



PROSIDING

SEMINAR NASIONAL KIMIA DAN PENDIDIKAN KIMIA III

"Teori dan Aplikasi Sains dalam Isu Globalisasi Lingkungan, Profesionalisasi Pembelajaran dan Kewirausahaan"

Program Studi Pendidikan Kimia Jurusan PMIPA FKIP UNS

Surakarta, 7 Mei 2011



MAKALAH PENDAMPING

KIMIA FISIKA
(Kode : C-04)

ISBN : 978-979-1533-85-0

TEKNIK DAN PERSAMAAN ALTERNATIF UNTUK PENENTUAN TETAPAN MICHAELIS-MENTEN DAN YANG MIRIP

Patih

Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Sebelas Maret

e-mail: patih31@yahoo.co.id

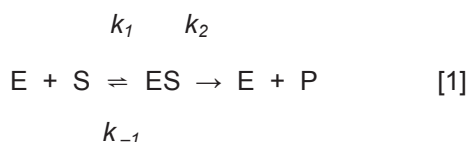
Abstrak

Telah dilakukan kajian tentang kesahihan persamaan-persamaan konvensional yang umum digunakan pada penentuan tetapan Michaelis-Menten (K_M) dan yang mirip (κ). Paradigma yang digunakan adalah bahwa persamaan harus memenuhi kriteria: pada konsentrasi substrat yang jauh lebih besar dari K_M reaksi order ke-nol dan pada yang jauh lebih kecil order ke-satu terhadap substrat, harus sama dengan yang diperoleh dari metode integral, dan mudah digunakan. Hasil menunjukkan bahwa kesemua persamaan yang dikaji tidak ada yang memenuhi ke-tiga kriteria. Telah diperkenalkan teknik dan persamaan alternatif yang, secara teoritis, sah.

Kata kunci: persamaan konvensional; tetapan Michaelis-Menten dan yang mirip; order ke-nol; order ke-satu

PENDAHULUAN

Reaksi enzimatik *Michaelis-Menten* dipercayai berlangsung menurut mekanisme reaksi



Briggs-Haldane (1925) membuktikan bahwa, dengan menggunakan Pendekatan Keadaan Mantap pada $[ES]$, hukum laju dapat dinyatakan sebagai

$$v = \frac{k_2[E][S]}{(k_{-1} + k_2)/k_1 + [S]} \quad [2]$$

Selanjutnya jika

$$(k_{-1} + k_2)/k_1 = K_M \quad [3]$$

maka [2] akan menjadi

$$v = \frac{k_{kat}[E][S]}{K_M + [S]} \quad [4]$$

Pola hubungan semacam [4] ini *hiperbolik* dan belum mempunyai tingkat reaksi yang pasti. Pada konsentrasi substrat $[S]$ yang cukup kecil (dari K_M), reaksi akan berlangsung menurut mekanisme reaksi order ke-satu terhadap S dan [4] akan menjadi

$$v = \frac{k_{kat}[E][S]}{K_M} \quad [5a]$$

Tetapi, pada $[S]$ yang lebih besar (dari K_M), hubungan ini berubah, dan [4] akan menjadi

$$v = k_{kat}[E] \quad [6a]$$

Pada kondisi ini, substrat bereaksi dengan semua enzim yang ada, sehingga v mencapai harga maksimum (yang selanjutnya diberi terminasi v_{maks}) dan reaksi menurut mekanisme reaksi tingkat ke-nol atau

$$v_{maks} = k_{kat}[E] \quad [6]$$

Substitusi persamaan [6] ke dalam [5a] akan menghasilkan

$$v = \frac{v_{maks}[S]}{K_M} \quad [5]$$

Karena enzim merupakan katalis yang sangat efektif, percobaan umumnya dilakukan pada konsentrasi substrat yang jauh lebih besar dari enzim dan penentuan K_M dilakukan dengan metode laju awal. Pada dasarnya metode ini termasuk metode diferensial dan karenanya tetapan yang diperoleh akan berbeda dengan yang menggunakan metode integral. Patiha (2006) menyatakan bahwa, kecuali untuk reaksi tingkat ke-*nol*, harga tetapan laju yang diperoleh dari metode diferensial selalu berbeda dengan yang dari integral. Selain itu, harga k yang konsisten, hanya dapat diperoleh jika *fraksi yang bereaksi* α dibuat tetap.

Laidler (1987) menyatakan bahwa harga tetapan laju k yang tepat, harus diperoleh dengan menggunakan *metode integral*. Masalahnya, penentuan hukum laju dengan metode integral *tidak praktis* -harus secara *trial and error*; data harus dicobakan pada sejumlah persamaan. Hukum laju yang dicari adalah yang memberikan kurva yang paling (mendekati) linear.

Sesungguhnya, Patiha (2006) telah merumuskan persamaan kinetika kimia tunggal yang merupakan hibrida persamaan diferensial dengan integral (selanjutnya disebut sebagai persamaan *hibrida diferensial-integral*). Meski secara prinsip dan praktis merupakan persamaan diferensial, selalu memberikan harga tetapan laju k (dan tentu saja *tingkat reaksi* n) yang **persis sama** dengan yang dari metode integral. Ini dimungkinkan berkat dimasukkannya *faktor koreksi*

$$p = \frac{\alpha}{F(\alpha)} \quad [7]$$

pada hukum laju diferensial sehingga yang disebut terakhir ini menjadi

$$v_o = \frac{\alpha}{F(\alpha)} k[A_o]^n \quad [8]$$

Selanjutnya, Patiha (2010) juga telah memperkenalkan *persamaan hibrida baru* jika menggunakan metode diferensial sebagai fungsi konsentrasi pereaksi yang ada pada waktu t .

$$v = \frac{\alpha}{(1-\alpha)^n F(\alpha)} k[A]^n \quad [9]$$

Pada [9] *faktor koreksi* adalah

$$p = \frac{\alpha}{(1-\alpha)^n F(\alpha)} \quad [10]$$

$F(\alpha)$ adalah bentuk umum hasil integrasi hukum laju diferensial dan mempunyai harga

$$F(\alpha) = -\ln(1-\alpha) \text{ untuk } n=1 \quad [11] \text{ dan}$$

$$F(\alpha) = \frac{1}{(n-1)} \left[\frac{1}{(1-\alpha)^{(n-1)}} - 1 \right] \text{ untuk } n \neq 1 \quad [12]$$

METODE

Kajian bersifat teoritis yang terdiri dari dua tahap. Pertama kajian tentang persamaan-persamaan yang telah ada dan kedua penetapan teknik dan perumusan persamaan alternatif. (Pada perkembangan selanjutnya, menerapkan teknik dan pada data hasil eks-perimen. Data yang sama dianalisis menggunakan persamaan terbit yang telah ada. Hasil-hasil diperbandingkan dengan menggunakan hasil dari metode integral sebagai standar. Persamaan dinyatakan sah jika kesalahan lebih kecil dari 5% dan handal jika juga lebih mudah pemakaiannya.)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kajian

Ada 2 persamaan yang paling sering digunakan untuk penentuan tetapan *Michaelis-Menten*, K_M , yaitu persamaan *Lineweaver-Burk* (1934) dan *Eadie* (1942)-*Hoofstee* (1959). Dowed dan Riggs ((1965: 863) dan Atkins dan Nimmo

(1975) menyatakan bahwa persamaan kedua lebih tepat dan superior dari yang pertama.

Namun ada juga persamaan integral dengan tenggang waktu tetap (*time lag*) oleh *Espenson* (1995: 34-35). Selain itu, berangkat dari keinginan untuk mendapatkan harga tetapan *Michaelis-Menten*, K_M , yang sama dengan yang diperoleh dari metode integral, *Patih* (2009) memperkenalkan padu-padanan persamaan hibrida diferensial-integral (*Patih*, 2006) dengan persamaan enzimatik.

Persamaan *Lineweaver-Burk*

Lineweaver-Burk (1934; 658) membalik persamaan [4] dan memperoleh

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{maks}} + \frac{K_M}{v_{maks}[S_o]} \quad [13]$$

Harga v_{maks} dapat dihitung dari intersep sedang K_M dari lereng kurva dengan mengalurkan $1/v$ lawan $1/[S_o]$.

Ada beberapa komentar. Pertama, ialah bahwa karena menggunakan metode diferensial maka harga K_M yang diperoleh tentulah tidak akan sama dengan yang diperoleh dari metode integral. Kedua, persamaan ini sebenarnya "bias". Jika penentuan dilakukan pada $[S_o]$ yang sangat tinggi maka v mencapai v_{maks} dan [13] akan menjadi

$$\frac{1}{v_{maks}} = \frac{1}{v_{maks}} + \frac{K_M}{v_{maks}[S_o]}$$

atau

$$K_M = 0 \quad [14]$$

Ini berarti, seharusnya harga v_{maks} yang akurat tidak dapat diperoleh dari rumus ini. Ketiga, pada dasarnya [13] bertentangan dengan [5], khususnya jika data yang digunakan untuk menentukan v diambil pada kondisi $[S_o]$ yang jauh lebih kecil dari K_M . Jika [5] dibalik maka akan diperoleh

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{maks}[S_o]} \quad [15]$$

Persamaan *Eadie - Hoofstee*

Eadie (1942) dan *Hoofstee* (1959) masing-masing memperkenalkan persamaan yang pada dasarnya sama dan biasanya dinyatakan sebagai

$$v = v_{maks} - \frac{K_M v}{[S_o]} \quad [16]$$

Harga v_{maks} (dan kemudian k_{kat}) dihitung dari intersep dan K_M dari lereng kurva v lawan $v/[S_o]$.

Juga ada beberapa komentar. Pertama, ialah bahwa, seperti yang sebelumnya, karena menggunakan metode diferensial maka harga K_M yang diperoleh tentulah tidak akan sama dengan yang diperoleh dari metode integral. Kedua, persamaan ini sebenarnya juga "bias". Jika v mencapai v_{maks} maka [16] akan menjadi

$$v_{maks} = v_{maks} - \frac{K_M v_{maks}}{[S_o]}$$

atau

$$K_M = 0 \quad [14]$$

Ketiga, pada dasarnya [16] juga bertentangan dengan [5], khususnya jika data yang digunakan untuk menentukan v diambil pada kondisi $[S]$ yang jauh lebih kecil dari K_M . Keempat, konsep laju pada [16] "tidak sama" dengan konsep laju pada studi kinetika reaksi yang umum dilakukan. Data yang digunakan adalah laju (awal) tetapi dalam persamaan bermakna *laju bersih*. (Fenomena ini dapat dibandingkan dengan konsep energi bebas Gibbs,

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad [17]$$

Energi bebas Gibbs adalah energi (kalor) bersih (yang dapat digunakan untuk kerja berguna) sama dengan energi (kalor) total dikurangi dengan energi (kalor) yang terbuang karena entropi pada temperatur T .

Persamaan *Espenson*

Espenson (1995: 34-35) mengganti notasi S pada [4] dengan notasi umum A lalu mengintegrasikan persamaan tersebut. Setelah [32]

beberapa langkah diperoleh persamaan integral rentang waktu tetap (*time lag*)

$$[A_t] - [A_{t+\sigma}] = -\kappa \ln \left(\frac{[A_t]}{[A_{t+\sigma}]} \right) + k\sigma \quad [18]$$

Dalam persamaan ini κ mirip dengan K_M sedang σ adalah rentang waktu. Espenson melakukan pengamatan hingga pereaksi bereaksi 90% kemudian membagi data menjadi 2 pasangan dengan σ tetap.

Ada beberapa komentar. Telah dikemukakan bahwa reaksi enzimatik berlangsung menurut 2 mekanisme reaksi yang berbeda. Jika percobaan dilakukan pada konsentrasi substrat yang jauh lebih besar dari K_M maka mungkin saja terjadi, reaksi telah berlangsung 90% tetapi reaksi masih tingkat ke-*nol* sehingga seharusnya yang dapat diperoleh hanyalah v_{maks} . Sebaliknya, jika percobaan dilakukan pada konsentrasi substrat yang jauh lebih kecil dari K_M maka reaksi tentulah selalu tingkat ke-*satu* sehingga seharusnya v_{maks} tidak dapat diperoleh. Andaikata percobaan dilakukan pada kondisi yang pas sekalipun, penggunaan persamaan ini tetap bias. Penggunaan pasangan data pada awal dan akhir percobaan tentunya tidak benar. Jika $[S_0]$ cukup besar maka, pada kondisi ini, data hanya pas untuk tingkat ke-*nol* dan pada $[S]$ yang kecil (pada akhir reaksi) hanya pas untuk tingkat ke-*satu*.

Persamaan Patiha (2009)

Patiha (2009) memasukkan faktor koreksi p ([7]) ke dalam [5] dan menghasilkan persamaan

$$v = \frac{pv_{maks}[S_0]}{K_M} \quad [19]$$

Karena reaksi ini tingkat kesatu terhadap $[S]$ maka pemasukan [7] ke dalam [19] akan menghasilkan

$$v = -\frac{\alpha v_{maks}[S_0]}{\ln(1-\alpha)K_M} \quad [20]$$

Karena pada setiap percobaan konsentrasi substrat selalu berkurang maka, jika diinginkan

untuk mencari harga K_M dari satu lakuan (*run*) maka [20] harus dibalik yaitu

$$1/v = -\frac{\ln(1-\alpha)K_M}{\alpha v_{maks}[S_0]} \quad [21]$$

Harga K_M dapat diperoleh dari lereng kurva $1/[S_0]$ lawan $1/v$ setelah v_{maks} ditentukan. Yang terakhir ini dilakukan dengan asumsi berikut.

Pada $[S_0]$ yang tinggi kurva ini tidak lagi linear. Kurva berbelok. Tapi karena bila $[S_0]$ besar (dan laju menjadi maksimum) harga $1/[S_0]$ mendekati 0 maka perpotongan kurva dengan ordinat ($1/v$) pada kondisi ini akan memberikan harga v_{maks} (yakni $1/[S]_{maks}$ akan memberikan $1/v_{maks}$).

Yang menarik disini bahwa harga K_M (dan v_{maks}) yang diperoleh dari [21] persis sama dengan yang diperoleh dari persamaan [13] jika [13] dikoreksi dengan [7]. Persamaan [21] juga taat azas. Namun tetap ada yang mengganjal yaitu dari bahwa secara teoritis kurva $1/[S_0]$ lawan $1/v$ seharusnya melalui titik O (0,0). Dengan demikian masih memerlukan pendalaman. Selain itu, sebelum persamaan ini digunakan **harus dicek dulu dengan metode integral apakah datanya memenuhi asumsi dasar reaksi enzimatik.**

Perumusan persamaan

Secara umum, hukum laju dinyatakan dalam persamaan

$$-d[A]/dt = k_A [A]^n, \quad [22]$$

Jika [22] dibagi dengan $[A_0]$ akan diperoleh

$$-d \left(\frac{[A]}{[A_0]} \right) / dt = k_A [A_0]^{(n-1)} \left(\frac{[A]}{[A_0]} \right)^n \quad [23]$$

Substitusi

$$\beta = \frac{[A]}{[A_0]} \quad [24]$$

ke dalam [23] akan menghasilkan

$$-d\beta / dt = k_A [A_0]^{(n-1)} \beta^n \quad [25]$$

$$-d\left(\frac{\beta}{\beta^n}\right) = k_A[A_o]^{(n-1)} dt \quad [26]$$

$$-\int d\left(\frac{\beta}{\beta^n}\right) = k_A[A_o]^{(n-1)} \int dt \quad [27]$$

Jika hasil integral bagian kiri dinyatakan sebagai $F(\beta)$ akan diperoleh persamaan

$$F(\beta) = k_A[A_o]^{(n-1)} t_\beta \quad [28a]$$

atau

$$t_\beta = (F(\beta)/k_A)[A_o]^{(1-n)} \quad [28]$$

dimana

$$F(\beta) = -\ln \beta \quad \text{untuk} \quad n = 1 \quad [29]$$

$$F(\beta) = \frac{1}{(n-1)} \left[\frac{1}{\beta^{(n-1)}} - 1 \right] \quad \text{untuk} \quad n \neq 1 \quad [30]$$

Sebenarnya persamaan [28] adalah bentuk lain dari persamaan *Patih* (1998), sedangkan [29] dan [30], masing-masing secara berurutan, adalah persamaan [11] dan [12], jika dilakukan substitusi $\beta = (1 - \alpha)$.

Penentuan harga n dan tetapan laju k dapat dilakukan dalam 1 lakuan (*run*) yaitu jika akhir dari setiap bacaan fisik pada waktu t_β dijadikan awal bagi yang mengikutinya. Dapat dibuktikan bahwa, berdasarkan pendekatan ini, jika bacaan sifat fisik awal adalah $[A_o]$, maka yang kedua adalah $\beta[A_o]$, ketiga $\beta^2[A_o]$, keempat, $\beta^3[A_o]$, atau secara umum yang ke- i adalah $\beta^{(i-1)}[A_o]$.

Jika pengertian ini dimasukkan kedalam [28] akan diperoleh

$$t_i = (F(\beta)/k_A)[\beta^{(i-1)}[A_o]]^{(1-n)} \quad [31]$$

$$t_i = (F(\beta)/k_A)[A_o]^{(1-n)} [\beta^{(i-1)(1-n)}] \quad [32]$$

Jika [28] dimasukkan ke dalam [32] akan diperoleh

$$t_i = (\beta)^{(i-1)(1-n)} t_\beta \quad [33]$$

atau dalam bentuk logaritmanya

$$\log t_i = (1-n) \log \beta(i-1) + \log t_\beta \quad [34]$$

Jika β dibuat tetap maka order reaksi dapat dihitung dari kurva $\log t_i$ lawan $(i-1)$. Selanjutnya harga tetapan laju k_A intersep dengan memanfaatkan persamaan [28] dan [29] untuk $n=1$ atau [30] untuk $n \neq 1$. Atau yang lebih mudah

$$k_A = -\ln(\beta)/t_\beta \quad \text{untuk} \quad n = 1 \quad [35]$$

atau

$$k_A = \left[\frac{1}{(n-1)} \left(\frac{1}{\beta^{(n-1)}} - 1 \right) \right] / t_\beta \quad \text{untuk} \quad n \neq 1 \quad [36]$$

Dalam kaitannya dengan penelitian ini, karena pada $[S_o]$ yang tinggi reaksi order ke-*nol* dan $v = v_{maks}$ maka berdasarkan [6] dan [36]

$$v_{maks} = \frac{[S_o](1-\beta)}{t_\beta} \quad [37]$$

Dan berdasarkan [5] dan [35]

$$K_M = -\frac{v_{maks} t_\beta}{\ln \beta} \quad [38]$$

Pembahasan

Persamaan [37] dapat juga diturunkan dari persamaan [6a]

$$v_{maks} = k_{kat}[E] \quad [6]$$

Karena pada $[S]$ tinggi reaksi order ke-*nol* terhadap $[S]$ maka

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = v_{maks}$$

$$-d[S] = v_{maks} dt$$

$$-\int d[S] = v_{maks} \int dt$$

$$[S_o] - [S] = v_{maks} t$$

$$[S_o] - [S] = k_{kat}[E] t$$

$$[S_o](1 - [S]/[S_o]) = v_{maks} t$$

$$[S_o](1 - \beta) = v_{maks} t_\beta$$

atau

$$v_{maks} = \frac{[S_o](1-\beta)}{t_\beta} \quad [37]$$

Demikian pula persamaan [38] dapat juga diturunkan dari persamaan [5]

$$v = \frac{v_{maks}[S]}{K_M} \quad [5]$$

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{v_{maks}[S]}{K_M}$$

$$v = -\frac{d[S]}{[S]} = \frac{v_{maks} dt}{K_M}$$

$$-\frac{d[S]/[S_o]}{[S]/[S_o]} = \frac{v_{maks} dt}{K_M}$$

$$-\frac{d\beta}{\beta} = \frac{v_{maks} dt}{K_M}$$

$$-\int \frac{d\beta}{\beta} = \frac{v_{maks}}{K_M} \int dt$$

$$-\ln \beta = \frac{v_{maks}}{K_M} t_\beta$$

$$K_M = -\frac{v_{maks}}{\ln \beta} t_\beta \quad [38]$$

Ada 2 hal yang menjadi inti isi dari kenyataan di atas. Pertama, karena [37] dan [38] dapat diturunkan dari persamaan utama {[5] dan [6]} maka memenuhi kriteria untuk penentuan tetapan K_M . Kedua, persamaan [37] dan [38] merupakan persamaan integral. Ini juga salah satu kriteria. Namun, ini tidak cukup. Data yang dapat digunakan untuk masing-masing persamaan haruslah yang sesuai. Persamaan [37] hanya pada kondisi $[S_o]$ jauh lebih besar dari K_M dan [38] dari yang lebih kecil. Atau dengan kata lain, data sebaiknya diperoleh dari percobaan yang pada awal reaksi order ke-nol dan pada akhir reaksi order ke-satu. Dan, cara yang paling mudah untuk menceknya adalah dengan menggunakan persamaan [33]. Karena persamaan ini juga merupakan persamaan integral maka akan melengkapi semua kriteri yang digunakan. Dengan demikian, bagi mendapatkan harga K_M yang pasti haruslah melalui percobaan yang membabitkan pengamatan pada kedua kondisi.

KESIMPULAN

Berdasarkan hal-hal yang telah dibicarakan dan sebatas kesalahan penafsiran, dapat disimpulkan 2 hal berikut ini.

1. Penentuan K_M atau κ harus membabitkan data yang merupakan reaksi order ke-nol dan ke-satu dan digunakan secara terpisah.
2. Persamaan alternatif yang, secara teoritis, sah adalah

$$1). t_i = (\beta)^{(i-1)(1-n)} t_\beta$$

$$2). v_{maks} = \frac{[S_o](1-\beta)}{t_\beta}$$

$$3). K_M = -\frac{v_{maks}}{\ln \beta} t_\beta$$

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya terutama kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional, yang telah membiayai penelitian ini; Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Sebelas Maret Surakarta, selaku pengelola kegiatan secara keseluruhan, FMIPA UNS dan Laboratorium MIPA Pusat UNS dan juga kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan sehingga memungkinkan terselenggaranya kegiatan ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Atkins, G. L. and I. A. Nimmo. 1975. *Biochem. J.* **149**, 775.
- Briggs, G. E. and J. B. S. Haldane. 1925. *Biochem. J.* **19**, 338.
- Dowd, J. E. and D. S. Riggs. 1965. *Biochem. J.* **249**, 8635
- Eadie, E. A. 1942. *J. Biol. Chem.* **146**. 85.

- Espenson, J. H. 1995. *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms*, 2nd Ed. New York: McGraw-Hill, Inc.
- Hofstee, B. H. J. 1959. *Nature*, Lond. **184**. 1926.
- Laidler, K. J. 1987. *Chemical Kinetics*, 3rd Edition. New York: Harper Collins Publisher, Inc.
- Lineweaver, H. and D. Burk. 1934. *J. Am. Chem. Sos.* **56**. 658.
- Patiha, 1998. *Persamaan Kinetika Kimia Tan: Perbaikan dan Implementasinya*. Lap. Penelitian Dosen Muda Tak Terpublikasi. Surakarta: FMIPA UNS.
- Patiha, 2006. *Persamaan Kinetika Kimia Tunggal Hibrida Diferensial dan Integral dan Implementasinya*. Laporan Penelitian Dasar Tak Terpublikasi. Surakarta: FMIPA UNS.
- Patiha, 2009. *Persamaan Kinetika Kimia Terpa-du untuk Reaksi Enzimatis Michaelis-Menten dan yang Mirip*. Laporan Penelitian Fundamental Tak Terpublikasi. Surakarta: FMIPA UNS.
- Patiha, 2010. *Pendekatan Kinetika terhadap Reaksi Kesetimbangan*. Laporan Penelitian Fundamental Tak Terpublikasi. Surakarta: FMIPA UNS.