

## AKTIVITAS URIKASE YANG DIHASILKAN DARI BERBAGAI SEL *Lactobacillus plantarum* DAN PARAMETER KINETIKANYA

### (URICASE ACTIVITY AND DETERMINATION OF KINETICS PARAMETER OF VARIOUS CELLS OF *Lactobacillus plantarum*)

Dyah Iswantini<sup>1,\*</sup>, Novik Nurhidayat<sup>2</sup>, Trivadila<sup>1</sup>, Eka Mardiah<sup>1</sup>

#### ABSTRACT

Uric acid concentration could be determined by spectrophotometry method. Uric acid was oxidized into allantoin in the presence of uricase and calculated by measuring the decrease of uric acid absorbance at 293 nm. These uricase were obtained from cells of *Lactobacillus plantarum*. *L. plantarum* K. Mar. E was isolated from passion fruit skin and *L. plantarum* Mgs. Psmb and Mgs. Bst from mangosteen. This research was conducted to observe the activity and kinetics of uricase from various cells of *L. plantarum* by spectrophotometric method. The plate assay method indicated that *L. plantarum* produced uricase, based on the clear zone about 0,2 mm on glucose yeast peptone medium contained 0,2% uric acid. The optimum condition of uricase activity from the three different sources occurred in physiological condition. Uricase activity generated from cells of *L. plantarum* K. Mar. E, Mgs. Psmb, and Mgs. Bst were 0,1073; 0,0867; and 0,0842 U/mL, respectively. The kinetic parameters for uricase, determined with uric acid as the substrate.  $V_{max}$  produced by *L. plantarum* K. Mar. E, Mgs. Psmb, and Mgs. Bst were 1,3635; 0,0316; and 0,0418 U/mL of bacterial culture, respectively and  $K_M$  0,1541; 0,0061; and 0,0054 mM, respectively. Uricase activity in various bacterial cells of *L. plantarum* was stable until the second day.

**Keywords:** Activity, uricase, spectrophotometry, kinetics, *Lactobacillus plantarum* cells.

#### ABSTRAK

Penentuan kadar asam urat dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 293 nm dengan adanya menggunakan enzim urikase yang dapat mengoksidasikan asam urat menjadi allantoin. Penelitian ini bertujuan menentukan aktivitas dan mempelajari kinetika urikase yang dihasilkan oleh berbagai sel bakteri *L. plantarum* dengan metode spektrofotometri, serta mempelajari kestabilannya. Urिकase yang digunakan diperoleh dari sel bakteri *Lactobacillus plantarum* K. Mar. E yang diisolasi dari kulit markisa dan *L. plantarum* Mgs. Psmb dan Mgs. Bst dari manggis. Kemampuan *L. plantarum* dalam mendegradasi asam urat secara kualitatif terlihat dari zona bening yang terbentuk setelah lima hari dengan diameter 0,2 mm pada media pepton ragi glukosa yang mengandung 0,2% asam urat. Kondisi optimum urikase yang dihasilkan dari ketiga sel *L. plantarum* terjadi pada kondisi fisiologis. Aktivitas urikase yang dihasilkan dari sel *L. plantarum* K. Mar. E, Mgs. Psmb, dan Mgs. Bst masing-masing sebesar 0,1073; 0,0867; dan 0,0842 U/mL. Parameter kinetika urikase ditentukan dengan menggunakan asam urat sebagai substrat.  $V_{maks}$  yang dihasilkan *L. plantarum* K. Mar. E, Mgs. Psmb, dan Mgs. Bst masing-masing sebesar 1,3635; 0,0316; dan 0,0418 U/mL kultur bakteri dan  $K_M$  masing-masing sebesar 0,1541; 0,0061; dan 0,0054 mM. Aktivitas urikase pada berbagai sel bakteri *L. plantarum* stabil sampai hari kedua.

**Kata kunci:** Aktivitas, urikase, spektrofotometri, kinetika, Sel *Lactobacillus plantarum*.

#### PENDAHULUAN

Asam urat merupakan produk akhir dari turunan purin pada metabolisme manusia yang berada dalam darah dan urin. Pengujian asam urat dalam darah dan urin menjadi sangat penting karena dapat digunakan sebagai indikator yang kuat pada tanda-tanda penyakit ginjal. Ketidaknormalan konsentrasi asam urat dalam tubuh akan menyebabkan beberapa penyakit, di antaranya

<sup>1</sup>) Dep. Kimia Fakultras Matematika dan IPA, Institut Pertanian Bogor.

<sup>2</sup>) Divisi Mikrobiologi R&D Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor.

\* Penulis korespondensi: dyahprado@yahoo.co.id

hiperurisemia, sindrom Lesch-Nyhan, gout, dan penyakit gagal ginjal (Luo *et al.*, 2006). Pengujian asam urat dalam cairan tubuh secara klinis dilakukan dengan mengambil dan memeriksa darah di laboratorium dengan metode spektrofotometri. Asam urat, ditentukan dengan mengukur penurunan serapan pada panjang gelombang 290 nm pada hasil oksidasi asam urat menjadi alantoin dengan adanya urikase.

Metode spektrofotometri UV ini telah dimanfaatkan oleh Liao *et al.*, (2006) untuk mengevaluasi kinetika urikase dalam pengujian asam urat dalam serum. Karakter enzim yang perlu dipelajari dalam kinetika enzim di antaranya yaitu  $K_M$  dan  $V_{maks}$  melalui persamaan Michaelis-Menten. Penggunaan enzim murni dalam pengujian dinilai kurang efisien karena sangat mahal dan stabilitasnya rendah. Oleh karena itu, digunakanlah mikroba penghasil urikase sebagai komponen pengenalan hayati untuk mengukur kadar asam urat. Keuntungan lainnya penggunaan mikroba ialah waktu hidup lebih lama, toleran pada pH, dan mudah dimurnikan.

Pemanfaatan mikroba sebagai pengganti enzim murni juga pernah dilakukan oleh Iswantini *et al.*, (1998) pada penentuan aktivitas enzim glukosa dehidrogenase (GDH) secara elektrokimia sebagai biosensor glukosa. Mikrob yang digunakan ialah *Escherichia coli*. GDH yang dihasilkan *E. coli* berada dalam bentuk apo-GDH (enzim yang belum aktif) dan tidak memiliki kemampuan untuk menghasilkan pirolokuinolin kuinon (PQQ). Pada tahun 2000, Iswantini *et al.*, menguji aktivitas katalitik dari sel *E. coli* tersebut dengan holoenzim yang dicirikan oleh persamaan Michaelis-Menten.

Beberapa mikroba yang mampu menghasilkan urikase di antaranya *Bacillus fastidiosus* (Mahler, 1970), *Microbacterium* sp. (Zhou *et al.*, 2005), *Pseudomonas aeruginosa* (Abdel-Fattah, 2005), dan *B. thermocatenuatus* (Lotfy, 2007). Aktivitas urikase yang dihasilkan mikroba-mikroba tersebut pada umumnya diukur dengan menggunakan metode spektrofotometri.

Mikroba yang digunakan pada penelitian ini adalah *Lactobacillus plantarum* yang belum diketahui aktivitasnya pada uricase. Namun diharapkan dapat menghasilkan aktivitas yang lebih besar dan tahan lama. Mikroba tersebut dipilih karena mudah diperoleh dan bermanfaat sebagai probiotik yang dapat mencegah penyakit pada manusia dan hewan.

Penelitian ini bertujuan menentukan aktivitas dan mempelajari kinetika uricase yang dihasilkan oleh berbagai sel bakteri *L. plantarum* dengan metode spektrofotometri, serta mempelajari kestabilannya. Selanjutnya penelitian ini diharapkan dapat

bermanfaat untuk aplikasi biosensor asam urat dengan metode elektrokimia.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah urikase murni (EC 1.7.3.3 dari *Arthrobacter globiformis* diperoleh dari Sigma Aldrich), sel *L. plantarum* Mgs. Psmb diisolasi dari manggis yang berasal dari Medan, *L. plantarum* K. Mar. E diisolasi dari kulit markisa yang berasal dari Medan dan *L. plantarum* Mgs. Bst diisolasi dari manggis yang berasal dari Brastagi (ketiga sel tersebut merupakan koleksi Laboratorium Genetik, Mikrobiologi, Puslit Biologi, LIPI).

### Metode

#### Uji Aktivitas Urikase Secara Kualitatif

Sebanyak satu ose bakteri yang ditumbuhkan pada media GYP dipindahkan ke media GYP yang mengandung 0,2% asam urat. Apabila bakteri mempunyai aktivitas urikase maka akan terlihat zona bening di sekitar koloni bakteri yang telah mendegradasi  $\text{CaCO}_3$ . Zona bening tersebut akan terlihat setelah lima hari inkubasi pada suhu 37°C.

#### Penumbuhan dan Panen Mikroba

Inokulum digoreskan pada permukaan media GYP dalam cawan petri dengan jarum pindah (lup inokulasi). Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari. Bakteri yang tumbuh selanjutnya ditanam ke dalam 10 mL media GYP cair sebagai *strarter* dan diinkubasi hingga mencapai nilai  $\text{OD}_{600}=1$ . Sebanyak 0,5 mL *starter* diinokulasi ke dalam 50 mL media GYP dan diinkubasi. Sel bakteri dipanen dengan sentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm (8000× *g*) selama 15 menit. Pelet dipisahkan dari supernatan, lalu dicuci dua kali dengan air distilata dan diresuspensi dengan NaCl 0,85%.

#### Pengukuran Spektrofotometri (Bergmeyer *et al.*, 1974)

Sebanyak 0,02 mL suspensi bakteri ( $\text{OD}$  *L. plantarum* Mgs. Psmb = 1,099; *L. Plantarum* K. Mar E = 0,999; *L. plantarum* Mgs. Bst = 0,999) ditambahkan ke dalam 3,09 mL bufer borat pH 8 dan 0,01 mL asam urat 3,57 mM, kemudian diinkubasi selama 5 menit. Untuk larutan blangko, 0,02 mL suspensi bakteri diganti dengan 0,02 mL bufer borat.

Selanjutnya penurunan nilai serapan diukur pada panjang gelombang 293 nm.

**Perhitungan Aktivitas Urikase**

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = \frac{\Delta A \times 3,12}{12,6 \times 0,02 \times t}$$

Keterangan:

- $\Delta A$  =  $A_{\text{blanko}} - A_{\text{contoh}}$
- 3,12 = volum total dalam pengukuran (mL)
- 12,6 = koefisien ekstingsi asam urat pada  $\lambda_{293}$  ( $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ )
- 0,02 = volume enzim yang digunakan (mL)
- $t$  = waktu (menit)

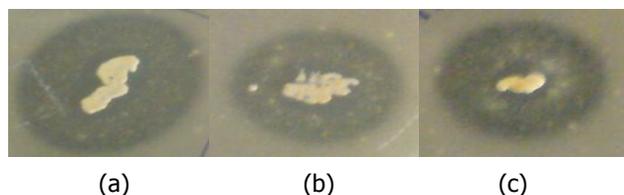
**Pengaruh pH Bufer, Suhu, dan Konsentrasi Substrat**

Pengukuran pH dilakukan pada ragam nilai pH bufer mulai dari pH 6–10 dengan interval 1 nilai pH. Pengukuran suhu dilakukan pada rentang 15–65°C dengan interval 10°C. Pengukuran konsentrasi substrat dilakukan dengan mengamati penurunan serapan asam urat pada panjang gelombang 293 nm dari konsentrasi asam urat dengan ragam 0,011–0,16 mM dalam bufer asam borat pada nilai pH optimum dan suhu ruang (25°C).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Sel Bakteri Penghasil Urikase**

Ketiga sel *L. plantarum* yang ditumbuhkan pada media GYP memiliki ciri berbentuk batang dan berkoloni. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri gram positif. Uji katalase negatif tidak menimbulkan buih ketika ditetesi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karena *L. plantarum* tidak bereaksi dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aktivitas urikase ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni dengan diameter masing-masing 0,2 cm setelah 5 hari inkubasi pada 37 °C (Gambar 1 dan Tabel 1). Zona bening di sekitar koloni bakteri menunjukkan bahwa asam urat telah didegradasi oleh urikase ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri (Azab *et al.*, 2005).



Gambar 1. Zona bening di sekitar sel (a) *L. plantarum* Mgs. Psmb (b) *L. Plantarum* K. Mar. E (c) *L. plantarum* Mgs. Bst.

Tabel 1. Hasil pengamatan zona bening di sekitar koloni terhadap waktu inkubasi pada suhu 37 °C.

Sel <i>L. plantarum</i>	Zona bening hari ke-				
	1	2	3	4	5
K. Mar E	-	-	+	+	++
Mgs. Psmb	-	-	+	+	++
Mgs. Bst	-	-	+	+	++

Keterangan:

- : tidak zona bening
- + : zona bening kecil ( $\pm 0,1$  cm)
- ++ : zona bening besar ( $\pm 0,2$  cm)

**Penentuan aktivitas urikase dengan menggunakan metode spektrofotometri**

Pengukuran aktivitas dengan metode spektrofotometri dilakukan berdasarkan penurunan serapan asam urat pada panjang gelombang 293 nm yang merupakan hasil dari oksidasi asam urat menjadi allantoin. Allantoin yang terbentuk tidak menyerap pada panjang gelombang 293 nm. Penurunan serapan pada panjang gelombang 293 nm sebanding dengan keberadaan asam urat (Trivedi *et al.*, 1978). Aktivitas urikase yang dihasilkan oleh enzim murni sebesar 1,2282 U/mL enzim dan aktivitas berbagai sel bakteri *L. plantarum* ditunjukkan pada Tabel 2. Aktivitas urikase dari sel *L. plantarum* K. Mar. E tertinggi dibandingkan dengan kedua sel lainnya.

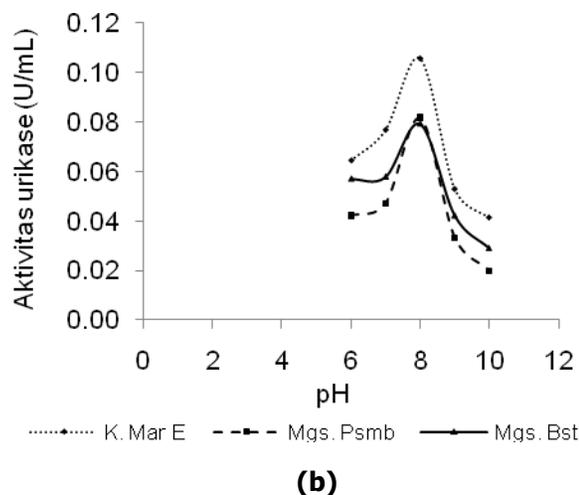
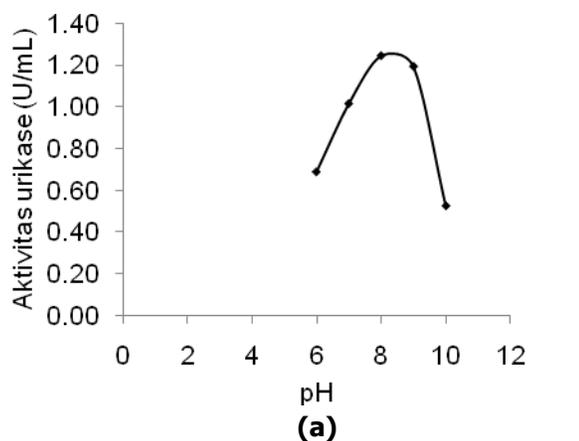
Tabel 2. ktivitas urikase yang diukur pada tiga sel *L. plantarum*

Sel <i>L. plantarum</i>	Aktivitas urikase (U/mL kultur)
K. Mar. E	0,1070
Mgs. Psmb	0,0867
Mgs. Bst	0,0842

**Penentuan pH optimum untuk menentukan aktivitas urikase**

Penentuan pH optimum pada penelitian ini ditentukan dengan menggunakan metode spektrofotometri. Kondisi pH awal diatur pada rentang 6–10 pada suhu 25 °C dengan larutan asam urat 3,57 mM. Gambar 2a memperlihatkan bahwa aktivitas urikase murni maksimum terdapat pada pH 8 dengan aktivitas sebesar 1,2455 U/mL enzim. Demikian pula aktivitas enzim yang dihasilkan dari sel *L. plantarum* K. Mar. E, *L. plantarum* Mgs. Psmb dan *L. plantarum* Mgs. Bst terjadi pada pH 8 (Gambar 2b) dengan aktivitas masing-masing sebesar 0,1007;

0,0817; dan 0,0792 U/mL kultur. Trivedi *et al.*, (1978) menyatakan bahwa pH optimum untuk urikase dengan metode spektrofotometri terjadi pada pH 7. Sementara menurut Duncan *et al.*, (1982) pH optimum urikase berada pada pH 8,5. Hasil pada penelitian ini sesuai dengan penelitian Arslan *et al.*, (2006) dan Zhang *et al.*, (2007) dengan menggunakan metode amperometri, yakni optimum pada pH 8.

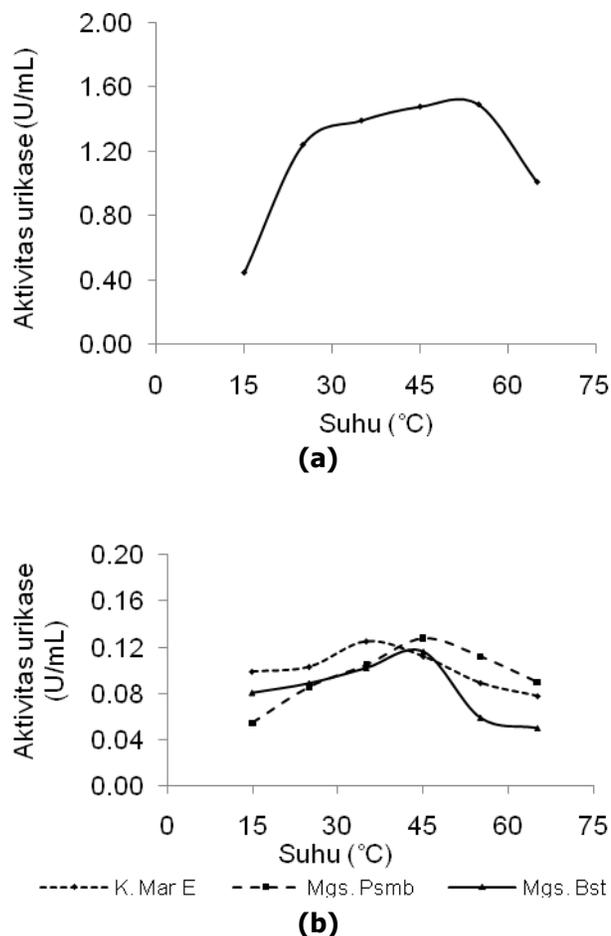


Gambar 2. Aktivitas urikase enzim murni (a) dan sel *L. plantarum* (b) pada beragam pH bufer.

### Penentuan Suhu Optimum pada pengukuran aktivitas urikase

Pengaruh suhu pada aktivitas urikase murni ditunjukkan pada Gambar 3a. Aktivitas urikase mengalami peningkatan dan mencapai optimum pada suhu 55 °C dengan aktivitas sebesar 1,4907 U/mL enzim. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Zhang *et al.*, (2006) dan Arslan (2008).

Aktivitas urikase dari mikroba berbeda dengan urikase murni. Suhu optimum sel *L. plantarum* lebih rendah, yakni suhu 35 °C untuk urikase yang dihasilkan sel K. Mar. E dengan nilai aktivitas sebesar 0,1255 U/mL kultur. Sementara sel *L. plantarum* Mgs. Psmb dan Mgs. Bst mencapai optimum pada suhu 45 °C, yakni sebesar masing-masing 0,1279 U/mL kultur dan 0,1164 U/mL kultur (Gambar 3b).



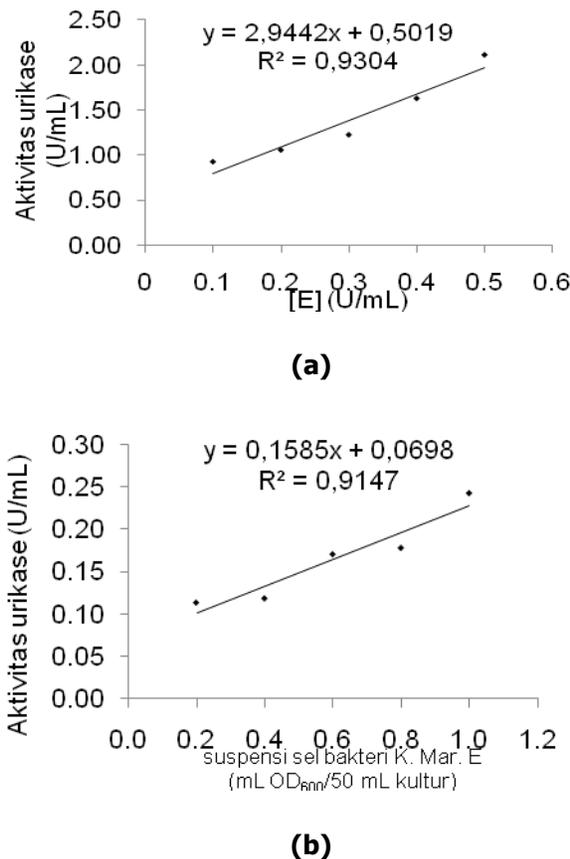
Gambar 3. Aktivitas urikase enzim murni (a) dan sel *L. plantarum* (b) pada berbagai suhu.

### Pengaruh Konsentrasi Enzim terhadap Aktivitas Urikase

Dengan enzim-enzim yang derajat kemurniannya tinggi, di dalam batas-batas tertentu, terdapat suatu hubungan linear antara konsentrasi dan aktivitas enzim (Pelczar 1988). Berdasarkan Gambar 4, konsentrasi enzim berbanding lurus dengan aktivitas enzim. Semakin tinggi konsentrasi enzim, semakin tinggi aktivitas enzim dan semakin cepat reaksi yang dikatalisis oleh enzim.

Apabila konsentrasi substrat tetap dan konsentrasi enzim turun maka kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim akan menurun karena enzim yang tersedia tidak cukup banyak untuk bereaksi dengan substrat (Murray *et al.*, 2003). Pada penelitian ini dibuat larutan enzim dengan berbagai macam konsentrasi untuk dapat membandingkan kerja enzim pada berbagai konsentrasi enzim. Enzim murni dengan konsentrasi 0,5 U/mL memiliki aktivitas tertinggi (Gambar 4a). Hal ini disebabkan karena pada konsentrasi tersebut terdapat banyak enzim yang dapat bereaksi dengan substrat.

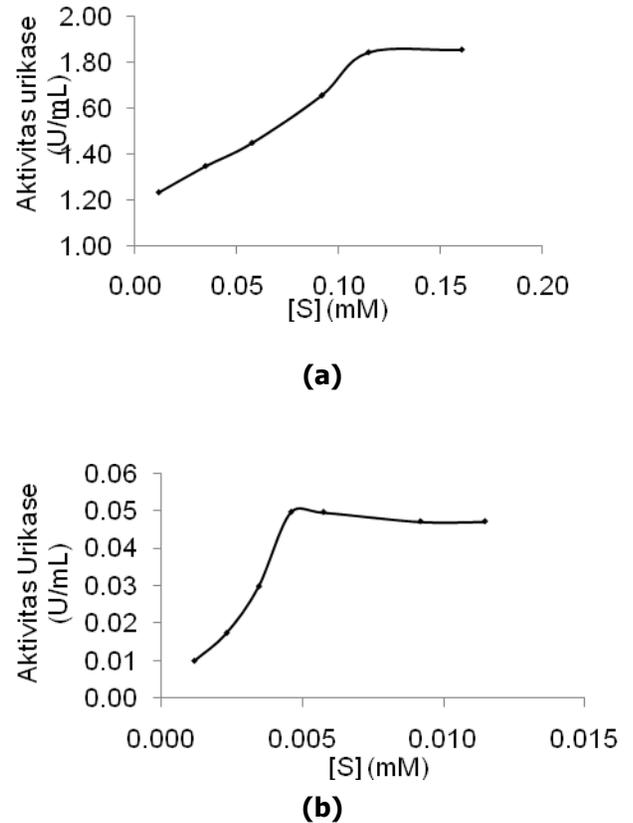
Sel bakteri dengan suspensi sebanyak 1,0 mL OD<sub>600</sub>/50 mL kultur memiliki aktivitas enzim tertinggi (Gambar 4b). Hal ini dikarenakan pada suspensi tersebut terdapat urikase yang cukup banyak untuk bereaksi dengan substrat. Akan tetapi, aktivitas urikase dari sel bakteri ini lebih rendah dibandingkan aktivitas yang diperoleh dari enzim murni. Hal ini dikarenakan jumlah urikase yang diproduksi sel bakteri *L. plantarum* sedikit.



Gambar 4. Aktivitas urikase pada beragam konsentrasi enzim murni (a) dan suspensi sel bakteri K. Mar E (b).

**Konsentrasi Optimum Substrat Asam Urat**

Penentuan pengaruh konsentrasi substrat asam urat dilakukan pada kondisi pH optimum dengan berbagai konsentrasi substrat, yakni 0,011–0,160 mM. Gambar 5 menunjukkan hubungan antara konsentrasi substrat asam urat dan aktivitas urikase. Hasil tersebut menunjukkan bahwa dengan metode ini, dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi asam urat sampai 0,1144 mM.

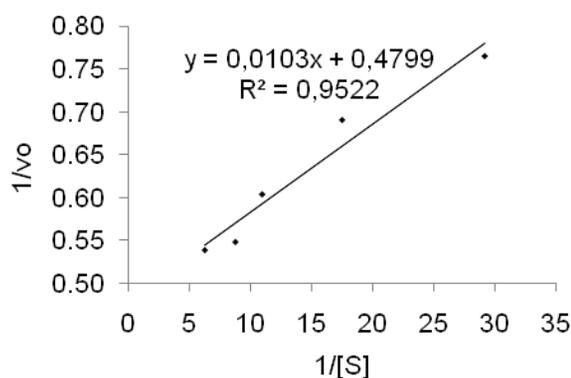


Gambar 5. Aktivitas urikase enzim murni (a) dan sel *L. plantarum* K. Mar. E (b) pada beragam konsentrasi substrat asam urat.

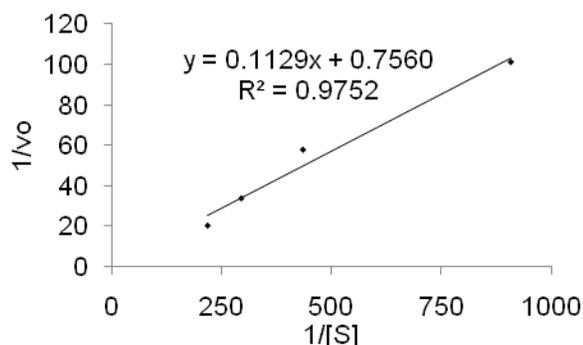
Aktivitas urikase pada sel *L. plantarum* diperoleh sekitar sepersepuluh dari enzim murni. Jadi untuk mendapatkan kondisi yang sama dengan enzim murni kemungkinan diperlukan konsentrasi substrat yang lebih kecil. Pada penelitian ini konsentrasi asam urat diperkecil menjadi 0,357 mM. Gambar 5b menunjukkan bahwa dengan urikase yang dihasilkan sel *L. plantarum* K. Mar. E dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi asam urat sampai 0,0046 mM. Demikian juga yang dihasilkan Mgs. Psmb dan Mgs. Bst. Bentuk kurva pada Gambar 5 menunjukkan aktivitas urikase menurut persamaan Michaelis-

Menten. Akan tetapi, nilai  $K_M$  dan  $V_{maks}$  sulit ditentukan dengan tepat dari kurva Michaelis-Menten. Oleh karena itu, diperlukan cara lain untuk memperoleh nilai  $K_M$  dan  $V_{maks}$  yang lebih tepat, yaitu dengan memetakan data yang sama dengan cara yang berbeda dengan memanfaatkan transformasi aljabar persamaan Lineweaver-Burk (Gambar 6).

Nilai  $K_M$  dan  $V_{maks}$  yang diperoleh berdasarkan persamaan Lineweaver-Burk (Gambar 6a) pada enzim murni sebesar 0,0283 mM dan 2,0838 U/mL. Hal tersebut memberikan arti bahwa pada enzim murni akan mencapai setengah dari kecepatan maksimumnya jika konsentrasi substrat 0,0283 mM dan kecepatan reaksi maksimumnya sebesar 2,0838 U/mL.



(a)



(b)

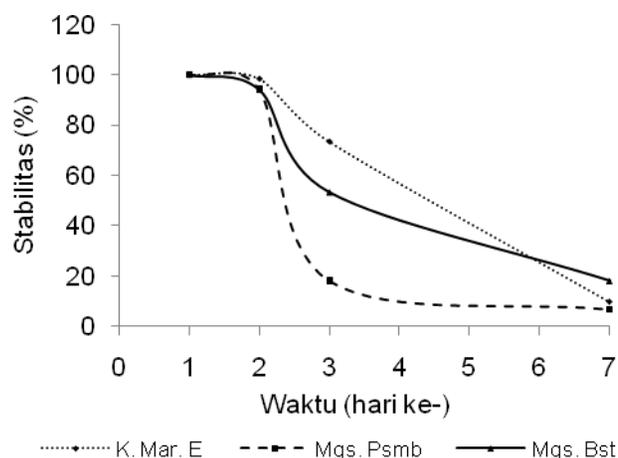
Gambar 6. Kurva Lineweaver-Burk (a) untuk enzim murni dan (b) sel *L. plantarum* K. Mar. E.

### Stabilitas Aktivitas Urikase Sel Bakteri

Pengukuran kestabilan aktivitas urikase dilakukan dengan cara menyimpan sel bakteri dalam larutan NaCl 0,85% bersuhu 4 °C selama 1, 2, 3, dan 7 hari. Gambar 7 menunjukkan perbandingan

kestabilan aktivitas urikase yang dihasilkan oleh sel bakteri sel K. Mar. E, Mgs. Psmb, dan Mgs. Bst.

Aktivitas urikase masih stabil pada hari kedua, yakni sebesar 98,39% untuk sel K. Mar. E, 94,29% untuk sel Mgs. Psmb, dan 94,12% untuk sel Mgs. Bst. Hari ketiga, kestabilan urikase yang dihasilkan sel Mgs. Psmb menurun hingga 18,10%, sedangkan untuk kedua sel lainnya aktivitas urikase masih stabil sekitar 50–70%. Setelah seminggu, aktivitas urikase yang dihasilkan sel Mgs. Bst memiliki kestabilan yang tertinggi di antara ketiga sel bakteri yakni sebesar 18,10%, sedangkan yang terendah adalah sel Mgs. Psmb.



Gambar 7. Kestabilan aktivitas urikase sel bakteri sampai hari ke-7.

Tabel 3. Data nilai  $V_{maks}$  dan  $K_M$

Sel <i>L. plantarum</i>	$V_{maks}$ (U/mL)	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (mM/menit mL OD <sub>600</sub> )
K. Mar E	1,3635	0,1541	17043,9051
Mgs. Psmb	0,0316	0,0061	263,3056
Mgs. Bst	0,0418	0,0054	523,0344

## KESIMPULAN

Aktivitas urikase tertinggi dihasilkan oleh *L. plantarum* dari sel K. Mar. E sebesar 0,1073 U/mL kultur. pH optimum untuk urikase terjadi pada pH 8. Kondisi suhu optimum untuk urikase yang dihasilkan sel K. Mar. E ialah 35 °C dan sel Mgs. Psmb dan Mgs. Bst terjadi pada suhu 45 °C. Kondisi tersebut telah sesuai dengan fisiologis tubuh. Dengan menggunakan metode spektrofotometri, dapat digunakan untuk mengukur asam urat secara *in vivo* sampai konsentrasi 0,1144 mM untuk enzim murni dan 0,0046 mM untuk sel *L. plantarum*. Nilai  $V_{maks}$  dan  $K_M$

untuk enzim murni sebesar 2,0838 U/mL enzim dan 0,0283 mM. Sementara *L. plantarum* K. Mar. E memiliki afinitas terbesar di antara ketiga sel dengan nilai  $V_{maks}$ ,  $K_M$ , dan  $k_{cat}$  sebesar 1,3635 U/mL kultur; 0,1541 mM, dan 17043,9051 mM/menit mL OD<sub>600</sub>. Aktivitas urikase pada berbagai sel bakteri *L. plantarum* umumnya stabil sampai hari kedua.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Kami ucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini melalui program Hibah Kompetensi Nomor: 219/SP2H/PP/DP2M/V/2009, tanggal 30 Mei 2009 atas nama Dr. Dyah Iswantini Pradono, M. Agr.

## DAFTAR PUSTAKA

- Azab, E.A., Ali, M.M., Farred, M.F. 2005. Studies on uricase induction in certain bacteria. *Egyptian Journal of Biology* 7:44-54.
- Bergmeyer, H.U., Gawehn, K., Grassl, M. 1974. In *Methods on Enzymatic Analysis* (Bergmeyer HU). Ed ke-2. Volume ke-1 (518). New York: Academic Pr.
- Iswantini, D., Kato, K., Kano, K., Ikeda, T. 1998. Electrochemical measurements of glucose dehydrogenase activity exhibited by *Escherichia coli* cells; effects of the additions of pyrroloquinoline quinone, magnesium or calcium ions and ethylenediaminetetracetic acid. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 46:249-254.
- Iswantini, D., Kano, K., Ikeda, T. 2000. Kinetics and thermodynamics of activation of quinoprotein glucose dehydrogenase apoenzyme *in vivo* and catalytic activity of the activated enzyme in *Escherichia coli* cells. *Biochemistry Journal* 350:917-923.
- Liao *et al.*, 2006. Evaluation of a kinetic uricase method for serum uric acid assay by predicting background serapance of uricase reaction solution with an integrated method. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 7(6):497-502.
- Luo, Y.C., Do, J.S., Liu, C.C. 2006. An amperometric uric acid biosensor based on modified Ir-C electrode. *Biosensor and Bioelectronics* 22:482-488.
- Ogawa, J. 2006. Analysis of microbial purine metabolism and its application for hyperuricemia prevention. [Noda Institute for Scientific Research GRANT]. Outline of Research Result.
- Trivedi, R.C., Rebar, L., Berta, E., Stong, L. 1978a. New ultraviolet (340 nm) methode for assay of uric acid in serum or plasma. *Clin Chem* 24(4):562-566.
- Zhang *et al.*, 2007. Development and analytical application of an uric acid biosensor using an urikase-immobilized eggshell membrane. *Biosensor and Bioelectronics* 22:1791-1797.
- Zhou, X.L., Ma, X.H., Sun, Q.Q., Li, X., Guo, K.P. 2005. Isolation of a thermostable urikase-producing bacterium and study on its enzyme production conditions. *Process Biochemistry* 40:3749-3753.