

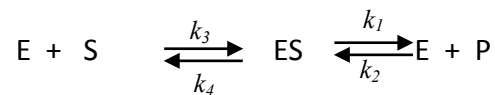
PERCOBAAN II

KINETIKA REAKSI ENZIM

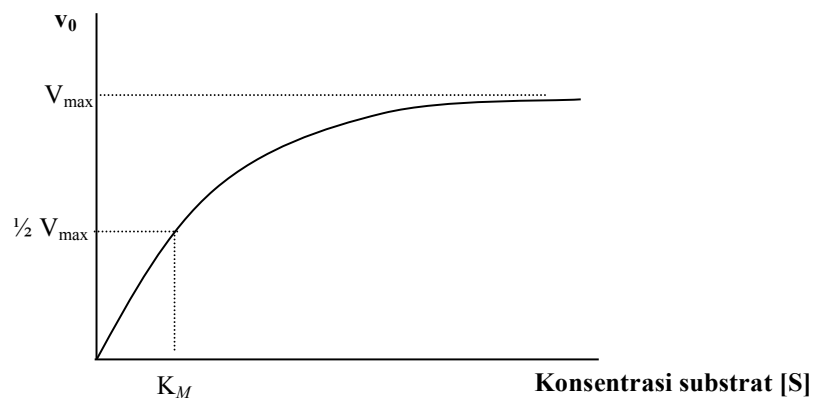
PENDAHULUAN

Enzim adalah protein yang mengkatalisis reaksi-reaksi biologi. Sebagai katalis, enzim mempengaruhi laju pada saat kesetimbangan dicapai, tetapi tidak mempengaruhi kesetimbangan total suatu reaksi. Enzim membantu terjadinya reaksi dengan menurunkan energi aktivasi pembentukan keadaan transisi substrat menjadi produk dibandingkan proses yang tidak dikatalisis.

Laju awal (V_0) dari reaksi yang dikatalisis enzim meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat hingga dicapai keadaan di mana penambahan substrat tidak lagi meningkatkan laju awal reaksi. Keadaan di mana laju awal maksimum (V_{max}) dicapai pada kondisi substrat jenuh, diilustrasikan dengan Gambar 1. Pengamatan ini, seperti yang terjadi pada reaksi enzimatik atau hidrolisis substrat tunggal, telah dijelaskan dengan postulat reaksi berikut, di mana E adalah enzim, S adalah substrat, dan P adalah produk:



Jadi, reaksi berlangsung melalui pembentukan kompleks enzim-substrat (ES). Bila semua enzim adalah dalam keadaan ES (sistem dijenuhkan oleh substrat), maka laju reaksi akan mencapai nilai maksimal (V_{max}).



Gambar 2.1. Hubungan konsentrasi substrat dan laju awal dalam reaksi enzimatik

Michaelis dan Menten, dan kemudian Briggs dan Haldane, menggunakan skema reaksi di atas untuk menurunkan persamaan matematik yang menggambarkan hubungan antara laju awal dan konsentrasi substrat. Persamaan Michaelis-Menten tersebut adalah

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

Dalam persamaan ini, V_{max} dan V_0 adalah laju maksimum dan laju awal reaksi, $[S]$ adalah konsentrasi substrat, dan K_M adalah konstanta Michaelis yang nilainya sama dengan $(k_2 + k_3)/k_1$.

PERCOBAAN

Alat:

| | | |
|---------------------|------------------------------|---------------------|
| Stopwatch | Tabung reaksi | Pengaduk kecil |
| Inkubator air 50 °C | Pipet ukur 1 mL, 5 mL, 10 mL | Pipet seukuran 1 mL |
| Sentrifuga klinik | Tabung sentrifuga | Kertas saring |
| Kuvet | Spektrofotometer | Gelas kimia 50 mL |

Bahan:

- Larutan TCA 20%
- Larutan Tripsin

| | |
|---------------------|---|
| Health | 3 |
| Fire | 0 |
| Reactivity | 0 |
| Personal Protection | J |

| | |
|---------------------|---|
| Health | 2 |
| Fire | 1 |
| Reactivity | 0 |
| Personal Protection | E |

- Larutan kasein 2% (b/v)
- Larutan NaOH 0,5 M
- Bufer fosfat 0,1 M (pH 8,0)
- Reagen Folin Ciocalteu

PERHATIAN!!!

Hati-hati bekerja dengan TCA karena bersifat korosif, hindari kontak langsung dengan kulit dan mata. Bila terjadi kontak dengan kulit atau mata, cuci sesegera mungkin dengan air yang banyak.

Prosedur :

| No. | Tabung | Kasein (mL) | Bufer Fosfat (mL) | Tripsin (μ L) |
|-----|--------|-------------|-------------------|--------------------|
| I | t = 0 | 0,1 | 2,9 | 250 |
| | t = 15 | 0,1 | 2,9 | 250 |
| II | t = 0 | 0,2 | 2,8 | 250 |
| | t = 15 | 0,2 | 2,8 | 250 |
| III | t = 0 | 0,4 | 2,6 | 250 |
| | t = 15 | 0,4 | 2,6 | 250 |
| IV | t = 0 | 0,5 | 2,5 | 250 |
| | t = 15 | 0,5 | 2,5 | 250 |
| V | t = 0 | 1,0 | 2,0 | 250 |
| | t = 15 | 1,0 | 2,0 | 250 |

Waktu inkubasi t = 15 menit

- Inkubasi masing-masing tabung yang berisi kasein dan buffer fosfat beserta pengaduknya selama 5 menit pada inkubator 35 °C. Sambil diaduk perlahan-lahan

(jangan sampai berbusa), selanjutnya tambahkan larutan tripsin (sesuai dengan tabel di atas).

- Inkubasi tepat 15 menit dalam inkubator 35 °C dihitung mulai tripsin ditambahkan, reaksi diberhentikan dengan penambahan 1,5 mL TCA 20% ke dalam masing-masing tabung disertai pengadukan yang kuat. Diamkan selama 30 menit dalam air es agar pengendapan berlangsung sempurna.
- Selanjutnya sentrifuga selama 10 menit kemudian saring melalui kertas saring.
- Filtrat dikerjakan menurut cara ANSON (lihat di bawah).

Waktu t = 0 menit

- Dalam tabung reaksi yang berisi pengaduk, masukkan larutan bufer dan larutan tripsin, tambahkan masing-masing 1,5 mL larutan TCA 20% inkubasi 30 menit dalam penangas 35 °C. Terakhir tambahkan larutan kasein (semua pengukuran sesuai tabel). Diamkan selama 30 menit dalam air es, selanjutnya sentrifuga 10 menit, kemudian saring melalui kertas saring. Filtrat dikerjakan melalui cara ANSON (lihat di bawah).

Metode ANSON

- Campurkan 1 mL TCA-Filtrat (dari percobaan di atas) dengan 2 mL NaOH 0,5 M. Tambahkan 0,5 mL reagen Folin-Ciocalteu, aduk. Diamkan 10 menit, kemudian tetapkan serapannya pada 650 nm.

Tugas dan Pertanyaan:

1. Buat grafik yang menggambarkan hubungan antara $1/v$ terhadap $1/S$.
2. Dari grafik tentukan nilai V_{max} dan K_M .
3. Apa yang harus diperbuat seandainya warna larutan yang hendak diukur dengan spektrofotometer itu terlalu gelap?

TUGAS PENDAHULUAN

1. Faktor apa saja yang mempengaruhi laju reaksi enzim? Jelaskan!
2. Turunkan persamaan kinetika enzim Michaelis-Menten dengan pendekatan teori keadaan tunak (*steady state*) yang dikemukakan oleh Briggs dan Haldane?
3. Buktikan bahwa nilai K_M sama dengan konsentrasi substrat pada saat $V_o = \frac{1}{2} V_{MAX}$
4. Apa pengertian istilah-istilah berikut:
 - a. Unit aktivitas
 - b. Aktivitas spesifik
 - c. Aktivitas total

PUSTAKA:

Clark, J. M. and Switzer, R. L. (1976). Experimental Biochemistry, 2nd ed., W.H Freeman and Company, San Fransisco, USA