil. Gambar 2.7 menunjukkan peran penting kecepatan sentrifugasi dalam pengendapan organel-organel sel. Berdasarkan gambar 2.7, pada kecepatan sentrifugasi 600 g hanya inti sel dan sitoskeleton yang terendapkan pada pelet. Mitokondria, lisosom, peroksisom dan kloroplas (pada sel tumbuhan) mengendap pada kecepatan sentrifugasi 15.000 g. Organel-organel lain yang memiliki densitas sangat kecil mengendap setelah 100.000 g (Koolman dan Roehm, 2005).



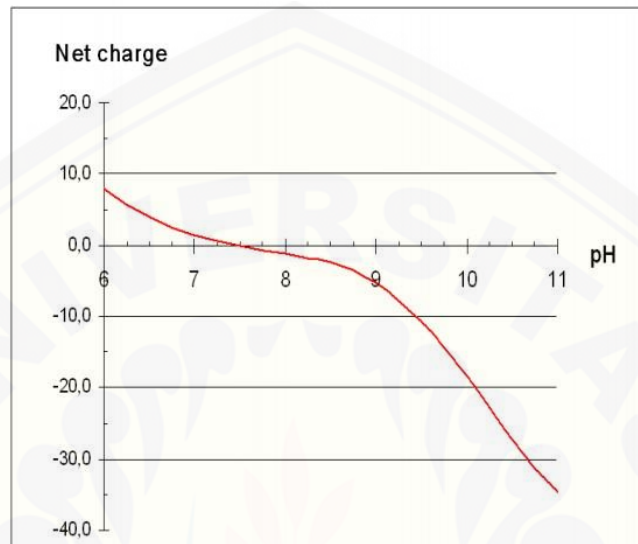
Gambar 2.7 Pengaruh Kecepatan Sentrifugasi pada Pengendapan Organel (Sumber: Koolman dan Roehm, 2005)

2.7 Pengaruh pH pada Urikase

Menurut Wiseman (1985) enzim dikatakan stabil apabila enzim mampu mempertahankan aktivitasnya pada saat penyimpanan, penggunaan dan dari kondisi yang bersifat merusak seperti pengaruh suhu, pH ekstrim serta penggunaan pelarut tertentu. Stabilitas enzim sangat dipengaruhi oleh pH, hal ini berhubungan dengan titik isoelektrik enzim tersebut. Bonnete (2012) menjelaskan bahwa titik isoelektrik secara teori merupakan penjumlahan seluruh muatan dari struktur primer dan masing-masing asam amino pada struktur enzim. Muatan total pada titik isoelektrik adalah nol dan titik isoelektrik urikase berada pada pH 7,5.

Muatan total urikase akan mengalami perubahan jika pH di sekitarnya mengalami perubahan. Pada pH di atas titik isoelektrik, muatan total urikase cenderung negatif sedangkan pada pH di bawah titik isoelektrik cenderung positif.

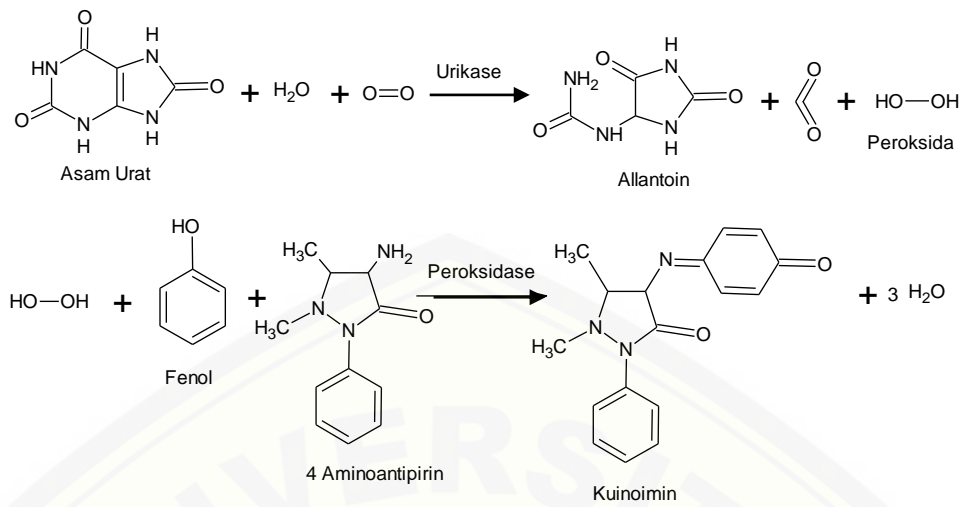
Perubahan muatan total ini menimbulkan gaya tolakan elektrostatis yang dapat menyebabkan perubahan pada struktur urikase dan berdampak pada perubahan sisi aktif enzim sehingga berdampak pada kinerja urikase (Bonnete, 2012). Gambar 2.9 berikut menjelaskan pengaruh pH pada muatan total urikase.



Gambar 2.9 Muatan Total Urikase pada Berbagai pH (Sumber: Bonnete, 2012)

2.8 Metode Pengukuran Aktivitas Urikase

Aktivitas urikase dapat diukur dengan dua metode spektrofotometri, yaitu dengan spektrofotometri UV dan spektrofotometri Visibel. Aktivitas urikase dengan spektrofotometri UV dapat dilihat dari besarnya sisa asam urat yang tidak terurai (Iswantini *et al.*, 2009). Sedangkan pada spektrofotometri visible, aktivitas urikase ditentukan dengan mengukur pembentukan kuinoimin sebagai hasil reaksi hidrogen peroksida (produk degradasi asam urat oleh enzim urikase) dengan 4-aminoantipirin dan fenol dengan adanya peroksidase sesuai dengan reaksi pada gambar 2.10. Satu U enzim urikase diasumsikan setara dengan jumlah enzim yang menghasilkan 1,0 μL hidrogen peroksida per menit dan pembentukan kuinoimin sebanding dengan jumlah asam urat yang terdegradasi oleh urikase (Lee *et al.*, 2015).



Gambar 2.10 Mekanisme Pembentukan Kuinoimin (Sumber: Suhendi dan Sutrisna, 2011)

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan November 2019 sampai bulan Oktober 2020 sedangkan tempat yang digunakan pada saat penelitian adalah laboratorium biokimia, laboratorium kimia analitik dan laboratorium CDAST Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

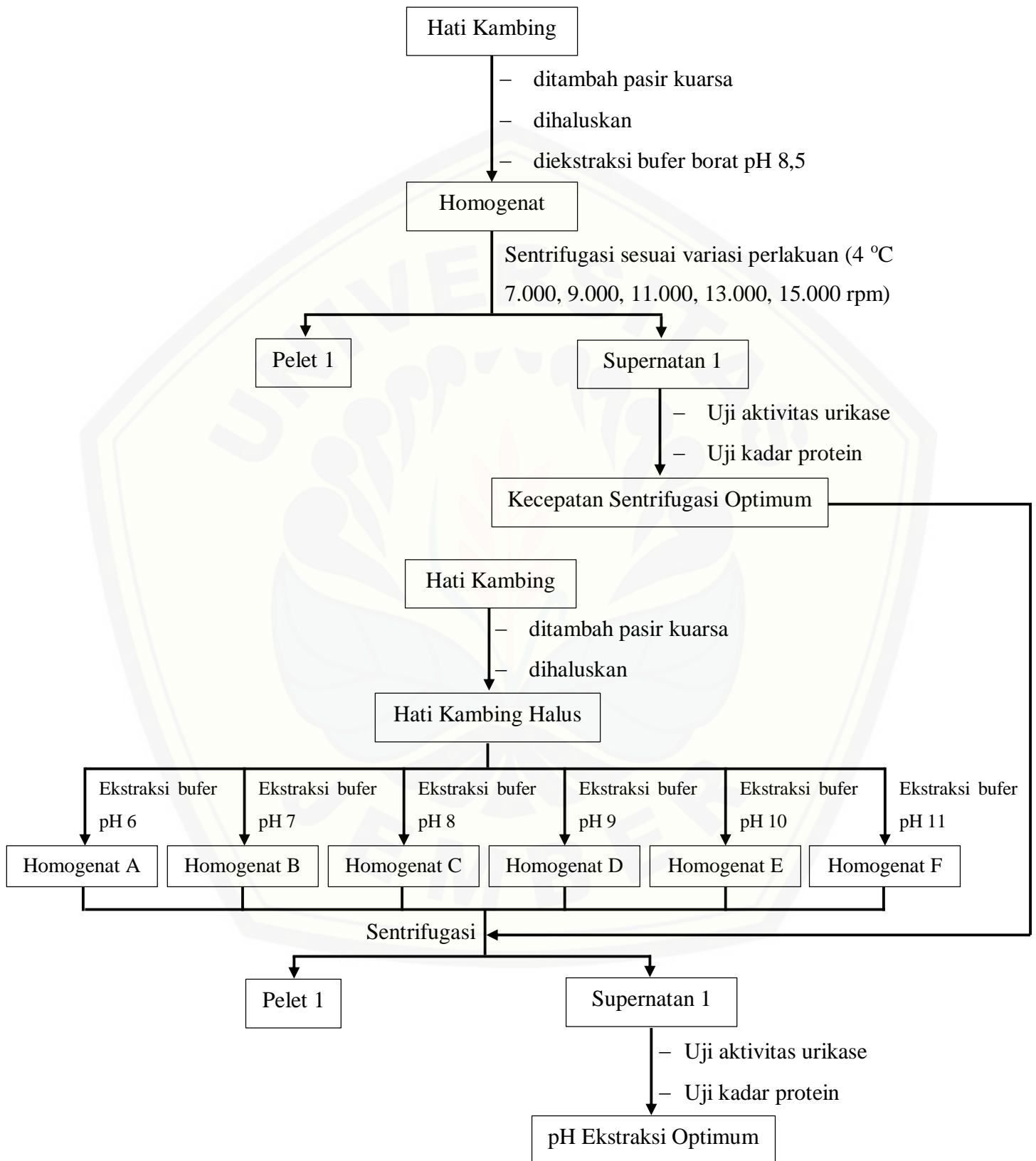
3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan untuk penelitian optimasi kecepatan sentrifugasi dan pH dalam isolasi enzim urikase dari hati kambing sebagai berikut: Spektrofotometer UV/Vis, neraca analitik, pisau 1 buah, inkubator, mortar dan alu, sentrifus, labu ukur 1000 mL, 50 mL, batang pengaduk 2 buah, gelas beaker 50 mL, 100 mL, 250 mL, 1000 mL, corong gelas 1 buah, corong Buchner, gelas ukur 50 mL, pipet tetes 2 buah, pipet mohr 25 mL, gunting 1 buah, kaca arloji 1 buah, pH meter, mikropipet, botol semprot, *ice bath*, *magnetic stirrer* dan anak stirrer.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian optimasi kecepatan sentrifugasi dan pH pada ekstraksi enzim urikase dari hati kambing adalah sebagai berikut: hati kambing yang diperoleh dari tempat penyembelihan hewan di Jl. Cokro Aminoto IV Kecamatan Talangsari, kertas saring whatman no.1, akuades, natrium hidroksida (NaOH) (Merck), asam urat (sigma-aldrict), asam borat (H_3BO_3) (Merck), asam klorida (HCl), natrium bikarbonat ($NaHCO_3$) (Merck), natrium karbonat (Na_2CO_3) (Merck), *Bovine Serum Albumin*, natrium fosfat (Na_2HPO_4) (Merck), asam fosfat (H_3PO_4) (Merck), Coomassie Brilliant Blue G-250, etanol, 4-aminoantipirin (sigma-aldrict), fenol, hidrogen peroksida (H_2O_2) dan *horse radish peroxidase* (Merck).

3.2 Rancangan Penelitian



3.4 Prosedur kerja

3.4.1 Preparasi Sampel

Hati kambing digunakan sebagai sampel pada penelitian ini. Pengambilan hati kambing dilakukan setelah kambing disembelih dilokasi pembelian dan hati kambing langsung dipindahkan ke dalam *ice box* yang berisi es. Hati kambing langsung dibawa ke laboratorium dan digunakan secepat mungkin.

3.4.2 Ekstraksi Urikase

a. Pengaruh Kecepatan Sentrifugasi pada pH 8,5 Terhadap Aktivitas Urikase

Ekstraksi urikase mengacu pada metode Rajoka *et al.* (2006), hati kambing sebanyak 10 gram ditambah dengan 1 gram pasir kuarsa kemudian dihaluskan menggunakan mortar. Hati yang sudah dihaluskan kemudian ditimbang sebanyak 5 g dan diekstraksi dengan bufer borat pH 8,5 hingga volume 50 mL, kemudian didiamkan selama 5 menit sebelum disaring. Prosedur pembuatan larutan bufer borat pH 8,5 tertera pada lampiran 3.1. Filtrat disentrifugasi selama 30 menit (4 °C, 7.000, 9.000, 11.000, 13.000, 15.000 rpm). Supernatan dipisahkan dari pelet dan supernatan yang diperoleh merupakan *crude* enzim urikase yang akan diuji lebih lanjut. *Crude* enzim diambil 0,1 mL untuk dilakukan uji aktivitas enzim dan uji protein dengan metode Bradford menggunakan standar BSA dengan pengulangan tiga kali. Kecepatan sentrifugasi yang menghasilkan aktivitas spesifik tertinggi dianggap sebagai kecepatan optimum dan digunakan pada proses selanjutnya.

b. Pengaruh pH pada Kecepatan Sentrifugasi Optimum Terhadap Aktivitas Urikase

Ekstraksi urikase pada optimasi pH ekstraksi dilakukan dengan metode yang sama seperti pada optimasi kecepatan sentrifugasi. Hati kambing sebanyak 10 g ditambah dengan 1 gram pasir kuarsa kemudian dihaluskan menggunakan mortar. Hati kambing yang sudah halus kemudian ditimbang sebanyak 0,5 g dan diekstraksi dengan bufer pH 6, 7, 8, 9, 10 dan 11 hingga volume 5 mL, kemudian didiamkan selama 5 menit sebelum disaring. Prosedur pembuatan larutan bufer dapat dilihat pada lampiran 3.1. Filtrat yang diperoleh disentrifugasi selama 30 menit dengan suhu 4 °C menggunakan kecepatan sentrifugasi optimum yang diperoleh dari optimasi kecepatan sentrifugasi. Pelet dan supernatan yang diperoleh diberi perlakuan yang sama seperti pada optimasi kecepatan sentrifugasi. pH ekstraksi

yang menghasilkan aktivitas spesifik urikase tertinggi dianggap sebagai pH optimum.

3.4.3 Penentuan Aktivitas Urikase

a. *Scanning* Panjang Gelombang Kuinoimin

Panjang gelombang kuinoimin yang berbeda pada beberapa literatur mengakibatkan dilakukan *scanning* panjang gelombang untuk memperoleh panjang gelombang yang optimal. Kuinoimin yang diperoleh dari hasil reaksi larutan H₂O₂ standar 30 ppm dengan 0,15 mL 4-aminoantipirin (30 mM), 0,1 mL fenol (1,5%) dan 0,05 mL peroksidase (15 U / mL) yang diinkubasi pada suhu 37 °C dan waktu 20 menit diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-800 nm dengan interval 1 nm. Panjang gelombang maksimum diperoleh, digunakan untuk pengukuran selanjutnya. Prosedur pembuatan larutan standar H₂O₂ 30 ppm, 4-aminoantipirin, fenol dan peroksidase tercantum pada lampiran 3.1.

b. Pembuatan Kurva Standar H₂O₂

Larutan stok H₂O₂ 100 ppm diencerkan dengan variasi konsentrasi yaitu 5, 10, 15, 20, 25, 30 dan 35 ppm. Prosedur pengenceran larutan stok terlampir pada lampiran 3.1. Masing-masing larutan H₂O₂ standar 0,6 mL ditambah 0,15 mL 4-aminoantipirin (30 mM), 0,1 mL fenol (1,5%), 0,05 mL peroksidase (15 U / mL) dan 0,1 mL bufer borat pH 8,5 (0,1 M), kemudian diinkubasi pada suhu 37 ° C selama 20 menit. Penambahan 1 mL etanol dilakukan setelah inkubasi selesai. Absorbansi diukur pada panjang gelombang hasil *scanning* yang telah diperoleh dari tahap penelitian sebelumnya. Data absorbansi yang didapatkan kemudian digunakan untuk membuat kurva regresi yang menyatakan hubungan absorbansi kuinoimin dengan konsentrasi H₂O₂.

c. Uji Aktivitas Urikase

Urikase dapat mengkatalisis oksidasi asam urat menjadi allantoin, CO₂ dan H₂O₂. *Crude* enzim urikase sebanyak 0,1 mL diinkubasi dalam 0,6 mL bufer natrium borat (0,1 M) yang mengandung 2 mM asam urat, 0,15 mL 4-aminoantipirin (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. Reaksi enzimatik dihentikan dengan penambahan 1 mL etanol. Kadar H₂O₂ yang dihasilkan

ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang hasil *scanning* dan dikonfersi pada kurva standar. Satu U aktivitas setara dengan jumlah enzim yang menghasilkan 1,0 μL H_2O_2 per menit (Lee *et al.*, 2015). Aktivitas total dan spesifik ditentukan menggunakan rumus berikut.

$$\text{Aktivitas Total (U/mL)} = \frac{[\text{S}] - [\text{K}] \times \text{Fp} \times \frac{\text{V total}}{\text{V enzim}}}{t \text{ inkubasi} \times \text{BM H}_2\text{O}_2}$$

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

Keterangan:

[S]	= Konsentrasi Sampel	V total	= Volume total
[K]	= Konsentrasi Kontrol	V enzim	= Volume enzim
Fp	= Faktor pengenceran	BM H_2O_2	= Berat molekul H_2O_2

(Zain, 2018).

3.4.4 Penentuan Kadar Protein Urikase

a. Pembuatan Kurva Standar Bovine Serum Albumin (BSA)

Larutan standar BSA dibuat dengan cara mengencerkan larutan stok BSA. Larutan stok dengan konsentrasi 2 mg/mL diencerkan menjadi larutan standar dengan variasi konsentrasi 0,15; 0,30; 0,45; 0,6; 0,75; 0,9; 1,05; 1,20; 1,35 dan 1,5 mg/mL. Larutan standar BSA kemudian ditentukan kadar proteinnya dengan uji Bradford. Larutan standar dengan berbagai konsentrasi dimasukkan ke dalam *microtube* sebanyak 39 μL kemudian ditambah dengan 1,95 mL reagen Bradford. Selanjutnya inkubasi dilakukan selama 5 menit pada suhu ruang. Blanko dibuat dengan metode yang sama tetapi tanpa adanya BSA. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 595 nm menggunakan spektrofotometer UV/Vis (Bradford, 1976). Data absorbansi yang diperoleh kemudian digunakan untuk membuat kurva regresi yang menyatakan hubungan absorbansi dengan konsentrasi BSA. Prosedur pembuatan larutan stok dan standar BSA serta reagen Bradford terlampir pada lampiran 3.1.

b. Uji Kadar Protein Urikase

Uji protein urikase dilakukan dengan memasukkan 39 μL *crude* enzim urikase (supernatan 1) ke dalam *microtube*. Selanjutnya ditambahkan 1,95 mL reagen Bradford dan diinkubasi selama 5 menit. Setelah itu dilakukan pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV/Vis pada panjang gelombang 595 nm (Bradford, 1976).

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

Keterangan:

m = nilai gradient dari persamaan kurva standar BSA

C = nilai intersept dari persamaan kurva standar BSA

Abs = nilai absorbansi larutan (Zain,2018).

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian optimasi kecepatan sentrifugasi dan pH dalam isolasi enzim urikase dari hati kambing adalah sebagai berikut.

1. Aktivitas maksimum urikase dicapai pada kecepatan sentrifugasi 13.000 rpm. Aktivitas total dan spesifik yang dihasilkan berturut-turut yaitu 0,0189 U/mL dan 0,0047 U/mg.
2. pH larutan bufer untuk ekstraksi urikase sangat berpengaruh terhadap aktivitas urikase. Aktivitas total dan spesifik urikase optimum pada pH 8. Nilai aktivitas total dan spesifik yang diperoleh pada pH 8 adalah 0,085 U/mL dan 0,0121 U/mg.

5.2 Saran

Optimasi pH ekstraksi sebaiknya menggunakan jenis bufer yang sama atau menggunakan jenis bufer yang berbeda dengan pH yang sama agar dalam penentuan pH optimum lebih mudah. Penelitian terkait optimasi jenis bufer ekstraksi juga perlu dilakukan untuk mengetahui jenis bufer yang sesuai dan mampu mempertahankan aktivitas urikase dalam waktu yang cukup lama. Homogenat setelah dimasukkan ke dalam tabung mikro sentrifus sebaiknya ditimbang terlebih dahulu untuk memastikan kandungan protein dalam sampel memiliki masa jenis yang benar-benar homogen. *Crude* enzim sebaiknya dimurnikan terlebih dahulu sebelum menentukan kecepatan sentrifugasi dan pH ekstraksi optimum untuk menghindari kadar protein yang tidak representatif karena masih banyaknya protein kontaminan. Penelitian terkait urikase sebaiknya dilakukan dalam waktu yang singkat untuk menghindari pengurangan aktivitas urikase.



DAFTAR PUSTAKA

- Aatbio. 2019. *Carbonate-Bicarbonate Buffer pH 9 Preparation and Recipe*. <https://www.aatbio.com/resources/bufer-preparations-andrecipes/carbonate-bicarbonate-bufer-ph-9-2-to-10-6>. (diakses pada 10 November 2019).
- Aatbio. 2019. *Phosphate Buffer pH 7 Preparation and Recipe*. <https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-andrecipes/phosphate-buffer-ph-5-8-to-7-4>. (diakses pada 10 November 2019).
- Aatbio. 2019. *Sodium Borate Buffer pH 8.5 Preparation and Recipe*. <https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/sodium-borate-buffer-ph-8-5>. (diakses pada 10 November 2019).
- Alishah, K., Asad, S., Khajeh, K., Akbari, N. 2016. *Utilizing Intein-mediated Protein Cleaving for Purification of Uricase a Multimeric Enzyme*. Tehran: Enzyme and Microbial Technology.
- Al-Helaly, L. A. dan F. A. Mohammad. 2014. Uricase Isolated from Seeds of Leek (*Allium ampeloprasum*), Celery (*Apium graveolens*) and Arugula (*Eruca sativa*). *Iraqi National Journal of Chemistry*.
- Andersen, Ø., Aas, T. S., Skugor, S., Takle1, H., Nes, S. V., Grisdale-Helland, B., Helland, S. J., Terjesen, B. F. 2006. *Purine-Induced Expression of Urate Oxidase and Enzyme Activity in Atlantic Salmon (Salmo Salar) Cloning of Urate Oxidase Liver Cdna from Three Teleost Species and The African Lungfish Protopterus Annectens*. Norway: FEBS Journal.
- Aziza, N. L. 2012. Persentase Organ dalam Serta Kandungan Vitamin A Hati kambing Petelur yang Diberi Pakan Mengandung Marigold (*Tagetes erecta*). [Skripsi]. Departemen Ilmu Nutrisi dan Tekknologi Pakan Fakultas Peternakan: Institut Pertanian Bogor.
- Barsoum, R. dan M. El-Khatib. 2017. Uric acid and life on earth. *Journal of Advanced Research*. 8:471–474.
- Bradford, M. M. 1976. *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of*

Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Georgia: Academic Press, Inc.

Bomalaski, J. S., Holtsberg, F. W., Ensor, C. M., Clark, M. A. 2002. Uricase Formulated with Polyethylene Glycol (UricasePEG 20): Biochemical Rationale and Preclinical Studies. *The Journal of Rheumatology*.

Campbell, N. A., Reece, J. B., dan Mitchell, L.G. 2002. *Biologi 1 Edisi ke-5*. Jakarta: Erlangga.

Chaudhary, K., Malhotra, K., Sowers, J., dan Aroor, A. 2013. Uric acid-key ingredient in the recipe for cardiorenal metabolic syndrome. *CardioRenal Medicine*, 3(3), 208–220. <https://doi.org/10.1159/000355405>

Creative Enzymes. 2017. *Uricase from E. coli Recombinant*. <http://www.creative-enzyme.com>. (diakses pada 7 Oktober 2019).

Cusabio. 2019. *Buffer Calculator Boric Acid-Borax Buffer pH 8*. <https://www.cusabio.com/m-296.html>. (diakses pada 10 November 2019).

Cusabio. 2019. *Buffer Calculator Boric Acid-Borax Buffer pH 9*. <https://www.cusabio.com/m-296.html>. (diakses pada 10 November 2019).

Cusabio. 2019. *Buffer Calculator Borax-NaOH Buffer pH 10*. <https://www.cusabio.com/m-296.html>. (diakses pada 10 November 2019).

Cusabio. 2019. *Buffer Calculator Borax-NaOH Buffer pH 11*. <https://www.cusabio.com/m-296.html>. (diakses pada 10 November 2019).

Fauziah, S. N., Herasari, D., Laila, A. 2012. *Studi Pengaruh Penambahan Gliserol dan Sorbitol Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Actinomycetes An14 2b-3*. Bandar Lampung: Universitas Lampung.

Francis H. M. 2000. *Uric Acid*. Penerjemah Suseno Akbar. Yogyakarta: Salemba Medika.

- Hafez, R. M., Abdel-Rahman, T. M., dan Naguib, R. M. 2017. Uric acid in plants and microorganisms: biological applications and genetics - a review. *Journal of Advanced Research*. 8:475–486.
- Hayashi, S., Fujiwara, S., dan Noguchi, T. 2000. *Evolution of Urate-Degrading Enzymes in Animal Peroxisomes* Sueko Hayashi , Satoko Fujiwara , and Tomoo Noguchi *. 32.
- Horecker B. L. 1955. TPNH Cytochrome c Reductase (Liver). *Journal of Biology-Chemistry*. 183, 593
- Htay, H. H., Sato, K., Tamaki, K., Tsutsumi, H., Katsumata, Y. 1989. *Comparative Immunology Of Mammalian Uricase Using Anti-Hog Liver Uricase*. Nagoya. Pergamon Press plc.
- Huda, N. 2001. *Pemeriksaan Kinerja Spektrofotometer UV-Vis. GBC 911A Menggunakan Pewarna Tartrazine CL 19140*. Batan: Sigma Epsilon.
- Islam, M. S., Aryasomayajula, A., Selvaganapathy, P. R. 2017. *A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods*. Canada: Micromachines.
- Iswantini, D., Nurhidayat, N. Trivadila, dan Mardiah, E. 2009. Aktivitas Urikase yang Dihasilkan dari Berbagai Sel L Actobacillus plantarum dan Parameter Kinetiknya (Uricase Activity and Determination f Kinetics Parameter of Various Cells of L Actobacillus plantarum). *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 163-169.
- Jagathy, K., Pushparaj, A., Ronald, J. 2016. Uricase Production from Bacillus Subtilis Isolated from Poultry Waste. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 3(6): 255-262.
- Jianguo, L., Gaoxiang, L., Hong, L., Xiukap Z. 1994. *Purification and Properties of Uricase from Candida sp. and Its Application in Uric Acid Analysis in Serum*. Beijing: Humana Press Inc.
- Koka R. M., Huang E., dan Lieske J. C. 2000. Adhesion of Uric Acid Crystals to the Surface of Renal Epithelial Cells. *Am J Physiol Renal Physiol*.

278:F989F998.

Koolman J., dan Roehm K. H. 2005. *Color Atlas of Biochemistry*. New York. Thieme Stuttgart.

Lee N. S. I. S., Khosravi H. M., Ibrahim N., dan Shahir S. 2015. Isolation, Partial Purification and Characterization of Thermophilic Uricase From *Pseudomonas otitidis* Strain SN4. *Malaysian Journal of Microbiology*, Vol 11(4) 2015, pp. 352-357

Maiuolo, J., Oppedisano, F., Gratteri, S., Muscoli, C., dan Mollace, V. 2016. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology*, 213, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.08.109>

Meraj, M., Ur-Rehman, K., Javed, S., Irfan, R., dan Jahan, N. 2014. Hyperproduction of Urate Oxidase By Wild and Mutated *Bacillus subtilis*. *Journal of Advanced in Chemical Engg., @ Biological Sciences (IJACEBS)*.1(1).

Moran, L. A., Horton, H., Robert. S., Gray, K., dan Perry, M. D. 2012. *Principle Biochemistry, Fifth Edition*. Ued States of America: Pearson Education, Inc.

Naja, N. A. 2020. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Urikase Pada Hati Ayam. *Skripsi*. Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam: Universitas Jember.

Nasrul, E., dan Sofitri. 2012. Hiperurisemia pada pra diabetes. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 1(2)

Pagana K. D. 2001. *Mosby's Diagnostic and Laboratory Test Reference 5th Ed*. Mosby, Inc. St. Louis; 876-879.

Pfrimer, P., De Moraes, L. M. P., Galdino, A., Sobreira, S. L., Pedrosa, R. V. Castelo, De Marco, J. Lisboa. Prates., M. Vianna. Bloch, Carlos. Gonçalves Torres, F. dan Araripe. 2010. Cloning, purification, and partial characterization of *Bacillus subtilis* urate oxidase expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.

- Pilsum, J. F. V. 1952. *The Inhibition of Uricase by Xanthine*. New York: Department of Biochemistry State University of New York
- 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.
- Retailleau, P., Colloc'h, N., Vivarès, D. B., Castro, F., El Hajji, B., Mornon, M., Paul, J., Monard, G., dan Prangé, T. 2004. Complexed and ligand-free high-resolution structures of urate oxidase (Uox) from *Aspergillus flavus*: A reassignment of the active-site binding mode. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. D60: 453-462.
- Rini. 2017. Hubungan jenis kelamin dan asupan purin dengan kadar asam urat pada lansia di posyandu peduli insani mendungan desa pabelan kecamatan kartasura kabupaten sukoharjo. *Skripsi*. Program Studi Ilmu Gizi-Fakultas Ilmu Kesehatan: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Stack Exchange. 2017. *HCl-Sodium Bicarbonate pH 6 Buffer Preparation*. <https://stackoverflow.com/> (diakses pada 10 November 2019).
- Stack Exchange. 2017. *HCl-Sodium Bicarbonate pH 7 Buffer Preparation*. <https://stackoverflow.com/> (diakses pada 10 November 2019).
- Stack Exchange. 2017. *HCl-Sodium Bicarbonate pH 8 Buffer Preparation*. <https://stackoverflow.com/> (diakses pada 10 November 2019).
- Suhendi, A., & Sutrisna, E. M. (2011). Aktivitas antihiperurisemia ekstrak air jinten hitam (*Coleus ambonicus* Lour) pada mencit jantan galur balb-c dan standarisasinya Antihyperurisemia activity of water extract of black seed (*Coleus ambonicus* Lour) in balb-c mice and its standardi-. *MAJalah Farmasi Indonesia*, 22(2), 77–84.
- Suryani, Ambarsari, L., Lindawati, E. 2017. *Isolation, Fractionation and Characterization of Catalase from Neurospora crassa (InaCC F226)*. Bogor: IOP Publishing.

Susanti, R. dan Fibriana, F. 2017. *Teknologi Enzim*. Yogyakarta: CV. Andi Offset.

Terkeltaub, R. 2012. *Gout and Other Crystal Arthropathies First Edition*. Elsevier Saunders.

Trinder, P. 1969. *Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor*. Sunderland: Biochem.

Usuda N., Hayashi S., Fujiwara S., Noguchi T., Nagata T., Rao M. S., Alvares K., Reddy J. K., dan Yeldandi A. V. 1994. Uric Acid Degrading Enzymes, Urate Oxidase and Alantoinase, are Associated with Different Subcellular Organelles in Frog Liver and Kidney. *Journal of Cell Science* 107, 1073-1081 (1994).

Varadaraju, C., Tamilselvan, G., Enoch, I., Selvakumar, P. M. 2018. *Phenol Sensing Studies by 4-Aminoantipyrine Method—A Review*. Tamil Nadu: Juniper Publisher.

Yazdi1, M. T., Zarrini1, G., Mohit, E., Faramarzi, M. A., Setayesh, N., Sedighi N., Mohseni, F. A. 2006. *Mucor Hiemalis a New Source for Uricase Production*. Tehran: Springer.

Yelchuri, R. K. 2012. *Characterization of Uricases of Yeast with Special Emphasis on Kluyveromyces Lactis*. Selangor. Prasad GS.

Zhao, Y., Zhao, L., Yang, G., Tao, J., Bu, Y., Liao, F. 2006. *Characterization of N Uricase from Bacillus Fastidious A.T.C.C. 26904 and Its Application to Serum Uric Acid Assay by a Patented Kinetic Uricase Method*. Chongqing: Portland Press Ltd.

LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Preparasi Larutan

1. Pembuatan Larutan Bufer Borat 0,1 M pH 8

Larutan bufer borat 0,1 M pH 8 sebanyak 100 mL dibuat dengan komposisi sebagai berikut:

- Natrium tetraborat dekahidrat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) dengan berat molekul 381,43 g/mol sebanyak 0,29 gram
- Asam borat (H_3BO_3) dengan berat molekul 61,84 g/mol sebanyak 0,43 gram

Akuademineral 80 mL disiapkan dalam gelas beaker. Natrium tetraborat dekahidrat 0,29 gram ditambahkan ke dalam gelas beaker yang sudah berisi akuademineral. Asam borat sebanyak 0,43 gram kemudian ditambahkan ke dalam larutan dan dihomogenkan. Larutan yang dihasilkan diukur pH nya, jika pH sudah sesuai larutan diencerkan dengan akuademineral hingga 100 mL (Cusabio, 2019).

2. Pembuatan Larutan Bufer Borat 0,1 M pH 8,5

Pembuatan larutan bufer borat 0,1 M pH 8 menggunakan komposisi berikut:

- Asam borat (H_3BO_3) dengan berat molekul 61,84 g/mol sebanyak 0,618 gram
- Natrium hidroksida (NaOH) dengan berat molekul 39,997 g/mol sebanyak 0,1 gram

Asam borat 0,6183 gram dilarutkan ke dalam 80 mL akuademineral. Natrium hidroksida sebanyak 0,1 gram ditambahkan ke dalam larutan asam borat dan dihomogenkan. Larutan yang dihasilkan diukur pH nya, jika pH sudah sesuai larutan diencerkan dengan akuademineral hingga 100 mL (Aatbio, 2019).

3. Pembuatan Larutan Bufer Borat 0,1 M pH 9

Larutan bufer borat 0,1 M pH 9 sebanyak 100 mL dibuat dengan komposisi sebagai berikut:

- Natrium tetraborat dekahidrat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) dengan berat molekul 381,43 g/mol sebanyak 0,76 gram
- Asam borat (H_3BO_3) dengan berat molekul 61,84 g/mol sebanyak 0,12 gram

Akuademineral 80 mL disiapkan dalam gelas beaker. Natrium tetraborat dekahidrat 0,76 gram ditambahkan ke dalam gelas beaker yang sudah berisi akuademineral. Asam borat sebanyak 0,12 gram kemudian ditambahkan ke dalam larutan dan dihomogenkan. Larutan yang dihasilkan diukur pH nya, jika pH sudah sesuai larutan diencerkan dengan akuademineral hingga 100 mL (Cusabio, 2019).

4. Pembuatan Larutan Bufer Borat 0,1 M pH 10

Pembuatan larutan bufer borat 0,1 M pH 10 menggunakan komposisi berikut:

- Natrium tetraborat dekahidrat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) dengan berat molekul 381,43 g/mol sebanyak 0,95 gram
- Natrium hidroksida (NaOH) dengan berat molekul 39,997 g/mol sebanyak 0,34 gram

Natrium tetraborat dekahidrat 0,95 gram dilarutkan ke dalam 80 mL akuademineral. Natrium hidroksida sebanyak 0,34 gram ditambahkan ke dalam larutan dan dihomogenkan. Larutan yang dihasilkan diukur pH nya, jika pH sudah sesuai larutan diencerkan dengan akuademineral hingga 100 mL (Cusabio, 2019).

5. Pembuatan Larutan Bufer Borat 0,1 M pH 11

Pembuatan larutan bufer borat 0,1 M pH 11 menggunakan komposisi berikut:

- Asam borat (H_3BO_3) dengan berat molekul 61,84 g/mol sebanyak 1,55 gram
- Natrium hidroksida (NaOH) dengan berat molekul 39,997 g/mol sebanyak 0,5 gram

Asam borat 1,55 gram dilarutkan ke dalam 80 mL akuademineral. Natrium hidroksida sebanyak 0,5 gram ditambahkan ke dalam larutan dan dihomogenkan. Larutan yang dihasilkan diukur pH nya, jika pH sudah sesuai larutan diencerkan dengan akuademineral hingga 100 mL (Cusabio, 2019).

6. Pembuatan Larutan Bufer Karbonat 0,1 M pH 6

Larutan bufer karbonat 0,1 M pH 6 dibuat dengan mencampurkan larutan natrium bikarbonat (NaHCO_3 (BM 84,007 g/mol)) 0,1 M dengan larutan asam klorida (HCl (BM 36,46 g/mol)) 0,1 M. Larutan natrium bikarbonat 0,1 M dibuat dengan menimbang natrium bikarbonat sebanyak 0,84 gram kemudian dilarutkan

ke dalam akuademineral dan diencerkan menjadi 100 mL. Larutan HCl 0,1 M kemudian ditambahkan ke dalam 50 mL larutan natrium bikarbonat sebanyak 1 mL dan diukur pH nya (StackExchange, 2017).

7. Pembuatan Larutan Bufer Karbonat 0,1 M pH 7

Larutan bufer karbonat 0,1 M pH 6 dibuat dengan mencampurkan larutan natrium bikarbonat (NaHCO_3 (BM 84,007 g/mol)) 0,1 M dengan larutan asam klorida (HCl (BM 36,46 g/mol)) 0,1 M. Larutan natrium bikarbonat 0,1 M dibuat dengan menimbang natrium bikarbonat sebanyak 0,84 gram kemudian dilarutkan ke dalam akuademineral dan diencerkan menjadi 100 mL. Larutan HCl 0,1 M kemudian ditambahkan ke dalam 50 mL larutan natrium bikarbonat sebanyak 9,2 mL dan diukur pH nya (StackExchange, 2017).

8. Pembuatan Larutan Bufer Karbonat 0,1 M pH 8

Larutan bufer karbonat 0,1 M pH 6 dibuat dengan mencampurkan larutan natrium bikarbonat (NaHCO_3 (BM 84,007 g/mol)) 0,1 M dengan larutan asam klorida (HCl (BM 36,46 g/mol)) 0,1 M. Larutan natrium bikarbonat 0,1 M dibuat dengan menimbang natrium bikarbonat sebanyak 0,84 gram kemudian dilarutkan ke dalam akuademineral dan diencerkan menjadi 100 mL. Larutan HCl 0,1 M kemudian ditambahkan ke dalam 50 mL larutan natrium bikarbonat sebanyak 39 mL dan diukur pH nya (StackExchange, 2017).

9. Pembuatan Larutan Bufer Karbonat 0,1 M pH 9

Pembuatan larutan bufer karbonat 0,1 M pH 9 menggunakan komposisi berikut:

- Natrium bikarbonat (NaHCO_3) dengan berat molekul 84,007 g/mol sebanyak 0,764 gram
- Natrium karbonat (Na_2CO_3) dengan berat molekul 105,99 g/mol sebanyak 0,095 gram

Natrium bikarbonat 0,764 gram dilarutkan ke dalam 80 mL akuademineral. Natrium karbonat sebanyak 0,095 gram ditambahkan ke dalam larutan natrium karbonat dan dihomogenkan. Larutan yang dihasilkan diukur pH nya, jika pH sudah sesuai larutan diencerkan dengan akuademineral hingga 100 mL (Aatbio, 2019).

10. Pembuatan Larutan Bufer Fosfat pH 7

Pembuatan 100 mL larutan bufer fosfat pH 7 menggunakan komposisi berikut:

- Kalium hidrogen fosfat (K_2HPO_4) dengan berat molekul 174,18 g/mol sebanyak 0,934 gram
- Kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) dengan berat molekul 136,086 g/mol sebanyak 0,631 gram

Kalium hidrogen fosfat 0,934 gram dilarutkan ke dalam 80 mL akuademineral. Kalium dihidrogen fosfat sebanyak 0,631 gram ditambahkan ke dalam larutan dan dihomogenkan. Larutan yang dihasilkan diukur pH nya, jika pH sudah sesuai larutan diencerkan dengan akuademineral hingga 100 mL (Aatbio, 2019).

11. Pembuatan Larutan Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA)

Larutan stok BSA dengan konsentrasi 2 mg/mL dibuat dengan cara melarutkan 50 mg BSA ke dalam 25 mL akuades. Campuran dihomogenkan hingga semua BSA larut dalam akuades. Larutan stok yang dihasilkan kemudian digunakan untuk membuat larutan standar dengan variasi konsentrasi 0 – 1,5 mg/mL interval 0,15 mg/mL.

12. Pembuatan Reagen Bradford

Reagen Bradford dibuat dengan cara melarutkan *Coomassie Brilliant Blue* G-250 (CBB G-250) sebanyak 100 mg ke dalam 50 mL etanol 95% kemudian asam fosfat 85% (w/v) ditambahkan sebanyak 100 mL. Campuran yang dihasilkan ditambah dengan akuades hingga volume 1 liter kemudian disaring dengan kertas saring whatman no. 1 setelah larut sempurna. Reagen kemudian disimpan dalam botol kaca bewarna gelap dan diletakkan dalam lemari pendingin bersuhu 4 °C (Bradford, 1976).

13. Pembuatan Larutan Standar H_2O_2

Larutan stok H_2O_2 dengan konsentrasi 100 ppm (setara dengan larutan 0,0068%) dibuat dengan mengencerkan larutan H_2O_2 30%. Larutan stok selanjutnya diencerkan sesuai dengan variasi konsentrasi yaitu 0 – 35 ppm dengan interval 5 ppm. Perhitungan pembuatan larutan stok sebagai berikut.

$$100 \text{ ppm} = 100 \text{ mg/L} = 0,1 \text{ gram/L}$$

$$\text{Mol} = \text{Massa} / \text{Berat molekul}$$

$$= 0,1 \text{ g} / 34,0147 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

$$= 0,0029 \text{ mol}$$

$$\text{M} = \text{Mol} / \text{Volume}$$

$$= 0,0029 \text{ mol} / 1 \text{ liter}$$

$$= 0,0029 \text{ M}$$

$$\text{M} = \frac{\% \cdot \rho \cdot 10}{\text{Mr}}$$

$$0,0029 \text{ M} = \frac{\% \cdot 1,45 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \cdot 10}{34,0147 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}$$

$$\% = 0,0068$$

Pengenceran H_2O_2 30% menjadi H_2O_2 0,0068%

$$\text{M}_1 \cdot \text{V}_1 = \text{M}_2 \cdot \text{V}_2$$

$$30\% \cdot \text{X} = 0,0068\% \cdot 25 \text{ mL}$$

$$\text{X} = 0,00567 \text{ mL}$$

14. Pembuatan Larutan 4-aminoantipirin 0,03 M

4-aminoantipirin sebanyak 0,1524 gram dilarutkan ke dalam 25 mL akuademineral. Campuran dihomogenasikan hingga 4-aminoantipirin larut sempurna. Larutan yang diperoleh disimpan pada wadah tertutup untuk digunakan lebih lanjut. Penentuan massa 4-aminoantipirin yang digunakan sebagai berikut.

$$\text{M} = \frac{\text{Mol}}{\text{Volume}}$$

$$\text{M} = \frac{\frac{\text{Massa}}{\text{Mr}}}{\text{Volume}}$$

$$0,03 \text{ M} = \frac{\frac{\text{Massa}}{203,24 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}}{25 \text{ mL}}$$

$$\text{Massa} = 0,1524 \text{ gram}$$

15. Pembuatan Larutan Fenol 1,5%

Larutan fenol 1,5% dibuat dengan melarutkan fenol sebanyak 1,5 gram ke dalam 80 mL akuademineral. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan hingga tanda batas.

$$\text{M (b/v)} = \frac{1,5 \text{ gram}}{100 \text{ mL}} \times 100\% = 1,5\%$$

16. Pembuatan Larutan Etanol 95%

Larutan etanol 95% sebanyak 100 mL dibuat dengan mengencerkan etanol 96%. Jumlah etanol 96% yang dibutuhkan diperoleh dari perhitungan berikut.

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$96\% \cdot X = 95\% \cdot 100 \text{ mL}$$

$$X = 98,96 \text{ mL} \approx 99 \text{ mL}$$

17. Pembuatan Larutan Asam Urat 2 mM

Asam urat sebanyak 16,81 mg dilarutkan dalam 40 mL bufer borat pH 8,5. Setelah larut, larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan diencerkan hingga tanda batas. Massa asam urat yang dilarutkan ditentukan melalui perhitungan berikut.

$$M = \text{Mol} / \text{Volume}$$

$$M = \frac{\text{Massa}}{\frac{\text{Mr}}{\text{Volume}}}$$

$$0,002 \text{ M} = \frac{\frac{\text{Massa}}{168,1103 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}}{0,05 \text{ L}}$$

$$\text{Massa} = 0,01681 \text{ gram} = 16,81 \text{ mg}$$

18. Pembuatan Larutan Enzim 15 U/mL

Peroksidase ditimbang sebanyak 0,5 mg kemudian dilarutkan dalam bufer fosfat pH 7 hingga volume 1 mL pada tabung ependorf 2 mL. Larutan enzim dihomogenkan dengan cara membolak-balikan ependorf. Larutan yang dihasilkan merupakan larutan stok peroksidase 85 U/mL. Kemudian stok peroksidase 85 U/mL dipipet sebanyak 0,882 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL. Bufer fosfat pH 7 ditambahkan hingga tanda batas. Larutan enzim yang dihasilkan memiliki aktivitas 15 U/mL berdasarkan perhitungan berikut.

$$\text{Aktivitas peroksidase induk} = 170 \text{ U/mg}$$

$$\text{Aktivitas peroksidase dalam } 0,5 \text{ mg} = 85 \text{ U}$$

$$\text{Aktivitas peroksidase } 0,5 \text{ mg dalam } 1 \text{ mL bufer} = 85 \text{ U/mL}$$

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$85 \text{ U/mL} \cdot V1 = 15 \text{ U/mL} \cdot 5 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,882 \text{ mL}$$

Lampiran 4.1 Scanning Panjang Gelombang

4.1.1 Scanning Panjang Gelombang Kuinoimin

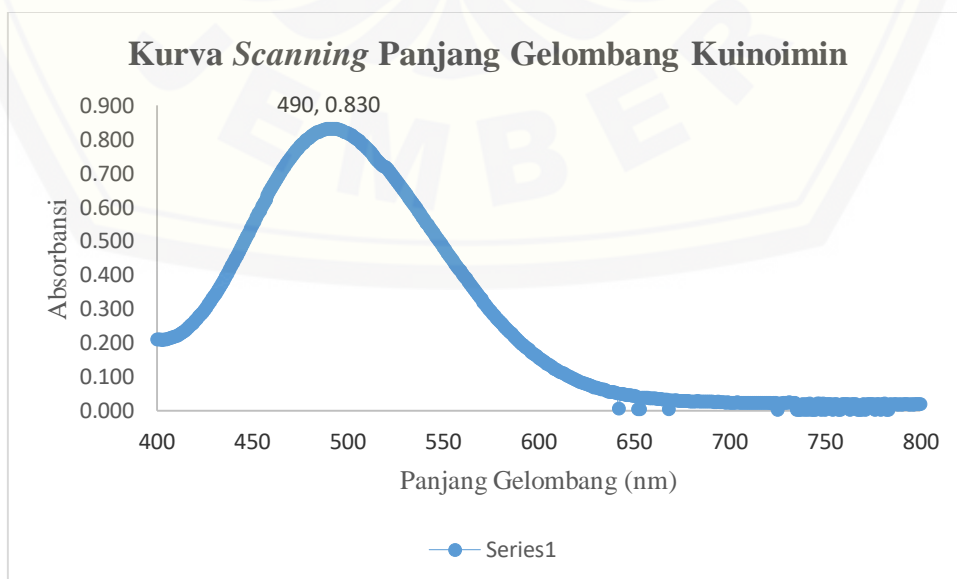
Panjang gelombang (nm)	Absorbansi	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
400	0.208	442	0.457
401	0.208	443	0.468
402	0.208	444	0.478
403	0.207	445	0.490
404	0.208	446	0.501
405	0.209	447	0.512
406	0.210	448	0.523
407	0.212	449	0.535
408	0.214	450	0.546
409	0.216	451	0.557
410	0.219	452	0.569
411	0.221	453	0.580
412	0.224	454	0.589
413	0.228	455	0.601
414	0.232	456	0.611
415	0.236	457	0.621
416	0.241	458	0.633
417	0.247	459	0.644
418	0.252	460	0.654
419	0.257	461	0.663
420	0.263	462	0.673
421	0.269	463	0.683
422	0.276	464	0.692
423	0.283	465	0.701
424	0.289	466	0.710
425	0.296	467	0.719
426	0.304	468	0.727
427	0.312	469	0.735
428	0.320	470	0.743
429	0.329	471	0.750
430	0.337	472	0.758
431	0.345	473	0.765
432	0.354	474	0.772
433	0.364	475	0.778
434	0.373	476	0.785
435	0.383	477	0.789
436	0.393	478	0.795
437	0.403	479	0.799
438	0.415	480	0.804
439	0.425	481	0.809
440	0.435	482	0.813
441	0.446	483	0.817

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
484	0.820	529	0.650
485	0.821	530	0.643
486	0.824	531	0.635
487	0.826	532	0.626
488	0.828	533	0.618
489	0.830	534	0.610
490	0.830	535	0.603
491	0.829	536	0.595
492	0.829	537	0.586
493	0.829	538	0.579
494	0.829	539	0.570
495	0.827	540	0.561
496	0.826	541	0.553
497	0.824	542	0.546
498	0.821	543	0.538
499	0.819	544	0.530
500	0.817	545	0.522
501	0.813	546	0.513
502	0.810	547	0.505
503	0.806	548	0.498
504	0.802	549	0.490
505	0.798	550	0.481
506	0.793	551	0.473
507	0.787	552	0.464
508	0.783	553	0.456
509	0.776	554	0.448
510	0.771	555	0.441
511	0.766	556	0.432
512	0.759	557	0.424
513	0.753	558	0.417
514	0.747	559	0.410
515	0.740	560	0.401
516	0.733	561	0.394
517	0.727	562	0.388
518	0.722	563	0.378
519	0.718	564	0.371
520	0.717	565	0.363
521	0.711	566	0.356
522	0.703	567	0.349
523	0.695	568	0.341
524	0.688	569	0.334
525	0.681	570	0.327
526	0.673	571	0.319
527	0.665	572	0.312
528	0.658	573	0.306

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
574	0.298	617	0.095
575	0.292	618	0.093
576	0.285	619	0.090
577	0.279	620	0.088
578	0.272	621	0.084
579	0.266	622	0.083
580	0.260	623	0.081
581	0.254	624	0.079
582	0.247	625	0.077
583	0.241	626	0.075
584	0.236	627	0.073
585	0.229	628	0.071
586	0.225	629	0.068
587	0.218	630	0.067
588	0.212	631	0.065
589	0.207	632	0.063
590	0.202	633	0.061
591	0.196	634	0.061
592	0.192	635	0.059
593	0.186	636	0.057
594	0.182	637	0.055
595	0.178	638	0.054
596	0.172	639	0.054
597	0.167	640	0.052
598	0.163	641	0.051
599	0.159	642	0.005
600	0.155	643	0.048
601	0.151	644	0.048
602	0.147	645	0.047
603	0.142	646	0.045
604	0.138	647	0.044
605	0.135	648	0.044
606	0.132	649	0.042
607	0.127	650	0.042
608	0.123	651	0.041
609	0.120	652	0.004
610	0.117	653	0.004
611	0.113	654	0.038
612	0.111	655	0.038
613	0.108	656	0.038
614	0.105	657	0.037
615	0.102	658	0.036
616	0.099	659	0.035

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
660	0.035	705	0.022
661	0.035	706	0.023
662	0.034	707	0.023
663	0.033	708	0.022
664	0.033	709	0.023
665	0.031	710	0.022
666	0.031	711	0.022
667	0.032	712	0.023
668	0.003	713	0.023
669	0.029	714	0.022
670	0.028	715	0.023
671	0.029	716	0.022
672	0.029	717	0.022
673	0.028	718	0.023
674	0.027	719	0.022
675	0.027	720	0.022
676	0.027	721	0.022
677	0.027	722	0.021
678	0.027	723	0.022
679	0.026	724	0.022
680	0.026	725	0.002
681	0.026	726	0.021
682	0.026	727	0.021
683	0.027	728	0.023
684	0.026	729	0.022
685	0.026	730	0.022
686	0.026	731	0.024
687	0.025	732	0.023
688	0.026	733	0.023
689	0.025	734	0.022
690	0.025	735	0.002
691	0.025	736	0.002
692	0.024	737	0.002
693	0.024	738	0.019
694	0.025	739	0.002
695	0.024	740	0.019
696	0.024	741	0.002
697	0.024	742	0.021
698	0.023	743	0.002
699	0.024	744	0.002
700	0.023	745	0.002
701	0.023	746	0.021
702	0.023	747	0.021
703	0.023	748	0.002
704	0.024	749	0.021

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
750	0.002	776	0.002
751	0.019	777	0.019
752	0.019	778	0.019
753	0.019	779	0.002
754	0.002	780	0.019
755	0.019	781	0.021
756	0.019	782	0.002
757	0.002	783	0.002
758	0.002	784	0.019
759	0.019	785	0.017
760	0.019	786	0.018
761	0.019	787	0.019
762	0.019	788	0.017
763	0.002	789	0.018
764	0.018	790	0.017
765	0.019	791	0.018
766	0.019	792	0.018
767	0.002	793	0.018
768	0.002	794	0.017
769	0.002	795	0.018
770	0.019	796	0.017
771	0.002	797	0.018
772	0.019	798	0.018
773	0.019	799	0.018
774	0.019	800	0.018
775	0.019		



4.1.2 Scanning Panjang Gelombang Bovine Serum Albumin (BSA)

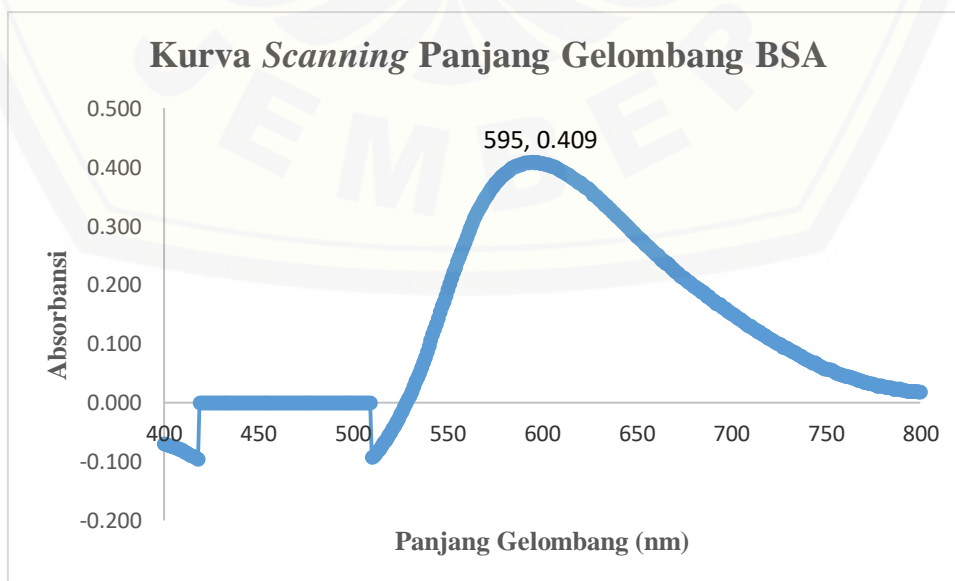
Panjang gelombang (nm)	Absorbansi	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
400	-0.070	442	****
401	-0.071	443	****
402	-0.072	444	****
403	-0.073	445	****
404	-0.074	446	****
405	-0.075	447	****
406	-0.076	448	****
407	-0.077	449	****
408	-0.079	450	****
409	-0.080	451	****
410	-0.082	452	****
411	-0.084	453	****
412	-0.085	454	****
413	-0.087	455	****
414	-0.089	456	****
415	-0.090	457	****
416	-0.092	458	****
417	-0.094	459	****
418	-0.096	460	****
419	****	461	****
420	****	462	****
421	****	463	****
422	****	464	****
423	****	465	****
424	****	466	****
425	****	467	****
426	****	468	****
427	****	469	****
428	****	470	****
429	****	471	****
430	****	472	****
431	****	473	****
432	****	474	****
433	****	475	****
434	****	476	****
435	****	477	****
436	****	478	****
437	****	479	****
438	****	480	****
439	****	481	****
440	****	482	****
441	****	483	****

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
484	****	529	0.006
485	****	530	0.012
486	****	531	0.020
487	****	532	0.028
488	****	533	0.037
489	****	534	0.043
490	****	535	0.051
491	****	536	0.060
492	****	537	0.069
493	****	538	0.077
494	****	539	0.087
495	****	540	0.097
496	****	541	0.107
497	****	542	0.116
498	****	543	0.125
499	****	544	0.134
500	****	545	0.144
501	****	546	0.154
502	****	547	0.164
503	****	548	0.172
504	****	549	0.182
505	****	550	0.192
506	****	551	0.202
507	****	552	0.212
508	****	553	0.222
509	****	554	0.230
510	-0.093	555	0.240
511	-0.090	556	0.248
512	-0.086	557	0.257
513	-0.082	558	0.265
514	-0.078	559	0.273
515	-0.073	560	0.282
516	-0.068	561	0.290
517	-0.064	562	0.297
518	-0.059	563	0.305
519	-0.054	564	0.313
520	-0.050	565	0.320
521	-0.044	566	0.326
522	-0.039	567	0.332
523	-0.033	568	0.337
524	-0.027	569	0.344
525	-0.020	570	0.349
526	-0.014	571	0.354
527	-0.007	572	0.359
528	0.000	573	0.364

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
574	0.368	617	0.380
575	0.373	618	0.378
576	0.376	619	0.374
577	0.380	620	0.374
578	0.384	621	0.371
579	0.386	622	0.368
580	0.389	623	0.366
581	0.392	624	0.364
582	0.394	625	0.361
583	0.397	626	0.358
584	0.399	627	0.354
585	0.400	628	0.352
586	0.402	629	0.350
587	0.403	630	0.346
588	0.405	631	0.344
589	0.405	632	0.340
590	0.407	633	0.336
591	0.408	634	0.335
592	0.408	635	0.331
593	0.408	636	0.328
594	0.409	637	0.324
595	0.409	638	0.322
596	0.408	639	0.318
597	0.409	640	0.315
598	0.408	641	0.312
599	0.407	642	0.309
600	0.407	643	0.306
601	0.406	644	0.302
602	0.405	645	0.299
603	0.405	646	0.296
604	0.403	647	0.292
605	0.402	648	0.290
606	0.401	649	0.287
607	0.400	650	0.283
608	0.398	651	0.281
609	0.396	652	0.277
610	0.394	653	0.275
611	0.393	654	0.271
612	0.391	655	0.268
613	0.388	656	0.265
614	0.387	657	0.262
615	0.384	658	0.259
616	0.382	659	0.256

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
660	0.252	705	0.141
661	0.251	706	0.138
662	0.247	707	0.136
663	0.243	708	0.133
664	0.242	709	0.131
665	0.237	710	0.131
666	0.237	711	0.127
667	0.234	712	0.125
668	0.230	713	0.124
669	0.227	714	0.121
670	0.224	715	0.121
671	0.222	716	0.117
672	0.220	717	0.115
673	0.215	718	0.114
674	0.213	719	0.111
675	0.212	720	0.109
676	0.209	721	0.108
677	0.206	722	0.105
678	0.204	723	0.103
679	0.201	724	0.101
680	0.198	725	0.100
681	0.197	726	0.099
682	0.194	727	0.095
683	0.192	728	0.093
684	0.188	729	0.093
685	0.188	730	0.091
686	0.185	731	0.089
687	0.181	732	0.087
688	0.181	733	0.086
689	0.176	734	0.085
690	0.174	735	0.083
691	0.173	736	0.080
692	0.169	737	0.079
693	0.168	738	0.076
694	0.167	739	0.075
695	0.163	740	0.073
696	0.161	741	0.072
697	0.160	742	0.070
698	0.156	743	0.067
699	0.154	744	0.068
700	0.151	745	0.066
701	0.150	746	0.063
702	0.148	747	0.062
703	0.145	748	0.060
704	0.143	749	0.058

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
750	0.058	776	0.030
751	0.056	777	0.028
752	0.056	778	0.028
753	0.055	779	0.029
754	0.053	780	0.028
755	0.051	781	0.027
756	0.050	782	0.026
757	0.049	783	0.026
758	0.048	784	0.026
759	0.047	785	0.025
760	0.046	786	0.023
761	0.045	787	0.024
762	0.044	788	0.023
763	0.043	789	0.024
764	0.042	790	0.022
765	0.041	791	0.022
766	0.040	792	0.021
767	0.038	793	0.020
768	0.038	794	0.020
769	0.037	795	0.020
770	0.035	796	0.020
771	0.035	797	0.019
772	0.034	798	0.019
773	0.033	799	0.018
774	0.033	800	0.018
775	0.032		



Lampiran 4.2 Pembuatan Kurva Standar

4.2.1 Pembuatan Kurva Standar H₂O₂

Pengenceran larutan H₂O₂

Larutan stok : 100 ppm

Larutan standar : 5 ppm

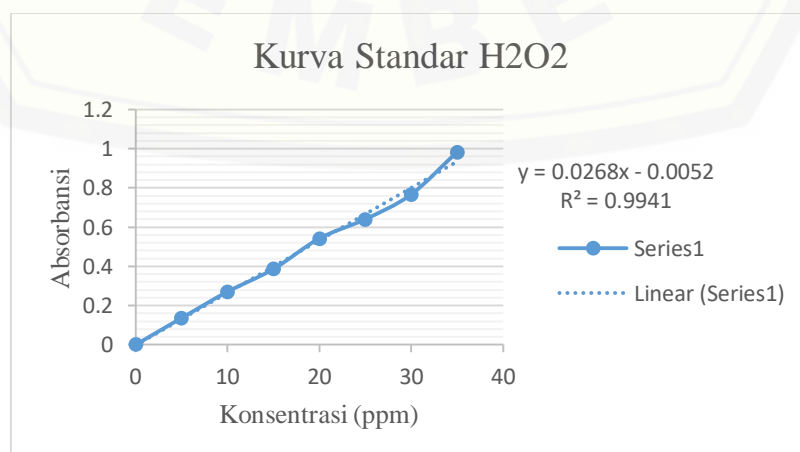
$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$100 \text{ ppm} \cdot V1 = 5 \text{ ppm} \cdot 5 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,25 \text{ mL}$$

M1 (ppm)	V1 (mL)	M2 (ppm)	V2 (mL)
100	0	0	5
100	0,25	5	5
100	0,50	10	5
100	0,75	15	5
100	1,00	20	5
100	1,25	25	5
100	1,50	30	5
100	1,75	35	5

[H ₂ O ₂] (ppm)	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi 3	Absorbansi rata-rata	Standar Deviasi
0	0	0	0	0	0.000
5	0.136	0.136	0.136	0.136	0.000
10	0.270	0.270	0.270	0.270	0.000
15	0.385	0.385	0.385	0.385	0.000
20	0.541	0.541	0.541	0.541	0.000
25	0.639	0.639	0.639	0.639	0.000
30	0.765	0.765	0.765	0.765	0.000
35	0.981	0.981	0.981	0.981	0.000



4.2.2 Pembuatan Kurva Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA)

Pengenceran larutan BSA

Larutan stok : 2 mg/mL

Larutan standar : 0,15 mg/mL

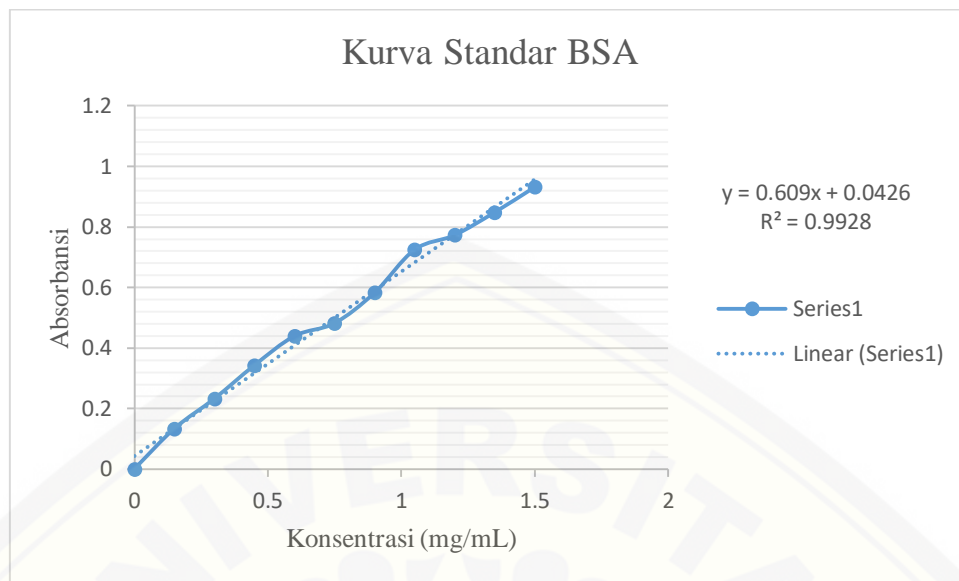
$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$2 \text{ mg/mL} \cdot V1 = 0,15 \text{ mg/mL} \cdot 5 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,375 \text{ mL}$$

M1 (mg/mL)	V1 (mL)	M2 (mg/mL)	V2 (mL)
2	0	0	5
2	0,375	0.15	5
2	0,750	0.30	5
2	1,125	0.45	5
2	1,500	0.60	5
2	1,875	0.75	5
2	2,250	0.90	5
2	2,625	1.05	5
2	3,000	1.20	5
2	3,375	1.35	5
2	3,750	1.50	5

[BSA] (mg/mL)	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Absorbansi 3	Absorbansi rata-rata	Standar Deviasi
0	0	0	0	0	0.0000
0.15	0.134	0.134	0.133	0.134	0.0006
0.3	0.233	0.232	0.233	0.233	0.0006
0.45	0.343	0.343	0.343	0.343	0.0000
0.6	0.440	0.439	0.440	0.440	0.0006
0.75	0.482	0.482	0.482	0.482	0.0000
0.9	0.582	0.582	0.584	0.583	0.0012
1.05	0.725	0.725	0.725	0.725	0.0000
1.2	0.774	0.773	0.773	0.773	0.0006
1.35	0.849	0.848	0.849	0.849	0.0006
1.5	0.931	0.933	0.932	0.932	0.0010



Lampiran 4.3 Perhitungan Aktivitas Urikase

4.3.1 Optimasi Kecepatan Sentrifugasi

1. *Crude* enzim (Supernatan 1)

a. Aktivitas Total

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

Diketahui:

Persamaan regresi kurva standar H₂O₂ : $y = 0,0268x - 0,0052$

Volume total : 2 mL

Volume enzim : 0,1 mL

Berat molekul H₂O₂ : 34 g/mol = 0,034 mg/μmol

Waktu inkubasi : 240 menit

– Data Absorbansi Sampel

Kecepatan Sentrifugasi (rpm)	Pengulangan	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs Sampel	SD
7000	1	0.180	0.181	0.182	0.181	0.0015
	2	0.178	0.178	0.178	0.178	
	3	0.180	0.180	0.180	0.180	
9000	1	0.307	0.307	0.307	0.307	0.0066
	2	0.295	0.295	0.296	0.295	
	3	0.297	0.295	0.295	0.296	
11000	1	0.305	0.305	0.305	0.305	0.0006
	2	0.306	0.306	0.306	0.306	
	3	0.306	0.306	0.306	0.306	
13000	1	0.280	0.280	0.280	0.280	0.0123
	2	0.259	0.259	0.259	0.259	
	3	0.280	0.281	0.281	0.281	
15000	1	0.333	0.333	0.333	0.333	0.0106
	2	0.349	0.348	0.35	0.349	
	3	0.354	0.353	0.352	0.353	

– Data Absorbansi Kontrol

Kecepatan Sentrifugasi (rpm)	Pengulangan	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs Kontrol	SD
7000	1	0.073	0.073	0.073	0.073	0.0031
	2	0.077	0.077	0.077	0.077	
	3	0.071	0.071	0.071	0.071	
9000	1	0.130	0.130	0.130	0.130	0.0146
	2	0.109	0.109	0.109	0.109	
	3	0.102	0.102	0.102	0.102	
11000	1	0.098	0.098	0.098	0.098	0.0046
	2	0.101	0.101	0.101	0.101	
	3	0.108	0.107	0.106	0.107	
13000	1	0.068	0.067	0.067	0.067	0.0009
	2	0.066	0.066	0.066	0.066	
	3	0.066	0.065	0.066	0.066	
15000	1	0.132	0.132	0.132	0.132	0.0099
	2	0.141	0.141	0.14	0.141	
	3	0.121	0.121	0.121	0.121	

– Data Aktivitas Total

Kecepatan Sentrifugasi (rpm)	Pengulangan	Abs Sampel	[S] (mg/mL)	Abs Kontrol	[K] (mg/mL)	AT (U/mL)	AT rerata (U/mL)	SD
7000	1	0.181	0.0069	0.073	0.0029	0.0099	0.0097	0.00040
	2	0.178	0.0068	0.077	0.0031	0.0092		
	3	0.180	0.0069	0.071	0.0028	0.0100		
9000	1	0.307	0.0116	0.130	0.0050	0.0162	0.0170	0.00076
	2	0.295	0.0112	0.109	0.0043	0.0170		
	3	0.296	0.0112	0.102	0.0040	0.0177		
11000	1	0.305	0.0116	0.098	0.0039	0.0189	0.0186	0.00038
	2	0.306	0.0116	0.101	0.0040	0.0187		
	3	0.306	0.0116	0.107	0.0042	0.0182		
13000	1	0.280	0.0106	0.067	0.0027	0.0194	0.0189	0.00111
	2	0.259	0.0099	0.066	0.0027	0.0177		
	3	0.281	0.0107	0.066	0.0026	0.0197		
15000	1	0.333	0.0126	0.132	0.0051	0.0184	0.0196	0.00148
	2	0.349	0.0132	0.141	0.0054	0.0191		
	3	0.353	0.0134	0.121	0.0047	0.0212		

Contoh Perhitungan Aktivitas Total Pada *Crude* Enzim 7000 rpm Pengulangan 1

- Penentuan konsentrasi sampel dengan absorbansi 0,181

$$y = 0,0268x - 0,0052$$

$$0,181 = 0,0268x - 0,0052$$

$$x = (0,181 + 0,0052) / 0,0268$$

$$x = 6,9 \text{ ppm}$$

$$x = 0,0069 \text{ mg/mL}$$

$$[S] = 0,0069 \text{ mg/mL}$$

- Penentuan konsentrasi kontrol dengan absorbansi 0,073

$$y = 0,0268x - 0,0052$$

$$0,073 = 0,0268x - 0,0052$$

$$x = (0,073 + 0,0052) / 0,0268$$

$$x = 2,9 \text{ ppm}$$

$$x = 0,0029 \text{ mg/mL}$$

$$[S] = 0,0029 \text{ mg/mL}$$

- Aktivitas total (U/mL) =
$$\frac{[0,0069 - 0,0029] \text{ mg/mL} \times 1 \times \frac{2 \text{ mL}}{0,1 \text{ mL}}}{240 \text{ menit} \times 0,034 \text{ mg/}\mu\text{mol}}$$

$$= 0,0098 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$$

$$= 0,0098 \text{ U/mL}$$

Keterangan: perhitungan yang sama dilakukan pada semua *crude* enzim dari semua variasi kecepatan sentrifugasi.

b. Kadar Protein

$$\text{Kadar Protein} = \frac{\text{Absorbansi} \pm C}{m} \times \text{FP}$$

Diketahui:

Persamaan regresi kurva standar BSA: $y = 0,609x + 0,0426$

FP (Faktor Pengenceran) : 5 kali

y : Absorbansi

x : Kadar Protein

C : 0,0426

m : 0,609

Kecepatan Sentrifugasi (rpm)	Pengulangan	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs Sampel	SD	Kadar Protein (mg/mL)	Kadar Protein rerata
7000	1	0.371	0.371	0.371	0.371	0.0122	2.70	2.81
	2	0.395	0.395	0.395	0.395		2.89	
	3	0.391	0.384	0.386	0.387		2.83	
9000	1	0.642	0.642	0.642	0.642	0.0176	4.92	4.79
	2	0.628	0.628	0.628	0.628		4.81	
	3	0.607	0.607	0.607	0.607		4.63	
11000	1	0.689	0.689	0.689	0.689	0.0010	5.31	5.30
	2	0.689	0.689	0.689	0.689		5.31	
	3	0.686	0.689	0.687	0.687		5.29	
13000	1	0.531	0.531	0.531	0.531	0.0262	4.01	4.04
	2	0.511	0.511	0.511	0.511		3.85	
	3	0.563	0.563	0.563	0.563		4.27	
15000	1	0.558	0.557	0.558	0.558	0.0256	4.23	4.05
	2	0.51	0.506	0.507	0.508		3.82	
	3	0.542	0.542	0.542	0.542		4.10	

Contoh Perhitungan Kadar Protein *Crude* Enzim 7000 rpm Pengulangan 1

$$\begin{aligned} \text{Kadar Protein} &= \frac{0.371 - 0,0426}{0,609} \times 5 \\ &= \frac{0.3284}{0,609} \times 5 \\ &= 2,696 \text{ mg/mL} \\ &\approx 2,70 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

Keterangan: perhitungan yang sama dilakukan pada semua *crude* enzim dari semua variasi kecepatan sentrifugasi.

c. Aktivitas Spesifik

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

Kecepatan Sentrifugasi (rpm)	Pengulangan	AT (U/mL)	AT rerata	Kadar Protein (mg/mL)	Kadar Protein rerata	AS (U/mg)	AS rerata
7000	1	0.0099		2.70		0.0037	
	2	0.0092	0.0097	2.89	2.81	0.0032	0.0035
	3	0.0100		2.83		0.0035	
9000	1	0.0162		4.92		0.0033	
	2	0.0170	0.0170	4.81	4.79	0.0035	0.0035
	3	0.0177		4.63		0.0038	
11000	1	0.0189		5.31		0.0036	
	2	0.0187	0.0186	5.31	5.30	0.0035	0.0035
	3	0.0182		5.29		0.0034	
13000	1	0.0194		4.01		0.0049	
	2	0.0177	0.0189	3.85	4.04	0.0046	0.0047
	3	0.0197		4.27		0.0046	
15000	1	0.0184		4.23		0.0043	
	2	0.0191	0.0196	3.82	4.05	0.0050	0.0048
	3	0.0212		4.10		0.0052	

Contoh Perhitungan Aktivitas Spesifik *Crude* Enzim 7000 rpm Pengulangan 1

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas Spesifik (U/mg)} &= \frac{0.0099 \text{ U/mL}}{2.70 \text{ mg/mL}} \\ &= 0,003666 \text{ U/mg} \\ &\approx 0,0037 \text{ U/mg} \end{aligned}$$

Keterangan: perhitungan yang sama dilakukan pada semua *crude* enzim dari semua variasi kecepatan sentrifugasi.

2. Supernatan 2

Perhitungan aktivitas total, kadar protein dan aktivitas spesifik supernatan 2 pada semua variasi kecepatan sentrifugasi dilakukan dengan cara yang sama seperti pada *crude* enzim (supernatan 1). Selisih aktivitas spesifik (AS) supernatan 1 dan supernatan 2 ditentukan dengan rumus berikut.

$$\text{Selisih Aktivitas Spesifik (\%)} = \frac{\text{AS supernatan 1} - \text{AS supernatan 2}}{\text{AS supernatan 1}} \times 100\%$$

Kecepatan Sentrifugasi (rpm)	Aktivitas Total (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Selisih Aktivitas Spesifik (%)
7000	0.0053	4.14	0.0013	62,86
9000	0.0089	4.99	0.0018	48,57
11000	0.0110	4.73	0.0023	34,29
13000	0.0093	4.52	0.0021	55,32
15000	0.0083	3.68	0.0022	54,17

Contoh perhitungan selisih aktivitas spesifik supernatan 1 dan supernatan 2 pada kecepatan sentrifugasi 7000 rpm

$$\begin{aligned} \text{Selisih Aktivitas Spesifik (\%)} &= \frac{0,0035 \frac{\text{U}}{\text{mg}} - 0,0013 \frac{\text{U}}{\text{mg}}}{0,0035 \frac{\text{U}}{\text{mg}}} \times 100\% \\ &= \frac{0,0022 \frac{\text{U}}{\text{mg}}}{0,0035 \frac{\text{U}}{\text{mg}}} \times 100\% \\ &= 62,857\% \\ &\approx 62,86\% \end{aligned}$$

Keterangan: perhitungan yang sama dilakukan pada semua data aktivitas spesifik supernatan 1 dan supernatan 2 dari semua variasi kecepatan sentrifugasi.

4.3.2 Optimasi pH Ekstraksi

1. *Crude* enzim (Supernatan 1)

a. Aktivitas Total

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

Diketahui:

Persamaan regresi kurva standar H₂O₂ : $y = 0,0268x - 0,0052$

Volume total : 2 mL

Volume enzim : 0,1 mL

Berat molekul H₂O₂ : 34,0147 g/mol

Waktu inkubasi : 240 menit

– Data Absorbansi Sampel

Variasi pH	Pengulangan	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs Sampel	SD
6	1	0.178	0.178	0.178	0.178	0.0012
	2	0.178	0.178	0.178	0.178	
	3	0.18	0.18	0.18	0.180	
7	1	0.188	0.188	0.188	0.188	0.0468
	2	0.225	0.225	0.225	0.225	
	3	0.281	0.281	0.281	0.281	
8	1	0.232	0.232	0.232	0.232	0.0000
	2	0.232	0.232	0.232	0.232	
	3	0.232	0.232	0.232	0.232	
9	1	0.334	0.334	0.334	0.334	0.0040
	2	0.334	0.334	0.334	0.334	
	3	0.341	0.341	0.341	0.341	
10	1	0.236	0.236	0.236	0.236	0.0030
	2	0.24	0.24	0.239	0.240	
	3	0.242	0.242	0.242	0.242	
11	1	0.562	0.562	0.562	0.562	0.0135
	2	0.547	0.548	0.548	0.548	
	3	0.535	0.535	0.535	0.535	

– Data Absorbansi Kontrol

Variasi pH	Pengulangan	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs Kontrol	SD
6	1	0.042	0.042	0.042	0.042	0.0000
	2	0.042	0.042	0.042	0.042	
	3	0.042	0.042	0.042	0.042	
7	1	0.15	0.15	0.15	0.150	0.0047
	2	0.159	0.159	0.16	0.159	
	3	0.154	0.154	0.154	0.154	
8	1	0.047	0.047	0.047	0.047	0.0051
	2	0.04	0.039	0.039	0.039	
	3	0.049	0.049	0.049	0.049	
9	1	0.215	0.215	0.215	0.215	0.0015
	2	0.218	0.218	0.218	0.218	
	3	0.216	0.216	0.216	0.216	
10	1	0.098	0.098	0.098	0.098	0.0012
	2	0.098	0.098	0.098	0.098	
	3	0.096	0.096	0.096	0.096	
11	1	0.171	0.172	0.171	0.171	0.0195
	2	0.205	0.205	0.205	0.205	
	3	0.171	0.171	0.171	0.171	

– Data Aktivitas Total

Variasi pH	Pengulangan	Abs Sampel	[S] (mg/mL)	Abs Kontrol	[K] (mg/mL)	AT (U/mL)	AT rerata	SD
6	1	0.178	0.0068	0.042	0.0018	0.062	0.062	0.0005
	2	0.178	0.0068	0.042	0.0018	0.062		
	3	0.180	0.0069	0.042	0.0018	0.063		
7	1	0.188	0.0072	0.150	0.0058	0.017	0.035	0.0208
	2	0.225	0.0086	0.159	0.0061	0.030		
	3	0.281	0.0107	0.154	0.0059	0.058		
8	1	0.232	0.0089	0.047	0.0019	0.085	0.085	0.0023
	2	0.232	0.0089	0.039	0.0017	0.088		
	3	0.232	0.0089	0.049	0.0020	0.084		
9	1	0.334	0.0127	0.215	0.0082	0.054	0.055	0.0021
	2	0.334	0.0127	0.218	0.0083	0.053		
	3	0.341	0.0129	0.216	0.0083	0.057		
10	1	0.236	0.0090	0.098	0.0039	0.063	0.065	0.0018
	2	0.240	0.0091	0.098	0.0039	0.065		
	3	0.242	0.0092	0.096	0.0038	0.067		
11	1	0.562	0.0212	0.171	0.0066	0.036	0.033	0.0022
	2	0.548	0.0206	0.205	0.0078	0.031		
	3	0.535	0.0202	0.171	0.0066	0.033		

Contoh Perhitungan Aktivitas Total Pada *Crude* Enzim pH 6 Pengulangan 1

- Penentuan konsentrasi sampel dengan absorbansi 0.178

$$y = 0,0268x - 0,0052$$

$$0.178 = 0,0268x - 0,0052$$

$$x = (0.178 + 0,0052) / 0,0268$$

$$x = 6,8 \text{ ppm}$$

$$x = 0,0068 \text{ mg/mL}$$

$$[S] = 0,0068 \text{ mg/mL}$$

- Penentuan konsentrasi kontrol dengan absorbansi 0.042

$$y = 0,0268x - 0,0052$$

$$0.042 = 0,0268x - 0,0052$$

$$x = (0.042 + 0,0052) / 0,0268$$

$$x = 1,8 \text{ ppm}$$

$$x = 0,0018 \text{ mg/mL}$$

$$[S] = 0,0018 \text{ mg/mL}$$

- Aktivitas total (U/mL) =
$$\frac{[0,0068 - 0,0018] \text{ mg/mL} \times 5 \times \frac{2 \text{ mL}}{0,1 \text{ mL}}}{240 \text{ menit} \times 0,034 \text{ mg/}\mu\text{mol}}$$

= 0,062 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$
= 0,062 U/mL

Keterangan: perhitungan yang sama dilakukan pada semua *crude* enzim dari semua variasi pH ekstraksi.

b. Kadar Protein

$$\text{Kadar Protein} = \frac{\text{Absorbansi} \pm C}{m} \times Fp$$

Diketahui:

Persamaan regresi kurva standar BSA: $y = 0,609x + 0,0426$

Fp (Faktor pengenceran) : 10 kali

y : Absorbansi

x : Kadar Protein

C : 0,0426

m : 0,609

Variasi pH	Pengulangan	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs Sampel	SD	Kadar Protein	Kadar Protein rerata
6	1	0.368	0.368	0.368	0.368	0.0007	5.34	5.33
	2	0.367	0.367	0.366	0.367		5.32	
	3	0.367	0.367	0.367	0.367		5.33	
7	1	0.543	0.543	0.543	0.543	0.0170	8.22	8.11
	2	0.517	0.517	0.517	0.517		7.79	
	3	0.549	0.549	0.549	0.549		8.32	
8	1	0.513	0.514	0.514	0.514	0.03574	7.74	7.07
	2	0.458	0.458	0.458	0.458		6.82	
	3	0.447	0.447	0.447	0.447		6.64	
9	1	0.73	0.73	0.73	0.730	0.0128	11.29	11.52
	2	0.755	0.755	0.755	0.755		11.70	
	3	0.747	0.747	0.747	0.747		11.57	
10	1	0.678	0.677	0.677	0.677	0.0194	10.42	10.50
	2	0.703	0.703	0.703	0.703		10.84	
	3	0.665	0.665	0.665	0.665		10.22	
11	1	0.582	0.581	0.581	0.581	0.0088	8.85	8.72
	2	0.564	0.564	0.564	0.564		8.56	
	3	0.575	0.575	0.575	0.575		8.74	

Contoh Perhitungan Kadar Protein *Crude* Enzim pH 6 Pengulangan 1

$$\begin{aligned} \text{Kadar Protein} &= \frac{0,368 - 0,0426}{0,609} \times 10 \\ &= \frac{0,3254}{0,609} \times 10 \\ &= 5,3432 \text{ mg/mL} \\ &\approx 5,34 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

Keterangan: perhitungan yang sama dilakukan pada semua *crude* enzim dari semua variasi pH ekstraksi.

c. Aktivitas Spesifik

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

Variasi pH	Pengulangan	AT (U/mL)	AT rerata	Kadar Protein (mg/mL)	KP rerata	AS (U/mL)	AS rerata
6	1	0.062		5.34		0.0116	
	2	0.062	0.062	5.32	5.33	0.0117	0.0117
	3	0.063		5.33		0.0118	
7	1	0.017		8.22		0.0021	
	2	0.030	0.035	7.79	8.11	0.0039	0.0043
	3	0.058		8.32		0.0070	
8	1	0.085		7.74		0.0109	
	2	0.088	0.085	6.82	7.07	0.0129	0.0121
	3	0.084		6.64		0.0126	
9	1	0.054		11.29		0.0048	
	2	0.053	0.055	11.70	11.52	0.0045	0.0048
	3	0.057		11.57		0.0049	
10	1	0.063		10.42		0.0061	
	2	0.065	0.065	10.84	10.50	0.0060	0.0062
	3	0.067		10.22		0.0065	
11	1	0.036		8.85		0.0040	
	2	0.031	0.033	8.56	8.72	0.0037	0.0038
	3	0.033		8.74		0.0038	

Contoh Perhitungan Aktivitas Spesifik *Crude* enzim 7000 rpm Pengulangan 1

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas Spesifik (U/mg)} &= \frac{0.062 \text{ U/mL}}{5.34 \text{ mg/mL}} \\ &= 0,011610 \text{ U/mg} \\ &\approx 0,0116 \text{ U/mg} \end{aligned}$$

Keterangan: perhitungan yang sama dilakukan pada semua *crude* enzim dari semua variasi pH ekstraksi.

2. Supernatan 2

Perhitungan aktivitas total, kadar protein dan aktivitas spesifik supernatan 2 pada semua variasi pH ekstraksi dilakukan dengan cara yang sama seperti pada *crude* enzim (supernatan 1). Selisih aktivitas spesifik (AS) supernatan 1 dan supernatan 2 ditentukan dengan rumus berikut.

$$\text{Selisih Aktivitas Spesifik (\%)} = \frac{\text{AS supernatan 1} - \text{AS supernatan 2}}{\text{AS supernatan 1}} \times 100\%$$

Variasi pH	Aktivitas Total (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Selisih Aktivitas Spesifik (%)
pH 6	0.0077	1.04	0.0074	36,75
pH 7	0.0012	0.71	0.0016	62,79
pH 8	0.0035	0.95	0.0037	69,42
pH 9	0.0155	4.42	0.0035	27,08
pH 10	0.0078	1.43	0.0055	11,29
pH 11	0.0005	0.56	0.0010	73,68

Contoh perhitungan selisih aktivitas spesifik supernatan 1 dan supernatan 2 pada kecepatan sentrifugasi 7000 rpm

$$\begin{aligned} \text{Selisih Aktivitas Spesifik (\%)} &= \frac{0,0117 \frac{\text{U}}{\text{mg}} - 0,0074 \frac{\text{U}}{\text{mg}}}{0,0117 \frac{\text{U}}{\text{mg}}} \times 100\% \\ &= \frac{0,0043 \frac{\text{U}}{\text{mg}}}{0,0117 \frac{\text{U}}{\text{mg}}} \times 100\% \\ &= 36,75\% \end{aligned}$$

Keterangan: perhitungan yang sama dilakukan pada semua data aktivitas spesifik supernatan 1 dan supernatan 2 dari semua variasi pH ekstraksi.

Lampiran 4.4 Dokumentasi



Kambing



Hati Kambing



Hasil Penggerusan Hati Kambing



Supernatan 1 (7.000 rpm)



Supernatan 1 (9.000 rpm)



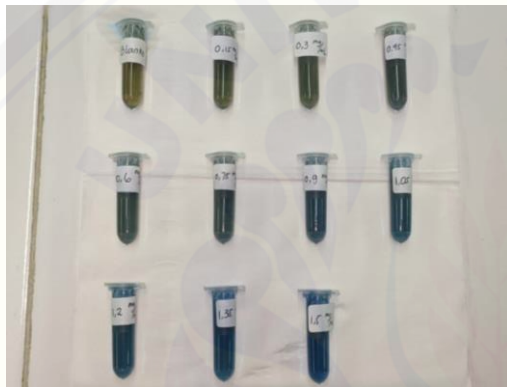
Supernatan 1 (11.000 rpm)



Supernatan 1 (13.000 rpm)



Supernatan 1 (15.000 rpm)



Sampel Kurva Standar BSA

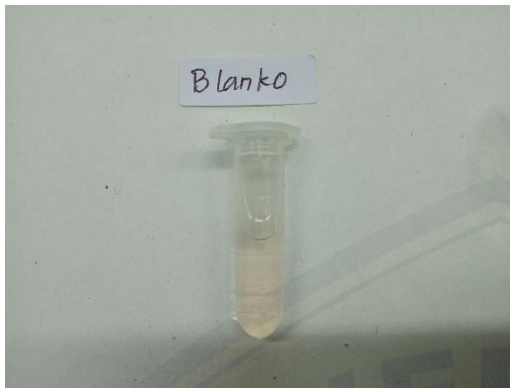


Sampel Kurva Standar H₂O₂

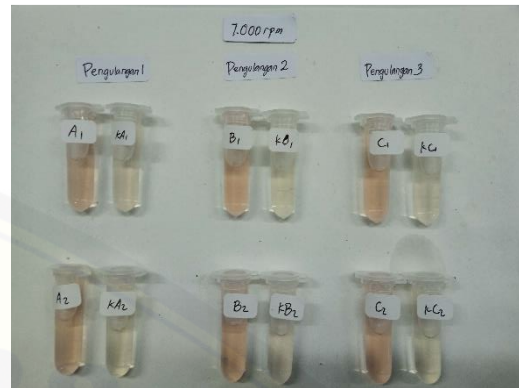


Hasil Uji Bradford Supernatan 1 (7.000 – 15.000 rpm)

4.4.1 Uji Aktivitas Supernatan 1 (7.000 – 15.000 rpm)



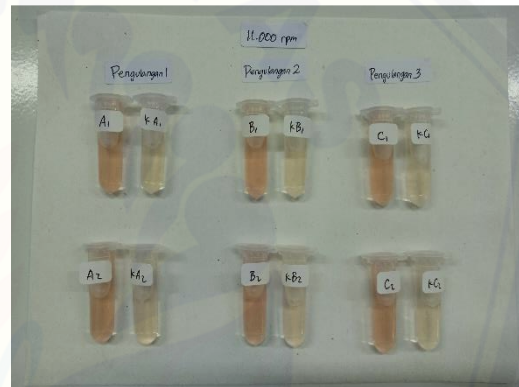
Blanko Uji Aktivitas



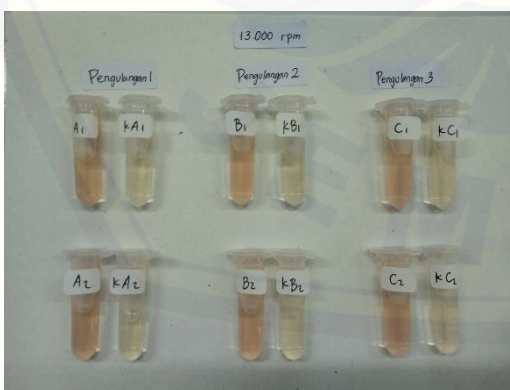
Supernatan 1 (7.000 rpm)



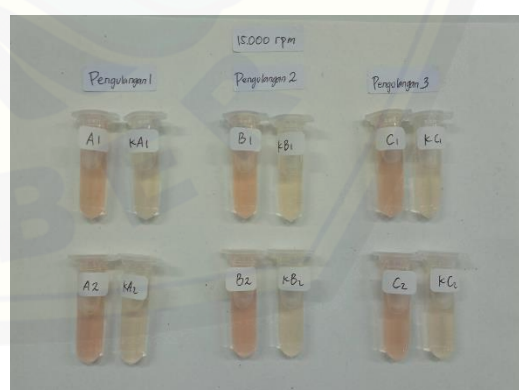
Supernatan 1 (9.000 rpm)



Supernatan 1 (11.000 rpm)

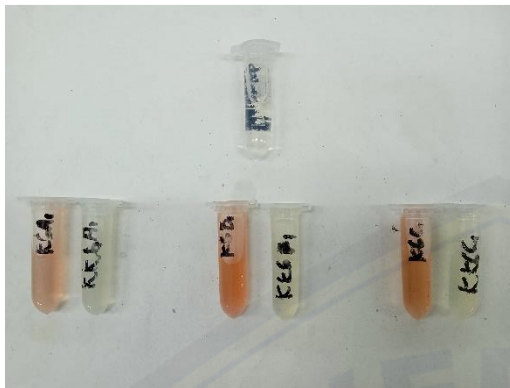


Supernatan 1 (13.000 rpm)



Supernatan 1 (15.000 rpm)

4.4.2 Uji Aktivitas Supernatan 1 (pH 6 – 11)



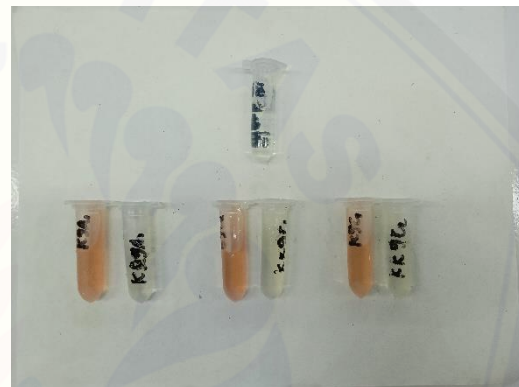
Supernatan 1 Karbonat pH 6



Supernatan 1 Karbonat pH 7



Supernatan 1 Karbonat pH 8



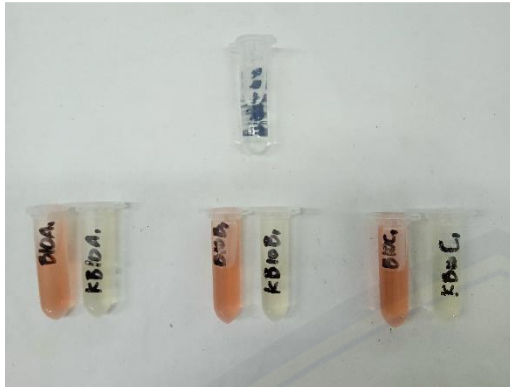
Supernatan 1 Karbonat pH 9



Supernatan 1 Borat pH 8



Supernatan 1 Borat pH 9

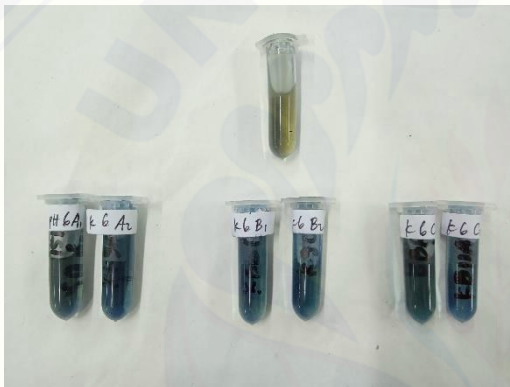


Supernatan 1 Borat pH 10

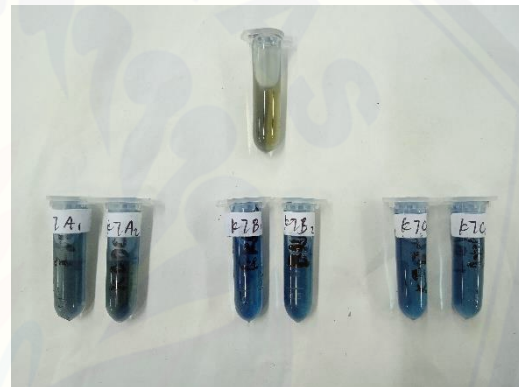


Supernatan 1 Borat pH 11

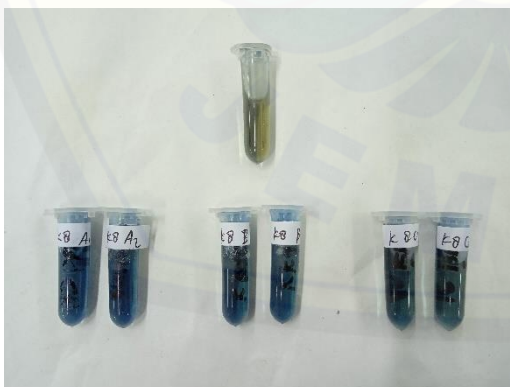
4.4.3 Uji Bradford Supernatan 1 (pH 6 – 11)



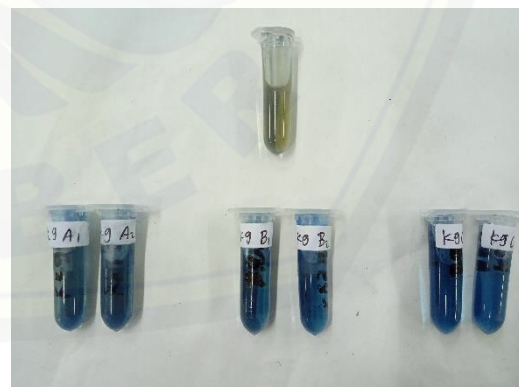
Supernatan 1 Karbonat pH 6



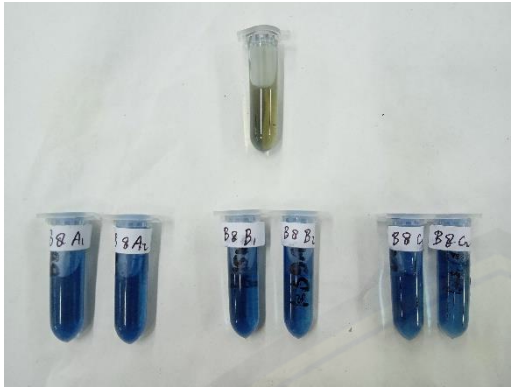
Supernatan 1 Karbonat pH 7



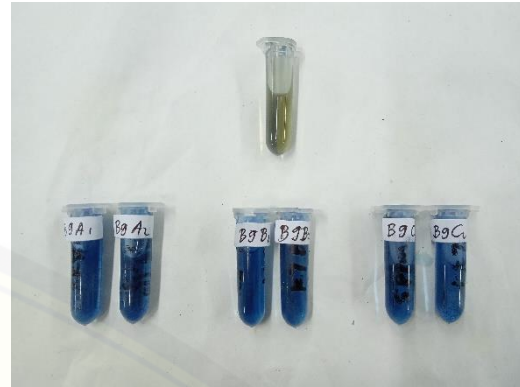
Supernatan 1 Karbonat pH 8



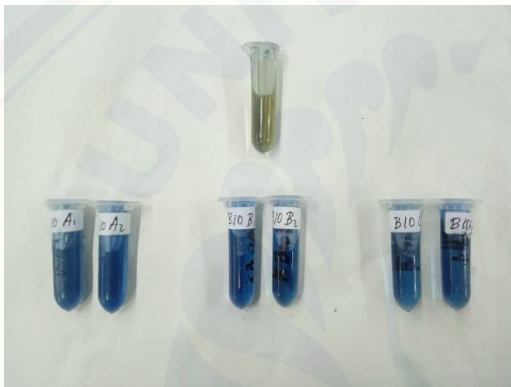
Supernatan 1 Karbonat pH 9



Supernatan 1 Borat pH 8



Supernatan 1 Borat pH 9

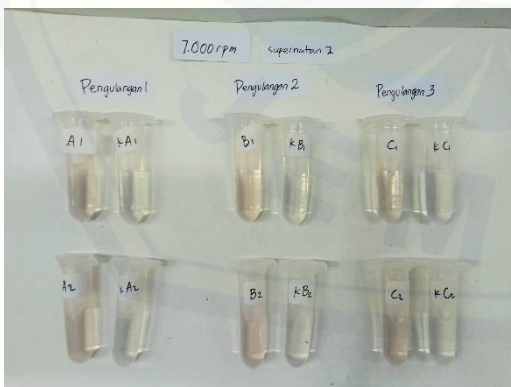


Supernatan 1 Borat pH 10



Supernatan 1 Borat pH 11

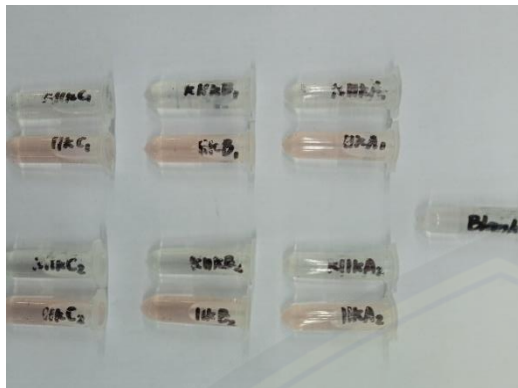
4.4.4 Uji Aktivitas Supernatan 2 (7.000 – 15.000 rpm)



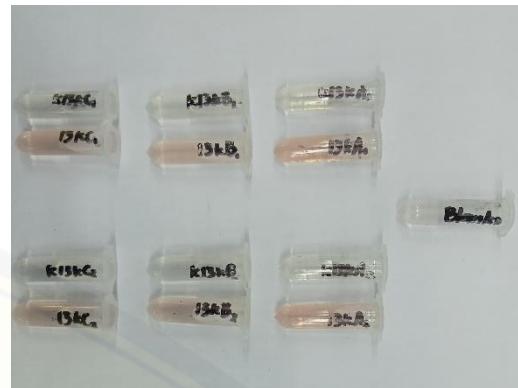
Supernatan 2 (7.000 rpm)



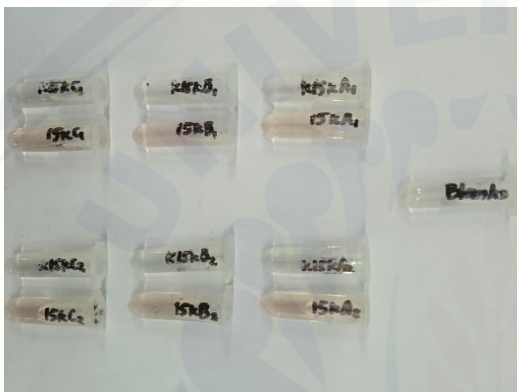
Supernatan 2 (9.000 rpm)



Supernatan 2 (11.000 rpm)



Supernatan 2 (13.000 rpm)



Supernatan 2 (15.000 rpm)



Perbandingan Supernatan 1 dan 2

4.4.5 Uji Bradford Supernatan 2 (7.000 – 15.000)



Supernatan 2 (7.000 rpm)



Supernatan 2 (9.000 rpm)



Supernatan 2 (11.000 rpm)



Supernatan 2 (13.000 rpm)



Supernatan 2 (15.000 rpm)

4.4.6 Uji Aktivitas Supernatan 2 (pH 6 – 11)



Supernatan 2 Karbonat pH 6



Supernatan 2 Karbonat pH 7



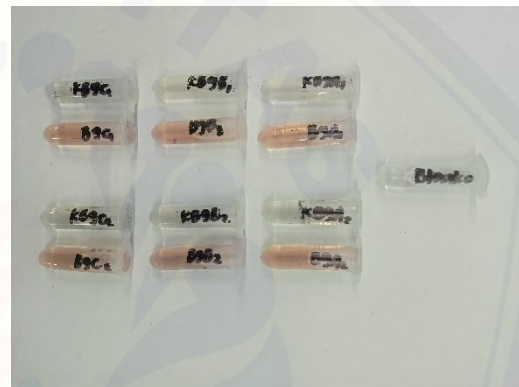
Supernatan 2 Karbonat pH 8



Supernatan 2 Karbonat pH 9



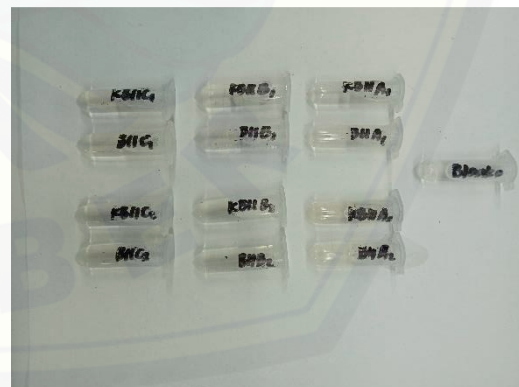
Supernatan 2 Borat pH 8



Supernatan 2 Borat pH 9



Supernatan 2 Borat pH 10



Supernatan 2 Borat pH 11

4.4.7 Uji Bradford Supernatan 2 (pH 6 – 11)



Supernatan 2 Karbonat pH 6



Supernatan 2 Karbonat pH 7



Supernatan 2 Karbonat pH 8



Supernatan 2 Karbonat pH 9



Supernatan 2 Borat pH 8



Supernatan 2 Borat pH 9



Supernatan 2 Borat pH 10



Supernatan 2 Borat pH 11

