

## DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, A., 2017, *Isolasi Dan Pemurnian Enzim  $\alpha$ -Glukosidase Dari Beras Ketan Putih (*Oryza Sativa* Var. *Glutinosa*) Serta Amobilisasi Dengan Matriks Karagenan Secara Mikroenkapsulasi*, skripsi tidak diterbitkan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Alasa, A.N., Anam, S. dan Jamaluddin, 2017, Analisis Kadar Total Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol Daun Tamoenjo (*Hibiscus Surattensis* L.), *Kovalen*, **3**(3): 258-268.
- Alexander, D., Alam, G. dan Kondar, W., 2011, Pengaruh Ekstrak Rimpang Temu Putih (*Curcuma Zedoaria*) Terhadap Kadar Asam Urat Pada Kelinci, *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, **15**(2): 89-94.
- Altarsha, M., Monard, G. and Castro, B., 2006, Quantum Computation of The UV- Visible Spectra of Uric Acid and its anions, *Journal Of Molecular Structure*, **761**(1); 203-207.
- Angriani, E., Dewi, A. P. dan Novayelinda, R., 2018, Faktor-Faktor Yang Berhubungan Dengan Kejadian Gout Arthritis Masyarakat Melayu, *JOM FKp*, **5**(2): 683-692.
- Arief, D. A., Sangi, M. S. dan Kamu, V. S., 2017, Skrining Fitokimia Dan Uji Toksisitas Ekstrak Biji Aren (*Arenga pinnata* MERR.), *Jurnal Mipa Unsrat Online*, **6**(2): 12-15.
- Astuti, S.M., Sakinah, M.A.M., Andayani, R.B.M., and Risch, A., 2011, Determination of Saponin Compound from *Anredera cordifolia* (Ten) Steenis Plant (Binahong) to Potential Treatment for Several Diseases, *Journal of Agricultural Science*, **3**(4): 224-232.
- Azmi, S. M. N., Jamal, P. and Amid, A., 2012, Xantin oxidase inhibitory activity from potential Malaysian medicinal plant as remedies for gout, *International Food Research Journal*, **19**: 59-66.
- Bargah, R.K., 2015, Preliminary Test of Phytochemical Screening of Ekstrak kasar Ethanolic and Aqueous Ecxtract of *Moringa pterygosperma* Gaertn, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **4**(1): 7-9.
- Baehaki, A., Rinto dan Budiman, A., 2011, Isolasi dan karakterisasi protease dari bakteri Tanah Rawa Indralaya, Sumatera Selatan., *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, **22**(1): 37-42.

- Bolsinger, J., Pronczuk, A., Sambanthamurthi, R., and Hayes, K. C., 2014, Anti-diabetic effects of palm fruit juice in the Nile rat (*Arvicanthis niloticus*), *Journal of Nutritional Science*, **3**(5): 1-11.
- Boyer, J. S., 1970, Photosynthesis at Low Water Potentials. *Phil. Trans. R. Soc. Lond B.*, **273**(927): 501-512.
- Briley, M. S. and Eisenthal, R., 1974, Association of Xantin Oxidase with the Bovine Milk-Fat-Globule Membrane Catalytic Properties Of The Free And Membrane-Bound Enzyme, *Biochem. J.*, **143**: 149-157.
- Briley, M. S. and Eisenthal, R., 1975, Association of Xanthine Oxidase with the Bovine Milk-Fat-Globule Membrane, *Biochem. J.*, **147**: 417-423.
- Chang, C. I., Lee, T. H., Li, Y. J., Chao, C. Y., You, B. J., Cheng, M. J., Wang, S. Y., Chen, C. C., and Kuo, Y. H., 2018, New 7-oxoabietane-type diterpenoids from the bark of *Cryptomeria japonica* and their xanthine oxidase inhibitory activity, *Phytochemistry Letters*, **27**: 69-73
- Dewi, A. P. dan Asnita, L., 2016, Perawatan lansia penderita nyeri sendi dalam keluarga dan masyarakat, UR Press, Pekanbaru.
- Dewi, T. K., 2012, Isolasi, Uji Penghambatan, Aktivitas Xantin Oksidase dan Identifikasi Senyawa Aktif dari Fraksi *n*-Butanol pada Ekstrak Akar Tanaman *Acalypha indica* Linn, Skripsi tidak diterbitkan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok.
- Dian, O., 2015, “Kolang Kaling Untuk Terapi Nyeri Sendi”(online) (<http://prasetya.ub.ac.id/berita/Kolang-kaling-Untuk-Terapi-Nyeri-Sendi-16877-id.pdf>, diakses pada tanggal 29/01/2019)
- Donadio, C., Calia, D., Ghimenti, S., Onor, M., Colombini, E., Fuoco, R., and Francesco, F. D., 2013, *Uric acid is the major determinant of absorbance in spent dialysate allowing spectrophotometric evaluation of dialysis dose*, Conference of Societa Italiana, University of Pisa.
- Eff, A. R. Y., Rahayu, S. T. dan Syachfitri, R. D., 2016, Uji Aktivitas Penghambatan Xantin Oksidase secara In-Vitro oleh Isolat 6,4'Dihidroksi-4-Metoksibenzofenon-2-O-β-D Glukopiranosida (C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>) yang Diisolasi dari Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl), *Pharm Sci Res*, **3**(1): 2407-2354.
- Elmaniar, R., 2017, *Aktivitas Penghambatan Enzim A-Gluksidase Oleh Ekstrak Etanol Umbi Ubi Jalar Ungu (Ipomoea Batatas L.)*, skripsi tidak diterbitkan, Fakultas Farmasi, Universitas Muhamaddiyah Surakarta, Surakarta.

- Ernawati dan Susanti, H., 2014, Penghambatan Aktivitas Xantin Oxidase Oleh Ekstrak Etanol Sarang Semut (*Myrmecodia Tuberosa* (Non Jack) Bl.) Secara In Vitro, *Pharmacia*, **4**(1): 15-22.
- Evans, C., Mohammed, A. and Patience, O., 2005, Comparism Of Xantin Oxidase Activities In Cow And Goat Milks, *Biokemistri*, **17**(1): 1-6.
- Ezedom, T. dan Asagba, S. O., 2016, *Effect Of A Controlled Food-Chain Mediated Exposure To Cadmium And Arsenic On Oxidative Enzymes In The Tissues Of Rats*, Delta State University, Abraka.
- Fahisyah, R. N., Naim, N. dan Armah, Z., 2019, Pengaruh Variasi Lama Penyimpanan Reagen Enzim 1a Terhadap Hasil Pemeriksaan Ureum Darah Metode Berthelot, *Jurnal Media Analisis Kesehatan*, **10**(1): 21-27.
- Girindra, A., 1986, *Biokimia 1*, Gramedia, Jakarta.
- Goodall, L. B., Robinson, A. M. and Brosseau, C. L., 2013, Electrochemical-surface enhanced Raman spectroscopy (E-SERS) of uric acid: a potential rapid diagnostic method for early preeclampsia detection, *Phys.Chem. Chem. Phys.*, **15**: 1382-1388.
- Hadiningrat, F. M., 2017, *Uji Aktivitas AntiHiperglikemik Ekstrak Eetanol 70% Daun Seledri Jepang (Angelica Keiskei) Ppada Tikus Pputih Jantan Galur Sprague Dwaley dengan Metode Induksi Aloksan*, Skripsi tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Hartati, I., Widiasmadi, N., Subantoro, R., Kurniasari, L., dan Darmanto, 2016, Penguatan Usaha Pengolah Kolang Kaling Di Desa Ngesrebalong Kecamatan Limbangan Kabupaten Kendal, *Momentum*, **12**(2): 17-22.
- Henderson, A., 2009, *Palms of Southern Asia*, Botanical Garden, New York.
- Hille, R., 2006, Structure and function of xantin oxidoreductase. *European J Inorganik Chem*, **10**: 1905-2095.
- Huang, J., Wang, S., Zhu, M., Chen, J., and Zhu, X., 2011, Effects of Genistein, Apigenin, Quercetin, Rutin and Astilbin on serum uric acid levels and xantin oxidase activities in normal and hyperuricemic mice, *Food and Chemical Toxicology*, **49**: 1943–1947.
- Ibrahim, M. A., Masoud, H. M. M., Darwish, D. A., Esa, S. S., and Zaakhok, S. A. M., 2015, Purification and characterization of xanthine oxidase from liver of the water buffalo *Bubalus bubalis*, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **5**(11): 63-68.

- Illanes, A., Altamirano, C. and Wilson, L, 2008, *Homogeneous Enzyme Kinetics, Dalam Enzyme Biocatalysis : Principles and Applications*, Springer, USA.
- Indah, M., 2004, *Enzim*, USU Digital Library, Medan.
- Iswantini, D., Ramdhani, T. H. dan Darusman, L. K., 2012, In Vitro Inhibition Of Celery (*Apium graveolens L.*) Extract On The Activity Of Xantin Oxidase And Determination Of Its Active Compound, *Indo. J. Chem*, **12**(3): 247-254.
- Jadhao, S., Bhise, N. and Khobragade, C., 2018, Isolation and Purification of Xantin Oxidase from Discarded Fish Liver Notopterosus kaping: An Easy Source of Enzyme, *Journal of Food Technology and Food Chemistry*, **1**(1): 1-6.
- Julianto, 2014, *Khasiat Tersembunyi Kolang Kaling*, Sinar Tani, Jakarta.
- Kant, S. N., Shihka, T., Savithri, T. N., and Chan, B. T., 2015, Isolation And Screening Of Xanthine Oxidase Producing Bacteria From Thermal Springs Of Himachal Pradesh, *CIBTech Journal of Biotechnology*, **4**(1): 27-31.
- Khairunnisa, 2013, *Aktivitas Inhibisi Xantin Oksidase Oleh Ekstrak Air Dan Etanol Anting - Anting (Acalypha Indica L.)*, skripsi tidak diterbitkan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Kemenkes RI, 2013, Riset Kesehatan Dasar; RISKESDAS, Balitbang Kemenkes RI, Jakarta.
- Kostic, D. A., Dimitrijevic, D. S., Stojanovic, G. S., Palic, I. V., Dordevic, A. S., and Ickovski, J. D., 2015, Xantin Oxidase: Isolation, Assays of Activity, and Inhibition, *Journal of Chemistry*, **2015**: 1-8.
- Kusuma, U. D. P., Muslichah, S. dan Ulfa, E. U., 2014, Uji Aktivitas Anti Hiperurisemia Ekstrak n-Heksana, Etil Asetat, dan Etanol 70% Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa*) terhadap Mencit Hiperurisemia, *e-Jurnal Pustaka Kesehatan*, **2**(1): 115-118.
- Lasut, M. T., 2012, *Budidaya Yang Baik Aren (Arenga Pinnata (Wurmb) Merr.)*, Universitas Sam Ratulangi, Manado.
- Lee, D. S., 2005, *Packaging Containing Natural Antimicrobial or Antioxidative Agents, Innovations in Food Packaging*, Elsevier Science & Technology, New York.
- Lempang, M., 2012, Pohon Aren Dan Manfaat Produksinya, *Info Teknis EBONI*, **9**(1): 37-54.

- Lehninger, A. L., 2004, *Principles Of Biochemistry 4E (4th edition)*, WH Freeman, U.S.A.
- Li, S. Z., 2005, *Compendium of Materia Medica*, People's Health Publishing House, Beijing, China.
- Lutony, 1993, *Tanaman Sumber Pemanis*, Penebar Swadaya, Surabaya.
- Mardiansyah, R. dan Sulistyowati, E., 2018, Inhibisi Ion Logam Cu<sup>2+</sup> Terhadap Kinetika Enzim Tripsin, *Jurnal Kimia Dasar*, **7**(2): 50-58.
- Mardiningsih, A. T., 2017, *Penghambatan Aktivitas Enzim Xantin Oksidase oleh Ekstrak Etanol Daun Kacang Tanah (Arachis hypogaea L.) secara inVitro*, skripsi tidak diterbitkan, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Masoud, H. M. M., Darwish, D. A. A., Monsef, M. M. A., Helmy, M. S., Ibrahim, M. A., 2017, Xanthine oxidase from milk of the water buffalo (*Bubalus bubalis*): Purification, characterization and application in SOD assay diagnostic kit., *Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **8**(3): 1735-1744.
- Meila, O dan Noraini, 2017, Uji Aktivitas Antidiabetes dari Ekstrak Metanol Buah Kiwi (*Actinidia deliciosa*) melalui Pneghambatan Aktivitas  $\alpha$ -Glukosidase, *Jurnal Famasi Galenika*, **3**(2): 132-137.
- Mohan, S., Eskandari, R. and Pinto, B. M., 2013, Naturally Occurring Sulfonium-Ion Glucosidase Inhibitors And Their Derivatives: A Promising Class Of Potential Antidiabetic Agents, *Chem. Res*, **47**(1): 211-225.
- Mondal, M. S., Sau, A. K. and Mitra, S., 2000, Mechanism of the inhibition of milk xanthine oxidase activity by metal ions: a transient kinetic study, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1480**: 302-310.
- Murray, R. K., Granner, D. K. dan Rodwell, V. W., 2006, *Biokimia Harper* terjemahan dari *Harper's Illustrated Biochemistry 27<sup>th</sup> ed* oleh Braham, U. dan Nanda, W, 2009, ECG, Jakarta.
- Motshakeri, M., Sejdic, J. T., Phillips, A. R. J., and Kilmartin, P. A., 2018, Rapid electroanalysis of uric acid and ascorbic acid using a poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-modified sensor with application to milk, *Journal Electrochimica Acta*, **147**: 1-19.
- Nadinah, 2008, *Kinetika Inhibisi Ekstrak Etanol Seledri (Apium graveolens L) dan Fraksinya terhadap Enzim Xantin Oksidase serta Penentuan Senyawa*

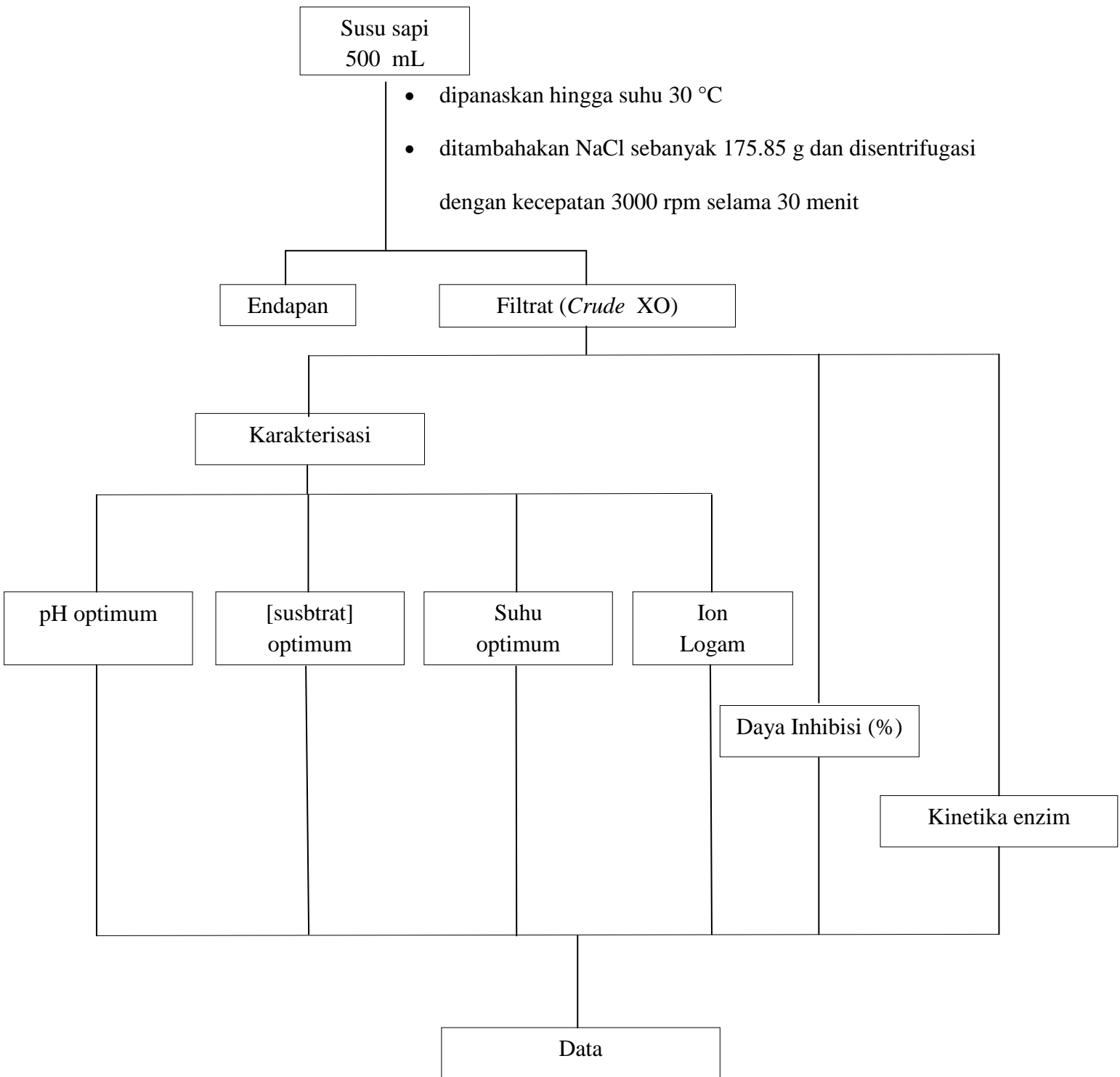
- Aktifnya*, tesis tidak diterbitkan, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Natsir, H., Chandra, D., Rukayadi, Y., Suhartono, M. T., Hwang, J. K., and Pyun, Y. R., 2002, Biochemical Characteristic of Chitinase Enzyme from *Bacillus sp.* of Kamojang Crater, Indonesia, *Journal Biochemistry, Molecular Biology, and Biophysics*, **6**(4): 279-282.
- Natsir, H., Patong, A. R., Suhartono, M. T., and Ahmad, A., 2010, Production And Characterization Of Chitinase Enzymes From Sulili Hot Spring In South Sulawesi, *Bacillus sp.* HSA,3-1a, *Indo. J. Chem*, **10**(2): 263 – 267.
- Nasrul, E. dan Sofitri, 2012, Hiperurisemia pada Pra Diabetes, *Jurnal Kesehatan Andalas*, **1**(2): 86-91.
- Ningsih, S., 2017, Aktivitas Inhibisi Xantin Oksidase Dan Kandungan Senyawa Polifenol Ekstrak Secang (*Caesalpinia Sappan L.*), *Prosiding Seminar Nasional Kimia*, Universitas Negeri Yogyakarta.
- Norarzmi, N. M., Manap, H., Rasyeid, A. R. Z., and Mauzina, M., 2016, Uric Acid Detection in UV Region, *The National Conference for Postgraduate Research*, Universiti Malaysia Pahang
- Oktavia, F. dan Wungkana, J., 2018, Abu Pelepah Aren (*Arenga pinnata Merr.*) sebagai Bahan Kosmetika Perawatan Kulit Wajah Kaya Antioksidan, *Jurnal Ilmiah Pertanian*, **14**(1): 29-34.
- Pacher, P., Nivorozhkin, A. and Szabo, C., 2006, Therapeutic Effects of Xantin Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol, *Pharmacol Rev*, **58**(1): 97-114.
- Peraturan Menteri Pertanian, 2013, *Pedoman Pembinaan Kelompok Tani dan Gabungan Kelompok Tani*, Nomor 82/Permentan/OT.140/8/2013.
- Purwati dan Nugrahini, T., 2018, Pemanfaatan Buah Kolang Kaling Dari Hasil Perkebunan Sebagai Pangan Fungsional, *Jurnal Abdimas Mahakam*, **2**(1): 24-33.
- Puspitayanti, I. R., 2017, *Aktivitas Penghambatan Enzim A-Gluksidase Oleh Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea Batatas L.*)*, skripsi tidak diterbitkan, Fakultas Farmasi, Universitas Muhamaddiyah Surakarta, Surakarta.
- Ramadani, P., Khaeruddin, I., Tjoadan, A., dan Burhanuddin, I. F., 2008, *Pengenalan Jenis-jenis Pohon yang Umum di Sulawesi*, UNTAD Press, Palu.

- Santhi, K., and Sengottuvel, R., 2016, Qualitative and Quantitative Phytochemical Analysis of *Moringa concanensis* Nimmo, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **5**(1): 633-640.
- Sari, N. P., Isbandiyah dan Widiwanto, B., 2016, Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Anggur (*Vitis Vinifera*) Terhadap Kadar Serum Asam Urat Pada Tikus Putih Jantan (*Rattusnorvegicus Strain Wistar*) Model Hiperurisemia, **12**(2): 102-106.
- Sari, P. S., Sitoru, S. dan Gunawan, R., 2018, Inhibisi Xantin Oksidase Oleh Fraksi Etil Asetat Dari Daun Jarum Tujuh Bilah (*Pereskia Bleo* (Kunth) D.C) Sebagai Antihiperurisemia, *Jurnal Atomik*, **3**(2): 116-116.
- Saropah, A., Jannah, A. dan Maunatin, A., 2012, Kinetika Enzimatik Ekstrak Kasar Enzim Bakteri Isolatik Hasil Isolasi dari Bekatul, *Alchemy*, **2**(1): 34-45.
- Sarmi, Ratnani, R. D. dan Hartati, I., 2016, Isolasi Senyawa Galaktomannan Buah Aren (*Arenga pinnata*) Menggunakan Beberapa Jenis Abu, *Momentum*, **12**(1): 21-25.
- Simanjuntak, M. T. dan Silalahi, J., 2003, *Biokimia Enzim*, USU Digital Library, Medan.
- Singh, Gomez and Swamy, 2010, Approach to a Case of Hyperuricemia, *Ind J Aerospace Med*, **54**(1): 40-46.
- Suhandana, M., Nurhayati, T. dan Ambarsari, L., 2013, Karakterisasi Ekstrak Kasar Enzim Polyphenoloxidase dari Udang Windu (*Penaeus monodon*), *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, **5**(2): 353-364.
- Surahman, A., Subandi dan Muntholib, 2012, Uji Fitokimia Dan Daya Inhibisi Ekstrak Daun Sendok (*Plantago Major L.*) Dan Buah Srikaya (*Annona Squamosa L.*) Terhadap Aktivitas Xantin Oksidase, Universitas Negeri Malang, Malang.
- Sukarti, Datulingi, T., Lomo, M. P., dan Pirda, 2017, Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Polar Batang Nangka (*Artocarpus Heterophylla Lamk*) Sebagai Pengawet Alami Sari Aren (*Arenga Pinnata*), *Prosiding Seminar Nasional*, **3**(1): 197-202.
- Susanti, E. dan Fibriana, F., 2017, *Teknologi Enzim*, Andi, Yogyakarta.
- Tarigan, J. Br. dan Purba, D., 2015, Karakterisasi Polisakarida Galaktomanan Kolang Kaling (*Arenga Pinnata*) Terikat Silang Fosfat, *Majalah Polimer Indonesia*, **18**(1): 1-8.
- Tehupeiory, E., 1996, *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid I Edisi ketiga*, Penerbit Balai Penerbit FKUI, Jakarta.

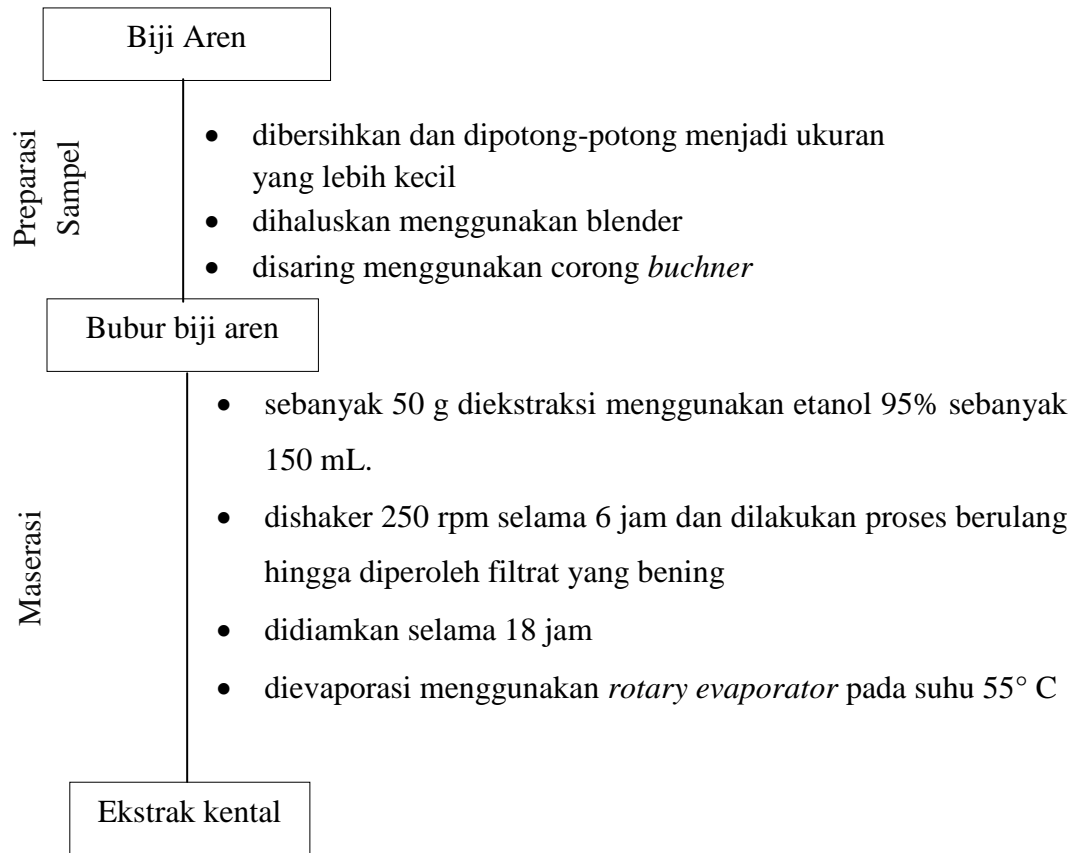
- Umamaheswari, M., Kumar, K. A., Somasundaram, A., Sivashanmugam, T., Subhadradevi, V., and Ravi, T. K., 2007, Xantin oxidase inhibitory activity of some Indian medical plants, *Journal of Ethnopharmacology*, **109**: 547–551.
- Van Steenis, C. G. G. J, 2005, *Flora*, Pradnya Pramita, Jakarta.
- Voet, D. J., Voet, J. G. dan Pratt, C. W., 2008., *Principles of Biochemistry*, John Willey & Sons, Inc, United States.
- Winarno, F. G., 1983, *Enzim Pangan*, Gramedia, Jakarta.
- Wulandari, S., Subandi dan Muntholib, 2012, *Inhibisi Xantin Oksidase Oleh Ekstrak Etanol Kulit Melinjo (Gnetum gnemon) Relatif Terhadap Allopurinol*, Universitas Negeri Malang, Malang.
- Xink, Y., Yang, H., Xia, X., Zhang, L., Zhang, Y., Cheng, C., and Wang, W., 2012, Expression, purification and partial characterization of a xanthine oxidase (XOD) in *Arthrobacter* sp, *Process Biochemistry*, **47**: 1539–1544.
- Zheng, Y., Xin, Y., Yang, H., Zhang, L., Xia, X., Tong, Y., Chen, Y., Ma, L., and Wang, W., 2012, Novel affinity purification of xanthine oxidase from *Arthrobacter M3*, *Journal of Chromatography B*, **906**: 19– 24.



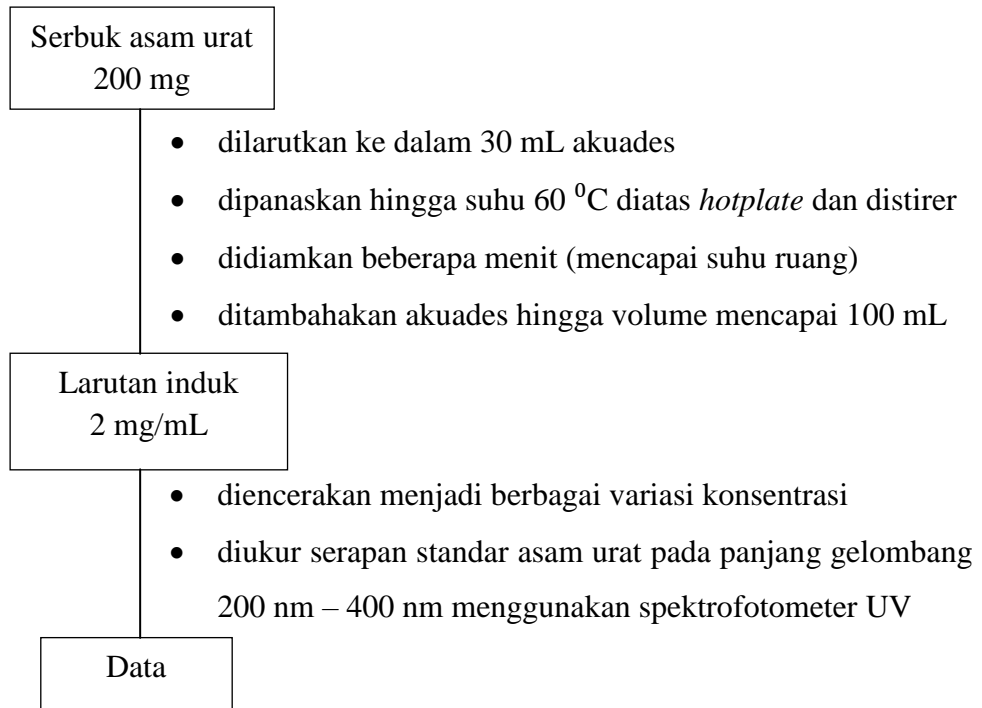
Lampiran 1. Isolasi Enzim XO dan Diagram Alir Penelitian



## Lampiran 2. Preparasi Sampel dan Ekstraksi



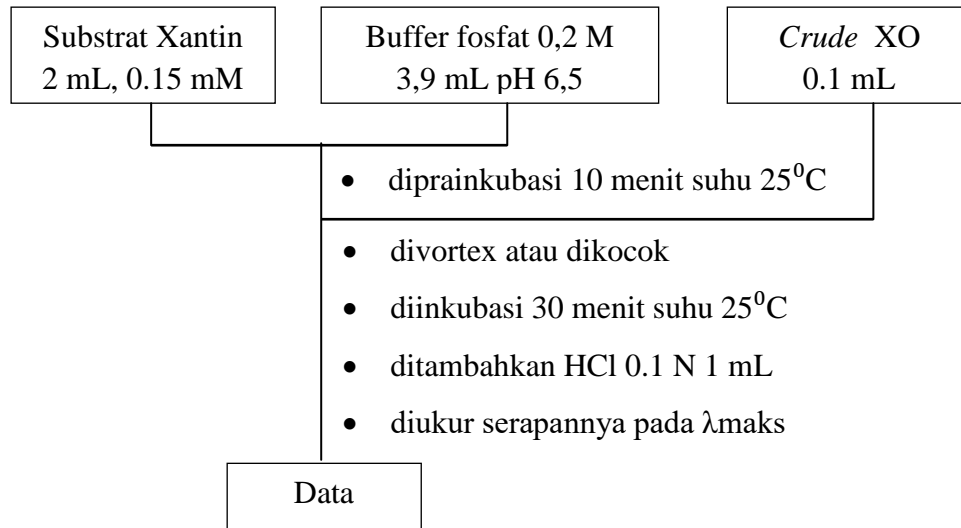
### Lampiran 3. Pembuatan Larutan Standar Asam Urat dan Penentuan $\lambda_{maks}$



Catatan : Penentuan panjang gelombang maksimum ditentukan dengan membuat variasi konsentrasi standar asam urat 0.1 mg/mL; 0.2 mg/mL; 0.4 mg/mL; 0.8 mg/mL; dan 0.16 mg/mL

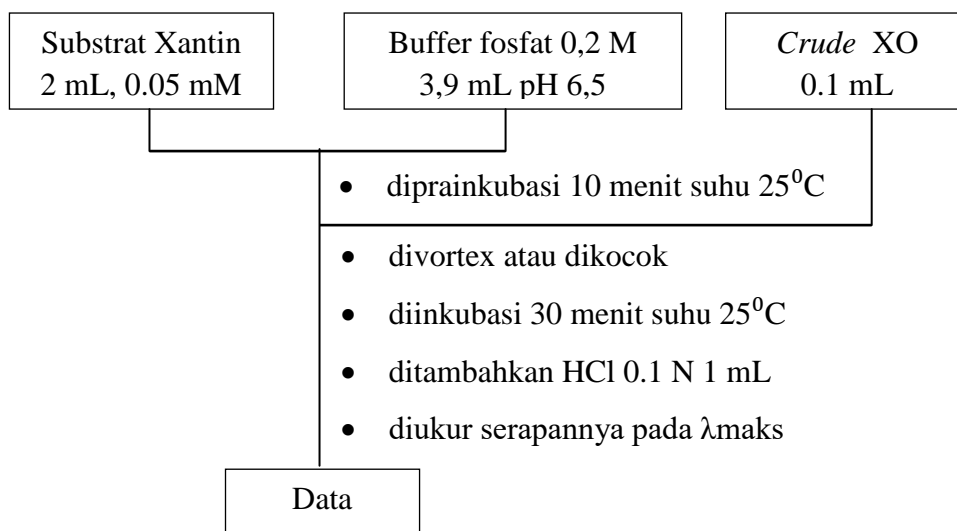
#### Lampiran 4. Karakterisasi Enzim Xantin Oksidase

##### a. Penentuan pH optimum



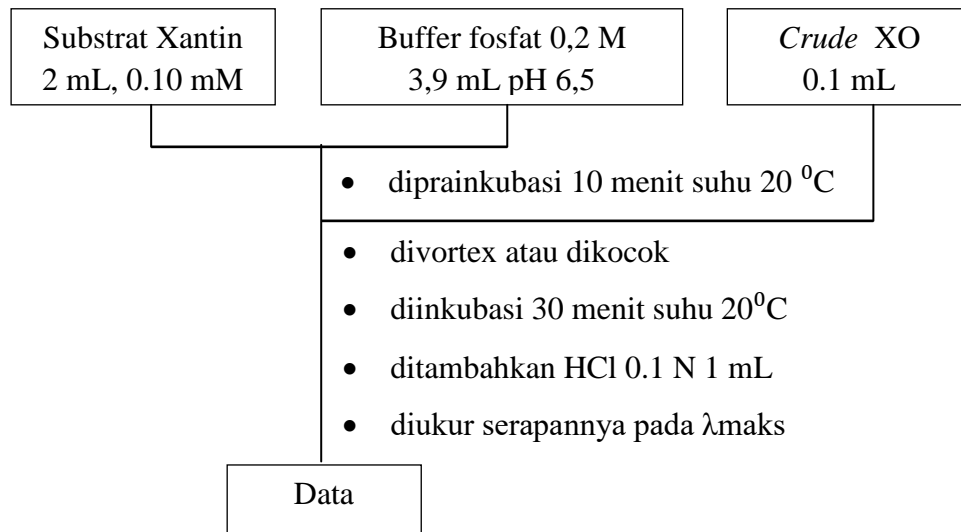
Catatan : dilakukan prosedur untuk masing-masing variasi pH 6.5; 7.0; 7.5; dan 8.0. Dan disiapkan tabung berbeda untuk masing-masing pH dengan mengganti *crude* XO menjadi akudes 0.1 mL dan ditetapkan sebagai kontrol. Prosedur dilakukan secara duplo.

##### b. Penentuan Konsentrasi Substrat



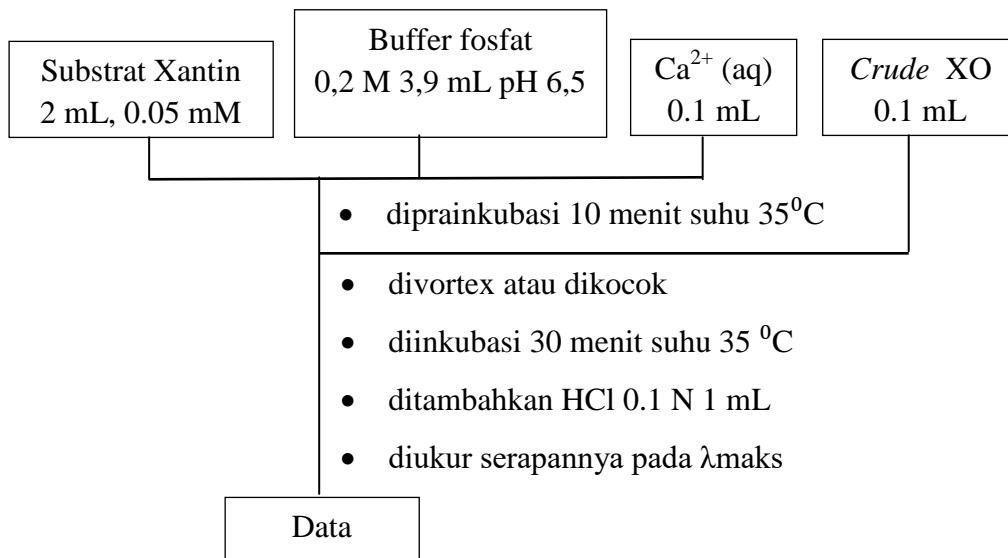
Catatan : dilakukan prosedur untuk masing-masing variasi [substrat] yaitu 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 mM. Dan disiapkan tabung berbeda untuk masing-masing [substrat] dengan mengganti *crude* XO menjadi akudes 0.1 mL dan ditetapkan sebagai kontrol. Prosedur dilakukan secara duplo.

### c. Penentuan Suhu Optimum



Catatan : dilakukan prosedur untuk masing-masing variasi suhu 25; 30; 35; dan 40 °C. Dan disiapkan tabung berbeda untuk masing-masing suhu dengan mengganti *crude* XO menjadi akudes 0.1 mL dan ditetapkan sebagai kontrol. Prosedur dilakukan secara duplo.

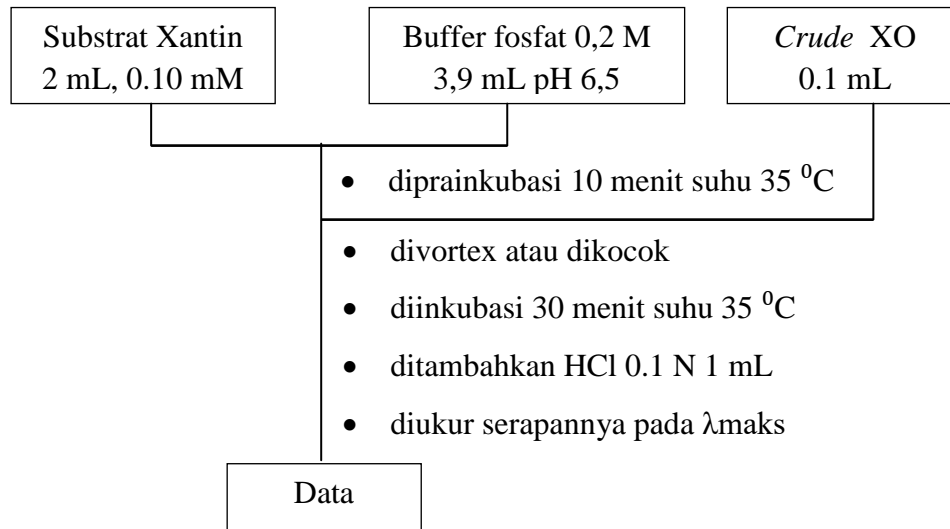
### d. Pengaruh Ion Logam



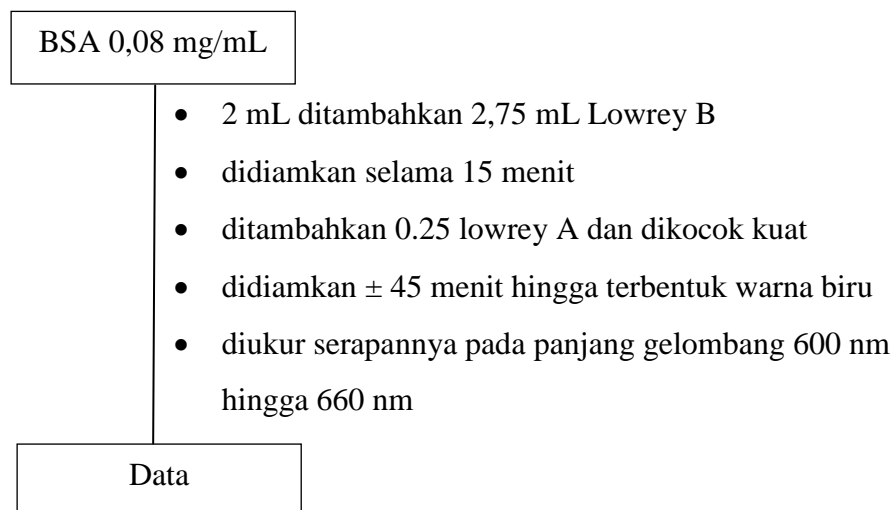
Catatan : dilakukan prosedur pada masing-masing larutan  $\text{CuCl}_2$  dan  $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  untuk setiap konsentrasi 10 mM dan 50 mM serta disiapkan tabung berbeda untuk masing-masing larutan logam dengan mengganti *crude* XO menjadi akudes 0.1 mL dan ditetapkan sebagai kontrol. Prosedur dilakukan secara duplo

Lampiran 5. Penentuan Aktivitas Enzim XO dan Aktivitas Spesifik

**a. Penentuan Aktivitas Crude Enzim pada Kondisi Optimum**



**b. Penentuan Kadar Prtoein Sampel dengan Metode Lowry**

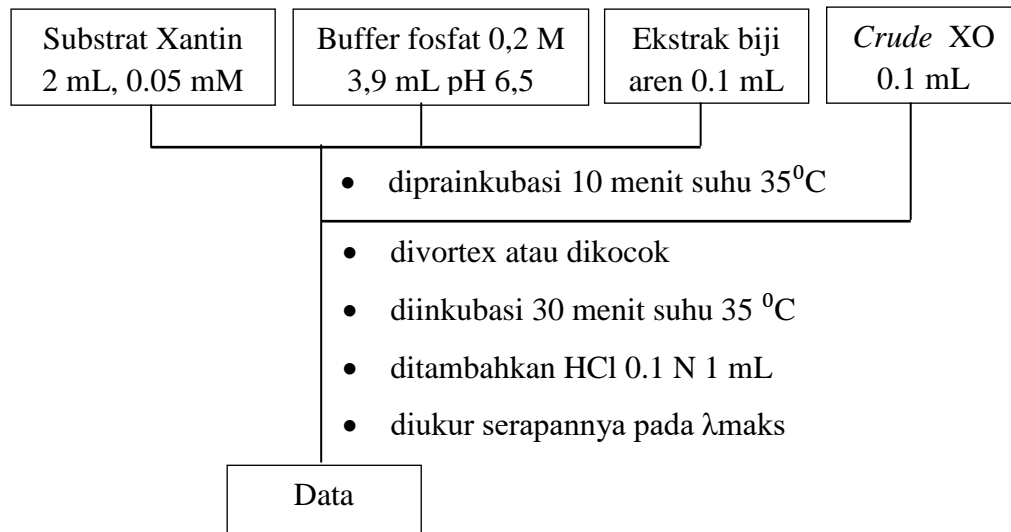


Lowrey B = campuran  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dalam  $\text{NaOH}$  0.1 N sebanyak 20 mL ditambah campuran 1%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dalam 1%  $\text{Na(K)-tartarat}$  sebanyak 0.4 mL dengan perbandingan 1:1

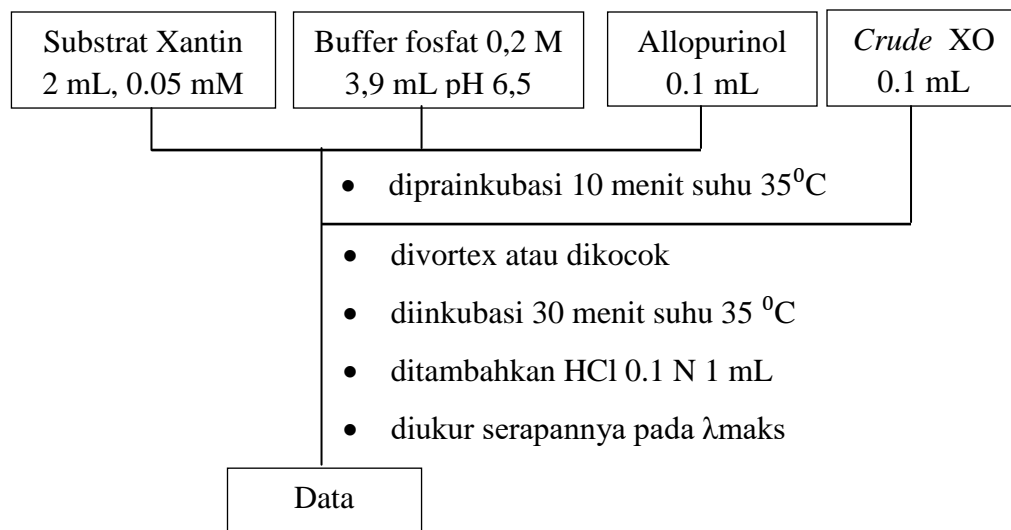
Lowrey A = Follin Ciocelteau dengan aquades 1:1

Catatan : dilakukan prosedur yang sama untuk konsentrasi standar BSA yang lain menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{630}$ ). Digunakan akuades sebagai blanko, maka akan diperoleh persamaan linear  $y = ax + b$  (Lampiran 8)

Lampiran 6. Penentuan Daya Inhibisi Estrak dan Allopurinol

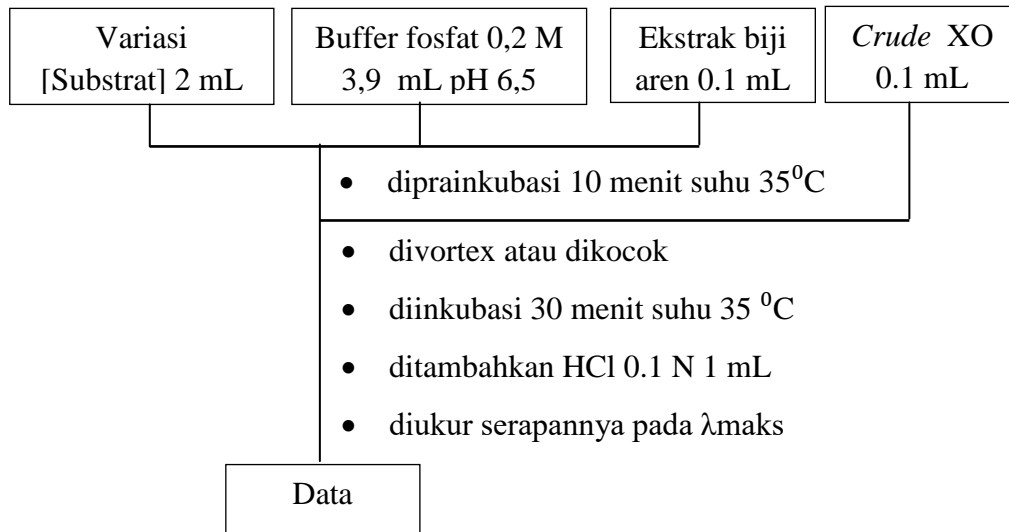


Catatan : dilakukan prosedur yang sama untuk konsentrasi ekstrak etanol biji aren lainnya dan digunakan akuades sebagai pengganti *crude XO* (kontrol blanko) untuk masing-masing konsentrasi ekstrak. Hubungan konsentrasi dan aktivitas enzim XO akan membentuk persamaan linear  $y = ax + b$  (Lampiran 8). Variasi konsentrasi juga dilakukan untuk mengetahui % inhibisi dan  $IC_{50}$



Catatan : dilakukan prosedur yang sama untuk konsentrasi allopurinol lainnya dan digunakan akuades sebagai pengganti *crude XO* (kontrol blanko) untuk masing-masing konsentrasi ekstrak. Hubungan konsentrasi dan aktivitas enzim XO akan membentuk persamaan linear  $y = ax + b$  (Lampiran X). Orientasi juga dilakukan untuk mengetahui % inhibisi

Lampiran 7. Penentuan Kinetika Inhibisi Ekstrak Uji terhadap Aktivitas Enzim XO



Catatan : untuk melihat kinetika enzim akibat perlakuan ekstrak, ke dalam sederetan konsentrasi substrat 0.05; 0.10; 0.15; 0.20; dan 0.25 mM masing-masing ditambahkan ekstrak (konsentrasi terpilih). Disiapkan tabung lain berisi campuran tanpa inhibitor dan ditetapkan sebagai kinetika awal. Digunakan allopurinol konsentrasi terpilih sebagai pemabanding (Lampiran 8).



Lampiran 8. Tabel dan Perhitungan

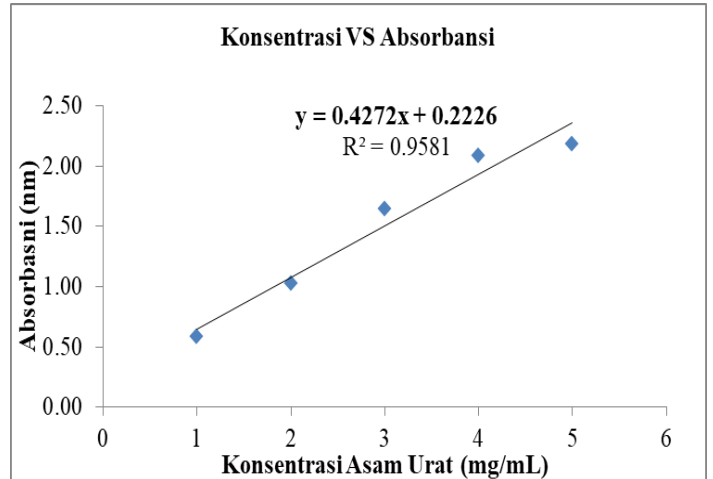
a.  $\% \text{ Rendamen (b/b)} = \frac{\text{berat ekstrak (g)}}{\text{berat sampel (g)}} \times 100 \%$

$\% \text{ Rendamen (b/b)} = \frac{0.7185 \text{ (g)}}{50 \text{ (g)}} \times 100 \%$

$\% \text{ Rendamen (b/b)} = 1.43 \%$

Serapan standar asam urat pada  $\lambda_{232}$

Konsentrasi Asam Urat	Absorbansi (nm)
0.01 mg/mL	0.584
0.02 mg/mL	1.022
0.04 mg/mL	1.640
0.08 mg/mL	2.088
0.16 mg/mL	2.187



Grafik hubungan konsentrasi standar Asam Urat (mg/mL) terhadap absorbansi pada  $\lambda_{232}$

b. Karakterisasi enzim xantin oksidase

Aktivitas enzim xantin oksidase pada variasi pH

pH	Absorbansi Sampel (dengan enzim)	Absorbansi Kontrol (tanpa enzim)	Selisih Absorbansi (Y)	Aktivitas XO (mU/mL)
6	1,25	0,298	0,933	26,46
6.5	1,502	0,281	1,221	32,47
7.0	1,061	0,281	0,780	18,10
7.5	1,058	0,337	0,721	17,38
8.0	1,133	0,354	0,779	16,99

Contoh perhitungan aktivitas enzim XO terhadap pH

$y = 0.4272x + 0,2226$

$x = \frac{Y - 0,2226}{0,4272} = \frac{1,221 - 0,2226}{0,4272}$

$$x = \frac{0,7104}{0,4272} = 2,337 \text{ mg/mL}$$

x dalam 7 mL campuran (Volume total larutan uji)

$$x = 2,337 \text{ mg/mL} \times 7 \text{ mL} = 16,359 \text{ mg}$$

Aktivitas Enzim dalam Unit adalah 1 mmol substrat xantin yang diubah menjadi asam urat per satuan waktu

$$\text{mmol} = \frac{16,359 \text{ mg}}{168 \text{ mg/mol}} = 0,0973 \text{ mmol}$$

$$\text{Aktivitas Enzim (U/mL)} = \frac{0,0974 \text{ mmol}}{30 \text{ menit}} \times \frac{1}{0,1 \text{ mL}} = 0,03246 \text{ U/mL}$$

$$\text{Aktivitas Enzim (mU/mL)} = 0,03246 \times 1000 = 32,46 \text{ mU/mL}$$

Aktivitas enzim xantin oksidase pada variasi konsentrasi substrat

Konsentrasi substrat (mM)	Absorbansi Sampel (dengan enzim)	Absorbansi Kontrol (tanpa enzim)	Selisih Absorbansi (Y)	Aktivitas XO (mU/mL)
0,05	0,967	0,201	0,766	17,67
0,10	1	0,207	0,793	21,55
0,15	1,062	0,217	0,845	20,24
0,20	1,161	0,317	0,844	20,21
0,25	1,223	0,379	0,844	20,21

Aktivitas enzim xantin oksidase pada variasi suhu

suhu ( °C)	Absorbansi Sampel (dengan enzim)	Absorbansi Kontrol (tanpa enzim)	Selisih Absorbansi (Y)	Aktivitas XO (mU/mL)
20	1,011	0,241	0,770	17,81
25	1,013	0,233	0,780	18,13
30	0,993	0,234	0,759	19,20
35	1,046	0,233	0,813	21,94
40	1,018	0,229	0,789	16,63

Aktivitas enzim xantin oksidase terhadap pengaruh logam

Sampel	Konsentrasi Ion Logam (mM)	Selisih Absorbansi (Y)	Aktivitas Enzim (mU/mL)	Aktivitas Relatif (%)
Kontrol	-	0,622	12,99	100,00
Ca	10 mM	0,664	14,56	112,09
	50 mM	0,797	17,62	135,60
Cu	10 mM	0,518	13,31	102,44
	50 mM	0,879	10,35	79,65
Cd	10 Mm	0,626	13,41	103,21
	50 mM	0,607	14,13	108,79

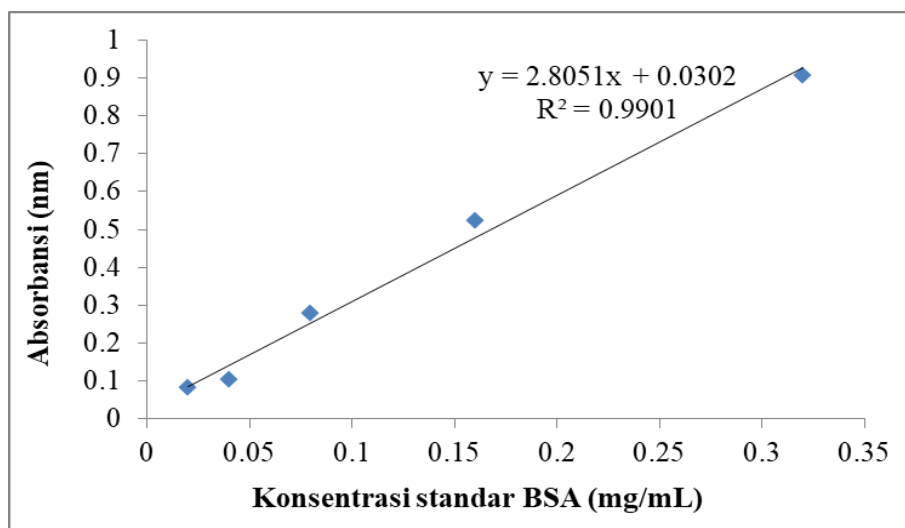
$$\text{Aktivitas relatif (\%)} = \frac{\text{aktivitas dengan CaCl}_2}{\text{aktivitas kontrol (tanpa logam)}} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas relatif (\%)} = \frac{14,56 \text{ mU/mL}}{12,99 \text{ mU/mL}} \times 100 \% = 112,09 \%$$

c. Penentuan aktivtas enzim (mU/mL) dan aktivitas spesifik (mU/mg)

**Tabel 12.** Serapan standar BSA

[BSA] (mg/mL)	Absorbansi $\lambda_{630}$ nm
0,02	0,082
0,04	0,102
0,08	0,277
0,16	0,524
0,32	0,905



Hubungan absorbansi dan konsentrasi BSA

Aktivitas dan aktivitas spesifik enzim xantin oksidase

Absorbansi (y)	Intercept (a)	Slope (b)	Faktor Pengenceran (FP)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Enzim (mU/mL)	Aktivitas Spesifik (mU/mg)
0,255	2,8051	0,0302	100	8,01	16,84	2,10
0,255	2,8051	0,0302	100	8,01	10,43	1,30
Rata-Rata				8,01	8,99	1,12
0,398	2,8051	0,0302	100	13,11	16,84	1,29
0,394	2,8051	0,0302	100	12,97	10,43	0,80
Rata-Rata				13,04	8,99	0,69

Penentuan kadar protein

$$y = 2.8051x + 0.0302$$

$$\frac{Y - 0.0302}{2.8051} = \frac{0.255 - 0.0302}{2.8051}$$

$$x = \frac{0.0324}{2.8051} = 0.080 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Kadar protein} = X \cdot \text{FP} = 8 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Aktivitas Spesifik} = \frac{\text{aktivitas enzim (mU/mL)}}{\text{Kadar Protein (mg/mL)}}$$

$$\text{Aktivitas spesifik} = \frac{16.84 \text{ mU/mL}}{8 \text{ mg/mL}} = 2.10 \text{ mU/mg}$$

- d. Variasi konsentrasi ekstrak etanol biji aren terhadap aktivitas enzim xantin oksidase

Aktivitas enzim xantin oksidase terhadap ekstrak etanol biji aren

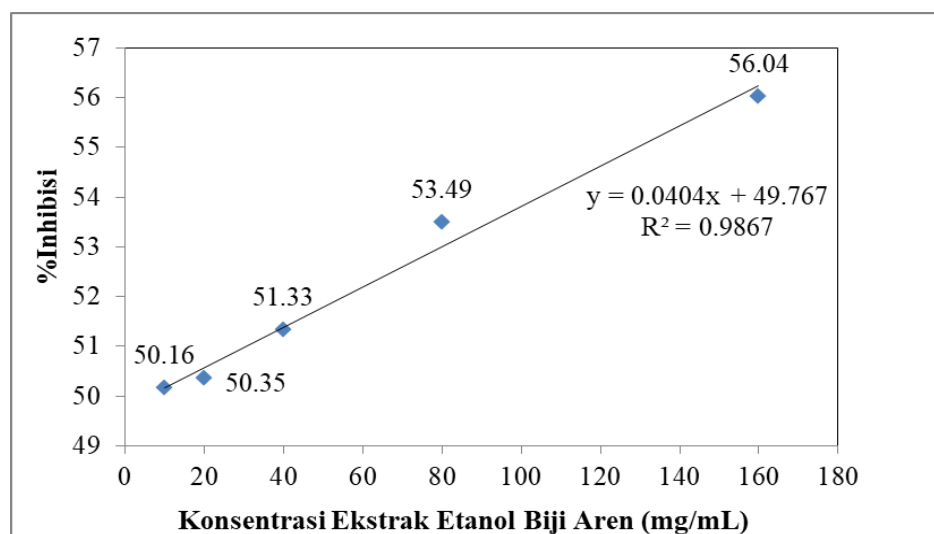
Sampel	Absorbansi Sampel (dengan enzim)	Absorbansi Kontrol (tanpa enzim)	$\Delta$ Absorbansi (Y)	Aktivitas enzim (mU/mL)	% inhibisi (%)
Blanko	0,589	0,004	0,585	12,99	0
10 ppm	0,507	0,03	0,477	8,39	50,16
20 ppm	0,491	0,02	0,476	8,36	50,35
40 ppm	0,508	0,04	0,471	8,20	51,33
80 ppm	0,532	0,07	0,463	7,83	53,49
<b>160 ppm</b>	0,506	0,06	0,447	7,40	56,04

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Aktivitas blanko} - \text{Aktivitas sampel uji}}{\text{Aktivitas blanko}} \times 100$$

Contoh perhitungan % inhibisi ekstrak etanol biji aren 10 ppm

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{16,84 - 8,39}{16,84} \times 100 \%$$

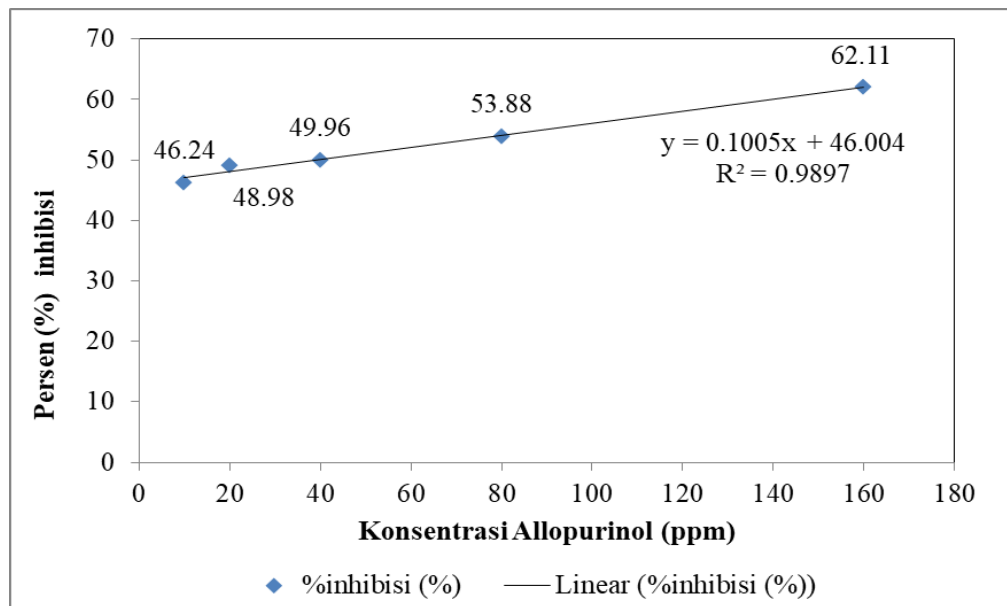
$$\% \text{ inhibisi} = \frac{8,45}{16,84} \times 100 \% = 50,16 \%$$



Hubungan konsentrasi terhadap aktivitas enzim (mU/mL)

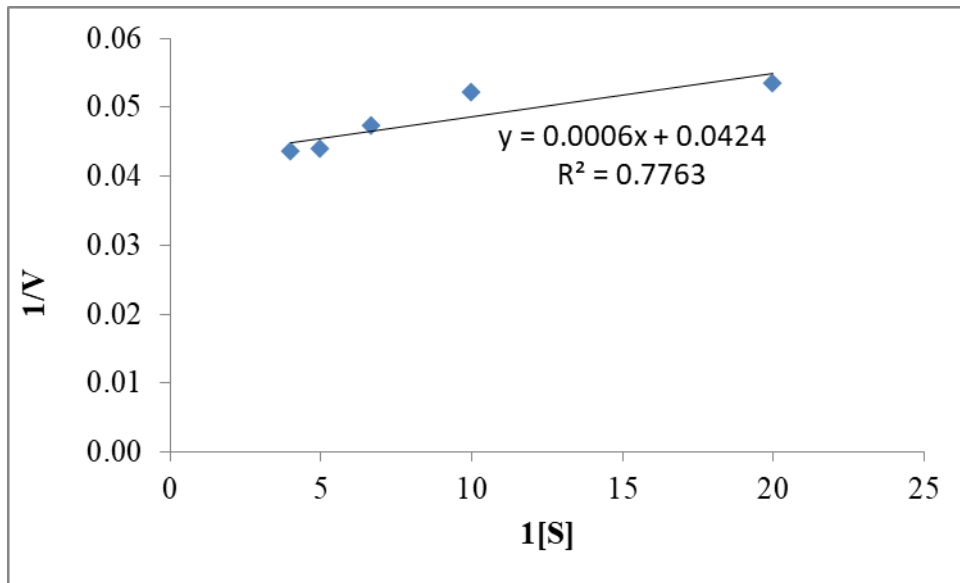
Aktivitas enzim xantin oksidase terhadap allopurinol

Sampel	Absorbansi Sampel (dengan enzim)	Absorbansi Kontrol (tanpa enzim)	$\Delta$ Absorbansi (Y)	Aktivitas enzim (mU/mL)	% inhibisi (%)
Blanko	0,589	0,004	0,585	9,05	0
10 ppm	0,497	0	0,497	8,59	46,24
20 ppm	0,493	0,01	0,483	8,43	48,98
40 ppm	0,491	0,013	0,478	7,77	49,96
80 ppm	0,469	0,011	0,458	6,38	53,88
<b>160 ppm</b>	0,495	0,079	0,416	9,05	62,11



Hubungan konsentrasi terhadap aktivitas enzim (mU/mL)

e. Penentuan nilai Km dan Vmaks pada kinetika enzim xantin oksidase



Hubungan antara 1/V dengan 1/[S] enzim XO

Persamaan linear dari grafik Lineweaver-Burk yakni  $y = 0.0006x + 0.0424$

Dengan nilai  $a = 0.0006$  dan  $b = 0.0424$

$$b = \frac{1}{V_{\text{maks}}}$$

$$0.0424 = \frac{1}{V_{\text{maks}}}$$

$$V_{\text{maks}} = \frac{1}{0.0424} = 23.58$$

Sedangkan nilai Km ditentukan berdasarkan

$$a = \frac{K_m}{V_{\text{maks}}}$$

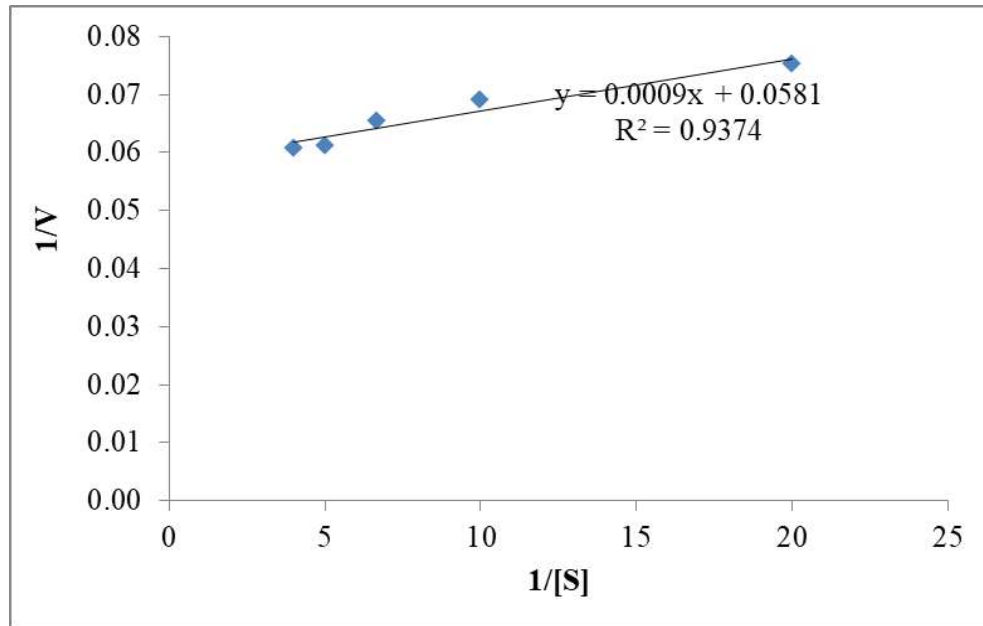
$$0.0006 = \frac{K_m}{23.58}$$

$$K_m = 0.0006 \times 23.58$$

$$K_m = 0.0006 \times 23.58$$

$$K_m = 0.0141$$

f. Penentuan Kintetika Inhibisi Ekstrak Biji Aren terhadap enzim Xantion Oksidase



Hubungan 1/[S] dengan 1/V ekstrak etanol biji aren

Persamaan linear dari grafik Lineweaver-Burk yakni  $y = 0.0009x + 0.0581$

Dengan nilai  $a = 0.0009$  dan  $b = 0.0581$

$$b = \frac{1}{V_{\text{maks}}}$$

$$0,0581 = \frac{1}{V_{\text{maks}}}$$

$$V_{\text{maks}} = \frac{1}{0,0581} = 17,21$$

Sedangkan nilai  $K_m$  ditentukan berdasarkan

$$a = \frac{K_m}{V_{\text{maks}}}$$

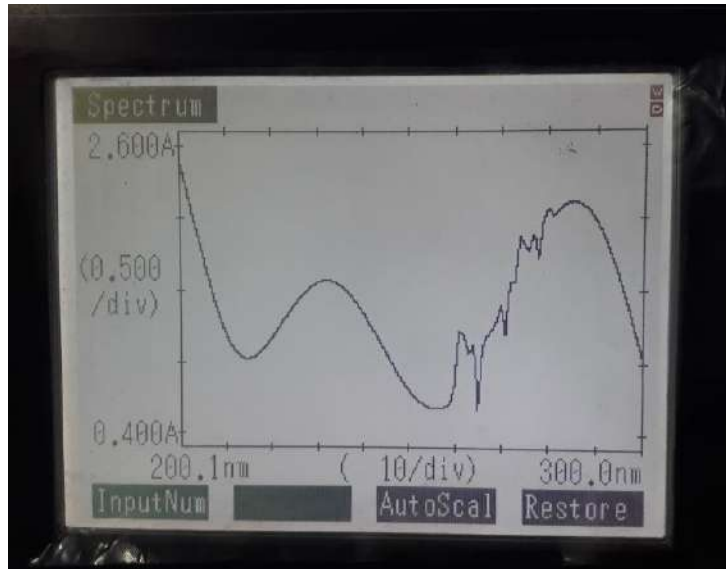
$$0.0009 = \frac{K_m}{17,21}$$

$$K_m = 0.0009 \times 17,21$$

$$K_m = 0,0154$$



Lampiran 9. Dokumentasi Penelitian



Spektrum panjang gelombang standar asam urat



Proses pemerahan susu sapi



Isolasi enzim xantin oksidase dari susu sapi dengan NaCl



Preparasi biji aren



Maserasi biji aren dengan etanol 95%



Evaporasi ekstrak etanol biji aren hingga diperoleh ekstrak kental



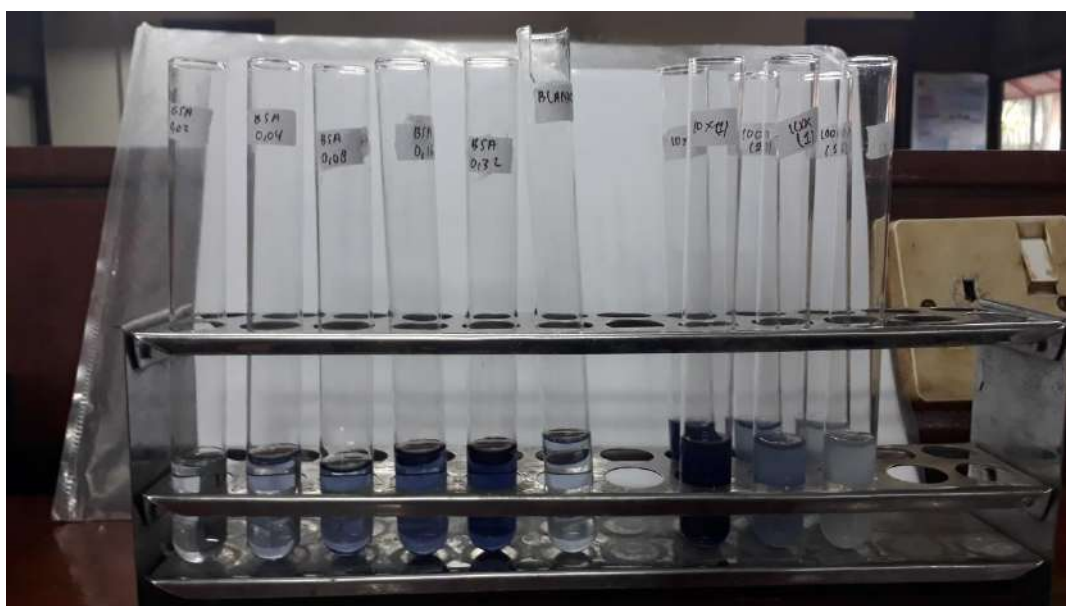
Karakterisasi enzim xantion oksidase (suhu)



Karakterisasi enzim xantin oksidase terhadap senyawaan logam



Pengenceran ekstrak etanol biji aren dari larutan 1000 pm



Pengukuran kadar protein *crude* enzim xantin oksidase