

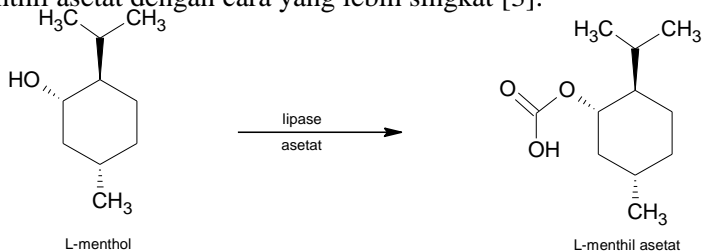
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Menthol dan Menthil Asetat

Menthol merupakan salah satu jenis senyawa monoterpen [1]. Menthol adalah senyawa yang dibutuhkan dalam jumlah besar sebagai produk aroma *mint*. Saat ini, kebutuhan akan menthol sebagai perasa, parfum, dan farmasi sekitar 12.000 ton per tahun. Pasokan utama l-menthol ini berasal dari tumbuhan *mint* (*Mentha arvensis* atau *piperita*) di seluruh dunia [16].

Menurut Fairuz [4], menthol merupakan senyawa organik dari jenis monoterpen yang dapat disintesis atau diperoleh secara alami dari minyak permen. Menthol merupakan senyawa volatil yang memiliki aroma dan rasa yang khas, sehingga sering dimanfaatkan sebagai bahan campuran untuk makanan, minuman, dan produk pakai seperti sabun, *shampoo*, dan pasta gigi. Di Indonesia menthol digunakan dalam industri makanan berbahan dasar coklat dan kembang gula (*confectionery*), minuman ringan, farmasi, rokok kretek, jamu, sabun, dan bahan pembersih keperluan rumah tangga termasuk pasta gigi, kosmetik dan perekat/lem [4].

Menthil asetat merupakan salah satu senyawa golongan monoterpen, sama seperti menthol [1]. Menthil asetat ($C_{12}H_{22}O_2$) merupakan cairan bening kekuningan yang beraroma *mint* dengan berat molekul 198,31 g/mol [17]. Pada umumnya, pembentukan menthil asetat dilakukan menggunakan menthol sebagai prekursor reaksi. Menthol dapat direaksikan dengan katalis anorganik untuk memperoleh menthil asetat melalui proses yang cukup panjang. Sedangkan dengan menggunakan lipase dan asetat, dapat diperoleh menthil asetat dengan cara yang lebih singkat [3].

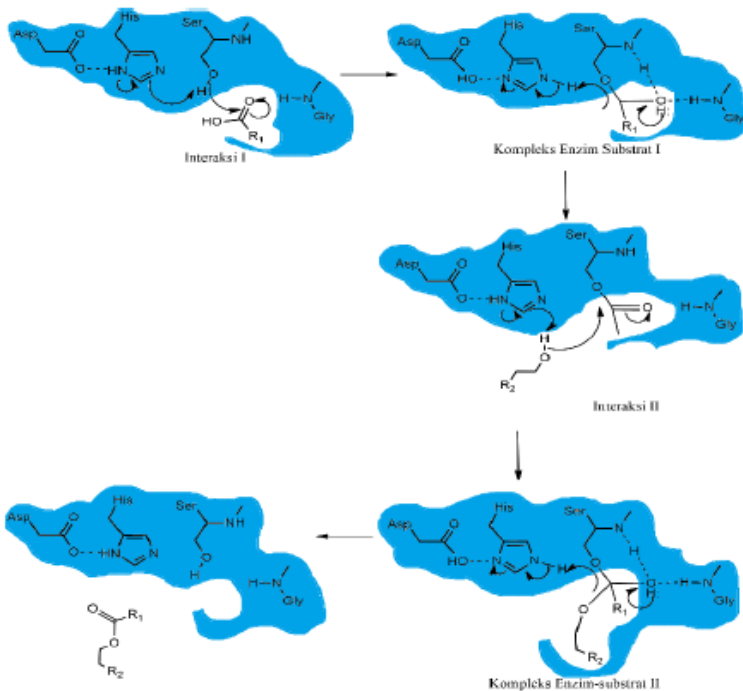


Gambar 2.1 Reaksi l-menthol menjadi l-menthil asetat menggunakan katalis lipase [3].

2.2 Reaksi Asilasi Enzimatis Menggunakan Lipase

Reaksi asilasi adalah proses adisi gugus asil ke suatu senyawa. Senyawa yang menyediakan gugus asil disebut sebagai agen pengasil atau sumber asil [4]. Donor asil tersebut dapat diperoleh dari beberapa senyawa, seperti asam asetat anhidrid, metil asetat, etil asetat, dan butil asetat [18].

Berikut merupakan mekanisme reaksi asilasi enzimatis pada senyawa alkohol menggunakan enzim lipase [19].



Gambar 2.2 Mekanisme reaksi asilasi alkohol dengan lipase [19].

Dalam mekanisme tersebut terlihat bahwa pada awal reaksi, substrat asam karboksilat berinteraksi dengan sisi serin dari enzim.

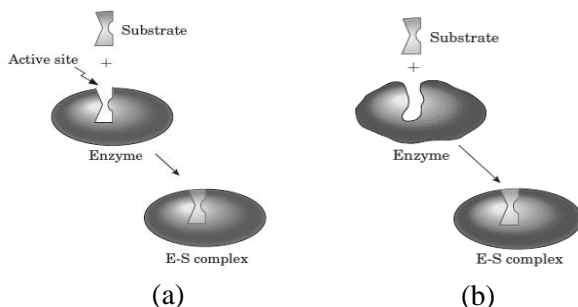
Tahap ini terlihat pada tahap **interaksi I**. Terjadinya interaksi ini menyebabkan terbentuknya intermediet berupa **kompleks enzim substrat I**. terbentuknya kompleks enzim ini memicu terjadinya interaksi enzim dengan substrat alkohol (**interaksi II**) sehingga terbentuk **kompleks enzim substrat II**. Tahap terakhir dari reaksi tersebut terbentuklah suatu senyawa ester [19].

2.3 Enzim Lipase

2.3.1 Karakteristik Enzim Lipase

Enzim merupakan suatu protein yang mengkatalisis terjadinya reaksi biokimia dalam makhluk hidup. Enzim terkandung dalam konsentrasi kecil di dalam sel. Enzim berperan dalam mempercepat laju reaksi tanpa mengubah kesetimbangan dari reaksi tersebut [20]. Kelebihan dari penggunaan enzim adalah kemampuannya mengkatalisis suatu reaksi tertentu dan substrat tertentu yang disebut dengan spesifisitas. Spesifisitas artinya enzim hanya bekerja untuk substrat tertentu dan mengubahnya menjadi produk tertentu pula. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa enzim hanya akan berikatan dengan substrat tertentu melalui sisi aktifnya [21]. Dalam proses mengkatalisis suatu reaksi, enzim membentuk senyawa antara (senyawa intermediet) yang mempunyai $E_{\text{aktivitas}}$ lebih rendah. Senyawa intermediet tersebut dinamakan kompleks enzim-substrat [22].

Penjelasan mengenai mekanisme pembentukan intermediet enzim-substrat dapat dijelaskan melalui dua model pendekatan yaitu model *lock and key* serta model *induced fit*. Dalam model *lock and key* menjelaskan bahwa enzim mempunyai bentuk yang rigid (kaku) pada sisi aktifnya. Hal ini mengakibatkan hanya substrat dengan bentuk yang sesuai dengan sisi aktif enzim yang dapat bereaksi. Lain halnya dengan *lock and key*, dalam model *induced fit* sisi aktif enzim mempunyai bentuk sisi aktif yang fleksibel sehingga sisi aktif enzim dapat menyesuaikan diri dengan bentuk substrat. Perbedaan model *lock and key* dan *induced fit* dapat dilihat pada gambar berikut [23].



Gambar 2.3 Model interaksi enzim dengan substrat: (a) *lock and key* ; (b) *induced fit*.

Enzim lipase merupakan enzim yang digunakan secara luas karena mempunyai kesesuaian dengan berbagai macam jenis substrat dan mampu mengkatalisis beberapa jenis reaksi seperti hidrolisis, esterifikasi, aminolisis, dan peroksidasi [24]. Enzim lipase (EC 3.1.1.3) merupakan enzim yang dalam pelarut organik mempunyai aktivitas hidrolisis, serta mampu mengkatalisis reaksi esterifikasi dan transesterifikasi [25]. Enzim lipase memiliki tiga sisi aktif dalam proses esterifikasi yaitu aspartat, histidin, serta serin [26].

Secara umum, lipase adalah rantai polipeptida yang dibagi menjadi dua domain, yaitu domain C-terminal dan domain N-terminal. Domain N-terminal berisi sisi aktif dengan bagian hidrofobik dari serin. Dimana pada rantai ini terbentuk urutan asam amino pentapeptida yaitu Gly-X-Ser-X-Gly. Selain serin, pusat aktif lipase paling banyak adalah histidin dan asam amino lainnya (Asp atau Glu). Mekanisme katalitik lipase berpusat pada sisi aktif serin [32].

Menurut Silva [27], aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh konformasi sisi aktifnya. Hal tersebut berhubungan dengan imobilisasi enzim. Enzim yang tidak diimmobilisasi, sisi aktifnya cenderung mudah untuk mengalami perubahan konformasi. Sementara enzim yang diimmobilisasi, sisi aktifnya akan lebih kaku karena adanya ikatan *cross-linking*. Hal tersebut menurunkan fleksibilitas enzim dan mempertahankan sisi aktifnya, sehingga aktivitas enzim akan bertambah [27].

Dalam pemanfaatannya sebagai katalis dalam reaksi senyawa organik, enzim sangat dipengaruhi oleh kondisi reaksi yang dilakukan. Menurut Joubiox [28], kemoselektivitas kerja enzim lipase dipengaruhi oleh struktur dari substrat [28] serta pelarut yang digunakan [29]. Selain itu, rasio jumlah mol antara enzim dengan substrat serta proses pengadukan juga mempengaruhi produk yang dihasilkan dalam reaksi katalitik menggunakan enzim [30].

2.3.2 Enzim Lipase *Candida antarctica Recombined Aspergillus oryzae*

Di antara berbagai jenis lipase, Lipase B dari *Candida antarctica* (CALB) adalah lipase yang aplikasinya paling banyak di industri. Hal ini dikarenakan enantioselektivitasnya yang tinggi, banyaknya substrat yang dapat digunakan, stabilitas termal, dan stabilitas pelarut organiknya juga tinggi. CALB merupakan lipase yang mempunyai tiga sisi aktif atau biasa disebut triad yang terdiri dari Serin, Histidin, dan Aspartat atau Glutamin, dimana sisi aktif tersebut efektif dalam pengikatan asil dan alkohol [31].

Lipase dari *Candida antarctica* mempunyai tiga asam amino yang berperan sebagai sisi aktif yaitu serin, histidin, dan aspartat atau glutamine. Stabilitas enzimnya ditentukan oleh konfigurasi tiga-dimensi. Lipase ini memiliki unit heliks yang melindungi sisi aktifnya dan memiliki permukaan hidrofobik [33]. Lipase jenis ini biasanya muncul dalam dua konformasi utama: konformasi tertutup dan terbuka. Dalam konformasi tertutup, sebuah amphiphilic α -helix, yang disebut tutup, menutup pusat aktif dari medium. Bentuk terbuka ditandai dengan konformasi bagian tutup dan pemaparan residu hidrofobik di sekitar tempat aktif ke medium. Pemaparan area hidrofobik yang besar ini sangat tidak menguntungkan jika tidak ada antarmuka hidrofobik yang menyebabkan stabilisasi. Area permukaan hidrofobik yang terbuka berkontribusi terhadap interaksi antara enzim dan substratnya [19].

2.4 Pemodelan Interaksi Molekul dengan Reseptor

Molecular docking merupakan suatu metode pemodelan molekul yang digunakan untuk memprediksi aktivitas biologis suatu senyawa secara *in silico*. Metode pemodelan molekul ini didasarkan

pada adanya interaksi antara protein reseptor terhadap ligannya. Kelebihan dari metode *molecular docking* adalah dapat digunakan untuk memprediksi aktivitas dari suatu senyawa sebelum dilakukan sintesis. Hal ini dapat meminimalisir penggunaan pelarut serta bahan kimia secara berlebihan yang dapat mencemari lingkungan. Beberapa program komputer yang dapat digunakan untuk pemodelan molekul (*molecular docking*), antara lain berbasis linux (seperti *Autodock Vina*) dan berbasis windows (seperti *Autodock*, *ArgusLab*, *Lead it*, *Molegro Virtual Docker (MVD)*, *ChemOffice Ultra*, *Hypercam*, *Accelrys*, *Discovery Studio*, *Molecular Operating Environment (MOE)*, *Maestro Schrodinger*, *SYBYL*, dan sebagainya) [35].

Metode pemodelan interaksi molekul menggunakan *AutoDock* yang berbasis pada proses *docking* dikembangkan untuk mencari sisi aktif pada keseluruhan permukaan protein reseptor dan juga mengoptimalkan konformasi peptidanya. Protein yang digunakan merupakan protein yang tidak mengandung ion, molekul air serta zat lain diluar protein tersebut. Sistem *docking* digunakan untuk pencarian dan identifikasi interaksi antara suatu makromolekul (reseptor) dengan molekul yang lebih kecil (ligan) yang memiliki energi *gibbs* (ΔG^0) yang rendah. Energy *gibbs* menginterpretasikan kekuatan dari ikatan antara reseptor dengan ligan. Interaksi reseptor-ligan dengan nilai energy *gibbs* (ΔG^0) yang rendah memiliki ikatan yang kuat. Interaksi reseptor dengan ligan juga dipengaruhi oleh konstanta inhibisi (K_i). Hubungan antara energy *gibbs* (ΔG^0) dengan konstanta inhibisi (K_i) dinyatakan dengan persamaan berikut [36]:

$$\begin{aligned}
 ML & \longleftrightarrow M + L \\
 k_i & = \frac{[M][L]}{[ML]} \\
 \Delta G^0 & = -RT \ln[1/k_i]
 \end{aligned}$$

dimana :

M = makromolekul

L = ligan

ML = kompleks makromolekul-ligan

Nilai k_i diperoleh dari hasil *docking* dan berpengaruh terhadap kekuatan ikatan. Semakin kecil nilai maka akan menurunkan nilai ΔG^0 . Hal ini menyebabkan terjadinya kenaikan kekuatan ikatan pada interaksi antara makromolekul dengan ligan [36].

2.5 Hipotesis

Reaksi asilasi terkatalis enzim lipase dari *Candida Antarctica Recombined Aspergillus oryzae* dipengaruhi oleh sumber asil, dimana asam asetat anhidrid lebih efektif dalam pembentukan menthil asetat. Hal tersebut dapat diketahui melalui hasil *in vitro* dan *in silico*.