



Pengantar Ilmu Biokimia

(Asam amino, Protein, Asam Nukleat
dan Enzim)

Jilid I

Dr. Emmy Yuanita
Diah Miftahul Aini, M.Si
Baiq Nila Sari Ningsih, M.Sc



PENGANTAR ILMU BIOKIMIA
(Asam, Protein, Asam Nukleat dan
Enzim)
Jilid I

Dr. Emmy Yuanita, S.Si., M.Si.
Biq Nila Sari Ningsih, S.Pd., M.Sc.
Maulidia Septiyana, S.Si., M.Si.
Ahmad Nizam
Dian Ismu Wardani
Restu Agung Ramadhani

LPPM Unram Press

PENGANTAR ILMU BIOKIMIA

(Asam, Protein, Asam Nukleat dan Enzim)

ISBN : 978-623-8331-11-6

iv + 116 hlm. Ukuran 18 cm x 26 cm (Unesco)

Penulis : Dr. Emmy Yuanita, S.Si., M.Si.
Biq Nila Sari Ningsih, S.Pd., M.Sc.
Maulidia Septiyana, S.Si., M.Si.
Ahmad Nizam
Dian Ismu Wardani
Restu Agung Ramadhani

Editor : Ishak
Tata Letak dan Desain Cover : Tim LPPM Unram Press

Penerbit : **LPPM Unram Press**

Jalan Pendidikan No. 37, Mataram, Nusa Tenggara Barat, 83125

Telp 0370-641552, 638265

Fax 0370-638625

e-mail : sentra-hki@unram.ac.id

website : <https://penerbit.lppm.unram.ac.id/>

Cetakan Pertama, Juni 2025

Hak Cipta dilindungi undang-undang dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk dan dengan cara apapun tanpa ijin tertulis dari penerbit

© 2024 Emmy Yuanita

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat-Nya, sehingga buku ini dapat diselesaikan dengan baik. Buku ini disusun untuk membantu mahasiswa memahami dasar-dasar ilmu biokimia dengan lebih mendalam. Biokimia sebagai disiplin ilmu yang penting dalam kehidupan memberikan wawasan tentang biomolekul yang mendasari berbagai proses biologis. Dengan penyajian yang sistematis dan mudah dipahami, buku ini bertujuan untuk membantu pembaca menguasai materi biokimia dan mengaplikasikannya dalam konteks akademik maupun praktis.

Buku ini membahas topik-topik utama dalam biokimia, termasuk asam amino, protein, asam nukleat (DNA dan RNA), serta enzim. Kami menjelaskan prinsip dasar struktur dan fungsi molekul-molekul tersebut, proses biosintesis, serta reaksi kimia yang terjadi dalam tubuh untuk mendukung berbagai fungsi vital. Melalui pendekatan yang jelas dan dilengkapi dengan contoh praktis, diharapkan mahasiswa tidak hanya memahami teori biokimia, tetapi juga dapat mengaplikasikannya dalam penelitian dan praktik ilmiah.

Kami menyadari bahwa biokimia adalah bidang yang kompleks, namun dengan penyajian yang terstruktur, kami yakin mahasiswa dapat dengan mudah memahami dan menguasainya. Buku ini diharapkan dapat menjadi sumber yang berguna untuk memperdalam pemahaman biokimia serta memberikan dasar yang kuat bagi studi lebih lanjut di bidang biologi atau ilmu kesehatan. Semoga buku ini bermanfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan dan kemajuan pendidikan di bidang biokimia.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI.....	iii
BAB I ASAM AMINO	1
Pendahuluan.....	1
1.1. Pengertian dan Struktur Asam Amino.....	2
1.2. Zwitter Ion.....	4
1.3. Klasifikasi Asam Amino.....	5
1.4. Sifat Sifat Asam Amino	9
Rangkuman.....	12
Tugas Latihan	13
BAB II PROTEIN.....	14
Pendahuluan.....	14
2.1. Ikatan Peptida	14
2.2. Struktur Protein	15
2.3. Protein dan Klasifikasinya.....	23
2.4. Penentuan Kadar Protein	25
Rangkuman.....	28
Soal Latihan.....	29
BAB III ASAM NUKLEAT, DNA, DAN RNA	30
Pendahuluan.....	30
3.1. Mononukleotida	30
3.2. Nukleosida dan Nukleotida	33
3.3. Polinukleotida	35
3.4. Pemutusan asam nukleat.....	36
3.5. DNA (Asam Deoksiribonukleat).....	39
3.6. Asam Ribonukleat (RNA).....	43
Rangkuman.....	47
Soal Latihan.....	48

BAB IV BIOSINTESIS PROTEIN	49
Pendahuluan.....	49
4.1. Transkripsi: Menyalin Informasi DNA menjadi RNA.....	49
4.2. Translasi: Menerjemahkan Informasi RNA menjadi Protein	52
Rangkuman	56
Soal Latihan.....	57
BAB V ENZIM.....	58
Pendahuluan.....	58
5.1. Tata Nama dan Klasifikasi Enzim	60
5.2. Fungsi dan Mekanisme Molekuler Enzim	64
5.3. Pemurnian Enzim	72
5.4. Langkah-langkah Utama Pemurnian Protein	74
5.5. Kinetika Enzim.....	95
Rangkuman	109
Soal Latihan.....	110

BAB I

ASAM AMINO

Pendahuluan

Asam amino adalah molekul organik yang memiliki peran mendasar dalam berbagai proses biologis di dalam tubuh makhluk hidup. Sebagai unit penyusun utama protein, asam amino memiliki signifikansi besar dalam struktur, fungsi, dan metabolisme organisme. Protein, yang dibangun dari rangkaian asam amino, tidak hanya berfungsi sebagai komponen struktural tubuh seperti otot, kulit, dan rambut, tetapi juga sebagai katalisator reaksi biokimia, pembawa sinyal, dan elemen penting dalam sistem imun.

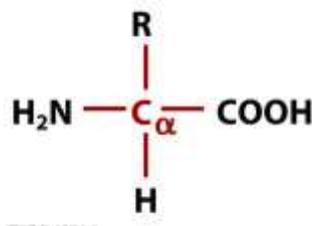
Dalam dunia biokimia, asam amino didefinisikan sebagai senyawa yang mengandung gugus amino ($-NH_2$) dan gugus karboksil ($-COOH$) yang terikat pada atom karbon alfa. Selain itu, variasi dalam rantai samping (R) yang terhubung pada atom karbon alfa memberikan karakteristik unik pada masing-masing jenis asam amino. Ada 20 jenis asam amino yang umumnya ditemukan dalam protein organisme hidup, yang dapat diklasifikasikan menjadi esensial dan non-esensial berdasarkan kemampuan tubuh untuk mensintesisnya.

Pentingnya asam amino tidak terbatas pada fungsinya sebagai pembangun protein. Banyak asam amino berperan dalam berbagai proses metabolisme, seperti siklus urea, sintesis neurotransmitter, dan produksi energi. Dalam industri farmasi dan makanan, asam amino juga menjadi bahan utama dalam pembuatan suplemen, obat-obatan, dan bahan aditif pangan.

Pendalaman ilmu tentang asam amino juga memiliki implikasi besar dalam berbagai bidang, mulai dari kesehatan, nutrisi, bioteknologi, hingga penelitian genetik. Misalnya, pemahaman tentang pola metabolisme asam amino tertentu dapat memberikan wawasan tentang penyakit metabolik atau gangguan genetik tertentu.

1.1. Pengertian dan Struktur Asam Amino

Asam amino merupakan senyawa yang mempunyai gugus karboksil (-COOH), amina (-NH₂) dan rantai samping (-R). Kehadiran rantai samping ini membantu membedakan satu asam amino dengan asam amino lainnya. Strukturnya adalah sebagai berikut:



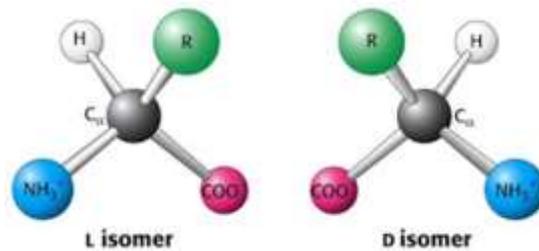
Gambar 1. Struktur Asam Amino

Dalam biokimia, pengertian atau definisi asam amino sering disebut dengan senyawa yang mengikat karboksil dan amina dengan atom karbon (C) yang sama disebut “alpha” atom karbon α. Gugus karboksil memberikan sifat asam dan gugus amino memberikan sifat basa. Asam amino merupakan salah satu golongan senyawa yang paling banyak dipelajari karena salah satu fungsinya sangat penting bagi organisme, terutama sebagai penyusun protein (*building blocks*). Sebagai building blocks atau kerangka dasar beberapa senyawa penting dalam metabolisme (vitamin, hormon, dan asam

nukleat) serta pengikat ion logam penting yang diperlukan untuk reaksi enzimatik (kofaktor).

Tata Nama dan Stereoisomer Asam Amino

Tata nama dan stereoisomer asam amino sangat penting untuk penamaan. Jika gugus NH_3^+ berada disebelah kanan maka penamaan diawali D-gliseraldehid, jika disebelah kiri penamaannya diawali L sesuai dengan Gambar 2. Semua asam amino secara alami mempunyai konfigurasi L. Ada beberapa asam amino penting secara struktural dan metabolik yang memiliki konfigurasi D, yaitu D-alanin dan D-glutamat, yang menjadi penyusun dinding sel bakteri.



Gambar 2. Stereoisomer asam amino

Asam amino esensial berjumlah 20, penulisannya dapat disingkat menjadi 3 huruf. Contohnya : Alanin (Ala), Glysin (Gly), Triptofan (Trp), dan lain lain.

Stereoisomer adalah senyawa yang mempunyai struktur ruang sama tetapi letak unsur-unsur penyusunnya berbeda. Stereoisomer dibagi menjadi enantiomer dan diastereomer. Enantiomer merupakan isomer bayangan cermin dari senyawa kiral, dalam hal ini asam amino kecuali glisin, seperti pada Gambar 2 memiliki isomer optik L dan D. Cara sederhana untuk menentukan isomer ini dari gambar dua dimensi yaitu dengan

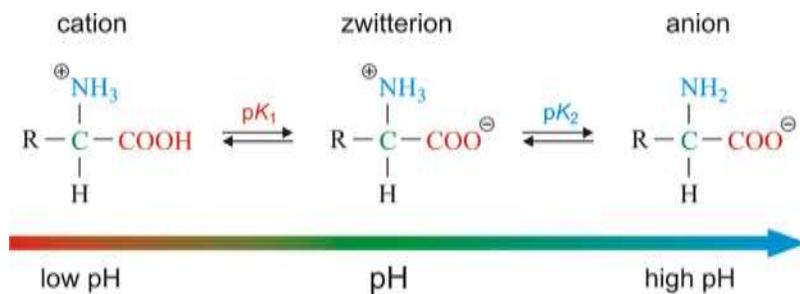
“mendorong” atom ke arah belakang dari pembaca (keluar dari pembaca). Jika searah jarum jam (perputarna searah jarum jam) terjadi barisan karboksil-residu-amino maka termasuk tipe D. Jika urutan ini berlawanan jarum jam maka tipe L. Sedangkan diastereomer adalah isomer bukan bayangan cermin dari senyawa tersebut.

1.2. Zwitter Ion

Asam amino di dalam larutan bersifat amfoter: bersifat asam pada larutan basa dan bersifat basa pada larutan asam. Hal ini terjadi karena asam amino mempunyai kemampuan untuk menjadi zwitter-ion. Asam amino memiliki gugus amino dan gugus karboksil yang aktif, yang dapat dianggap sebagai asam dan basa (walaupun pH alaminya seringkali dipengaruhi oleh gugus R yang dimilikinya). Pada pH tertentu yang disebut titik isoelektrik, asedangkan gugus karboksil menjadi bermuatan negative (deprotonasi- COO^-).

Titik isoelektrik ini memiliki sifat tertentu tergantung pada jenis asam aminonya. Dalam kasus seperti ini, asam amino dikatakan dalam bentuk zwitter-ion.

Kebanyakan asam amino bebas ada sebagai zwitter-ion pada pH fisiologis netral atau mendekati netral.



Gambar 3. Bentuk zwitter-ion asam amino

Keadaan isoelektrik → pH isoelektrik (Pi) adalah nilai antara pk1 dan pk2. Contoh: Alanin, pk1 = 2,35 (karboksil) pk2 = 9,69 (amino) maka Pi = $(2,35+9,69)/2 = 6,0$

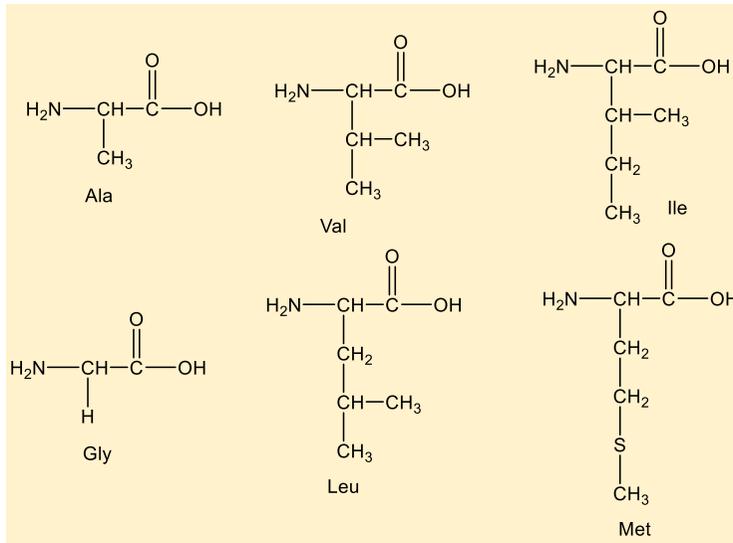
1.3. Klasifikasi Asam Amino

Berikut adalah 20 asam amino penyusun protein. Biasanya asam amino ditulis dengan menggunakan 3 huruf atau satu huruf. Asam amino umumnya diklasifikasikan berdasarkan sifat kimia rantai samping dan dibagi menjadi empat kelompok, yaitu rantai samping asam lemah, basa lemah, polar (hidrofilik), dan non polar (hidrofobik).

1. Asam amino non polar

Asam amino nonpolar memiliki rantai samping yang bersifat hidrofobik, yang berarti cenderung tidak larut dalam air dan sering ditemukan di bagian dalam protein yang menghindari air. Contoh rantai samping nonpolar termasuk atom hidrogen (H), gugus metil (CH₃), gugus alkil, dan cincin aromatik.

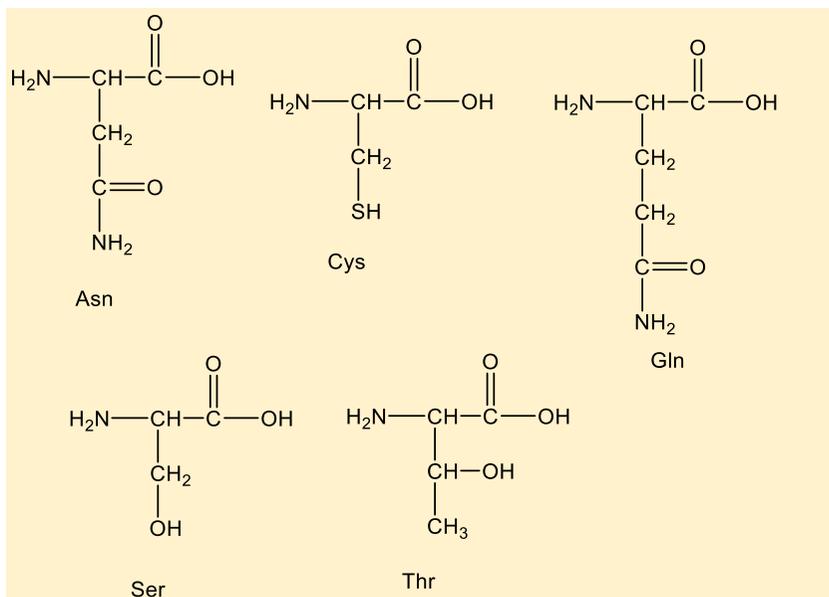
Terdiri dari : Glisin (Gly, G), Alanin (Ala, A), Valin (Val, V), Leusin (Leu, L), Isoleusin (Ile, I), dan Metionin (Met, M). Strukturnya ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Asam amino non polar

2. Asam amino polar

Asam amino non polar antara lain : Serin (Ser, S), Treonin (Thr, T), Asparagin (Asn, N), Glutamin (Gln, Q), dan Sistein (Cys, C) seperti pada Gambar 5.

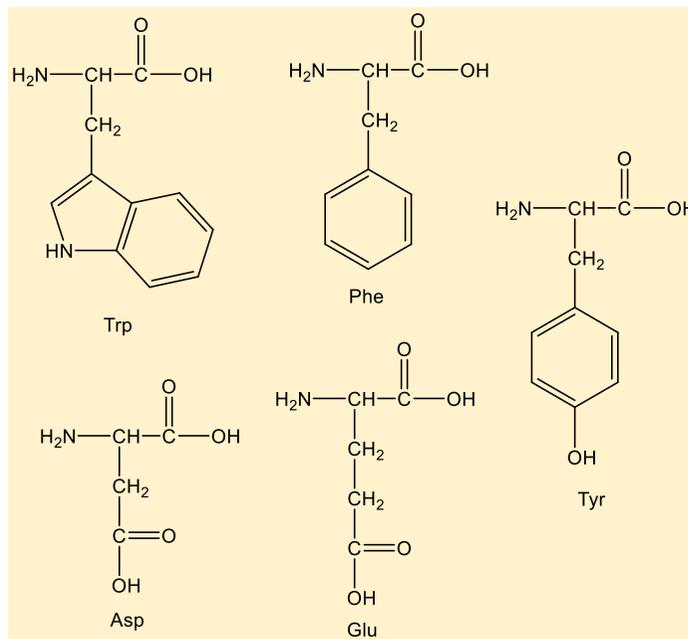


Gambar 5. Asam amino polar

Asam amino polar memiliki rantai samping yang dapat berinteraksi dengan air sehingga bersifat hidrofilik dan cenderung berada di bagian luar protein yang berinteraksi dengan lingkungan berair. Rantai samping polar mengandung gugus yang memiliki atom oksigen, sulfur, atau nitrogen yang dapat membentuk ikatan hidrogen, seperti gugus hidroksil ($-\text{CH}_2\text{OH}$), tiol ($-\text{CH}_2\text{SH}$), atau amida ($-\text{CH}_2\text{CONH}_2$).

3. Asam amino bersifat asam

Asam amino bersifat asam antara lain: Asam aspartat (Asp, D), Asam glutamat (Glu, E), Fenilalanin (Phe, F), Tirosin (Tyr, Y), Triptofan (Trp, W) dan ditunjukkan pada Gambar 6.



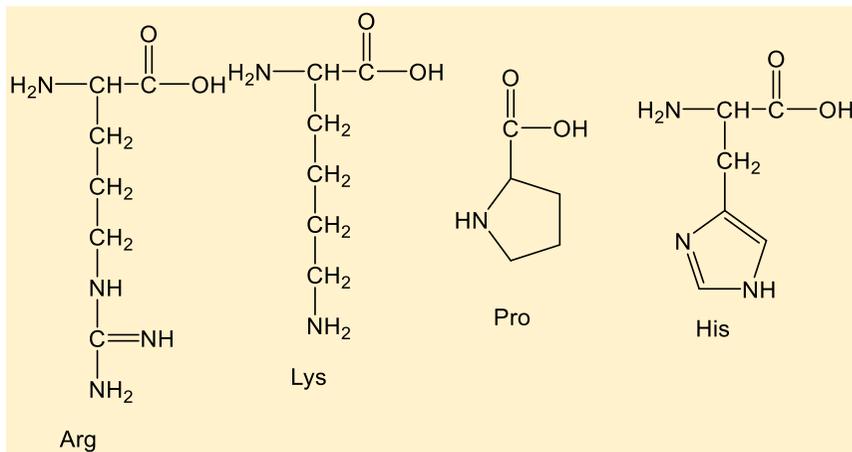
Gambar 6. Asam amino bersifat asam lemah

Gugus karboksil ($-\text{COOH}$) dalam asam amino bersifat asam karena gugus karboksil dapat melepaskan proton (H^+) ke dalam larutan, yang meningkatkan konsentrasi ion hidrogen (H^+) dan menyebabkan larutan

menjadi lebih asam. Di sisi lain, gugus amino (-NH₂) dalam asam amino bersifat basa karena gugus ini dapat menerima proton (H⁺) dari larutan, yang mengurangi konsentrasi ion hidrogen (H⁺) dan menyebabkan larutan menjadi lebih basa. Dalam larutan dengan pH netral, asam amino cenderung berada dalam bentuk zwitterion yang merupakan molekul yang memiliki muatan positif dan negatif tetapi bersifat netral secara keseluruhan. Pada kondisi ini, gugus karboksil telah melepaskan protonnya dan menjadi bermuatan negatif (-COO⁻), sedangkan gugus amino telah menerima proton dan menjadi bermuatan positif (-NH₃⁺).

4. Asam amino bersifat basa (muatan positif)

Asam amino bersifat basa (bermuatan positif) yaitu Lisin (Lys, K), Arginin (Arg, R), Histidin (His, H), Prolin (Pro, P) seperti ditunjukkan pada gambar 7.



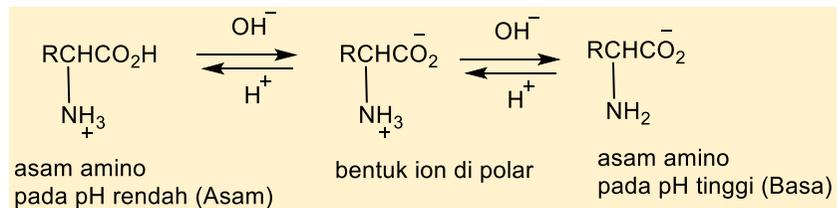
Gambar 7. Asam amino bersifat basa

1.4. Sifat Sifat Asam Amino

Beberapa sifat yang dimiliki asam amino adalah sebagai berikut:

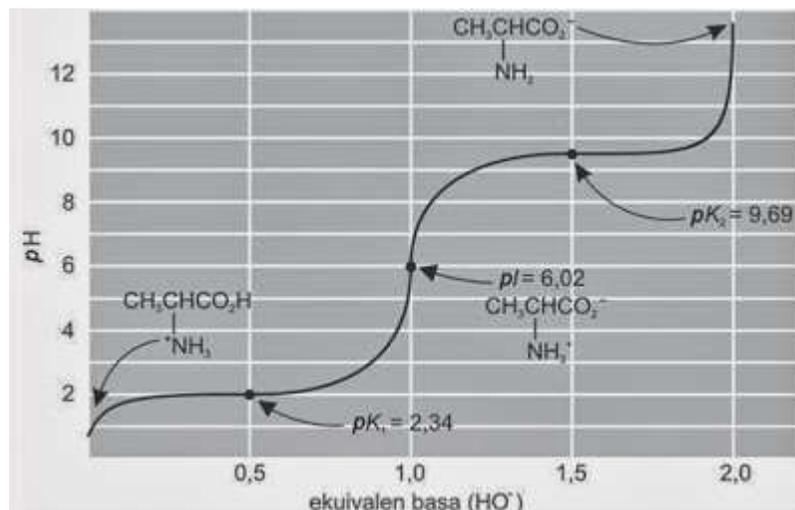
1. Sifat Asam Basa

Secara umum asam amino bersifat amfoter yaitu dapat bersifat sebagai asam dan basa. Sebagai asam dengan cara mendonasikan proton pada basa kuat, sebagai basa dengan menerima proton dari asam kuat. Asam amino dapat bersifat asam pada pH rendah, dan bersifat basa pada pH tinggi. Keseimbangan bentuk asam amino dapat dilihat pada Gambar 8 dibawah ini.



Gambar 8. Keseimbangan Asam Basa pada Asam Amino

Kurva titrasi alanin sebagai salah satu contoh kesetimbangan asam amino.



Gambar 9. Kurva Titrasi Alanin

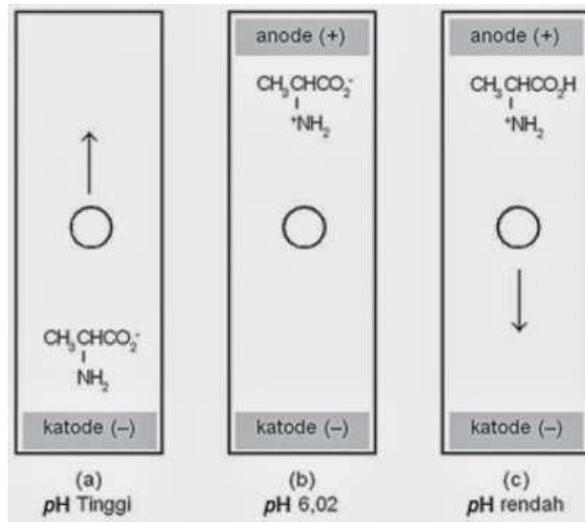
Kurva diatas menunjukkan bahwa pada larutan asam (pH rendah) alanin berbentuk ion amonium tersubstitusi, pada larutan basa alanin berbentuk ion karboksilat tersubstitusi. Pada pI (*Isoelectric point*) atau titik isoelektrik yaitu alanin berada pada kondisi ion dipolar dengan nilai 6,02.

Secara umum, asam amino yang mempunyai satu gugus amonio dan satu gugus karboksilat serta tidak mempunyai gugus asam atau basa pada strukturnya, mempunyai nilai pK_a sekitar 2-3. Hal ini menunjukkan proton yang lepas dari gugus karboksil dan nilai pK_a sekitar 9-10 menunjukkan proton yang lepas dari ion amonium, dan memiliki titik isoelektrik (pI) diantara dua nilai pK_a yaitu sekitar 6.

2. Muatan Positif dan Negatif Asam Amino

Muatan positif dan negatif pada asam amino dapat disebabkan oleh pH lingkungannya. Asam amino yang mempunyai muatan yang berbeda dapat dipisahkan berdasarkan perbedaan muatan. Dengan metode elektroforesis. Dalam metode elektroforesis, campuran asam amino dimasukkan dalam penyangga padat misalnya kertas dan penyangga tersebut ditetesi dengan larutan hingga basah dengan mengatur nilai pH. Kemudian dialiri arus listrik. Asam amino yang bermuatan positif akan menuju ke katoda (bermuatan negatif). Sebaliknya, asam amino yang bermuatan negatif akan menuju ke anoda (bermuatan positif). Pergerakan ini berhenti jika muatan listrik dihentikan.

Gambar dibawah ini menunjukkan hasil percobaan elektroforesis asam amino alanin.

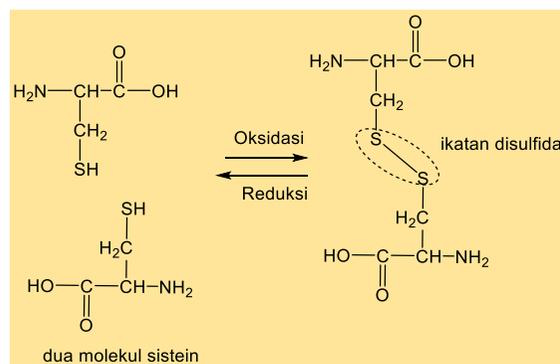


Gambar 10. Elektroforesis pada asam amino alanin

Perpindahan asam amino alanin pada elektroforesis tergantung pada pH. Saat pH tinggi alanin dapat bermuatan negatif dan menuju ke anoda (bermuatan positif) gambar 10b, melainkan pada pH rendah alanin dapat bermuatan positif dan menuju ke katoda (bermuatan negatif) gambar 10c.

3. Ikatan disulfida pada Asam Amino

Ikatan disulfida terbentuk dari ikatan tunggal S-S dari 2 molekul asam amino sistein. Gambar 11 dibawah ini menunjukkan pembentukan ikatan disulfida.



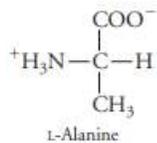
Gambar 11. Pembentukan ikatan disulfida

Rangkuman

Asam amino adalah molekul organik yang berperan penting dalam tubuh makhluk hidup, terutama sebagai penyusun utama protein yang mendukung struktur tubuh, metabolisme, dan sistem imun. Terdiri dari gugus amino ($-\text{NH}_2$), karboksil ($-\text{COOH}$), dan rantai samping ($-\text{R}$) yang unik, asam amino bersifat amfoter dengan kemampuan menjadi asam atau basa bergantung pada pH lingkungan. Terdapat 20 jenis asam amino yang diklasifikasikan menjadi esensial dan non-esensial serta berdasarkan sifat rantai sampingnya: non-polar, polar, asam, atau basa. Dalam kondisi tertentu, asam amino dapat membentuk zwitter-ion dengan muatan positif dan negatif yang seimbang. Sifat ini memungkinkan pemisahan asam amino melalui metode elektroforesis. Selain itu, asam amino membentuk ikatan disulfida yang penting dalam struktur protein.

Tugas Latihan

1. Sebutkan 20 jenis asam amino yang esensial bagi tubuh!
2. Jelaskan ciri-ciri asam amino polar?
3. Mengapa asam amino dikatakan sebagai zwitter ion?
4. Hitung nilai pKl dari histidin!
5. Asam amino (kecuali glisn) merupakan senyawa kiral, yang mempunyai karbon kiral dan isomer optik atau enansiomer. Perhatikan gambar di bawah ini. Tandai karbon kiral dan gambarkan struktur D-alanin



BAB II PROTEIN

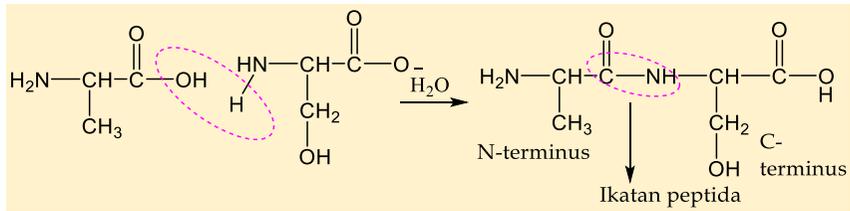
Pendahuluan

Asam amino merupakan *building block* dari protein, dan menjadi unit terkecil pembentukan makromolekul dalam ilmu biokimia. Dalam ilmu biokimia memahami peranan biokimia dalam biologi dan memerlukan pemahaman tentang unsur-unsur kimia penyusun biomolekul serta struktur dan fungsi dari ratusan senyawa biomolekul dalam kehidupan.

Pada bab sebelumnya, telah dipelajari tentang asam amino, sifat, dan klasifikasinya. Pada bab ini akan dibahas mengenai interaksi antar asam amino untuk membentuk molekul yang besar yaitu protein. Secara rinci akan dibahas mengenai pembentukan ikatan peptida, sifat-sifat pada ikatan peptida untuk membentuk protein dan klasifikasi serta reaksi pada protein.

2.1. Ikatan Peptida

Penghubung antara asam amino satu dengan asam amino lainnya adalah ikatan peptida. Ikatan peptida adalah ikatan yang terbentuk ketika atom karbon dari gugus karboksil dalam satu molekul berbagi elektron dengan atom nitrogen dari gugus amina di molekul lain. Gambar 12 dibawah ini menunjukkan reaksi kondensasi pada pembentukan ikatan peptida. Reaksi kondensasi ditandai dengan terlepasnya molekul air ketika reaksi terjadi. Hasil akhir berupa terbentuknya ikatan CO-NH dan menghasilkan molekul yang disebut amida.



Gambar 12. Reaksi Kondensasi pembentukan ikatan peptida

Pembentukan protein melibatkan beberapa rangkaian asam amino, asam amino mempunyai N terminal dan C terminal. Asam amino yang masih memiliki gugus amino dalam rangkaian protein disebut N terminal sedangkan yang masih mempunyai gugus karboksilat dinamakan C terminal.

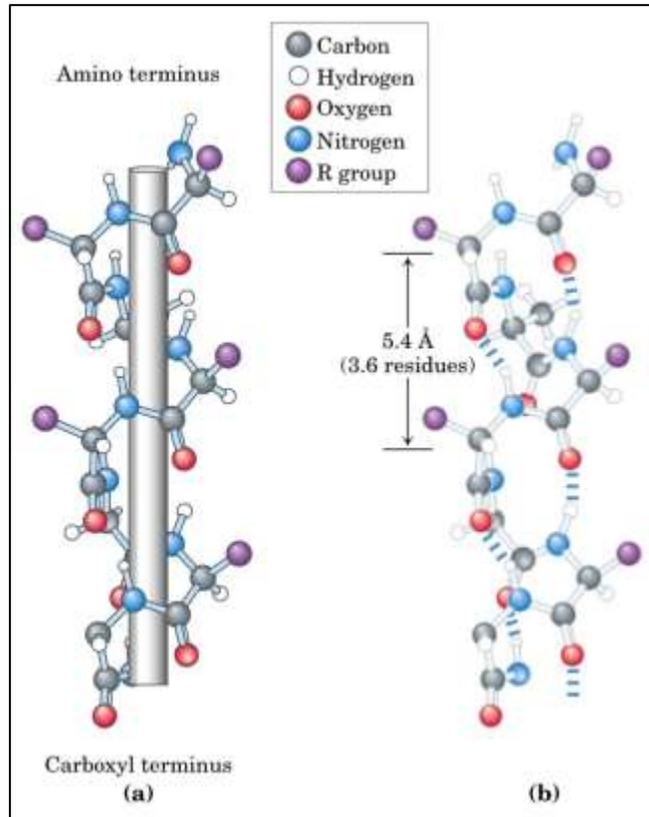
Terminologi penamaan asam amino sebagai berikut: Penggabungan dua asam amino disebut dipeptida, tiga asam amino disebut tripeptida, empat asam amino disebut tetrapeptida. Gabungan asam amino 2 sampai 20 asam amino disebut olipopeptida dan kurang dari 100 asam amino disebut polipeptida. Ikatan peptida dapat diputus dengan reaksi hidrolisis, dengan penambahan air dan reaksi ini dapat dilakukan secara spontan dan lambat. Hasil pemutusan tersebut melepaskan energi sebesar 10 kJ/mol.

2.2. Struktur Protein

Struktur protein terdiri dari beberapa tingkat organisasi, yaitu struktur primer, sekunder, tersier, dan kuartener. Struktur primer protein adalah urutan linear asam amino yang dihubungkan oleh ikatan peptida. Urutan ini ditentukan oleh informasi genetik yang dikodekan dalam DNA. Setiap asam amino dalam rantai polipeptida dihubungkan oleh ikatan peptida yang terbentuk melalui reaksi kondensasi antara gugus karboksil dari satu asam amino dengan gugus amina dari asam amino berikutnya. Struktur primer menentukan sifat dan fungsi akhir protein karena urutan asam amino menentukan bagaimana rantai polipeptida akan melipat

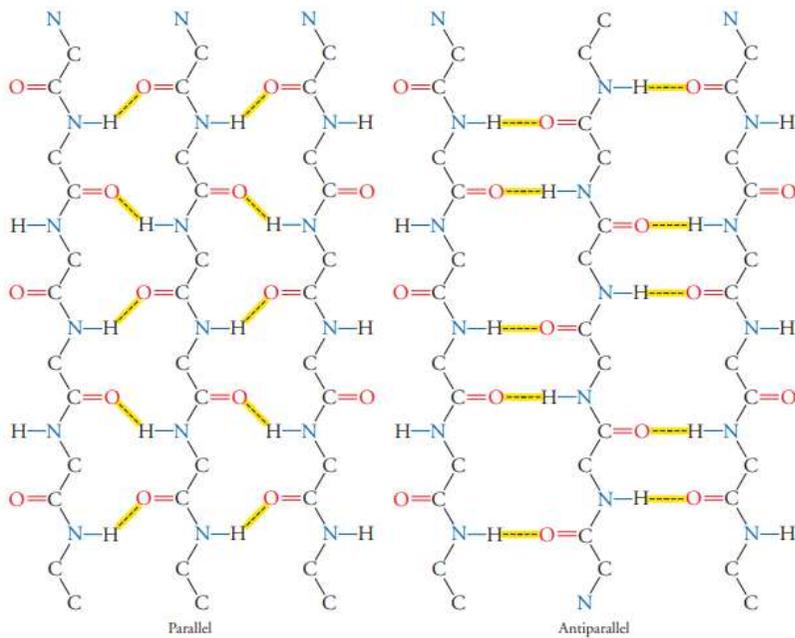
menjadi struktur yang lebih kompleks. Struktur sekunder protein merujuk pada pengaturan lokal dari rantai polipeptida menjadi pola tertentu yang distabilkan oleh ikatan hidrogen antara gugus karbonil dan amina dari tulang punggung peptida.

Dua pola utama struktur sekunder adalah α -helix dan β -sheet. Alpha-helix (α -helix) adalah salah satu bentuk struktur sekunder dalam protein di mana rantai polipeptida melingkar membentuk heliks yang stabil. Dalam α -helix, ikatan hidrogen terbentuk antara gugus karbonil ($-C=O$) dari asam amino pada posisi "i" dengan gugus amino ($-NH$) dari asam amino pada posisi "i+4". Meskipun setiap ikatan hidrogen relatif lemah secara individu, jumlah ikatan hidrogen yang terbentuk di dalam α -helix membuatnya sangat stabil. Keberadaan ikatan hidrogen ini menyebabkan α -helix memiliki ketahanan struktural yang cukup baik. Selain itu, kecenderungan suatu peptida untuk membentuk α -helix juga dipengaruhi oleh urutan asam amino dalam rantai polipeptida tersebut.



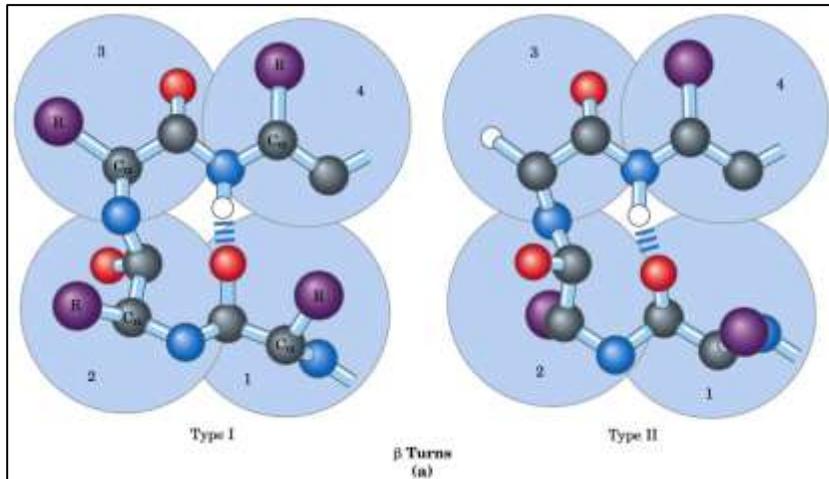
Gambar 13. Struktur α -helix

Beta-sheet (β -sheet) adalah salah satu bentuk struktur sekunder dalam protein di mana dua atau lebih rantai polipeptida atau bagian yang berdekatan dalam rantai yang sama melipat dan saling berhubungan melalui ikatan hidrogen antara gugus karbonil ($-C=O$) dari satu rantai dengan gugus amino ($-NH$) dari rantai lainnya. Dalam β -sheet, gugus-gugus ini membentuk lembaran atau lembaran yang stabil, yang bisa berbentuk antiparalel (dengan arah yang berlawanan) atau paralel (dengan arah yang sama).



Gambar 14. Struktur β -sheet (terdiri dari struktur parallel dan antiparallel)

Meskipun gambaran umumnya menunjukkan β -sheet sebagai struktur datar, sebenarnya struktur ini bisa memiliki torsi yang memungkinkan adaptasi dalam bentuk 3D yang lebih kompleks. Kestabilan β -sheet juga didukung oleh jumlah ikatan hidrogen yang terbentuk di antara gugus-gugus ini. Propensitas suatu peptida untuk membentuk β -sheet juga dipengaruhi oleh urutan asam amino dalam rantai polipeptida tersebut, yang mencerminkan kemampuan segmentasi untuk melipat dan berinteraksi dengan cara yang menghasilkan struktur β -sheet. Selain itu, β -turn, juga dikenal sebagai "beta turn" atau "beta bend," adalah struktur kecil pada protein di mana tulang punggung polipeptida membuat tikungan tiba-tiba atau perubahan arah yang cepat.



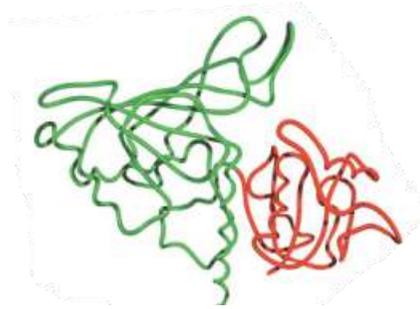
Gambar 15. Struktur β -turn

Struktur ini memungkinkan protein untuk mengubah arahnya secara efisien dalam ruang tiga dimensi. Propensitas suatu peptida untuk membentuk β -turn juga dipengaruhi oleh urutan asam amino dalam rantai polipeptida, yang mempengaruhi kemampuan segmentasi untuk membentuk struktur ini.

Pusat hidrofobik Protein

Protein globular biasanya mempunyai 2 lapisan struktur sekunder. Hal ini berarti protein mempunyai daerah permukaan dan pusat inti. Pada permukaan protein, beberapa tulang punggung dan gugus samping protein terekspos ke pelarut, pada pusat protein gugus samping protein terpisah atau dipisahkan dari pelarut. Dengan kata lain, protein terdiri dari permukaan hidrofilik dan hidrofobik.

Rantai polipeptida dapat melipat menjadi struktur Tunggal yang mempunyai pusat hidrofobik yang disebut domain. Beberapa protein kecil mempunyai 1 domain, sedangkan untuk protein besar dapat mempunyai beberapa domain, domain dapat berupa sama atau berbeda.



Gambar 16. Dua domain protein, gliseraldehida-3-fosfat, domain kecil berwarna merah sedangkan domain besar berwarna hijau. (pdb 1GPD)

Pusat pada domain biasanya kaya akan struktur sekunder protein. Hal ini karena formasi α -helix dan β -sheet yang mempunyai ikatan hidrogen, mengurangi kepolaran dari tulang punggung. Struktur protein sekunder (irregular) atau loops lebih banyak ditemukan dipermukaan (atau domain) dimana tulang punggung yang bersifat polar dapat membentuk ikatan hidrogen dengan molekul air.

Persyaratan untuk pusat hidrofobik dan hidrofilik juga mempunyai batasan pada urutan asam amino. Lokasi pada gugus samping tertentu pada protein tersier sangat berkaitan dengan hidrofobisitas: semakin besar residu hidrofobisitasnya semakin besar kemungkinan ditemukan pada bagian dalam protein. Pada bagian dalam protein, gugus samping protein disatukan (dikemas), sehingga menyebabkan molekul air mempunyai tempat yang sangat kecil dengan kata lain molekul air sulit masuk ke bagian dalam protein.

Tabel 1 dibawah ini menunjukkan dua skala hidrofobisitas untuk gugus samping asam amino. Informasi ini berguna untuk memprediksi lokasi asam amino di dalam protein. Sebagai contoh, residu yang sangat hidrofobik seperti Phe dan Met hampir selalu terkubur pada bagian dalam protein.

Gugus samping polar pada rantai samping asam amino dapat menertralkan sifat kepolaran dan mengakibatkan asam amino tersebut terkubur dalam lingkungan nonpolar. Di bagian dalam protein selalu ditemukan muatan positif berada di dekat muatan negatif sehingga terbentuk pasangan ion.

Tabel 1. Skala hidrofobisitas

Residue	Scale A ^a	Scale B ^b
Phe	2.8	3.7
Met	1.9	3.4
Ile	4.5	3.1
Leu	3.8	2.8
Val	4.2	2.6
Cys	2.5	2.0
Trp	-0.9	1.9
Ala	1.8	1.6
Thr	-0.7	1.2
Gly	-0.4	1.0
Ser	-0.8	0.6
Pro	-1.6	-0.2
Tyr	-1.3	-0.7
His	-3.2	-3.0
Gln	-3.5	-4.1
Asn	-3.5	-4.8
Glu	-3.5	-8.2
Lys	-3.9	-8.8
Asp	-3.5	-9.2
Arg	-4.5	-12.3

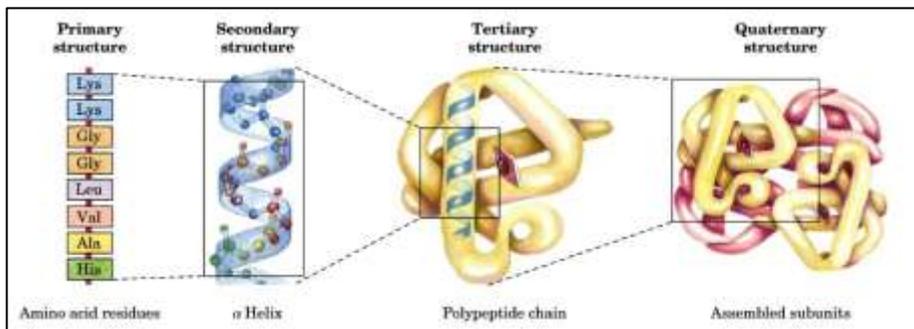
^aScale A is from Kyte, J., and Doolittle, R.F., *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132 (1982).

^bScale B is from Engelman, D.M., Steitz, T.A., and Goldman, A., *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **15**, 321-353 (1986).

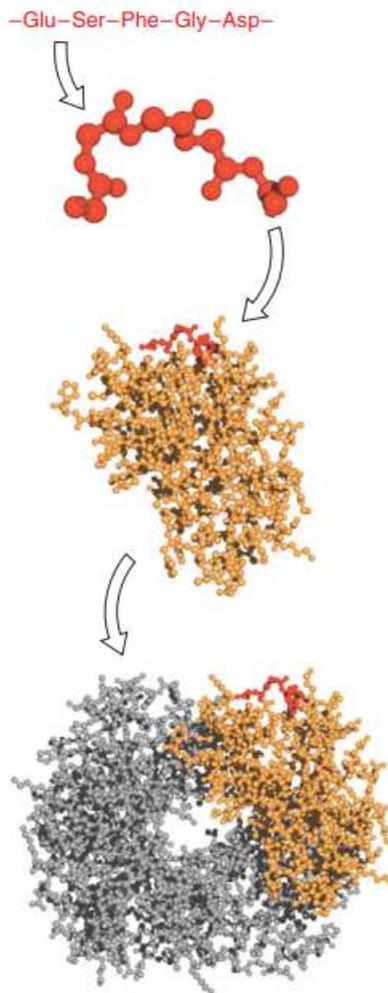
Selanjutnya, Struktur tersier dan kuartener dari protein adalah tingkatan organisasi yang lebih kompleks setelah struktur primer dan sekunder, dan keduanya penting dalam membentuk enzim yang aktif dan fungsional. Struktur tersier protein mengacu pada tata letak tiga dimensi dari seluruh rantai polipeptida, termasuk heliks, lembaran beta, dan b-turns yang terlipat dan terorganisir. Interaksi antara rantai samping asam amino yang berbeda, seperti ikatan hidrogen, ikatan ion, ikatan disulfida, dan

interaksi hidrofobik, memainkan peran kunci dalam membentuk struktur tersier. Struktur tersier menentukan bentuk akhir protein dan juga penting dalam menentukan fungsi biologisnya. Misalnya, dalam enzim, struktur tersier menentukan kantong aktif tempat substrat berikatan dan reaksi kimia berlangsung.

Struktur kuartener protein adalah bentuk tiga dimensi dari lebih dari satu rantai polipeptida yang berbeda (subunit) dalam protein multimerik. Subunit-subunit ini dapat sama (homomerik) atau berbeda (heteromerik) dalam komposisi asam amino dan urutan. Interaksi antara subunit-subunit ini membentuk struktur kuartener. Kedua struktur ini, bersama dengan struktur primer dan sekunder, membentuk kerangka dasar yang kompleks untuk fungsi enzim dan protein lainnya dalam seluler.



Gambar 16. Struktur primer, sekunder, tersier dan kuartener protein



Gambar 17. Urutan struktur protein pada hemoglobin

2.3. Protein dan Klasifikasinya

Protein berasal dari bahasa Yunani yaitu *protos* yang berarti “yang paling utama”. Secara garis besar protein merupakan senyawa organik kompleks berbobot molekul tinggi yang terdiri dari karbon, hidrogen, oksigen, nitrogen, sulfur, fosfor dan dihubungkan satu dengan yang lainnya. Protein adalah biomolekul raksasa yang menjadi penyusun utama makhluk

hidup. Protein pertama kali ditemukan pada tahun 1838 oleh Jöns Jakob Berzelius.

Klasifikasi Protein

1. Klasifikasi protein berdasarkan jenis konformasinya, protein dapat diklasifikasikan menjadi:
 - a. Protein Fibrous. Berupa paralel single axis yang tidak larut dalam air tetapi larut dalam larutan garam. Contohnya adalah kolagen, rambut, kuku, dan kulit.
 - b. Protein Globular. Memiliki bentuk spiral atau globular dan larut dalam sistem air. Contohnya adalah albumin dan hemoglobin.
2. Klasifikasi protein berdasarkan fungsi biologisnya, fungsi protein tergantung pada struktur protein, yaitu:
 - a. Fungsi Struktur : bagian utama pada otot, rambut, kulit, kuku seperti kolagen yang berfungsi sebagai penopang untuk tulang dan kulit, keratin yang terdapat pada kuku taaupun rambut
 - b. Fungsi Transport : menghantarkan zat dari satu tempat ke tempat lainnya : seperti albumin sebagai transporter nutrisi sedang seperti kalsium, seng, dan vitamin B6; hemoglobin sebagai pembawa zat besi sekaligus pemhantar oksigen
 - c. Fungsi regulasi : berperan penting dalam segala proses reaksi biokimia dalam tubuh seperti enzim. Enzim digunakan di dalam tubuh dalam metabolisme pada proses pencernaan, pelepasan energi, perubahan nutrisi menjadi sumber bahan bakar serta dalam penyusunan jaringan tubuh dan otot.
 - d. Hormon : sebagai pembawa pesan dari satu bagian sel ke sel lain seperti insulin, glukogen, dan hormon antidiuretik (ADH).

- e. Fungsi antibody/ imun : mampu melindungi tubuh dari benda asing yang berupa bakteri atau virus.
- f. Mengatur pH : protein di dalam tubuh dapat menjaga kestabilan pH. Kondisi kelebihan dan basa dalam tubuh dapat menyebabkan koma.

2.4. Penentuan Kadar Protein

Penentuan kadar protein dalam sampel dapat dilakukan melalui beberapa metode yang memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing. Salah satu metode yang umum digunakan adalah spektroskopi absorbansi ultraviolet (UV), di mana protein menyerap cahaya UV pada panjang gelombang 280 nm. Metode ini melibatkan penggunaan kuvet kuarsa untuk mengisi buffer kosong yang digunakan untuk mengatur nol pada spektrofotometer. Setelah itu, buffer diganti dengan sampel protein untuk mengukur absorbansi pada 280 nm. Jika absorbansi melebihi batas linier alat, sampel harus diencerkan dan diukur kembali.

Selain itu, ada juga uji pewarna berbasis protein seperti uji Bradford dan uji Lowry. Uji Bradford menggunakan pewarna *Coomassie Brilliant Blue G-250* yang berikatan dengan residu tertentu dalam protein pada pH asam, menyebabkan perubahan warna yang diukur pada 595 nm. Prosedurnya meliputi penambahan larutan pewarna ke sampel protein, inkubasi, dan pengukuran absorbansi. Sementara itu, uji Lowry melibatkan reaksi dua tahap, yaitu reduksi ion tembaga oleh protein dalam larutan alkali, diikuti oleh reduksi reagen Folin-Ciocalteu yang menghasilkan warna biru dengan puncak absorbansi pada 750 nm. Uji Lowry sensitif terhadap banyak senyawa pengganggu dan dapat menghasilkan presipitasi dengan deterjen dan lipid.

Metode lain yang sering digunakan adalah uji asam bicinchoninic (BCA). Metode ini menggantikan reagen Folin-Ciocalteu dengan asam bicinchoninic yang bereaksi dengan ion kupri (Cu^+) yang dihasilkan dari reaksi protein dengan ion Cu^{2+} dalam kondisi alkali, membentuk kompleks ungu yang diukur pada 562 nm. Uji BCA lebih sensitif dan lebih toleran terhadap senyawa pengganggu dibandingkan dengan uji Lowry. Namun, uji ini masih dapat terganggu oleh agen pengkelat seperti EDTA dan agen pereduksi seperti DTT.

Selain itu, ada juga metode derivatisasi amina yang menggunakan pewarna fluoresen yang bereaksi dengan grup amina pada protein, menghasilkan peningkatan fluoresensi yang diukur dengan spektrofluorometer. Prosedurnya meliputi pencampuran sampel dengan larutan o-ftalaldehida yang telah ditambah 2-merkapttoetanol, inkubasi, penambahan NaOH, dan pengukuran fluoresensi pada eksitasi 340 nm dan emisi 440-455 nm. Metode ini lebih sensitif dibandingkan dengan uji berbasis absorbansi, tetapi memerlukan standar yang cocok karena variabilitas protein-ke-protein yang tinggi.

Deteksi fluoresensi berbasis deterjen menggunakan probe fluoresen yang kuantum yield-nya meningkat signifikan saat berikatan dengan antarmuka protein-deterjen. Dua persiapan komersial yang umum digunakan adalah NanoOrangeTM dan Quant-iTTM. Dalam melaksanakan pengukuran ini, penting untuk menggunakan kuvet kuarsa atau kaca yang bersih untuk menghindari kontaminasi dan penyimpangan hasil pengukuran. Pelat mikrotiter dapat digunakan untuk meningkatkan throughput dan mengurangi penggunaan sampel dan reagen. Selain itu, perlu mempertimbangkan potensi kontaminan dalam sampel protein dan memilih metode yang tepat untuk meminimalkan gangguan tersebut.

Instruksi umum untuk metode penentuan kadar protein mencakup penggunaan kuvet kuarsa atau kaca yang bersih untuk menghindari kontaminasi dan penyimpangan hasil pengukuran. Penggunaan pelat mikrotiter dapat meningkatkan throughput dan mengurangi penggunaan sampel serta reagen. Penting juga untuk mempertimbangkan potensi kontaminan dalam sampel protein dan memilih metode yang tepat untuk meminimalkan gangguan tersebut. Kontaminan dapat dihilangkan sebelum pengukuran konsentrasi, tetapi proses ini dapat menyebabkan pengenceran atau kehilangan sampel asli, sehingga dapat mengakibatkan kesalahan dalam estimasi konsentrasi. Presipitasi protein diikuti dengan pemisahan dan resuspensi mungkin merupakan metode yang paling akurat untuk menghilangkan kontaminan yang tidak dapat dihindari. Secara keseluruhan, metode-metode ini digunakan untuk mengukur konsentrasi protein dalam sampel dengan akurasi tinggi, sambil mempertimbangkan keuntungan dan keterbatasan masing-masing metode sesuai dengan jenis sampel dan kondisi eksperimen. Pilihan metode sangat bergantung pada volume sampel yang tersedia, kebutuhan throughput, dan keberadaan senyawa pengganggu dalam sampel.

Rangkuman

Protein merupakan biomolekul kompleks yang tersusun dari asam amino melalui ikatan peptida. Struktur protein memiliki tingkat organisasi mulai dari primer, sekunder (seperti α -helix dan β -sheet), tersier, hingga kuartener, yang menentukan fungsi biologisnya. Protein dapat diklasifikasikan berdasarkan bentuknya, seperti protein fibrous yang tidak larut air dan protein globular yang larut dalam air, serta fungsinya, termasuk sebagai struktur tubuh, transportasi zat, regulasi enzim, hormon, antibodi, dan pengatur pH. Penentuan kadar protein dapat dilakukan dengan berbagai metode, seperti spektroskopi UV, uji Bradford, uji Lowry, dan metode fluoresensi, masing-masing dengan kelebihan dan keterbatasannya. Metode ini digunakan untuk memastikan akurasi pengukuran konsentrasi protein dalam sampel, mempertimbangkan volume, kebutuhan throughput, serta potensi gangguan dari kontaminan.

Soal Latihan

1. Gambarkan struktur primer protein yang terdiri dari His-Arg-Trp
2. Sebutkan jenis protein berdasarkan jenis konformasinya
3. Sebutkan metode yang digunakan untuk pengujian protein
4. Perhatikan dan identifikasi masing-masing pernyataan di bawah ini, sebutkan apakah termasuk kedalam protein primer, sekunder, tersier atau kuartener?
 - a. Bentuk myoglobin adalah bulat seperti bola
 - b. Hemoglobin terdiri dari empat rantai polipeptida
 - c. Residu asam amino dari kolagen terdiri dari glisin
 - d. Molekul Lisozim terdiri dari struktur heliks

BAB III

ASAM NUKLEAT, DNA, DAN RNA

Pendahuluan

Asam-asam nukleat seperti DNA (deoksiribonukleat) dan RNA (asam ribonukleat) menjadi dasar kimia bagi perpindahan informasi di dalam sel. Asam nukleat yaitu rantai polimer yang terdiri dari satuan monomer yang disebut nukleotida. Asam nukleat adalah makromolekul yang memberi informasi karena setiap asam nukleat mempunyai urutan nukleotida unik dan spesifik seperti asam amino yang mencari protein tertentu. Asam nukleat (*nucleic acid*) yaitu makromolekul biokimia yang sangat kompleks, mempunyai bobot molekul besar, dan terdiri dari rantai nukleotida yang tersusun atas informasi genetik. Asam nukleat yang paling umum yaitu Asam deoksiribonukleotida (DNA) dan Asam ribonukleat (RNA). Asam nukleat ditemukan pada semua sel hidup serta virus. Dinamakan asam nukleat karena berada di dalam inti (nukleus).

Dalam bab ini akan di bahas mengenai satuan satuan monomer DNA dan RNA dan urutan untaian dalam asam nukleat. Selain itu juga akan di bahas mengenai struktur kovalen dari DNA dan RNA.

3.1. Mononukleotida

Mononukleotida merupakan *building block* pada semua asam nukleat. Unsur-unsur pada nukleotida dapat direaksikan atau dihidrolisis

Mononukleotida $\xrightarrow{\text{hidrolisis}}$ basa nitrogen heterosiklik, gula lima karbon, dan fosfat

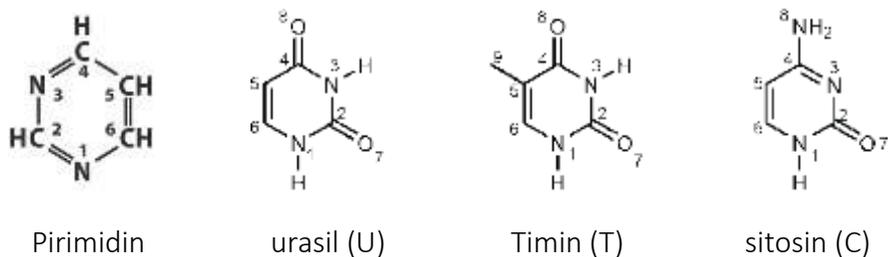
Basa-basa nitrogen heterosiklik terdiri dari purin dan pirimidin, gula lima karon terdiri dari 2-deoksi D ribosa (DNA) dan D-ribosa (RNA). Bagia gula pada asam nukleat merupak isomer D-optik sama halnya dengan asam amino penyusun protein. Fosfat pada mononukleotida adalah senyawa kunci anorganik pada tingkat seluler.

Basa-basa nitrogen heterosiklik terdiri dari Purin dan pirimidin. Basa purin yaitu adenin dan guanin. Gambar 3.1 menunjukkan basa adenin dan guanin. Adenin dikenal sebagai basa yang berhubungan dengan ATP, ADP, dan AMP. Adenin dan guanin terdapat dalam DNA dan RNA



Gambar 18. Basa Purin : Adenin dan Guanin

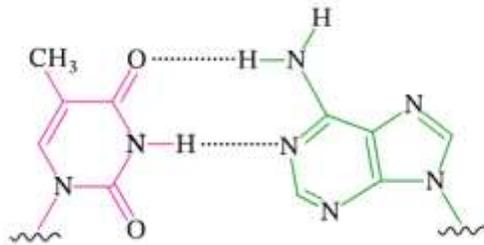
Basa pirimidin terdiri dari urasil, timin dan sitosin. Urasil hanya terdapat pada RNA, timin terutam aada di dalam DNA, sedangkan sitosin terdapat baik di dalam DNA maupun RNA.



Gambar 19. Basa-basa pirimidin : urasil, timin, dan sitosin

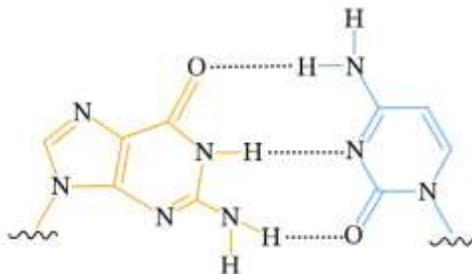
Sifat basa Purin dan Pirimidin

Basa basa purin dan pirimidin asam nukleat mengandung gugus fungsional yang memungkinkan terjadinya ikatan hidrogen. Sifat struktural molekuler yang menonjol dari basa purin dan pirimidin menyebabkan pasangan-pasangan basa tertentu mengalami ikatan hidrogen. Sistem cincin atau ring jeterosiklik nitrogen dari basa purin dan pirimidin menyerap sinar ultra violet pada daerah 250-280 nm. Sifat ini memberikan profil untuk mengetahui jumlah asam nukleat dan nukleotida secara spektrofotometrik. Timin dan adenin terikat melalui 2 ikatan hidrogen sedangkan Guanin dan sitosin melalui 3 ikatan hidrogen.



Timin (T)

Adenin (A)



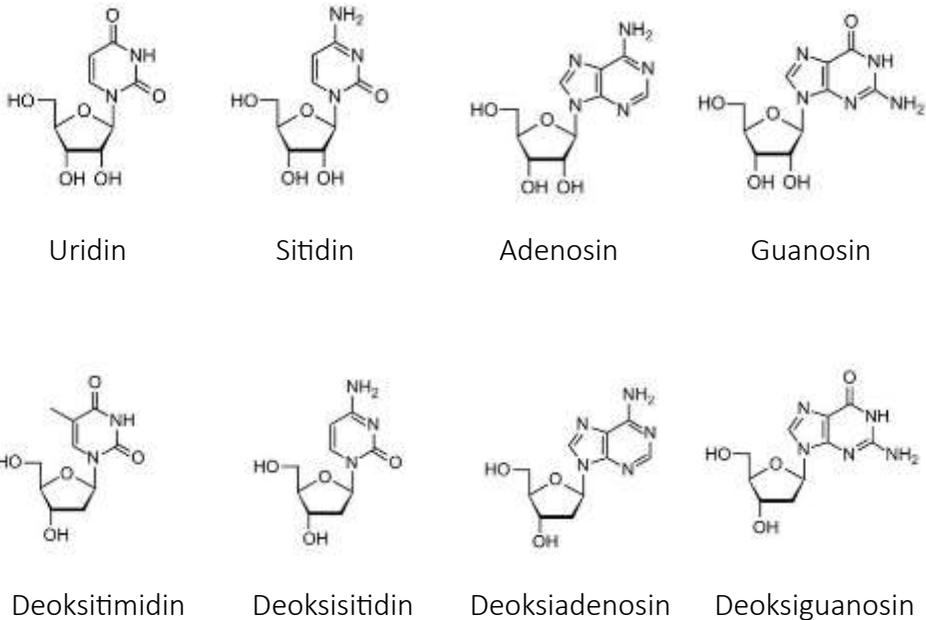
Guanin (G)

Sitosin (C)

Gambar 20. Ikatan hidrogen antara basa purin dan pirimidin (proses berpasangan basa)

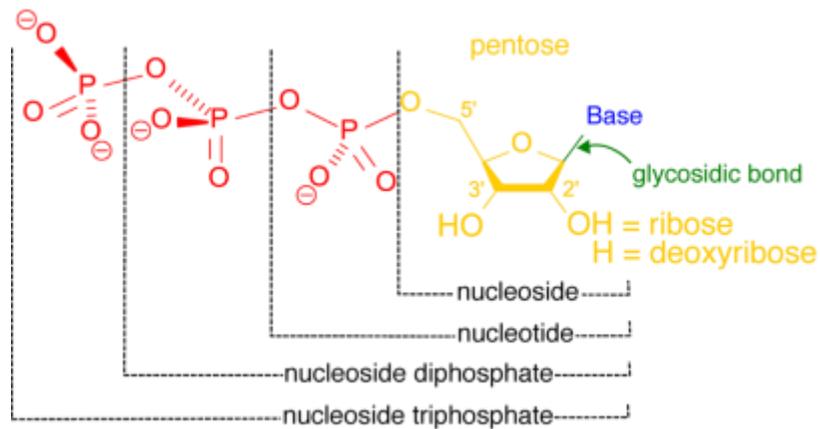
3.2. Nukleosida dan Nukleotida

Gula pentosa dan basa nitrogen (purin atau pirimidin) dapat berikatan untuk membentuk turunan N-glikosil yang disebut Nukleosida. Gambar berikut menunjukkan beberapa turunan dari nuklosida



Gambar 21. Struktur nuklosida

Nukleotida merupakan ester nukleosida yang asam aksinya yaitu asam fosfat yang membentuk ikatan ester dengan salah satu gugus-gugus OH dari pentosa. Bgain asam fosfat dari nukleotida adalah asam pada basa yang mempunyai nilai pKa sebesar 1- 6. Hal ini menunjukkan pada pH fisiologis sebesar 7, nukleotida yang ada sebagian besar berada dalam bentuk dianion, sehingga senyawa ini disebut ester fosfat dan digambarkan sebagai $R-O-PO_3^{2-}$. Berikut gambar struktur umum turunan nukleosida fosfat.



Gambar 22. nukleosida mono-, di-, dan trifosfat

Gambar 22 menampilkan bentuk umum dari turunan nukleosida, bentuk yang paling banyak dari mononukleotida bebas dalam sel mempunyai gugus fosfat pada kedudukan 5'. Hal ini karena jalur utama hidrolisis enzimatis dari asam nukleat menghasilkan nukleosida 5' monofosfat sebagai hasil awal. Selain monofosfat nukleosida terdapat juga di- dan trifosfat yang terdapat di dalam sel dengan melakukan fungsi sebagai berikut :

1. Transfer energi kimia

ATP adalah pembawa pusat energi kimia sel. ATP dihasilkan dari fosforilasi ADP melalui tahapan penghasil energi dari metabolisme, fotosintesis dan respirasi. Selain ATP terdapat juga molekul lain seperti UTP, GTP, dan CTP yang berfungsi sebagai pembawa energi kimia dalam reaksi biosintesis tertentu.

2. Pembawa gugus reaktif

Nukleosida fosfat berfungsi sebagai pembawa satuan-satuan *building blocks* dalam biosintesis. Sebagai contoh, uridin difosfat UDP, merupakan

pembawa spesifik untuk guladalam biosintesis polisakarida. Dalam biosintesis glikogen, UDP-glukosa sebagai satuan monomer reaktif. Asam amino diaktifkan untuk biosintesis protein dengan bereaksi dengan ATP membentuk suatu amino asil adenilat dengan AMP terikat pada satu gugus asam amino yang diikat oleh campuran asam fosfat – anhidridaasam amino.

3. Biosintesis asam nukleat

Nukleosida trifisfat adalah jenis monomer reaktif dalam pembentukan asam-asam nukleat

4. Unsur-unsur beberapa enzim

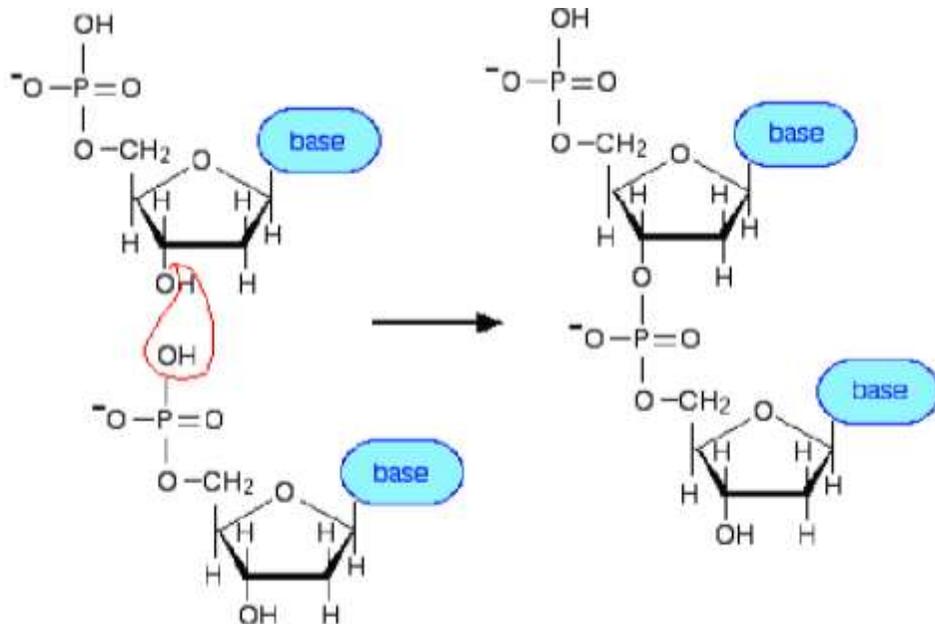
Adenin nukleotida merupakan bagian dari struktur molekular koenzim penting termasuk NAD^+ , NADP^+ , FAD , koenzim A dan koenzim B_{12}

5. Pengatur metabolik

Pengatur intraeluler dan metabolisme dilakukan oleh nukleosida siklik. ATP dan AMP berfungsi sebagai umpan balik pusat dalam metabolisme seluler.

3.3. Polinukleotida

Polinukleotida adalah gabungan dari nukleosida monofosfat dan merupakan satuan pengulangan asam nukleat. Masing-masing nukleotida terdiri dari tiga komponen, yaitu basa nitrogen heterosiklik (purin atau pirimidin), gula pentosa, dan gugus fosfat. Asam nukleat dibedakan berdasarkan jenis gulanya misalnya DNA dan RNA, yang mempunyai kerangka polinukleotida dengan ikatan kovalen seperti gambar di bawah ini. Dalam DNA mempunyai gula pentosa 2'deoksi D-ribosa dan basa (A,G,C,T) sedangkan RNA dengan gula pentosa D-ribosa dengan basa A,G,C, dan U.



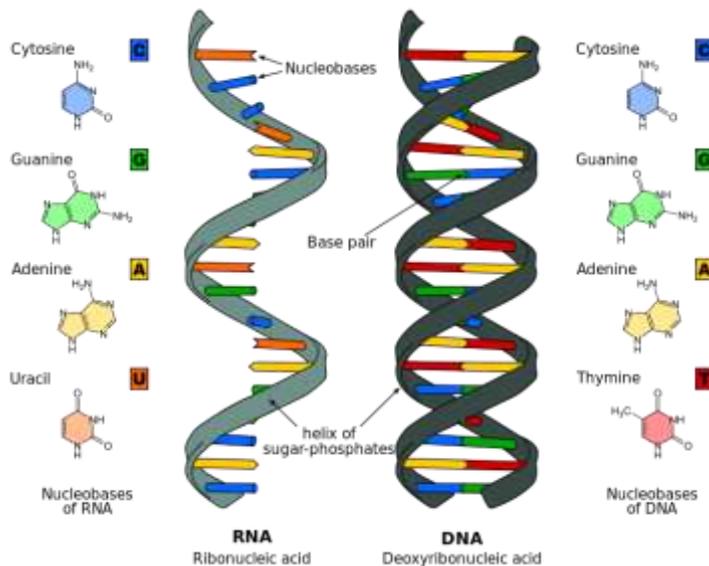
Gambar 23. Pembentukan ikatan fosfodiester pada DNA

Pada DNA atau RNA, terdapat Asam nukleat yang tersusun dari rantai panjang nukleotida yang terhubung melalui ikatan fosfodiester. Ikatan ini terbentuk antara gugus fosfat pada nukleotida yang satu (5') dengan karbon ke-3 (3'-OH) pada gula nukleotida yang lain. Pembacaan nukleotida sesuai perpanjangian yaitu 5' → 3'. Proses ini menciptakan rangka tulang punggung DNA atau RNA, yang memberikan stabilitas pada struktur heliks.

3.4. Pemutusan asam nukleat

Ikatan fosfodiester pada DNA dan RNA dapat diputuskan dengan proses kimia maupun enzimatik. Semua ikatan yang dapat dihidrolisis pada DNA dan RNA dapat direaksikan dengan 12 M asam perklorat pada 100 °C selama 1 jam. Dalam larutan basa RNA dengan mudah terhidrolisis menjadi campuran 2' dan 3' nukleosida monofosfat. Pada DNA yang tidak mempunyai gugus 2'-OH hanya dapat dihidrolisis pada basa yang

ekstrem, karena proses hidrolisis terjadi pada daerah 2'-3' monofosfat. Asam nukleat terdiri dari DNA dan RNA seperti yang ditunjukkan pada Gambar 24 dibawah ini.



Gambar 24. Struktur Asam Nukleat

Asam nukleat yang melalui proses metabolisme akan dipecah oleh nuklease pankreas untuk menghasilkan campuran nukleosida monofosfat dan oligonukleotida. Kemudian dipecah lagi pada usus kecil untuk menghasilkan nukleosida dan ortofosfat. Nukleosida diserap dan mengalami metabolisme terutama di dalam hati, ginjal, dan sumsum tulang. Hidrolisa asam nukleat dengan katalis enzim merupakan suatu terobosan baru untuk menemukan urutan basa pada asam nukleat. Ikatan ester 3' atau 5'-fosfat dapat dihidrolisasikan oleh nuklease. Nuklease spesifik dapat bekerja pada DNA ataupun RNA. Eksonuklease bekerja pada ujung akhir dari rantai asam nukleat, sama seperti eksopeptidase. Tabel 1 di bawah ini menguraikan

mengenao berbagai macam eeksonuklease dan endonuklease beserta sumber dan fungsinya.

Tabel 1. Hidrolase asam nukleat dan fungsinya

Enzim	Sumber	Fungsi
Eksionuklease:		
Fosfodiesterase	Bisa ular rattle	Hidrolisasi pada ikatan 3'fosfat ester pada DNA atau RNA. Hidrolisa bertahap dimulai dari gugus 3'-OH
Fosfodiesterase	Limpa kecil	Hidrolisasi pada ikatan 5' fosfat ester pada DNA atau RNA, dengan memulai dari ujung akhir 5'-OH bebas
Endonuklease:		
Deoksiribonuklease I	Pankreas	Hidrolisasi beberapa ikatan 3' dari DNA untuk menghasilkan suatu campuran oligonukleotida dan 5' mononukleotida
Deoksiribonuklease II	Limpa kecil, bakteri	Hidrolisasi beberapa dari ikatan 5'DNA.

		Kedua untai DNA terbelah pada tempat yang sama secara bersamaan
Ribonuklease I	Pankreas sapi	Hidrolisasi ujung akhir 5' dari ikatan-ikatan RNA dimana ujung 3' terpasang pada nukleotida guanin

3.5. DNA (Asam Deoksiribonukleat)

Setiap organisme hidup mengandung satu atau lebih satuan genetik yang disebut kromosom, masing-masing berisi untaian rangkap DNA spiral. Pada sel prokariotik, DNA menyatu membentuk poliamin poliamin kecil bermuatan positif. Sedangkan kromosom eukariotik lebih kompleks mengandung DNA, RNA dan protein. Dalam suatu organisme multiseluler sel somatik atau diploid (selain sel telur dan sperma) mempunyai isi kromosom yang identik. Sehingga molekul molekul DNA sama pada semua sel organisme. Tetapi ketika suatu organisme memiliki kerumitan pasangan DNA yang meningkat maka jumlah bahan genetiknya juga meningkat. Organisme yang lebih tinggi mempunyai enzim yang lebih luas dan banyak sehingga lebih banyak pula informasi dalam bentuk DNA nya. Sel dari organisme yang lebih kompleks membagi DNA nya menjadi lebih dari satu kromosom tetapi tidak mempunyai serat atau untai rangkap DNA yang semakin memanjang.

Tabel 2. Kadar DNA seluler pada beberapa tipe organisme (sel diploid)

Organisme	DNA setiap Sel (gr)	Jumlah pasangan basa
Mamalia	6×10^{-12}	5500×10^{12}
Burung	2×10^{-12}	2000×10^{12}
Jamur	6×10^{-14}	20×10^{12}
Bakteri	6×10^{-15}	2×10^{12}

Tabel 3. Jumlah kromosom dalam sel beberapa organisme (tiap kromosom mengandung satu molekul DNA tunggal)

Organisme	Jumlah kromosom
Prokariotik	
Bakteri	1
Eukariotik	
Kucing	38
Kelinci	44
Manusia	46
Ayam	78

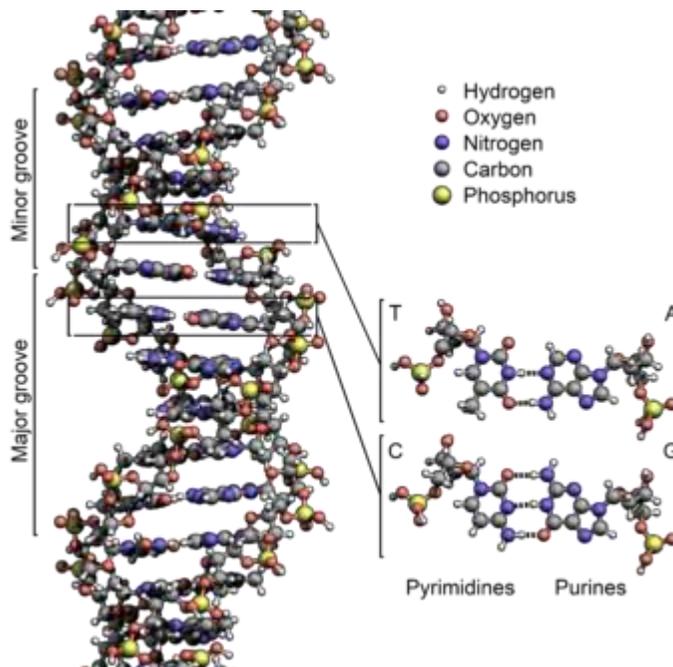
Tabel 3 diatas menunjukkan jumlah kromosom pada beberapa organisme prokariotik dan eukariotik. Jumlah kromosom meningkat seiring dengan kekompleksan organisme. Yang bukan kromosom adalah DNA pendek, bundar dan berserat rangkap yang kemudian disebut plasmid. Kebanyakan plasmid terdapat pada bakteri. Plasmid berukuran sekitar 7000 sampai sekitar 150.000 pasangan basa dan suatu sel bakteri kemungkinan

mempunyai sebanyak 20 plasmid. Sementara plasmid masih belum diketahui fungsinya secara jelas, namun berfungsi sebagai pemakaiian gen.

Struktur DNA

Struktur DNA berbentuk heliks ganda (double helix) yang ditemukan oleh James Watson dan Francis Crick pada tahun 1953. Beberapa karakteristik pada struktur DNA yaitu dua untai DNA berjalan dalam arah yang berlawanan, yaitu 5' ke 3' dan 3' ke 5'. Pasangan Basa Komplementer terdiri dari basa-basa nitrogen berpasangan dengan spesifik (A dengan T, G dengan C) melalui ikatan hidrogen.

Struktur DNA terdiri dari satuan berulang yang disebut nukleotida. Setiap nukleotida terdiri dari tiga komponen utama yaitu fosfat, gula deoksiribosa, dan basa nitrogen. Pada DNA terdapat basa Adenin (A), Guanin (G), Sitosin (C), dan Timin (T).



Gambar 25. Struktur heliks ganda DNA

DNA kromosom dalam eukariot dan prokariot adalah molekul sangat besar dengan bobot molekul lebih dari 1×10^9 . DNA setiap spesies terdiri dari dua rantai heliks yang berpilin dengan jari-jari 10 \AA (1.0 nanometer) dan 34 \AA (3,4 nanometer) putaran heliks. Menurut penelitian lain, rantai DNA memiliki lebar $22\text{-}26 \text{ \AA}$ (2,2-2,6 nanometer) dan panjang satu satuan nukleotida 33 \AA (0,33 nm) ketika diukur dengan larutan tertentu. Namun, meskipun satuan nukleotida sangat kecil, polimer DNA dapat memiliki jutaan nukleotida yang terangkai seperti rantai DNA. Misalnya, kromosom 1, yang merupakan kromosom terbesar pada manusia, mengandung sekitar 220 juta pasangan basa.

Putaran Heliks yaitu Heliks ganda berputar ke kanan dengan sekitar 10,5 pasangan basa per putaran. Faktor Stabilitas Heliks yaitu ikatan hidrogen antara pasangan basa, interaksi tumpukan antara pasangan basa yang sejajar di dalam heliks, dan gugus fosfat yang bermuatan negatif memberikan stabilitas melalui interaksi dengan air di sekitarnya. Struktur kimia DNA yang ada membuatnya ideal untuk menyimpan data biologis dari semua makhluk hidup. Dalam struktur unting ganda DNA, rantai punggung DNA menyimpan informasi biologis yang sama. Karena itu, ketika dua untai DNA terpisah, informasi biologis ini akan direplikasi. Lebih dari 98% DNA manusia bersifat non-kode, yang berarti DNA tidak dapat menyandikan protein.

Ukuran DNA dinyatakan dalam satuan pasangan basa (bp) atau pasangan kilobasa (1000 bp, disingkat kb). Sebagian besar molekul DNA yang terbentuk secara alami terdiri dari ribuan hingga jutaan pasangan basa.

Untai tunggal pendek pendek berantai tunggal dari nukleotida biasanya disebut oligonukleotida (oligo adalah bahasa Yunani untuk "sedikit"). Di dalam sel, nukleotida dipolimerisasi oleh aksi enzim yang dikenal sebagai polimerase. Ikatan fosfodiester yang menghubungkan residu nukleotida dapat rusak oleh aktivitas nuklease. Eks nuklease menghilangkan residu dari ujung rantai polinukleotida, sedangkan endonuklease membelah di beberapa tempat lain titik di sepanjang rantai. Polimerase dan nuklease biasanya spesifik untuk DNA atau RNA. Dengan tidak adanya enzim-enzim ini, struktur asam nukleat sangat stabil.

Fungsi DNA

DNA berfungsi sebagian besar selama proses replikasi, yang merupakan bagian dari proses pembelahan sel. Struktur DNA terdiri dari dua rantai, dengan satu rantai berfungsi sebagai "konjugat" dari rantai pasangannya. Susunan rantai pasangan dapat dengan mudah dibentuk dengan mengetahui susunan rantai satu.

Selama proses replikasi, setiap rantai DNA baru disintesis pada akhir proses. Rantai DNA tunggal berasal dari rantai DNA sebelumnya, dan rantai pasangannya disintesis dari rantai DNA baru. Rantai tunggal dari DNA sebelumnya berfungsi sebagai "cetakan" untuk membuat rantai pasangannya. Dalam proses replikasi, protein atau enzim pembantu diperlukan. Enzim DNA polimerase adalah enzim yang membantu membentuk rantai DNA baru yang terdiri dari polimer.

3.6. Asam Ribonukleat (RNA)

Asam ribonukleat adalah rangkaian nukleotida yang saling terikat seperti rantai dan merupakan hasil dari transkripsi dari suatu fragmen DNA,

sehingga RNA sebagai polimer yang jauh lebih pendek jika dibandingkan DNA. Berbeda dengan DNA yang biasanya ditemukan dalam inti sel, sebagian besar RNA ditemukan dalam sitoplasma, terutama di ribosom.

FUNGSI RNA

Tipe RNA menentukan fungsi RNA. Tipe pertama adalah transfer RNA (tRNA), yang merupakan RNA yang dibentuk di dalam nukleus tetapi menempatkan diri dalam sitoplasma. tRNA adalah RNA yang terpendek dan berfungsi sebagai penerjemah kodon mRNA, dan tRNA memiliki proporsi nukleosida yang lebih tinggi daripada tRNA. Transfer RNA, juga dikenal sebagai transfer-ribonukleic acid atau transfer asam ribonukleat, adalah molekul yang menginterpretasikan pesan genetik yang terdiri dari serangkaian kodon yang terletak di sepanjang molekul mRNA. Dalam proses translasi, ia mentransfer asam amino ke ribosom.

Tiap tRNA terdiri dari sekuen yang terdiri dari tiga rangkaian basa pendek. Setiap ujung tiga' tRNA mengandung sekuen SSA yang berseberangan dengan sekuen antikodon, dan suatu amino akan melekat pada ujung tiga' tRNA. Ini adalah cara tRNA berfungsi, yaitu dengan membawa asam amino tertentu yang akan berguna dalam sintesis protein, yaitu dengan mengurutan asam amino sesuai dengan urutan kodon pada mRNA.

Ribosomal RNA (rRNA) rRNA adalah ribosom yang memiliki protein dengan massa yang hampir sama. Molekulnya fleksibel dan terdiri dari satu pita yang tidak bercabang. rRNA terdiri dari berbagai jenis rRNA, seperti 23S rRNA, 16S rRNA, dan 5S rRNA, dan tidak memiliki inti sejati. rRNA mewakili 80 persen RNA total dalam sel.

Mesenger RNA (mRNA) adalah polinukleotida dengan pita tunggal linier yang disintesis oleh DNA di dalam nukleus. Rantai tunggal mRNA relatif panjang. Panjang rantai polipeptida yang disusun berkorelasi dengan panjang mRNA. Rantai asam amino yang membentuk rantai polipeptida memiliki urutan kodon yang sama dengan molekul mRNA yang bersangkutan. Setiap molekul membawa salinan urutan DNA, yang ditranslasikan menjadi satu atau lebih rantai polipeptida dalam sitoplasma. mRNA mengangkut kode genetik dari DNA di inti sel ke ribosom sitoplasma. mRNA dibuat jika diperlukan, dan setelah selesai, dihancurkan dalam plasma.

Secara umum, DNA dan RNA merupakan bagian dari asam nukleat dan mempunyai beberapa perbedaan. Tabel 4 menampilkan beberapa perbedaan mendasar antara DNA dan RNA.

Tabel 4. Perbedaan mendasar antara DNA dan RNA:

Fitur	DNA	RNA
Gula	Deoksiribosa	Ribosa
Basa Nitrogen	A, T, G, C	A, U, G, C
Bentuk	Heliks ganda (double helix)	Biasanya untai tunggal (single strand)
Fungsi	Menyimpan informasi genetik	Sintesis protein dan regulasi ekspresi gen

Fitur	DNA	RNA
Lokasi	Inti sel, mitokondria	Inti sel, sitoplasma, ribosom

Rangkuman

Asam nukleat seperti DNA dan RNA adalah makromolekul penting dalam penyimpanan dan perpindahan informasi genetik. DNA berfungsi sebagai cetak biru genetik dengan struktur heliks ganda, terdiri dari gula deoksiribosa, fosfat, dan basa nitrogen (A, T, G, C). RNA, berperan dalam sintesis protein, memiliki struktur untai tunggal dengan gula ribosa dan basa nitrogen (A, U, G, C). DNA menyimpan informasi genetik di inti sel, sementara RNA mentranskripsi informasi ini ke ribosom untuk sintesis protein. Monomer penyusun asam nukleat adalah nukleotida, yang terdiri dari basa nitrogen (purin dan pirimidin), gula lima karbon, dan fosfat. RNA terdiri dari mRNA (pembawa pesan genetik), tRNA (pengangkut asam amino), dan rRNA (penyusun ribosom). DNA berperan dalam replikasi genetik, sementara RNA memfasilitasi ekspresi gen.

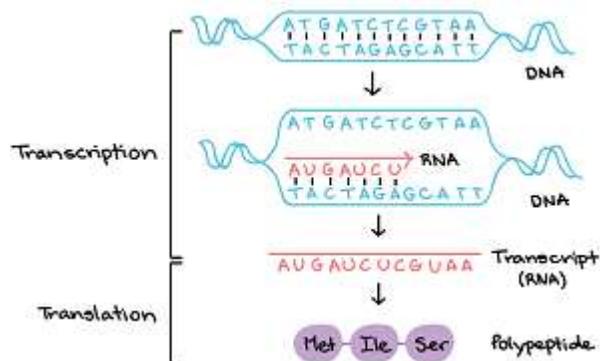
Soal Latihan

1. Apa saja komponen utama penyusun nukleotida pada DNA dan RNA? Jelaskan perbedaannya.
2. Sebutkan dan jelaskan fungsi dari tiga jenis RNA.
3. Apa perbedaan utama antara DNA dan RNA dalam hal struktur dan fungsi?
4. Bagaimana proses ikatan hidrogen terjadi antara basa-basa nitrogen pada DNA? Berikan contohnya.
5. Jelaskan peran mRNA dalam proses sintesis protein.

BAB IV BIOSINTESIS PROTEIN

Pendahuluan

Sintesis protein adalah proses pembentukan protein yang melibatkan sintesis RNA yang dipengaruhi oleh DNA. Dalam sintesis protein, DNA merupakan sumber pengkodean asam nukleat untuk menghasilkan asam amino yang menjadi building block protein tetapi tidak terlibat secara langsung di dalam prosesnya. DNA di dalam suatu sel akan ditranskripsikan menjadi RNA. RNA kemudian ditranslasi menjadi asam amino sebagai penyusun protein. Sehingga RNA yang terlibat secara langsung dalam sintesis protein. Keterkaitan antara DNA, RNA, dan asam amino dalam sintesis protein ini disebut dengan “Dogma Central Biologi”. Pada kajian biosintesis protein terdapat molekul pendukung biosintesis yaitu asam nukleat.



Gambar 26. Keterkaitan antara DNA, RNA dan Asam amino

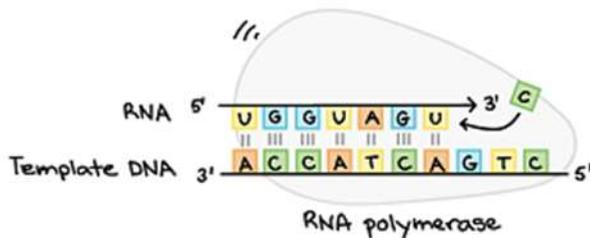
4.1. Transkripsi: Menyalin Informasi DNA menjadi RNA

Proses transkripsi terjadi di inti sel pada eukariot dan di sitoplasma pada prokariot. Dalam proses ini, gen pada untai DNA "ditulis ulang" menjadi

RNA. Berbeda dengan DNA, RNA hanya memiliki untai tunggal. RNA ini diproses pada organisme eukariotik seperti kita untuk menghasilkan produk akhir yang disebut mRNA (messenger RNA).

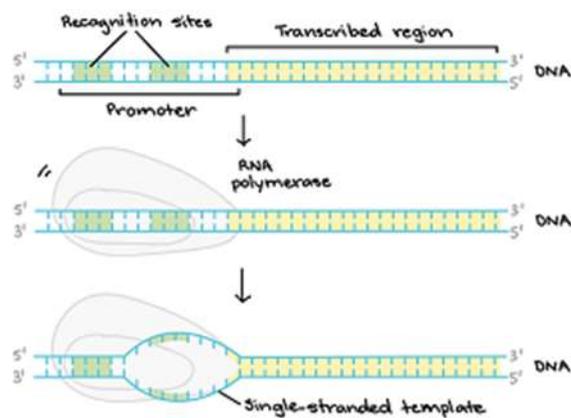
Transkripsi bertujuan untuk membuat salinan RNA dari untai gen di DNA, tahap pertama ekspresi gen, di mana informasi dari gen digunakan untuk membuat produk fungsional seperti protein. RNA menyalin, atau mentranskripsi, informasi yang diperlukan untuk membuat polipeptida, yang merupakan gabungan asam amino atau protein atau subunit protein. Sebelum dapat ditranslasi menjadi protein, transkripsi eukariotik harus melalui berbagai proses.

RNA polimerase adalah enzim utama yang terlibat dalam transkripsi ini, yang mensintesis untai RNA dengan menggunakan template (cetakan) DNA dari satu untai. Lebih spesifik lagi, RNA polimerase membuat untai RNA pada arah 5' ke 3', menambahkan nukleotida baru pada ujung untai 3'.



Gambar 27. RNA Polymerase

Tahapan transkripsi terdiri dari: inisiasi, elongasi, dan terminasi. Uraian mengenai hal tersebut disampaikan sebagai berikut:



Gambar 28. Tahapan proses transkripsi

1. Inisiasi

RNA polimerase berikatan dengan promotor pada untai DNA, memulai proses transkripsi. Pada eukariot, diperlukan faktor transkripsi untuk membantu RNA polimerase mengenali promotor. RNA polimerase terikat pada promotor, untai DNA di dekat awal setiap gen, yang unik. Setelah terikat, RNA polimerase memisahkan untai ganda DNA, memberikan template atau cetakan untai tunggal yang siap untuk ditranskripsi.

2. Elongasi

RNA polimerase mensintesis untai mRNA dari 5' ke 3' menggunakan salah satu untai DNA sebagai templat. RNA polimerase menggunakan untai DNA cetakan untuk membentuk molekul RNA keluar dari nukleotida sambil "membaca" cetakan ini, membuat untai yang tumbuh dari 5' ke 3'. RNA transkripsi membawa informasi yang sama dari untai DNA non-template (coding). Selama proses ini, basa RNA Urasil (U) menggantikan Timin (T).

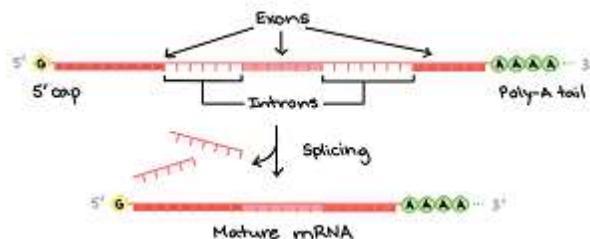
3. Terminasi

Transkripsi berhenti ketika RNA polimerase mencapai sinyal terminasi. Transkripsi RNA ditunjukkan dengan urutan yang disebut terminator. RNA polimerase melepaskan hasil transkripsi RNA setelah ditranskripsi. Pada

bakteri, RNA hasil transkripsi dapat bertindak langsung sebagai mRNA, atau messenger RNA. Transkripsi gen koding-protein pada eukariotik disebut pre-mRNA dan memerlukan proses tambahan sebelum dapat ditranslasi secara langsung.

mRNA eukariotik mengalami modifikasi pasca-transkripsi, termasuk:

- Penambahan 5' cap: Melindungi mRNA dari degradasi. Untuk meningkatkan stabilitas mRNA, untai pre-mRNA eukariotik harus memiliki ujung yang dimodifikasi, 5' cap (di awal) dan 3' ekor poly-A.
- Penambahan ekor poli-A: Membantu stabilitas dan transportasi mRNA keluar inti.
- Splicing: Penghapusan intron (bagian tidak penting) dan penyambungan ekson. Dalam proses ini, bagian pre-mRNA (intron) dipotong, dan keping sisa (disebut exons) disambung kembali. Tujuan dari pemotongan ini adalah untuk memastikan bahwa mRNA memiliki urutan mRNA yang tepat. Introns dan exons akan ditranslasi bersama, membentuk polipeptida "sampah" jika introns tidak dibuang.



Gambar 29. Proses pemotongan intron dan penggabungan ekson untuk menghasilkan mature mRNA

4.2. Translasi: Menerjemahkan Informasi RNA menjadi Protein

Setelah mRNA selesai ditranskripsi dan dimodifikasi, kemudian diangkut ke sitoplasma (atau ke retikulum endoplasma pada eukariot) untuk translasi.

Selama proses translasi, sel "membaca" informasi pada messenger RNA (mRNA) dan menggunakan informasi tersebut untuk menghasilkan protein. Sebenarnya, mRNA tidak selalu mengkode protein secara keseluruhan; kadang-kadang, mRNA hanya mengkode subunit protein atau polipeptida (rantai asam amino). Instruksi untuk membuat polipeptida diberikan oleh RNA nukleotida (Adenine, Uracil, Cytosine, dan Guanine), yang dibaca dalam kelompok tiga nukleotida yang disebut kodon. Setiap satu dari 61 kodon yang bertanggung jawab untuk asam amino "dibaca" untuk menghasilkan asam amino tertentu dari dua puluh asam amino umum yang ditemukan di protein. Satu kodon, AUG, membangun asam amino methionine dan juga berfungsi sebagai kodon awal untuk memberi sinyal untuk memulai pembangunan protein.

Ada tiga kodon stop, UAA, UAG, dan UGA, yang menginformasikan sel jika pembuatan polipeptida telah selesai. Hubungan antara kodon ini disebut kode genetik, dan memungkinkan sel untuk mengkode mRNA menjadi rantai asam amino.

Dengan cara apa mRNA "dibaca" untuk menghasilkan polipeptida? Ribosomer dan tRNA adalah dua molekul yang memainkan peran penting dalam proses translasi.

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

Gambar 30. Gabungan tiga nukleotiga yang membentuk kodon

Transfer RNA (tRNA)—Transfer RNA, juga dikenal sebagai tRNA, adalah molekul yang berfungsi sebagai "jembatan" yang menghubungkan kodon mRNA ke asam amino yang dikodingnya. Setiap tRNA memiliki sekuens (urutan) 3 nukleotida yang disebut antikodon di satu ujungnya, yang dapat mengikat ke kodon mRNA tertentu. Asam amino dibawa ke ujung lain tRNA, yang dikoding oleh kodon.

Ribosom adalah tempat pembuatan polipeptida dan protein. Ribosom terdiri dari RNA (ribosomal RNA, atau rRNA) dan protein. Setiap ribosom terdiri dari dua subunit, yang besar dan yang kecil. Untuk membuat rantai, ribosom memberikan set lubang di mana tRNA dapat menemukan kodon yang sesuai dengan cetakan mRNA.

Tahapan Translasi:

1. Inisiasi

Kompleks ribosom kecil (40S pada eukariot, 30S pada prokariot) berikatan dengan mRNA di dekat kodon inisiasi (AUG). tRNA inisiator yang

membawa Metionin (eukariot) atau N-formil metionin (prokariot) berikatan dengan kodon inisiasi. Subunit ribosom besar (60S pada eukariot, 50S pada prokariot) kemudian bergabung membentuk kompleks lengkap.

2. Elongasi

tRNA membawa asam amino ke situs A pada ribosom. Asam amino ditransfer ke rantai peptida yang sedang tumbuh di situs P melalui ikatan peptida yang dikatalisis oleh peptidil transferase. Ribosom bergerak ke sepanjang mRNA dari 5' ke 3', dan tRNA yang kosong keluar melalui situs E.

3. Terminasi

Proses translasi berhenti ketika ribosom mencapai kodon terminasi (UAA, UAG, UGA). Faktor terminasi mengikat ribosom, menyebabkan pelepasan polipeptida yang baru disintesis dari ribosom. Tahap di mana rantai polipeptida dilepaskan disebut terminasi. Ketika stop codon (UAG, UAA, atau UGA) memasuki ribosom, rantai polipeptida terpisah dari tRNA dan keluar dari ribosom, proses ini dimulai. Setelah selesai, polipeptida mungkin masih perlu dilipat menjadi tiga dimensi, melalui proses tambahan (seperti mengeluarkan asam amino) dan ditempatkan di tempat yang tepat di dalam sel, atau bergabung dengan polipeptida lain sebelum menjadi protein dan melakukan fungsinya. Protein sangat penting bagi organisme karena berfungsi sebagai penyusun tubuhnya. Protein adalah rantai asam amino yang ditemukan dalam inti sel dan dikenal sebagai polipeptida atau subunit protein.

DNA dan kode genetik, transkripsi, dan translasi kode genetik menjadi protein adalah semua langkah yang diperlukan dalam proses sintesis protein ini.

Rangkuman

Biosintesis protein adalah proses biologis yang menghasilkan protein di dalam sel melalui dua tahap utama: transkripsi dan translasi. Pada tahap transkripsi, informasi genetik dalam DNA disalin menjadi mRNA di inti sel. mRNA kemudian keluar dari inti dan menuju ribosom di sitoplasma. Pada tahap translasi, ribosom membaca urutan kodon pada mRNA dan mencocokkannya dengan tRNA yang membawa asam amino. Asam amino ini kemudian dirangkai menjadi rantai polipeptida sesuai dengan urutan yang ditentukan oleh mRNA, membentuk protein fungsional.

Soal Latihan

1. Apa yang terjadi pada tahap transkripsi dalam biosintesis protein?
2. Jelaskan peran mRNA dalam biosintesis protein.
3. Di mana tahap translasi terjadi dalam sel?
4. Sebutkan peran tRNA dalam proses translasi.

Bagaimana hubungan antara kodon pada mRNA dan asam amino yang disusun dalam polipeptida?

BAB V

ENZIM

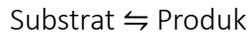
Pendahuluan

Enzim adalah katalisator biologis, kadang disebut sebagai biokatalis, yang mempercepat proses biologis dalam makhluk hidup. Selain itu, enzim dapat diambil dari sel dan digunakan sebagai katalisator untuk berbagai reaksi komersial penting. Sebagai contoh, enzim digunakan dalam bubuk pencuci dan produk pembersih lainnya, dan merupakan komponen penting dari instrumen dan uji analitik dengan aplikasi di bidang kedokteran, forensik, dan lingkungan. Makromolekul ini juga memainkan peran penting dalam sintesis pemanis dan modifikasi antibiotik. Istilah "enzim" berasal dari istilah Yunani en, yang berarti "di dalam," dan zyme, yang berarti "ragi," dan pertama kali digunakan oleh ilmuwan Jerman Wilhelm Kühne pada tahun 1878 ketika ia sedang membahas kemampuan ragi untuk membuat alkohol dari karbohidrat.

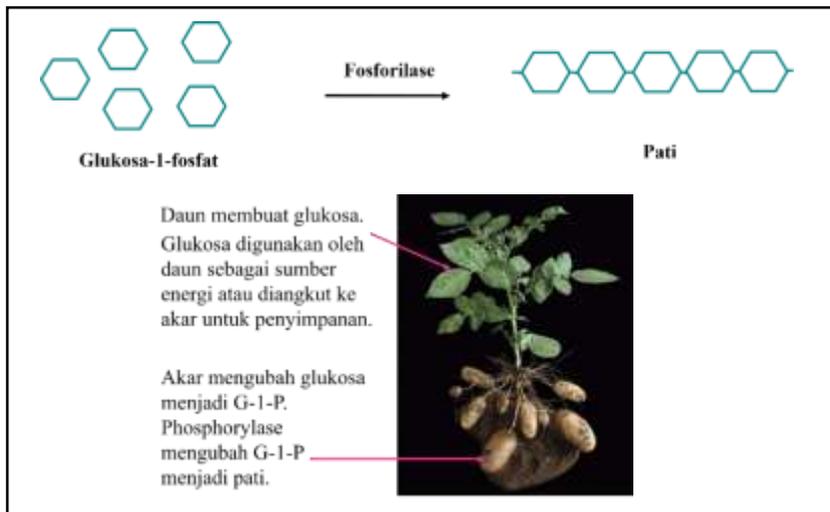
Pada akhir abad kesembilan belas dan awal abad kedua puluh, terjadi kemajuan signifikan dalam ekstraksi, karakterisasi, dan eksploitasi komersial banyak enzim. Namun, baru pada tahun 1920-an enzim berhasil dikristalkan, yang menunjukkan hubungan antara molekul protein dan aktivitas katalitik. Selama enam puluh tahun berikutnya atau lebih, diyakini bahwa semua enzim adalah protein, tetapi pada tahun 1980-an ditemukan bahwa molekul RNA tertentu juga dapat berfungsi sebagai katalis. RNA ini, yang juga dikenal sebagai ribozim, sangat penting untuk ekspresi gen tertentu. Pada dekade yang sama, ahli biokimia juga berhasil menciptakan cara untuk menghasilkan antibodi yang memiliki aktivitas katalitik. Antibodi

ini disebut "abzim" dan menawarkan banyak harapan untuk digunakan dalam bidang kedokteran dan sebagai katalis inovatif dalam industri.

Enzim adalah katalis yang sangat kuat yang dapat mengkatalisis konversi molekul substrat menjadi molekul produk pada konsentrasi yang sangat rendah. Konstanta k_{cat} (*turnover rate/turnover frequency/turnover number*) adalah konstanta yang mewakili jumlah molekul substrat yang dapat dikonversi menjadi produk oleh satu molekul enzim per unit waktu (biasanya per menit atau per detik). Konstanta ini digunakan untuk menggambarkan aktivitas katalitik enzim.



Enzim bukan hanya katalis yang sangat kuat, tetapi juga menunjukkan selektivitas yang luar biasa karena enzim biasanya secara spesifik mengkatalisis konversi satu jenis molekul substrat menjadi molekul produk, atau paling banyak beberapa jenis substrat yang memiliki keterkaitan. Fosforilase adalah enzim yang mensintesis Pati dengan substrat Glukosa-1-fosfat.



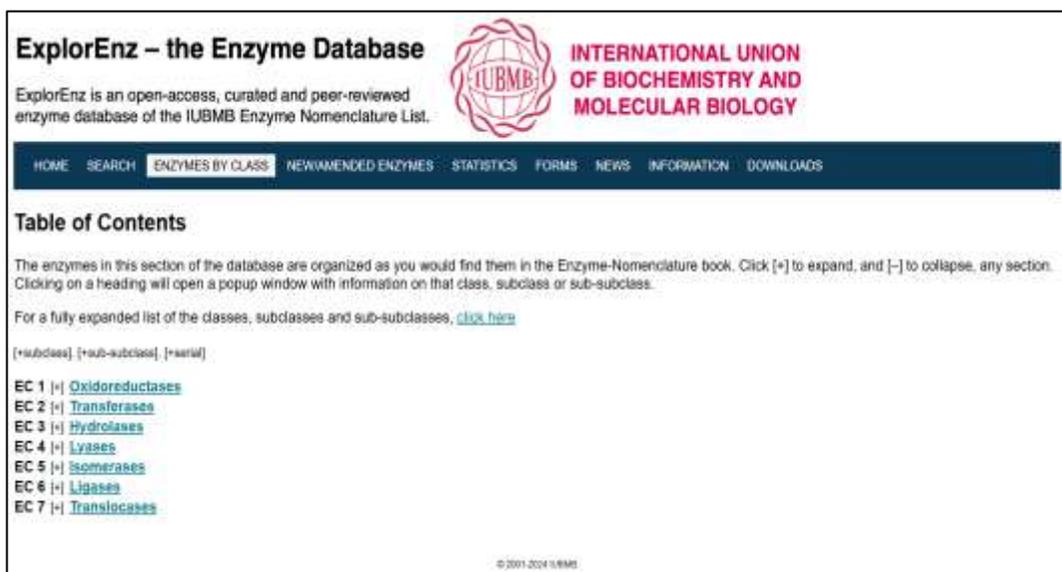
Gambar 31. Fosforilase mensintesis Pati dengan substrat Glukosa-1-fosfat

Beberapa enzim bahkan menunjukkan spesifisitas kelompok. Alkaline fosfatase, misalnya, adalah enzim yang memiliki kemampuan untuk menghilangkan gugus fosfat dari berbagai substrat. Di samping itu, spesifisitas absolut merujuk pada tingkat spesifisitas yang jauh lebih tinggi yang ditunjukkan oleh enzim lain. Sebagai contoh, glukosa oksidase menunjukkan selektivitas substrat yang hampir mutlak untuk β -D-glukosa dan hampir tidak ada aktivitas dengan monosakarida lainnya. Spesifisitas ini sangat penting untuk banyak analisis dan perangkat (biosensor) yang menilai substrat tertentu (seperti glukosa) dalam kombinasi yang rumit (seperti sampel darah atau urine).

5.1. Tata Nama dan Klasifikasi Enzim

Jumlah enzim yang melimpah dan banyaknya nama yang telah diberikan pada enzim yang sama menyebabkan diperlukannya sistem yang terorganisir untuk klasifikasi dan tata nama enzim. Sebelum aturan tata nama enzim dibuat, penamaan enzim dalam literatur sebelumnya sangat membantu. Kemungkinan hanya individu yang terlibat langsung yang memahami perbedaan antara enzim kuning lama dan baru serta apa yang dikatalisis oleh diaphorase—atau, untuk dalam hal ini, DT-diaphorase—(EC 1.6.99.1 dan EC 1.8.1.4). Sejalan dengan hal ini, nama reaksi yang dikatalisis oleh rhodanese (thiosulfate sulfurtransferase: EC 2.8.1.1) tidak tampak dari namanya. Tidak jarang ditemukan bahwa para peneliti menerbitkan studi tentang beberapa enzim dengan nama-nama serupa atau enzim yang sama dengan nama yang berbeda. Sebuah enzim dapat dikenali dengan beberapa nama, dan kadang-kadang nama yang sama digunakan untuk enzim yang berbeda.

Untuk memungkinkan identifikasi enzim yang tidak ambigu berdasarkan reaksi yang mereka katalisis, International Union of Biochemistry mengembangkan sistem klasifikasi. Sistem ini menggunakan penamaan sistematis yang mengidentifikasi reaksi kimia yang terlibat dalam setiap kelompok enzim dan sistem numerik (nomor EC) untuk mengategorikan enzim berdasarkan jenis reaksi yang mereka katalisis. Daftar resmi penkategorian enzim yang saat ini digunakan secara luas adalah ExplorEnz—*The Enzyme Database* (<http://www.enzyme-database.org>). ExplorEnz adalah daftar resmi nomenklatur dan klasifikasi enzim yang digunakan oleh International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). Database ini dibuat pada tahun 2005 sebagai metode baru untuk mengakses data Daftar Nomenklatur Enzim IUBMB di Trinity College, Dublin. Informasi ini tetap tersimpan dalam database MySQL, dengan nama-nama kimia yang diformat sesuai dengan pedoman IUPAC.



The screenshot displays the ExplorEnz website interface. At the top, the title "ExplorEnz – the Enzyme Database" is prominently displayed. Below it, a brief description states: "ExplorEnz is an open-access, curated and peer-reviewed enzyme database of the IUBMB Enzyme Nomenclature List." To the right of this text is the IUBMB logo, which consists of a globe with the acronym "IUBMB" inside, and the full name "INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY" to its right. A dark blue navigation bar contains several menu items: HOME, SEARCH, ENZYMES BY CLASS, NEW/AMENDED ENZYMES, STATISTICS, FORMS, NEWS, INFORMATION, and DOWNLOADS. Below the navigation bar, the "Table of Contents" section is visible. It includes a paragraph explaining that enzymes are organized as in the Enzyme Nomenclature book and provides instructions on how to expand or collapse sections. A link is provided for a fully expanded list of classes, subclasses, and sub-subclasses. The main content area lists seven enzyme classes, each with a link to expand/collapse and a link to the class page: EC 1 | Oxidoreductases, EC 2 | Transferases, EC 3 | Hydrolases, EC 4 | Lyases, EC 5 | Isomerases, EC 6 | Ligases, and EC 7 | Translocases. At the bottom right of the page, a small copyright notice reads "© 2001-2004 IUBMB".

Gambar 32. Tampilan laman ExplorEnz

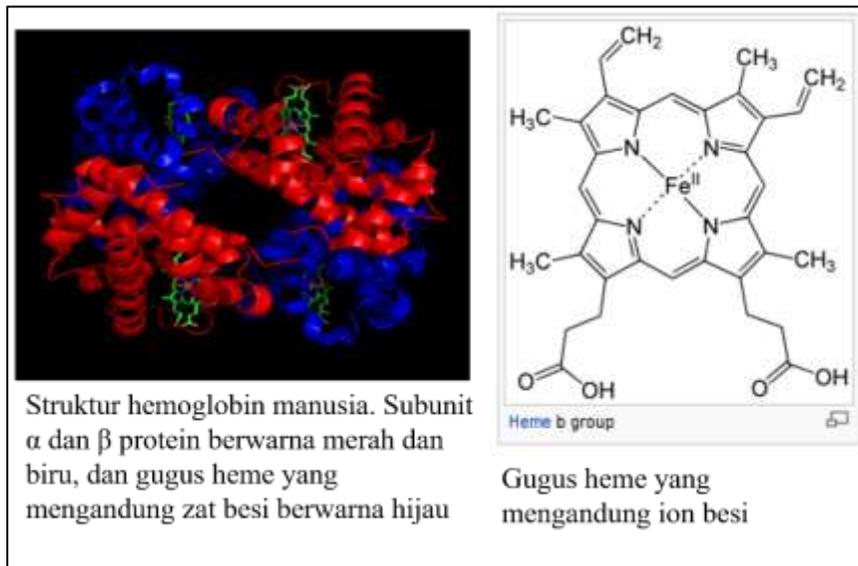
Sistem klasifikasi enzim IUBMB mengidentifikasi enzim berdasarkan reaksi yang dikatalisisnya menggunakan nomor EC yang terdiri dari empat digit yang dipisahkan oleh titik dan diberikan kepada setiap enzim. Oksidoreduktase (EC 1), Transferase (EC 2), Hidrolase (EC 3), Lyase (EC 4), Isomerase (EC 5), dan Ligase (EC 6) adalah enam kelompok enzim pertama yang diakui (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/rules.html>). Kelompok Oksidoreduktase memfasilitasi transfer atom hidrogen atau oksigen atau elektron antara molekul selama proses redoks. Dehidrogenase (transfer ion hidrogen), oksidase (transfer elektron ke oksigen molekuler), oksigenase (transfer oksigen dari oksigen molekuler), dan peroksidase (transfer elektron ke peroksida) adalah anggota dari kelas besar ini. Donor ekuivalen reduksi yang digunakan dalam reaksi ditunjukkan oleh digit kedua dari kode tersebut. Kelompok Transferase memfasilitasi perpindahan satu atom atau sekelompok atom antara dua molekul, kecuali enzim yang termasuk ke dalam kelompok lain, seperti hidrolase dan oksidoreduktase. Komisi Eropa menyarankan untuk mengakhiri nama transferase dengan X-transferase, di mana X adalah kelompok yang ditransfer. Sebagai contoh, pati dimodifikasi menjadi siklodekstrin oleh enzim glukano-transferase (EC. 2.4.1.19). Kelompok yang ditransfer dijelaskan oleh digit kedua. Kelompok Hidrolase mengkatalisis pemutusan hidrolitik ikatan, termasuk ikatan anhidrida fosfat, ikatan C–O, ikatan C–N, dan ikatan C–C. Enzim-enzim ini dikategorikan bergantung pada jenis ikatan yang dihidrolisis, Dalam bidang teknologi enzim, saat ini kelas enzim ini adalah yang paling sering dijumpai. Kelompok lyase menghilangkan gugus nonhidrolitik dari substrat. Dalam reaksi eliminasi ini, sebagian atom diambil dari substrat dan seringkali menghasilkan ikatan rangkap. Ikatan yang terputus ditunjukkan oleh digit kedua dalam klasifikasi ini. Kelompok Isomerase adalah enzim yang mampu

mengkatalisis berbagai peristiwa isomerisasi kimia. Enzim-enzim ini mengkatalisis perubahan dalam geometri atau struktur molekul. Enzim yang diklasifikasi dapat disebut sebagai tautomerase, racemase, epimerase, cis-trans-isomerase, isomerase, mutase, atau cyclo-isomerase tergantung pada jenis isomerisme yang terjadi. Selain itu, kelompok ligase membentuk ikatan baru antara molekul-molekul yang disintesis, sering disebut sebagai sintetase. Dalam reaksi biosintetik, ikatan kovalen digunakan untuk mengikat molekul-molekul bersama. Jenis reaksi yang dikatalisis ditunjukkan oleh digit kedua dan ketiga dalam kode. Kelompok enzim yang baru-baru ini ditambahkan adalah Translokase (EC 7) yang mengkatalisis perpindahan ion atau molekul melintasi membran atau pemisahan mereka di dalamnya.

Setiap kelas enzim memiliki arti sendiri untuk digit-digit kode EC sehingga tidak ada aturan universal dalam hal ini. Sebagai contoh, tripeptida aminopeptidases memiliki kode "EC 3.4.11.4", yang komponennya menunjukkan kelompok enzim berikut. Enzim EC 3 adalah hidrolase (enzim yang menggunakan air untuk memecah beberapa molekul lain). EC 3.4 adalah hidrolase yang bekerja pada ikatan peptide. EC 3.4.11 adalah hidrolase yang membelah asam amino amino-terminal dari polipeptida. EC 3.4.11.4 adalah hidrolase yang membelah ujung terminal amino dari tripeptide.

Banyak enzim menggunakan koenzim nonprotein selain asam amino untuk memperluas rentang reaktivitas kimianya. Koenzim adalah molekul organik atau metaloorganik kecil yang berfungsi sebagai kofaktor bagi enzim, membantu dalam katalisis reaksi biokimia. Kofaktor, yang bisa berupa koenzim atau ion logam, diperlukan untuk aktivitas enzim dan dapat mengikat erat atau lemah pada enzim. Kofaktor yang terikat erat, sering disebut sebagai kelompok prostetik, tetap terkait dengan enzim bahkan di

antara siklus reaksi. Sebaliknya, koenzim yang terikat lemah, yang dikenal sebagai kosubstrat, dapat berpisah dari enzim antara siklus reaksi, berperilaku seperti substrat. Dengan demikian, koenzim, kosubstrat, dan kofaktor memainkan peran krusial dalam memastikan enzim dapat berfungsi dengan baik.



Gambar 33 Hemoglobin sebagai contoh kofaktor

5.2. Fungsi dan Mekanisme Molekuler Enzim

Fungsi Enzim

Enzim memiliki berbagai fungsi penting dalam kehidupan organisme, terutama dalam sel makhluk hidup. Fungsi utama enzim adalah sebagai biokatalisator yang mempercepat laju reaksi kimia dalam sel. Enzim bekerja optimal dalam kondisi fisiologis seperti suhu sedang dan pH netral, yang umumnya sesuai dengan lingkungan hidup organisme. Spesifisitas enzim yang sangat tinggi memastikan bahwa setiap enzim hanya mengkatalisis reaksi tertentu dan mengikat substrat yang spesifik. Selain itu,

aktivitas beberapa enzim dapat diatur oleh berbagai faktor seperti pengikat alosterik, modifikasi kovalen, atau perubahan lingkungan lokal. Keuntungan dari reaksi yang dikatalisis oleh enzim meliputi reaksi dalam kondisi fisiologis, spesifisitas dan efisiensi tinggi, serta kemampuan regulasi aktivitas, yang semuanya penting untuk mengontrol reaksi biokimia dalam sel secara tepat dan efisien.

Enzim umumnya sangat spesifik terhadap substratnya. Ini berarti setiap enzim memiliki bentuk dan struktur yang dapat mengenali dan berinteraksi dengan substrat tertentu secara khusus. Spesifisitas ini sangat penting dalam mengatur jalannya jalur metabolik dalam sel. Enzim berperan dalam mengendalikan produksi produk metabolik dan mengatur laju reaksi yang diperlukan untuk memenuhi kebutuhan energi dan bahan kimia sel. Di samping itu, beberapa enzim berperan dalam proses transduksi sinyal di dalam sel. Contohnya adalah enzim kinase, yang mengfosforilasi protein tertentu untuk mengaktifkan atau menonaktifkan jalur sinyal tertentu. Kemampuan ini sangat penting dalam mengatur respons sel terhadap sinyal eksternal dan kondisi lingkungan.

Enzim juga dapat berperan dalam memelihara struktur seluler. Misalnya, enzim yang terlibat dalam sintesis dinding sel bakteri atau enzim yang membantu dalam pembentukan atau degradasi matriks ekstraseluler dalam sel hewan. Di samping itu, beberapa enzim memiliki peran dalam detoksifikasi bahan kimia beracun yang masuk ke dalam sel, misalnya enzim dalam hati yang mengubah senyawa beracun menjadi senyawa yang lebih mudah diekskresikan. Enzim juga diperlukan untuk proses reproduksi dan pertumbuhan sel, seperti enzim yang terlibat dalam sintesis asam nukleat atau enzim yang mengatur proses pembelahan sel. Secara keseluruhan,

enzim adalah molekul penting dalam biologi yang memungkinkan sel untuk berfungsi secara efisien dalam mempertahankan kehidupan.

Selain berperan dalam hampir semua aspek metabolisme dan regulasi biokimia dalam organisme, enzim saat ini banyak digunakan di berbagai industri, termasuk pembuatan deterjen (seperti protease, lipase, amilase), produksi tekstil (amilase, katalase untuk penghilangan pati), pengolahan kulit (protease untuk hidrolisis protein), produksi kertas, peningkatan lingkungan, pengolahan makanan (keju/mentega yang dimodifikasi enzim), dan pengawetan. Penggunaan enzim dalam produksi industri didukung oleh penggunaannya terutama di industri makanan (45%), deterjen (35%), tekstil (10%), dan kulit (3%).

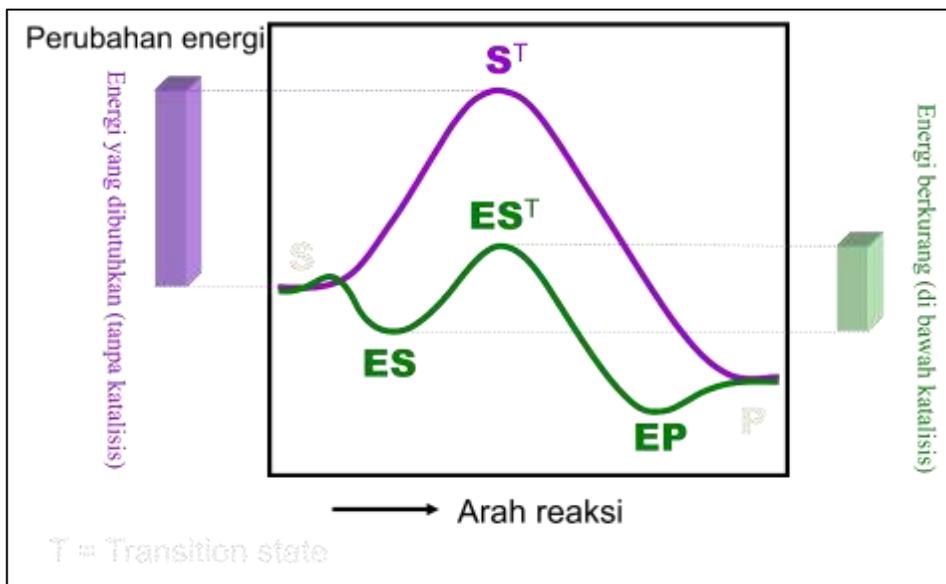
Enzim juga memainkan peran penting dalam bidang diagnostik, mulai dari immunoassay hingga biosensor. Immunoassay enzim dikenal karena sensitivitasnya, sebanding dengan radioimmunoassay di laboratorium namun dapat diadaptasi untuk skrining lapangan. Pengukuran tingkat enzim dalam cairan tubuh seperti plasma darah, urine, dan cairan serebrospinal membantu diagnosis klinis dengan mengungkapkan kerusakan seluler akibat kondisi tertentu seperti infeksi atau paparan toksin. Assay enzim memberikan diferensiasi organ dan penyakit yang lebih baik dibandingkan parameter klinis lainnya. Enzim juga sangat berperan dalam diagnosis penyakit hati dan bilier, penyakit jantung, dan gangguan otot. Selain itu, enzim digunakan dalam diagnosis infark miokard akut, yang menunjukkan peningkatan signifikan setelah cedera jantung. Enzim-enzim ini memungkinkan diagnosis tepat waktu dan penilaian pengobatan. Selain itu, gangguan otot rangka, baik miopati atau penyakit neurogenik, menunjukkan peningkatan tingkat enzim tertentu. Oleh karena itu, enzim adalah biomarker krusial yang membantu dalam diagnosis patologi otot. Enzim

memiliki potensi tinggi sebagai agen terapeutik melalui spesifisitas substrat tinggi dan efisiensi katalitiknya. Karakteristik ini tidak dimiliki oleh jenis obat lainnya.

Obat berbasis enzim juga menargetkan terapi kanker dengan menggunakan enzim proteolitik untuk menghambat pertumbuhan tumor dan mengurangi efek samping kemoterapi. Enzim proteolitik, termasuk papain dan chymotrypsin, menunjukkan potensi dalam mengurangi efek samping kemoterapi dan meningkatkan tingkat kelangsungan hidup pada beberapa jenis kanker. Potensi antiinflamasi terapi enzim membuktikan pentingnya penggunaan enzim dalam pengobatan kanker, meskipun mekanisme yang tepat masih belum jelas. Sebagai contoh, L-asparaginase menjadi agen antikanker yang efektif dengan mengurangi asparagin pada sel kanker. Terapi trombolitik berbasis enzim, seperti dengan streptokinase dan urokinase, melarutkan bekuan darah pada kondisi seperti infark miokard akut dan emboli paru sehingga dapat menyelamatkan nyawa pasien saat intervensi bedah membawa risiko besar. Enzim juga memainkan peran kritis dalam mengelola gangguan pencernaan, seperti kekurangan pankreas dan intoleransi laktosa. Di samping itu, enzim mikroba dan tumbuhan menawarkan alternatif yang menjanjikan untuk pengobatan tradisional berbasis hewan, meningkatkan pencernaan dan mengurangi respons inflamasi. Secara keseluruhan, enzim terus berkembang sebagai alat yang tak tergantikan dalam bioteknologi, meliputi aplikasi industri, diagnostik, terapi, dan kesehatan pencernaan, dan terus memperluas perannya di berbagai bidang kedokteran dan industri.

Mekanisme Molekuler Enzim

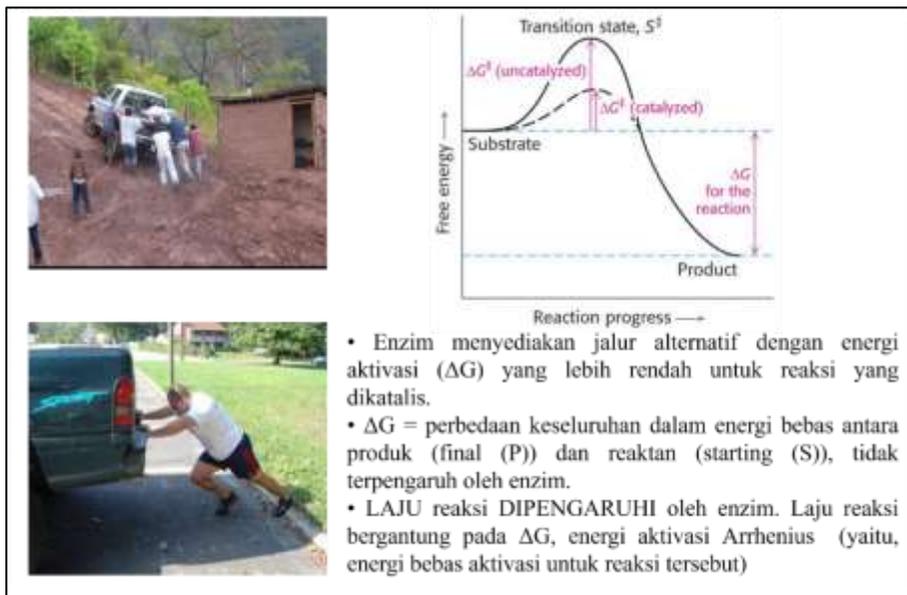
Agar reaksi biokimia terjadi, Energi aktivasi (energy barrier) yang dibutuhkan untuk mengubah molekul substrat menjadi keadaan transisi harus dilewati. Keadaan transisi memiliki energi bebas tertinggi di jalur reaksi. Perbedaan energi bebas antara substrat dan keadaan transisi disebut energi bebas aktivasi Gibbs (ΔG). ΔG negatif menunjukkan bahwa reaksi tersebut menguntungkan secara termodinamika dalam arah yang ditunjukkan, sedangkan ΔG positif menunjukkan bahwa reaksi tersebut tidak menguntungkan secara termodinamika dalam arah yang ditunjukkan. Reaksi yang tidak menguntungkan secara energi sering didorong dengan menghubungkannya dengan reaksi yang menguntungkan secara energi, seperti hidrolisis ATP. Enzim menstabilkan keadaan transisi dan menurunkan ΔG , sehingga meningkatkan laju di mana reaksi terjadi.



Gambar 34. Enzim menstabilkan keadaan transisi

Oleh karena itu, enzim dapat meningkatkan laju reaksi hingga jutaan kali lipat dibandingkan jika reaksi berlangsung tanpa enzim. Makromolekul ini

meningkatkan laju reaksi dengan menyediakan jalur energi aktivasi yang lebih rendah yang diperoleh pada reaksi dari reaktan ke produk.

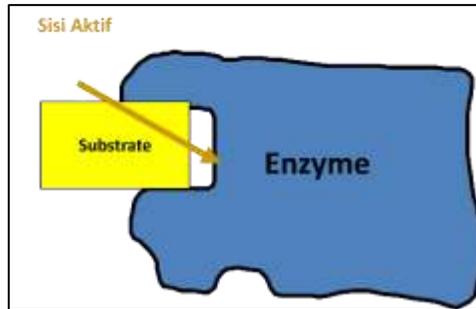


Gambar 35. Perubahan energi bebas

Reaksi kimia sering ada dalam keadaan kesetimbangan dinamis. Konstanta kesetimbangan (K) menentukan rasio konsentrasi substrat dan produk pada kesetimbangan. Enzim tidak mengubah posisi kesetimbangan, tetapi mempercepat pencapaian posisi kesetimbangan dengan mempercepat reaksi maju dan mundur.



Reaksi enzimatik terjadi saat substrat menempel pada sisi aktif suatu enzim. Sisi aktif adalah wilayah khusus pada enzim yang bertanggung jawab untuk mengikat substrat dan mengkatalisis reaksi kimia.

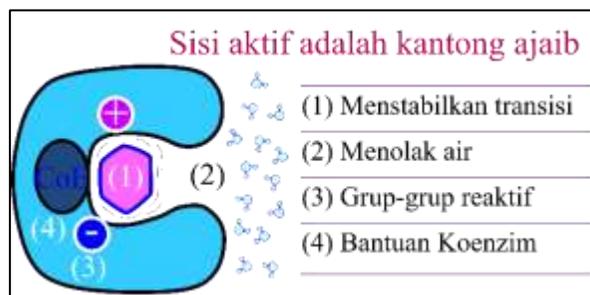


Gambar 36. Sisi aktif enzim

Sisi aktif ini merupakan entitas tiga dimensi yang sering kali berbentuk celah atau cekungan di permukaan protein enzim. Di daerah terbatas ini, substrat terikat oleh beberapa interaksi lemah, seperti ikatan hidrogen, gaya van der Waals, dan interaksi ionik, yang memastikan bahwa substrat diposisikan dengan tepat untuk bereaksi. Proses pembentukan kompleks enzim-substrat terjadi ketika substrat berikatan dengan sisi aktif enzim. Spesifisitas substrat dari enzim ditentukan oleh sifat dan tata letak spasial residu asam amino yang membentuk situs aktif. Sebagai gambaran, protease serin tripsin, chymotrypsin dan elastase memotong ikatan peptida dalam substrat protein di sisi karboksil masing-masing residu asam amino bermuatan positif, aromatik dan rantai kecil, karena residu komplementer di sisi aktifnya.

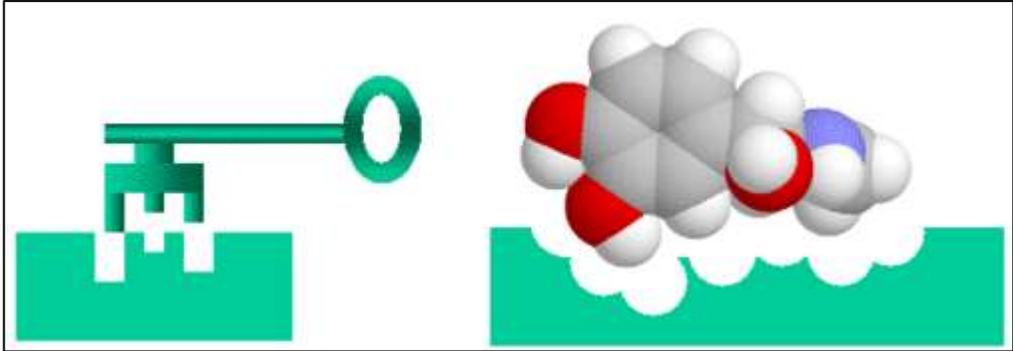
Sisi aktif enzim memiliki sifat-sifat unik yang memungkinkannya untuk mengkatalisis reaksi kimia secara efisien dan spesifik. Salah satu sifat utama sisi aktif adalah kemampuannya untuk menstabilkan keadaan transisi dari reaksi kimia, yaitu keadaan energi tinggi sementara yang harus dilalui substrat sebelum menjadi produk. Dengan menstabilkan keadaan transisi, enzim menyediakan jalur lain dengan energi aktivasi yang lebih rendah, sehingga mempercepat laju reaksi. Selain itu, banyak sisi aktif enzim memiliki sifat hidrofobik yang menolak air sehingga menciptakan lingkungan

yang mengurangi gangguan dari molekul air dan meningkatkan stabilitas interaksi antara enzim dan substrat. Sisi aktif juga mengandung gugus-gugus reaktif, seperti residu asam amino tertentu, yang berpartisipasi langsung dalam mekanisme reaksi melalui berbagai interaksi kimia. Grup-grup reaktif ini dapat membantu dalam pemecahan ikatan kimia substrat atau memfasilitasi transfer proton dan elektron. Selain itu, beberapa enzim membutuhkan bantuan koenzim, molekul organik kecil yang berperan sebagai kofaktor esensial dalam proses katalitik. Koenzim ini dapat membawa kelompok kimia tertentu atau membantu menstabilkan keadaan transisi, meningkatkan efisiensi reaksi. Dengan sifat-sifat ini, sisi aktif enzim memastikan bahwa reaksi biokimia dalam sel berlangsung dengan cepat, efisien, dan terkontrol.



Gambar 37. Struktur sisi aktif enzim

Secara keseluruhan, sisi aktif enzim memainkan peran krusial dalam memastikan bahwa reaksi kimia berlangsung secara efisien dan spesifik, dengan mengikat substrat dan mengubahnya menjadi produk dalam proses yang terkontrol dan tepat. Terdapat dua model utama yang menjelaskan bagaimana enzim mengikat substratnya: model gembok-dan-kunci dan model induced-fit. Model gembok-dan-kunci menggambarkan sisi aktif sebagai struktur yang komplementer dengan substrat, mirip dengan gembok yang hanya dapat dibuka dengan kunci yang tepat.



Gambar 38. Hipotesis gembok dan kunci

Di sisi lain, model induced-fit menjelaskan bahwa sisi aktif enzim dapat mengalami perubahan bentuk setelah berikatan dengan substrat sehingga menyesuaikan diri untuk memastikan bahwa substrat terikat dengan kuat dan berada dalam posisi yang optimal untuk reaksi. Secara keseluruhan, enzim adalah molekul penting yang memungkinkan sel berfungsi secara efisien dan mempertahankan kehidupan. Dengan kemampuannya untuk mengkatalisis reaksi biokimia, mengatur proses metabolik, dan berperan dalam berbagai aplikasi industri serta medis, enzim terus menunjukkan potensinya sebagai alat yang tak tergantikan dalam berbagai bidang ilmu pengetahuan dan teknologi.

5.3. Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim adalah langkah krusial dalam bioteknologi dan penelitian biokimia. Proses ini penting untuk mengidentifikasi fungsi dan struktur enzim, menggunakan produk yang dimurnikan sebagai perantara dalam reaksi atau pemrosesan lanjutan, serta untuk menghasilkan produk komersial dalam penelitian diagnostik dan terapeutik. Enzim dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti jaringan hewan, tanaman, cairan biologis (misalnya darah, susu, serum), ekspresi heterolog atau rekombinan, kultur fermentasi (ragi, jamur, bakteri), dan kultur sel (sel hewan, tanaman,

insekta). Konsentrasi enzim dalam sumber alami biasanya rendah sehingga diperlukan induksi ekspresi atau ekspresi rekombinan dalam berbagai sistem ekspresi untuk memperoleh jumlah yang cukup. Pemurnian enzim dilakukan sesuai dengan prosedur pemurnian protein pada umumnya. Proses ini bertujuan untuk memisahkan protein target dari campuran kompleks yang mengandung berbagai jenis molekul lainnya. Metode yang paling umum digunakan termasuk kromatografi, pengendapan, dan ultrafiltrasi.

Pada abad kedelapan belas, Antoine Fourcroy dan lainnya mengenali protein sebagai kelas molekul biologis yang berbeda. Teknik isolasi dan pemurnian protein mulai berkembang oleh Edwin Joseph Cohn selama Perang Dunia II melalui fraksinasi protein plasma. Studi awal pemurnian protein didominasi oleh sifat kelarutan, presipitasi, dan kristalisasi. Kromatografi kemudian menjadi tonggak besar berikutnya, dengan penukar ion menjadi tak tergantikan dalam pemurnian protein. Whatman memperkenalkan penukar ion berbasis selulosa, diikuti oleh penukar ion berbasis dekstran dari Pharmacia. Pada tahun 1910, Emil Starkenstein menjelaskan konsep kromatografi afinitas, yang menjadi penting dalam pemurnian protein. Karakteristik fisik dan kimia protein sangat mempengaruhi strategi pemurnian yang akan diterapkan. Stabilitas terhadap suhu dan pH, kebutuhan pelarut organik, deterjen, garam, kofaktor, serta sensitivitas terhadap protease, ion logam, dan kondisi redoks perlu dipertimbangkan. Berat molekul, sifat muatan, afinitas biospesifik, dan hidrofobisitas juga menentukan pilihan media dan kondisi kromatografi yang akan digunakan.

5.4. Langkah-langkah Utama Pemurnian Protein

1. Ekstraksi Protein

Langkah pertama adalah pelepasan protein target dari bahan sumbernya. Teknik ekstraksi bervariasi tergantung pada jenis bahan sumber dan sifat protein yang diinginkan. Penghancuran sel dilakukan dengan metode seperti homogenisasi, sonikasi, atau lisis kimia untuk melepaskan protein dari sel atau jaringan. Pemilihan buffer yang tepat sangat penting untuk menjaga stabilitas protein selama ekstraksi. Setelah penghancuran sel, padatan dipisahkan melalui sentrifugasi untuk memperoleh supernatan yang mengandung protein target.

2. Peningkatan Konsentrasi Ekstrak

Setelah ekstraksi, konsentrasi protein dalam ekstrak sering kali masih rendah dan perlu ditingkatkan. Teknik yang digunakan termasuk *freeze drying* (pengeringan beku), dialysis, presipitasi dengan *polyethylene glycol* (PEG), dan ultrafiltrasi. *Freeze drying* menghilangkan air dari ekstrak protein melalui sublimasi, meninggalkan protein dalam bentuk padat. Dialysis digunakan untuk menghilangkan garam dan molekul kecil lainnya dari larutan protein melalui membran semi-permeabel. Presipitasi dengan PEG memungkinkan protein dipisahkan dari larutan berdasarkan perbedaan kelarutan, sementara ultrafiltrasi menggunakan membran untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran molekul.

Teknik lainnya adalah *salting out* dengan ammonium sulfat ((NH₄)₂SO₄). *Salting out* adalah proses di mana senyawa yang larut dalam air diendapkan atau dipisahkan dari larutan dengan menambahkan ion-ion garam ke dalam larutan. Ion-ion garam ini meningkatkan kepekatan ion-ion dalam larutan, yang mengurangi kelarutan senyawa dalam air dan

menyebabkan senyawa tersebut mengendap. Teknik ini berdasarkan pada prinsip bahwa penambahan garam seperti natrium sulfat atau amonium sulfat secara bertahap menurunkan kelarutan senyawa dalam pelarut air, yang memungkinkan endapan senyawa tersebut untuk diambil dengan cara sentrifugasi atau penyaringan.

Ada asam amino hidrofobik dan asam amino hidrofilik dalam molekul protein. Setelah protein dilipat dalam larutan dengan air, asam amino hidrofobik biasanya membentuk area hidrofobik yang dilindungi sementara asam amino hidrofilik berinteraksi dengan molekul pelarutan dan memungkinkan protein membentuk ikatan hidrogen dengan molekul air di sekitarnya. Jika permukaan protein bersifat hidrofilik sudah cukup, protein dapat dilarutkan dalam air. Ketika konsentrasi garam meningkat, beberapa molekul air tertarik oleh ion garam, yang mengurangi jumlah molekul air yang tersedia. Sebagai hasil dari meningkatnya kebutuhan molekul pelarut, interaksi protein-protein lebih kuat daripada interaksi pelarut-zat terlarut; molekul protein menggumpal dengan membentuk interaksi hidrofobik satu sama lain. Proses ini dikenal sebagai *salting out*.



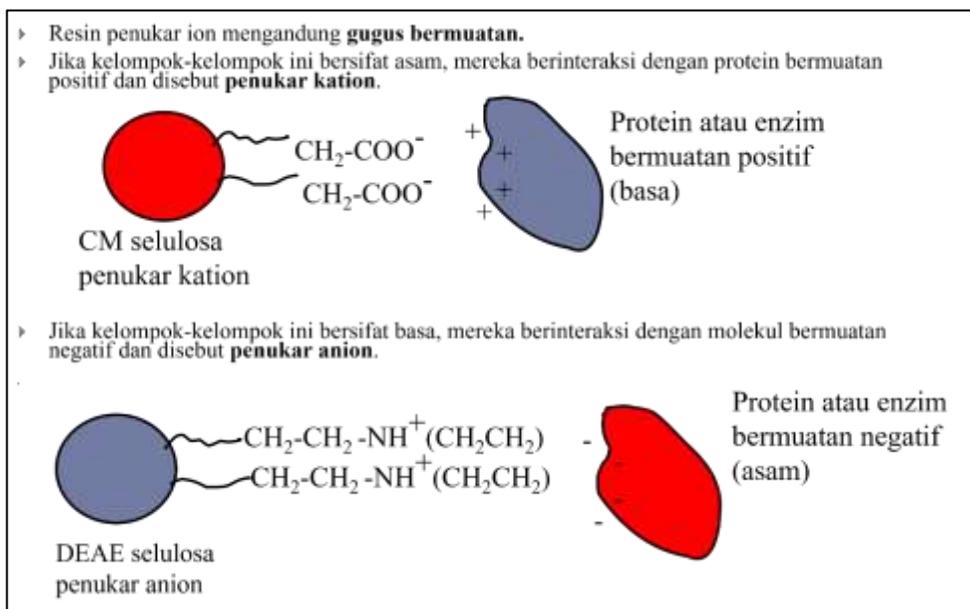
Gambar 39. Ilustrasi *salting out*

3. Proses Pemurnian Lanjutan: Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom adalah metode lanjutan yang sering digunakan untuk pemurnian protein dengan presisi tinggi. Teknik ini melibatkan penggunaan berbagai jenis kolom kromatografi yang dirancang untuk memisahkan protein berdasarkan sifat fisik dan kimianya. Ada beberapa jenis kromatografi yang umum digunakan dalam pemurnian protein, di antaranya:

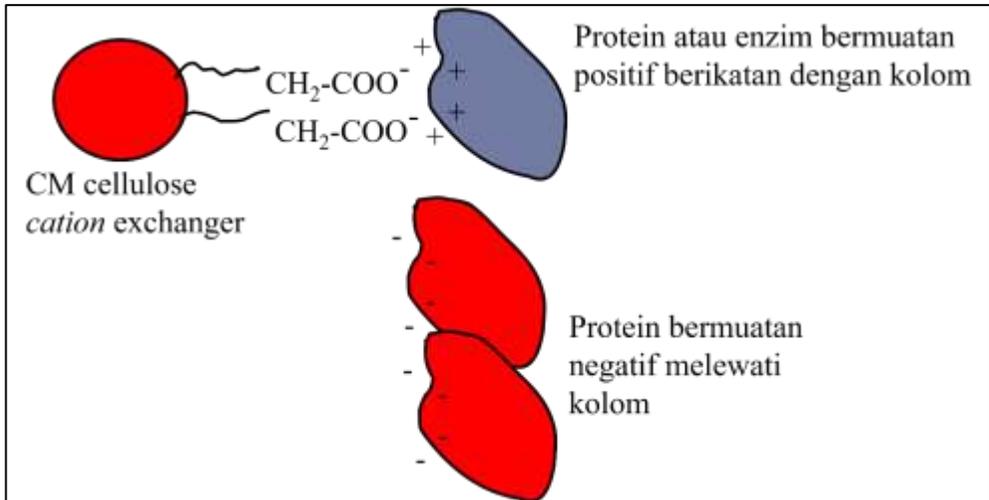
Kromatografi Penukar Ion

Kromatografi penukar ion memisahkan protein berdasarkan muatan listriknya. Dalam teknik ini, resin penukar ion memiliki gugus bermuatan yang dapat berinteraksi dengan protein yang bermuatan berlawanan.



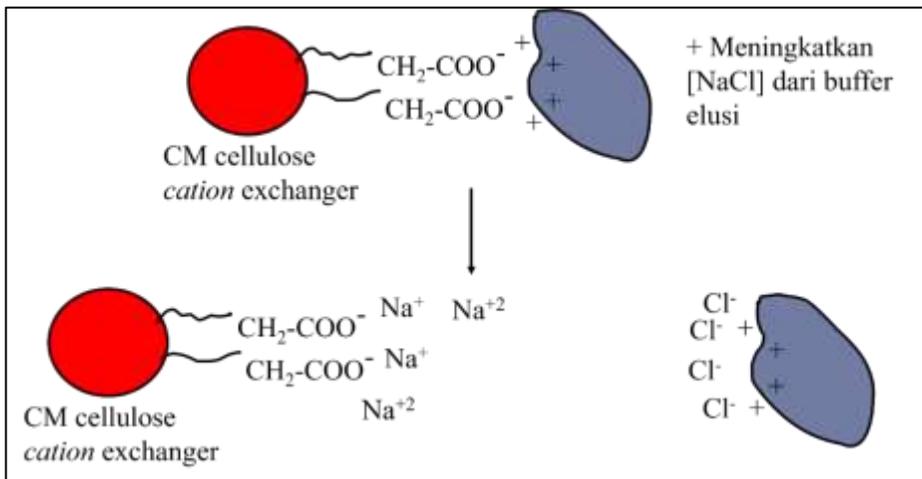
Gambar 40. Kromatografi penukar ion

Untuk pengikatan protein, pH tetap (biasanya mendekati netral) dalam kondisi garam rendah.



Gambar 41. Kromatografi penukar ion

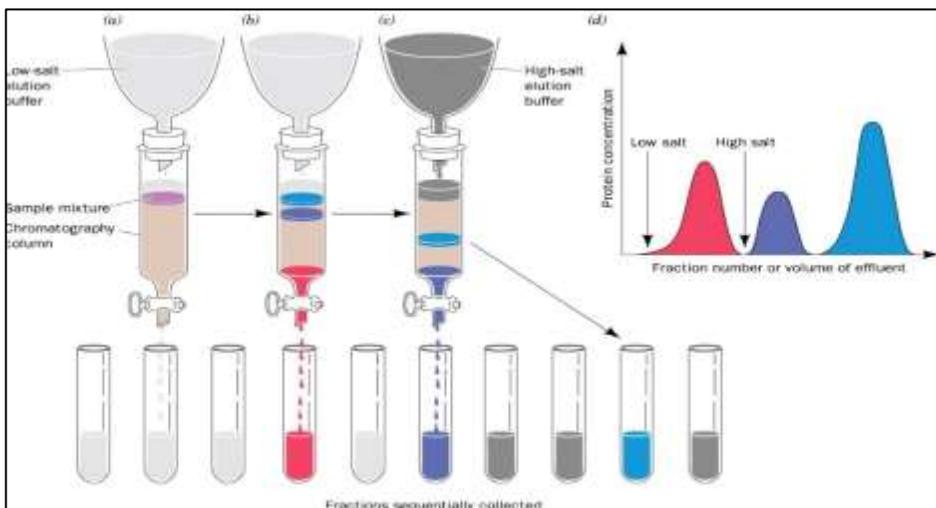
Untuk mengelusi protein yang kita inginkan, penambahan jumlah garam harus semakin tinggi (tingkatkan kekuatan ionik). Na^+ akan berinteraksi dengan resin kation dan Cl^- akan berinteraksi dengan protein bermuatan positif untuk keluar dari kolom.



Gambar 42. Elusi protein

Protein akan berikatan dengan penukar ion dengan afinitas yang berbeda. Saat kolom dielusi dengan buffer, protein yang memiliki afinitas relatif

rendah dengan resin penukar ion (fase diam) akan bergerak melalui kolom lebih cepat daripada protein yang mengikat fase diam pada kolom. Semakin besar afinitas pengikatan protein untuk fase diam pada kolom pertukaran ion, semakin lambat kolom. Protein dapat dielusi dengan mengubah buffer elusi menjadi buffer dengan konsentrasi garam yang lebih tinggi dan/atau pH yang berbeda (elusi bertahap atau elusi gradien). Penukar kation mengikat protein dengan muatan positif. Penukar anion mengikat protein dengan muatan negatif.



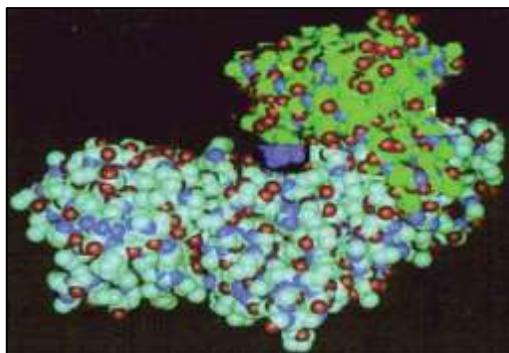
Gambar 43. Kromatografi pertukaran ion menggunakan elusi bertahap

Proses kromatografi ini melibatkan persiapan kolom, pengikatan protein, pencucian untuk mengeluarkan kontaminan, dan elusi protein terikat dengan buffer yang mengubah pH atau kekuatan ionik. Teknik ini sangat berguna untuk memurnikan protein dengan perbedaan muatan yang halus. Penukar ion dapat berupa penukar ion selulosa dan penukar ion tipe gel. Penukar ion selulosa adalah yang paling umum. Penukar ion tipe gel dapat bergabung dengan sifat filtrasi gel dan memiliki kapasitas lebih tinggi.

Kelemahannya adalah bahan ini mudah dikompresi (diratakan oleh tekanan) sehingga aliran eluen rendah. Ada bahan lain yang berasal dari silika atau bead kaca berlapis yang dapat mengatasi masalah ini.

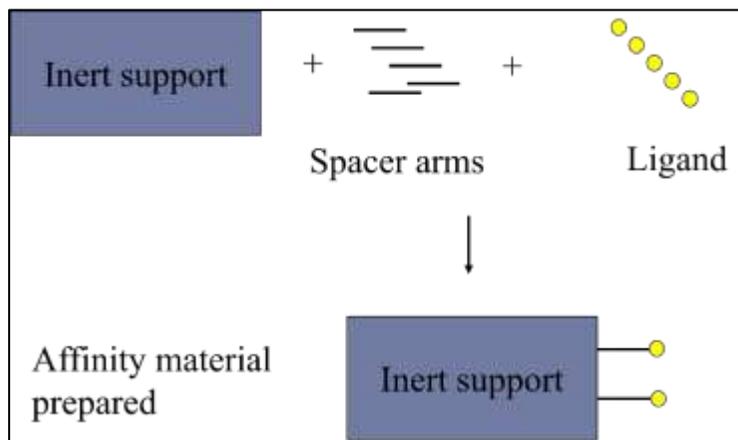
Kromatografi Afinitas

Banyak protein memiliki kemampuan untuk mengikat molekul tertentu dengan sangat erat namun tidak secara kovalen. Kemampuan ini dapat dimanfaatkan dalam berbagai aplikasi, salah satunya adalah kromatografi afinitas. Dalam teknik ini, protein yang memiliki afinitas tinggi terhadap molekul tertentu digunakan untuk memisahkan dan memurnikan zat-zat yang diinginkan dari campuran kompleks, sehingga menghasilkan hasil yang lebih spesifik dan efisien. Proses ini menggunakan ligan yang terimmobilisasi pada matriks kolom untuk mengikat protein target secara spesifik. Protein non-target dicuci keluar, sementara protein target dielusi dengan buffer yang mengganggu interaksi ligan-protein. Contohnya adalah glukosa, molekul kecil berwarna biru tua, yang mengikat dengan erat pada enzim hexokinase. Contohnya adalah glukosa yang mengikat dengan erat pada enzim hexokinase.



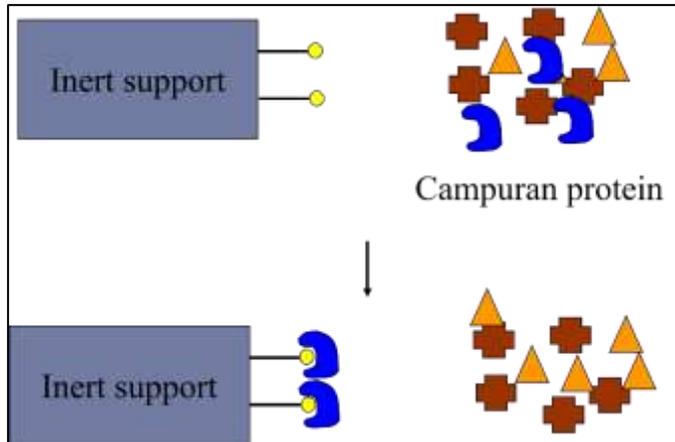
Gambar 44. Glukosa (molekul kecil berwarna biru tua) mengikat hexokinase

Cara kerja kromatografi afinitas melibatkan penggunaan ligan, molekul yang secara khusus mengikat protein yang diinginkan. Ligan ini diikatkan pada matriks atau media pendukung yang kemudian dimasukkan ke dalam kolom kromatografi. Ketika campuran protein dilewatkan melalui kolom tersebut, protein yang memiliki afinitas tinggi terhadap ligan akan mengikat kuat dan tertahan di dalam kolom, sementara protein lain yang tidak memiliki afinitas yang sama akan lewat tanpa terikat. Setelah itu, protein yang diinginkan dapat dielusi atau dilepaskan dari kolom dengan cara mengubah kondisi elusi, seperti pH atau konsentrasi garam, yang menyebabkan protein terlepas dari ligan.



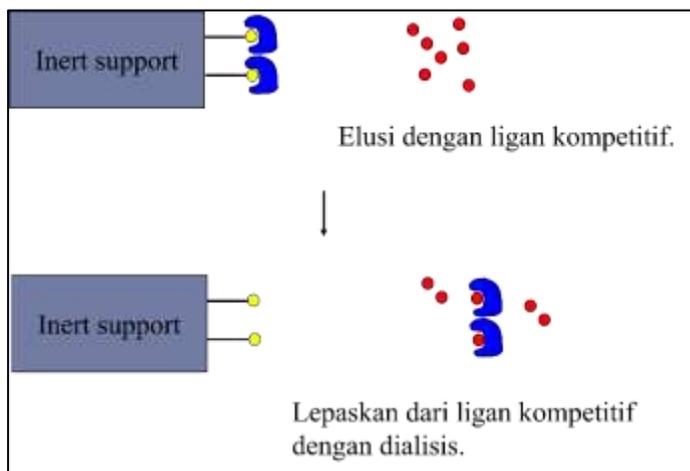
Gambar 45. Preparasi kromatografi afinitas

Ligan memainkan peran kunci dalam teknik ini karena hanya protein yang memiliki afinitas terhadap ligan tersebut yang akan terikat. Ini memungkinkan pemurnian protein target dari campuran yang kompleks dengan efisiensi tinggi dan spesifisitas yang baik.



Gambar 46. Kromatografi afinitas

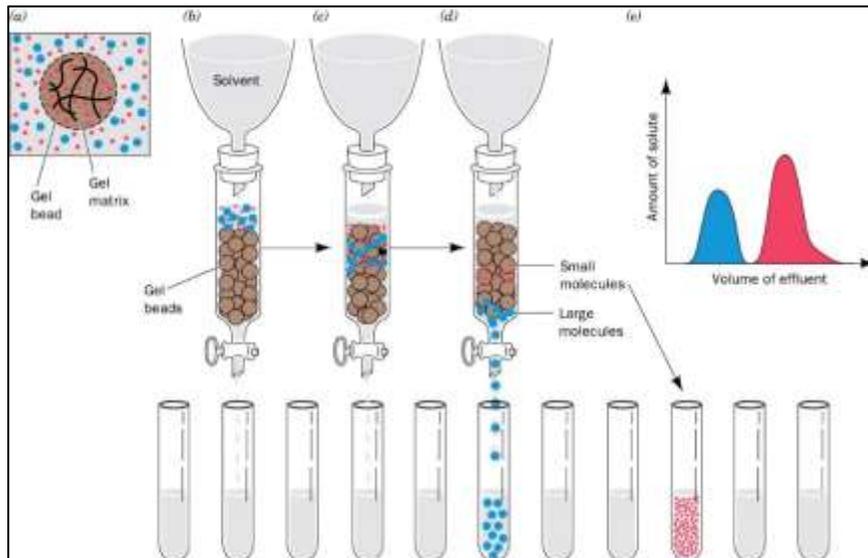
Dengan menggunakan metode elusi ini, protein yang diinginkan dapat dilepaskan dari kolom dengan kondisi yang lebih lembut, menghindari perubahan ekstrem dalam pH atau konsentrasi garam yang mungkin merusak struktur atau fungsi protein. Teknik ini memungkinkan pemurnian protein dengan spesifisitas tinggi dan meminimalkan potensi kerusakan pada protein target.



Gambar 47. Elusi kromatografi afinitas

Kromatografi Filtrasi Gel (Eksklusi Ukuran)

Memisahkan protein berdasarkan ukuran molekulnya dengan menggunakan matriks berpori. Molekul besar dielusi lebih cepat daripada molekul kecil yang masuk ke dalam pori-pori matriks.



Gambar 48. Kromatografi filtrasi gel

Kromatografi Adsorpsi

Kromatografi adsorpsi adalah teknik pemisahan di mana molekul nonpolar teradsorpsi secara fisik pada permukaan zat padat yang tidak larut, seperti alumina, tanah diatom, atau gel silika, melalui gaya Van der Waals. Dalam proses ini, molekul-molekul tersebut dielusi atau dipisahkan dari kolom menggunakan pelarut organik nonpolar seperti kloroform, heksana, atau etil eter. Pemisahan didasarkan pada partisi antara bahan kolom yang polar dan pelarut yang nonpolar. Meskipun teknik ini efektif untuk banyak jenis molekul, kromatografi adsorpsi jarang digunakan untuk pemisahan protein karena sifatnya yang cenderung tidak sesuai untuk struktur protein yang kompleks.

Kromatografi Hidroksiapatit

Kromatografi hidroksiapatit adalah teknik pemisahan yang menggunakan gel kristal hidroksiapatit, yaitu bentuk kalsium fosfat yang tidak larut, untuk menyerap protein. Proses pemisahan protein terjadi melalui elusi gradien kolom, di mana buffer fosfat digunakan untuk mencuci protein-protein yang telah teradsorpsi pada hidroksiapatit. Teknik ini efektif dalam memisahkan protein karena hidroksiapatit memiliki kemampuan unik untuk berinteraksi dengan protein berdasarkan muatan dan struktur spesifiknya.

Kromatografi Interaksi Hidrofobik

Kromatografi interaksi hidrofobik memanfaatkan interaksi hidrofobik antara protein dan matriks kolom dalam proses pemisahan bertujuan untuk mengisolasi protein berdasarkan tingkat hidrofobitasnya. Pada dasarnya, protein memiliki sifat hidrofobik yang berbeda-beda, yang memungkinkan interaksi yang lebih kuat dengan permukaan yang juga bersifat hidrofobik pada matriks kolom tertentu. Dalam teknik ini, ketika campuran protein dibiarkan mengalir melalui kolom yang berisi matriks dengan permukaan hidrofobik, protein-protein dengan hidrofobitas yang lebih tinggi akan lebih banyak berinteraksi dengan matriks tersebut dan cenderung tertahan lebih lama, sementara protein-protein dengan hidrofobitas yang lebih rendah akan lebih cepat elusi atau terlepas dari kolom. Dengan demikian, pemisahan berdasarkan hidrofobitas ini dapat dimanfaatkan untuk mendapatkan protein yang diinginkan dalam sampel protein campuran. Metode ini sering digunakan dalam berbagai aplikasi bioteknologi dan pemurnian protein.

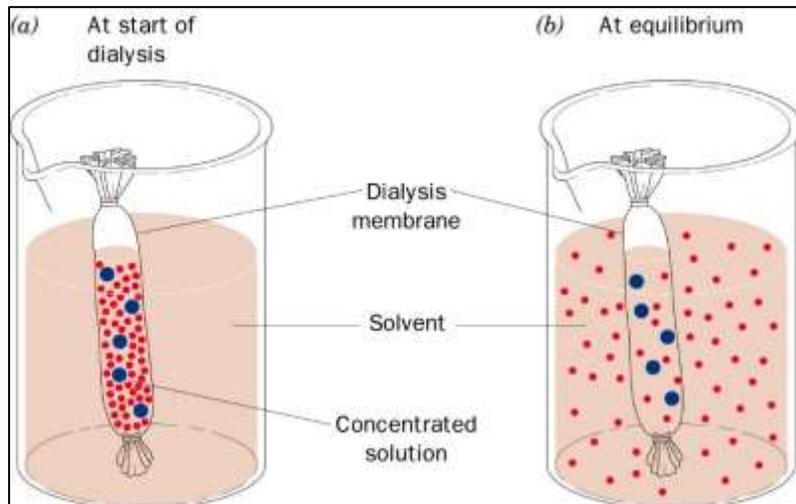
4. Proses Pemurnian Lanjutan: Presipitasi

Metode presipitasi melibatkan pemisahan enzim dari larutan dengan cara mengubah kondisi larutan, seperti pH, suhu, atau dengan menambahkan agen presipitasi seperti amonium sulfat. Metode ini sederhana dan ekonomis, namun mungkin memerlukan langkah pemurnian tambahan untuk mencapai kemurnian tinggi.

5. Proses Pemurnian Lanjutan: Ultrafiltrasi dan Dialisis

Ultrafiltrasi menggunakan membran semipermeabel untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran molekul. Teknik ini sangat berguna untuk konsentrasi protein dan penghilangan garam. Dialisis melibatkan penggunaan membran dialisis untuk menghilangkan molekul-molekul kecil seperti garam dari larutan protein.

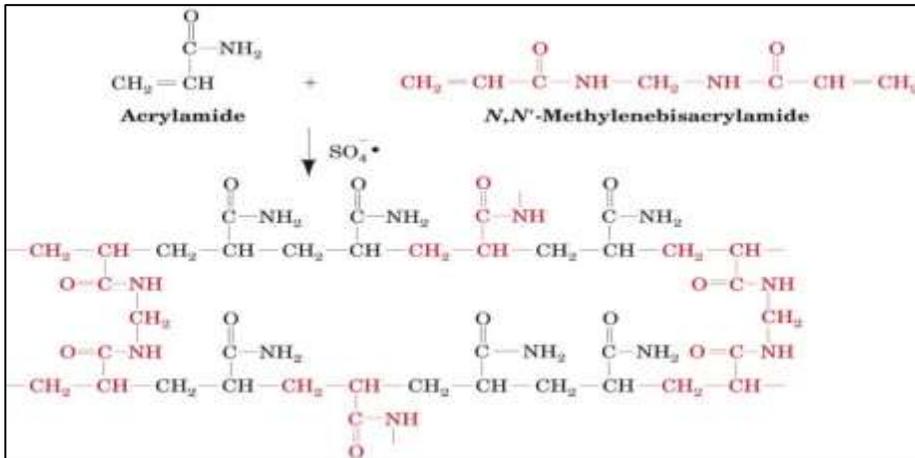
Dialisis adalah proses yang menggunakan membran semipermeabel untuk memisahkan molekul berdasarkan ukuran. Membran ini memiliki pori-pori yang lebih kecil dari dimensi makromolekul, memungkinkan pelarut, garam, dan metabolit kecil untuk berdifusi melintasi membran, sementara molekul yang lebih besar terblokir. Salah satu bahan dialisis yang umum digunakan adalah cellophane, yang terbuat dari selulosa asetat. Biasanya, dialisis digunakan untuk mengubah pelarut di mana protein dilarutkan. Selain itu, cellophane dapat digunakan untuk mengkonsentrasikan larutan protein dengan meletakkannya dalam polymeric dessicant (PEG) yang tidak dapat melewati membran, tetapi mampu menyerap air melalui membran tersebut.



Gambar 49. Penggunaan dialisis untuk memisahkan molekul kecil dan besar

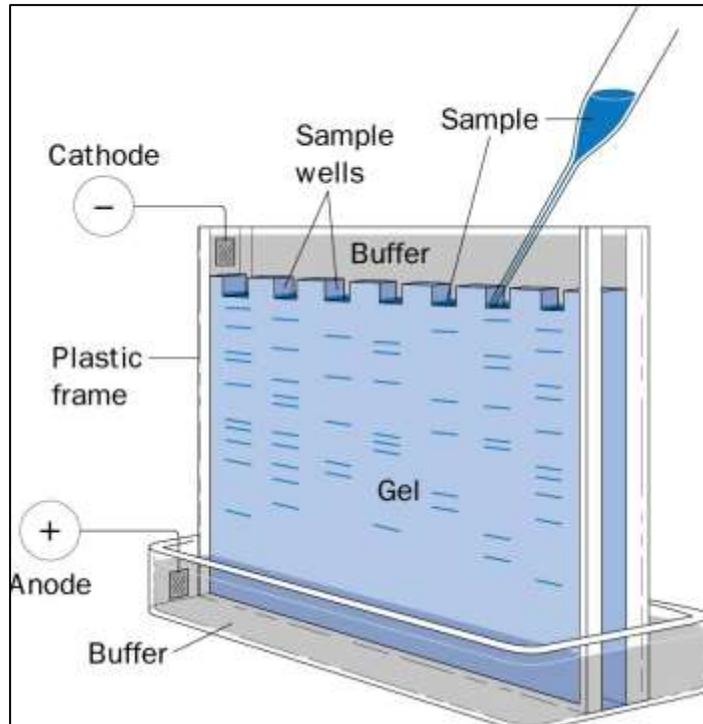
6. Metode Analisis Kemurnian

Setelah proses pemurnian, kemurnian dan aktivitas protein perlu dianalisis untuk memastikan hasil yang sesuai dengan tujuan. Teknik analisis yang umum digunakan termasuk kuantifikasi protein total, uji aktivitas enzim, elektroforesis gel, dan spektrometri massa. Elektroforesis adalah teknik yang memanfaatkan migrasi ion dalam medan listrik untuk memisahkan molekul berdasarkan muatan dan ukuran mereka. Salah satu bentuk yang umum adalah *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE), di mana sampel protein dimuat ke dalam gel *polyacrylamide* dan kemudian dipisahkan berdasarkan ukuran dan muatan listriknya saat dikenakan medan listrik. Teknik PAGE sering digunakan dalam penelitian biokimia untuk menilai kemurnian suatu protein, memungkinkan peneliti untuk mengidentifikasi protein target serta menentukan apakah terdapat kontaminasi atau keberadaan bentuk alternatif dari protein tersebut dalam sampel yang dianalisis.



Gambar 50. Reaksi pada pembentukan gel *polyacrylamide*

Peralatan yang dibutuhkan untuk melakukan elektroforesis gel, khususnya untuk PAGE, terdiri dari beberapa komponen utama. Pertama, terdapat gel elektroforesis itu sendiri, yang terbuat dari polyacrylamide dan biasanya dibuat dalam bentuk lembaran atau gel dalam tabung. Gel ini ditempatkan di dalam suatu cetakan atau gel cassette yang memberikan bentuk dan ruang untuk aplikasi sampel. Selanjutnya, diperlukan buffer elektroforesis, yang digunakan untuk menghubungkan listrik ke gel dan mengatur pH serta konduktivitas lingkungan elektroforesis. Buffer ini juga membantu dalam menjaga stabilitas pH selama proses elektroforesis. Selain itu, sebuah sumber listrik DC diperlukan untuk memberikan medan listrik yang diperlukan untuk memisahkan molekul dalam gel. Sumber listrik ini biasanya berupa catu daya dengan tegangan rendah hingga menengah, yang dapat disesuaikan sesuai dengan kebutuhan spesifik eksperimen elektroforesis.

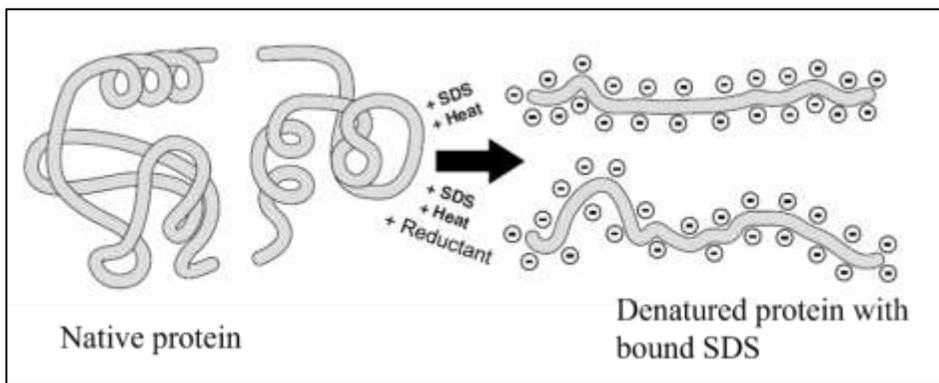


Gambar 51. Diagram peralatan elektroforesis disk

Secara umum, peralatan elektroforesis gel ini penting untuk melakukan pemisahan molekul berdasarkan ukuran dan muatan listrik mereka, yang merupakan teknik kunci dalam analisis biokimia dan molekuler di laboratorium.

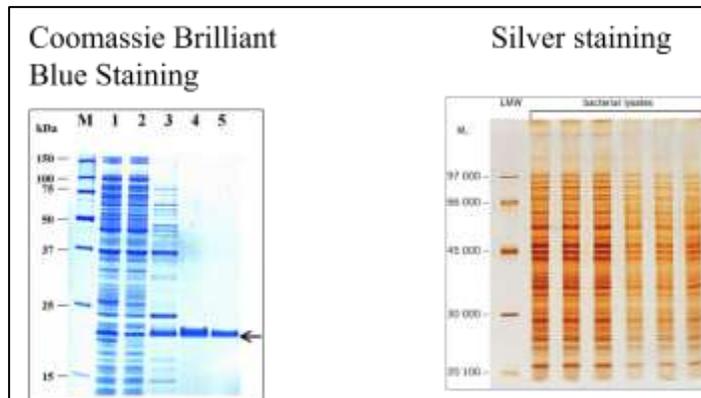
Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) adalah metode yang digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan massa molekulnya. Dalam proses ini, protein asli dibuka dengan pemanasan dan keberadaan *β -mercaptoethanol*, yang membantu dalam denaturasi dan pengurangan ikatan disulfida protein. SDS, atau *sodium dodecyl sulfate*, kemudian ditambahkan ke dalam sampel. SDS bertindak sebagai deterjen yang mengikat ke protein, membuatnya tetap dalam bentuk denaturasi dan memberikan muatan negatif yang sebanding

dengan panjang rantai polipeptida. Polipeptida yang lebih besar akan mengikat lebih banyak SDS dibandingkan polipeptida yang lebih kecil, sehingga perbedaan muatan ini memungkinkan pemisahan protein berdasarkan ukuran mereka selama proses elektroforesis. Dengan demikian, SDS-PAGE memberikan cara yang efektif untuk menganalisis komposisi dan kemurnian sampel protein dalam riset biokimia dan biologi molekuler.



Gambar 52. SDS-PAGE

Dalam gambar di bawah ini, terdapat dua hasil elektroforesis SDS-PAGE yang menunjukkan pemisahan protein dari dua jenis sampel yang berbeda dan menggunakan pewarnaan yang berbeda pula yaitu *coomassie brilliant blue staining* dan *silver staining*. Pada umumnya, *silver staining* 10-100 kali lebih sensitif daripada *coomassie blue staining*, tapi lebih rumit. Pita samar tapi masih terlihat pada gel ini mengandung kurang dari 0.5 ng protein.



Gambar 53. Elektroforegram SDS-PAGE

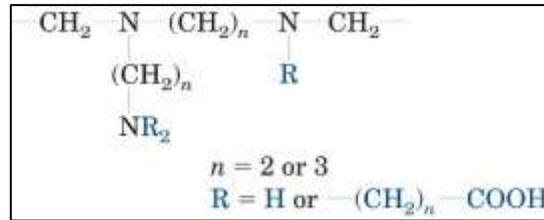
Elektroforegram SDS-PAGE berfungsi untuk mengidentifikasi dan membandingkan protein berdasarkan berat molekulnya yang dinyatakan dalam kilodalton (kDa). Band yang terlihat menunjukkan berbagai protein dengan berat molekul berbeda, di mana protein yang lebih besar berada di bagian atas gel dan protein yang lebih kecil berada di bagian bawah. Penanda berat molekul (LMW) membantu identifikasi ukuran protein. Band yang lebih pekat menunjukkan konsentrasi protein yang lebih tinggi, sedangkan band yang lebih samar menunjukkan konsentrasi yang lebih rendah.

Teknik elektroforesis juga adalah dasar untuk berbagai metode analisis dalam biologi molekuler, termasuk Western blot, Southern blot, Northern blot, dan Southwestern blotting. Setiap teknik ini menggunakan prinsip elektroforesis untuk memisahkan molekul target sebelum langkah-langkah tambahan dilakukan untuk mendeteksi atau menganalisis molekul tersebut. Western blot, atau protein immunoblot, adalah teknik analisis yang digunakan untuk mendeteksi protein spesifik dalam sampel homogenat atau ekstrak jaringan tertentu. Teknik ini dimulai dengan elektroforesis gel untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran, diikuti

dengan transfer protein ke membran, dan deteksi menggunakan antibodi yang spesifik terhadap target protein. Hasilnya berupa visualisasi band pada membran yang menunjukkan keberadaan dan kuantitas protein target dalam sampel. Southern blot adalah metode yang secara rutin digunakan dalam biologi molekuler untuk mendeteksi urutan DNA tertentu dalam sampel DNA. Proses ini juga dimulai dengan elektroforesis gel untuk memisahkan fragmen DNA yang telah dipotong dengan enzim restriksi. Fragmen DNA kemudian ditransfer ke membran dan dideteksi menggunakan probe DNA berlabel yang komplementer terhadap urutan target, memungkinkan identifikasi dan analisis spesifik fragmen DNA dalam sampel kompleks. Northern blot adalah teknik yang digunakan dalam penelitian biologi molekuler untuk mempelajari ekspresi gen dengan mendeteksi RNA. Teknik ini mengikuti prinsip yang mirip dengan Southern blot tetapi menggunakan RNA sebagai target. RNA dipisahkan berdasarkan ukuran melalui elektroforesis gel, ditransfer ke membran, dan dideteksi menggunakan probe RNA atau DNA berlabel. Teknik ini berguna untuk menganalisis tingkat ekspresi gen dan ukuran transkrip RNA dalam berbagai kondisi biologis. Southwestern blotting, berdasarkan Southern blotting (yang diciptakan oleh Edwin Southern) dan pertama kali dijelaskan oleh B. Bowen dan kolega pada tahun 1980, adalah teknik laboratorium yang melibatkan identifikasi dan karakterisasi protein pengikat DNA. Teknik ini menggabungkan prinsip elektroforesis protein dan hibridisasi DNA untuk mendeteksi protein yang memiliki afinitas untuk mengikat urutan DNA tertentu. Protein dipisahkan menggunakan elektroforesis gel, ditransfer ke membran, dan diinkubasi dengan fragmen DNA berlabel. Hasilnya memungkinkan identifikasi protein pengikat DNA spesifik dan analisis interaksi protein-DNA.

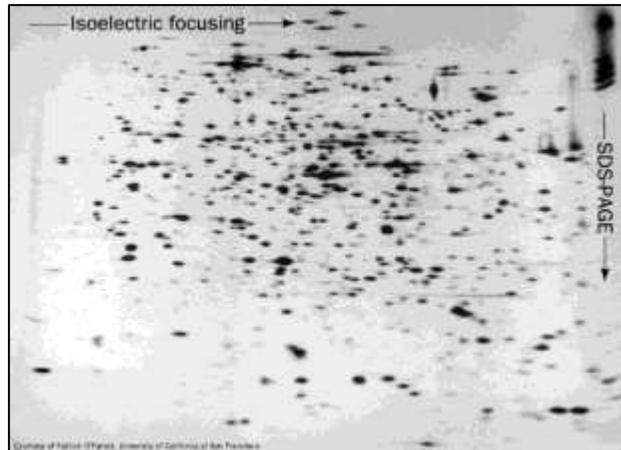
Varian lain dari elektroforesis adalah teknik pemfokusan isoelektrik (isoelectric focusing, IEF), yang memisahkan protein berdasarkan titik isoelektriknya, yaitu pH di mana protein memiliki muatan bersih nol. Pemfokusan isoelektrik memungkinkan analisis protein tanpa memperhatikan muatan keseluruhan, yang dapat dicapai dengan menggunakan urea untuk mendenaaturasi protein tanpa menambahkan muatan, berbeda dengan SDS yang menambahkan muatan negatif pada protein. Dalam IEF, campuran protein dialirkan melalui larutan dengan gradien pH yang stabil dari anoda ke katoda. Setiap protein dalam campuran tersebut akan bermigrasi ke posisi dalam gradien pH yang sesuai dengan titik isoelektriknya dan berhenti bergerak ketika mencapai pH di mana muatan bersihnya adalah nol.

Untuk memastikan gradien pH yang stabil selama IEF, digunakan amfolit (elektrolit amfoterik). Amfolit adalah oligomer dengan massa molekul rendah yang mengandung kelompok amino dan karboksilat alifatik dengan berbagai titik isoelektrik. Amfolit ini membantu mempertahankan gradien pH yang stabil meskipun dalam kondisi tegangan tinggi yang digunakan selama pemfokusan isoelektrik. Selain menggunakan larutan dengan gradien pH, IEF juga dapat dilakukan dengan gel yang memiliki gradien pH yang diimobilisasi. Gel ini dibuat dari turunan akrilamida yang secara kovalen terikat pada amfolit. Pembuat gradien digunakan untuk memastikan campuran yang bervariasi secara terus-menerus saat gel dibuat, memungkinkan pemisahan protein yang lebih presisi berdasarkan titik isoelektriknya.



Gambar 54. Formula umum dari amfolit yang digunakan dalam pemfokusan isoelektrik

Pemfokusan isoelektrik adalah teknik yang sangat penting dalam elektroforesis gel dua dimensi (*2D-gel electrophoresis*), yang merupakan alat tak ternilai dalam studi proteomik. Proteom, seperti genom, adalah keseluruhan jumlah semua protein yang diekspresikan oleh sebuah sel atau organisme. Namun, proteomik tidak hanya fokus pada identifikasi protein, tetapi juga pada kuantifikasi, lokalisasi, modifikasi, interaksi, dan aktivitasnya. Dalam teknik ini, protein pertama-tama dipisahkan berdasarkan titik isoelektriknya menggunakan pemfokusan isoelektrik. Pita protein individu dari gel yang telah diwarnai dapat dipotong, dihilangkan warnanya, dan protein tersebut dapat diekstraksi dari fragmen gel untuk diidentifikasi dan dikarakterisasi lebih lanjut menggunakan spektrometri massa (*mass spectrometry*). Spektrometri massa memungkinkan identifikasi akurat dari protein yang diekstraksi, serta analisis lebih lanjut mengenai modifikasi post-translasi dan interaksi protein.



Gambar 55. Elektroforesis gel dua dimensi (2D)

7. Kristalisasi Protein

Kristalisasi protein merupakan proses yang sulit dan menantang. Untuk mencapai kristalisasi yang sukses, protein harus dalam keadaan homogen, yaitu murni tanpa kontaminan. Langkah pertama dalam kristalisasi adalah menyiapkan larutan protein yang supersaturasi, biasanya dengan konsentrasi sekitar 10 mg/ml. Larutan ini kemudian dibiarkan berdiri hingga terbentuk kristal. Setelah kristal protein terbentuk, teknik difraksi sinar-X digunakan untuk mengamati ikatan yang membentuk struktur tiga dimensi protein. Dengan memanfaatkan sinar-X, para ilmuwan dapat mempelajari pola difraksi yang dihasilkan oleh kristal protein. Data dari pola difraksi ini kemudian dianalisis untuk menentukan posisi atom dalam molekul protein, yang pada akhirnya memberikan gambaran detail mengenai struktur tiga dimensi protein tersebut. Proses ini penting dalam bidang biokimia dan biologi struktural, karena mengetahui struktur tiga dimensi protein dapat memberikan wawasan tentang mekanisme fungsi protein dan interaksi molekulernya, serta membantu dalam desain obat dan penelitian bioteknologi lainnya.

8. Stabilisasi Protein

Langkah terakhir dalam pemurnian protein adalah stabilisasi protein target. Protein yang dimurnikan harus disimpan dalam kondisi yang mencegah denaturasi atau degradasi. Buffer yang sesuai, suhu penyimpanan yang rendah, dan penambahan stabilizer seperti protease inhibitor atau agen pereduksi digunakan untuk menjaga aktivitas dan stabilitas protein.

9. Tren dan Tantangan Saat Ini

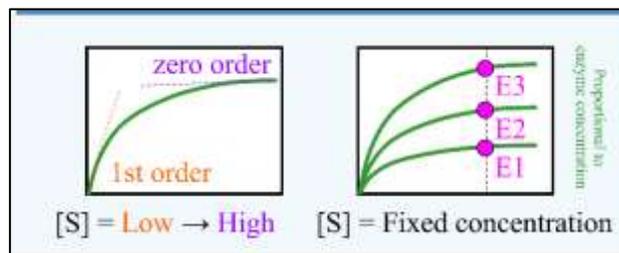
Industri bioteknologi menghadapi tantangan besar dalam meningkatkan kapasitas pemurnian protein seiring dengan meningkatnya produksi protein per unit volume kultur. Mengurangi jumlah langkah pemisahan dan memaksimalkan hasil pada setiap langkah menjadi penting untuk proses yang ekonomis. Penelitian dan pengembangan terus dilakukan untuk menciptakan metode pemurnian yang lebih efisien dan cepat. Pasar global untuk produk protein rekayasa diperkirakan tumbuh pesat, dengan segmen protein terapeutik sebagai yang paling cepat berkembang.

Dengan kemajuan teknologi dan metodologi baru, proses pemurnian protein dapat dilakukan dengan efisiensi tinggi, menghasilkan produk yang murni dan aktif untuk berbagai aplikasi industri dan penelitian. Pemurnian protein yang efektif tidak hanya mengurangi biaya produksi tetapi juga meningkatkan kualitas produk akhir, yang pada gilirannya berkontribusi pada pengembangan produk-produk baru yang inovatif dan bernilai tinggi dalam berbagai sektor industri.

5.5. Kinetika Enzim

Model Michaelis-Menten

Konsentrasi substrat adalah salah satu faktor kunci yang mempengaruhi laju reaksi enzimatik. Dengan memahami bagaimana variasi konsentrasi substrat mempengaruhi aktivitas enzim, kita dapat memperoleh wawasan penting tentang mekanisme kerja enzim dan optimasi kondisi reaksi untuk aplikasi industri dan medis.



Gambar 56. Variasi konsentrasi substrat dan enzim terhadap aktivitas enzim

Ketika enzim (E) berinteraksi dengan substrat (S) untuk membentuk kompleks enzim-substrat (ES), laju reaksi (V) sangat bergantung pada konsentrasi substrat ([S]). Pada konsentrasi substrat yang rendah, laju reaksi meningkat hampir secara linear dengan peningkatan konsentrasi substrat. Hal ini karena sebagian besar enzim bebas (E) dan tersedia untuk mengikat substrat. Ketika konsentrasi substrat meningkat, laju peningkatan laju reaksi mulai melambat. Hal ini terjadi karena sebagian besar situs aktif enzim mulai terikat dengan substrat, dan pembentukan kompleks ES menjadi lebih signifikan. Pada titik ini, laju reaksi masih dapat meningkat dengan peningkatan konsentrasi substrat, tetapi tidak secepat pada fase linear. Pada konsentrasi substrat yang sangat tinggi, laju reaksi mencapai maksimum (V_{max}) dan tidak meningkat lebih lanjut meskipun konsentrasi

substrat terus meningkat. Hal ini karena semua situs aktif enzim sudah terikat dengan substrat, mencapai keadaan jenuh.

Studi tentang kinetika enzim, yang melibatkan analisis kecepatan reaksi dan faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim, sangat penting untuk memahami fungsi biologis dan aplikasi industri dari enzim. Model Michaelis-Menten adalah salah satu model kinetika enzim yang paling dasar dan banyak digunakan. Model ini pertama kali diperkenalkan oleh Leonor Michaelis dan Maud Menten pada tahun 1913. Model ini menggambarkan hubungan antara konsentrasi substrat ($[S]$) dan kecepatan reaksi enzimatik (V). Asumsi utama dari model ini meliputi:

1. Pembentukan kompleks enzim-substrat (ES) adalah langkah cepat dan reversibel.
2. Pembentukan produk dari kompleks ES adalah langkah yang lebih lambat dan menentukan laju reaksi.
3. Konsentrasi kompleks ES tetap konstan selama reaksi berlangsung, dikenal sebagai kondisi *steady-state*.

Dalam kondisi steady state, konsentrasi ES mencapai suatu nilai tetap di mana laju pembentukan ES sama dengan laju konsumsi atau disosiasi ES. Reaksi yang terjadi dapat dijelaskan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Pembentukan kompleks ES: $E + S \rightleftharpoons ES$
2. Pembentukan Produk: $ES \rightleftharpoons E + P$

Dalam langkah ini, pembentukan kompleks ES terjadi ketika enzim dan substrat bergabung, yang dipengaruhi oleh laju pembentukan (k_1). Kompleks ES dapat disosiasi kembali menjadi enzim bebas dan substrat, atau berlanjut untuk membentuk produk (P), yang dipengaruhi oleh laju

disosiasi (k_{-1}). Setelah kompleks ES terbentuk, langkah berikutnya adalah transformasi ES menjadi produk (P) dan melepaskan enzim bebas (E): $ES \rightarrow E+P$ Laju pembentukan produk ini dilambangkan dengan k_2 atau k_{cat} . Dalam hal ini, k_{cat} (laju turnover) mewakili jumlah maksimum molekul substrat yang dapat diubah menjadi produk oleh satu molekul enzim per satuan waktu, ketika enzim jenuh dengan substrat. Hal ini menunjukkan efisiensi katalitik enzim. Di samping itu, k_{-1} (laju disosiasi) mewakili laju disosiasi kompleks ES kembali menjadi enzim bebas dan substrat. Hal ini menunjukkan stabilitas kompleks enzim-substrat. Laju disosiasi (k_{-1}) penting untuk dipertimbangkan karena jika k_{cat} terlalu lambat dibandingkan dengan k_1 (laju pembentukan kompleks ES) dan k_{-1} (laju disosiasi kembali menjadi E dan S), maka kompleks ES akan lebih cenderung untuk disosiasi daripada untuk menghasilkan produk. Oleh karena itu, untuk reaksi enzimatik yang efisien, k_{cat} harus lebih tinggi atau setidaknya seimbang dengan k_1 dan k_{-1} .

Prinsip steady state memberikan kerangka kerja yang kuat untuk menganalisis dan memahami dinamika reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Asumsi steady state menyatakan bahwa perubahan konsentrasi ES terhadap waktu ($d[ES]/dt$) adalah nol. Ini berarti bahwa:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

Dalam kondisi ini, laju pembentukan ES ($k_1 [E] [S]$) sama dengan laju disosiasi ES ($k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$), yang menghasilkan: $k_1 [E] [S] = k_{-1} [ES] + k_2 [ES]$. Persamaan Michaelis-Menten dapat disederhanakan dengan menggunakan asumsi steady state. K_M adalah konstanta Michaelis, yang menunjukkan afinitas enzim terhadap substrat. Persamaan Michaelis-Menten dinyatakan sebagai gambar berikut.

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad K_s = \text{tetapan kesetimbangan disosiasi}$$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_s} \quad \text{karena } [E] = [E]_0 - [ES] \text{ maka,}$$

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_s} - \frac{[ES][S]}{K_s} \quad \text{atau } [ES] \left\{ 1 + \frac{[S]}{K_s} \right\} = \frac{[E]_0[S]}{K_s}$$

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{[S] + K_s}$$

$$V = k_{cat}[ES] = \frac{k_{cat}[E]_0[S]}{[S] + K_s}$$

saat $[S] \gg [K_s]$, maka

$$\lim_{[S] \rightarrow \infty} V = \frac{k_{cat}[E]_0[S]}{[S]} = k_{cat}[E]_0 = V_{max}$$

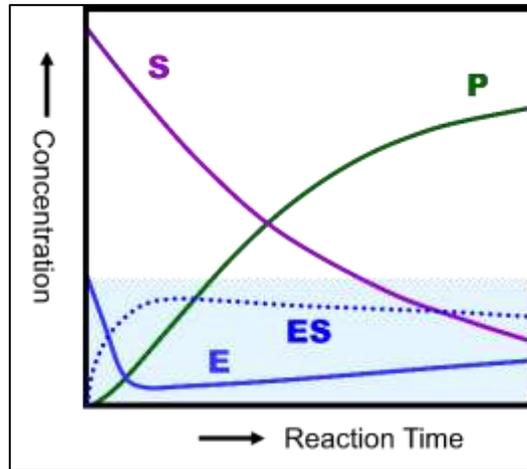
sehingga

$$V = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_s}$$

Gambar 57. Kinetika Michaelis Menten

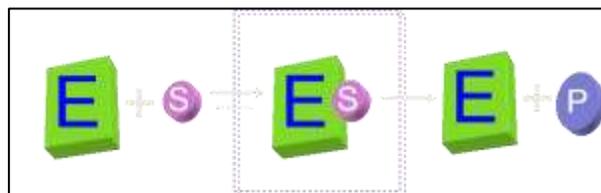
Dalam persamaan Kinetika Michaelis Menten, V adalah kecepatan reaksi, V_{max} adalah kecepatan maksimum reaksi, $[S]$ adalah konsentrasi substrat, sedangkan K_M adalah konstanta Michaelis-Menten, yang menggambarkan afinitas enzim terhadap substrat. Model ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi substrat rendah, kecepatan reaksi meningkat hampir secara linier dengan peningkatan konsentrasi substrat. Namun, pada konsentrasi substrat yang tinggi, kecepatan reaksi mendekati V_{max} karena semua situs aktif enzim sudah terikat dengan substrat.

Kondisi *steady state* atau keadaan stabil adalah konsep penting dalam kinetika enzim yang diperkenalkan oleh George Briggs dan John Haldane pada tahun 1925. Konsep ini menggantikan beberapa asumsi dalam model Michaelis-Menten yang awalnya mengasumsikan bahwa pembentukan produk dari kompleks enzim-substrat (ES) sangat lambat dibandingkan dengan pembentukan dan disosiasi kompleks ES.



Gambar 58. Konsentrasi ES Konstan pada Kondisi Stabil

Dalam teori *steady state*, diasumsikan bahwa konsentrasi kompleks enzim-substrat (ES) tetap konstan sepanjang reaksi karena laju pembentukannya sama dengan laju disosiasinya menjadi produk dan enzim bebas.



Gambar 59. Teori Kondisi Stabil

Kinetika Briggs-Haldane dijabakan pada gambar berikut.

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

Saat steady-state tercapai $d[ES]/dt \cong 0$

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_{cat}[ES] \quad \text{atau} \quad \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} = K_M$$

substitusi $[E] = [E]_0 - [ES]$

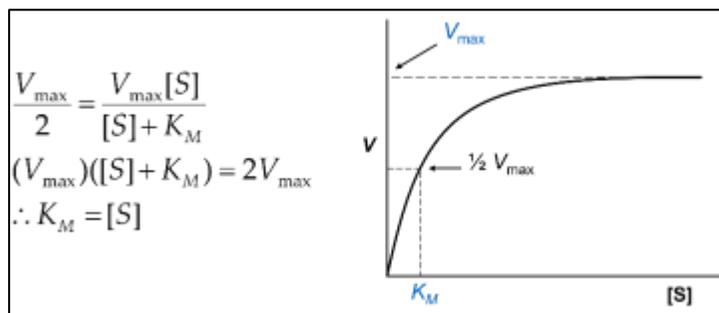
$$\frac{([E]_0 - [ES])[S]}{[ES]} = K_M \quad \text{atau} \quad [ES] = \frac{[E]_0[S]}{[S] + K_M}$$

karena $V = k_{cat}[ES]$, maka

$$V = \frac{k_{cat}[E]_0[S]}{[S] + K_M} = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_M}$$

Gambar 60. Kinetika Briggs-Haldane

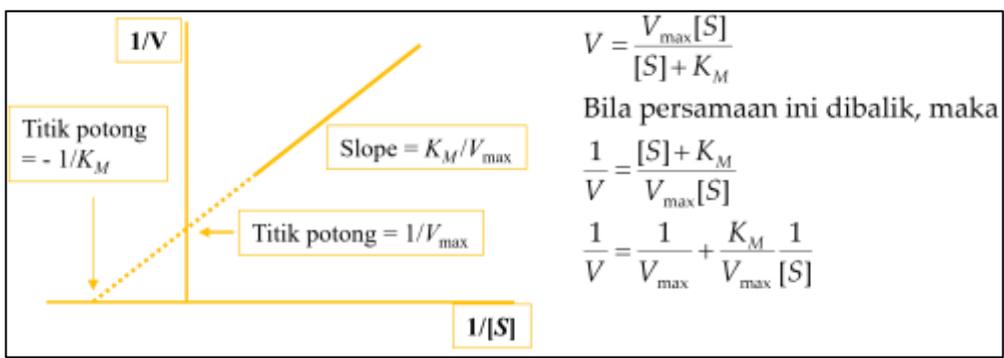
Nilai K_M dapat diperoleh dari grafik dengan ekstrapolasi ke sumbu $[S]$ saat $V = \frac{1}{2} V_{max}$.



Gambar 61. Nilai K_M berdasarkan Kinetika Briggs-Haldane

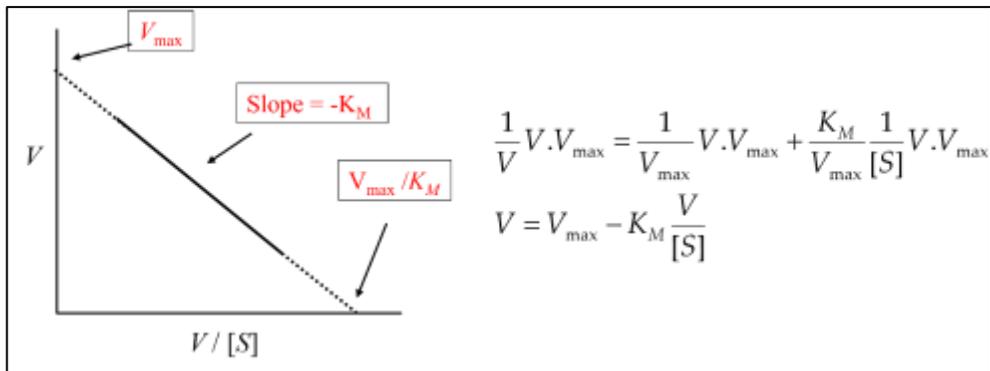
Penentuan nilai K_M dan V_{max} langsung dari grafik persamaan Michaelis-Menten tidaklah selalu memuaskan karena grafiknya membentuk kurva sehingga menyulitkan untuk melakukan ekstrapolasi dengan akurat. Lineweaver dan Burk (1934) menyelesaikan masalah tersebut dengan cara mereformulasi persamaan Michaelis-Menten ke dalam bentuk persamaan linier. Plot Lineweaver-Burk merupakan metode grafis yang umum

digunakan untuk menentukan parameter kinetik seperti K_M dan V_{max} . Metode ini mengubah kurva non-linier dari persamaan Michaelis-Menten menjadi garis lurus sehingga memudahkan penentuan parameter kinetik secara grafis. Dengan memplot invers dari kecepatan reaksi ($1/V$) terhadap invers konsentrasi substrat ($1/[S]$), kita mendapatkan garis lurus di mana kemiringannya adalah K_M/V_{max} dan titik potong pada sumbu Y adalah $1/V_{max}$. Persamaan untuk plot Lineweaver-Burk dijabarkan pada gambar berikut.



Gambar 62. Plot Lineweaver-Burk

Salah satu kelemahan dari metode ini adalah bahwa kesalahan eksperimen pada konsentrasi substrat rendah diperbesar, yang dapat menyebabkan ketidakakuratan dalam penentuan parameter kinetik. Untuk mengatasi masalah tersebut, Eadie-Hofstee melakukan perubahan pada persamaan Lineweaver-Burk. Plot Eadie-Hofstee adalah metode lain untuk menentukan parameter kinetik. Dalam plot ini, laju reaksi (V) dipetakan terhadap rasio laju reaksi terhadap konsentrasi substrat ($V/[S]$). Persamaan plot ini terdapat pada gambar berikut.

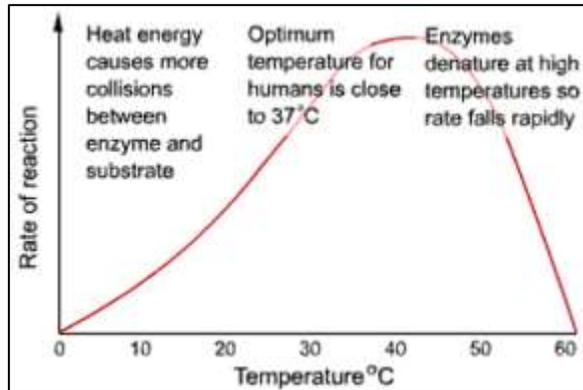


Gambar 63. Plot Eadie-Hofstee

Di sini, kemiringan garis adalah $-K_M$ dan titik potong pada sumbu Y adalah V_{max} . Metode ini mengatasi beberapa kelemahan dari plot Lineweaver-Burk dengan mengurangi pembesaran kesalahan pada konsentrasi substrat rendah. Namun, metode ini tidak selalu memberikan hasil yang paling akurat untuk semua jenis data kinetik.

Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Enzim

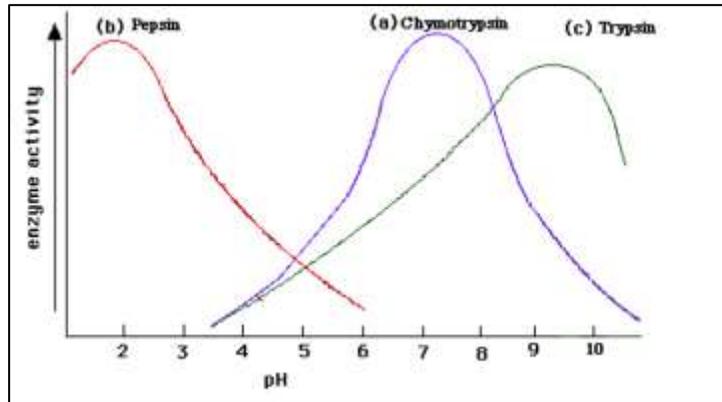
Suhu adalah faktor kritis yang mempengaruhi aktivitas enzim. Peningkatan suhu biasanya meningkatkan energi kinetik molekul-molekul reaktan, sehingga mempercepat frekuensi tumbukan antara molekul-molekul tersebut dan meningkatkan laju reaksi. Namun, suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan denaturasi enzim, di mana enzim kehilangan strukturnya yang esensial untuk aktivitas katalitiknya.



Gambar 64. Variasi suhu terhadap aktivitas enzim

Penelitian oleh Athel Cornish-Bowden dan Bisswanger menunjukkan bahwa setiap enzim memiliki suhu optimal di mana aktivitasnya paling tinggi. Sebagai contoh, enzim dalam tubuh manusia biasanya memiliki suhu optimal sekitar 37 °C, sesuai dengan suhu tubuh manusia. Di sisi lain, enzim dari organisme termofilik, yang hidup di lingkungan dengan suhu tinggi, seperti mata air panas, dapat berfungsi optimal pada suhu yang jauh lebih tinggi, seperti 70 °C atau lebih.

Di samping itu, pH merupakan faktor penting yang mempengaruhi aktivitas enzim. pH mengukur konsentrasi ion hidrogen dalam suatu larutan dan dapat mempengaruhi muatan listrik dari asam amino yang membentuk enzim. Perubahan pH dapat menyebabkan perubahan konformasi enzim, yang dapat mempengaruhi kemampuan enzim untuk mengikat substrat.



Gambar 65. Variasi pH terhadap aktivitas enzim

Setiap enzim memiliki pH optimal di mana aktivitasnya maksimal. Misalnya, enzim pepsin yang berfungsi di lambung memiliki pH optimal sekitar 2, yang sangat asam, sedangkan enzim amilase yang bekerja di mulut memiliki pH optimal sekitar 7, yang netral. pH di luar rentang optimal dapat mengurangi aktivitas enzim atau bahkan menyebabkan denaturasi enzim.

4.5 Inhibisi Enzim

Inhibisi enzim adalah mekanisme di mana aktivitas enzim dikurangi atau dihentikan oleh molekul tertentu yang dikenal sebagai inhibitor. Inhibitor dapat bekerja melalui berbagai mekanisme, dan berdasarkan reversibilitas pengikatan, inhibitor dibagi menjadi dua kategori utama: inhibisi reversibel dan ireversibel.

1. Inhibisi Kompetitif

Inhibisi kompetitif terjadi ketika inhibitor bersaing dengan substrat untuk mengikat situs aktif enzim. Inhibitor kompetitif memiliki struktur yang mirip dengan substrat dan dapat menghalangi substrat untuk berikatan dengan enzim. Peningkatan konsentrasi substrat dapat mengatasi inhibisi ini dengan menggeser keseimbangan ke arah pembentukan kompleks enzim-

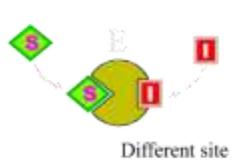
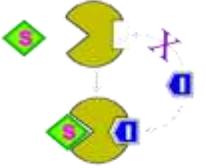
substrat. Contoh umum dari inhibisi kompetitif adalah malonat yang menghambat suksinat dehidrogenase dengan cara bersaing dengan suksinat untuk mengikat situs aktif enzim.

2. Inhibisi Unkompetitif

Inhibisi unkompetitif terjadi ketika inhibitor hanya mengikat kompleks enzim-substrat dan tidak mengikat enzim bebas. Inhibitor unkompetitif menurunkan V_{max} dan K_M secara proporsional, karena pengikatan inhibitor mengurangi jumlah kompleks enzim-substrat yang tersedia untuk membentuk produk. Fenomena ini jarang terjadi tetapi memberikan informasi penting tentang mekanisme reaksi enzim.

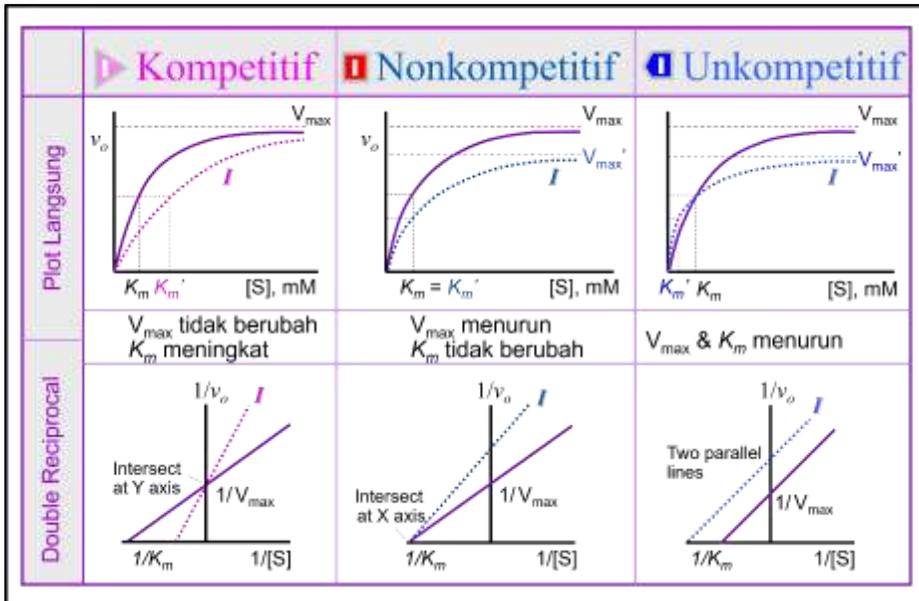
3. Inhibisi Nonkompetitif

Inhibisi nonkompetitif terjadi ketika inhibitor dapat mengikat baik enzim bebas maupun kompleks enzim-substrat. Pengikatan ini menyebabkan perubahan konformasi yang mengurangi aktivitas enzim tanpa mengubah afinitas enzim terhadap substrat K_M tetap. Contoh dari inhibisi nonkompetitif adalah ion logam berat yang dapat mengikat dan mengubah konformasi enzim sehingga mengurangi aktivitas katalitiknya.

	 Kompetitif	 Nonkompetitif	 Unkompetitif
Panduan Kartun	 <p>Substrate Inhibitor Compete for active site</p>	 <p>Different site</p>	
Persamaan dan Deskripsi	$E + S \xrightarrow{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ $+ I \downarrow \uparrow EI$	$E + S \xrightarrow{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ $+ I \downarrow \uparrow EI + S \rightarrow EIS$	$E + S \xrightarrow{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ $+ I \downarrow \uparrow E/S$
	[I] hanya mengikat [E] bebas, dan bersaing dengan [S]; meningkatkan [S] mengatasi penghambatan oleh [I].	[I] mengikat [E] bebas atau kompleks [ES]; meningkatkan [S] tidak bisa mengatasi inhibisi [I].	[I] mengikat hanya ke kompleks [ES]. Meningkatkan [S] mendukung penghambatan oleh [I].

Gambar 66. Penghambatan enzim (mekanisme)

Masing-masing tipe inhibisi ini mempengaruhi kinetika enzim dengan cara yang berbeda, yang dapat dianalisis menggunakan plot Langsung dan plot Double Reciprocal (Lineweaver-Burk). Pemahaman tentang tipe-tipe inhibisi enzim dan analisis kinetik menggunakan plot langsung dan plot Double Reciprocal sangat penting dalam biokimia dan pengembangan obat.



Gambar 67. Penghambatan enzim (plot)

4. Inhibisi Ireversibel

Inhibisi ireversibel terjadi ketika inhibitor mengikat secara kovalen ke enzim sehingga menyebabkan inaktivasi permanen. Inhibitor ini secara efektif menghentikan aktivitas enzim. Contoh umum dari inhibitor ireversibel adalah iodoasetat yang mengikat gugus-SH pada residu sistein dalam enzim. Inhibitor ireversibel sering digunakan dalam penelitian untuk mempelajari fungsi enzim dan mekanisme katalitik.

Aplikasi Praktis Kinetika Enzim

Pemahaman tentang kinetika enzim sangat penting untuk berbagai aplikasi praktis. Dalam industri bioteknologi, enzim digunakan dalam produksi makanan, minuman, biofuel, dan bahan kimia. Optimasi kondisi reaksi berdasarkan kinetika enzim dapat meningkatkan efisiensi dan hasil produksi. Misalnya, enzim protease digunakan dalam industri detergen untuk membantu pemecahan protein dalam noda, sementara enzim

amilase digunakan dalam industri makanan untuk memecah pati menjadi gula. Enzim juga digunakan dalam produksi biofuel untuk membantu mengkonversi biomassa menjadi bahan bakar yang dapat digunakan. Optimasi kondisi reaksi enzimatik berdasarkan pemahaman kinetika enzim memungkinkan peningkatan efisiensi dan pengurangan biaya produksi.

Dalam bidang medis, inhibisi enzim merupakan dasar dari banyak terapi obat. Misalnya, inhibitor protease digunakan dalam pengobatan HIV untuk menghambat replikasi virus. Pemahaman mendalam tentang kinetika inhibisi enzim membantu dalam pengembangan obat yang lebih efektif dan spesifik. Inhibitor enzim juga digunakan dalam pengobatan penyakit kardiovaskular, kanker, dan berbagai penyakit metabolik. Sebagai contoh, dalam pengembangan obat untuk kanker, inhibitor kinasi sering digunakan untuk menghambat aktivitas enzim yang mempromosikan pertumbuhan sel kanker. Studi kinetika enzim membantu dalam merancang inhibitor yang efektif dengan afinitas tinggi dan selektivitas terhadap target enzim spesifik.

Studi kinetika enzim terus berkembang, membawa pengetahuan baru yang dapat digunakan untuk meningkatkan kualitas hidup manusia dan efisiensi proses industri. Penelitian kinetika enzim memberikan wawasan tentang mekanisme dasar reaksi biokimia dan membuka jalan untuk pengembangan aplikasi yang lebih canggih dalam bidang bioteknologi dan medis. Misalnya, penelitian terbaru dalam bidang enzimologi telah mengidentifikasi enzim-enzim baru dengan potensi aplikasi industri dan medis. Teknik seperti evolusi terarah dan rekayasa protein digunakan untuk mengembangkan enzim dengan sifat yang ditingkatkan, seperti stabilitas termal yang lebih tinggi atau aktivitas katalitik yang lebih tinggi.

Rangkuman

Enzim adalah protein biologis yang bertindak sebagai katalisator dalam reaksi kimia di dalam tubuh makhluk hidup, mempercepat laju reaksi tanpa ikut berubah secara permanen dalam proses tersebut. Enzim bekerja dengan cara menurunkan energi aktivasi yang diperlukan agar reaksi kimia dapat terjadi lebih cepat. Enzim umumnya sangat spesifik terhadap substratnya. Sehingga enzim memiliki bentuk dan struktur yang dapat mengenali dan berinteraksi dengan substrat tertentu secara khusus. Spesifisitas ini sangat penting dalam mengatur jalannya jalur metabolik dalam sel. Enzim berperan dalam mengendalikan produksi produk metabolik dan mengatur laju reaksi yang diperlukan untuk memenuhi kebutuhan energi dan bahan kimia sel.

Soal Latihan

1. Apa yang dimaksud dengan enzim dan bagaimana cara kerjanya dalam reaksi biokimia?
2. Mengapa enzim disebut sebagai katalisator dalam reaksi kimia?
3. Jelaskan peran situs aktif pada enzim dalam hubungannya dengan substrat.
4. Apa yang terjadi jika enzim mengalami denaturasi?

Berikan contoh dua jenis enzim yang terlibat dalam proses pencernaan dan jelaskan fungsinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). The mitochondrion. In *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. Garland Science. New York.
- Bhatia, S. (2018). *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Volume 2: Enzymes, Proteins and Bioinformatics*. IOP Publishing.
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1-6), 41-55.
- Copeland, R. A. (2023). *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. John Wiley & Sons.
- Cornish-Bowden, A. (2013). *Fundamentals of enzyme kinetics*. John Wiley & Sons.
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, 3(2), 156.
- Genome to Proteome Juang RH (2004) BCbasics Systems Biology, Integrated Biology.
- Janson, J. C. (Ed.). (2011). Protein purification: principles, high resolution methods, and applications (Vol. 149). John Wiley & Sons.
- Labrou, N. E. (2014). Protein purification: an overview. *Protein downstream processing: design, development and application of high and low-resolution methods*, 3-10.
- Lodish, H., et al. (2016). *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman.
- Matthews, C.K., & van Holde, K.E. (1996). Biochemistry, 2nd Edition. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. California.
- McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2023). Enzyme nomenclature and classification: The state of the art. *The FEBS journal*, 290(9), 2214-2231.

- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- Noble, J. E., & Bailey, M. J. (2009). Quantitation of protein. *Methods in enzymology*, 463, 73-95.
- Noller, H.F. (2007). Molecular structure of the ribosome. *Annual Review of Biochemistry*.
- Roeder, R.G. (1996). The role of general transcription factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends in Biochemical Sciences*.
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1.
- Sharp, P.A. (1994). Split genes and RNA splicing. *Cell*.
- Steitz, T.A. (2008). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Science*.
- Subin, S. R., & Bhat, S. G. (2015). Enzymes: concepts, nomenclature, mechanism of action and kinetics, characteristics and sources of food-grade enzymes. *Enzymes in food and beverage processing*, 3-38.
- Su, L., Feng, Y., Wei, K., Xu, X., Liu, R., & Chen, G. (2021). Carbohydrate-Based Macromolecular Biomaterials. *Chemical Reviews*, 121(18), 10950–11029. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01338>

ISBN 978-623-8331-10-9 (no. jil. lengkap)		
ISBN 978-623-8331-11-6 (jil. 1 PDF)		
		
9	786238	331116