

BAB V

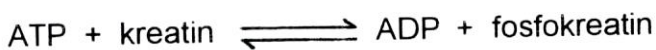
ENZIM : KINETIKA DAN INHIBISI

Enzim adalah protein khusus yang berfungsi mengkatalisis reaksi hayati secara efektif, tepat dan spesifik. Nama enzim yang berarti "di dalam ragi" mulai digunakan pada tahun 1877. Pada tahun 1897, E. Buchner berhasil mengekstraksi enzim yang mengkatalisis fermentasi alkohol dari ragi, tetapi baru pada tahun 1926, J.B. Sumner dapat mengisolasi urease dari biji buah nangka dalam bentuk kristal murni dan membuktikan bahwa enzim adalah protein. Selanjutnya dalam kurun waktu 1930 sampai 1936, J. Northrop berhasil mengkristalkan pepsin, tripsin dan kimotripsin. Sampai kini telah dikenal ribuan enzim.

Walaupun kebanyakan enzim yang berkaitan dengan metabolisme sel telah diidentifikasi, tetapi masih banyak persoalan yang perlu dipecahkan, termasuk kontrol genetik pada biosintesis enzim, pengendalian mekanisme aktivitas enzim secara molekular dan peran enzim bentuk ganda dalam perkembangan dan diferensiasi.

NOMENKLATUR DAN PENGGOLONGAN ENZIM

Nama konvensional enzim didasarkan pada nama substrat yang dikatalisisnya dengan menambahkan sufiks -ase, misalnya : urease mengkatalisis hidrolisis urea menjadi amonia dan CO₂. Arginase mengkatalisis hidrolisis arginin menjadi ornitin dan urea. Fosfatase mengkatalisis hidrolisis ester fosfat. Nomenklatur semacam ini dan nomenklatur non informatif lainnya seperti pepsin, tripsin dan katalase sekarang tidak dipakai lagi. "International Enzyme Commission" dari IUB-MB (International Union of Biochemistry Molecular Biology) menggolongkan dan menamai enzim menurut sistem baru. Sistem baru ini menggolongkan enzim menjadi 6 golongan utama dan serangkaian sub golongan, berdasarkan jenis reaksi yang dikatalisisnya (tabel 5.1). Setiap enzim diberikan satu nama rekomendasi yang pendek dan praktis untuk penggunaan sehari-hari, satu nama sistematis yang mengidentifikasi reaksi yang dikatalisisnya, dan satu nomor golongan yang dipakai apabila diperlukan identifikasi suatu enzim yang akurat, misalnya dalam majalah penelitian internasional, abstrak atau indeks. Contoh reaksi enzimatis :



Nama rekomendasi enzim, yang biasa digunakan adalah kreatin kinase, nama sistematis, berdasarkan reaksi yang dikatalisisnya adalah ATP : kreatin fosfotransferase. Nomor golongannya adalah EC.2.7.3.2, dimana EC menyatakan "Enzyme Commission", dengan digit pertama (2) menunjukkan nama golongan (transferase), digit ke dua (7) menunjukkan nama sub golongan (fosfotransferase), digit ke tiga (3) menunjukkan nama sub sub golongan (fosfotransferase dengan satu gugus nitrogen sebagai aseptor) dan digit ke empat (2) menunjukkan kreatin kinase (lihat tabel 5.1). Di sini penamaan hanya ditulis dalam dua digit, untuk penamaan empat digit dapat dilihat referensi lain.

Tabel 5.1. Penggolongan enzim menurut IUB-MB (nama golongan, kode nomor, dan jenis reaksi yang dikatalisisnya)

- 1. Oksido-reduktase (reaksi oksidasi-reduksi)**
 - 1.1. bekerja pada CH-OH
 - 1.2. bekerja pada C=O
 - 1.3. bekerja pada C=CH
 - 1.4. bekerja pada CH-NH₂
 - 1.5. bekerja pada CH-NH
 - 1.6. bekerja pada NADH ; NADPH

- 2. Transferase (mentransfer gugus fungsi)**
 - 2.1. gugus satu karbon
 - 2.2. gugus aldehyd/keton
 - 2.3. gugus asil
 - 2.4. gugus glikosil
 - 2.7. gugus fosfat
 - 2.8. gugus yang mengandung -S

- 3. Hidrolase (reaksi hidrolisis)**
 - 3.1. ester
 - 3.2. ikatan glukosidik
 - 3.4. ikatan peptida
 - 3.5. ikatan C-N lain
 - 3.6. asam anhidrida

- 4. Liase (adisi pada ikatan rangkap)**
 - 4.1. C=C
 - 4.2. C=O
 - 4.3. C-N

- 5. Isomerase (reaksi isomerisasi)**
 - 5.1. Rasemase

- 6. Ligase (pembentukan ikatan dengan penguraian ATP)**
 - 6.1. C-O
 - 6.2. C-S
 - 6.3. C-N
 - 6.4. C-C

Tabel 5.2. Beberapa enzim yang mengandung/memrlukan ion metal sebagai kofaktor

- Zn²⁺**
 Alkohol dehidrogenase
 Karbonat anhidrase
 Karboksipeptidase
- Mg²⁺**
 Fosfohidrolase
 Fosfotransferase
- Mn²⁺**
 Arginase
 Fosfotransferase
- Fe²⁺ atau Fe³⁺**
 Cytokrom
 Peroksidase
 Katalase
 Feredoksin
- Cu²⁺ (Cu⁺)**
 Tyrosinase
 Cytokrom oksidase
- K⁺**
 Piruvat kinase
 (juga memerlukan Mg²⁺)
- Na⁺**
 ATP-ase membran plasma
 (juga memerlukan K⁺ dan Mg²⁺)

KOFAKTOR ENZIM

Aktivitas beberapa enzim hanya tergantung pada struktur proteinnya, sedangkan beberapa enzim lainnya memerlukan satu atau lebih komponen non protein, yang dinamai kofaktor. Kofaktor ini dapat berupa ion metal atau molekul organik yang disebut koenzim. Beberapa enzim memerlukan keduanya. Kofaktor umumnya bersifat stabil terhadap perlakuan panas, sedangkan kebanyakan enzim kehilangan aktivitasnya pada perlakuan panas. Aktivitas katalitik dari kompleks kofaktor-enzim disebut holoenzim. Bila kofaktor dihilangkan dari kompleks kofaktor-enzim, protein enzimnya yang sudah tidak aktif lagi disebut apoenzim. Tabel 5.2. memperlihatkan beberapa enzim yang memerlukan ion metal sebagai kofaktor. Pada enzim-enzim tersebut, ion metal dapat bekerja sebagai (1) pusat katalitik primer, (2) gugus penghubung ("bridging") untuk mengikat substrat dan enzim melalui pembentukan kompleks koordinatif, (3) senyawa penstabil konformasi protein enzim dalam bentuk katalitik aktifnya. Enzim yang memerlukan ion metal kadang-kadang disebut metaloenzim. Pada beberapa metaloenzim komponen metalnya saja telah mempunyai aktivitas katalitik, protein enzim memperbesar aktivitasnya. Misalnya enzim katalase dengan ion porfirinnya, mengkatalisis dekomposisi hidrogen peroksida dengan sangat cepat menjadi air dan oksigen. Garam ion besi juga mengkatalisis reaksi ini, tetapi dengan laju reaksi yang lebih lambat.

Tabel 5.3. menyimpulkan koenzim-koenzim penting dan jenis reaksi enzimatik yang bersangkutan. Setiap koenzim mengandung satu molekul vitamin sebagai bagian strukturnya. Vitamin adalah senyawa organik renik yang mempunyai fungsi vital untuk semua sel dan tidak dapat disintesis oleh sel, sehingga harus ada dalam makanan spesies tertentu. Koenzim umumnya berfungsi sebagai pengemban ("carrier") intermediet dari gugus fungsi, atom spesifik atau transfer elektrom dalam reaksi enzimatik keseluruhan. Bila koenzim terikat kuat pada molekul enzim, biasanya disebut gugus prostetik, misalnya gugus biositin dari asetil-CoA karboksilase.

Tabel 5.3. Koenzim pada reaksi transfer gugus

Koenzim	Transfer
Nikotinamida adenin dinukleotida	Atom hidrogen (elektron)
Nikotinamida adenin dinukleotida fosfat	Atom hidrogen (elektron)
Flavin mononukleotida	Atom hidrogen (elektron)
Koenzim Q	Atom hidrogen (elektron)
Tiamin pirofosfat	Aldehyde
Koenzim A	Gugus asil
Lipoamida	Gugus asil
Koenzim karbamida	Gugus alkil
Biositin	Karbon dioksida
Piridoksal fosfat	Gugus amino
Koenzim tetrahidrofolat	Gugus metil, metilen, formil atau Formimino

KINETIKA KIMIA

Reaksi kimia dapat digolongkan berdasarkan banyaknya molekul yang bereaksi dan menghasilkan produk. Jadi kita mengenal reaksi monomolekular, bimolekular dan termolekular, dimana satu, dua dan tiga molekul bereaksi menghasilkan produk. Reaksi kimia juga dapat digolongkan berdasarkan kinetika, orde reaksi yaitu reaksi orde nol, orde satu, orde dua dan orde tiga, tergantung pada bagaimana laju reaksi dipengaruhi oleh konsentrasi reaktannya pada kondisi tertentu.

Reaksi orde satu adalah reaksi yang berlangsung dengan suatu laju yang benar-benar proporsional terhadap konsentrasi satu reaktan (gambar 5.1). Contoh paling mudah adalah bila laju reaksi benar-benar proporsional terhadap konsentrasi A.



Laju reaksi pada setiap waktu t dinyatakan dengan persamaan laju orde satu

$$-d[A] / dt = k[A]$$

dimana A : konsentrasi molar dari A dan $-d[A] / dt$: laju reaksi dimana konsentrasi A menurun, k : konstanta laju reaksi dengan dimensi kebalikan waktu detik⁻¹.

Bentuk integrasi persamaan tersebut yang lebih berguna untuk kalkulasi adalah :

$$\log [A_0] / [A] = kt / 2.303$$

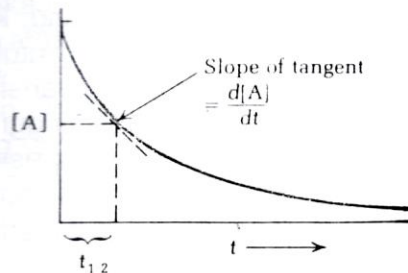
dimana $[A_0]$: konsentrasi A pada waktu nol dan $[A]$: konsentrasi A pada waktu t .

Pada reaksi orde satu, waktu paruh $t_{1/2}$ reaksi diberikan oleh :

$$t_{1/2} = 0,693 / k$$

Pada reaksi orde satu, waktu paruhnya tidak tergantung pada konsentrasi awal reaktan atau substrat.

Gambar 5.1. Kurva reaksi orde satu. Waktu paruh reaksi adalah waktu yang dibutuhkan untuk perubahan setengah dari konsentrasi awal reaktan menjadi produk.



Reaksi orde dua adalah reaksi dimana laju reaksinya proporsional terhadap produk dari dua konsentrasi reaktannya.



Laju reaksi ini yang dapat dinyatakan dengan $-d[A] / dt$, $-d[B] / dt$, atau $+d[P] / dt$, proporsional terhadap konsentrasi A dan konsentrasi B, dinyatakan dengan persamaan laju reaksi orde dua.

$$-d[A] / dt = k[A][B]$$

dengan k : konstanta laju reaksi orde-dua. Bila bentuk reaksi seperti :



dan laju reaksinya proporsional terhadap konsentrasi dua molekul reaktan, persamaan laju reaksi orde-duanya dinyatakan dengan :

$$-d[A]/dt = k[A][A] = k[A]^2$$

konstanta laju reaksi orde-dua berdimensi $1 / (\text{konsentrasi} \times \text{waktu})$, atau $M^{-1} \text{detik}^{-1}$. Bentuk integrasi persamaan laju reaksi orde-dua :

$$t = \frac{2,303}{k \{ [A_0] - [B_0] \}} \log \frac{[B_0][A]}{[A_0][B]}$$

dimana $[A_0]$ dan $[B_0]$: konsentrasi awal dan $[A]$ dan $[B]$: konsentrasi pada waktu t . Reaksi orde-dua dengan konsentrasi awal reaktan sama, waktu paruhnya : $1 / [A_0] k$. Perlu diingat bahwa reaksi orde-dua seperti :



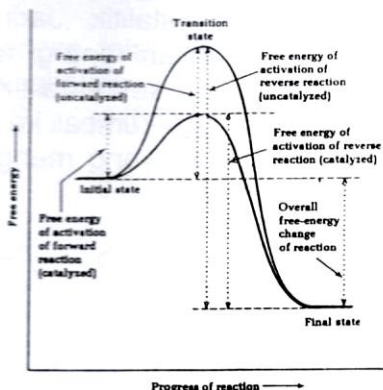
pada kondisi tertentu dapat diperlakukan seperti reaksi orde-satu. Misalnya bila konsentrasi B sangat tinggi sedangkan konsentrasi A sangat rendah. Dalam kasus ini laju reaksinya hampir proporsional terhadap hanya satu konsentrasi reaktan, yaitu A. Pada kondisi khusus ini, reaksi disebut reaksi pseudo orde-satu atau reaksi orde-satu "apparent". Laju reaksi tidak selalu orde-satu murni atau orde-dua murni, kadang-kadang juga berorde campuran.

ENERGI BEBAS DAN EFEK KATALIS

Suatu reaksi kimia seperti $A \rightarrow B$ berlangsung, karena suatu fraksi tertentu dari populasi molekul A mempunyai cukup energi untuk mencapai kondisi teraktivasi, yang disebut keadaan transisi. Pada keadaan transisi ini kemungkinan ikatan kimia terbentuk atau terputus menjadi produk sangat tinggi (gambar 5.2). Laju suatu reaksi kimia proporsional terhadap konsentrasi dari spesies keadaan transisi ini. Energi bebas aktivasi ΔG^\ddagger (# menunjukkan proses teraktivasi) adalah energi yang diperlukan untuk membawa semua molekul dalam 1 mol senyawa ke keadaan transisi pada suhu tertentu.

Ada dua cara untuk mempercepat laju reaksi kimia. Peningkatan suhu, menaikkan pergerakan termal dan energi, sehingga menaikkan jumlah molekul yang dapat masuk keadaan transisi dan mempercepat laju reaksi kimia. Laju reaksi kimia juga dapat dipercepat dengan penambahan suatu katalis. Katalis bergabung sementara dengan reaktan untuk mencapai keadaan transisi dengan energi aktivasi lebih rendah dari pada energi transisi reaksi tanpa katalis. Jadi katalis mempercepat suatu reaksi kimia dengan menurunkan energi aktivasi (gambar 5.2). Bila produk reaksi telah terbentuk, katalis dilepaskan lagi. Tabel 5.4 menunjukkan energi aktivasi untuk penguraian hidrogen peroksida dengan dan tanpa katalis.

Gambar 5.2. Diagram energi suatu reaksi kimia dengan dan tanpa katalis



Tabel 5.4. Energi bebas aktivasi ΔG^\ddagger pada penguraian hidrogen peroksida dengan katalis katalase pada 20°C
Katalase mempercepat laju reaksi lebih dari 10^8 kali

Kondisi	ΔG^\ddagger kkal mol ⁻¹
Tanpa katalis	18
Dengan katalis koloidal platina	13
Dengan katalis katalase	7

BAGAIMANA ENZIM BEKERJA SEBAGAI KATALIS : PRINSIP DAN CONTOH

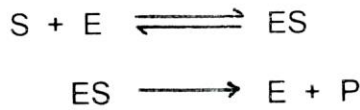
PRINSIP UMUM : MODEL “INDUCED FIT”

Peran suatu katalis adalah menurunkan ΔG^\ddagger dengan memudahkan pembentukan keadaan transisi. Satu enzim mengikat pada sisi aktifnya (gambar 5.3) satu molekul substrat (atau pada beberapa kasus beberapa substrat). Sisi aktif enzim seringkali berupa suatu kantung atau celah yang dikelilingi rantai samping asam amino untuk mengikat substrat dan rantai samping yang berperan sebagai katalis. Struktur tersier yang kompleks dari enzim memungkinkan kecocokan kantung enzim dengan substratnya dengan baik, sekaligus menjelaskan spesifisitas istimewa suatu katalis enzim. Kemungkinan ini difahami oleh pakar biokimia Jerman E. Fisher, yang mengusulkan hipotesis “*lock and key*” untuk kerja enzim. Menurut model “*lock and key*”, enzim dapat menakomodasi substrat spesifik seperti satu gembok dan kunci spesifiknya (gambar 5.3.a). Kenyataannya, enzim tidak begitu saja menerima substratnya, tetapi menuntut distorsi substrat ke suatu keadaan yang mendekati keadaan transisi. Hipotesis “*induced fit*” ini diusulkan oleh D. Koshland pada tahun 1958 yang paling dapat diterima sampai sekarang.

“*Induced fit*” berarti distorsi enzim dan substrat (gambar 5.3.b). Distorsi ini dapat lokal, atau mengkaitkan suatu perubahan besar dalam konformasi enzim.

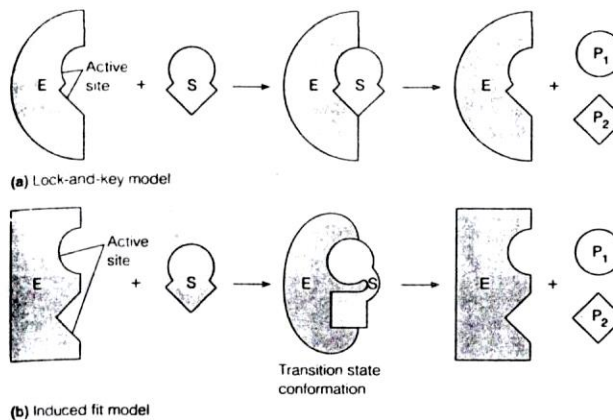
Enzim tidak hanya melakukan distorsi sederhana atau mengposisikan substratnya. Sering kali ditemui rantai samping asam amino spesifik ditempatkan ditempat yang tepat untuk membantu proses katalitik itu sendiri. Dalam banyak kasus, rantai-rantai samping ini adalah gugus asam atau basa yang dapat membantu adisi atau

pengambilan proton. Pada contoh lain, enzim mengikat ion metal pada posisi yang benar-benar tepat untuk turut dalam proses katalitik. Jadi enzim, (1) mengikat substrat atau substrat-substrat, (2) menurunkan energi keadaan transisi, (3) langsung membantu proses katalitik. Setelah proses katalitik selesai, enzim harus dapat melepaskan produk atau produk-produk dan kembali ke keadaan asalnya, siap untuk proses katalitik berikutnya. Satu enzim (E) yang mengkatalisis satu substrat (S) menjadi satu produk (P), reaksinya dapat ditulis :



dimana ES : komponen enzim-substrat.

Gambar 5.3. Dua model interaksi enzim-substrat. (a) Model "lock and key", pada model ini sisi aktif enzim cocok dengan substrat sebagai satu gembok dengan kunci. **(b) Model "induced fit",** pada model ini, enzim dan substrat keduanya melakukan distorsi pada pengikatan, substrat diubah kesuatu konformasi yang mendekati keadaan transisi, enzim menjaga substrat dalam keadaan tegang.



KINETIKA KATALISIS ENZIMATIK

LAJU REAKSI ENZIMATIK SEDERHANA : KINETIKA MICHAELIS-MENTEN

Persamaan reaksi enzimatis satu substrat satu produk dinyatakan :



dengan asumsi reaksi kebalikan antara E dan P diabaikan, sehingga reaksi menjadi orde satu. Laju reaksinya ditentukan hanya oleh konsentrasi ES dan harga k_2 , maka

$$v = k_2 [ES] \quad 5.2$$

$$[E_t] = [E] + [ES] \quad \text{atau} \quad [E] = [E_t] - [ES] \quad 5.3$$

dimana $[E_t]$: konsentrasi enzim total ; $[E]$: konsentrasi enzim bebas ; $[ES]$: konsentrasi kompleks enzim-substrat.

dari 5.1, laju pembentukan ES ; $d[ES] / dt = k_1 [E] [S]$

dan laju penguraian ES $- d[ES] / dt = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$

Pada keadaan : "steady state", $d[ES] / dt = - d[ES] / dt$

$$k_1 [E] [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES] = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

$$[E] [S] = \{ (k_{-1} + k_2) / k_1 \} [ES] = K_M [ES]$$

dimana $K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$

dari persamaan 5.3. $K_M [ES] = [E_t] [S] - [ES] [S]$

$$[ES] = [E_t] [S] / (K_M + [S]) \quad 5.4$$

masukan 5.4. ke persamaan 5.2 : $v = k_2 [E_t] [S] / (K_M + [S]) \quad 5.5$

persamaan 5.5 adalah persamaan Michaelis-Menten, dan K_M konstanta Michaelis-Menten.

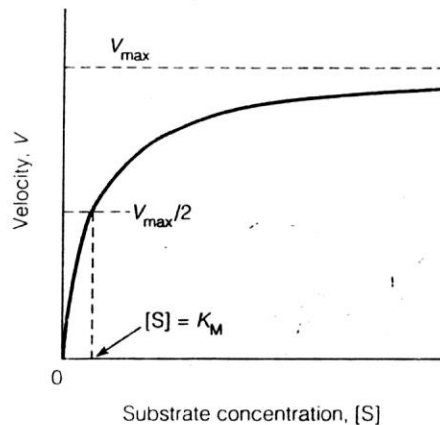
Catatan : 1. Karena K_M adalah ratio laju konstanta dari suatu reaksi spesifik, maka ia adalah khas untuk reaksi tersebut, jadi suatu enzim yang bekerja pada substrat tertentu mempunyai K_M tertentu pula. 2. K_M mempunyai unit seperti konsentrasi. Kita perhatikan grafik v versus $[S]$ (gambar 5.4), pada konsentrasi substrat tinggi, dimana $[S]$ jauh lebih besar dari pada K_M , reaksi mendekati suatu laju maksimum, V_{maks} karena molekul enzim jenuh, yang dinyatakan dengan :

$$V_{maks} = k_2 [E_t]$$

Jadi cara lain menulis persamaan Michaelis-Menten :

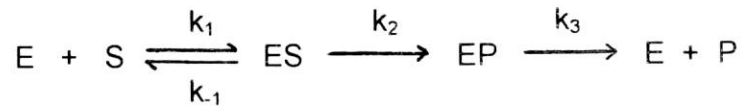
$$v = V_{maks} [S] / (K_M + [S]) \quad 5.6$$

Gambar 5.4. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap laju reaksi. Pada titik dimana $[S] = K_M$, laju reaksi tepat setengah dari laju maksimum. Sulit untuk mengukur laju maksimum dari data grafik ini, karena V_{maks} mendekati asimtot.



LAJU REAKSI GANDA

Persamaan laju reaksi Michaelis-Menten berlaku untuk reaksi enzimatik dua tahap yang sederhana. Tetapi pada keadaan tertentu persamaan ini juga dapat digunakan untuk menyatakan proses yang lebih ruwet, seperti :



Reaksi ganda seperti di atas dapat dinyatakan dengan suatu persamaan :

$$v = k_{\text{kat}} [E_t] [S] / K_M + [S]$$

dimana k_2 pada persamaan 5.5 diganti dengan konstanta yang lebih umum, yaitu k_{kat} yang mencakup laju konstanta semua reaksi antara ES dan E + P. Misalnya untuk reaksi dua tahap, $k_{\text{kat}} = k_2$. Untuk reaksi yang lebih kompleks dari reaksi ganda, k_{kat} merupakan kombinasi dari laju-laju konstanta yang ruwet, nilainya tergantung pada tahap-tahap proses "rate-limiting"-nya. Tetapi persamaan laju reaksi Michaelis-Menten 5.6 tetap tidak berubah, bila kita definisikan $V_{\text{maks}} = k_{\text{kat}} [E_t]$. Karena definisi k_{kat} mencakup k_2 sebagai kasus khusus. Selanjutnya kita akan menggunakan k_{kat} dalam semua persamaan berikutnya, juga untuk reaksi sederhana.

ARTI K_M , k_{kat} DAN k_{kat} / K_M

Dua besaran yang mengkarakterisasi suatu enzim yang mengikuti kinetika Michaelis-Menten adalah K_M dan k_{kat} . Jadi apa arti kedua besaran tersebut ? Konstanta Michaelis-Menten K_M sering kali berkaitan dengan afinitas enzim terhadap substrat. Hubungan ini berlaku pada kasus terbatas ("limiting"), suatu reaksi dua tahap dimana k_2 nya jauh lebih kecil dari pada k_{-1} , dimana $K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1 \cong k_{-1} / k_1 = K_S$, konstanta kesetimbangan persamaan 5.1. Pada keadaan ini, nilai K_M yang besar mengindikasikan k_{-1} jauh lebih besar dari pada k_1 , dan enzim mengikat substrat dengan lemah. Jadi bila laju pembentukan produk rendah, K_M dapat dianggap sebagai kebalikan ukuran kekuatan pengikatan substrat. Tetapi nilai k_2 yang sangat besar juga dapat mengarah ke nilai K_M yang besar. Arti K_M paling baik ditinjau dari gambar 5.4. Kurva persamaan Michaelis-Menten ini menunjukkan bahwa K_M sama dengan konsentrasi substrat sewaktu laju reaksi adalah setengah dari laju reaksi maksimum. Jadi K_M merupakan ukuran konsentrasi substrat agar proses katalitik berlangsung dengan efektif. Suatu enzim dengan K_M besar memerlukan konsentrasi substrat yang lebih besar dari pada enzim dengan K_M rendah untuk mencapai laju reaksinya.

Konstanta kedua, k_{kat} , menyatakan ukuran langsung dari produk pada kondisi optimum (enzim jenuh). Unit k_{kat} adalah detik⁻¹. Konstanta kedua ini merupakan ukuran "turn over" jumlah molekul substrat per molekul enzim per detik, jadi k_{kat} kadang-kadang disebut "turnover number".

Kita dapat memahami arti rasio k_{kat} / K_M dengan menganggap situasi pada konsentrasi substrat yang sangat rendah, yaitu $[S] \ll K_M$, dan sebagian besar enzim dalam keadaan bebas, sehingga $[E_t] \cong [E]$, maka persamaan 5.5

$$v = k_{\text{kat}} [E_t] [S] / (K_M + [S]) = (k_{\text{kat}} / K_M) [E] [S]$$


Oleh karena itu, pada kondisi dimana $[S]$ jauh lebih kecil dari pada K_M , rasio k_{kat} / K_M berlaku sebagai konstanta laju reaksi orde-dua untuk reaksi substrat dan enzim bebas. Rasio ini sangat penting karena merupakan ukuran langsung efisiensi enzim dan spesifisitas enzim. Rasio ini menunjukkan apa yang dapat dicapai enzim dan substrat apabila tersedia banyak sisi-sisi enzim, dan merupakan komparasi langsung efektifitas suatu enzim terhadap substrat yang berbeda. Umpama suatu enzim mempunyai pilihan antara dua substrat, A dan B dengan konsentrasi sama. Pada kondisi dimana kedua konsentrasi substrat encer, dan kedua substrat berkompetisi terhadap enzim, maka :

$$v_A / v_B = (k_{kat} / K_M)_A [E] [A] / (k_{kat} / K_M)_B [E] [B]$$

$$r = (k_{kat} / K_M)_A / (k_{kat} / K_M)_B \quad 5.7$$

Tabel 5.1. memperlihatkan nilai k_{kat} / K_M untuk kimotripsin dengan berbagai substrat. Nilai k_{kat} / K_M dari berbagai gugus yang ditunjukkan bervariasi sampai 1 juta kali, ini menunjukkan enzim mempunyai daerah ("range") yang lebih disukai bahkan untuk substrat yang sama. Daerah pemotongan substrat oleh enzim yang lebih disukai adalah disamping residu-residu yang paling hidrofobik, yang terlihat dari data tabel 5.1.

Tabel 5.1. Yang lebih disukai kimotripsin dalam hidrolisis beberapa N-asetil metil ester, diukur dengan k_{kat} / K_M

Asam amino dalam ester	Rantai samping asam amino	K_{kat} / K_M [(mol/L) ⁻¹ detik ⁻¹]
Glysin	- H	$1,3 \times 10^{-1}$
Norvalin	- CH ₂ CH ₂ CH ₃	$3,6 \times 10^2$
Norleusin	- CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	$3,0 \times 10^3$
Phenilalanin	- CH ₂ - 	$1,0 \times 10^5$

Penggabungan enzim-substrat pada kondisi konsentrasi substrat yang rendah, rasio k_{kat} / K_M nya sesuai dengan konstanta laju reaksi orde-dua. Konstanta laju reaksi demikian kemungkinan mempunyai satu nilai maksimum yang dapat ditentukan dengan frekuensi dimana molekul enzim dan molekul substrat berbenturan. Bila setiap benturan menghasilkan kompleks enzim-substrat, teori difusi memprediksi k_{kat} / K_M akan mencapai nilai kira-kira $10^8 - 10^9$ (mol/L)⁻¹ detik⁻¹.

ANALISIS DATA KINETIK : UJI PERSAMAAN MICHAELIS-MENTEN

Bila konsentrasi dan laju awal diketahui, bagaimana mencari K_M dan k_{kat} ? cara terbaik adalah menggunakan persamaan Lineweaver-Burk yang merupakan kebalikan dari persamaan Michaelis-Menten :

$$1/v = (K_M + [S]) / V_{maks} [S] = K_M / V_{maks} [S] + [S] / V_{maks} [S]$$

$$= K_M / V_{maks} [S] + 1 / V_{maks} \quad 5.8$$

Jadi grafik $1/v$ versus $1/[S]$ merupakan garis lurus. Dimana $1/[S] = 0$, $[S]$ bernilai tak terhingga dan laju reaksi adalah maksimum. Jadi nilai $1/V_{maks}$ dapat diperoleh dari perpotongan garis lurus tersebut dengan sumbu $1/v$. k_{kat} dapat dihitung persamaan : $V_{maks} = k_{kat} [E_t]$. Sedangkan K_M diperoleh dari persamaan Lineweaver-Burk, bila $1/v = 0$ yang memberikan

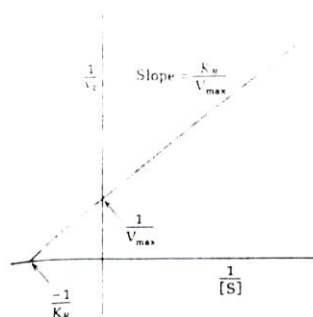
$$0 = K_M / V_{maks} [S] + 1 / V_{maks}$$

$$K_M / V_{maks} [S] = - 1 / V_{maks}$$

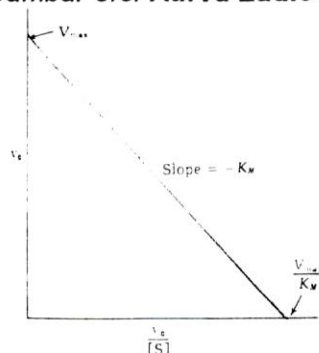
$$K_M / [S] = - 1 \text{ atau } 1 / [S] = - 1 / K_M$$

Jadi perpotongan garis Lineweaver-Burk dengan sumbu $1/[S]$ memberikan $-1/K_M$ (gambar 5.5.)

Gambar 5.5. Kurva Lineweaver-Burk



Gambar 5.6. Kurva Eadie-Hofstee



Kurva Lineweaver-Burk memberikan uji cepat untuk kinetika Michaelis-Menten dan dapat mengevaluasi konstanta-konstanta kritik dengan mudah, juga dapat membedakan berbagai jenis inhibisi dan pengendalian enzim. Cara lain untuk menyatakan persamaan Michaelis-Menten adalah dengan persamaan Eadie-Hofstee (gambar 5.6)

$$v = V_{maks} - K_M v / [S] \quad 5.9$$

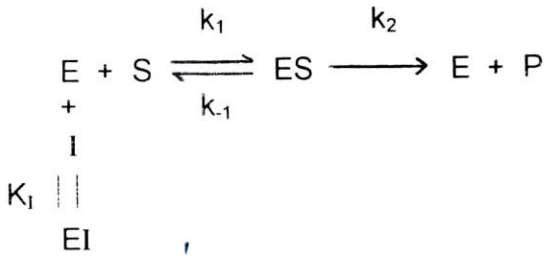
INHIBISI ENZIM

Dikenal dua jenis inhibisi enzim, yaitu : inhibisi reversibel dan inhibisi irreversibel. Inhibisi reversibel berkaitan dengan pengikatan inhibitor secara nonkovalen dan selalu dapat balik kembali, yang pada prinsipnya dengan menghilangkan inhibitor tersebut. Dalam beberapa kasus, pengikatan nonkovalen sedemikian kuat sehingga pada kondisi fisiologi tampaknya irreversibel. Contohnya inhibisi tripsin oleh tripsin inhibitor. Disini hanya inhibisi reversibel yang akan dibahas.

INHIBISI REVERSIBEL

Semua model inhibisi reversibel berkaitan dengan pengikatan inhibitor pada enzim secara nonkovalen, tetapi mekanisme inhibitor tersebut menurunkan aktivitas enzim dan pengaruhnya terhadap kinetika reaksi berbeda-beda. Dikenal 3 jenis inhibisi reversibel, yaitu kompetitif, unkompetitif dan nonkompetitif.

Inhibisi kompetitif : Molekul inhibitor sangat menyerupai molekul substrat sehingga dapat berkompetisi dengan substrat dalam mengikat sisi aktif enzim, tetapi tidak dapat menghasilkan produk. Inhibitor ini disebut inhibitor kompetitif. Secara matematik inhibisi ini dapat dinyatakan sebagai :



dimana I : inhibitor, k_1 : konstanta disosiasi EI, dengan $k_1 = [E][I] / [EI]$, dan [I] = konsentrasi inhibitor bebas, [EI] : konsentrasi kompleks enzim-inhibitor,

$$[E_t] = [E] + [ES] + [EI]$$

dengan cara yang sama maka diperoleh :

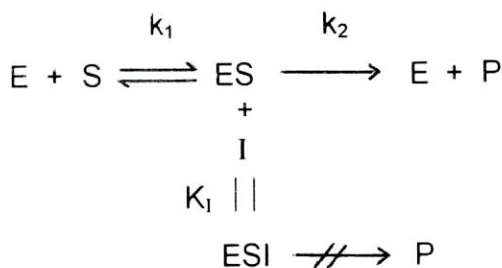
$$v = k_2 [E_t] [S] / K_M (1 + I / K_i) + [S] \quad 5.10$$

Persamaan Lineweaver-Burk inhibisi kompetitif :

$$1/v = (1 + [I] / K_i) (K_M / V_{maks}) (1 / [S]) + 1 / V_{maks}$$

Pengaruh inhibisi kompetitif pada kurva $1/v$ versus $1/[S]$ pada gambar 5.7. Inhibitor kompetitif sifatnya tidak mempengaruhi V_{maks} , atau dengan perkataan lain, inhibitor kompetitif tidak mempengaruhi laju penguraian kompleks ES. Contoh : inhibisi suksinat dehidrogenase oleh asam malonat. Dari inhibisi kompetitif dapat diketahui bahwa sisi aktif enzim mempunyai dua ruang gugus positif yang dapat mengikat dua gugus negatif karboksilat dari substrat. Struktur sisi katalitik merupakan struktur komplementer dari struktur substrat. Dari hubungan antara struktur molekular inhibitor dan afinitasnya terhadap enzim yang dinyatakan dengan K_i , kita memperoleh informasi mengenai struktur dan geometri sisi aktif, sehingga memungkinkan pendekatan ke arah pemetaan sisi aktif enzim.

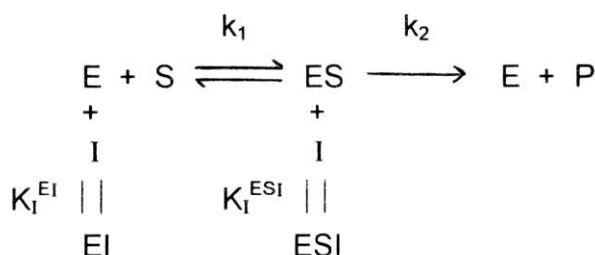
Inhibisi unkompetitif : Inhibitor tidak mengikat enzim bebas, tetapi mengadakan ikatan dengan kompleks enzim-substratnya, membentuk kompleks enzim-substrat-inhibitor yang tidak dapat menghasilkan produk, sebagai berikut :



dengan $K_i = [I][ES] / [ESI]$

Pada inhibisi unkompetitif, bila [S] bertambah tinggi, maka derajat inhibisinya pun bertambah tinggi. Inhibisi unkompetitif ini dapat dikenal dari grafik $1/v$ versus $1/[S]$ pada [I] tetap. Kemiringan konstan pada kenaikan [I], dan penurunan V_{maks} (gambar 5.7). Reaksi inhibisi unkompetitif jarang ditemui pada reaksi dengan satu substrat, tetapi umumnya ditemui pada reaksi dengan dua substrat.

Inhibisi nonkompetitif : Inhibitor nonkompetitif dapat berikatan baik dengan enzim bebas maupun dengan kompleks enzim-substrat dan mempengaruhi keduanya. Disini inhibitor berikatan dengan sisi lain dari enzim, bukan berikatan dengan sisi katalitiknya, terjadi perubahan struktur enzim dan tidak terbentuk ES, atau bila ES terbentuk, ES ini tidak dapat terurai menjadi produk. Reaksi inhibisi nonkompetitif dapat dituliskan :



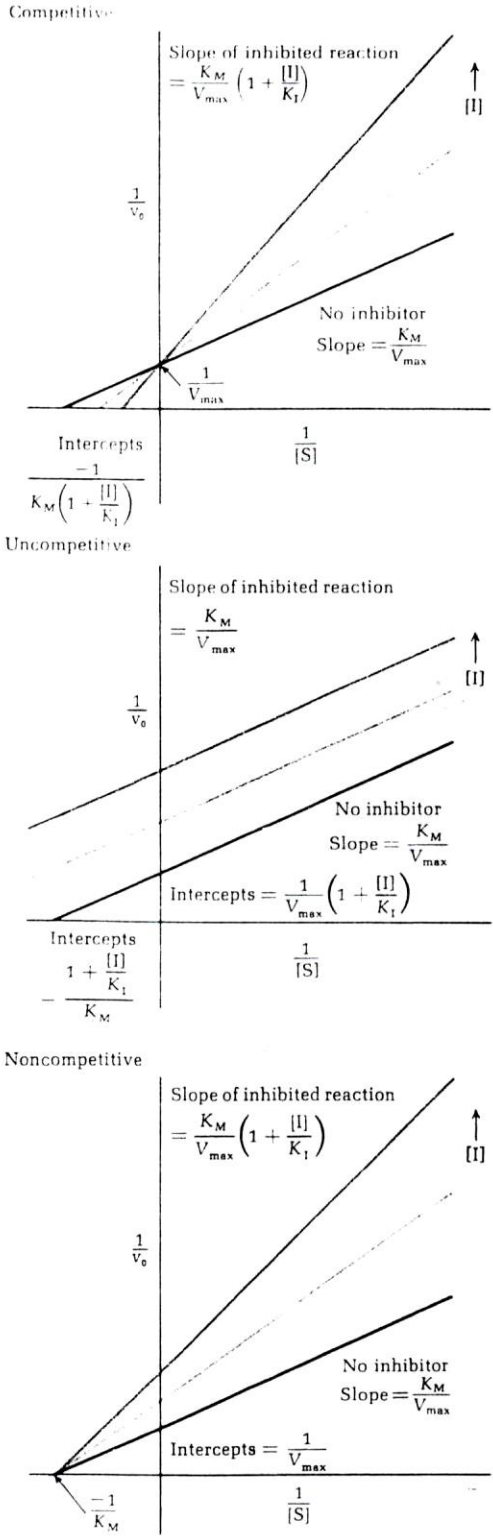
dengan $K_I^{EI} = [E][I] / [EI]$ dan $K_I^{ESI} = [ES][I] / [ESI]$

Inhibisi nonkompetitif ini dapat dikenal dari grafik $1/v$ versus $1/[S]$ yang dapat dilihat pada gambar 5.7. Grafik menunjukkan kemiringan yang berbeda dan perpotongan dengan sumbu $1/v$ nya pun berbeda. Perpotongan ini lebih besar untuk reaksi inhibisi dari pada reaksi tanpa inhibitor. V_{maks} berkurang pada reaksi inhibisi walaupun [S] bertambah besar. Contoh : Reagen-reagen yang dapat bergabung dengan beberapa gugus di luar sisi aktif dari enzim secara reversibel. Beberapa enzim (tidak semua) mempunyai gugus tiol yang dapat diinhibisi oleh ion logam berat, menunjukkan bahwa gugus tiol diperlukan untuk mempertahankan konformasi aktif dari enzim.

Tabel 5.2. Pengaruh inhibitor pada kurva Lineweaver-Burk $1/v$ vs $1/[S]$

	Kemiringan	Perpotongan pada ordinat
Tanpa inhibisi	K_M / V_{maks}	$1 / V_{maks}$
Kompetitif	$(K_M / V_{maks}) (1 + [I] / K_I)$	$1 / V_{maks}$
Unkompetitif	K_M / V_{maks}	$1 / V_{maks} (1 + [I] / K_I)$
Nonkompetitif	$(K_M / V_{maks}) (1 + [I] / K_I)$	$1 / V_{maks} (1 + [I] / K_I)$

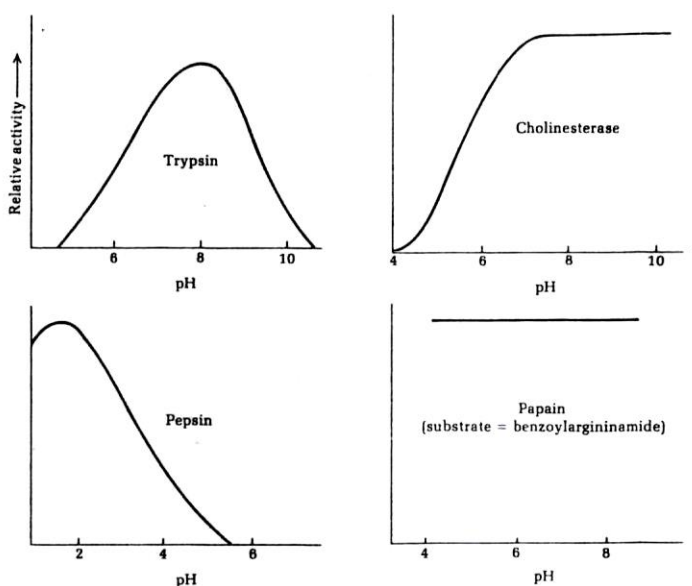
Gambar 5.7. Grafik Lineweaver-Burk menunjukkan efek inhibisi kompetitif unkompetitif dan nonkompetitif pada enzim



PENGARUH pH TERHADAP AKTIVITAS ENZIM

Aktivitas kebanyakan enzim mencapai maksimum pada pH tertentu ; di atas atau di bawah pH ini, aktivitas enzim menurun. Walaupun profil pH – aktivitas kebanyakan enzim berbentuk lonceng, tetapi dapat juga berbentuk lain (gambar 5.8). Hubungan pH – aktivitas enzim tergantung pada sifat asam-basa enzim dan substrat, juga faktor lain yang secara kuantitatif sulit dianalisis. Profil pH – aktivitas enzim umumnya bervariasi dengan substrat, karena K_M kebanyakan enzim berubah dengan pH.

Gambar 5.8. *Profil pH – aktivitas beberapa enzim*



PENGARUH SUHU TERHADAP REAKSI ENZIMATIK

Kebanyakan laju reaksi enzimatik menjadi dua kali setiap kenaikan suhu 10°C ($Q_{10} = 2,0$). Walaupun demikian, koefisien suhu Q_{10} dari satu enzim ke enzim lainnya tergantung pada energi aktivasi dari reaksi enzimatik, yaitu tinggi energi “barrier” ke keadaan transisi. Tetapi karena enzim adalah protein yang dapat terdenaturasi bila suhu dinaikan melampaui suhu tertentu. Jadi suhu optimum “apparent” adalah resultante dari dua proses : (1) kenaikan laju reaksi enzimatik karena kenaikan suhu (2) kenaikan laju denaturasi termal dari enzim di atas suhu kritis.