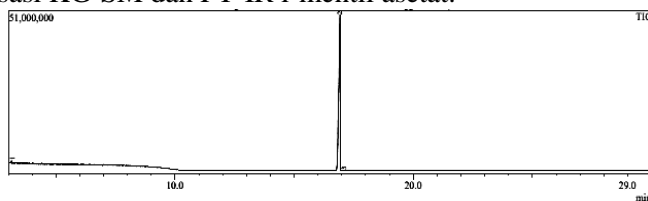


BAB IV PEMBAHASAN

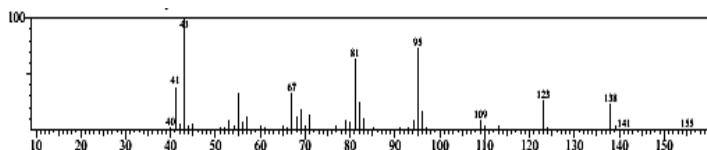
4.1 Analisis hasil uji *in vitro*

4.1.1 Analisis hasil starting material

Pada saat akan melakukan reaksi hidrolisis l-mentil asetat, maka substrat perlu dianalisis terlebih dahulu untuk mengetahui kemurnian substrat yang akan digunakan. *Starting material* berupa l-mentil asetat dianalisis terlebih dahulu menggunakan instrumen KG-SM dan FT-IR. Hasil karakterisasi melalui KG-SM diperoleh data berupa kromatogram yang ditunjukkan pada **Gambar 4.1** dan spektra masa pada **Gambar 4.2**, sedangkan analisis dengan FT-IR ditunjukkan pada **Gambar 4.3**. Berikut merupakan hasil karakterisasi KG-SM dan FT-IR l-mentil asetat:

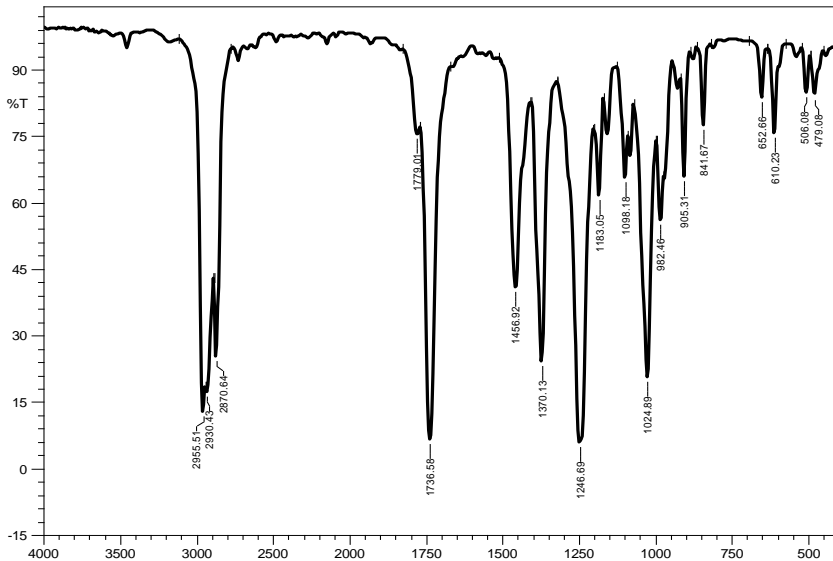


Gambar 4.1 Kromatogram KG-SM substrat l-mentil asetat



Gambar 4.2 Spektra masa KG-SM substrat l-mentil asetat

Berdasarkan hasil KG-SM dapat diketahui bahwa substrat l-mentil asetat yang diperoleh cukup murni yaitu sebesar 99.27%. Jika ditinjau dari pola fragmentasi, maka diperoleh nilai 41, 43, 67, 81, 95, 123, 138, 141, dan 155 m/z. Kemudian dilakukan analisis menggunakan FT-IR yang ditunjukkan melalui **gambar 4.3**. Analisis menggunakan FT-IR bertujuan untuk mengetahui gugus apa saja yang terkandung di dalam substrat l-mentil asetat.

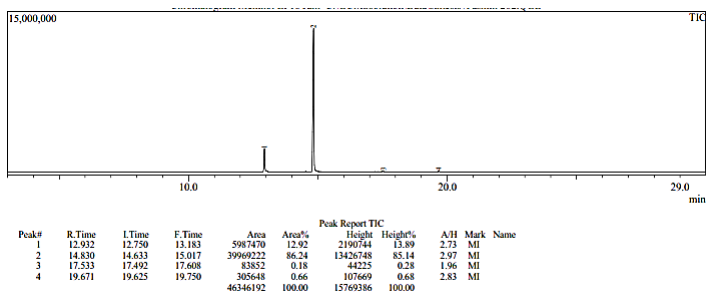


Gambar 4.3 Spektra FT-IR substrat l-mentil asetat

Berdasarkan spektra tersebut dapat dilihat adanya serapan pada bilangan gelombang 2955.51cm^{-1} yang menandakan adanya gugus $-\text{CH sp}^3$. Kemudian terdapat serapan pada 1736.58 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus $\text{C}=\text{O}$ ester. Selain itu juga ditemukan adanya serapan pada $1246,69\text{ cm}^{-1}$ yang menandakan adanya gugus $\text{C}-\text{O}$ ester.

4.1.2 Pengaruh lama reaksi terhadap reaksi hidrolisis l-mentil asetat

Pengaruh lama reaksi hidrolisis l-mentil asetat diamatai selama 24 jam. Pada jam ke-8, 16, dan 24 hasil reaksi dicuplik dan dianalisis dengan instrumentasi KG-SM yang disajikan pada lampiran. Hasil analisis melalui instrumentasi KG-SM bertujuan untuk mengetahui persen area l-mentol yang telah terbentuk. Hasil analisis terbaik ditunjukkan melalui **gambar 4.4**. Berdasarkan spektra masa dan kromatogram tersebut dapat dilihat bahwa persen area l-mentol terbaik saat direaksikan dalam pelarut etanol pada jam ke-16.



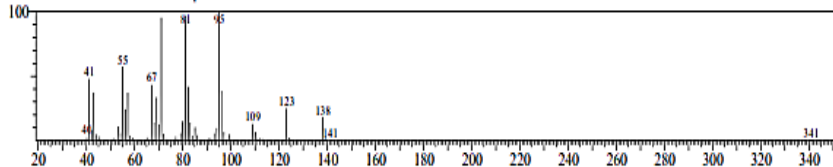
Gambar 4.4 Kromatogram KG-SM hasil reaksi hidrolisis dalam pelarut etanol (16 jam)

<< Target >>

Line#:1 R.Time:12.933(Scan#:1193) MassPeaks:59

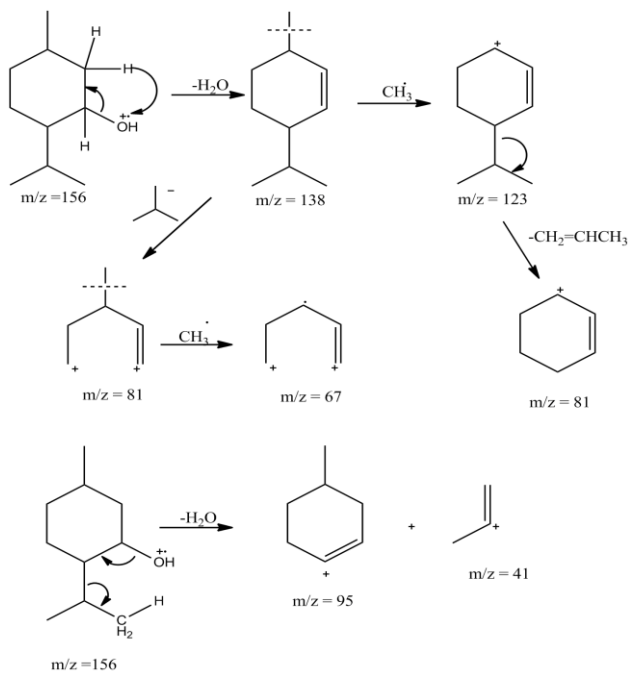
RawMode:Averaged 12.925-12.942(1192-1194) BasePeak:95.05(224660)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Gambar 4.5 Spektra masa KG-SM hasil reaksi hidrolisis dalam pelarut etanol (16 jam)

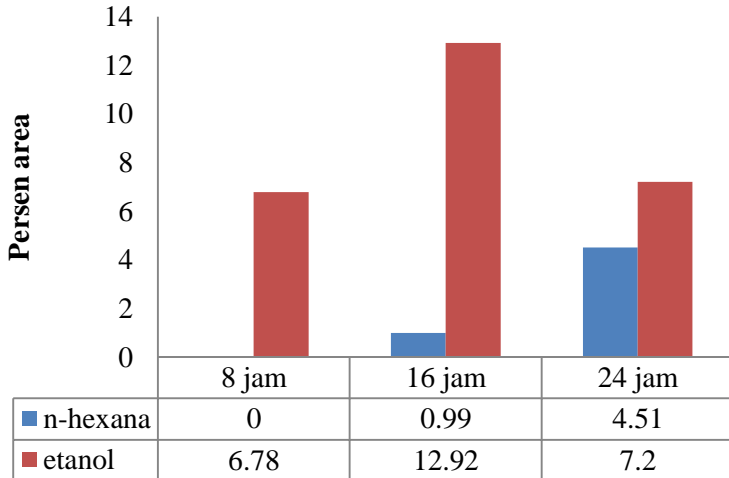
Berdasarkan hasil analisis melalui KG-SM, diduga l-mentol berada pada puncak pertama dengan waktu retensi sebesar 12.933 menit. Persen l-mentol yang terbentuk sebesar 12.92% sedangkan l-mentil asetat berada pada puncak ke-dua dengan waktu retensi sebesar 14.833. Fragmentasi l-mentol ditunjukkan melalui spectra masa, yaitu 40, 41, 55, 67, 81, 95, 109, 123, 138, dan 141 m/z. mekanisme pola fragmentasi ditunjukkan melalui **gambar 4.6**



Gambar 4.6 Pola fragmentasi l-mentol

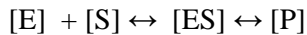
Kemudian dibuat grafik hubungan antara lama waktu reaksi pada berbagai pelarut terhadap persen l-mentol yang terbentuk. Grafik ditunjukkan melalui **gambar 4.7**

Grafik hubungan %l-mentol dan lama reaksi



Gambar 4.7 Hubungan %l-mentol dan lama reaksi

Berdasarkan data tersebut, dapat dilihat bahwa persen l-mentol dalam pelarut n-hexana yang diperoleh dari jam ke 8 sampai ke 24 mengalami peningkatan. Sedangkan pada pelarut etanol, persen l-mentol mengalami peningkatan dari jam ke-8 sampai jam ke-16. Akan tetapi setelah jam ke-16, persen l-mentol mengalami penurunan pada jam ke-24. Terjadinya penurunan kemungkinan disebabkan karena beberapa penyebab. Tidak semua reaksi akan menghasilkan produk yang *irreversible*, kemungkinan yang terjadi adalah transformasi produk akan kembali membentuk substrat. Dengan kata lain kemungkinan terjadi reaksi *reversible* yaitu reaksi yang berlangsung bolak balik yang mengacu pada persamaan di bawah ini:



Diduga setelah waktu optimum jam ke-16, enzim akan mengarahkan ke pembentukan substrat. Sehingga setelah l-mentil asetat mengalami reaksi hidrolisis menjadi l-mentol, l-mentol akan mengalami esterifikasi dengan melepaskan gugus -OH menghasilkan ester kembali.

Hal ini juga berkaitan dengan kerja enzim lipase yang tidak hanya dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis tapi juga reaksi

esterifikasi. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Anggita, 2017), persen l-mentol meningkat seiring dengan lamanya reaksi hidrolisis. Hal ini disebabkan karena kontak antar enzim dengan substrat semakin lama, sehingga interaksi akan berjalan semakin optimal.

4.1.3 Pengaruh kepolaran pelarut terhadap reaksi hidrolisis

Reaksi hidrolisis l-mentil asetat melibatkan pelarut organik serta larutan akuos. Enzim yang digunakan termasuk dalam enzim lipase, enzim tersebut lebih aktif saat direkaskna dalam pelarut air-organik dibandingkan larutan homogen. Pada reaksi tersebut dilakukan penambahan larutan Na_2CO_3 sebagai penyedia air pada reaksi hidrolisis. Reaksi hidrolisis dilakukan pada jam ke-16 dengan temperatur 50°C . Hasil reaksi hidrolisis ditunjukkan melalui **tabel 4.1**.

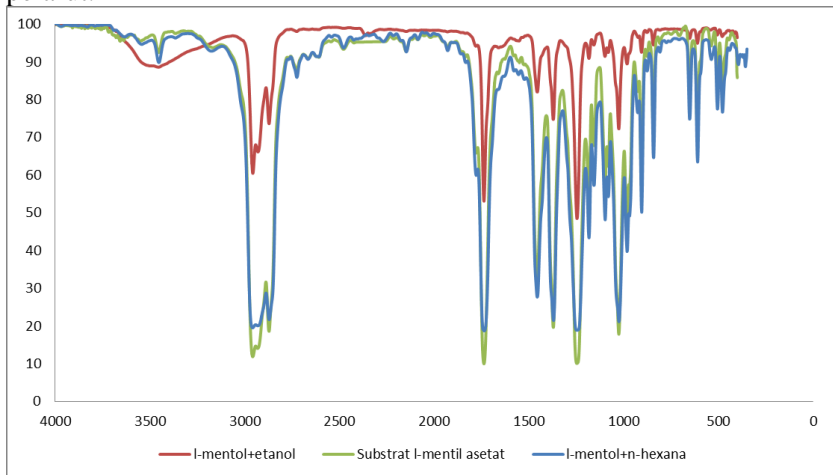
Tabel 4.1 Hasil reaksi hidrolisis dengan variasi pelarut pada jam ke 16

Pelarut	n-hexana	Etanol
Polaritas (ϵ_r)	1.89	24.3
%l-mentol	0.99	12.92
%l-mentil asetat yang belum bereaksi	97.61	86.24
%slektivitas	41,42	93,89

Pada reaksi hidrolisis l-mentil asetat, pemilihan jenis pelarut memegang peranan penting dalam berlangsungnya reaksi. Karena reaksi tersebut melibatkan enzim lipase maka harus diketahui bahwa lipase lebih aktif saat direaksikan dalam pelarut air-organik dibandingkan larutan homogen. Penggunaan pelarut organik memiliki beberapa alasan di antaranya adalah kesetimbangan termodinamik mengarahkan pada pembentukan produk, eliminasi reaksi samping, peningkatan dan stabilitas termal enzim pada kondisi yang ekstrim. Pada pelarut organik konformasi enzim lebih rigid. Sehingga mudah untuk mengontrol sifat katalitik enzim [27]. Berdasarkan hasil hidrolisis yang disajikan di atas, dapat diketahui

bahwa perbedaan polaritas pelarut mempengaruhi persen l-mentol yang dihasilkan. Pelarut n-hexana merupakan pelarut organik nonpolar dengan polaritas sebesar 1.89 (ϵ_r), persen l-mentol yang dihasilkan dari pelarut n-hexana yaitu 0.99%. Sedangkan etanol merupakan pelarut organik polar dengan polaritas sebesar 24.3 (ϵ_r), dengan persen area sebesar 12.92%. Hal ini didukung pada lampiran C.3. Persen selektivitas dengan pelarut etanol menunjukkan hasil yang tinggi yaitu 93,89% sedangkan pada pelarut n-hexana persen selektivitas yang diperoleh adalah 41, 42%.

Pengaruh kepolaran pelarut juga didukung dengan *overlay* melalui data IR seperti yang tertera pada **gambar 4.8**. berdasarkan gambar tersebut nampak serapan pada bilangan gelombang 3631.1 cm^{-1} yang diduga mengandung gugus $-\text{OH}$. Gugus $-\text{OH}$ pada hasil reaksi hidrolisis dalam pelarut etanol memiliki intensitas yang lebih tinggi dibandingkan pelarut n-hexana. Intensitas gugus $-\text{OH}$ semakin berkurang dengan meningkatnya kepolaran pelarut.

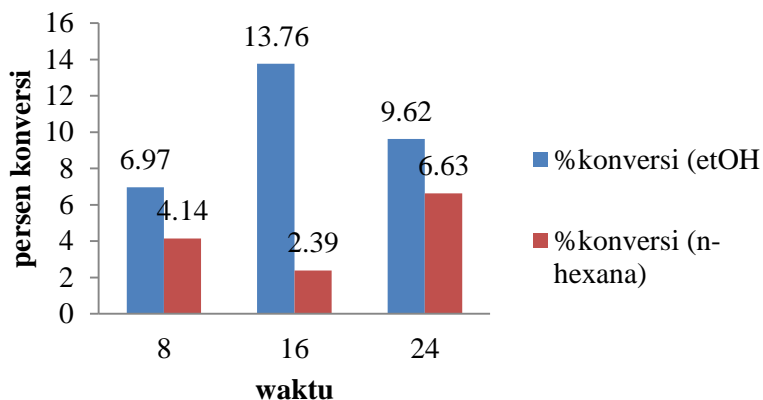


Gambar 4. 8 Overlay Spektra FT-IR Produk l-mentol dengan plarut n-hexana dan etanol pada jam ke-24

Kemudian dibuat grafik hubungan %konversi yang ditunjukkan pada **gambar 4.9**. Berdasarkan grafik tersebut dapat dilihat bahwa konversi terbaik diperoleh pada pelarut etanol di mana l-mentil asetat telah terkonversi sebanyak 13.76%. selektivitas enzim untuk mengarahkan ke arah pembentukan produk tinggi yaitu

93.09%. Menurut Croeteau [7] kelarutan substrat l-mentil asetat kurang baik dalam pelarut n-hexana. Sehingga reaksi hidrolisis dengan melibatkan pelarut tersebut menghasilkan konversi yang rendah. Sedangkan pelarut yang lebih polar menghasilkan konversi yang lebih tinggi [7]. Hal ini bisa jadi karena kelarutannya dalam substrat baik, sehingga interaksi antara ligan dengan makromolekul menjadi lebih mudah untuk terjadi selain itu, stabilitasnya enzim dalam pelarut organik polar lebih baik karena membentuk ikatan hidrogen.

Hubungan Persen Konversi dan Waktu pada 2 Jenis Pelarut



Gambar 4.9 Grafik hubungan persen konversi pada berbagai jam

Pelarut n-hexana merupakan pelarut hidrofobik dengan konstanta dielektrik 1.89 (ϵ_r). Pelarut organik hidrofobik adalah senyawa yang mengalami penolakan oleh partikel air. Sehingga reaksi hidrolisis untuk menghasilkan l-mentol kurang dapat berjalan secara optimal. Sedangkan pelarut etanol adalah pelarut hidrofilik, pelarut tersebut mengalami ketertarikan terhadap molekul air. Substrat l-mentil asetat larut dalam alkohol. Selain itu, pelarut etanol dapat menyumbangkan elektron bebas dari O nukleofil untuk berikatan dengan karbokation.

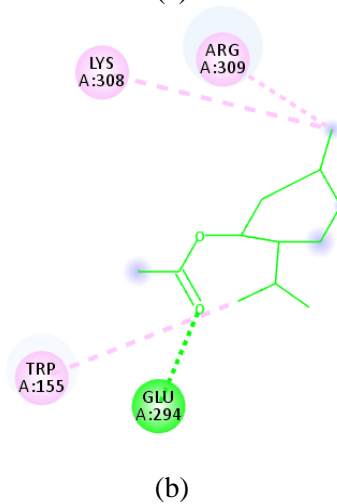
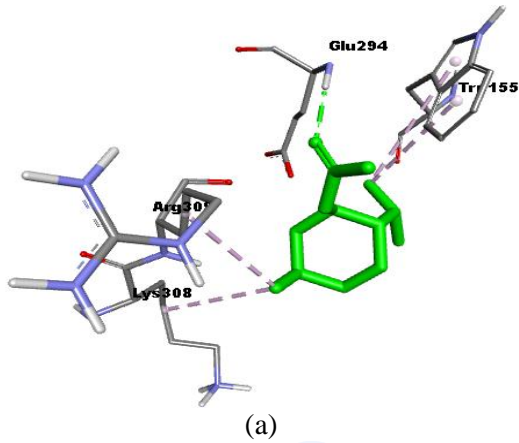
Penambahan larutan Na_2CO_3 memiliki peranan dalam berlangsungnya reaksi hidrolisis. Larutan Na_2CO_3 mampu menyediakan air dan meningkatkan aktivitas enzimatis. Di mana

senyawa yang telah bereaksi dengan Na_2CO_3 membentuk garam, sehingga lebih mudah larut dan produk yang diinginkan terekstraksi dari fasa air menuju fasa organik Keberadaan air pada reaksi hidrolisis berperan penting pada jalannya reaksi. Molekul air yang berikatan pada molekul protein berperan pada konformasi enzim dalam pelarut organik yang berinteraksi melalui ikatan hidrogen [10]. Selain itu, enzim memerlukan air untuk berikatan dengan permukaan enzim untuk memperlihatkan adanya konformasi fleksibilitas dan aktivitas enzim.

4.2 Analisis hasil uji *in silico*

Interaksi antara senyawa ligan dengan makromolekulnya dianalisis dengan metode *docking*, dimana *docking* dapat memodelkan penghambatan protein dengan menggunakan sisi aktif protein. Ligan yang digunakan meliputi senyawa l-mentil asetat, l-mentol, n-hexana, etanol dan air. Ligan diperoleh dari *chemspider.com*. Kemudian dilakukan optimasi struktur geometri pada masing – masing ligan menggunakan aplikasi *HyperChem*. Optimasi bertujuan untuk memperoleh konformasi struktur ligan yang paling stabil. Kemudian dilakukan preparasi makromolekul *Candida antarctica* lipase B (CALB) yang diawali dengan pengunduhan molekul tersebut di *pdb.org* dalam bentuk 3D dengan kode akses 4ZV7. Makromolekul perlu dioptimasi untuk menghilangkan ligan dan air yang terkandung dalam makromolekul. Sehingga tidak dapat mempengaruhi interaksi antara makromolekul dengan ligan. Optimasi dilakukan dengan menggunakan *Discovery Studio Visualizer 2016*.

Docking dilakukan pada sisi aktif enzim lipase dari makromolekul *Candida antarctica* lipase B. Berdasarkan Toddler, [10] sisi aktif *Candida antarctica* lipase B adalah Ser, His, Asp/Glu. Setelah dilakukan proses *docking* akan diperoleh *output* berupa *pose* dan *score*. Dari *score* dapat diperoleh delta G yang digunakan untuk menghitung konstanta disosiasi. Sedangkan pada *ouput pose* dapat diketahui interaksi terbaik antara ligan dengan residu asam amino dari makromolekul yang digunakan. Melalui uji *in silico* diperoleh visualisasi interaksi antara ligan l-mentil asetat dengan makromolekul CALB yang ditunjukkan melalui **gambar 4.10** .



Gambar 4.10. (a) Interaksi ligan 1-mentil asetat dengan makromolekul CALB secara 3 dimensi dan (b) Interaksi ligan 1-mentil asetat dengan makromolekul CALB secara 2 dimensi

Ligan 1-mentil asetat berinteraksi dengan sisi aktif makromolekul CALB. Residu asam amino Glu294 yang berikatan dengan ligan 1-mentil asetat terjadi melalui ikatan hidrogen. Selain terjadinya interaksi antara ligan 1-mentil asetat dengan makromolekul CALB, uji *in silico* juga berperan dalam memodelkan interaksi yang terlibat

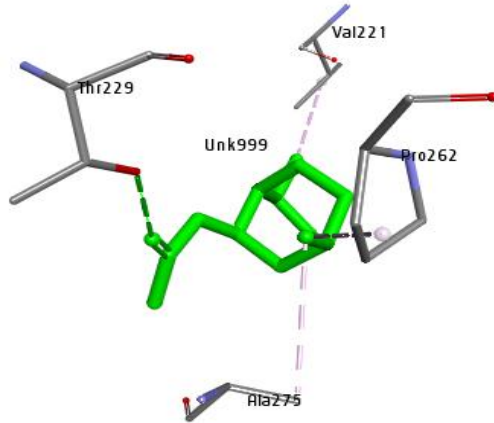
antara makromolekul dengan multiligan. Ligan yang berperan dalam interaksi ini adalah ligan l-mentil asetat dan l-mentol. Interaksi antara multiligan terhadap makromolekul CALB bertujuan untuk mengetahui seberapa besar nilai konstanta disosiasi (K_d) dari masing – masing ligan terhadap makromolekul. Sehingga dapat diperkirakan seberapa kuat interaksi yang berlangsung.

Interaksi antara ligan l-mentil asetat dan l-mentol terhadap makromolekul CALB ditunjukkan melalui **gambar 4.11**. Berdasarkan hasil *docking* yang telah dilakukan, dapat dilihat bahwa masing – masing ligan berinteraksi dengan residu asam amino makromolekul yang dapat divisualisasikan melalui **gambar 4.12** .

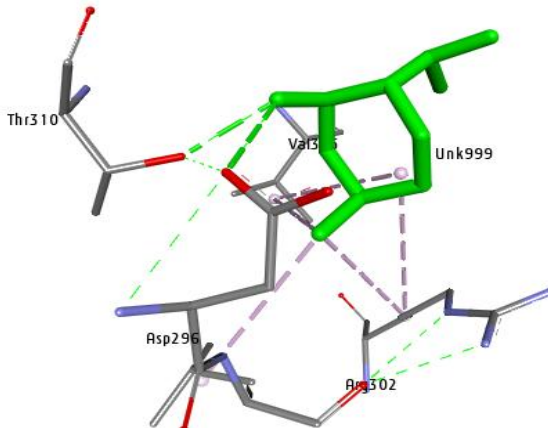


Gambar 4.11. Interaksi multiligan dengan makromolekul CALB

Kemudian diamati interaksi antara ligan l-mentil asetat terhadap makromolekul yang ditunjukkan melalui **Gambar 4.12**.



Gambar 4.12 Interaksi l-mentil asetat dengan makromolekul CALB
 Pada gambar tersebut, menunjukkan adanya ineteraksi antara ligan l-mentil asetat dengan residu asam amino Thr229 yang terberntuk melalui ikatan hidrogen. Kemudian pada **gambar 4.13** ditunjukkan adanya interaksi anatar makromolekul dan ligan l-mentol. Interaksi berlangsung antara residu asam amino Asp296 dan Thr130 melalui ikatan hidrogen.



Gambar 4.13 Interaksi l-mentol dengan residu asam amino makromolekul CALB

Hasil *multiple docking* menunjukkan nilai ΔG° pada masing – masing interaksi. ΔG° digunakan untuk menghitung nilai konstanta disosiasi pada masing – masing ligan yang ditunjukkan pada tabel **tabel 4.2**. Berdasarkan hasil *docking* tersebut, maka dipilih model konformasi yang paling stabil. Kestabilan senyawa kompleks secara termodinamika dinyatakan melalui besar kecilnya tetapan disosiasi, K_d . Semakin kecil nilai K_d pada interaksi senyawa kompleks maka semakin kecil pula senyawa tersebut untuk terdisosiasi, maka senyawa kompleks akan semakin stabil. Dari nilai tersebut, dapat diketahui bahwa K_d dari ligan l-mentil asetat sebesar 1.097, sedangkan nilai K_d pada ligan l-mentol sebesar 1.102 (**tabel 4.2**). Nilai K_d pada ligan l-mentol lebih besar daripada ligan l-mentil asetat. Semakin besar nilai K_d maka interaksi yang terjadi antara ligan dengan makromolekul semakin lemah. Sehingga l-mentol lebih mudah lepas dari sisi aktif enzim dan berikatan dengan ligan lain dibandingkan dengan l-mentil asetat yang memiliki nilai K_d lebih rendah.

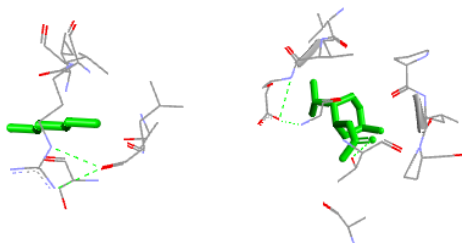
Tabel 4.2 Nilai ΔG° dan K_d masing – masing ligan

Ligan	Total Energi	K_d
l-mentil asetat	-57.986	1.097
l-mentol	-62.4603	1.102

Hidrolisis enzimatis tidak hanya melibatkan air tapi juga pelarut organik. Makromolekul CALB memiliki 2 alfa-heliks di sekitar sisi aktif, yang di namakan alfa-5 dan alfa-10. Daerah tersebut merupakan daerah yang fleksibel dan dapat bekerja sebagai penutup lipase melalui gerakan relatif yang dapat ditingkatkan melalui kerja dari pelarut organik [28]. Hal ini disebabkan karena pelarut organik bekerja lebih baik pada reaksi yang melibatkan biokatalis. Selain itu gerakan heliks, pada media air tidak cukup besar [28]. Untuk mengetahui pengaruh pelarut terhadap reaksi hidrolisis l-mentil asetat, maka dilakukan uji *in silico*. Pelarut yang digunakan merupakan pelarut organik non-polar (n-hexana) dan pelarut polar (etanol).

Interaksi antara pelarut n-hexana, l-mentil asetat dan makromolekul CALB ditunjukkan melalui **gambar 4.14**. Hasil *docking* tidak hanya memvisualisasikan interaksi, tapi juga energi

yang digunakan selama interaksi berlangsung, data energi n-hexana, l-mentil asetat dan makromolekul CALB ditunjukkan pada **table 4.3**

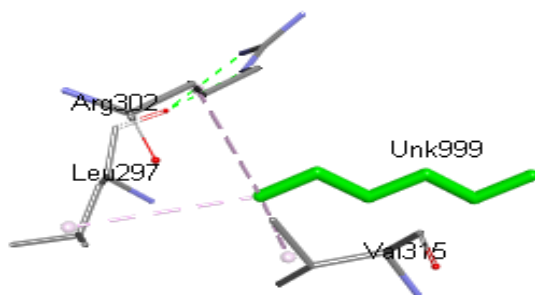


Gambar 4.14 Interaksi l-mentil asetat dan n-hexana terhadap makromolekul CALB

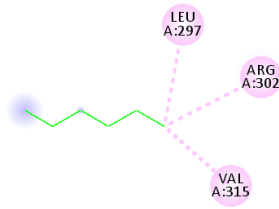
Tabel 4.3 Tabel data energi n-hexana, l-mentil asetat dan makromolekul CALB

Ligan	Energi total	VDW	Ikatan H
CALB-n-hexana	-37.2078	-37.2078	0
CALB-air	-9.32014	-9.32014	0
CALB-l-mentil_asetat	-57.1934	-51.1934	-6

Berdasarkan interaksi pada **gambar 4.14**, maka dapat divisualisasikan bagaimana interaksi antara n-hexana dan l-mentil asetat terhadap residu asam amino yang terlibat **gambar 4.15** dan **gambar 4.16**



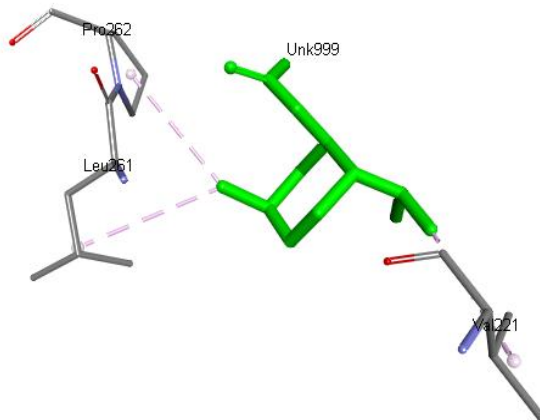
(a)



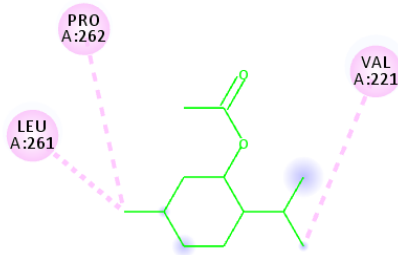
(b)

Gambar 4.15 (a) Interaksi n-hexana dengan makromolekul CALB 3D dan (b) Interaksi n-hexana dengan residu asam amino makromolekul CALB 2D

Berdasarkan hasil uji *in silico* yang ditunjukkan melalui **gambar 4.15**, interaksi antara residu asam amino dan n-hexana tidak menunjukkan adanya ikatan hidrogen yang terlibat. Hal ini juga berlaku pada interaksi antara l-mentil asetat dan residu asam amino yang ditunjukkan pada **gambar 4.16** dimana tidak terlihat adanya ikatan hidrogen yang terbentuk antara residu asam amino dengan atom O pada l-mentil asetat.



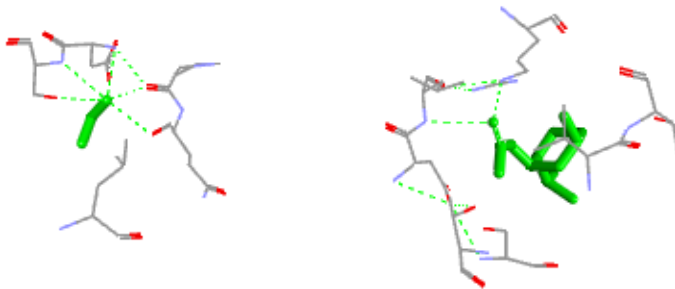
(a)



(b)

Gambar 4.16. (a) Interaksi l-mentil asetat dengan makromolekul CALB 3D dan (b) Interaksi l-mentil asetat dengan residu asam amino makromolekul CALB 2D

Kemudian dilakukan uji *in silico* untuk mengetahui interaksi antara etanol, l-mentil asetat dan makromolekul CALB yang ditunjukkan pada **gambar 4.17**.



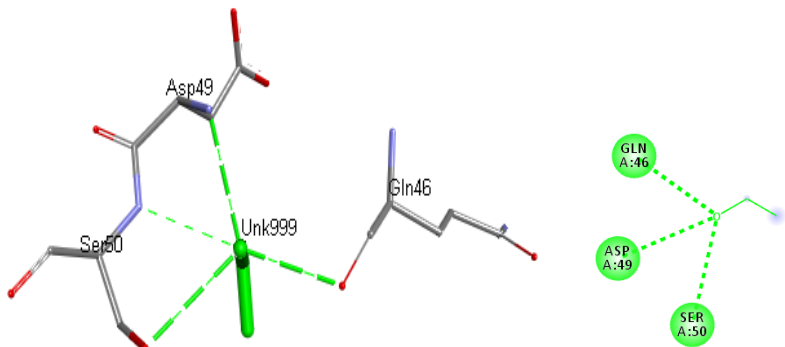
Gambar 4.17 Interaksi antara etanol, l-mentil asetat dan makromolekul CALB

Output berupa data energi interaksi antara etanol, substrat l-mentil asetat dan makromolekul CALB ditunjukkan melalui **tabel 4.4**. berdasarkan data tersebut dapat dilihat adanya ikatan hidrogen antara makromolekul dengan etanol sebesar -17.426 ,dan makromolekul dengan substrat l-mentil asetat sebesar -9.1207

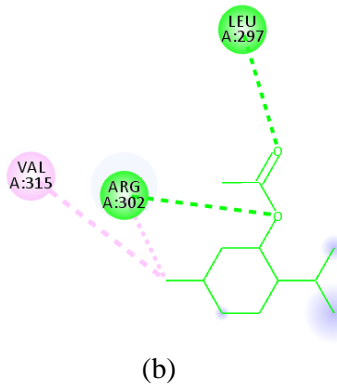
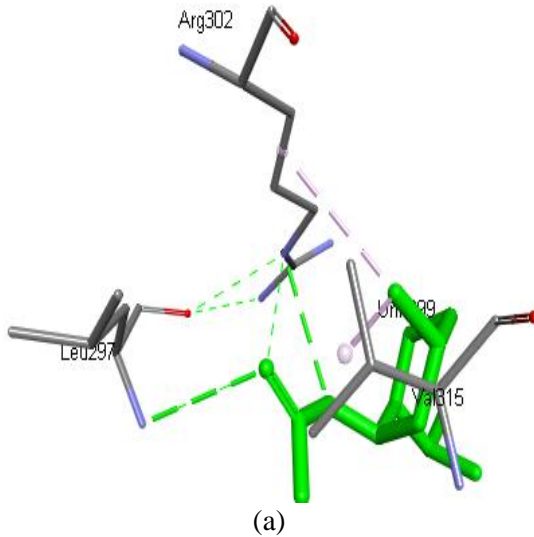
Tabel 4.4 Tabel data energi n-hexana, l-mentil asetat dan makromolekul CALB

Ligan	Energi total	VDW	Ikatan H
CALB-air	-9.32024	-9.32024	0
CALB-etanol	-32.465	-15.0386	-17.4264
CALB1-l-mentil_asetat	-58.1097	-48.9892	-9.12047

Berdasarkan **gambar 4.17** diketahui interaksi antar masing – masing ligan dengan makromolekul yang ditunjukkan pada **gambar 4.18 dan 4.19**



Gambar 4.18 Interaksi antara etanol dengan residu asam amino CALB secara 3D dan 2D



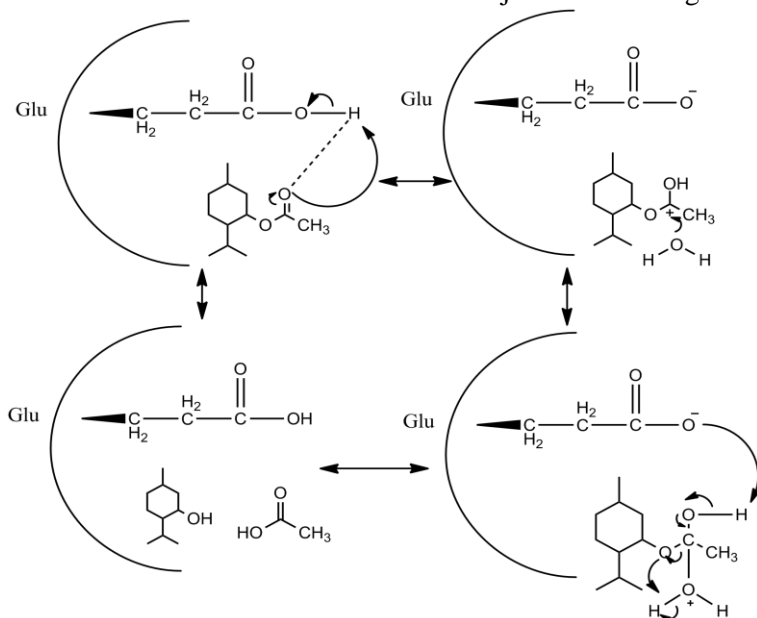
Gambar 4.19 Interaksi antara l-mentil asetat dengan residu asam amino CALB

Berdasarkan **gambar 4.18** hasil *docking* di atas, terjadi interaksi antara l-mentil asetat maupun etanol terhadap residu asam amino dari makromolekul CALB. Interaksi terjadi antara residu asam amino yang dikenal memberikan sisi katalitik enzim yaitu Gln46, Ser50, dan Asp49. Interaksi tersebut terbentuk melalui ikatan hydrogen. Interaksi yang terjadi antara l-mentil asetat dengan etanol terbentuk dari residu asam amino Leu297 dengan atom O pada l-

mentil asetat. Residu asam amino Leu297 berikatan dengan atom O melalui ikatan hidrogen.

4.3 Tinjauan analisis mekanisme reaksi enzimatik berdasarkan uji *in silico*

Setelah dilakukan uji *in silico* antara ligan-ligan dengan makromolekul, maka dapat dilakukan dugaan mekanisme interaksi antara molekul tersebut. Mekanisme reaksi antara ligan 1-mentil asetat dan residu asam amino CALB ditunjukkan melalui gambar



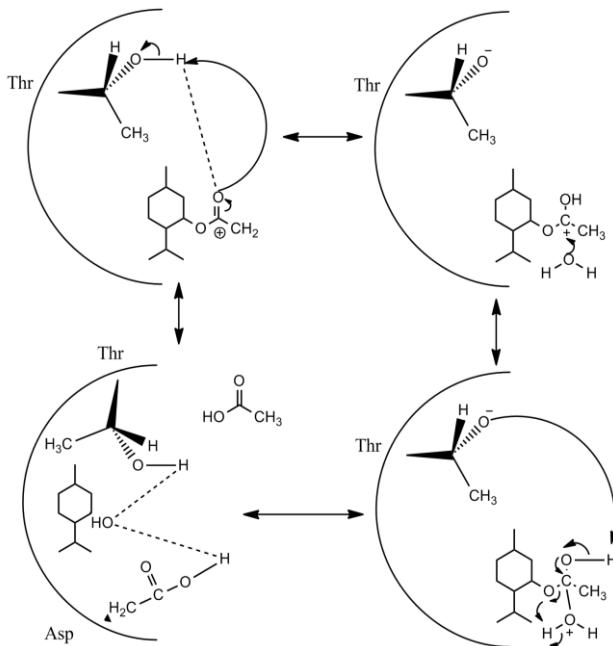
Gambar 4.20 Mekanisme 1-mentil asetat dan residu asam amino Glu294

Mekanisme reaksi di atas mengacu pada hasil uji *in silico* pada **gambar 4.10**. berdasarkan mekanisme tersebut terlihat adanya interaksi hydrogen antara ligan dan residu asam amino. Ikatan hidrogen merupakan ikatan yang lemah jika dibandingkan dengan ikatan ion maupun kovalen.. namun demikian, ikatan hydrogen berperan penting dalam mempelajari desain interaksi molecular. Ikatan hydrogen terbentuk dari interaksi elektrostatis antara atom H yang terikat pada atom yang memiliki keelektronegatifan tinggi dengan atom yang memiliki keelektronegatifan tinggi lainnya. Dalam

hal ini, ikatan hydrogen terjadi secara intermolekuler di mana ikatan terbentuk antara molekul yang berbeda.

Residu asam amino Glu294 mengandung gugus R yaitu $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$ yang bermuatan negatif dan bersifat asam. Atom H yang terikat pada gugus tersebut akan berikatan dengan gugus atom O pada l-mentil asetat melalui ikatan hidrogen. Kemudian atom C asetat mengalami karbokation sehingga memerlukan atom O dari air agar bermuatan netral. Kemudian senyawa l-mentol dan asam asetat hasil hidrolisis lepas bersamaan dengan terbentuknya residu Glu kembali. Berdasarkan dugaan tersebut, dapat digambarkan mekanisme antara ligan l-mentil asetat dan residu asam amino Glu294.

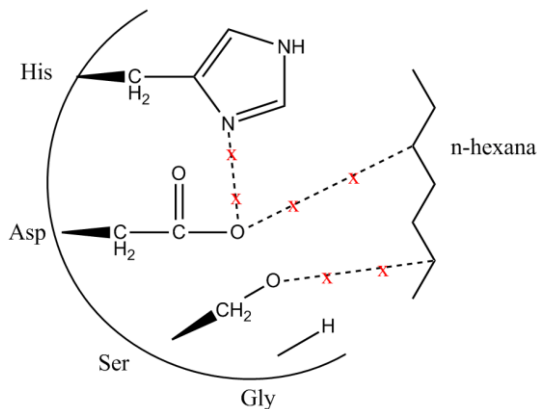
Setelah dilakukan uji *in silico* antara ligan l-mentil asetat dan l-mentol terhadap makromolekul CALB yang ditunjukkan pada **gambar 4.11**, maka dibuat dugaan mekanisme yang terjadi yang dapat dilihat melalui **gambar 4.21**



Gambar 4.21 Tinjauan mekanisme reaksi antara ligan l-mentil asetat, l-mentol dan makromolekul CALB

Berdasarkan dugaan mekanisme reaksi pada **gambar 4.21**, dapat dilihat bahwa reaksi diawali dengan pengikatan atom O dari l-mentil asetat dengan atom H dari residu asam amino Thr 229 melalui ikatan hidrogen. Residu asam amino Thr 229 merupakan asam amino hidroksi alifatik. Dengan gugus R polar yang tidak bermuatan. Kemudian l-mentol dan asam asetat akan terlepas beserta dengan kembali terbentuknya residu asam amino Thr 229. Ligan l-mentol berikatan dengan residu asam amino Thr dan Asp melalui ikatan hydrogen. Di mana atom O pada l-mentol berikatan dengan atom H dari Thr dan Asp.

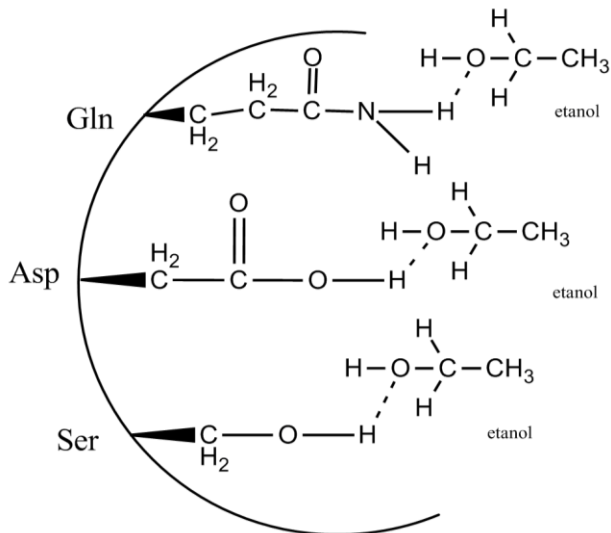
Kemudian untuk mengetahui pengaruh pelarut terhadap interaksi antara makromolekul dengan ligan l-mentil asetat, maka telah dilakukan *docking* pada **gambar 4.14 dan gambar 4.17**. Menurut Davis [29] hidrolisis ester sangat dipengaruhi oleh pelarut dan dengan adanya pelarut tersebut kemungkinan dapat meningkatkan enansioselektivitas. Berdasarkan uji *in silico* tersebut, maka dibuat dugaan mekanisme reaksi yang terjadi yang dapat dilihat pada **gambar 4.22**:



Gambar 4.22 Tinjauan mekanisme reaksi antara pelarut n-hexana dengan residu asam amino makromolekul CALB

Pada interaksi antara pelarut n-hexana dengan substrat l-mentil asetat dan makromolekul, tidak terlihat adanya ikatan hidrogen yang terbentuk antara residu asam amino dan substrat. Hal ini kemungkinan disebabkan karena n-hexana merupakan pelarut organik non-polar yang bersifat hidrofobik. Sedangkan substrat l-mentil asetat lebih larut dalam pelarut hidrofilik. Sehingga substrat

tidak mudah larut dalam pelarut n-hexana. Hal ini kemungkinan menyebabkan pelarut n-hexana sulit berinteraksi dengan sisi katalitik enzim. Sehingga enzim tidak dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis dengan optimal. Hal ini juga didukung oleh penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Bevilaqua [12], di mana kelarutan substrat l-mentil asetat rendah jika dilarutkan pada pelarut non-polar seperti n-hexana.



Gambar 4.23 Tinjauan mekanisme reaksi antara pelarut n-hexana dengan residu asam amino makromolekul CALB

Sedangkan dari **gambar 4.22** menunjukkan adanya interaksi antara residu-residu asam amino terhadap pelarut etanol melalui ikatan hidrogen. Residu asam amino Gln46, Ser50, dan Asp49 dikenal sebagai residu asam amino yang memberikan sisi katalitik terhadap enzim. Residu asam amino Gln46 (Glutamin) merupakan asam amino amida yang mengandung gugus R polar tak bermuatan yaitu NH_2 . Atom H dari NH_2 akan berikatan dengan atom O dari etanol. Sedangkan gugus Asp memiliki gugus R yang bermuatan negative yaitu $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$. Atom H akan berikatan dengan atom O dari etanol membentuk ikatan hidrogen O-H. Hal ini juga berlaku pada Ser dimana atom H dari gugus $-\text{OH}$ akan berikatan dengan atom O dari etanol membentuk ikatan hidrogen. Berdasarkan

mekanisme pada **Gambar 4.22** dan **Gambar 4.23** dapat diamati bahwa pelarut etanol memberikan peranan penting pada hidrolisis l-mentil asetat. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Sharma [27] pada umumnya pelarut yang hidrofilik memiliki interaksi yang baik dengan molekul enzim. Enzim menunjukkan laju katalitik yang baik pada larutan akuos Hal ini kemungkinan disebabkan karena pelarut polar dapat membentuk lingkungan hidrofilik yang mendukung reaksi hidrolisis. Alkohol tersier kebanyakan digunakan sebagai pelarut [29]. l-mentil asetat merupakan senyawa yang dapat larut dalam pelarut polar.

Berdasarkan mekanisme tersebut, dapat dijelaskan mengapa pelarut n-hexana memberikan persen l-mentol yang lebih sedikit dibandingkan saat direaksikan dengan pelarut etanol.