

## INHIBISI ION LOGAM $\text{Cu}^{2+}$ TERHADAP KINETIKA ENZIM TRIPSIN

### *INHIBITION OF $\text{Cu}^{2+}$ METAL ION ON THE KINETICS OF TRYPSIN ENZYME*

**Rendy Mardiansyah, Eddy Sulistyowati\***

*Jurusan Pendidikan Kimia, FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta*

[\\*rendy.mar@gmail.com](mailto:rendy.mar@gmail.com) & [eddy.sulistyowati@uny.ac.id](mailto:eddy.sulistyowati@uny.ac.id)

#### **Abstrak**

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan nilai parameter kinetika enzim tripsin dengan menggunakan inhibisi ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  berupa nilai  $V_{\text{maks}}$  (aktivitas maksimum) dan  $K_m$  (konstanta - Michaelis-Menten) dan untuk mengetahui jenis inhibisi dari inhibitor ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  terhadap kinetika enzim tripsin. Penentuan aktivitas enzim tripsin pada substrat kasein tanpa dan dengan penambahan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dalam bentuk senyawa  $\text{CuCl}_2$  dilakukan menggunakan metode Anson. Konsentrasi substrat kasein yang digunakan berturut-turut 2; 4; 6; 8; dan 10 mg/mL. Konsentrasi  $\text{CuCl}_2$  yang digunakan berturut-turut 0,002; 0,004; dan 0,006 M. Penentuan aktivitas enzim tripsin dilakukan pada kondisi optimum enzim tripsin, yaitu pada pH 8; suhu  $37^\circ\text{C}$ ; dan waktu inkubasi 20 menit. Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah aktivitas enzim tripsin dalam satuan mg/mL/menit. Analisis data dilakukan secara deskriptif kuantitatif dengan membandingkan nilai parameter kinetika enzim tripsin tanpa dan dengan penambahan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dalam bentuk senyawa  $\text{CuCl}_2$  yang diperoleh dari grafik *Lineweaver-Burk*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa nilai parameter  $V_{\text{maks}}$  pada kinetika enzim tripsin tanpa dan dengan penambahan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dalam bentuk senyawa  $\text{CuCl}_2$  konsentrasi 0,002; 0,004; dan 0,006 M berturut-turut sebesar  $7,173 \times 10^{-3}$ ;  $3,385 \times 10^{-3}$ ;  $2,756 \times 10^{-3}$ ; dan  $2,251 \times 10^{-3}$  mg/mL/menit. Untuk nilai parameter  $K_m$  berturut-turut sebesar 11,65; 12,39; 11,83; dan 11,75 mg/mL. Berdasarkan data tersebut, ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dalam bentuk senyawa  $\text{CuCl}_2$  bersifat inhibitor non kompetitif terhadap kinetika enzim tripsin dengan substrat kasein.

**Kata kunci:** inhibitor, ion logam  $\text{Cu}^{2+}$ , kinetika enzim

#### **Abstract**

The aim of this research was to determine the parameter of kinetic trypsin enzyme value utilizing the inhibition of metal ion  $\text{Cu}^{2+}$  in  $V_{\text{max}}$  and  $K_m$  values, and to know the type of inhibition of metal ion  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{CuCl}_2$  compound toward kinetic trypsin enzyme. The establishments of the activity of trypsin enzyme on casein substrate with and without adding metal ion  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{CuCl}_2$  were performed by applying Anson method. The amount of casein substrate's concentration used were 2, 4, 6, 8, and 10 mg/mL. The concentration of  $\text{CuCl}_2$  used were 0.002, 0.004, and 0.006 M. The establishments were performed in optimum condition of trypsin enzyme, they were performed in pH 8; temperature  $37^\circ\text{C}$  and for incubation time 20 minutes length. The findings of this research are the activity of trypsin enzyme in mg/mL/minute. The data analysis was descriptive quantitative by comparing the value of kinetic trypsin enzyme with and without adding metal ion  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{CuCl}_2$  obtained from *Lineweaver-Burk* chart. The results of this research showed that the parameter of  $V_{\text{max}}$  values on kinetic trypsin enzyme without and with adding metal ion  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{CuCl}_2$  concentration, by 0.002, 0.004, and 0.006 M sequentially about  $7.173 \times 10^{-3}$ ,  $3.385 \times 10^{-3}$ ,  $2.756 \times 10^{-3}$  and  $2.251 \times 10^{-3}$  mg/mL/minute. For the parameter of  $K_m$  values sequentially about 11.65; 12.39; 11.83; and 11.75 mg/mL. Based on the data, metal ion  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{CuCl}_2$  compound is noncompetitive inhibitor on kinetic trypsin enzyme to casein substrate.

**Keywords:** Keywords: inhibitor, ion metal  $\text{Cu}^{2+}$ , kinetic enzyme

## PENDAHULUAN

Enzim merupakan biokatalis (Cabeza, et al), yaitu katalis untuk reaksi-reaksi dalam sistem biologi. Enzim bekerja dengan mempercepat reaksi tetapi tidak mengubah kesetimbangan reaksi kimia (Cipolati, et al, 2014). Aktivitas enzim dapat dipengaruhi dengan adanya senyawa tambahan berupa aktivator yang dapat mengaktifkan enzim atau inhibitor yang dapat menurunkan aktivitas enzim. Inhibitor adalah suatu zat yang cenderung menurunkan laju reaksi yang dikatalis oleh enzim (Togu, 2011). Faktor lainnya yang mempengaruhi aktivitas dari enzim dalam mengatalis reaksi di antaranya adalah suhu, pH dan waktu inkubasi (Wuryanti, 2004).

Enzim proteolitik atau protease atau proteinase merupakan salah satu jenis enzim yang berfungsi memecah protein menjadi molekul-molekul yang lebih kecil. Enzim Tripsin dihasilkan oleh pankreas dan disekresikan ke dalam usus dua belas jari, tempat di mana enzim tripsin menghidrolisis protein menjadi peptida selama pencernaan makanan. Enzim tripsin memiliki spesifikasi kerja yaitu hanya dapat memotong rantai polipeptida pada sisi karboksil dari residu asam amino lisin atau arginin dari protein. (Wulansari D, dkk, ).

Enzim tripsin memiliki residu serin yang spesifik pada sisi aktifnya, sehingga enzim tripsin termasuk dalam golongan enzim proteolitik atau protease serin (Eddy, dkk, 2016). Gugus aktif hidroksil serin yang terdapat pada sisi aktif enzim tripsin dapat dihambat secara *irreversible* maupun secara *reversible* bergantung pada jenis inhibitor yang menghambatnya. Sebagai contoh beberapa ion logam berat yang dapat menurunkan kinerja enzim tripsin seperti kation  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ , dan

$\text{Zn}^{2+}$  dengan substrat BAEE (Green, 1953: 379).

Dalam reaksi enzim dikenal kecepatan reaksi hidrolisis, pengukuran atau reaksi katalisasi lain yang disebut *velocity* (V). Harga V dari suatu reaksi enzimatis akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat [S], akan tetapi setelah [S] meningkat lebih lanjut akan sampai pada kecepatan yang tetap. Pada konsentrasi enzim tetap (tertentu) harga V hampir linier dengan [S]. Pada kondisi dimana V tidak dapat bertambah lagi dengan bertambahnya [S] disebut kecepatan maksimum ( $V_{\text{maks}}$ ).  $V_{\text{maks}}$  merupakan salah satu parameter kinetika enzim (Ganda, 2011).

Parameter kinetika enzim yang lain adalah konstanta Michaelis-Menten, yang lebih dikenal dengan  $K_m$ .  $K_m$  merupakan konsentrasi substrat yang separuh dari lokasi aktifnya telah terisi, yaitu bila kecepatan reaksi enzim telah mencapai  $\frac{1}{2} V_{\text{maks}}$  (Ganda, 2011).

Penelitian tentang pengaruh penambahan ion logam tembaga(II) terhadap aktivitas enzim tripsin pada kondisi optimum oleh Nurul (2017) menunjukkan bahwa kondisi optimum enzim tripsin diperoleh pada pH optimum 8, suhu  $37^\circ\text{C}$ , waktu inkubasi 20 menit, dan konsentrasi substrat 10 mg/ml. Menurut Eddy dkk (2016) aktivitas enzim tripsin pada pengaruh penambahan ion logam tembaga(II) terhadap aktivitas enzim tripsin dengan konsentrasi  $\text{CuCl}_2$  0,002; 0,004; 0,006; 0,008; dan 0,01 M berturut-turut sebesar 0,001375; 0,001175; 0,0011; 0,002325; dan 0,0011 mg/mL/menit pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Berdasarkan penelitian tersebut, penambahan  $\text{CuCl}_2$  dapat disimpulkan bahwa ion  $\text{Cu}^{2+}$  bersifat inhibitor dan

sangat mempengaruhi aktivitas enzim tripsin pada kondisi optimum.

Penelitian tentang pengaruh penambahan senyawa  $\text{AgNO}_3$  oleh Titik (2017) terhadap aktivitas enzim tripsin menunjukkan bahwa kondisi optimum enzim tripsin diperoleh pada pH optimum 8,0; Suhu optimum  $37^\circ\text{C}$  serta waktu inkubasi selama 20 menit. Aktivitas enzim tripsin pada kondisi optimum dan konsentrasi substrat (kasein) optimum 10 mg/ml sebesar 0.00336 unit aktivitas enzim. Penelitian ini menggunakan metode Lowry modifikasi untuk menentukan kadar protein dan menggunakan metode Anson modifikasi untuk penentuan aktivitas enzim tripsin.

Penelitian mengenai interaksi antara toksisitas logam berat dengan enzim tripsin oleh Tong Zhang dkk (2014), menunjukkan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dapat merusak struktur fungsi enzim tripsin dan menghambat aktivitasnya dengan substrat benzoil-n-arginin etil ester (BAEE). Dengan demikian ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dalam bentuk senyawa kimia dapat mempengaruhi aktivitas enzim dengan menghambat aktivitas enzim tripsin.

Penelitian mengenai inhibisi terhadap enzim tripsin telah banyak dilakukan, maka dari itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. penelitian ini dilakukan untuk menentukan nilai parameter kinetika reaksi enzim dan jenis inhibisi ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  terhadap kinetika enzim tripsin.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini termasuk jenis eksperimen laboratorium dengan subjek penelitian ini adalah ion logam  $\text{Cu}^{2+}$ , sedangkan objeknya adalah jenis inhibisi ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  terhadap kinetika enzim

tripsin menggunakan substrat kasein. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi substrat kasein, sedangkan variabel terikatnya adalah aktivitas enzim tripsin dengan dan tanpa penambahan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dalam bentuk senyawa  $\text{CuCl}_2$  dengan berbagai variasi konsentrasi. Variabel terkontrol dari penelitian ini adalah konsentrasi  $\text{CuCl}_2$  dan kondisi optimum dari enzim tripsin meliputi pH 8, suhu  $37^\circ\text{C}$  dan waktu inkubasi 20 menit (Eddy, dkk., 2016).

Penelitian diawali dengan persiapan alat dan bahan yang digunakan. Alat dari penelitian ini adalah seperangkat alat-alat gelas, Spektronik-20, pH meter, neraca analitik, *stopwatch*, *vortemixer*, inkubator (*Memmert*), bunsen, dan *sentrifuge*. Bahan penelitian ini adalah kristal  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaOH}$ , asam trikloroasetat (TCA), tripsin, protein kasein,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , Natrium Kalium Tartarat,  $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , akuades, dan reagen *folin*. Bahan-bahan tersebut digunakan untuk membuat larutan Buffer Fosfat pH 8, larutan TCA 10%, larutan Tripsin, Reagen *Folin-Ciocalteu* 1N, larutan  $\text{NaOH}$  0,5 M, larutan induk kasein 10 mg/ml pH 8, pereaksi Lowry, variasi larutan kasein standar, dan larutan garam  $\text{CuCl}_2$ .

## Penentuan kadar protein

Penentuan kadar protein dilakukan untuk menentukan kadar protein pada enzim tripsin. Penentuan ini didasarkan pada metode Lowry yang diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum standar kasein dan penentuan kurva baku standar kasein.

Penentuan panjang gelombang maksimum kasein dilakukan dengan menggunakan larutan kasein 1 mg/mL dalam buffer fosfat pH 8 yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan

5mL reagen C dan diaduk kemudian diamkan selama 10 dalam suhu kamar. Setelah itu ditambahkan 0,5 mL reagen D dan diaduk dengan kuat kemudian diamkan dalam suhu kamar selama 30 menit. Terakhir diukur absorbansi pada panjang gelombang 650-750 nm.

Penentuan kurva baku standar kasein dilakukan dengan menggunakan larutan standar kasein 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; dan 1,0 mg/mL. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh pada prosedur sebelumnya. Terakhir pengukuran absorbansi dari larutan enzim tripsin pada panjang gelombang maksimum.

### Penentuan Aktivitas Enzim Tripsin

Penentuan aktivitas enzim tripsin dengan substrat kasein dilakukan pada kondisi optimum. Penentuan aktivitas enzim tripsin didasarkan pada metode Anson yang dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan sampel, larutan kontrol, dan larutan blangko pada panjang gelombang maksimum yang sebelumnya telah ditentukan. Penentuan aktivitas enzim tripsin terlebih dahulu dilakukan tanpa pengaruh penambahan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dengan variasi substrat kasein. Adapun variasi konsentrasi substrat kasein yang digunakan berturut-turut adalah 2; 4; 6; 8; dan 10 mg/mL pada setiap tabung reaksi. Prosedur ini masing-masing dilakukan sebanyak tiga kali (*triplo*)

Langkah selanjutnya dilakukan penentuan aktivitas enzim tripsin dengan pengaruh penambahan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dengan variasi konsentrasi substrat kasein yang sama dengan prosedur sebelumnya. Adapun konsentrasi ion logam yang ditambahkan berturut-turut adalah 0,002; 0,004; dan 0,006 M. Prosedur yang

dilakukan sama dengan prosedur sebelumnya, hanya pada langkah setelah penambahan enzim tripsin diikuti dengan penambahan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  pada larutan sampel dan larutan kontrol, sedangkan pada larutan blangko ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  sebagai pengganti larutan buffer fosfat. Pada penelitian ini ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  yang digunakan dalam bentuk senyawa  $\text{CuCl}_2$ .

Setelah diperoleh absorbansi aktivitas enzim tripsin terhadap variasi substrat kasein tanpa dan dengan pengaruh penambahan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$ , maka diperoleh data absorbansi yang kemudian dihitung aktivitasnya.

### Penentuan parameter kinetika enzim

Penentuan parameter kinetika enzim ( $V_{\text{maks}}$  dan  $K_m$ ) didasarkan atas plot grafik hubungan antara konsentrasi substrat [S] dan aktivitas enzim (V) (Fayyaz *et al.*, 1995; Dinu, 2001).

Data V dan [S] yang diperoleh dari prosedur sebelumnya dibuat tabel dan dikonversikan menjadi  $1/V$  dan  $1/[S]$  serta dibuat plot grafik hubungan antara  $1/V$  dan  $1/[S]$ . Lalu ditentukan nilai  $V_{\text{maks}}$  dan  $K_m$  yang didasarkan atas persamaan kurva *Lineweaver Burk* (Whitaker, 1996), dengan cara:

- Bahwa dari persamaan  $1/V = 1/V_{\text{maks}} + K_m/V_{\text{maks}}(1/[S])$
- Bila  $1/V = Y$  dan  $1/[S] = X$ , maka rumusnya dapat ditulis menjadi:  $Y = a + bX$ , sehingga:  $a = 1/V_{\text{maks}}$  dan  $b = K_m/V_{\text{maks}}$
- Dengan demikian, bila harga  $1/V_{\text{maks}}$  diketahui maka nilai  $V_{\text{maks}}$  didapat, begitu pula nilai  $K_m$  akan juga didapat dari persamaan  $b = K_m/V_{\text{maks}}$

### HASIL DAN PEMBAHASAN

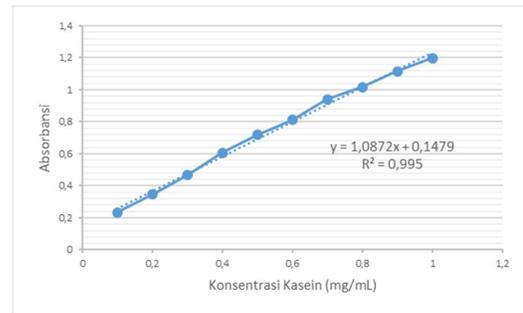
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui nilai parameter kinetika dari

aktivitas enzim tripsin terhadap substrat kasein tanpa dan dengan penambahan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$ , sehingga dapat diketahui jenis inhibisi dari ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dalam bentuk senyawa  $\text{CuCl}_2$ .

Langkah yang dilakukan pada penelitian ini mula-mula adalah persiapan dan pembuatan bahan-bahan yang digunakan. Semua bahan yang digunakan adalah bahan kimia pro analisis (E-Merck). Langkah selanjutnya adalah penentuan kadar protein (kasein) yang didasarkan pada metode Lowry modifikasi. Setelah itu dilakukan penentuan aktivitas enzim tripsin terhadap substrat kasein menggunakan metode Anson modifikasi pada kondisi optimum. Kemudian dilakukan penentuan aktivitas enzim tripsin (substrat kasein) dengan penambahan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$ . Analisis data secara deskriptif kuantitatif, yaitu dengan menentukan nilai parameter kinetika enzim tripsin terhadap substrat kasein tanpa penambahan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  pada kondisi optimum dibandingkan dengan nilai parameter kinetika enzim tripsin terhadap substrat kasein dengan penambahan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  pada kondisi optimum, kemudian dideskripsikan jenis inhibisi ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dalam bentuk senyawa  $\text{CuCl}_2$  terhadap kinetika enzim tripsin.

Penentuan kadar protein (kasein) diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum dari kasein, penelitian dilakukan menggunakan larutan kasein standar 1 mg/mL dan diukur pada panjang gelombang maksimum 650 – 750 nm sehingga diperoleh panjang gelombang maksimum 720 nm. Selanjutnya penentuan kurva Baku kasein menggunakan variasi konsentrasi larutan kasein yang diukur pada panjang gelombang maksimum. Kemudian dibuat plot grafik hubungan antara absorbansi dan konsentrasi larutan

kasein. Sehingga diperoleh persamaan garis linear  $y = 1,0872x + 0,1479$  dengan nilai  $r = 0,995$ ; maka  $y =$  absorbansi dan  $x =$  konsentrasi kasein (mg/mL). Hubungan konsentrasi kasein dan absorbansi dapat dilihat pada gambar 1 berikut



Gambar 1. Kurva Baku Protein

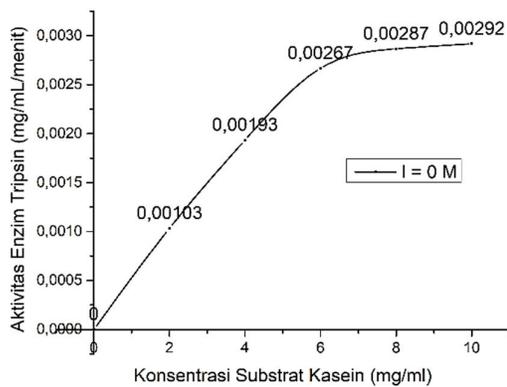
Penentuan kadar protein dalam tripsin didasarkan pada persamaan garis linear yang diperoleh dari prosedur sebelumnya. Penentuan kadar protein diawali dengan mengukur nilai absorbansi dari enzim tripsin pada panjang gelombang maksimum 720 nm dengan metode Lowry modifikasi. Absorbansi yang diperoleh adalah 0,226 yang kemudian nilai absorbansi larutan enzim tripsin ini dimasukkan ke dalam persamaan garis linear dari kurva baku yang diperoleh dari prosedur sebelumnya. Sehingga konsentrasi protein (kasein) dalam enzim tripsin adalah 0,071 mg/mL.

Penentuan aktivitas enzim tripsin terhadap variasi substrat kasein tanpa penambahan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dilakukan pada kondisi optimum yaitu pada pH 8, suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , dan waktu inkubasi 20 menit. prosedur didasarkan pada metode Anson modifikasi dengan menggunakan 3 tabung, yaitu tabung  $T_s$  (sampel), tabung B (Blangko) dan tabung  $T_k$  (kontrol). Prosedur ini dilakukan masing-masing sebanyak tiga kali (*triplo*). Aktivitas enzim tripsin pada beberapa konsentrasi substrat kasein (tabel 1), menunjukkan bahwa

aktivitas enzim tripsin mula-mula meningkat secara signifikan sejalan dengan meningkatnya konsentrasi substrat kasein, sampai pada konsentrasi substrat kasein 9 mg/mL, tetapi tidak signifikan setelah konsentrasi substrat kasein ditingkatkan menjadi 10 mg/mL. Plot grafik hubungan konsentrasi substrat kasein dan aktivitas enzim tripsin dapat dilihat pada gambar 2.

Tabel 1. Aktivitas Enzim Tripsin Tanpa Pengaruh Inhibitor

Konsentrasi Substrat (mg/mL)	Aktivitas Enzim Tripsin (mg/mL/menit)
2	0,00103
4	0,00193
6	0,00267
8	0,00287
10	0,00292



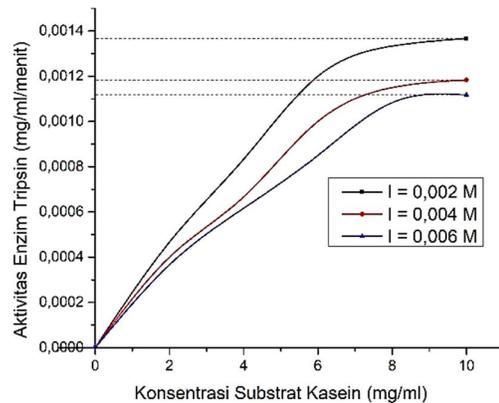
Gambar 2. Hubungan Aktivitas Enzim (V) dan Konsentrasi Substrat Kasein [S] tanpa inhibitor  $\text{Cu}^{2+}$

Prosedur yang dilakukan untuk menentukan aktivitas enzim tripsin terhadap variasi substrat kasein dengan penambahan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  pada kondisi optimum sama dengan prosedur sebelumnya. Perbedaannya 0,5 mL buffer fosfat diganti dengan larutan 0,5 mL  $\text{CuCl}_2$  dengan berbagai konsentrasi, yaitu 0,002; 0,004; dan 0,006 M. Aktivitas enzim tripsin pada beberapa konsentrasi substrat dan dengan penambahan beberapa konsentrasi ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  (tabel 2), menunjukkan bahwa mula-mula aktivitas meningkat secara signifikan sejalan dengan meningkatnya konsentrasi substrat kasein. Aktivitas enzim tripsin juga mengalami

penurunan dengan adanya penambahan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dan semakin menurun sejalan dengan meningkatnya konsentrasi ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  yang ditambahkan. Sehingga menunjukkan bahwa ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  merupakan inhibitor yang menghambat aktivitas enzim tripsin terhadap substrat kasein. Plot grafik hubungan konsentrasi substrat kasein dan aktivitas enzim tripsin dengan penambahan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dapat dilihat pada gambar 3.

Tabel 2. Aktivitas Enzim Tripsin dengan Inhibitor  $\text{Cu}^{2+}$

Variasi Konsentrasi Substrat (mg/mL)	Aktivitas Enzim Tripsin (mg/mL/menit)		
	$\text{Cu}^{2+} = 0,002 \text{ M}$	$\text{Cu}^{2+} = 0,004 \text{ M}$	$\text{Cu}^{2+} = 0,006 \text{ M}$
2	0,00047	0,00040	0,00037
4	0,00083	0,00067	0,00062
6	0,00120	0,00100	0,00085
8	0,00133	0,00115	0,00108
10	0,00137	0,00118	0,00112



Gambar 3. Hubungan Aktivitas Enzim (V) dan Konsentrasi Substrat Kasein [S] penambahan inhibitor  $\text{Cu}^{2+}$

Aktivitas enzim tripsin yang mula-mula meningkat secara signifikan sebanding dengan meningkatnya konsentrasi substrat, tetapi tidak signifikan setelah konsentrasi substrat ditingkatkan lagi. Hal ini terjadi karena aktivitas enzim akan meningkat dengan bertambahnya konsentrasi substrat [S], akan tetapi setelah [S] meningkat lebih lanjut akan sampai pada kecepatan yang tetap. Pada kondisi dimana kecepatan reaksi enzimatik tidak dapat bertambah lagi dengan

bertambahnya  $[S]$  disebut kecepatan maksimum ( $V_{maks}$ ) (Wiesman, 1989).

Penentuan  $V_{maks}$  menghasilkan gambaran tentang sifat-sifat kinetika enzim lain,  $\frac{1}{2} V_{maks}$ , yaitu suatu konsentrasi substrat yang separuh lokasi aktifnya telah terisi atau bila kecepatan reaksi enzimatik telah mencapai setengah dari kecepatan maksimum, yang dikenal dengan  $K_m$  (tetapan Michaelis-Menten).

Nilai parameter  $V_{maks}$  dan  $K_m$  kinetika enzim dapat ditentukan dengan cara menghubungkan aktivitas enzim ( $V$ ) dengan konsentrasi substrat  $[S]$  yang merupakan grafik kurva Michaelis-Menten.

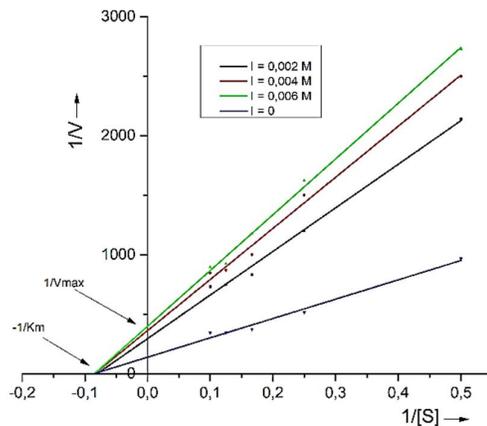
Nilai parameter  $K_m$  dan  $V_{maks}$  sulit ditentukan dengan grafik kurva tersebut. Persamaan Michaelis-Menten dapat ditransformasikan secara aljabar menjadi bentuk lain yang lebih bermanfaat di dalam pemetaan data percobaan. Suatu transformasi yang umum dilakukan diturunkan secara sederhana dengan membuat kebalikan dari kedua sisi persamaan Michaelis-Menten (Lehninger, 1982).

Langkah pertama yang dilakukan untuk menentukan nilai  $V_{maks}$  dan  $K_m$  adalah transformasi data  $[S]$  dan ( $V$ ) yang telah diperoleh sebelumnya (tabel 1 dan tabel 2) menjadi  $1/[S]$  dan  $1/V$ . Data  $1/[S]$  dan  $1/V$  dapat dilihat pada tabel 3. Plot grafik hubungan antara  $1/V$  dan  $1/[S]$  berdasarkan data pada tabel 3 dan menggunakan regresi linear sehingga diperoleh grafik *Lineweaver-Burk*. Penentuan  $V_{maks}$  dan  $K_m$  didasarkan atas persamaan garis regresi grafik *Lineweaver-Burk* (gambar 4). Selanjutnya dari persamaan regresi tersebut, maka diperoleh nilai  $1/V_{maks}$  sehingga diperoleh nilai  $V_{maks}$  dan diperoleh  $K_m/V_{maks}$  sehingga diperoleh

nilai  $K_m$ . Hasil perhitungan yang diperoleh disajikan pada tabel 4.

Tabel 3. Data Konversi ( $V$ ) Menjadi  $1/V$  dan  $[S]$  Menjadi  $1/[S]$

$1/[S]$	$Cu^{2+} = 0$	$Cu^{2+} = 0,002 M$	$Cu^{2+} = 0,004 M$	$Cu^{2+} = 0,006 M$
	$1/V$	$1/V$	$1/V$	$1/V$
0,500	967,7419	2142,8571	2500,0000	2727,2727
0,250	517,2414	1200,0000	1500,0000	1621,6216
0,1667	375,0000	833,3333	1000,0000	1176,4706
0,1250	348,8372	750,0000	869,5652	923,0769
0,1000	342,8571	731,7073	845,0704	895,5224



Gambar 4. Hubungan Antara  $1/V$  dan  $1/[S]$

Tabel 4. Data Persamaan Regresi,  $V_{maks}$  dan  $K_m$

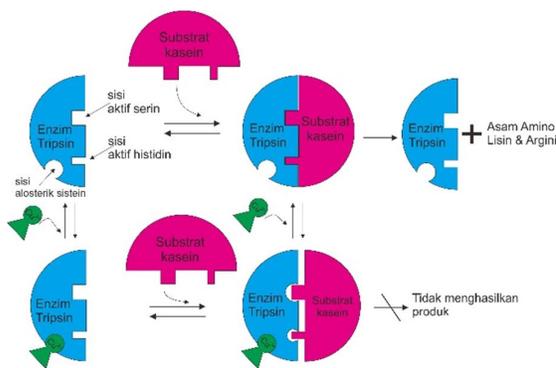
$[I]$ $Cu^{2+}$ (M)	Persamaan Regresi	$1/V_{maks}$	$V_{maks}$ (mg/mL/menit)	$K_m/V_{maks}$	$K_m$ (mg/mL)
0	$Y = 139,4 + 1624,5X$	139,4	$7,173 \times 10^{-3}$	1624,5	11,6
0,002	$Y = 295,36 + 3662,3X$	295,36	$3,385 \times 10^{-3}$	3662,3	12,39
0,004	$Y = 362,75 + 4292,8X$	362,75	$2,756 \times 10^{-3}$	4292,8	11,83
0,006	$Y = 398,58 + 4687,1X$	398,58	$2,2508 \times 10^{-3}$	4687,1	11,75

Berdasarkan grafik pada gambar 4 diperlihatkan bahwa sekumpulan garis hasil dari pemetaan kebalikan ganda data tanpa adanya inhibitor dan dengan tiga konsentrasi inhibitor ion logam  $Cu^{2+}$  memiliki titik potong yang sama pada sumbu  $1/[S]$  atau berada pada nilai  $-1/K_m$ , menunjukkan bahwa nilai  $K_m$  bagi substrat kasein relatif tidak berubah. Titik potong pada sumbu  $1/V$  atau pada nilai  $1/V_{maks}$  meningkat sejalan dengan penambahan

konsentrasi inhibitor ion logam  $\text{Cu}^{2+}$ , sehingga nilai  $V_{\text{maks}}$  menurun.

Data pada tabel 4 hasil dari perhitungan substitusi persamaan regresi linear dari gambar 4, diperoleh nilai  $V_{\text{maks}}$  yang relatif mengalami penurunan, dan nilai  $K_m$  yang relatif tidak berubah (Lehninger, 1982: 256). Hal ini menunjukkan bahwa jenis inhibisi ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dalam bentuk senyawa  $\text{CuCl}_2$  bersifat tidak bersaing atau non kompetitif (Anna, 2006)

Inhibitor ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  sebagai inhibitor non kompetitif berikatan secara dapat balik pada molekul enzim tripsin bebas dan kompleks enzim tripsin-substrat kasein, membentuk kompleks Cu-Tripsin dan Cu-Tripsin-Kasein yang tidak aktif. Reaksi antara  $\text{Cu}^{2+}$ , tripsin dan kasein dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Reaksi Enzim Tripsin, Substrat Kasein dan Ion logam  $\text{Cu}^{2+}$

Ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  bukan berikatan pada sisi aktif tripsin melainkan pada sisi allosterik yaitu gugus sistein yang memiliki gugus  $-\text{SH}$  (Wirahadikusuma, 1977). Reaksi  $\text{Cu}^{2+}$  dengan gugus sistein pada tripsin dituliskan sebagai berikut:



Hasil penelitian ini memperlihatkan secara empiris bahwa ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  bersifat inhibitor non kompetitif terhadap

kinetika enzim tripsin pada substrat kasein. Hasil penelitian ini menjadi informasi penting bagi kesehatan dan ilmu biokimia mengenai spesifisitas substrat enzim, sifat-sifat alamiah gugus fungsional pada sisi aktif dan alosterik, mekanisme katalitik enzim, serta untuk menunjang penelitian selanjutnya.

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

Nilai parameter  $K_m$  masing-masing pada kondisi aktivitas enzim tripsin tanpa dan dengan penambahan inhibitor ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dalam bentuk senyawa  $\text{CuCl}_2$  konsentrasi 0,002; 0,004 M; dan 0,006 M secara berturut-turut adalah 11,65; 12,39; 11,83; dan 11,75 mg/mL sedangkan nilai  $V_{\text{maks}}$  secara berturut-turut sebesar  $7,173 \times 10^{-3}$ ;  $3,385 \times 10^{-3}$ ;  $2,756 \times 10^{-3}$ ; dan  $2,251 \times 10^{-3}$  mg/ml/menit

Penambahan ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  dalam bentuk senyawa  $\text{CuCl}_2$  dengan variasi konsentrasi 0,002; 0,004; dan 0,006 M terhadap aktivitas enzim tripsin dengan substrat kasein menunjukkan bahwa ion logam  $\text{Cu}^{2+}$  merupakan inhibitor non kompetitif. hal ini dapat lihat dari nilai  $K_m$  yang relatif tidak berubah dan Nilai  $V_{\text{maks}}$  relatif mengalami penurunan.

## DAFTAR PUSTAKA

Anna Poedjiadi dan F.M. Titin Supriyanti. (2006). Dasar-dasar Biokimia. rev.ed. Jakarta: UI Press

Cabeza M. S., Baca F. L., Puentes E. M., Loto F., and Baigori M. D., 2011, Selection of Psychrotolerant Microorganism Producing Cols-Active Pectinases for

- Biotechnological Process at Low Temperature, *Journal of Food Technology and Biotechnology*, 49.2, pp 187–195
- Cipolati E. P., Jose M. A. S., Klein M., Feddern V., Manuella M. C. F., Vladimir J. O., Ninow J. L., and Oliveira D., 2014, Current Status and Trends in Enzymatic Nanoimmobilization, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 99, pp 56–67.
- Dinu, D. 2001. Enzymatic hydrolysis of pectic acid and pectins by polygalacturonase from *Aspergillus niger*. *Roum. Biotechnol.*, 6 (5) : 397-402.
- Eddy S., dkk. 2017. Karakterisasi Beberapa Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim Tripsin. Yogyakarta: Jurnal Penelitian Saintek, Vol. 21, Nomor 2, Oktober 2016
- Fayyaz, A., B.A. Asbi, H.M. Ghazali, Y.B. Che-Man and S. Jinap. 1995. Kinetics of papaya pectinesterase. *Food Chemistry*, 53 : 129-135.
- Ganda Putra. 2009. Penentuan Kinetika Enzim Poligalakturonase (Pg) Endogenous Dari Pulp Biji Kakao. Bali: Jurnal Biologi Volume Xiii No.1 Juni 2009
- Green, N. M., & Neurath, H. (1953). The effects of divalent cationson trypsin. *Journal of Biological Chemistry*, 204 (1), 379-390.
- Lehninger., 1982., *Dasar-Dasar Biokimia*, Erlangga: Jakarta.
- Wirahadikusumah, M. (1977). *Biokimia: Protein, Enzim dan Asam Nukleat*. Bandung: ITB
- Nurul Dwi Safitri. 2017. Pengaruh Penambahan Ion Logam Tembaga(II) terhadap Aktivitas Enzim Tripsin pada Kondisi Optimum. Yogyakarta: FMIPA UNY
- Titik Tri Wijayanti. 2017. Pengaruh Penambahan Ion Logam  $Ag^{2+}$  terhadap Aktifitas Enzim Tripsin. Yogyakarta: FMIPA UNY
- Togu Gultom. (2011). *Enzimologi*. Yogyakarta: UNY.
- Tong Zhang dkk. Interaction of Cu(2+), Pb (2+), Zn (2+) with Trypsin: What is the Key Factor of their Toxicity?. *Article In Journal Of Fluorescence* October 2014
- Whitaker, J. R. 1996. *Enzymes*. In O. R. Fennema (Ed.). *Food Chemistry*. 3 Edition. Maecel Dekker, Inc., New York
- Wiseman, A. 1989. *Handbook of Enzymes Biotechnology* 2nd Edition. Ellis Howard, New York.
- Wulansari D, Wahyuntari B, Trismilah, Nurhasanah A. 2012. The effect of Growth Medium pH toward Trypsin-Like Activity Produced by Lactic Acid Bacteria. *Microbiology*. vol 6, No 2, June 2012, p 49-56
- Wuryanti isolasi dan penentuan aktivitas spesifik enzim bromelin. *JKSA* Vol.VII.No.3 Desember 2004