

LABORATORIUM KIMIA FISIKA
Jurusan Kimia - FMIPA
Universitas Gadjah Mada (UGM)

KINETIKA KIMIA
Kinetika Reaksi Enzimatis

Drs. Iqmal Tahir, M.Si.

Laboratorium Kimia Fisika, Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281

Tel : 0857 868 77886; Fax : 0274-545188
Email :
iqmal@ugm.ac.id atau iqmal.tahir@yahoo.com

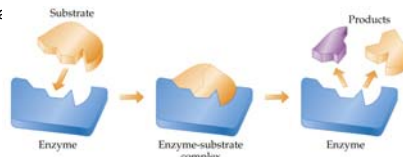
Website :
http://iqmal.staff.ugm.ac.id
http://iqmaltahir.wordpress.com

Enzim sebagai katalis

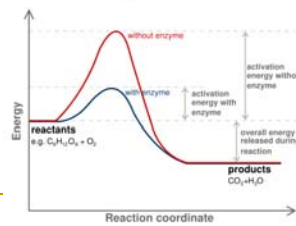
- Enzim merupakan katalis biologis. Kemampuan katalisis enzim adalah spesifik.
- Secara struktural kebanyakan enzim memiliki massa molekul besar (10,000 to 10⁶ amu) dan memiliki bentuk yang spesifik.
- Kemampuan katalisis enzim adalah spesifik. Substrat dapat melakukan reaksi pada daerah situs aktif pada enzim dengan jalan menempatnya dan kemudian reaksi dapat langsung terjadi. Produk reaksi selanjutnya meninggalkan enzim.
- Hanya substrat yang tepat menempati situs aktif saja yang bisa mengalami reaksi.
- Jika suatu molekul terikat pada enzim sehingga substrat lain tidak dapat menempatnya, maka situs aktif tersebut dikatakan terhalang dan molekul tersebut dikatakan sebagai katalis inhibit (atau enzim inhibitor)

Enzim sebagai katalis

- Mekanisme molekul reaksi enzimatis

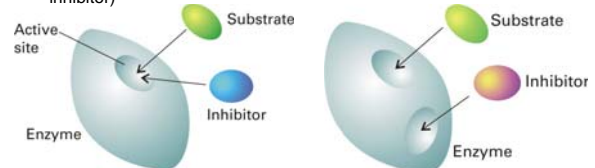


- Profil energetika reaksi



Enzim sebagai katalis

- Jika suatu molekul terikat pada enzim sehingga substrat lain tidak dapat menempatnya, maka situs aktif tersebut dikatakan terhalang dan molekul tersebut dikatakan sebagai katalis inhibit (atau enzim inhibitor)

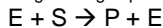


Pada inhibisi kompetitif, substrat dan inhibitor bersaing menempati situs aktif pada enzim

Inhibisi non kompetitif terjadi jika inhibitor menyerang enzim tapi tidak pada daerah situs aktifnya. Penyerangan tersebut akan mengubah bentuk 3D enzim sehingga enzim menjadi tidak aktif

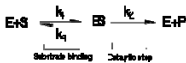
Kinetika reaksi enzimatis

Reaksi enzimatis termasuk reaksi yang melibatkan reaksi pra kesetimbangan dengan persamaan reaksi :



E = enzim
S = substrat
P = produk reaksi enzimatis.

Dalam hal ini E berfungsi sebagai katalis karena tidak mengalami perubahan, sedangkan S terkonversi menjadi P. Data eksperimen : Laju pembentukan hasil reaksi tergantung kepada konsentrasi enzim. Jadi meskipun reaksi dapat ditulis $S \rightarrow P$ namun sebenarnya enzim terlibat di dalam mekanisme reaksi tersebut. Mekanisme reaksi sederhana dituliskan sebagai berikut



(ES) menyatakan intermediet yang merupakan kombinasi aktif dari enzim dengan substrat yang dapat berubah menjadi hasil reaksi dengan konstanta laju reaksi tingkat satu k_2 atau terurai menghasilkan material asal dengan konstanta laju reaksi k_{-1} .

Kinetika reaksi enzimatis

Laju reaksi pembentukan hasil reaksi dirumuskan sebagai :

$$\frac{dP}{dt} = k_2 \cdot [(ES)]$$

Untuk menyelesaikan persamaan tersebut perlu diketahui konsentrasi substrat yang terikat sebagai (ES). Laju pembentukan ES dirumuskan :

$$\frac{d[(ES)]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[(ES)] - k_2[(ES)]$$

- Suku pertama pada persamaan tersebut menyatakan pembentukan (ES) dari E dan S
- Suku kedua menyatakan perubahan menjadi E dan S kembali
- Suku ketiga menyatakan perubahan menjadi hasil.

Digunakan pendekatan keadaan tunak (*steady state*) :
laju pembentukan ES = laju peruraian ES

Kinetika reaksi enzimatik

Profil konsentrasi spesies setiap saat pada keadaan steady state vs non SS

Dengan pendekatan keadaan steady maka untuk $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ menghasilkan

$$k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad \text{dan} \quad [ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_2 + k_{-1}}$$

[E] dan [S] berturut-turut adalah konsentrasi enzim dan substrat bebas.

LABORATORIUM KIMIA FISIKA
Jurusan Kimia - FMIPA, UGM

Kinetika reaksi enzimatik

Apabila $[E]_0$ adalah konsentrasi enzim total, maka $[E] + [(ES)] = [E]_0$. Jumlah $[E]_0$ selalu tetap selama reaksi berlangsung. Mengingat penambahan enzim hanya sedikit, maka konsentrasi total substrat mendekati konsentrasi substrat yang tidak berikatan dengan enzim, $[S] + [(ES)]$ mendekati $[S]$ dengan demikian :

$$[(ES)] = \frac{k_1 \{ [E]_0 - [(ES)] \} \cdot [S]}{k_2 + k_{-1}} \quad \text{atau} \quad [(ES)] = \frac{k_1 [E]_0 [S]}{k_2 + k_{-1} + k_1 [S]}$$

Laju pembentukan produk akan mengikuti persamaan :

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{k_2 + k_{-1} + k_1 [S]}$$

Didefinisikan **konstanta Michaelis-Menten** sebagai :

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad \text{maka laju reaksi menjadi} \quad \frac{dP}{dt} = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_m + [S]}$$

Laju enzimolisis bergantung secara linier terhadap jumlah enzim yang ditambahkan dan terhadap jumlah substrat yang ada.

LABORATORIUM KIMIA FISIKA
Jurusan Kimia - FMIPA, UGM

Kinetika reaksi enzimatik

Persamaan laju reaksi enzimatik :

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_m + [S]}$$

Apabila $dP/dt = v_0$ maka persamaan dapat diubah

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m + [S]}{k_2 [E]_0 [S]}$$

v_0 = kecepatan awal

Nilai v_0 umumnya linear dan mengikuti order satu. Nilai v_0 ditentukan dari grafik konsentrasi versus waktu pada bagian linearitas sebagai harga slope.

LABORATORIUM KIMIA FISIKA
Jurusan Kimia - FMIPA, UGM

Kinetika reaksi enzimatik

Didefinisikan :

- Kecepatan maksimum V_{max}
 $V_{max} = k_2 [E]_0$
- Bilangan pembalikan (*turn over number*) untuk k_1

Persamaan laju reaksi menjadi :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m + [S]}{k_2 [E]_0 [S]}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{k_2 [E]_0 [S]} + \frac{[S]}{k_2 [E]_0 [S]}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Dibuat kurva $1/v_0$ versus $1/[S]$ maka

intersep = $1/V_{max}$

slope = K_m/V_{max}

LABORATORIUM KIMIA FISIKA
Jurusan Kimia - FMIPA, UGM

Kinetika reaksi enzimatik

Nilai v_0 akan berubah sesuai dengan variasi nilai konsentrasi S.

Akan dihasilkan data v_0 dan [S].

LABORATORIUM KIMIA FISIKA
Jurusan Kimia - FMIPA, UGM

Kinetika reaksi enzimatik

Kurva $1/v_0$ versus $1/[S]$ disebut sebagai kurva **Lineweaver-Burk**

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

LABORATORIUM KIMIA FISIKA
Jurusan Kimia - FMIPA, UGM

Kinetika reaksi enzimatik

Arti fisik

$$E+S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E+P$$

Substrate binding Catalytic step

Hubungan V_{max} dan K_M

V_{max} laju maksimal saat $S \gg K_M$

K_M Konstanta Michaelis, konsentrasi substrat saat $v = \frac{1}{2} V_{max}$

LABORATORIUM KIMIA FISIKA
Jurusan Kimia - FMIPA, UGM

Kinetika reaksi enzimatik

Arti fisik :

Model Kurva Michaelis-Menten

- Jika $[S] < K_M$, maka laju reaksi fungsi dari $[S]$
- Jika $[S] > K_M$, maka laju reaksi tidak tergantung dari $[S]$

LABORATORIUM KIMIA FISIKA
Jurusan Kimia - FMIPA, UGM

Arti fisik K_M

$$E+S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E+P$$

Substrate binding Catalytic step

K_M tergantung kepada jenis substrat dan kondisi lingkungan seperti pH, T dan kekuatan ionik

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

$$K_{ES} = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

K_M sama dengan K_{ES} dari kompleks ES jika $k_2 \ll k_{-1}$

Nilai K_M yang tinggi menunjukkan ikatan lemah, nilai K_M yang rendah menunjukkan ikatan yang kuat

K_M menunjukkan afinitas kompleks ES hanya jika $k_{-1} \gg k_2$

LABORATORIUM KIMIA FISIKA
Jurusan Kimia - FMIPA, UGM

Tabel nilai K_M

TABLE 8.5 K_M values of some enzymes

Enzyme	Substrate	$K_M(\mu M)$
Chymotrypsin	Acetyl-L-tryptophanamide	5000
Lysozyme	Hexa-N-acetylglucosamine	6
β -Galactosidase	Lactose	4000
Threonine deaminase	Threonine	5000
Carbonic anhydrase	CO ₂	8000
Penicillinase	Benzylpenicillin	50
Pyruvate carboxylase	Pyruvate	400
	HCO ₃ ⁻	1000
	ATP	60
Arginine-tRNA synthetase	Arginine	3
	tRNA	0.4
	ATP	300

LABORATORIUM KIMIA FISIKA
Jurusan Kimia - FMIPA, UGM

Arti fisik V_{max}

Range nilai V_{max} lebar

V_{max} menunjukkan turnover number (k_{cat}) enzim

Jumlah molekul substrat diubah menjadi produk persatuan waktu (s^{-1})

Turnover number (k_{cat}) sama dengan k_2 pada:

$$V_{max} = k_2 [E]_T$$

$$k_2 = \frac{V_{max}}{[E]_T}$$

TABLE 8.6 Maximum turnover numbers of some enzymes

Enzyme	Turnover number (per second)
Carbonic anhydrase	600,000
3-Ketosteroid isomerase	280,000
Acetylcholinesterase	25,000
Penicillinase	2,000
Lactate dehydrogenase	1,000
Chymotrypsin	100
DNA polymerase I	15
Tryptophan synthetase	2
Lysozyme	0.5

LABORATORIUM KIMIA FISIKA
Jurusan Kimia - FMIPA, UGM

Arti fisik efisiensi katalisis

Dalam kondisi fisiologis kebanyakan enzim tidak dalam keadaan jenuh substrat

$[S]/K_M$ antara 0.01 dan 1. Saat $[S] \ll K_M$ $[E]$ sama dengan $[E]_T$

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_M} [S][E]_T$$


k_{cat}/K_M adalah konstanta laju untuk interaksi S dan E dan dapat digunakan sebagai pengukur efisiensi katalitik (*catalytic efficiency*)

k_{cat}/K_M diartikan preferensi enzyme untuk substrat berbeda

LABORATORIUM KIMIA FISIKA
Jurusan Kimia - FMIPA, UGM

Tabel nilai Km/Kcat

TABLE 8.7 Substrate preferences of chymotrypsin

Amino acid in ester	Amino acid side chain	k_{cat}/K_M ($s^{-1} M^{-1}$)
Glycine	-H	1.3×10^{-1}
Valine	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	2.0
Norvaline	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	3.6×10^2
Norleucine	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	3.0×10^3
Phenylalanine	$-\text{CH}_2$ 	1.0×10^5

Source: After A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (W. H. Freeman and Company, 1999), Table 7.3.



Tabel nilai Km/Kcat

TABLE 8.8 Enzymes for which k_{cat}/K_M is close to the diffusion-controlled rate of encounter

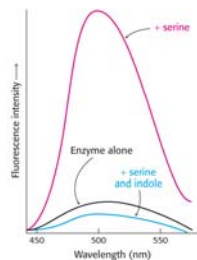
Enzyme	k_{cat}/K_M ($s^{-1} M^{-1}$)
Acetylcholinesterase	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	8.3×10^7
Catalase	4×10^7
Crotonase	2.8×10^8
Fumarase	1.6×10^8
Triose phosphate isomerase	2.4×10^8
β -Lactamase	1×10^8
Superoxide dismutase	7×10^9

Source: After A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (W. H. Freeman and Company, 1999), Table 4.5.



Analisis kinetika reaksi enzimatis

Analisis melibatkan monitoring ikatan enzim-substrate.
Dilakukan menggunakan teknik spektroskopi (UV-Vis, fluoresen)
- Khususnya enzim yang mengandung gugus prostetik berwarna
- *Tryptophan synthase* (piridoksal fosfat)

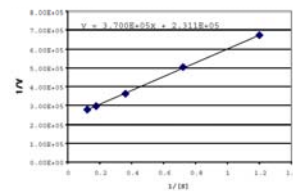


Latihan

Data reaksi

[S] (mM)	V (mM/sec)	Diubah 1/[S] (mM ⁻¹)	1/V (sec/mM)
8.33	3.62E-06	0.12	2.76E+05
5.55	3.39E-06	0.18	2.95E+05
2.77	2.75E-06	0.36	3.64E+05
1.38	1.99E-06	0.72	5.02E+05
0.83	1.49E-06	1.2	6.73E+05

Dibuat kurva 1/[S] vs 1/[V]



Perhitungan

$$K_M = 1.6$$

$$V_{max} = 4.32 \times 10^{-6} \text{ mM/sec}$$

