



KAJIAN KESAHIHAN PERSAMAAN ESPENSON (1995) UNTUK REAKSI ENZIMATIS DAN YANG MIRIP

Patiha, Mudjijono, Yuniawan Hidayat dan Edy Pramono

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sebelas Maret

Jl. Ir. Sutami 36 A, Ketingan Surakarta 57126 Telp. (0271) 63375

Info Artikel

Sejarah Artikel:
Diterima April 2014
Disetujui Mei 2014
Dipublikasikan Agustus 2014

Kata kunci:
brominasi aseton
persamaan *Espenson* (1995)
reaksi enzimatik
tetapan *Michaelis-Menten*

Abstrak

Telah dilakukan kajian tentang kesahihan persamaan *Espenson* (1995). Pertama secara teoritis atas paradigma yang digunakan dan kemudian dari hasil penerapannya pada penentuan tetapan *Michaelis-Menten* dari reaksi brominasi aseton. Dikatakan sah jika, secara teoritis konsisten dengan konsep dasar kinetika kimia dan reaksi enzimatik dan memberikan harga tetapan *Michaelis-Menten* yang pasti. Ditemukan bahwa persamaan tersebut tidak/kurang sah.

Abstract

A study on the validity of *Espenson* equation (1995) has been done. First, theoretically on the paradigm used and then from the results of its application in the determination of *Michaelis-Menten* constant of bromination of acetone. Said to be valid if, it is, theoretically, consistent with the basic concept of chemical kinetics and enzymatic reaction and gives a fixed value of the *Michaelis-Menten* constant. It was found that the equation is invalid.

Pendahuluan

Enzim adalah katalis dalam proses kimia pada makhluk hidup. Ada beberapa tipe mekanisme reaksi enzimatik; yang paling sederhana, yaitu yang dikenal sebagai reaksi enzimatik *Michaelis-Menten*, dipercayai berlangsung mengikuti mekanisme reaksi:



Berdasarkan pendekatan keadaan mantap, hukum lajunya adalah:

$$v = \frac{k_{kat}[E][S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

k_{kat} , $[E]$, $[S]$, dan K_M masing-masing secara berurutan adalah tetapan katalis, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, dan tetapan *Michaelis-Menten*.

Pola hubungan semacam (2) ini hiperbolik; reaksi belum mempunyai order reaksi yang pasti. Pada $[S]$ yang cukup besar (dari K_M), hubungan ini berubah, dan (2) akan menjadi:

$$v = k_{kat}[E] \quad (3)$$

Pada kondisi ini, semua enzim bereaksi dengan substrat, sehingga v mencapai harga maksimum (yang selanjutnya disebut v_{maks}) dan reaksi menurut mekanisme reaksi tingkat ke-nol terhadap $[S]$ atau

$$v_{maks} = k_{kat}[E] \quad (4)$$

Tetapi pada konsentrasi substrat $[S]$ yang cukup kecil (dari K_M), reaksi akan berlangsung menurut mekanisme reaksi order ke-satu terhadap S dan (2) akan menjadi

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

Substitusi persamaan (4) ke dalam (5) akan menghasilkan

$$v = \frac{v_{maks}[S]}{K_M} \quad (6)$$

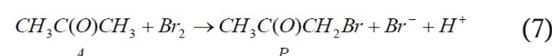
Studi tentang kinetika reaksi enzimatik, bermula pada penentuan K_M . Pada umumnya penentuan ini menggunakan metode diferensial dengan teknik laju awal. Ada 2 persamaan yang paling umum digunakan yaitu *Laneweaver-Burk* (1934) dan *Eadie* (1942) dan *Hoofstee* (1959).

Persamaan ini tetap digunakan hingga saat

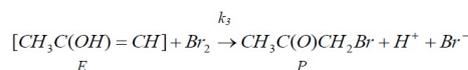
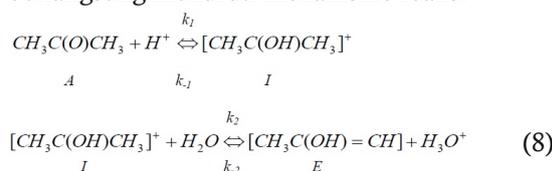
ini (Heinzerling *et al.*; 2012).

Fenomena ini menarik. Berbeda dengan yang biasanya diperkenalkan pada pemula, reaksi ini mengikuti hukum laju yang berbeda pada awal dan akhir reaksi. Karena itu, adalah penting bagi mahasiswa untuk melakukan percobaan kinetika reaksinya. Akan tetapi, karena harga enzim sangat mahal dan mudah rusak, tentulah agak sulit untuk mewujudkannya. Sebab itu, perlu untuk mencari reaksi yang mirip, dengan pereaksi yang murah, mudah diperoleh, dan relatif mudah percobaannya.

Reaksi brominasi aseton:



adalah salah satu reaksi yang banyak digunakan sebagai model dalam percobaan kinetika kimia. Pada temperatur kamar, reaksi ini dipercayai berlangsung menurut mekanisme reaksi



Berdasarkan pendekatan keadaan mantap, hukum lajunya adalah

$$-d[P]/dt = \frac{(k_1k_2k_3)/k_{-1}[A][H^+][Br_2]}{k_{-2}[H^+] + k_3[Br_2]} \quad (9)$$

Pada umumnya, percobaan dilakukan pada kondisi $[H^+]$ dan $[A]$ yang relatif berlebihan terhadap $[Br_2]$, menggunakan metode laju awal dengan mengikuti perubahan absorbansi Br_2 . Didapati bahwa, reaksi masing-masing order ke-satu terhadap $[A]$ dan $[H^+]$ dan ke-nol terhadap $[Br_2]$. Sesungguhnya penggunaan metode laju awal tidak akan dapat memberikan gambaran yang utuh mengenai reaksi ini. Persamaan (9) berbentuk pecahan dengan penjumlahan pada penyebutnya. Karena ion H^+ bertindak sebagai katalis maka, jika (9) dibagi k_3 dan $(k_2/k_3)[H^+]$ dianggap sebagai K_M dan $(k_1k_2)/k_{-1}[H^+][A]$ dianggap sebagai v_{maks} , reaksi ini akan mirip dengan reaksi enzimatik. Dengan mengikuti perubahan absorbansi Br_2 pada panjang gelombang 400 nm (indeks absorbansi molar $160 M^{-1}cm^{-1}$) hingga mendekati akhir reaksi. Patiha (2011) membuktikan bahwa pada $[HCl]_0$ sama dengan 0,050 M dan 0,100 M dan $[Br_2]_0$ sama dengan

0,010 M, reaksi ini berlangsung menurut mekanisme reaksi yang mirip dengan reaksi enzimatis terhadap $[Br_2]$, reaksi order ke-nol pada awal dan ke-satu pada akhir reaksi. Namun, masih ada masalah yang mengganjal. Karena termasuk metode diferensial, metode laju awal tidak akan memberikan harga K_M yang pasti. Menurut Laidler (1987), harga yang pasti hanya dapat diperoleh dengan metode integral.

Espenson (1995) menyatakan bahwa, hukum laju reaksi enzimatis dan yang mirip dengannya, dapat dinyatakan dalam persamaan

$$v = \frac{k^*[A]}{\kappa + [A]} \quad (10)$$

Ia kemudian mengintegrasikan persamaan [10] dan setelah beberapa langkah memperoleh persamaan integral rentang waktu tetap (*time-lag*)

$$[A_t] - [A_{t+\sigma}] = -\kappa \ln \left(\frac{[A_t]}{[A_{t+\sigma}]} \right) + k^* \sigma \quad (11)$$

Dalam persamaan ini k^* sama dengan v_{maks} , κ sama dengan K_M , sedang σ adalah rentang waktu. Espenson melakukan pengamatan hingga pereaksi bereaksi 90% kemudian membagi data menjadi 2 pasangan dengan σ tetap. Tetapan dapat diperoleh dari lereng dan k^* dari intersep kurva linier $[A_t - A_{t+\sigma}]$ lawan $\ln ([A_t]/[A_{t+\sigma}])$. Masalahnya, pada konversi (2) menjadi (10) diasumsikan bahwa harga k^* tidak bergantung pada konsentrasi $[H^+]$ pada reaksi brominasi aseton dan diduga, kebenaran hasil yang diperoleh akan sangat bergantung pada data awal yang digunakan. Bisa saja terjadi bahwa meski reaksi telah berlangsung 90% tetapi reaksi masih berlangsung menurut mekanisme reaksi order ke-satu.

Berdasarkan hal-hal yang telah dibicarakan di atas, tujuan penelitian ini adalah: (1) menjelaskan pengaruh konsentrasi ion H^+ terhadap harga κ dan (2) menguji kesahihan persamaan Espenson (1995).

Metode Penelitian

Kajian ini bersifat semi eksperimental. Kesahihan persamaan akan disimpulkan dari hasil telaah secara teoritis atas paradigma yang digunakan dan dari hasil penerapan pada reaksi brominasi aseton oleh Patihā (2011).

Hasil yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan yang diperoleh dengan teknik yang dikembangkan oleh Patihā (2011). Berdasarkan

teknik ini, penentuan v_{maks} dilakukan dengan menggunakan persamaan integral pada saat reaksi mengikuti mekanisme reaksi order ke-nol dan selanjutnya v_{maks} ini digunakan untuk menentukan κ pada saat reaksi order ke-satu.

Disimpulkan sah jika secara konsisten mengikut pada kaidah-kaidah reaksi enzimatis (dan katalis pada umumnya), taat pada asas statistik, dan memberikan harga κ yang pasti.

Hasil dan Pembahasan

Ada 3 hal menarik yang dapat diungkap dari persamaan Espenson (1995). Pertama, seperti telah diutarakan di atas, ialah bahwa harga k^* dinyatakan sama dengan v_{maks} . Kedua, ialah bahwa tidak ada persyaratan mengenai data yang harus digunakan; data cukup dipasangkan dengan selisih waktu yang sama. Ketiga, model persamaan adalah linier tetapi tidak mempersyaratkan uji linieritas.

Secara kinetika, pada umumnya, order reaksi terhadap katalis (dan dengan sendirinya juga enzim) adalah ke-satu (lihat persamaan (3) dan (4)). Artinya, bila konsentrasi katalis di dua-kalikan maka laju reaksi akan menjadi 2^1 atau 2 kali lebih cepat. Ini berarti, bila konsentrasi enzim diubah maka v_{maks} juga akan berubah. Persamaan Espenson (1995) mengabaikan paradigma ini.

Memasangkan setiap data pengamatan begitu saja, akan bisa menimbulkan masalah. Seperti telah diungkap pada awal pembicaraan, reaksi enzimatis dapat berlangsung menurut mekanisme reaksi yang berbeda. Bila $[S]_0$ jauh lebih besar dari K_M maka, pada awalnya, reaksi akan teramati sebagai reaksi order ke-nol terhadap $[S]$ tetapi akan berubah menjadi order ke-satu pada akhir-akhir reaksi. Ini disebabkan karena, berbeda dengan substrat, konsentrasi katalis tidak berubah dengan waktu. Tetapi, bila $[S]_0$ jauh lebih kecil dari K_M maka reaksi akan selalu teramati sebagai reaksi order ke-satu terhadap $[S]$. Kiranya dapat dipahami bahwa, pada kondisi ini, harga K_M tidak dapat ditentukan karena laju tidak pernah mencapai maksimum.

Pada dasarnya, terhadap semua pasangan data dapat saja dilakukan uji statistik. Masalahnya, tentu tidak semuanya menghasilkan kurva yang linier. Selalu ada data yang relatif lebih mendekati linier. Karenanya uji linieritas mutlak perlu. Tetapi ini tidak harus berarti segalanya sudah terpenuhi. Keadaan ekstrim bisa terjadi dimana reaksi akan selalu teramati sebagai reaksi order ke-satu terhadap

[S]. Karenanya, kurvanya akan lebih mendekati linier (dari pada jika dari campuran order ke-nol dan ke-satu). Tetapi, seperti telah diutarakan di atas, laju maksimum tidak pernah tercapai. Dengan demikian, tetap perlu kajian tentang kesahihan sumber data.

Langkah selanjutnya adalah mengkaji hasil penerapan persamaan pada data reaksi brominasi aseton. Untuk mendapatkan karakter hukum lajunya, berikut ini disajikan hasil yang diperoleh oleh Patihha (2011). Pada reaksi brominasi aseton, pada kondisi reaksi konsentrasi HCl (yang dapat dianggap sebagai enzim) divariasikan.

Tabel 1. Harga koefisien regresi, r, dan tetapan laju, k, reaksi brominasi aseton di awal-awal dan akhir-akhir reaksi dengan 10 mL [Br₂]₀ 0,050 M, 10 mL aseton 4,0 M dan berbagai volum [HCl] 0,100 M, dan H₂O sehingga volum total 50 mL, pada rentang waktu tetap 10 detik menggunakan persamaan integral

No	[HCl] (M)	Awal-awal reaksi				Akhir-akhir reaksi			
		Order - 0		Order - 1		Order - 0		Order - 1	
		r	10 ² k	r	10 ² k	r	10 ² k	r	10 ² k
1	0,050	-0,9995	0,463	-0,9994	1,02	-0,9978	0,26	-0,9989	0,51
2	0,100	-0,9999	0,974	-0,9998	2,13	-0,9968	0,60	-0,9999	1,06
3	0,150	0,9998	0,940	-0,9999	2,05	-0,9959	0,80	-1,000	1,16
4	0,200	0,9993	1,70	-0,9999	4,13	-0,9857	1,04	-1,000	1,30
5	0,250	0,9992	1,95	-0,9999	5,06	-0,9950	1,45	-0,9999	1,49

Sumber: Patihha (2011)

Berdasarkan Tabel 1. harga v_{maks} (dan dengan sendirinya juga harga κ) reaksi brominasi aseton hanya bisa ditentukan berdasarkan hasil percobaan 1 dan 2.

Selanjutnya, penerapan persamaan Espenson (1995) pada data tersebut memberikan hasil seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Harga intersep, lereng, koefisien regresi r, dan dari reaksi brominasi aseton: 10 mL [Br₂]₀ 0,050 M, 10 mL aseton 4,0 M dan berbagai volum [HCl] 0,100 M, dan H₂O sehingga volum total 50 mL, pada rentang waktu tetap 10 detik menggunakan persamaan Espenson

Hasil	Konsentrasi Awal HCl / M				
	0,050	0,100	0,150	0,200	0,250
Intersep	0,5061	0,4700	0,4072	0,4209	0,3368
Lereng	-0,0464	-0,0230	-0,0092	-0,0555	-0,0360
r	-0,9818	-0,9208	-0,7273	-0,9415	-0,8708
10 ⁴ x κ / M	2,90	2,06	0,58	3,47	2,25

Berdasarkan persamaan Espenson, harga k^* pada Tabel 2. dapat dihitung dari intersep dibagi dengan rentang waktu tetap, σ , sedang κ adalah negatif dari harga lereng (dalam satuan absorbansi atau dibagi dengan 160 M⁻¹ cm⁻¹ (dalam satuan konsentrasi harus).

Ada 2 hal yang menarik pada Tabel 2. Pertama, harga k^* ($= v_{maks}$) pada semua konsentrasi HCl ternyata berbeda dan cenderung mengecil dengan kenaikan konsentrasi HCl. Hal ini bertentangan dengan paradigma persamaan Espenson dan sekaligus konsep katalis pada umumnya. Berdasarkan paradigma Espenson, harganya seharusnya sama sedang

berdasar konsep katalis harga pada HCl 0,100 M harus dua kali lebih besar dari pada HCl 0,050 M. Yang terakhir ini terbukti jika menggunakan teknik Patihha (2011) yakni harga v_{maks} hanya dapat dihitung pada saat reaksi order ke-nol. Pada Tabel 1. harga k ($= v_{maks}$) pada HCl 0,100 M ($= 9,74 \times 10^{-4}$) kira-kira dua kali lebih besar dari pada harga pada konsentrasi HCl 0,050 M ($= 4,63 \times 10^{-4}$). Kedua, harga κ juga berbeda (dan juga cenderung mengecil); pada hal, sebagai tetapan, seharusnya sama. Lalu timbul pertanyaan, harga (-harga) mana yang bisa digunakan. Berdasarkan konsep reaksi enzimatik, yang bisa dipakai hanyalah data pada konsentrasi HCl 0,050 dan 0,100 M. Tetapi, harganya berbeda dan karenanya (sekali lagi) bertentangan dengan paradigma persamaan Espenson (yang mengharuskan keduanya sama). Mestinya, berdasarkan koefisien regresi, yang paling benar adalah data pada konsentrasi HCl 0,050 M.

Berbeda harga κ ditengarai karena asumsi $v_{maks} = k^*$ tidak berubah dengan perubahan konsentrasi enzim. Karena σ juga konstan maka intersep juga konstan. Padahal, fakta percobaan (dan juga teori) menunjukkan v_{maks} berubah. Penjelasan lain yang mungkin dapat diterima ialah bahwa penggunaan enzim (yang konsentrasinya konstan) menyebabkan lereng yang terukur itu bukan k ($= k_{kat}$) tetapi $k^{\wedge} = k [E]^{\alpha}$. Bila, katakan [E] di dua kalikan maka lerengnya adalah $k^{\wedge\wedge} = k [2E]^{\alpha}$. Karena lerengnya tidak sama, tentulah kurvanya tidak berimpit. Artinya, persamaan garisnya akan berbeda. Implikasinya, adalah tidak benar untuk menggambarkan fenomena dengan konsentrasi enzim yang berbeda (seperti persamaan Espenson) dalam satu persamaan garis.

Teknik Patihha (2011) mendekati masalah ini sebagai berikut. Harga v_{maks} yang diperoleh pada saat reaksi order ke-nol disubstitusikan ke dalam harga lereng pada saat reaksi order ke-satu (lihat (6)); jadi ada dua buah persamaan garis. Berbeda dengan pada persamaan Espenson, lereng pada persamaan (3) "dimungkinkan" berubah sebanding dengan perubahan konsentrasi enzim. Pada Tabel 1. saat [HCl] 0,050 M harga k pada saat order ke-nol adalah $4,63 \times 10^{-4}$, dan harga k (sama dengan lereng) pada saat order ke-satu adalah $0,51 \times 10^{-2}$. Selanjutnya berdasarkan persamaan (3), harga $\kappa = (4,63 \times 10^{-4} / 0,51 \times 10^{-2}) : 160 = 5,64 \times 10^{-4}$ M. Dengan cara yang sama, harga κ pada saat [HCl] 0,100 M $= (9,74 \times 10^{-4} / 1,06 \times 10^{-2}) : 160 = 5,74 \times 10^{-4}$ M; 2 harga yang kira-kira sama.

Masalahnya, apakah ini sudah menjadi sesuatu yang mutlak benar. Pada awal pembicaraan dikatakan bahwa v_{maks} tercapai jika semua enzim bereaksi dengan substrat yang ada dan bahwa konsentrasi substrat harus jauh lebih besar dari K_M . Lalu, jika $[E]$ dibesarkan, apakah v_{maks} (selalu) mulai terjadi pada konsentrasi substrat yang sama atau berbeda. Ini sangat penting karena, sama atau berbeda, akan bisa berpengaruh terhadap harga lereng (dan selanjutnya harga K_M). Ini belum terjawab dalam artikel ini dan menjadi tujuan akhir penelitian. Tentunya dengan melakukan sejumlah percobaan yang membatik reaksi-reaksi enzimatik sesungguhnya dan juga reaksi-reaksi lain yang diduga atau memang mirip dengan reaksi enzimatik.

Simpulan

Berdasarkan hal-hal yang telah dibicarakan di atas dan sebatas kesalahan percobaan, dapat diambil 2 kesimpulan berikut: (1) konsentrasi ion H^+ (enzim) berpengaruh pada harga (K_M), (2) persamaan Espenson (1995) bagi penentuan (K_M) tidak/kurang sah.

Ucapan Terima kasih

Dengan selesainya tulisan ini dan nantinya seluruh rangkaian penelitian, team peneliti berterima kasih yang sebesar-besarnya kepada

Dirjen Dikti yang telah membiayai penelitian, LPPM UNS, FMIPA UNS, Laboratorium MIPA Pusat UNS, Laboratorium Kimia FMIPA UNS, dan semua pihak yang telah membantu. Secara khusus terima kasih juga kepada Retno, Nanik, Novika, Arif, dan Dita yang telah/sedang mengerjakan bagian tertentu. Akhirnya, betapapun kecilnya, semoga hasil penelitian ini bermakna bagi pengembangan ilmu kimia. Amin.

Daftar Pustaka

- Eadie, G.S. 1942. *J. Biol. Chem.* 146, 85
- Espenson, J.H. 1995. *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms*. 2nd Ed. New York: McGraw-Hill, Inc
- Heinzerling, P., F. Schrader, and S. Schanze. 2012. *J. Chem. Ed.* 89. 1582-1586
- Hofsee, B.N.J. 1959. *Nature*. Lond. 184, 1296
- Laidler, K.J. 1987. *Chemical Kinetics*. 3rd Edition. New York: Harper Collins Publisher. Inc
- Laneweaver, H and D. Burk. 1934. *J. Am. Chem. Soc.* 56. 658
- Patuha. 2011. *Teknik dan Persamaan Baru yang Efektif untuk Penentuan Tetapan Michaelis-Menten dan yang Mirip*. Laporan Penelitian Fundamental Tidak Dipublikasikan. Surakarta: FMIPA UNS