

## REVIEW ARTIKEL: ISOLASI DAN PENGUKURAN AKTIVITAS ENZIM XANTIN OKSIDASE

### ARTICLE REVIEW: ISOLATION AND MEASUREMENT OF XANTHINE OXIDASE ENZYME ACTIVITIES

**Muhammad Lathiful Hidayatul Rohmat and Nuniek Herdyastuti\***  
Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences  
Universitas Negeri Surabaya  
Jl. Ketintang, Surabaya (60231), Telp. 031-8298761  
\* Corresponding author, e-mail : [nuniekherdyastuti@unesa.ac.id](mailto:nuniekherdyastuti@unesa.ac.id)

**Abstrak.** Xantin oksidase adalah enzim yang mengkatalisis oksidasi hipoxantin menjadi xantin dan kemudian xantin menjadi asam urat yang memerankan peran penting dalam katabolisme purin. Xantin oksidase dapat diisolasi dari berbagai sumber susu, jaringan hewan, dan mikroorganisme baik mesofilik maupun termofilik. Pemurnian enzim xantin oksidase untuk mendapatkan aktivitas enzim yang tinggi telah dilakukan dengan berbagai metode antara lain, presipitasi amonium sulfat, dialisis, dan berbagai macam metode kromatografi. Pengukuran aktivitas enzim xantin oksidase dapat dilakukan secara *in vitro* dengan mengukur kadar produk ataupun kadar substrat yang beraksi. xantin oksidase berpotensi diaplikasikan dalam bidang medis sebagai kit, bidang industri sebagai biosensor dan penyiapan makanan sehat rendah purin, serta dalam bidang lingkungan hidup sebagai bioremediasi senyawa heterogen siklik yang berbahaya.

**Kata kunci:** Xantin oksidase, isolasi, pengukuran aktivitas, aplikasi

**Abstract.** Xanthine oxidase is an enzyme that catalyzes the oxidation of hypoxanthine to xanthine and then xanthine to uric acid which be an important role in purine catabolism. Xanthine oxidase can be isolated from various sources of milk, animal tissue, and mesophilic and thermophilic microorganisms. Purification of xanthine oxidase to obtain high enzyme activity has been carried out by various methods include ammonium sulfate precipitation, dialysis, and various chromatographic methods. Measurement of xanthine oxidase enzyme activity can be doing by *in vitro* with measuring product levels or substrate levels in action. xanthine oxide has the potential to be applied in the medical field as a kit, in the industrial field as a biosensor and preparation of low purine healthy foods, as well as in the environmental field as a bioremediation of dangerous cyclic heterogeneous compounds.

**Keywords:** Xanthine oxidase, isolation, activity measurement, application

## PENDAHULUAN

Xantin oksidase merupakan salah kompleks enzim yang terdiri dari molekul-molekul protein antar lain flavin adenin dinukleotida (FAD), molibdenum dan besi sehingga secara kolektif dikenal sebagai besi molybdenum-sulfur flavin hidrosilase [1]. Enzim ini berperan pada proses oksidasi hipoxantin menjadi xantin dan kemudian menjadi asam urat yang merupakan jalur degradasi purin [2]. Selain sebagai katalisator oksidasi hipoxantin, secara bersamaan enzim ini juga berperan sebagai katalisator reduksi oksigen

( $O_2$ ) menjadi hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang mengarah pada pembentukan radikal anion superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ) [3].

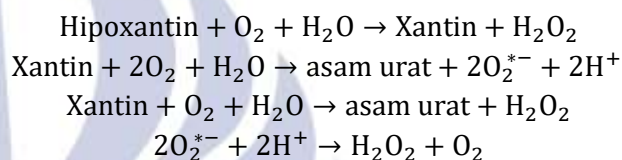
Xantin oskidase dapat diperoleh dari berbagai sumber yang berbeda diantaranya dari bakteri, susu, dan berbagai organ hewan dalam jumlah yang berbeda. Aktivitas enzim xantin oksidase dapat diuji dengan menentukan kadar asam urat yang terbentuk setelah direaksikan dengan substrat xantin. Penentuan kadar asam urat ilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 290 nm.

Xantin oksidase dimanfaatkan sebagai salah satu elemen utama dalam diagnosis superoksida dismutase (SOD) menggunakan kit [4]. Hal ini dikarenakan kemampuannya sebagai katalisator radikal anion superoksida yang merupakan substrat dari SOD. Kit tersebut sangat sensitif untuk pengukuran aktivitas SOD yang berguna untuk diagnosa, pemantauan, dan pengobatan stres oksidatif. Dimana stres oksidatif berperan sebagai patogenesis berbagai penyakit organ dalam [5]. Selain itu, xantin oksidase juga dimanfaatkan dalam berbagai bidang medis seperti pada proses diagnosa dan manajemen pengobatan penyakit dalam seperti hiperuresemia, asam urat, xanthinuria, dan gagal ginjal [6]. Enzim xantin oksidase juga dimanfaatkan sebagai agen anti mikroba dan juga banyak digunakan dalam uji klinis senyawa anorganik fosfat, adenosin deaminase, dan 5'-nukleotidase, terutama dalam penentuan penyakit liver [7, 8]. Pada bidang industri pangan xantin oksidase dimanfaatkan sebagai biosensor kadar hipoxantin dalam daging ikan. Kandungan hipoxantin dalam daging ikan dapat digunakan sebagai penentu kualitas kesegaran ikan hal ini dikarenakan hipoxantin memberikan rasa tidak enak "pahit" pada daging ikan [9].

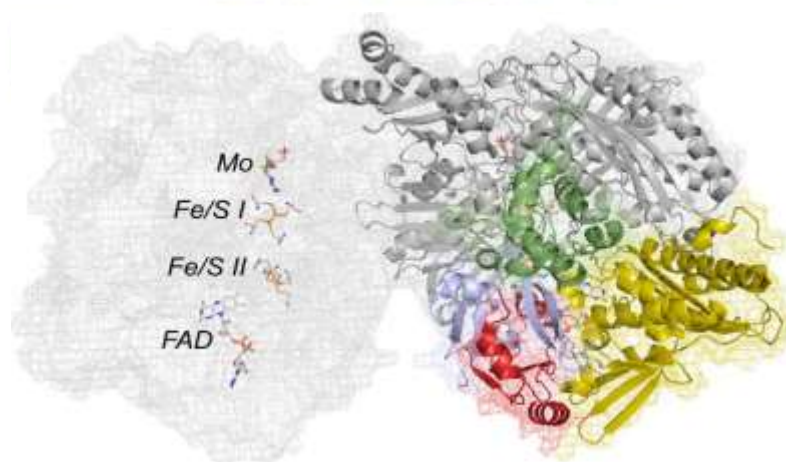
### ENZIM XANTIN OKSIDASE

Xantin Oksidase adalah enzim yang mampu mengatalisis oksidasi hipoxantin menjadi xantin, dan kemudian mengatalisis xantin menjadi asam urat yang mempunyai peranan penting dalam katabolisme purin dalam manusia [2, 10]. Selama proses oksidasi, oksigen bertindak sebagai akseptor elektron, sehingga menghasilkan radikal

anion superoksida dan hidrogen peroksida. Akibatnya selama reaksi berlangsung, radikal anion superoksida ( $O_2^{\cdot-}$ ) dan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) terbentuk [3]. Menurut Fridovich [3] menyebutkan bahwa dalam kondisi relatif fisiologis (21%  $O_2$  dan pH 7) xantin oksidase dapat mengkatalis reduksi  $O_2$  menjadi  $H_2O_2$  dan  $O_2^{\cdot-}$  pada rasio 4:1 ( $H_2O_2 : O_2^{\cdot-}$ ) atau 80%  $H_2O_2$  dan 20%  $O_2^{\cdot-}$ , sedangkan untuk produksi 100%  $O_2^{\cdot-}$  membutuhkan lingkungan 100%  $O_2$  pada pH 10. Selanjutnya, superoksida yang terbentuk secara spontan ataupun dengan pengaruh enzim superoksida dismutase senyawa radikal anion superoksida dikonversi menjadi hidrogen peroksida dan oksigen [11]. Reaksinya dapat ditulis sebagai berikut [12]:



Struktur Xantin oksidase tersusun dari molekul-molekul protein dimana tiap molekulnya tersusun atas 2 mol Flavin Adenin Dinukleotida (FAD), 2 mol atom Mo, dan 8 mol atom Fe yang secara kolektif dikenal sebagai besi molybdenum-sulfur flavin hidroksilase [1, 4]. Bentuk aktif dari enzim xantin oksidase adalah homodimer dengan masa molekul 290 kDa, dengan masing-masing molekul bekerja secara independen dalam katalisis [13]. Setiap sub unit mengandung empat situs aktif redoks: satu situs aktif pusat molibdenum, sepasang  $[2Fe-2S]$  yang berbeda secara spektroskopik, dan satu kofaktor FAD seperti terlihat pada Gambar 1 [14].

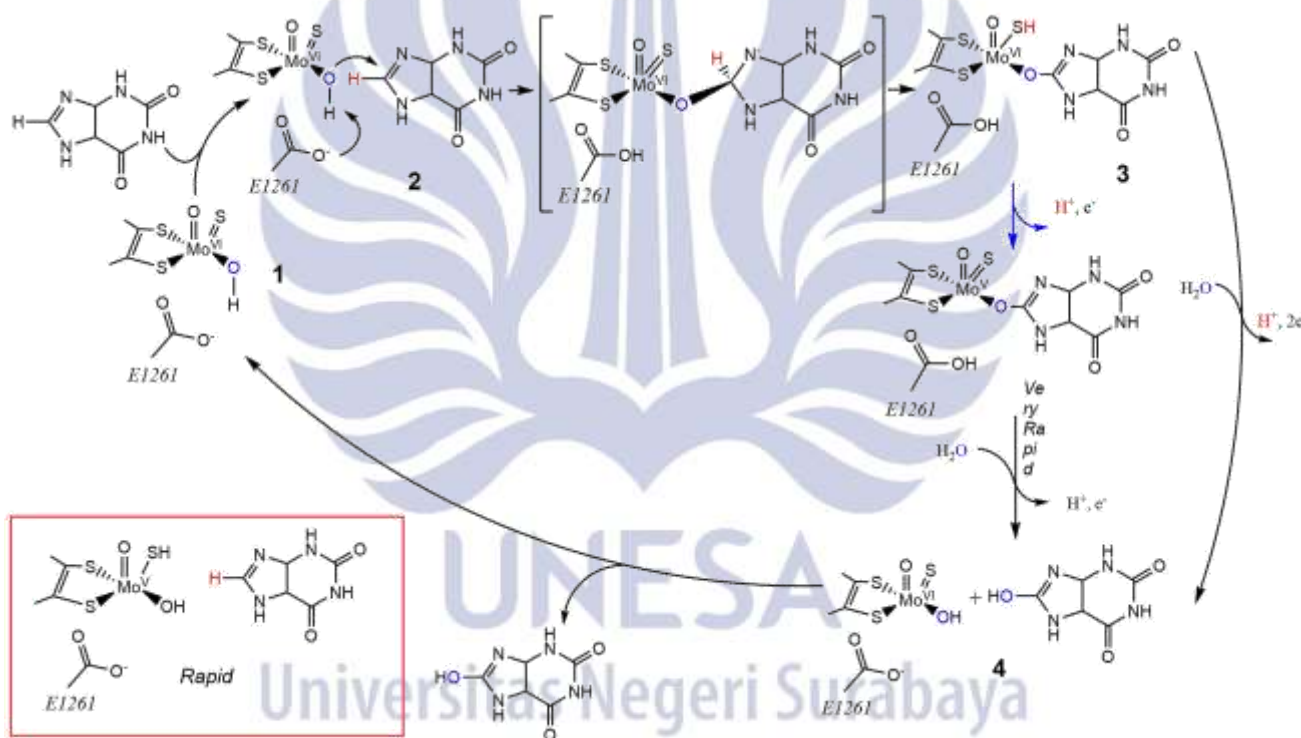


Gambar 1. Struktur Enzim Xantin Oksidase [15]

Gambar 1 diatas menunjukkan struktur enzim xantin oksidase, dimana dari N-ujung pada sub unit sebelah kanan terdapat gugus-gugus berwarna biru dan hijau untuk dua ikatan [2Fe-2S] (masing-masing Fe/S I dan Fe/S II), kuning untuk FAD, dan abu-abu untuk molybdopterin. Wilayah penghubung antara gugus besi-sulfur-ikatan FAD berwarna merah di bagian kiri bawah subunit. Sub unit di sebelah kiri ditampilkan dalam bentuk mesh (ruang) untuk menggambarkan tata ruang dari beberapa pusat redoks-aktif dalam sub unit untuk menggambarkan jalur transfer elektron  $\text{Mo} \rightarrow \text{Fe/S I} \rightarrow \text{Fe/S II} \rightarrow \text{FAD}$ . Dua pusat molibdenum terpisah  $52 \text{ \AA}$  [15].

Sisi aktif enzim xantin oksidase terdiri dari unit molybdopterin dengan atom molybdenum juga dikoordinasikan oleh oksigen terminal (oxo), atom sulfur dan terminal

hidroksida. Dalam reaksi pembentukan asam urat, sebuah atom oksigen ditransfer dari molybdenum ke xantin dimana beberapa perantara dianggap terlibat. Atom oksigen yang ditransfer dari molybdenum ke xantin oleh enzim xantin oksidase berasal dari air bukan dari dioksigen [15]. Secara keseluruhan, urutan katalitis xantin oksidase terdiri dari setengah reaksi reduktif dimana substrat secara oksidatif terhidroksilasi di pusat molibdenum, menguraikan dari Mo (VI) menjadi Mo (V), dan setelah transfer elektron intramolekul yang melibatkan pusat Fe/S, setengah reaksi oksidasi lainnya terjadi dimana ekuivalen pereduksi hilang dari enzim melalui FAD-nya dengan  $\text{O}_2$  berperan sebagai akseptor elektron [14]. Mekanisme reaksi xantin oksidase ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Siklus mekanisme katalitis xantin oksidase pada oksidasi xantin menjadi asam urat. Panah biru menunjukkan jalur reaksi alternatif yang mengarah pada pembentukan zat antara yang sangat cepat. Spesies yang cepat dibentuk oleh penambahan substrat berlebih pada enzim yang tereduksi sebagian [16].

## ISOLASI DAN PEMURNIAN XANTIN OKSIDASE

Xantin oksidase dapat diisolasi dari berbagai sumber antara lain susu, bakteri dan berbagai jaringan hewan dalam jumlah yang berbeda. Hati tikus *rat* dan *mouse* diketahui

mempunyai aktivitas enzim xantin oksidase ditemukan oleh Kadam & Iyer pada tahun 2007. Setelah melalui pengendapan ammonium sulfat hati tikus *rat* mempunyai aktivitas spesifik sebesar 20,8 unit/mg dengan harga  $K_m$  dan  $V_{\text{mak}}$  13,8 dan 2,55 mL/min. Isolat dari hati tikus *mouse* mempunyai aktivitas spesifik sebesar 18,3 unit/mg

dengan harga  $K_m$  dan  $V_{\max}$  9,67  $\mu\text{M}$  dan 2,15 mL/min [17].

Genus *Arthobacter* telah diketahui mampu memproduksi kompleks enzim xantin oksidase. *Arthobacter sp. XL26* yang diisolasi dari tanah setelah dioptimasi kulturisasinya melalui protokol imun negatif dengan pemulihan aktivitas 92,0% telah dipelajari aktivitas xantin oksidasenya berdasarkan terbentuknya produk  $\text{H}_2\text{O}_2$  setelah direaksikan dengan horseradish peroxidase dan aminopyrine. Setelah melalui pemurnian kromatografi imonoafinitas, bakteri ini menunjukkan aktivitas spesifik 36,0 U/mg stabilitas pada range pH 5-10 dengan suhu dan pH optimum masing-masing 50 °C dan 7 serta harga  $K_m$  sebesar 32,1  $\mu\text{M}$ . Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa enzim terdiri dua protein peptida dengan masing-masing massa sebesar 55,5 dan 85,5 kDa [7]. *Arthobacter M3* yang berhasil diisolasi dari tanah juga dilakukan pemurnian untuk memperoleh aktivitas enzim xantin oksidase. Pemurnian ini hanya dilakukan dalam tiga tahap yaitu fraksinasi amonium sulfat, kromatografi afinitas, dan kromatografi penukaran ion DEAE-CL 4B. Hasilnya menunjukkan adanya aktivitas spesifik enzim sebesar 1033 U/mg dengan suhu dan pH optimum masing-masing 50 °C dan 7,0-7,5 serta harga nilai  $pI$  4,3-5,0. Enzim memiliki dua polipeptida heterogen dengan masa masing-masing 35 dan 100 kDa ditunjukkan oleh adanya dua pita yang nampak pada pemurnian SDS-PAGE [18, 19].

*Acinetobacter calcoaceticu RL2-M4* yang diproduksi dari tanah di sekitar pabrik pemerahan susu di India. Dimana, pengayaan bakteri dilakukan dengan memperkaya medium garam minimum (MSM) yang mengandung xantin dan kemudian dimurnikan dengan fraksinasi amonium sulfat (40-50%) mempunyai aktivitas spesifik 1,4 U/mg. Pemurnian enzim dengan kromatografi penukaran ion DEAE mempunyai aktivitas spesifik 4,58 U/ml. Berat molekul enzim diperkirakan 190 kDa homodimer dengan berat molekul sub unit 95 kDa, mempunyai pH optimum 7 dan suhu optimum 40 °C, stabil dalam suhu 35 °C selama 5 jam. Enzim mempunyai harga  $K_m$  0,3 mM,  $V_{\max}$  5,8 U/mg, dihambat sebesar 93% oleh ion  $\text{Ag}^+$ , 77% oleh natrium trifosfat dan urea, juga dihambat oleh Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) dan ion  $\text{Cu}^{2+}$  masing-masing sebesar 67% dan 74%. Sedangkan ion  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , EDTA dan dithiothreitol (DTT) tidak memberikan efek yang signifikan terhadap aktivitas enzim [20].

Aktivitas xantin oksidase tidak hanya dihasilkan oleh mikroba mesofilik tetapi juga dihasilkan oleh mikroba termofilik. *Bacillus pumilus RL-2d* yang diperoleh dari tanah sumber air panas Manikaran India telah dikarakterisasi secara morfologi maupun gen 16s-rRNA mempunyai aktivitas xantin oksidase dalam media yang mengandung xantin. Bakteri termofilik mampu memproduksi xantin oksidase secara optimal pada pH 7,5, suhu 55 °C, umur inokulasi 28 jam, dan waktu inkubasi selama 24 jam. Xantin oksidase yang telah diproduksi dan dioptimasi parameter fisiokimia diperoleh aktivitas spesifik sebesar 0,209 U/mg dcw dengan karakterisasi enzim menunjukkan suhu dan pH optimum 75 °C dan 7,5 serta menunjukkan termal 5 jam pada suhu 70 °C dan 1 jam pada suhu 80 °C. Enzim diinhibisi secara kuat oleh  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ , dan allopurinol [21]. Xantin oksidase dari *Cellulosimicrobium cellulans* ATCC 21606 juga menunjukkan sifat termostabil yaitu mampu mempertahankan 80,65 % katalitiknya selama 30 menit pada suhu 60 °C. karakteristik enzim menunjukkan pH dan suhu optimum 8 dan 55 °C, serta harga  $K_m$  dan  $V_{\max}$  131,29  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  dan 15,23  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Ion  $\text{Ca}^{2+}$  memberikan sedikit efek penghambatan, sedangkan  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  menunjukkan efek penghambatan yang kuat [22].

Susu mamalia telah diketahui memiliki aktivitas enzim xantin oksidase, dimana xantin oksidase terkonsentrasi dalam membran globula lemak susu yang merupakan protein terbanyak kedua setelah butyrophilin pada susu [11]. Susu sapi (*Bovine milk*) telah dimurnikan menggunakan presipitasi amonium sulfat dan kromatografi afinitas untuk dipelajari aktivitas xantin oksidase berdasarkan kemampuannya dalam mengkonversi xantin menjadi asam urat. Setelah pemurnian kromatografi afinitas diperoleh aktivitas enzim sebesar 51082,22 U/mg dengan pH optimum 9, harga  $K_m$  17,0 mM dan suhu optimum 50 °C, serta mampu mempertahankan 70% aktivitas katalitiknya setelah 60 menit pada suhu 60 °C, memberikan pita tunggal dan diperkirakan mempunyai berat molekul 150 kDa [23].

Xantin oksidase yang diisolasi dan dimurnikan dari susu kerbau air (*Bubalus bubalis*) dengan penambahan toluena, fraksinasi ammonium sulfat, kromatografi afinitas pada kolom Heparin-agarose dan kromatografi filtrasi gel pada kolom Sephacryl S-300 mempunyai aktivitas spesifik 10,66 unit/mg. Berat molekul enzim yang dimurnikan adalah 270 kDa

homodimer dengan berat molekul subunit 135 kDa sebagai mana ditentukan oleh SDS PAGE. Titik isoelektrik menunjukkan spesi tunggal pada pH 6,2, pH optimum enzim 8 dan harga  $K_m$  1 mM. Enzim diaktivasi  $MnCl_2$  dan  $FeCl_2$  tetapi diinhibisi oleh  $NiCl_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $ZnCl_2$ , dan  $CuCl_2$  [4]. Xantin oksidase dari susu sapi telah diisolasi dan dimurnikan dengan kromatografi DEAE-fraksi Sepharose memiliki aktivitas spesifik 8,76 U/mg dan memberikan dua pita yang berarti dua sub unit dengan berat molekul 90 kDa  $\alpha$  subunit, 64 kDa  $\beta$  subunit pada SDS-PAGE [24].

Organ hati yang merupakan salah satu tempat terjadinya metabolisme tubuh terutama metabolisme purin juga banyak dipelajari terkait aktivitas enzim xantin oksidase. Ibrahim, *et al* (2015) telah mempelajari aktivitas xantin oksidase dari hati kerbau air (*Bubalus bubalis*) berdasarkan telah dipelajari aktivitas xantin oksidase berdasarkan reaktivitas superoksida yang dihasilkan selama reaksi. Setelah melalui pemurnian dengan pengendapan aseton dan kromatografi DEAE-selulosa serta Sephacryl S-300, hati kerbau air menunjukkan aktivitas spesifik 7,2 unit/mg dengan nilai titik isoelektrik (pI) pH 6,0-6,2, pH optimum 7,6 dan harga  $K_m$  1,1 mM. Memiliki berat molekul 200 kDa dan berat molekul sub unitnya berdasarkan SDS-PAGE sebesar 67 kDa. Enzim diaktivasi oleh  $FeCl_2$  namun diinhibisi oleh  $CuCl_2$ ,  $MnCl_2$ , dan  $ZnCl_2$ . Allupurinol juga menghambat secara kompetitif dengan satu sisi pengikat dengan nilai  $K_i$  0,025 mM [25]. Hati domba (*Ovis Aries*) juga dimurnikan dengan perlakuan yang sama seperti pemurnian di atas untuk memperoleh enzim xantin oksidase. Setelah dimurnikan diperoleh aktivitas spesifik sebesar 3,5 U/mg, pH optimum 7,6, harga  $K_m$  0,9 mM, pI 5,6 dan 5,8 dengan berat molekul 150 kDa dan pada SDS-PAGE ditemukan pita tunggal 75 kDa yang mewakili protein homodimer.  $FeCl_2$  dan  $NiCl_2$  mampu meningkatkan aktivitas enzim, sementara  $CuCl_2$  dan  $ZnCl_2$  menjadi inhibitor enzim. Allupurinol juga menjadi inhibitor kompetitif pada enzim dengan satu sisi pengikat dengan harga  $K_i$  0,06 mM [26].

Aktivitas enzim oksidase juga telah dipelajari pada hati ikan, dimana untuk pertama kalinya hati ikan dimurnikan untuk dipelajari aktivitas enzim xantin oksidase. Hati ikan putak (*Notopterosus kaporat*) dimurnikan dengan pengendapan ammonium sulfat, dialisis, dan kromatografi DEAE-Selulos. Setelah pemurnian

diperoleh aktivitas spesifik enzim sebesar 2,52 U/mg dengan pH optimum 5, dan suhu optimum 30 °C, serta harga  $K_m$  dan  $V_{max}$  masing-masing sebesar 2,7 mM dan 0,035 [9]. Secara ringkas isolasi dan pemurnian enzim xantin oksidase beserta aktivitas enzimatisnya ditunjukkan pada Tabel 1.

## AKTIVITAS ENZIM XANTIN OKSIDASE

Aktivitas xantin oksidase merupakan ukuran jumlah produk yang dihasilkan dari suatu oksidasi substrat xantin. Satu unit aktivitas xantin oksidase didefinisikan sebagai laju pembentukan 1  $\mu M$  asam urat per menit. Beberapa metode penentuan aktivitas xantin oksidase yang sering dipergunakan adalah:

### 1) Penentuan secara kolorimetri

Penentuan secara kolorimetri didasarkan pada pelepasan produk hasil oksidasi xantin berupa superoksida ke dalam supernatan menggunakan metode Agrawal. Produk tersebut dikomplekskan dengan reagen Nitroblu tetrazolium (NTB) kemudian akan membentuk formazan berwarna biru gelap yang menghasilkan serapan pada panjang gelombang 575 nm. Untuk menentukan unit xantin oksidase digunakan 0,02 unit *bovine milk* xantin oksidase yang tersedia secara komersial sebagai reaksi kontrol [4, 26, 27].

### 2) Kuantifikasi spektrofotometri pembentukan asam urat

Metode ini didasarkan pada pembentukan asam urat yang merupakan produk dari reaksi enzim xantin oksidase dengan substrat xantin, asam urat yang terbentuk ditentukan serapannya pada panjang gelombang 290 nm. Metode ini kurang sensitif diterapkan pada sampel yang mengandung aktivitas xantin oksidase yang kecil. Satu unit aktivitas xantin oksidase dinyatakan sebagai:

$$\text{Unit/mg protein} = (\Delta A/\text{min} \times 1000) / (1,22 \times 10^4 \times \text{mg mL}^{-1} \text{ reaction mixture})$$

Dimana koefisien absorbs molar asam urat adalah  $1,22 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [9, 17, 28].

### 3) Kuantifikasi spektrofotometri penguraian xantin

Metode ini didasarkan pada penguraian substrat xantin oleh enzim xantin oksidase, dimana ditentukan absorbansi substrat xantin yang tidak

teroksidasi oleh enzim xantin oksidase pada panjang gelombang 293 nm. Didasarkan pada absorbansi sisa substrat xantin maka dapat diketahui konsentrasi sisa xantin sehingga dapat diperoleh konsentrasi xantin yang bereaksi dengan enzim. Dengan demikian aktivitas enzimatisnya dapat dihitung menggunakan persamaan berikut [29, 30]:

$$\text{Unit/mL} = (\text{xantin yang bereaksi (mM)}) / (\text{volume enzim (L)} \times \text{waktu inkubasi (menit)})$$

#### 4) Uji fluorimetrik (Backman)

Uji fluorimetrik memberikan sensitivitas 100-500 kali dibanding uji spektrofotometri tradisional pembentukan asam urat dari xantin. Pada uji ini xantin oksidase secara efisien melakukan metabolisme pterin (2-amino-4-hydroxypteridine) menjadi produk fluoresen, isoxanthopterin (2-amino-4,7-pterinediol). Intensitas fluoresensi isoxanthopterin diukur dengan eksitasi pada 345 nm dan emisi pada 390 nm serta kuantitasnya diperoleh dengan menggunakan kurva kalibrasi isoxanthopterin otentik yang dijual komersil [28, 31].

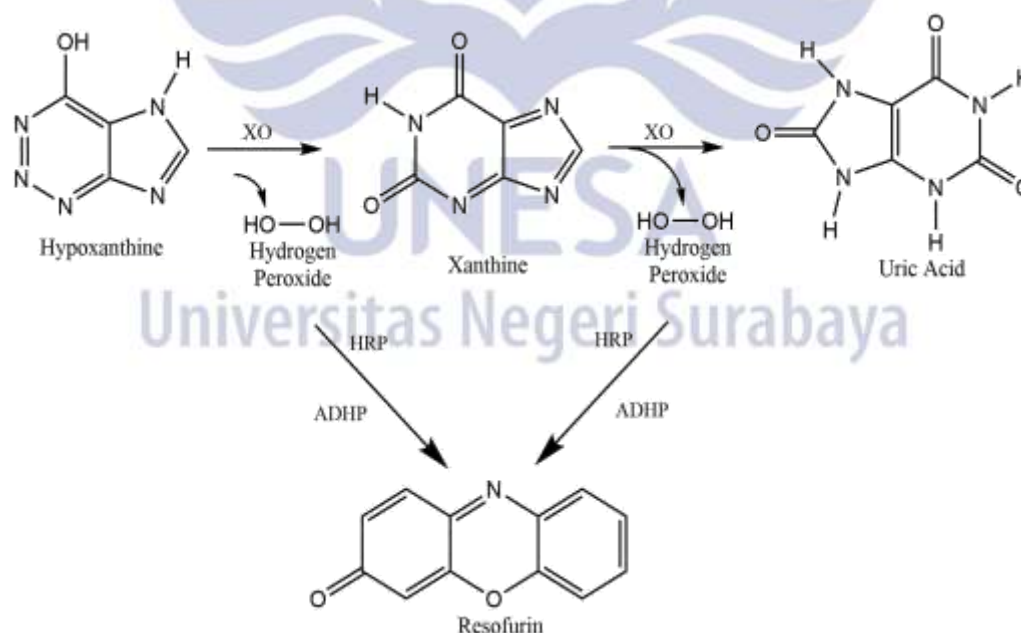
#### 5) Uji fluorimetrik (Cyman)

Kit pengujian xantin oksidase fluorimetrik Cyman didasarkan pada enzimatis

multistep (Gambar 3) dimana  $\text{H}_2\text{O}_2$  yang dihasilkan pada oksidasi hipoxantin maupun xantin akan bereaksi dengan ADHP (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) dengan bantuan horseradish peroxidase (HRP) dalam larutan DMSO. Reaksi  $\text{H}_2\text{O}_2$  dengan ADHP dalam stokiometri 1:1 akan menghasilkan resorufin senyawa yang sangat berfluoresensi. Fluoresensi resorufin dapat dengan mudah dianalisis dengan panjang gelombang eksitasi 520-550 nm dan panjang gelombang emisi 585-595 nm [32, 33].

#### 6) Metode radiochemical

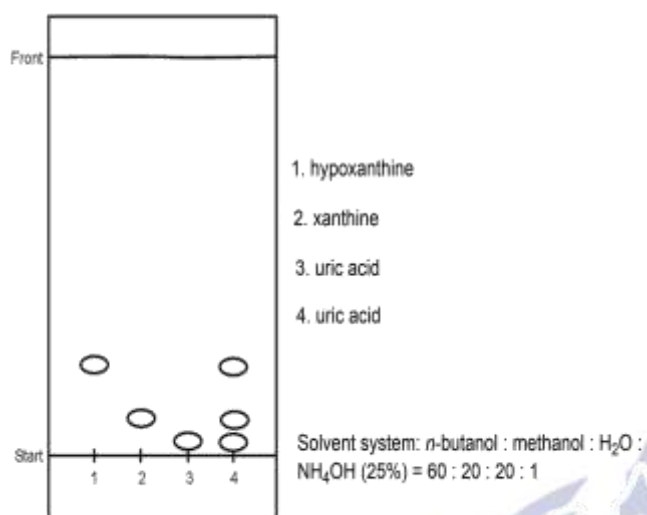
Prinsip metode ini pada dasarnya sama dengan prinsip kuantitasi spektrofotometri pembentukan asam urat, akan tetapi metode ini merupakan cara paling sensitif untuk menentukan aktivitas xantin oksidase. Pada metode ini produk reaksi [ $^{14}\text{C}$ ] hipoxantin dan [ $^{14}\text{C}$ ] asam urat dipisahkan dari substrat oleh TLC (Cellulose F; E. Merck, Darmstadt, Germany). Seperti Gambar 4 yang menunjukkan kromatogram komponen senyawa tersebut. Untuk memungkinkan mengidentifikasi pergerakan masing-masing senyawa maka pelet TLC diberi pencahayaan dibawah sinar UV. Setelah ditentukan posisi hipoxantin, xantin dan asam urat, kemudian radioaktif [ $^{14}\text{C}$ ] xantin dan [ $^{14}\text{C}$ ] asam urat diukur menggunakan scintillation counter [28].



Gambar 3. Skema kit pengujian xantin oksidase fluorimetrik [33].

Tabel 1. Ringkasan tahapan isolasi dan pemurnian enzim xantin oksidase dari berbagai sumber beserta aktivitasnya

Sumber	Tahap Isolasi dan Pemurnian	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Hasil (%)	Referensi
Hati tikus ( <i>rat liver</i> )	Homogenat	0,00312	100	[34]
	Perlakuan hangat	0,00692	55	
	Pretisipasi amonium sulfat (60%)	0,0286	34	
	HTP	0,542	25	
	Q-Sepharose F. F.	3,64	19	
Hati tikus ( <i>rat liver</i> )	Presipitasi amonium sulfat (60%)	20,8	100	[17]
Hati tikus ( <i>mouse liver</i> )		18,3	100	
<i>Arthrobacter</i> sp.	Ekstrak kasar	2,9	100	[7]
	Kromatografi imunoafinitas	36,0	92,0	
<i>Arthrobacter</i> M3	Ekstrak kasar	8,6	100	[18]
	Presipitasi amonium sulfat (30%)	22,2	70,0	
	Kromatografi afinitas	498	51,8	
	DEAE-CL 48	1033	36,1	
Susu sapi ( <i>Bovine Milk</i> )	Susu segar	15,85	100	[23]
	Presipitasi amonium sulfat (50%)	31,04	31,04	
	Kromatografi afinitas	51082,22	20,49	
Hati kerbau air ( <i>Bubalus bubalis</i> )	Fraksi aseton	0,23	100	[25]
	Fraksi DEAE-selulosa	10,4	60,5	
	Fraksi Sephacryl S-300	0,92	33,8	
<i>Bacillus pumilus</i> RL-2d	Ekstrak kasar	0,209	100	[21]
Susu kerbau air ( <i>Bubalus bubalis</i> )	Presipitasi amonium sulfat (50%)	0,86	100	[4]
	Fraksi heparin-agarosa	2,44	45,5	
	Fraksi Sephacryl S-300	10,66	19,1	
Susu sapi (cow milk)	Fraksi n-Butanol	0,031	100	[24]
	Fraksi dialisis	0,92	95	
	Fraksi DEAE-Sepharose	8,76	87	
Hati ikan putak ( <i>Notopterus kaporat</i> )	Ekstrak kasar	0,0925	-	[9]
	Presipitasi amonium sulfat (60%)	0,3818	-	
	Fraksi dialisis	1,2840	-	
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> ATCC21606	Kromatografi kolom DEAE-selulosa	2,5282	-	[22]
	Gel SDS-PAGE	8889,20	-	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RL2-M4	Ekstrak sel bebas (CFE)	0,56	100	[20]
	Presipitasi amonium sulfat (50%)	1,4	78	
	Kromatografi pertukaran anion DEAE	9,62	31	
Hati domba ( <i>Ovis aries</i> )	Ekstraksi n-Butanol	0,11	100	[26]
	Fraksi aseton	0,13	80,4	
	Fraksi DEAE-selulosa	0,55	47,7	
	Fraksi Sephacryl S-3000	3,5	24,1	



Gambar 4. Kromatogram TLC khas hipoxantin, xantin, dan asam urat [28].

### PEMANFAATAN XANTIN OKSIDASE

Xantin oksidase menjadi salah satu enzim yang menarik untuk diisolasi karena memiliki peran utama dalam katabolisme purin dan beberapa senyawa heterosiklik lainnya dengan atom karbon hibridisasi  $sp^2$  seperti aldehida. Selain itu, xantin oksidase terlibat sebagai enzim oksidatif yang menghasilkan radikal superoksida dan molekul hidrogen peroksida. Sehingga xantin oksidase berpotensi diaplikasikan dalam enam bidang seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5, antara lain: 1) treatment obat metabolisme senyawa heterosiklik seperti kafein dan hipoxantin, 2) industri produksi obat analog nukleosida dengan menghilangkan reaksi samping dan produk samping, 3) deteksi serta diagnosis purin dan enzim terkait purin dalam klinis, makanan, dan lingkungan, 4) bioremediasi, degradasi senyawa heterosiklik yang berbahaya, 5) penyiapan makanan rendah purin pada industri makanan sehat [35, 36].

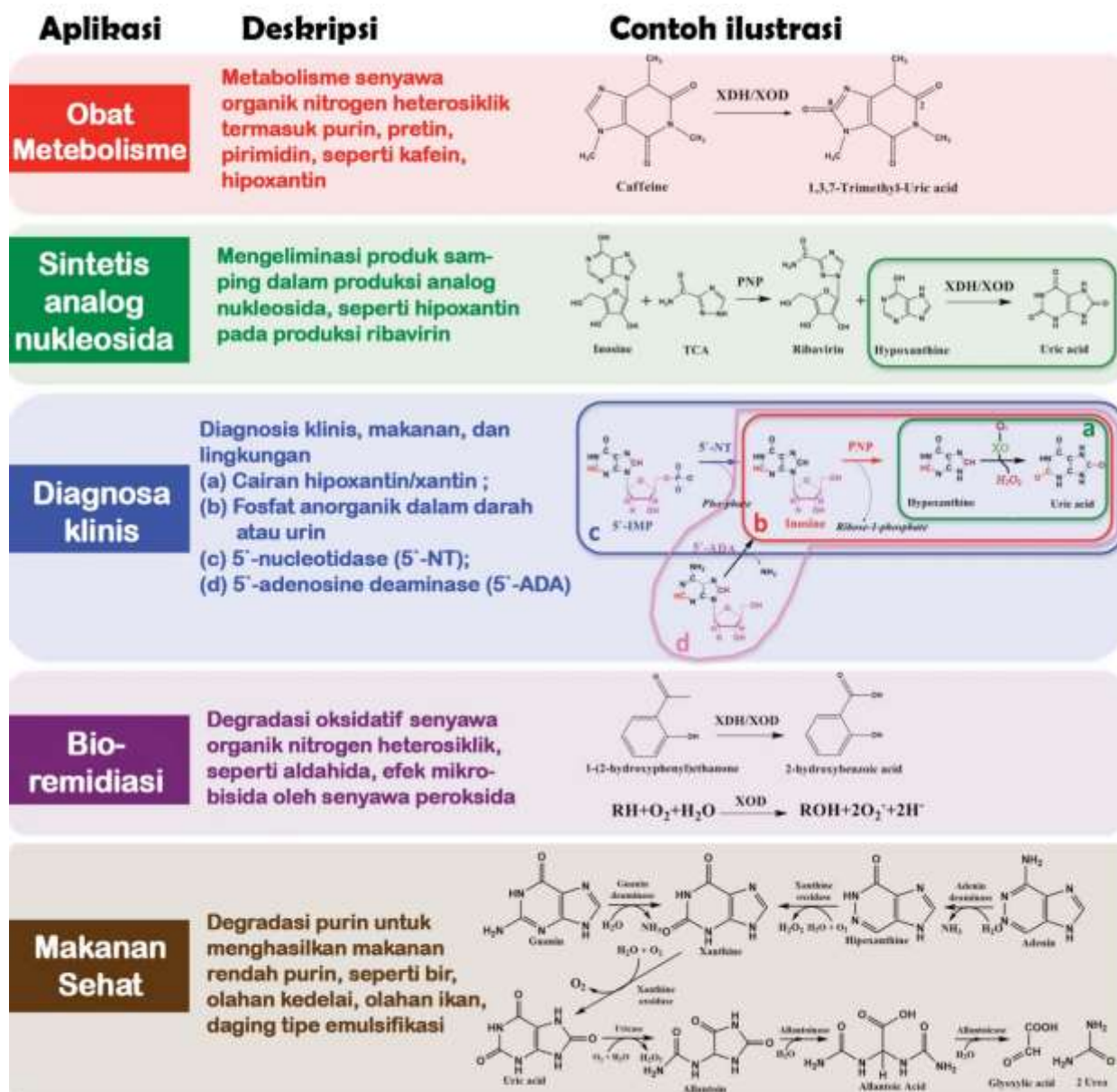
Pengaplikasian xantin oksidase yang sangat penting dari keenam aplikasi diatas yaitu produksi obat analog nukleosida anti-virus yaitu ribavirin dengan metode bioenzimatik [37]. Pada proses produksinya, xantin oksidase mampu menghilangkan produk samping berupa hipoxantin pada waktu yang tepat sehingga menggeser kesetimbangan reaksi ke arah produk ribavin, dengan demikian dapat meningkatkan produktivitas [38, 39]. Aplikasi xantin oksidase penting lainnya yaitu pengujian klinis secara

enzimatik untuk menemukan tanda-tanda berbagai penyakit yang terkait dengan asam urat yaitu dengan deteksi kandungan xantin dan hipoxantin dalam cairan tubuh, serta tanda-tanda penyakit lainnya dengan deteksi fosfat anorganik, 5'-nucleotidase, dan adenosin deaminase [35, 36].

Selain itu, xantin oksidase banyak diaplikasikan sebagai komponen utama dari berbagai kit dalam bidang medis ataupun farmasi. Dilaporkan bahwa *Bovine Milk Xanthine Oxidase* (BMXO) telah diaplikasikan sebagai komponen utama dalam kit diagnosa superoksida dimutase (SOD), dimana kit ini mampu melakukan diagnosa, pemantauan, dan pengobatan stres oksidatif pada organ tubuh [4]. Pada prinsipnya aktivitas SOD dapat diukur berdasarkan laju penghambatan reduksi *ferricytochrome C* oleh anion superoksida yang dihasilkan oleh rekasi dari xantin dengan xantin oksidase [40]. Trabsa *et al*, (2015) juga telah mengaplikasikan BMXO sebagai kit dalam mempelajari efek hipourikemik dari ekstrak tanaman herbal untuk penanganan kondisi hiperuriskemia. Sehingga diharapkan dapat memperoleh suatu obat herbal yang mampu menghambat xantin oksidase. Dilaporkan bahwa ekstrak *Lycium arabicum* merupakan salah ekstrak tanaman yang menunjukan penghambatan kuat terhadap BMXO sehingga memiliki efek penurunan yang signifikan pada kadar serum dan kreatinin hati serta urea pad tikus hiperuriskemia [41].

Xantin oksidase juga telah banyak diaplikasikan dalam biosensor xantin sebagai perangkat analisis kuantitatif secara cepat pada xantin dalam sampel nyata [42]. Dimana xantin merupakan indikator pertama profil purin abnormal dan dapat berfungsi sebagai penanda berbagai penyakit [43]. Penentuan kadar xantin dalam serum dan urin sangat diperlukan dalam proses diagnosa dan manajemen medis hiperuriskemia, gout, xanthinuria, penyakit otot, gangguan hati, batu ginjal serta gagal ginjal. Biosensor xantin menggunakan xantin oksidase banyak dipilih dibanding menggunakan berbagai metode lainnya, hal ini dikarenakan lebih sederhana dan cepat serta biaya rendah dan perlengkapan yang relatif ekonomis [42]. Xantin oksidase juga telah diimobilisasi ke berbagai media pendukung guna mempertahankan aktivitas katalitiknya sehingga dapat digunakan secara berkelanjutan





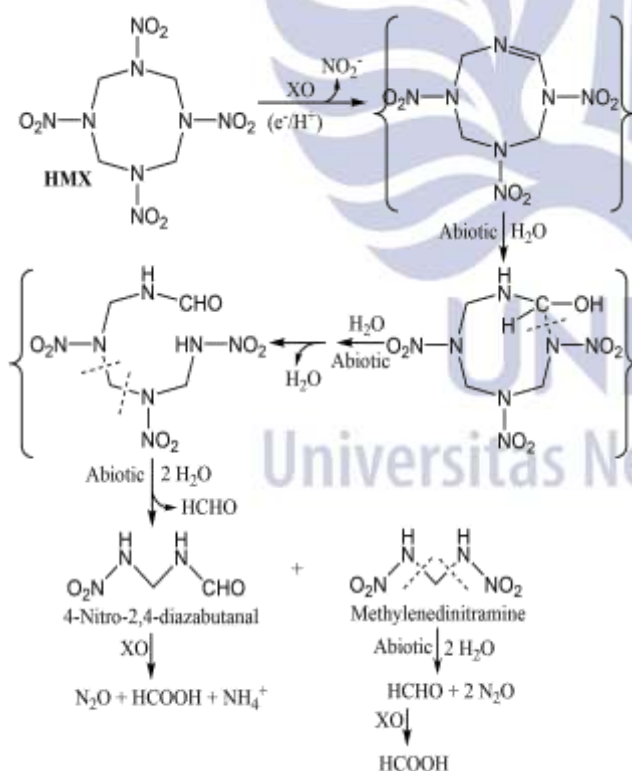
Gambar 5. Lima potensial aplikasi enzim xantin oksidase, 1) treatment obat metabolisme senyawa heterosiklik, 2) industri produksi obat analog nukleosida, 3) deteksi serta diagnosis purin dan enzim terkait purin dalam klinis, makanan, dan lingkungan, 4) bioremediasi, 5) penyiapan makanan rendah purin pada industri makanan sehat [35, 36].

Xantin oksidase yang telah diimmobilisasi juga banyak diaplikasikan sebagai biosensor hipoxantin. Dimana dalam degradasi adenin pada bahan biologis, ATP akan terdegradasi menjadi ADP, IMP, inosin, yang kemudian ditransformasikan menjadi hipoxantin. Sehingga hipoxantin dapat terakumulasi dalam jaringan biologis. Akibatnya kadar hipoxantin sering dijadikan sebagai indeks kesegaran daging dalam industri makanan dan indeks patologi beberapa proses dalam tubuh manusia [44]. Selain itu, hipoxantin juga bertanggung jawab atas hilangnya

rasa enak dan menimbulkan bau amis yang tidak menyenangkan. Dengan demikian, biosensor hipoxantin pada ikan atau hewan yang mati, mampu untuk memprediksi waktu kematian serta akumulasi inosin, hipoxantin dan xantin dari waktu ke waktu dapat digunakan untuk menilai kesegaran ikan [45].

Xantin oksidase juga berpotensi dimanfaatkan sebagai bioremediasi berbagai senyawa heterosiklik yang berbahaya salah satunya yaitu (HMX). HMX merupakan bahan kimia peledak yang banyak digunakan untuk

keperluan militer maupun komersial. Pembuatan, penggunaan, serta pembuangan bahan kimia peledak sekala dapat mengakibatkan pencemaran lingkungan yang sangat mengkhawatirkan. HMX diketahui beracun bagi sistem biologis dan kesehatan makhluk hidup [46]. Pada tahun 2003 Bushan *et al* memberikan bukti bahwa dalam kondisi anaerob xantin oksidase mampu mengkatalisis HMX menjadi turunannya. Dalam kondisi anaerob, xantin oksidase mampu mengkatalisis HMX dengan mentransfer satu elektronnya yang kemudian senyawa turunan pertama yang tidak stabil mengalami dekomposisi hidrolitik membentuk senyawa turunan kedua, kemudian diikuti pembelahan cincin membentuk senyawa turunan ketiga. Senyawa turunan ketiga secara spontan mengalami hidrolisis menghasilkan NDAB dan MDNA. NDAB akan dibiotransformasi oleh xantin oksidase menjadi produknya ( $N_2O$ ,  $HCOOH$ ,  $NH_4^+$ ), sedangkan MDNA secara abiotik didekomposisi menjadi  $N_2O$  dan  $HCHO$ , selanjutnya  $HCHO$  akan dioksidasi oleh xantin oksidase menjadi  $HCOOH$  [47]. Skema reaksi biotransformasi ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Skema reaksi biotransformasi HMX oleh enzim xantin oksidase [47].

Dalam beberapa tahun terakhir, pengaplikasian xantin oksidase dalam penyiapan makanan sehat rendah purin banyak dipelajari. Dimana diet makanan rendah purin memiliki efek yang baik pada peningkatan resimen pasien asam urat serta mampu mengurangi kadar asam urat darah [48]. Pada kasus ini, Hu you *et al* pada tahun 2015 mampu mendegradasi basis purin jamur untuk menghasilkan cuka jamur yang dapat dikonsumsi dengan kadar purin rendah, kaya asam amino dan vitamin D dengan memanfaatkan xantin oksidase yang berasal dari *Arthobacter sp.* ATCC21606. Penghancur ultrasonik digunakan untuk meyiapkan cairan penghancur jamur yang sepenuhnya memisahkan asam nukleat dan protein untuk memudahkan degradasi asam nukleat. Pada saat yang sama *Arthobacter* ATCC21606 melepaskan xantin oksidase endogennya degradasi berbasis purin (adenin, guanin, hipoxantin, xantin) dengan aktivitas yang tinggi secara penuh [49]

## KESIMPULAN

Enzim xantin oksidase dapat diproduksi dari berbagai sumber baik dari jaringan makhluk hidup seperti hati dan susu maupun dari mikroorganisme yang didapatkan dari berbagai tempat di lingkungan air maupun tanah. Manfaat dari xantin oksidase telah menunjukkan banyak perkembangan baik dibidang metabolisme obat, industri biosintesis analog nukleosida, diagnosa klinis, bioremediasi, serta produksi makanan sehat rendah purin. Penelitian lebih lanjut terkait enzim xantin oksidase masih diperlukan dalam mengatasi aktivitas enzim yang relatif rendah dan produksi enzim yang rumit serta pengaplikasian enzim. Untuk itu produksi enzim xantin oksidase perlu dilakukan optimasi sehingga dapat diaplikasikan pada industri secara maksimal

## DAFTAR PUSTAKA

- Umamaheswari, M., Madaswaran, A., Asokkumar, K., Sivashanmugam, T., Subhadradevi, V., and Jagannath, P. (2011), Study of Potential Xanthine Oxidase Inhibitors: *In silico* and *in vitro* biological activity, *Bangladesh J. Pharmacol.*, 6, 117-123.
- Pertamawati dan Mutia, H. (2015), Uji Penghambatan Aktivitas Enzim Xantin Oksidase terhadap Ekstrak Kulit Kayu Secang

- (*Caesalpinia sappan* L.), *Kartika-Jurnal Ilmiah Farmasi.*, 3, 12-17.
- Kelley, E. E., Khoo, N. K., Hundley, N. J., Malik, U. Z., Free, B. A., and Tarpey, M. M. (2010), Hydrogen Peroxide is the Major Oxidant Product of Xanthine, *Free Radical Biology & Medicine.*, 48, 493-498.
  - Masoud, H. M. M., Darwish, D. A., Abdel-Monsef, M. M., Helmy, M. S., and Ibrahim, M. A. (2017), Xanthine Oxidase from Milk of the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*): Purification, Characterization and Application in SOD Assay Diagnostic Kit, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.*, 8, 1735-1744.
  - Sachidanandam, K., Fagan, S. C., and Ergul, A. (2006), Oxidative Stress and Cardiovascular Disease: Antioxidants and Unresolved Issues, *Cardiovascular Drug Reviews.*, 23, 115-132
  - Devi, R., Thakur, M., and Pundir, C. S. (2011), Construction and Application of an Amperometric Xanthine Biosensor Based on Zinc Oxide Nanoparticles-Polypyrrole Composite Film, *Biosensors and Bioelectronics.* 26, 3420-3426.
  - Xin, Y., Yang, H., Xia, X., Zhang, L., Zhang, Y., Cheng, C., Wang, W. (2012), Expression, purification and partial characterization of a xanthine oxidase (XOD) in *Arthrobacter* sp. *Process Biochemistry*, 47, 1539-1544.
  - Martin, H.M., Hancock, J.T., Salisbury, V., Harrison, R. (2004), Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent, *Infect Immun*, 72, 4933-9.
  - Jadhao, S., N., Bhise, and C., Khobragade. (2018), Isolation and Purification of Xanthine Oxidase from Discarded Fish Liver (*Notopterus Kipirat*): An Easy Source of Enzyme, *Jurnal of Food Technology and Food Chemistry*, 1, 1-6.
  - Lu, J-M., Yao, Q., Chen, C. (2013), 3, 4-Dihydroxy-5-nitrobenzaldehyde (DHNB) is a Potent Inhibitor of Xanthine Oxidase: a potential therapeutic agent for treatment of hyperuricemia and gout, *Biochemical Pharmacology*.
  - Kostić, D.A., Dimitrijević, D.S., Stojanović, G.S., Palić, I.R., Đorđević, A.S., and Ickovski, J.D. (2015), Xanthine Oxidase: Isolation, Assays of Activity, and Inhibition. *Journal of Chemistry*. 2015, 1-8.
  - Flemmig, J., Kuchta, K., Arnhold, J., and Rauwald, H.W. (2011), Olea europaea leaf (Ph.Eur.) extract as well as several of its isolated phenolics inhibit the gout-related enzyme xanthine oxidase, *Phytomedicine*, 18, 561-566.
  - Enroth, C., Eger, B. T., Okamoto, K., Nishino, T., Nishino, T., and Pai, E. F. (2000), Crystal Structures of Bovine Milk Xanthine Dehydrogenase and Xanthine Oxidase: Structure-Based Mechanism of Conversion, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 10723-10728.
  - Cao, H., Pauff, J.M., and Hille, R. (2014), X-ray Crystal Structure of a Xanthine Oxidase Complex with the Flavonoid Inhibitor Quercetin, *J. Nat. Prod.*, 77, 1693-1699.
  - Hille, R., Hall, J., and Basu, P. (2014), The Mononuclear Molybdenum Enzymes, *Chem. Rev.*, 114, 3963-4038.
  - Stein, B.W. and Kirk, M.L. (2014), Electronic structure contributions to reactivity in xanthine oxidase family enzymes, *J Biol Inorg Chem.*, 20, 183-194.
  - Kadam, R. S., and Iyer, K. R. (2007), Isolation of Different Animal Liver Xanthine Containing Fraction and Determination of Kinetic Parameter for Xanthine, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69, 41-45.
  - Zhang, Y., Xin, Y., Yang, H., Zhang, L., Xia, X., Tong, Y., Chen, Y., Ma, L., Wang, W. (2012), Novel affinity purification of xanthine oxidase from *Arthrobacter* M3, *Journal of Chromatography*, 906, 19-24.
  - Zhang, Y., Xin, Y., Yang, H., Zhang, L., Xia, X., Tong, Y., Chen, Y., Ma, L., Wang, W. (2014), Thermal inactivation of xanthine oxidase from *Arthrobacter* M3: mechanism and the corresponding thermostabilization strategy, *Bioprocess Biosyst Eng*, 37, 719-725.
  - Monika, Sharma, N.K., Thakur, N., Sheetal, Savitri, Bhalla, T.C. (2019), Xanthine oxidase of *Acinetobacter calcoaceticus* RL2-M4: Production, purification and characterization, *Protein Expression and Purification*, 160, 36-44.
  - Sharma, N.K., Shikha Thakur, S., Neerja Thakur, N., Savitri, Bhalla, T.C. (2015), Thermostable Xanthine Oxidase Activity from *Bacillus pumilus* RL-2d Isolated from

- Manikaran Thermal Spring: Production and Characterization, *Indian J Microbiol.*
22. Chen Y., Li Y., Chao H., Wu J., Zhu W., Fang T., Gao X., and Yan D. (2019), Molecular cloning and characterisation of a novel xanthine oxidase from *Cellulosimicrobium cellulans* ATCC21606, *Process Biochemistry.*
  23. Beyaztaş, S., and Arslan, O. (2014) Purification of Xanthine Oxidase from Bovine Milk by Affinity Chromatography with a Novel Gel, *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*, 30, 442-447.
  24. Nile, S.H., Keum, Y.S., Nile, A.S., Kwon, Y.D., Kim, D.H. (2017), Potential cow milk xanthine oxidase inhibitory and antioxidant activity of selected phenolic acid derivatives. *J Biochem Mol Toxicol.* 00, e22005.
  25. Ibrahim, M.A., Masoud, H.M.M., Darwish D.A., Esa S.S., Zaahkook S.A.M. (2015), Purification and characterization of xanthine oxidase from liver of the water buffalo *Bubalus bubalis*. *J App Pharm Sci*, 5, 063-068.
  26. Zaahkook, S.A.M., Darwish, D.A., Masoud, H.M.M., Monsef, M.M.A., Helmy, M.S., Esa, S.S., Ghazy, A.H.M., Ibrahim, M.A. (2019), Purification and Characterization of Xanthine Oxidase from Liver of the Sheep (*Ovis Aries*), *Journal of Antioxidant Activity*, 1, 8-18.
  27. Agarwal, A. & Banerjee, U.C (2009), Screening of Xanthine Oxidase Producing Microorganisms Using Nitroblu Tetrazolium Based Colorimetric Assay Method, *The Open Biotechnology Journal*, 3, 46-49.
  28. Shintani, H. (2013), Determination of Xanthine Oxidase, *Pharmaceutica Analytica Acta*, 87, 1-2.
  29. Iswantini, D., Darusman, L. K., Hidayat, R. (2009), Indonesian sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) as antioxidant and inhibition kinetics of flavonoids crude extract on the activity of xanthine oxidase, *Journal of Biological Science*. 5, pp 504-508.
  30. Khairunnisa (2013), *Aktivitas Inhibisi Xanthine Oksidase oleh Ekstrak Air dan Etanol Anting - Anting (Acalypha Indica L.)*. Skripsi tidak diterbitkan: PPs Institut Pertanian Bogor.
  31. Beckman, J.S., Parks, D.A., Pearson, J.D., Marshall, P.A., Freeman, B.A. (1989), A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues, *Free Radic Biol Med*, 6, 607-615.
  32. Amundson, D.M., Zhou, M. (1999), Fluorometric method for the enzymatic determination of cholesterol, *J. Biochem. Biophys. Meth*, 38, 43-52.
  33. Cyman cham. (2016). *Xanthine Oxidase Fluorometric Assay kit* (Online), diunduh dari: [https://www.caymanchem.com/pdfs/1001089\\_5.pdf](https://www.caymanchem.com/pdfs/1001089_5.pdf)
  34. Maia, L. & Mira, L. (2002), Xanthine Oxidase and Aldehyde Oxidase: A Simple Procedure for the Simultaneous Purification from Rat Liver, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1, 48-53.
  35. Wang, C.H., Zhang, C., Xing, X.H. (2016), Xanthine dehydrogenase: An old enzyme with new knowledge and prospects, *Bioengineered*, 6, 395-405.
  36. Wang, C.H., Xing, X.H. (2017), Research progress and development prospects of xanthine oxidase, *Guangxi Sciences*, 1, 15-24.
  37. World-Health-Organization. (2013), *WHO model list of essential medicines 18th list* (Online), diunduh dari: <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>
  38. Hori, N., Uehara, K., Mikami, Y. (1991), Effects of xanthine oxidase on synthesis of 5-methyluridine by the ribosyl transfer reaction, *Agric Biol Chem*, 4, 1071-1074.
  39. Meng, J.H., Chen, W.M. (1999), Using xanthine oxidase to improve the productivity of Ribavirin, *Journal of Wuhan University: Natural Science Edition*, 6, 838-840.
  40. McCord, J. M., and Irwin, F. (1969), Superoxide Dismutase: An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocytin), *The Journal of Biological Chemistry*, 22, 649-6055.
  41. Trabsa, H., Baghiani, A., Boussoualim, N., Krache, I., Khennou, S., Charef, N., Arrar, L. (2015), Kinetics of inhibition of xanthine oxidase by *Lycium arabicum* and its protective effect against oxonate-induced hyperuricemia and renal dysfunction in mice, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2, 249-256.
  42. Pundir, C.S., Devi, R. (2014), Biosensing methods for xanthine determination: A review, *eEnzyme and Microbial Technology*, 57, 55-62.
  43. Kalimuthu, P., Leimkuehler, S. Bernhardt, Paul. (2012). A Low Potential Amperometric

- Enzyme Biosensor for Xanthine and Hypoxanthine. *Analytical chemistry*. 84.
44. Van Raemdonck, D. E. M., Jannis, N. C. P., Rega, F. R. L., De Leyn, P. R. J., Flameng, W. J., Lerut, T. E. (1996), Delay of adenosine triphosphate depletion and hypoxanthine formation in rabbit lung after death. *Annals of Thoracic Surgery*, 62, 233.
  45. Lawal, A.T., Adeloju, S.B. (2012), Mediated xanthine oxidase potentiometric biosensors for hypoxanthine based on ferrocene carboxylic acid modified electrode, *Food Chemistry*, 135, 2982-2987.
  46. P. Gong, J. Hawari, S. Thiboutot, G. Ampleman, G.I. Sunahara, (2002), Toxicity of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) to soil microbes, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 97-103
  47. Bhushan, B., Paquet, L., Halasz, A., Spain, J.C., Harawi, J. (2003), Mechanism of xanthine oxiase catalyzed biotransformation of HMX under anaerobic conditions, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306, 509-515.
  48. Lu, W., Zhan, Y.Y., Qui, X.P. (2010), Observation on therapeutic effect of reasonable diet and gout patients. *The Chinese and Foreign Health Abstract*, 27, 27-28.
  49. Hu, Y., Wang, C., Xu, N., *et al*, (2015) A method for preparing edible fungus vinegar whit low purine, rich in amino acid and vitamin D, Google patents CN201510616009x.

