

MEKANISME KERJA PROTEIN DALAM MENDUKUNG FUNGSI SEL



PURNAMAWATI
Dept.HistoPA

**FAKULTAS KEDOKTERAN DAN
ILMU ESEHATAN
UNIVERSITAS KRISTEN
KRIDA WACANA
JAKARTA
2023**

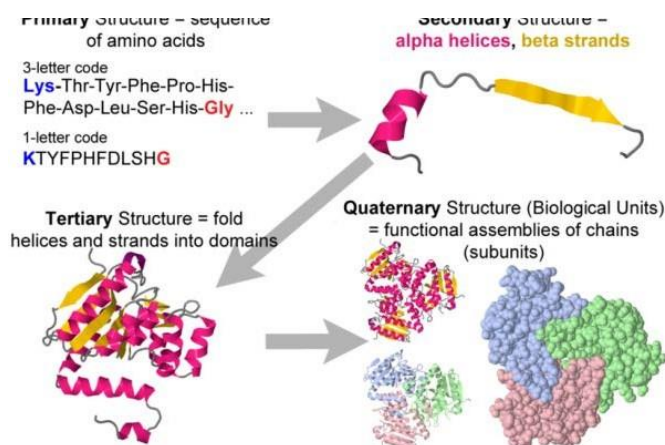
Protein merupakan makro molekul yang berperan pada hampir semua aktivitas seluler. Protein merupakan struktur pembentuk sel, berperan pada organisasi intraseluler, mekanisme produksi, detoksifikasi dan pemeliharaan sel, disamping itu protein juga terlibat dalam komunikasi seluler untuk menerima, mentransmisi serta mengamplifikasi sinyal dari ekstrasel dan memobilisasi respon intraseluler.

Struktur Protein

Protein terdiri dari susunan residu asam amino yang dirangkai dengan ikatan peptida antara gugus N-terminus suatu residu dengan gugus C-terminus residu lainnya. Selain itu residu asam amino juga memiliki rantai sisi (*side chain*) yang unik dan memiliki sifat kimia yang berbeda-beda, kebanyakan rantai sisi ini bersifat non polar, beberapa rantai sisi memiliki muatan positif atau negatif, sementara yang lainnya dapat bersifat polar namun tidak bermuatan. Sifat kimia dari rantai sisi ini sangat penting karena rantai-rantai sisi inilah yang akan berikatan satu dengan lainnya membentuk dan mempertahankan struktur suatu protein.

Rantai sisi yang bermuatan dapat membentuk ikatan ion sedangkan rantai sisi yang bersifat polar dapat membentuk ikatan hidrogen. Pada rantai sisi yang hidrofobik dapat terjadi interaksi ikatan lemah yang disebut ikatan van der Waals. Kebanyakan ikatan yang terbentuk pada rantai sisi ini bersifat non kovalen dan hanya residu sistein yang mampu membentuk ikatan kovalen.

Terdapat 4 tingkat struktur protein, perbedaan ini didasarkan pada derajat kompleksitas dari rantai polipeptida penyusun protein. Keempat tingkat itu adalah :



- struktur primer/ linear
- struktur sekunder
- struktur tersier
- struktur kuarterner

Satu molekul protein dapat tersusun dari satu atau lebih struktur tersebut. Struktur

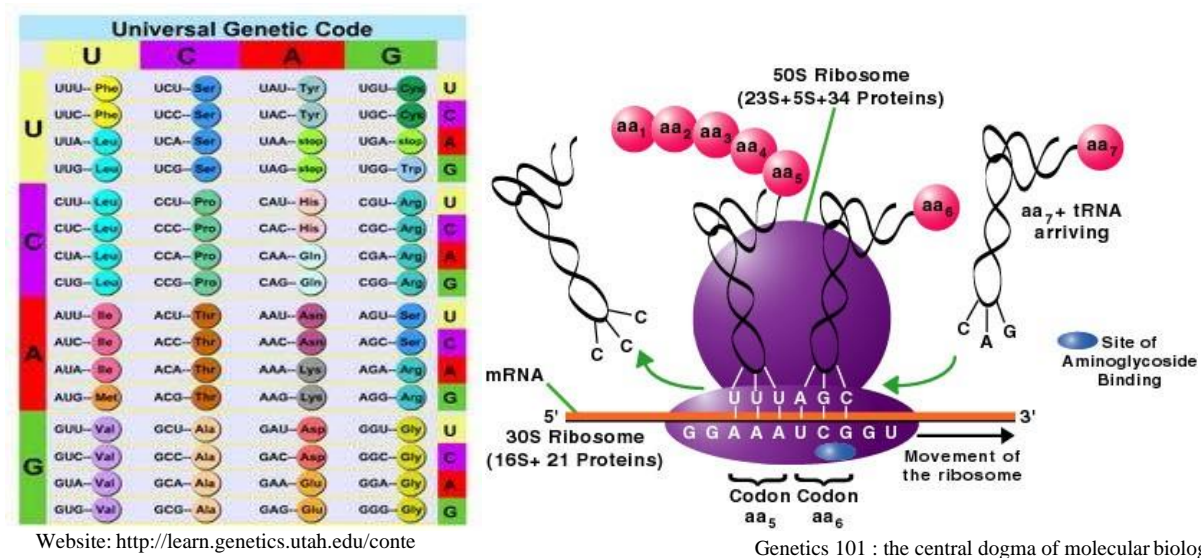
pada protein juga menunjukkan fungsi dari protein, seperti struktur kolagen yang berbentuk superkoil helikal menyerupai tali panjang yang kuat sebagai struktur penunjang, berbeda dengan struktur hemoglobin berupa globular protein yang melipat dan kompak sehingga berbentuk sferis sehingga memudahkan pergerakan dalam pembuluh darah.

Sintesis Protein

Sintesis protein berlangsung di ribosom pada retikulum endoplasma kasar. Mekanisme sintesis protein ini disebut sebagai translasi. Kode-kode genetik DNA terlebih dahulu ditranskripsikan menjadi RNA yang kemudian ditranslasikan menjadi protein berupa rangkaian residu asam amino (rantai polipeptida) yang kemudian dimodifikasi sehingga menjadi protein yang fungsional.

Ada 3 tipe RNA yang berperan pada translasi protein yaitu :

- Messenger RNA (mRNA), membawa informasi genetik yang akan ditranslasi menjadi protein.
- Ribosomal RNA (rRNA), katalitik komponen dari ribosom.
- Transfer RNA (tRNA), membawa asam amino ke ribosom.



Ribosom terdiri atas 2 sub unit yaitu sub unit besar (50S) yang terdiri dari 5S rRNA, 23S rRNA dan 34 polipeptida, sedangkan sub unit kecil (30S) terdiri dari 16S rRNA dan sekitar 21 polipeptida yang berbeda.

Modifikasi post translasi

Setelah proses translasi selesai, protein yang disintesis akan memiliki Metionin sebagai inisiator protein dengan gugus amino bebas (N terminus), sedangkan diujung akhir protein terdapat gugus karboksi bebas (C terminus). Setelah disintesis, protein akan mengalami modifikasi agar dapat berfungsi. Modifikasi terjadi pada residu asam amino yang merupakan *side chain* atau pada N- atau C-termini berupa modifikasi kovalen atau enzimatik. Situs-situs yang seringkali mengalami modifikasi adalah situs yang memiliki gugus fungsional seperti gugus hidroksil dari serin, treonin dan tirosin, gugus amin dari lisin, arginin dan histidin, gugus anion tiolat dari sistein, serta gugus karboksilat dari aspartat dan glutamat. Modifikasi ini diantaranya meliputi pembentukan ikatan disulfida serta pelipatan protein menjadi struktur tiga dimensi. Famili *heat shock protein* (Hsp40, Hsp70, Hsp90, Hsp100) berperan sebagai *protein folding chaperones* melalui aktivitas ATPase. *Calnexin* dan *Calreticulin* pada Retikulum Endoplasma terlibat dalam maturasi glikoprotein. Protein *chaperon* lain yang bekerja secara enzimatik non ATPase seperti Protein Disulfide Isomerase (PDI) mengkatalisis pembentukan ikatan disulfida antar residu sistein, dan enzim Peptidylprolyl cis-trans isomerases (PPI) mengkatalisis reaksi isomerisasi ikatan peptida pada residu prolin. Residu Treonin, Serin dan Tirosin seringkali mengalami fosforilasi, suatu mekanisme penting untuk meregulasi proses-proses intraseluler seperti siklus sel, pertumbuhan, apoptosis, diferensiasi dan transduksi persinyalan seluler. Proses modifikasi post translasi lainnya berupa penambahan gugus fungsional berupa grup fosfat, asetat, amida dan metal. Ada juga penambahan molekul karbohidrat (glikosilasi), penambahan molekul lipid (lipidasi), pemotongan inisiator residu metionin, serta pemotongan gugus peptida seperti pada modifikasi hormon peptida insulin.

Pada kondisi stress oksidatif juga dapat terjadi modifikasi protein seperti karbonilasi yang mengakibatkan terjadinya degradasi pada protein menjadi agregat protein.

Modifikasi post translasi ini dapat dideteksi secara eksperimental dengan menggunakan berbagai tehnik diantaranya *mass spectrometry*, *Eastern blotting* dan *Western blotting*.

Interaksi protein dengan senyawa lain untuk menimbulkan fungsinya

Struktur dan sifat protein ditentukan oleh untaian asam amino pembentuk protein dan modifikasi paska translasinya. Struktur dan sifat ini menentukan fungsi spesifik dari protein, misalnya protein tertentu dapat bersifat hidrofilik atau hidrofobik, berdiri sendiri atau merupakan bagian

dari suatu struktur multipel, protein juga dapat memiliki karakteristik khusus pada permukaannya sehingga hanya molekul-molekul yang sesuai saja yang dapat berinteraksi dan protein dapat berubah konformasinya saat terjadi interaksi dengan molekul lainnya.

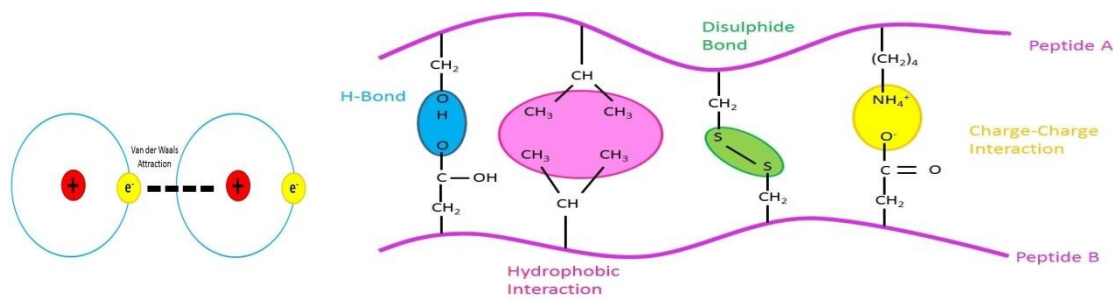
Beragamnya morfologi protein disebabkan oleh perbedaan kombinasi susunan asam amino yang membentuk protein. Ada 20 jenis asam amino yang dapat dikombinasikan untuk menyusun protein. Selain morfologinya, fungsi proteinpun sangat beragam, mulai dari mempertahankan bentuk sel sebagai sitoskeleton, sebagai enzim yang mengkatalisis reaksi-reaksi biokimia pada sel, sebagai monitor yang dapat merubah bentuk dan aktivitasnya sebagai respon terhadap sinyal metabolik serta reseptor pada transduksi sinyal dan disekresikan sebagai ligan dalam komunikasi seluler.

Interaksi protein sangatlah penting dalam melakukan proses-proses seluler seperti replikasi DNA, transkripsi, translasi, *splicing*, sekresi, kontrol siklus sel, transduksi sinyal dan pengantara metabolisme. Beberapa tipe protein menunjukkan komposisi alami sebagai multi subunit protein misalnya protein-protein klasik seperti hemoglobin, *tryptophan synthetase*, *aspartate transcarbamylase*, *core RNA polymerase*, *Q β -replicase*, dan *glycyl-tRNA synthetase*.

Contoh lain multi subunit protein yang lebih kompleks diantaranya enzim-enzim metabolik seperti piruvat dehidrogenase dan kompleks α -ketoglutarat dehidrogenase, kompleks *nuclear pore*, kompleks *ribonucleoprotein* seperti partikel pengenal sinyal pada jalur glikosilasi, *small nuclear ribonucleoproteins* dari *spliceosome*, dan ribosom.

Interaksi protein ada juga yang berlangsung sementara/transien misalnya model interaksi enzim dengan substrat seperti protein kinase, protein fosfatase, glikosil transferase, asil transferase, protease, dll. Contoh lain interaksi transien misalnya pembentukan kompleks faktor transkripsi pada promotor, perubahan struktur protein oleh *capron*, reformasi struktur subseluler pada proses pembelahan sel, dll.

Berbagai sifat kimia asam amino penyusun protein menentukan ikatan yang terbentuk pada saat interaksi protein, misalnya asam amino alifatik (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, and Pro) dan aromatik (Phe, Tyr, Trp) yang bersifat non polar dan berinteraksi terutama melalui ikatan hidrofobik dan van der Waals.



Asam amino yang bersifat asam (Asp, Glu) dan basa (Arg, Lys, His) berikatan melalui ikatan ion atau interaksi karena muatan listriknya (*charge-charge interactions*), selain itu ikatan karena muatan ini dan juga ikatan hidrogen terjadi pada asam amino yang mengandung alkohol (Ser, Thr, Tyr) atau amida (Asn, Gln). Pada residu sistein dapat terbentuk ikatan disulfida yang merupakan suatu ikatan kovalen yang tidak serta merta terbentuk secara spontan pada saat interaksi protein dengan ligan tetapi membutuhkan katalis untuk membentuk dan memecahkannya.

1. Interaksi Protein dengan protein *Chaperon / Heat Shock Protein*

Selain pada proses modifikasi post translasi, chaperon juga dibutuhkan pada proses *refolding* protein. Hal ini disebabkan sebagian besar ikatan pada protein merupakan ikatan non kovalen yang lemah sehingga protein mudah terdenaturasi dan mengalami *unfolding* yang mengakibatkan hilangnya fungsi protein. Didalam tubuh bila terjadi kenaikan suhu tubuh beberapa derajat saja dapat menimbulkan *unfolding* protein dalam jumlah yang signifikan, karena itu chaperon dibutuhkan untuk mengembalikan struktur protein melalui mekanisme *refolding*.

2. Interaksi protein dengan gugus fosfat

Beberapa residu protein seperti serin, treonin, dan tirosin dapat mengalami penambahan gugus fungsional yang berperan sebagai *molecular switch* yang akan membuat perubahan konformasi dari protein sehingga protein menjadi aktif atau non aktif. Penambahan gugus fungsional ini bersifat reversibel melalui mekanisme fosforilasi dan defosforilasi (penambahan atau pelepasan gugus fosfat). Kelompok protein kinase merupakan enzim yang dapat memfosforilasi (menambahkan gugus fosfat) kepada protein dan menjadikannya aktif, sebaliknya kelompok protein fosfatase dapat mendefosforilasi (melepaskan gugus fosfat dari protein sehingga

membuatnya tidak aktif. Mekanisme aktivasi dan non aktivasi ini diantaranya terjadi pada protein-protein yang terlibat dalam jalur persinyalan seluler.

3. Interaksi protein sebagai reseptor dan ligan

Berbagai protein terlibat dalam komunikasi antar sel baik sebagai reseptor maupun ligan. Protein sebagai reseptor memiliki kemampuan menerima sinyal, mentransmisikan serta mengamplifikasi sinyal. Reseptor protein pada permukaan membran sel memiliki struktur yang dapat mengenali sinyal yang spesifik sesuai dengan *site*-nya, molekul sinyal ini dinamakan ligan/*messenger*. Ligan merupakan persinyalan kimia yang dapat berupa molekul asam amino, protein, gliko protein, fosfolipid, lipid, glukokortikoid, hormon, kolekalsiferol, asam retinoat, ion Ca^{++} bahkan gas terlarut seperti NO, CO dan lain-lain.

Interaksi reseptor permukaan sel dengan ligannya menginisiasi suatu protein *signalin cascades* / transduksi sinyal intraseluler yang melibatkan *messenger-messenger* lainnya berupa protein dan enzim yang akan mengamplifikasi dan mentransmisikan sinyal ke reseptor intraseluler baik di sitoplasma maupun di nukleus sehingga menimbulkan respon diantaranya berupa peningkatan atau penurunan ekspresi suatu gen.

4. Interaksi protein dengan DNA

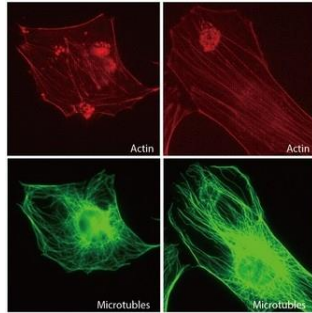


Pada eukariot, rantai DNA senantiasa membentuk kompleks dengan protein yang membuatnya dalam keadaan kompak untuk menempati ruang yang

kecil. Kompleks DNA-protein ini dinamakan kromatin, untaian kromatin berbentuk butiran dan rantai dimana setiap butirannya disebut sebagai nukleosom yang terdiri dari untaian rantai ganda DNA bermuatan negatif yang melingkari 8 butir protein histon yang bermuatan positif, selanjutnya kromatin akan melipat membentuk formasi yang disebut kromosom. Sehingga setiap kromosom mengandung seuntai DNA rantai ganda dalam bentuk kompleks dengan protein. Pengepakan DNA oleh protein selain bertujuan untuk melindungi DNA juga berfungsi sebagai pengaturan bagian mana dan bilamana untaian DNA dapat diakses untuk disalin (pada proses transkripsi dan replikasi) atau untuk diperbaiki. Selain protein histon, berbagai protein

berinteraksi dengan rantai DNA seperti faktor Transkripsi, *enhancer* dan *silencer* yang berperan sebagai regulator transkripsi gen. Protein lainnya adalah enzim pada proses replikasi DNA seperti *helicase* dan *primase* yang membantu membuka putaran rantai ganda DNA sehingga dapat diakses serta disalin.

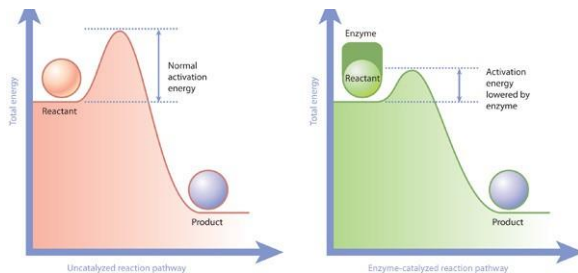
5. Protein dalam pergerakan sel dan struktur pembentuk sel



Beberapa protein yang berperan dalam mempertahankan struktur sel diantaranya adalah mikrotubul yang merupakan protein utama dalam pengaturan sitoplasma dan distribusi dari organel, aktin filamen yang berperan dalam berbagai pergerakan sel seperti kontraksi sel otot dan pembelahan sel, serta intermediat filamen berupa serat-serat yang mendukung bagian dalam dari sel.

Courtesy of Dr. Takeshi Matsuzawa and Dr. Akio Abe

6. Protein yang terlibat dalam reaksi-reaksi metabolik

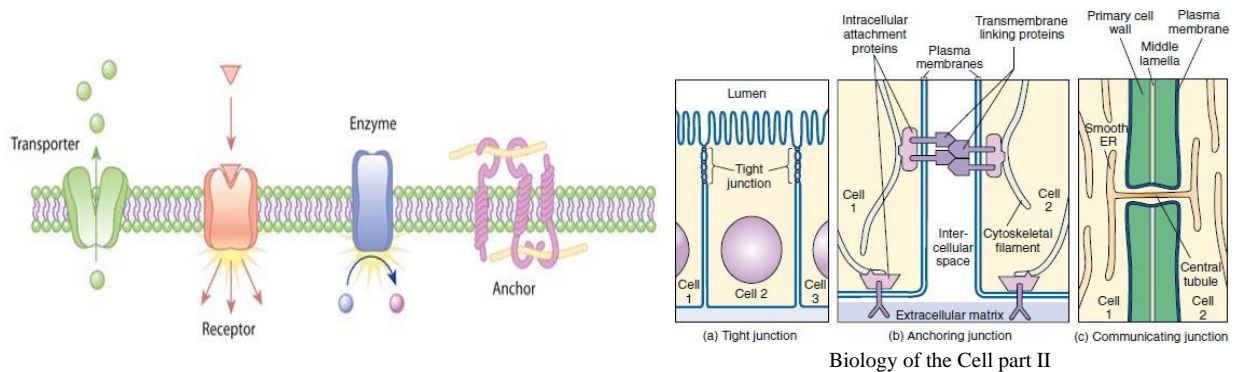


Protein yang berfungsi sebagai enzim berperan mengkatalisis berbagai reaksi metabolik pada sel. Enzim mengkatalisis suatu reaksi biokimia dengan menurunkan energi yang dibutuhkan untuk mengaktifkan suatu reaksi sehingga dapat

mempercepat reaksi sebesar ribuan atau bahkan jutaan kali lebih cepat. Hubungan enzim dengan substratnya sangatlah spesifik, enzim akan berinteraksi pada *complementary areas* di permukaan substratnya membentuk suatu relasi yang sering disebut sebagai *lock and key*. Enzim dapat berikatan dengan satu atau lebih substrat, mempersatukan sehingga suatu reaksi dapat berlangsung dan melepaskan kembali substratnya saat reaksi selesai. Dalam kondisi tertentu saat enzim berikatan dengan substrat, enzim dapat mengalami perubahan konformasi yang merubah orientasi dari substratnya sehingga substrat menjadi lebih reaktif. Enzim biasanya dinamakan sesuai dengan jenis reaksi biokimia yang dikatalisisnya, seperti enzim protease yang memecah protein dan enzim dehidrogenase yang mengoksidasi substrat dengan melepaskan atom hidrogen.

7. Protein pada membran sel

Protein pada membran sel memiliki berbagai fungsi, di antaranya sebagai molekul yang mengekspresikan identitas sel (MHC), sebagai protein adhesi interseluler, transporter ion, membentuk *tight junction*, *communicating junction* dan *Anchoring junction* yang menghubungkan sitoskeleton sel dengan sitoskeleton sel lainnya atau dengan matrik ekstraseluler. Protein pada permukaan membran sel juga berfungsi sebagai reseptor yang menerima sinyal dari ekstraseluler serta mentransmisikannya ke intraseluler.



8. Protein yang terlibat dalam transport

Protein transport berfungsi sebagai karier/pembawa molekul lain untuk didistribusikan, contoh protein transport adalah hemoglobin. Pada orang dewasa hemoglobin berbentuk multi subunit kompleks terdiri dari 2 sub unit α dan 2 subunit β yang akan berinteraksi dengan molekul oksigen. Pada hemoglobin fetus, terdapat perbedaan kombinasi komposisi oligomer hemoglobin yaitu terdiri dari 2 subunit α dan 2 subunit γ , kombinasi interaksi protein ini mengakibatkan perbedaan yang menyebabkan oksigen dari hemoglobin ibu dapat dipindahkan ke hemoglobin fetus. Contoh transport protein lainnya adalah Sitokrom yang berfungsi sebagai pembawa elektron di mitokondria.

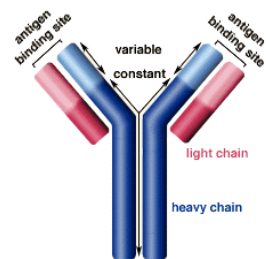
9. Protein sebagai storage/ tempat penyimpanan

Protein dapat berperan sebagai tempat penyimpanan biologis dari berbagai ion logam dan asam amino dimana molekul-molekul ini dapat dimobilisasi kembali pada saat dibutuhkan. Salah satu yang paling banyak dipelajari adalah *Ferritin* yaitu *storage* protein dari besi. Besi merupakan komponen dari *heme* pada hemoglobin yang merupakan transport protein untuk membawa

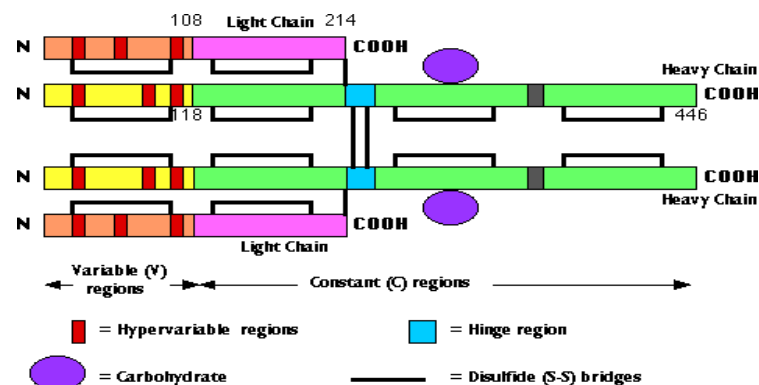
molekul oksigen, karenanya besi memiliki peran penting dalam berbagai fungsi seluler dan keberadaannya didalam tubuh dipertahankan melalui mekanisme penyimpanan didalam *Ferritin* dalam bentuk Kristal padat Fe(III) atau disebut juga *ferrihydrate*.

Hubungan struktur protein dengan molekul yang diukur secara spesifik

1. Interaksi antigen-antibodi



Protein yang terlibat dalam sistem imun sebagai antibodi memiliki kemampuan untuk berikatan dengan sangat spesifik dengan antigen *epitope*. Antigen ini dapat berupa protein lain, karbohidrat, molekul-molekul kecil bahkan nukleotida yang dikenali sebagai *non self* (bukan merupakan bagian dari tubuh) oleh sistem imun. Epitope dari antigen adalah suatu target spesifik yang terdapat pada permukaan antigen, sedangkan bagian dari antibodi yang berikatan secara spesifik dengannya disebut *paratope*. Antibodi disebut juga imunoglobulin, memiliki berbentuk *Y-shaped protein* yang terdiri dari *constant region* dan *variable region*. *Constant region* terbagi



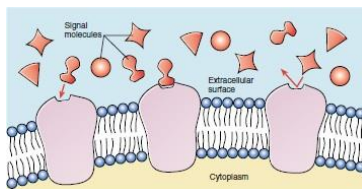
menjadi lima kelas yaitu

IgM, IgG, IgA, IgD, dan IgE, area ini menentukan mekanisme yang digunakan untuk mengeliminasi antigen. Di bagian atas antibodi terdapat *variable region* yang merupakan struktur yang unik dan spesifik terhadap *epitope* tertentu.

Variable region terdiri atas bagian ujung dari *heavy* dan *light chain* dengan komposisi 110-130 asam amino. *Variable region*, baik *heavy* maupun *light chain* terbagi lagi menjadi tiga hypervariable region (HV1,2,3) yang dipisahkan oleh *framework region* (FR) yang merupakan struktur lembaran β yang membentuk *scaffold* untuk mempertahankan HV region pada posisi kontak dengan antigen. HV *region* yang berinteraksi secara spesifik dengan *epitope* disebut juga sebagai *complementarity determining regions* (CDRs). Spesifisitas *paratope* yang terdapat pada ujung *variable region* dari antibodi menyebabkan ikatan yang spesifik terhadap satu *epitope*

antigen, namun *epitope* yang sama dapat dimiliki oleh lebih dari satu protein antigen sehingga satu antibodi juga dapat mengenali lebih dari satu antigen yang memiliki *epitope* yang sama. Antibodi yang dapat berikatan secara spesifik dengan antigen ini digunakan pada berbagai *immunoassays* seperti *Western Blot* dan ELISA untuk mendeteksi dan mengkuantifikasi spesifik protein, Imunohistokimia untuk mengetahui lokalisasi dari spesifik protein didalam sel atau jaringan serta Imunopresipitasi untuk mengisolasi spesifik protein dari suatu campuran berbagai protein.

2. Interaksi Ligan-Reseptor

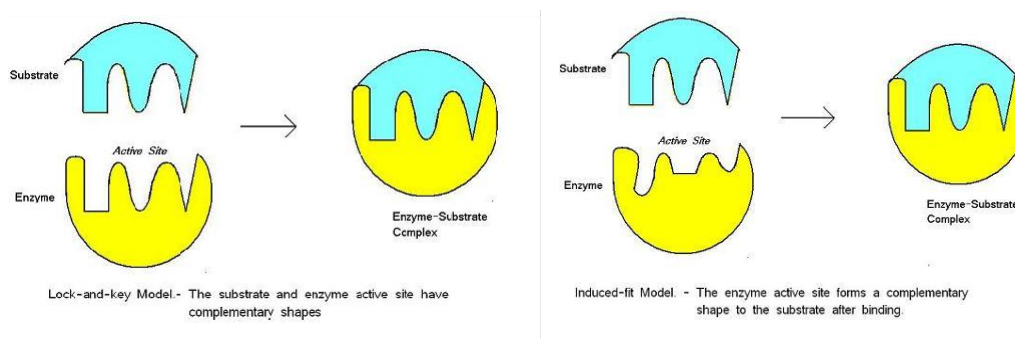


Dalam mengkoordinasikan perilakunya, sel berkomunikasi dengan sel lainnya maupun dengan lingkungannya, komunikasi seluler ini melibatkan Interaksi antara ligan sebagai molekul sinyal dan reseptor sebagai penerima sinyal. Hubungan reseptor dengan molekul sinyal ini bersifat spesifik dimana reseptor hanya menerima dan menghantarkan sinyal dari kelompok molekul yang sesuai dan mengabaikan sinyal lainnya. Pada reseptor permukaan sel, spesifisitas ini bergantung dari afinitas antara ligan dengan berbagai domain serta kombinasi dari struktural motif pada *binding site* dari reseptor, Ligan berinteraksi melalui kontak multipel dengan berbagai domain yang terdapat pada reseptor, sebagian dari interaksi ini berperan sebagai binding sedangkan interaksi lainnya penting untuk transmisi sinyal. Aktivasi reseptor kadang juga membutuhkan perubahan konformasi, dimerisasi maupun mekanisme proteolisis.

3. Interaksi Enzim-substrat

Enzim adalah kompleks protein yang dapat mengkatalisis reaksi biokimia spesifik tanpa dirinya sendiri ikut berubah. Spesifisitas yang dimiliki enzim dikarenakan adanya *active site* yang spesifik terhadap substrat tertentu, *active site* memiliki bentuk *three-dimensional cleft* mengandung residu asam amino yang dapat membentuk ikatan sementara dengan substrat (*binding site*) dan residu yang mengkatalisis reaksi pada substrat (*catalytic site*). Spesifisitas interaksi enzim dengan substratnya digambarkan dengan model *lock and key* yang menunjukkan bentuk komplementer yang tepat antara enzim dengan substratnya, model lainnya adalah

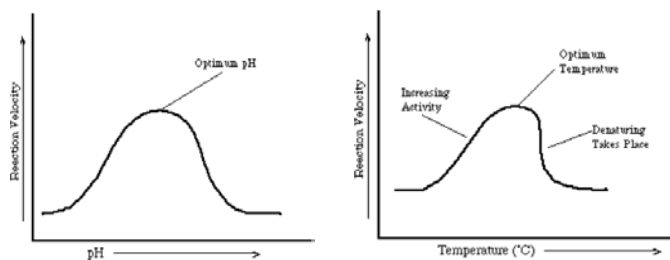
induced-fit model dimana dapat terjadi perubahan konformasi dari *active site* untuk menyesuaikan dengan substratnya setelah *binding*.



Spesifisitas enzim juga dapat dibedakan menjadi sebagai berikut :

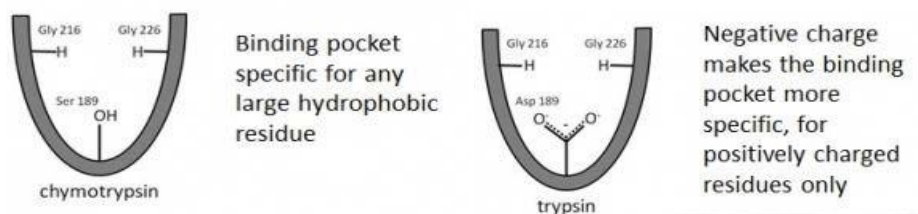
1. Absolute specificity – enzim yang hanya mengkatalisis satu jenis reaksi spesifik.
2. Group specificity – enzim dapat bekerja pada molekul yang memiliki grup fungsional yang spesifik, misalnya pada kelompok amino, fosfat and metil.
3. Linkage specificity – enzim yang bekerja pada jenis ikatan kimia tertentu daripada dengan struktur molekul tertentu.
4. Stereochemical specificity – enzim yang bekerja pada isomer sterik atau isomer optik tertentu.

Struktur tiga dimensi dari enzim ini sensitif terhadap perubahan PH, garam, suhu dan keberadaan kofaktor. PH yang terlalu tinggi atau rendah menyebabkan kebanyakan enzim kehilangan fungsinya, enzim membutuhkan PH optimum untuk menjaga stabilitasnya dan mencapai keaktifan maksimalnya. Keberadaan garam di lingkungan enzim juga dapat menghilangkan fungsi enzim sebagai akibat dari perubahan struktur enzim, sedangkan kenaikan temperatur akan meningkatkan kecepatan reaksi hingga batas maksimum dimana kenaikan suhu sebesar 10°C dapat meningkatkan aktivitas enzim hingga 50-100%, namun bila temperatur direndahkan atau ditinggikan diluar batas toleransi maka akan menurunkan hingga menghilangkan fungsinya.



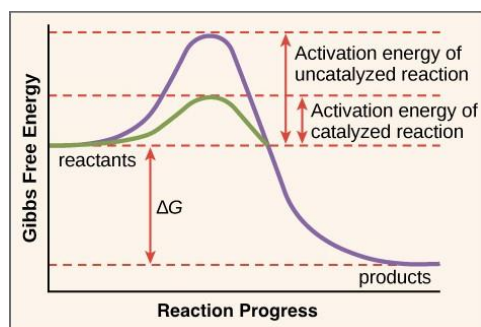
Walaupun enzim menunjukkan spesifisitas, namun kofaktor dapat bekerja pada berbagai apoenzim (enzim dalam bentuk belum aktif). Kebanyakan enzim membutuhkan keberadaan kofaktor untuk berfungsi sebagai kompleks aktif yang dinamakan holoenzim (kompleks apoenzim+kofaktor).

Spesifitas enzim juga dipengaruhi oleh sifat residu asam amino pada *active site*-nya, sebagai contoh antara tripsin dan kemotripsin dimana keduanya merupakan protease yang dapat memotong asam amino hidrofobik, namun tripsin dapat bekerja lebih spesifik dengan memotong



substrat tepat dibelakang residu yang bermuatan positif, hal ini disebabkan adanya muatan negatif pada *active site* dari tripsin.

Interaksi Enzim, substrat dan Inhibitor



Enzim merupakan katalisator yang dapat mempercepat reaksi kimia tanpa mengalami perubahan kimia permanen pada dirinya. Enzim sebagai katalisator bekerja menurunkan energi aktivasi/ barrier energi yang dibutuhkan untuk membentuk *transition state intermediate* pada suatu reaksi kimia dengan cara

membentuk kompleks transisi yang stabil dengan substrat sehingga memberikan orientasi optimal kepada substrat serta memudahkan pemutusan ikatan, disamping itu *active site* dari enzim memberikan lingkungan yang ideal untuk terjadinya suatu reaksi kimia.

Active site dari enzim merupakan struktur tiga dimensi yang membentuk lekukan celah, struktur ini tersusun dari berbagai residu asam amino, perbedaan komposisi residu dan posisinya dalam struktur tiga dimensi *active site* inilah yang berperan penting pada spesifisitas substrat *binding*

terhadap enzim. Bentuk yang komplementer antara enzim dengan substrat memungkinkan terjadinya berbagai ikatan lemah non kovalen seperti ikatan hidrogen, elektrostatik dan van der Waals forces, serta interaksi hidrofobik yang memberikan lingkungan yang unik pada *active site*. Selain *active site* yang merupakan sub unit katalitik, pada enzim juga terdapat *regulatory site* yang tidak memiliki aktivitas katalitik. Hal ini dikonfirmasi oleh John Gerhart dan Howard Schachman dengan melakukan uji ultrasentrifugasi.

Terdapat 3 model interaksi enzim dengan substrat yaitu:

1. Model lock and key yang diajukan oleh Emil Fischer (1890) yang menyatakan bahwa interaksi *active site* enzim dengan substrat merupakan suatu interaksi dari dua molekul dengan bentuk yang komplementer sehingga tidak membutuhkan perubahan struktur setelah interaksi terjadi.
2. Induced-fit model merupakan model dimana interaksi antara enzim dengan substrat dapat menyebabkan perubahan konformasi dari *active site* enzim untuk menyesuaikan dengan struktur substrat.
3. Transition-state model adalah model dimana baik substrat maupun enzim mengalami perubahan bentuk dengan bantuan energi, substrat yang telah berubah bentuknya kemudian akan terlepas dari enzim.

Dari ketiga model di atas yang paling umum digunakan adalah *induced fit model*.

Hal-hal yang mempengaruhi interaksi/ *binding* substrat dengan enzim.

- Komplementari
Kesesuaian struktur tersier menentukan pengenalan dan interaksi enzim dengan substrat.
- Fleksibilitas
Struktur tersier memungkinkan enzim untuk beradaptasi dengan substratnya (*induced fit*) dimana ini merupakan hal yang esensial untuk keberagaman dalam fungsi biokimia (derajat fleksibilitas bervariasi berdasarkan fungsi).

- Permukaan

Binding sites dapat berbentuk cembung, cekung atau datar. Untuk substrat kecil dapat berupa celah, kantong atau rongga.

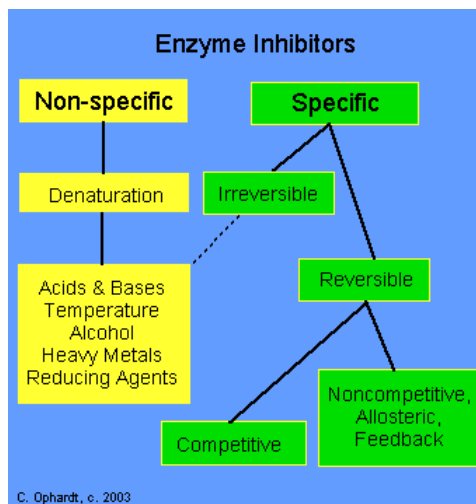
- Non-Covalent Forces

Ikatan non kovalen merupakan salah satu karakteristik dari binding sites.

- Afinitas

Afinitas binding merupakan kekuatan ketertarikan kimia antara enzim dan substrat.

Substrat dinamakan juga reaktan kimia, setiap tipe enzim dapat berinteraksi dengan satu atau lebih substrat tergantung dari jenis reaksi kimianya. Pada beberapa reaksi satu substrat dapat dipecah menjadi multipel produk, sedangkan pada reaksi lainnya dua substrat dapat bergabung membentuk molekul yang lebih besar. Dua substrat juga dapat bereaksi bersama-sama, mengalami modifikasi dan menjadi dua produk yang berbeda.

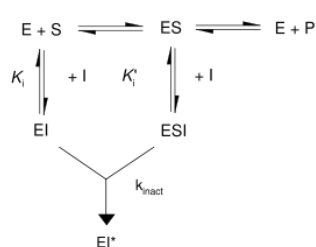


Selain berinteraksi dengan substrat, enzim juga dapat berinteraksi dengan inhibitor. Inhibitor enzim adalah suatu senyawa yang dapat berinteraksi dengan enzim untuk menurunkan aktivitasnya. Inhibitor dapat bekerja dengan cara berinteraksi dengan enzim dan menghalangi substrat memasuki *active site* enzim dan atau mencegah enzim mengkatalisis suatu reaksi kimia. Inhibitor alami terlibat dalam regulasi metabolisme yaitu sebagai negative feedback untuk mempertahankan homeostasis seluler.

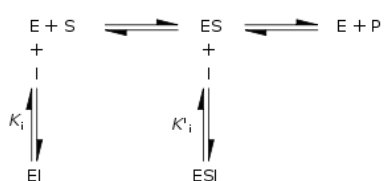
Ada dua kategori inhibitor yaitu : - Ireversibel inhibitor

- Reversibel inhibitor

Ireversibel inhibitor berikatan secara kovalen dengan enzim dan menyebabkan perubahan kimia yang ireversibel pada *active site* enzim. Ireversibel inhibitor seringkali mengandung grup fungsional reaktif seperti aldehyd, alkena, atau fenil sulfonat. Grup elektrofil ini dapat bereaksi



dengan asam amino pada rantai sisi untuk membentuk *covalent adducts*. Komponen asam amino ini mengandung *nucleophilic side chains* hidroksil atau sulfhidril grup seperti serin, sistein, treonin dan tirosin. Mekanisme inhibisi oleh ireversibel inhibitor diawali dengan pembentukan ikatan non kovalen yang reversibel dengan afinitas rendah antara inhibitor (I) dengan enzim (E-I) atau dengan kompleks enzim-substrat (ESI), kemudian secara perlahan terjadi reaksi/*rearrangement* pada kompleks ini disebut juga sebagai *slow binding* sehingga terbentuk *covalently modified irreversible complex EI**. Tingkat di mana EI* ini terbentuk disebut tingkat inaktivasi atau *kinact*. Binding dari ireversibel reseptor ini bersifat kompetitif dengan substrat atau dengan inhibitor lain (misal dengan reversibel inhibitor). Disamping itu reversibel inhibitor juga dapat membentuk ireversibel produk dengan berikatan sangat kuat dengan target enzim sehingga menyerupai ikatan kovalen dari ireversibel inhibitor.



Reversibel inhibitor membentuk ikatan non kovalen dengan enzim, ikatan non kovalen ini diantaranya ikatan hidrogen, ikatan ion dan interaksi hidrofobik. Kombinasi dari ikatan yang lemah ini dapat menyebabkan suatu ikatan yang kuat dan spesifik, namun berbeda dengan substrat maupun ireversibel inhibitor yang bereaksi secara kimia maka reversibel inhibitor tidak bereaksi secara kimia saat berikatan sehingga dapat dilepaskan dengan mudah melalui pengenceran atau dialisis. Ada tiga jenis reversibel inhibitor yaitu kompetitif, non kompetitif dan *uncompetitive*/inhibitor campuran.

- Inhibitor kompetitif



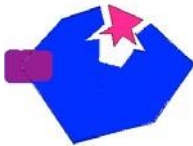
Berkompetisi dengan substrat untuk berikatan dengan enzim pada saat bersamaan. Inhibitor kompetitif seringkali memiliki struktur yang menyerupai struktur substrat. Jenis inhibisi ini dapat diatasi dengan menambahkan konsentrasi substrat. Inhibitor kompetitif memiliki afinitas dengan *active site* enzim sehingga dapat berikatan dengan enzim (E-I) namun tidak berikatan dengan kompleks enzim-substrat, dengan mengganggu substrat *binding* maka inhibitor kompetitif menyebabkan peningkatan K_m namun tidak mempengaruhi V_{max} karena tidak mengganggu reaksi katalisis dari kompleks enzim-substrat (ES).

- Inhibitor non kompetitif

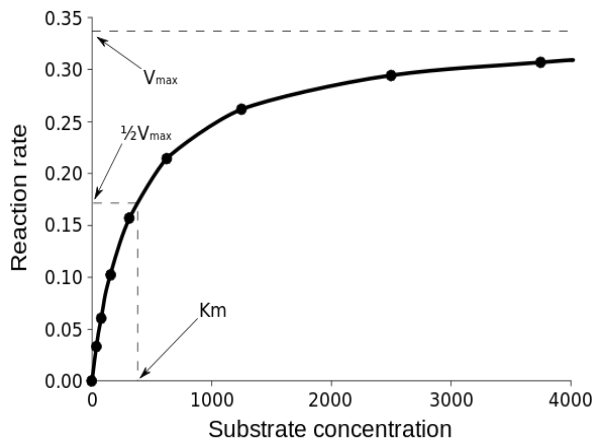


Inhibitor non kompetitif berikatan dengan *active site* enzim dan menurunkan aktifitasnya tapi tidak mengganggu ikatan enzim dengan substratnya, dengan demikian tingkat penghambatan yang terjadi bergantung dari konsentrasi substratnya. Inhibitor non kompetitif memiliki afinitas yang sama besarnya terhadap enzim (E) maupun kompleks enzim substrat (ES) sehingga jenis inhibisi ini tidak merubah K_m namun menurunkan V_{max} .

- Uncompetitive inhibitors



Inhibitor ini berikatan baik dengan enzim (E) maupun dengan kompleks enzim substrat (ES). *Uncompetitive inhibitor* biasanya mengikuti mekanisme *allosteric effect* dimana ia berikatan dengan enzim pada tempat yang berbeda dengan substrat, *binding* inhibitor pada *allosteric site* ini merubah konformasi dari enzim sehingga menyebabkan turunnya afinitas substrat terhadap *active site* enzim. *Binding* inhibitor pada kompleks enzim substrat mengakibatkan terhentinya reaksi untuk menghasilkan produk. Karenanya mekanisme inhibisi ini dapat menurunkan K_m karena mengganggu efisiensi binding substrat pada enzim (E), disamping itu juga dapat menurunkan V_{max} karena mengganggu *binding* substrat dan menghambat reaksi katalisis pada kompleks enzim substrat (ES).



Kebanyakan reversibel inhibitor mengikuti skema klasik dari Michaelis-Menten dimana enzim (E) berikatan dengan substrat (S) untuk membentuk kompleks enzim substrat (ES). Nilai K_m merupakan konstanta Michaelis yang berhubungan dengan konsentrasi substrat ketika kecepatan setengah maksimal. V_{max} adalah kecepatan maksimum enzim.

Uji fungsi protein

Untuk memprediksi fungsi protein yang belum diketahui beberapa metoda bioinformatika dapat dilakukan, diantaranya :

1. Homology-based methods

Berdasarkan pada konsep bahwa protein yang memiliki sekuens yang serupa biasanya homolog dan memiliki fungsi yang juga serupa. Karena sekuens asam amino menentukan struktur protein dan struktur menentukan fungsi biokimia dari protein. Untuk mengetahui sekuens homolog dari gen atau protein yang diinginkan dapat dilakukan dengan menggunakan database sequence alignment program seperti BLAST dan FASTA lalu dilakukan scan alignment untuk sekuens yang serupa dengan cara mengurutkan sekuens yang dicari dengan sekuens yang telah ada di arsip hingga didapatkan kelompok residu yang selaras secara total atau sebagian dengan arsip. Perbandingan ini dapat digunakan untuk memprediksi fungsi protein individu, keluarga dari protein, atau bahkan seluruh protein pelengkap dari sekuensing organisme baru.

2. Metoda berbasiskan motif sekuens

Untuk mengetahui domain pada suatu urutan sekuens dapat digunakan domain database Pfam (*Protein Families Database*), sedangkan *dcGO website* berisi penjelasan untuk domain individu dan supra-domain misalnya kombinasi dari dua atau lebih domain yang berurutan. *dcGO* dapat digunakan untuk memprediksi fungsi protein dengan lebih realistis. Didalam domain protein terdapat penanda yang dikenal dengan sebutan ‘motif’, motif berkaitan dengan fungsi tertentu dari protein misalnya sebagai sinyal peptida pendek yang membawa protein ke lokasi tertentu didalam sel/*subcellular localization*. Keberadaan motif dapat diketahui menggunakan database PROSITE (*'database of protein domains, families and functional sites'*).

3. Metoda berbasiskan struktur tiga dimensi protein

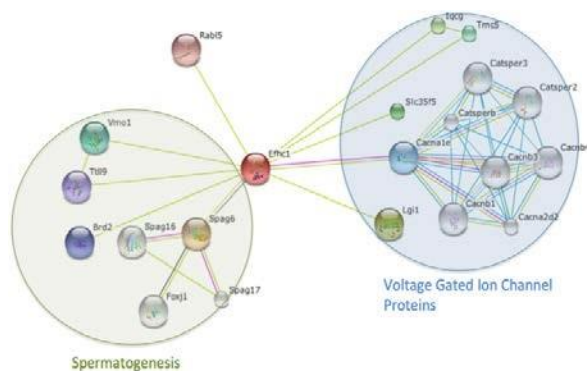
Struktur 3D protein merupakan indikator yang baik untuk menilai kesamaan fungsi dari dua atau lebih protein. Program-program yang dapat digunakan untuk melihat kesamaan struktur 3D dengan yang telah tercatat di Protein Data Bank adalah FATCAT (*Flexible structure Alignment by Chaining AFPs (Aligned Fragment Pairs with Twists)*), CE (*combinatorial*

extension) dan DeepAlign (*protein structure alignment beyond spatial proximity*). Bila struktur 3D dari protein yang dicari belum dimiliki maka server RaptorX dapat digunakan untuk memprediksi model struktur 3D. Selain menggunakan struktur 3D dari seluruh protein maka struktur 3D motif dari active site atau binding site juga dapat digunakan untuk memprediksi fungsi protein memakai metoda SALSA (*The Structurally Aligned Local Sites of Activity*) yang dikembangkan oleh Mary Jo Ondrechen yang menghitung sifat kimia dari individual asam amino untuk mengidentifikasi *active site*. Database seperti Catalytic Situs Atlas telah dikembangkan dan dapat dicari menggunakan urutan protein baru untuk memprediksi situs fungsional tertentu.

4. Metoda berbasis *Genomic context*

Metoda baru dalam memprediksi fungsi protein berdasarkan observasi kehadiran atau ketidakhadiran dari dua atau lebih protein dengan corak yang serupa pada berbagai genom yang berbeda. Pendekatan ini disebut juga *phylogenomic profiling* dan digunakan untuk memprediksi fungsi seluler atau proses biologis dimana protein tersebut berperan. Sebagai contoh protein-protein yang terlibat dalam jalur persinyalan yang sama akan berbagi *genomic context* di semua spesies.

5. Metoda berbasis *Network*



Banyak algoritma telah dikembangkan untuk memprediksi fungsi berdasarkan pada integrasi beberapa sumber data (misalnya genom, proteomik, interaksi protein, dll) dan pengujian pada gen sebelumnya menunjukkan tingkat akurasi yang tinggi. Algoritma yang lebih akurat seperti

GeneMANIA (beberapa algoritma jaringan asosiasi integrasi) telah dikembangkan dalam beberapa tahun terakhir mengindikasikan penggunaan network untuk memprediksi fungsi gen ataupun protein dimasa depan. Gambar ilustrasi diatas menunjukkan analisis protein EFHC1 menggunakan *String database* untuk melihat interaksinya dengan protein-protein

lain yang telah dikelompokan berdasarkan fungsinya menggunakan Pfam dan Smart database.

Referensi

1. Essential of Cell Biology unit 2.5. e-book. Nature edu © 2010.
2. Biology of the cell part II. e-book. McGraw Hill
3. Boundless."Enzyme Active Site and Substrate Specificity." Boundless Biology.2016. From <https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/metabolism6/enzymes-72/enzyme-active-site-and-substrate-specificity-350/11576/>
4. http://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Enzyme/Irreversible_Inhibitor
5. http://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Enzyme/Reversible_Inhibitors
6. Whisstock, J.C.; Lesk, A.M. (2003). "Prediction of protein function from protein sequence and structure". *Quarterly Reviews of Biophysics*. 36 (3): 307–340.
7. Reeck, G. R.; de Haen, C.; Teller, D. C.; Doolittle, R. F.; Fitch, W. M.; Dickerson, R. E.; et al.(1987). ""Homology" in proteins and nucleic acids: a terminology muddle and a way out of it". *Nature*. **50** (5): 667.
8. Sharan, R; I. Ulitsky; R. Shamir (2007). "Network-based prediction of protein function". *Mol Sys Biol*. 3 (88): 88.
9. Finn, R.D.; J. Mistry; J. Tate; P. Coggill; A. Heger; J.E. Pollington; O.L. Gavin; et al. (2010). "The Pfam protein families database". *Nucleic Acids Res*. **38** (Database issue): D211–222
10. Sleator, R.D.; P. Walsh (2010). "An overview of in silico protein function prediction". *Arch Microbiol*. **192** (3): 151–155.
11. String 9.1 <http://string-db.org/>
12. Pfam 27.0 <http://pfam.xfam.org/>
13. Smart <http://smart.embl-heidelberg.de/>