

Biotransformasi Enzimatis Asam Oleat Menggunakan Lipase dari *Aspergillus oryzae* dan Pendekatan Mekanisme Reaksi Melalui Metode *Molecular Docking*

SKRIPSI

Oleh:

**RANA NUR AZIZAH
165090201111030**



**JURSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2020**



Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya



Biotransformasi Enzimatis Asam Oleat Menggunakan Lipase dari *Aspergillus oryzae* dan Pendekatan Mekanisme Reaksi Melalui Metode *Molecular Docking*

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Oleh:

RANA NUR AZIZAH
165090201111030



JURSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG

2020

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Biotransformasi Enzimatis Asam Oleat Menggunakan Lipase
dari *Aspergillus oryzae* dan Pendekatan Mekanisme Reaksi
Melalui Metode *Molecular Docking***

Oleh:

**RANA NUR AZIZAH
165090201111030**

Setelah diseminarkan di depan Majelis Peguji
pada tanggal 01 Juli 2020
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I

Dr. Elvina Dhiaul ifitah, S.Si, M.Si
NIP. 197204191997022001

Pembimbing II

Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si, M.Kes
NIP. 197203262002122001

Mengetahui,
Dekan Jurusan Kimia Fakultas MIPA
Universitas Brawijaya



Masruri, S.Si, M.Si, Ph.D
NIP.197310202002121001



LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rana Nur Azizah

NIM : 165090201111030

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul:

Biotransformasi Enzimatis Asam Oleat Menggunakan Lipase dari *Aspergillus oryzae* dan Pendekatan Mekanisme Reaksi Melalui Metode *Molecular Docking*

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,
Yang menyatakan,

Rana Nur Azizah
165090201111030

Biotransformasi Enzimatis Asam Oleat Menggunakan Lipase dari *Aspergillus oryzae* dan Pendekatan Mekanisme Reaksi Melalui Metode *Molecular Docking*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui produk reaksi biotransformasi enzimatis *free* lipase dari *Aspergillus oryzae* terhadap Asam oleat dan mengusulkan mekanisme reaksi enzimatis dengan metode *molecular docking*. Biotransformasi enzimatis dilakukan dengan metode konvensional dan metode radiasi sinar *microwave*. Produk biotransformasi dikarakterisasi dengan GC-MS. Hasil karakterisasi produk biotransformasi menunjukkan adanya senyawa Etil dodekanoat pada metode konvensional dengan variasi waktu 12 jam. Berdasarkan hasil yang diperoleh, diperkirakan telah terjadi reaksi β -oksidasi dalam biotransformasi enzimatis. Mekanisme reaksi dengan Etil dodekanoat sebagai intermediet diprediksikan mengacu pada jurnal An, dkk (2013). Untuk menentukan jalur mekanisme reaksi terbaik dilakukan perbandingan antara dua jalur mekanisme reaksi melalui pendekatan dengan metode *molecular docking*. *Molecular docking* memberikan nilai energi ikat, konstanta inhibisi dan RMSD dari penambatan. Reseptor yang digunakan yaitu lipase dari *Aspergillus oryzae* dengan kode 5XK2. Sedangkan struktur ligan yang digunakan adalah senyawa Asam oleat sebagai reaktan, dan berturut-turut senyawa Asam 10-hidroksistearat, Asam 4-hidroksidodekanoat, Etil dodekanoat dan Etil 4-hidroksidodekanoat, masing-masing sebagai senyawa intermediet produk utama yang diharapkan, yaitu γ -dodekalakton. Hasil perhitungan Etil dodekanoat sebagai intermediet pertama yang terbaik dengan energi ikat sebesar -4.02 kca/mol dan konstanta inhibisi sebesar 1.12 μ M jika dibandingkan dengan ligan lain. Sehingga mekanisme reaksi dapat diprediksikan. Jalur mekanisme reaksi hasil biotransformasi sebagai berikut: Asam oleat - Etil dodekanoat - Etil 4-hidroksidodekanoat – γ -dodekalakton.

Kata kunci: Biotransformasi enzimatis, Asam oleat, *Aspergillus oryzae*, *Molecular docking*

Biotransformation Enzymatic of Oleic Acid Using Lipase Enzymes from *Aspergillus oryzae* and the Reaction Mechanism Approach Through the *Molecular Docking* Method

ABSTRACT

This research to determine the product of enzymatic biotransformation free lipase from *Aspergillus oryzae* against Oleic acid and propose an enzymatic reaction mechanism by molecular docking method. Enzymatic biotransformation was carried out with conventional methods and microwave radiation methods. Biotransformation products are characterized by GC-MS. The results of the characterization of biotransformation products showed the presence of Ethyl dodecanoate compound in conventional methods with a 12 hour time variation. Based on the results obtained, it is estimated that there has been a β -oxidation reaction in enzymatic biotransformation. Interaction of reactions with Ethyl dodecanoate as an intermediary predicted decision in the journal An, et al (2013). To determine the reaction path that is best done between the reaction pathways by the molecular docking method. Molecular docking provides binding energy value, inhibition constant and RMSD from tethering. The receptor used is the lipase from *Aspergillus oryzae* with the code 5XK2. While the structure of the ligand used is Oleic acid as a reactant, and 10-hydroxystearic acid, 4-hydroxidodecanoic acid, Ethyl dodecanoic and 4-hydroxidodecanoic ethyl respectively, respectively as intermediates for the main expected product, γ -dodecalactone. The result of the calculation of Ethyl dodecanoate as the best first intermediate with binding energy of -4.02 kca / mol and inhibition constituents of 1.12 μ M when compared with other ligands. So the reaction mechanism can be predicted. The following pathway mechanism for biotransformation results as follows: Oleic acid - Ethyl dodecanoate - Ethyl 4-hydroxidodecanoate - γ -dodecalactone.

Keywords: Enzymatic biotransformation, Oleic acid, *Aspergillus oryzae*, molecular docking

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, Puji syukur saya panjatkan kehadiran Allah SWT atas nikmat, karunia, dan rahmat-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **Biotransformasi Enzimatis Asam Oleat Menggunakan Lipase dari *Aspergillus oryzae* dan Pendekatan Mekanisme Reaksi Melalui Metode *Molecular Docking***. Skripsi ini sebagai salah satu syarat mendapatkan gelar sajana sains dalam bidang kimia. Penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan banyak pihak sehingga dapat terususun dan tersusun dan terselesaikan dengan baik. Penulis ingin menyampaikan terimakasih sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Dr. Elvina Dhiaul iftitah, S.Si, M.Si, sebagai pembimbing I dan Ibu Dr. Arie Srihardyastutie, S.Si, M.Kes sebagai pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, saran, ilmu dan perhatian selama penyusunan skripsi ini.
2. Bapak Moh. Farid Rahman, S.Si., M.Si, sebagai peninjau dalam seminar proposal dan seminar kemajuan yang telah memberikan saran.
3. Bapak Masruri, S.Si, M.Si, Ph.D, selaku Ketua Jurusan Kimia dan segenap staf pengajar Jurusan Kimia atas ilmu dan bimbingan yang telah diberikan.
4. Orang tua, adik dan keluarga besar penulis yang selalu memberikan dukungan dan doa untuk menyelesaikan skripsi ini.
5. Sahabat penulis Salsabila Intan Savitri, Aulia Novitasari, Alma Miranda, Alyaa Farrah Dibha, Firsta Luthfiani Salsabila, Bigram Refsilangi, dan Nuril Fadilla yang selalu memberi semangat, hiburan, dan dukungan kepada penulis.
6. Teman-teman seperjuangan angkatan 2016 yang selalu mendukung penulis.

Penulis menyadari skripsi ini masih jauh dari kata sempurna baik dari segi penulisan maupun penyusunan. Penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari pembaca agar dapat memberikan manfaat bagi orang lain dikemudian hari.

Malang, Juni 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
BAB I	1
PENDAHULUAN	1
1. 1. Pendahuluan	1
1. 2. Rumusan Masalah	3
1. 3. Batasan Masalah	4
1. 4. Tujuan Penelitian	4
1. 5. Manfaat Penelitian	4
BAB II	5
TNJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Asam Oleat	5
2.2 γ – dodekalakton	5
2.3 Lipase	6
2.4 Biotransformasi	7
2.5 Radiasi Gelombang <i>Microwave</i>	8
2.6 <i>Molecular Docking</i>	9
BAB III	10
METODE PENELITIAN	11
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	11
3.2. Alat dan Bahan	11
3.2.1. Alat	11
3.2.2. Bahan	11
3.3. Tahapan penelitian	11
3.4. Prosedur Kerja	12

3.4.1. Biotransformasi Enzimatis dengan Metode Konvensional

12

3.4.2. Biotransformasi Enzimatis dengan Metode Radiasi Microwave

12

3.4.3. Karakterisasi GC-MS

13

3.4.4. Molecular Docking

13

3.4.4.1. Persiapan reseptor lipase dari *Aspergillus oryzae*

13

3.4.4.2. Penyiapan Ligan

14

3.4.4.3. Validasi Metode Penambatan (*Redocking*)

14

3.4.4.4. Penyiapan Reseptor dan Ligan

14

3.4.4.5. Mengatur Grid Box

15

3.4.4.6. Mengatur Parameter Docking

15

3.4.4.7. Running Docking

15

3.4.4.8. Analisis dan Visualisasi Penambatan Molekul

16

BAB IV

17

PEMBAHASAN

17

4.1 Analisis produk hasil biotransformasi dengan metode konvensional pada variasi waktu 12 jam menggunakan GC-MS

17

4.2 Analisis produk hasil biotransformasi dengan metode radiasi *microwave* pada variasi waktu 30 menit menggunakan GC-MS

17

4.3 Analisis dengan pendekatan *molecular docking* untuk memprediksi jalur mekanisme reaksi

22

4.3.1. Molekular docking terhadap hasil biotransformasi enzimatis dengan metode konvensional

27

4.3.2. *Molecular docking* terhadap biotransformasi berdasarkan jurnal An, dkk., (2013)

29

4.4 Penentuan jalur mekanisme reaksi biotransformasi enzimatis

33

4.4.1. Prediksi jalur mekanisme reaksi biotransformasi Asam oleat berdasarkan hasil *molecular docking*

37

4.4.2. Prediksi jalur mekanisme reaksi biotransformasi Etil dodekanoat berdasarkan hasil *molecular docking*

39

4.4.3. Prediksi jalur mekanisme reaksi biotransformasi Etil 4-hidroksidodekanoat berdasarkan hasil *molecular docking*

42

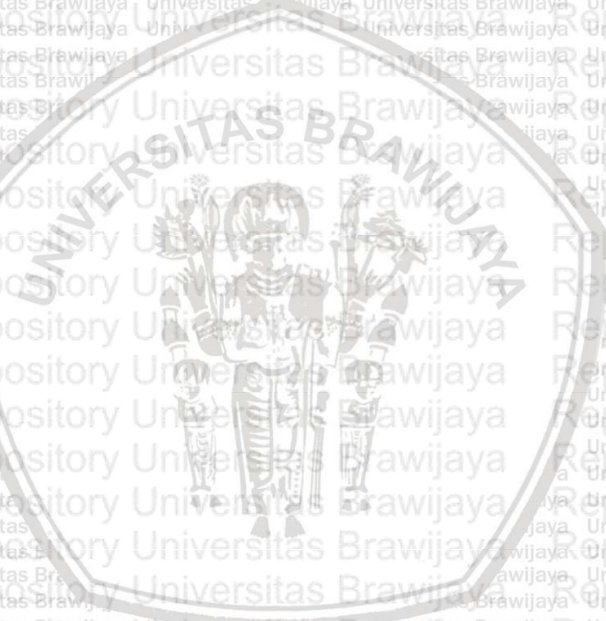
44

**BAB V
PENUTUP**

- 5.1. Kesimpulan
- 5.2. Saran

**DAFTAR PUSTAKA
LAMPIRAN**

47	47	47	47
47	48	49	55



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur Asam oleat	5
Gambar 2.2. Struktur γ -dodekalakton	6
Gambar 2.3. Struktur 3D lipase dari <i>Aspergillus oryzae</i>	6
Gambar 2.4. Proses biotransformasi enzimatis	8
Gambar 4.1. Kromatogram hasil analisis produk biotransformasi dengan metode konvensional pada variasi waktu 12 jam	17
Gambar 4. 2. Spektra masa Etil dodekanoat	20
Gambar 4. 3. Pola fragmentasi Etil dodekanoat pada m/z 88	20
Gambar 4. 4. Pola fragmentasi Etil dodekanoat pada m/z 41	21
Gambar 4. 5. Pola fragmentasi Etil dodekanoat pada m/z 101	21
Gambar 4. 6. Kromatogram hasil analisis produk biotransformasi dengan metode radiasi microwave pada variasi waktu 30 menit	22
Gambar 4. 7. Spektra masa Asam dodekanoat	25
Gambar 4. 8. Pola fragmentasi Asam doekanoat pada m/z 73	25
Gambar 4. 9. Pola fragmentasi Asam dodekanoat pada m/z 41	26
Gambar 4. 10. Pola fragmentasi Asam dodekanoat pada m/z 60	26
Gambar 4. 11. Mekaniseme reaksi hasil biotransformasi dengan metode konvensional	28
Gambar 4. 12. Mekanisme reaksi biotransformasi berdasarkan jurnal An, dkk., (2013)	28
Gambar 4. 13. Reaksi β -oksidasi Asam oleat menjadi Etil dodekanoat	40
Gambar 4. 14. Mekanisme reaksi Reaksi β -oksidasi Asam oleat menjadi Etil dodekanoat	42
Gambar 4. 15. Reaksi hidroksilasi Etil dodekanoat menjadi Etil 4-hidroksidodekanoat	43
Gambar 4. 16. Mekanisme reaksi hidroksilasi Etil dodekanoat menjadi Etil 4-hidroksidodekanoat	44
Gambar 4. 17. Reaksi laktonisasi Etil 4-hidroksidodekanoat menjadi γ -dodekalakton	45
Gambar 4. 18. Mekanisme reaksi reaksi laktonisasi Etil 4-hidroksidodekanoat menjadi γ -dodekalakton	45

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Hasil analisis produk biotransformasi dengan metode konvensional pada variasi waktu 12 jam 18

Tabel 4.2. Hasil analisis produk biotransformasi dengan metode radiasi *microwave* pada variasi waktu 30 menit 23

Tabel 4. 3. Data hasil *molekular docking* mekanisme reaksi hasil biotransformasi enzimatis metode konvensional 29

Tabel 4. 4. Visualisasi hasil *molekular docking* mekanisme reaksi hasil biotransformasi enzimatis metode konvensional 30

Tabel 4.5. Residu asam amino yang berinteraksi pada *molecular docking* terhadap mekanisme reaksi hasil biotransformasi enzimatis metode konvensional 31

Tabel 4.6. Data hasil *molecular docking* terhadap mekanisme reaksi biotransformasi brdasarkan jurnal An, dkk., (2013) 34

Tabel 4.7. Visualisasi hasil *molecular docking* terhadap mekanisme reaksi biotransformasi brdasarkan jurnal An, dkk., (2013) 35

Tabel 4.8. Residu asam amino yang berinteraksi pada *molecular docking* terhadap mekanisme reaksi biotransformasi berdasarkan jurnal An, dkk., (2013) 36

Tabel 4. 9. Hasil data *molecular docking* 38

Tabel 4.10. Hasil GC-MS reaksi biotransformasi enzimatis 40

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Pendahuluan

Flavour merupakan campuran berbagai komponen *volatile* dan *non-volatile* yang memiliki sifat kimia dan kesan yang berbeda-beda. Komponen *volatile* memberikan aroma dan rasa sedangkan komponen *non-volatile* hanya memberikan rasa. Campuran berbagai rasa dan aroma akan memberikan kesan yang khas dari suatu senyawa. Sehingga suatu senyawa dapat dikelompokkan sesuai ciri aromanya [1]. Fungsi utama *flavour* sebagai perasa yang dideteksi oleh indera pengecap untuk memenuhi kebutuhan, kenikmatan dan kesenangan. Proses pengolahan suatu produk pangan akan menghilangkan sebagian *flavour* sehingga untuk meningkatkan ketertarikan pasar dilakukan penambahan *flavour* [1].

Ada beberapa jenis *flavour* yang digunakan dalam dunia perdagangan, khususnya sebagai penambah rasa pada pangan. Yang menjadi fokus utama yaitu *flavour* buatan atau *flavour* sintesis. *Flavour* buatan didapat dari proses kimiawi dengan produk akhir memiliki struktur yang sama dengan *flavour* alami. *Flavour* sintesis diproduksi sebagai alternatif solusi keterbatasan *flavour* alami yang harus diekstrak langsung dari bahan alam. Tetapi pembuatan *flavour* buatan seringkali tidak ramah lingkungan. Untuk itu diperlukan metode pembuatan *flavour* alami dengan bahan yang ramah lingkungan serta tidak membutuhkan biaya yang sangat besar. Alternatif yang disarankan berupa adanya biotransformasi senyawa organik dengan bantuan mikroorganisme atau isolasi enzim [1].

Berbagai macam *flavour* dapat ditemukan di alam dalam bentuk senyawa yang langsung dapat diekstrak dari tumbuhan atau melalui proses pengubahan bentuk. Salah satu *flavour* yang banyak digunakan dalam produk pangan yaitu aroma *fruity*. Di alam, *flavour* alami dengan aroma *fruity* didapatkan dari senyawa lakton [2]. γ -dodekalakton salah satu senyawa lakton yang aromanya meyerupai aprikot, strawberi, mangga dan susu yang digunakan dalam produk pangan, kosmetik, sampai medis [3].

Sumber bahan alami untuk sintesis γ -dodekalakton dapat berasal dari Asam oleat. Sintesis γ -dodekalakton melibatkan dua tahap reaksi yaitu tahap oksidasi dan laktonisasi [2]. Sedangkan menurut An, dkk. (2013) sintesis untuk menghasilkan γ -dodekalakton butuh melalui 3 tahap reaksi yaitu hidroksilasi, β -oksidasi dan laktonisasi [3]. Reaksi biotransformasi dengan menggunakan enzim memiliki banyak kemungkinan jalur yang dilewati. Dari hasil reaksi dapat dilihat produk samping sehingga mekanisme dapat dipetakan.

Di era modern, kebutuhan konsumen sangat tinggi sehingga dibutuhkan metode dan alat yang dapat menghasilkan *yield* yang besar dengan waktu yang cukup singkat. Biotransformasi dengan metode konvensional membutuhkan waktu 24 jam untuk pembuatan media dan 72 jam untuk fermentasi dengan menggunakan rotatory shaker [4]. Penggunaan teknologi *microwave* sekarang menjadi sangat populer di industri kimia karena menghasilkan tingkat konversi dan hasil yang meningkat dalam waktu singkat. Gelombang mikro menyebabkan ion bergerak lebih cepat dan bertubrukan dengan molekul lain sehingga menyebabkan perubahan konformasi protein. Dalam sintesis ester Asam laurat menggunakan Novozym 435, pemanasan ventilasi diperlukan 24 jam sedangkan, reaksi selesai pada hanya 8 menit di bawah sistem *microwave*. Penggunaan *microwave* juga dapat meningkatkan produk konversi [5].

Biotransformasi dengan bantuan enzim banyak melibatkan jalur mekanisme reaksi sampai mendapatkan produk akhir. Dalam memprediksi mekanisme reaksi, hasil karakterisasi dari biotransformasi dengan berbagai variasi menghasilkan banyak senyawa yang dapat ditetapkan sebagai senyawa intermediet menuju produk. Selain itu penentuan jalur mekanisme reaksi dapat dilakukan dengan penambatan molekuler. Interaksi antara sisi aktif enzim dan senyawa penambatnya dapat terlihat dalam pemodelan. Pemodelan ini menjelaskan dari sisi kimia komputasi sehingga model pengikatan reseptor dan ligan dapat terlihat. Hasil penelitian Iftitah, dkk., (2019) telah memprediksi mekanisme reaksi melalui metode *molekular docking* untuk reaksi asilasi (-)-isoulegol dan L-mentol menggunakan enzim lipase dari *Rhizomuchor miehei*. [6]

Pembuatan mekanisme secara teoritis tidak dapat dikatakan valid. Dibutuhkan metode yang lebih valid dengan eksperimen secara *in-vitro* maupun *in-silico* untuk memprediksi mekanismenya. An,

dkk., (2013) telah memetakan jalur mekanisme reaksi biotransformasi Asam oleat menjadi γ -dodekalakton dengan berbagai jenis enzim berdasarkan hasil biotransformasi di laboratorium. Jalur mekanisme ini terdiri dari 3 tahap yaitu hidroksilasi, β -oksidasi dan laktonisasi [3]. Jalur mekanisme reaksi ini dapat berbeda dengan hasil laboratorium lainnya. Untuk mengetahui jalur mekanisme reaksi biotransformasi yang kemungkinannya lebih tinggi, dilakukan perbandingan pendekatan melalui *molecular docking* antara perkiraan mekanisme reaksi hasil biotransformasi penelitian ini dengan mekanisme reaksi dari jurnal tersebut. Interaksi antara senyawa dan enzim akan dijelaskan melalui *molecular docking* ini. Metode ini memprediksi orientasi molekul yang paling stabil dalam pembentukan kompleks antara molekul ligan dengan protein [7].

Dalam memprediksi mekanisme dilakukan perbandingan hasil *molecular docking* antara hasil biotransformasi enzimatik dengan hasil penelitian An, dkk., (2013). Pada jurnal tersebut, gambaran mekanisme reaksi ditunjukkan dengan bahan dasar Asam oleat dengan produk akhir γ -dodekalakton. Reaksi terjadi dalam tiga tahap. Pertama reaksi hidroksilasi Asam oleat menjadi Asam 10-hidroksistearat. Kedua reaksi β -oksidasi menghasilkan Asam 4-hidroksidodekanoat. Dan terakhir reaksi laktonisasi menghasilkan γ -dodekalakton [3]. Asam oleat, Asam 10-hidroksistearat, dan Asam 4-hidroksidodekanoat akan ditambahkan dengan lipase dari *Aspergillus oryzae* dengan kode 5XK2. Sebagai pembanding *molecular docking* dari hasil biotransformasi.

Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan biotransformasi enzimatik Asam oleat menggunakan *free* enzim lipase *Aspergillus oryzae* dengan metode konvensional dan radiasi *microwave* terhadap Asam oleat dan pendekatan mekanisme reaksi melalui metode *molecular docking*. Prediksi mekanisme dilakukan dengan membandingkan hasil *molecular docking* antara hasil biotransformasi enzimatik dengan hasil penelitian An, dkk., (2013).

1.2. Rumusan Masalah

1. Produk apa saja yang terbentuk dari reaksi biotransformasi enzimatik *free* lipase dari *Aspergillus oryzae* terhadap Asam oleat?

2. Bagaimana hasil analisis dengan pendekatan *molecular docking* antara Asam 10-hidroksistearat, Asam 4-hidroksidodekanoat, Etil dodekanoat dan Etil 4-hidroksidodekanoat terhadap enzim *free* lipase dari *Aspergillus oryzae*?
3. Jalur mekanisme reaksi manakah yang memungkinkan dalam proses biotransformasi enzimatis *free* lipase dari *Aspergillus oryzae* terhadap asam oleat?

1. 3. Batasan Masalah

1. Substrat yang digunakan adalah Asam Oleat dari merek T&T Chemical dengan kandungan metil 11-oktadekenoat.
2. Enzim yang digunakan *free* lipase dari *Aspergillus oryzae* dengan aktivitas 100.000 unit/gram.
3. Biotransformasi enzimatis menggunakan metode konvensional dengan alat *incubator shaker* dan radiasi *microwave* dengan alat *microwave* rumah tangga termodifikasi.
4. *Molecular docking* menggunakan software *Autodocktools*, Pubchem (*database* senyawa), PDB (Protein Data Bank) dan *Discovery studio 2.0*.

1. 4. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui produk apa saja yang terbentuk dari reaksi biotransformasi enzimatis *free* lipase dari *Aspergillus oryzae* terhadap Asam oleat.
2. Mengetahui hasil analisis dengan pendekatan *molecular docking* antara Asam oleat dan γ -dodekalakton terhadap enzim *free* lipase dari *Aspergillus oryzae*.
3. Mengetahui jalur mekanisme reaksi yang memungkinkan dalam proses biotransformasi enzimatis *free* lipase dari *Aspergillus oryzae* terhadap Asam oleat.

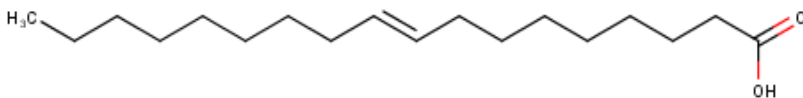
1. 5. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini dapat mengetahui metode terbaik untuk menghasilkan produk biotransformasi γ -dodekalakton dan dapat mengetahui jalur mekanisme reaksinya sehingga dapat digunakan sebagai acuan penelitian selanjutnya.

BAB II TNJAUAN PUSTAKA

2.1 Asam Oleat

Asam oleat atau *cis-9-Octadecenoic acid* merupakan salah satu asam lemak omega 9 tak jenuh yang dapat ditemukan di berbagai sumber hewani dan nabati [8]. Asam oleat memiliki rumus molekul $C_{18}H_{34}O_2$ dengan berat molekul sebesar 282,5 g/mol. Ciri fisik asam oleat yaitu berwujud cairan, berwarna bening hingga kuning pucat dan tidak berbau [9]. Struktur Asam oleat tersaji dalam **Gambar 2.1**.



Gambar 2.1. Struktur Asam oleat

Asam oleat terkandung di hampir semua asam lemak alami. Secara tidak langsung terdapat pada lemak. Sumber Asam oleat terdapat pada minyak zaitun sebanyak 55–80%, 15-20% pada minyak biji anggur, dan 10-40% pada minyak nabati seperti minyak kedelai, minyak kelapa sawit dan minyak jagung [10]. Pengaplikasian Asam oleat dalam bidang farmasi sebagai eksipien dan Asam oleat juga digunakan sebagai zat pengemulsi atau pelarut dalam aerosol [8]. Dalam bidang kesehatan, Asam oleat dapat menghambat perkembangan adrenoleukodystrophy, penyakit fatal yang mempengaruhi otak dan kelenjar adrenal, membantu meningkatkan daya ingat dan mencegah penyakit kardiovaskular [8, 11].

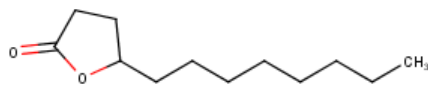
Selain itu, Asam oleat dapat digunakan sebagai *starting material* untuk biotransformasi yang menghasilkan γ -laktone dengan bantuan enzim ataupun mikroorganisme [3, 4].

2.2 γ – dodekalakton

Laktone merupakan salah satu *flavour* penting dalam industri pangan. Penambahan laktone sebagai penambah aroma digunakan dalam makanan, minuman, sampai susu [4]. Laktone memberikan kesan rasa buah, seperti kelapa, mentega, krim, dan manis. Pembentukan laktone terjadi oleh reaksi β -oksidasi asam hidroksil jenuh

dan tidak jenuh atau dari prekursor lipid sampai menghasilkan karbon terhidroksilasi pada posisi C4 atau C5. γ - dan δ - lakton dibentuk melalui reaksi esterifikasi internal (laktonisasi) dari gugus hidroksil C4 (γ) atau C5 (δ) dengan gugus asam karboksilat pada molekul yang sama [2].

Salah satu turunan lakton yaitu γ -lakton. γ -lakton merupakan senyawa yang memiliki rasa yang ada di aprikot, persik, stroberi, nanas, mangga, plum, acerola, dan susu [3]. γ -dodekalakton merupakan salah satu turunan dari γ -lakton yang memiliki rumus molekul $C_{10}H_{18}O_2$ dengan massa molekul 170,25 g/mol [12]. Struktur γ -dodekalakton dapat dilihat pada **Gambar 2.2**.

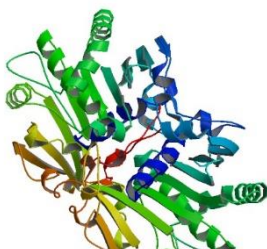


Gambar 2.2. Struktur γ -dodekalakton

Sintesis γ -dodekalakton disintesis dari asam lemak bebas, asam lemak hidroksi, atau minyak dengan beberapa langkah reaksi dengan bantuan enzim atau oksidasi dari mikroorganisme [3].

2.3 Lipase

Lipase (triasilgliserol asilhidrolase) adalah hidrolase serin yang mengkatalisis hidrolisis trigliserida menjadi gliserol dan asam lemak bebas pada fase minyak-air. Lipase memiliki sifat biokatalitik yang digunakan dalam berbagai bidang, diantaranya formulasi detergen, biosenso, industri pangan, sintesis ester, dan pengolahan limbah [13]. Salah satu penghasil enzim lipase yaitu *Aspergillus*



Gambar 2.3. Struktur 3D lipase dari *Aspergillus oryzae*

oryzae. Visualisasi enzim lipase dari *Aspergillus oryzae* dapat dilihat pada **Gambar 2.3**.

Enzim lipase mempunyai suhu optimum dengan kisaran yang besar dan berbeda-beda. Lipase dari *rice bran* (kulit padi) suhu optimum adalah 40°, lipase dari kelapa 35°C, lipase dari biji *sunflower* 35 - 50°C, dan lipase dari biji *Caesalpinia bonducella L* 30°C [14].

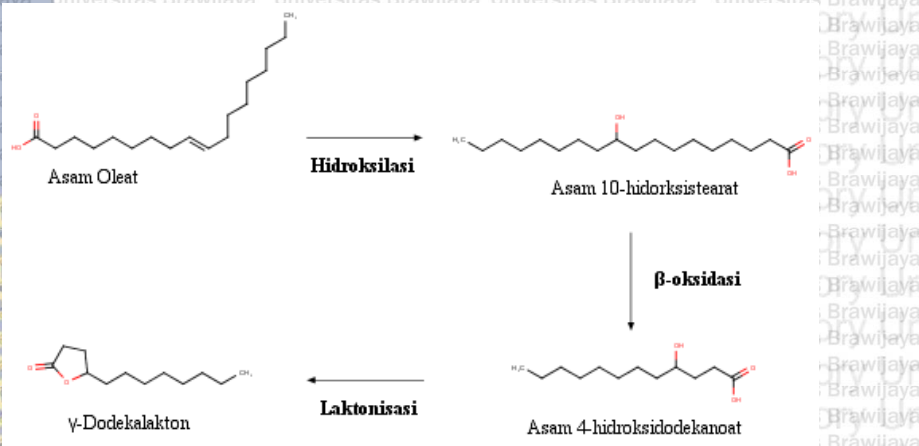
Salah satu jenis enzim yang mempunyai peran penting dalam perkembangan bioteknologi adalah enzim lipase. Enzim ini memiliki sifat khusus yaitu memecahkan ikatan ester pada lemak dan gliserol. Selain itu, enzim lipase mempunyai kemampuan mengkatalis reaksi hidrolisis, alkoholisis, esterifikasi, dan interesterifikasi [15].

2.4 Biotransformasi

Biotransformasi adalah modifikasi struktural dalam suatu bahan kimia senyawa oleh organisme / sistem enzim yang mengarah ke pembentukan molekul dengan polaritas yang relatif lebih besar. Metode ini dapat mengubah struktur rantai karbon tanpa mengubah karakteristik dasar suatu senyawa. Biotransformasi terdiri dari dua jenis yaitu enzimatis dan non-enzimatis [16].

Dalam penelitian ini menggunakan biotransformasi enzimatis. Biotransformasi terjadi karena berbagai enzim hadir dalam lingkungan reaksi dan menyebabkan perubahan yang mempengaruhi senyawa. Reaksi yang terjadi akibat biotransformasi ini digolongkan menjadi oksidasi, reduksi, hidrolisis, isomerisasi, kondensasi, pembentukan ikatan karbon baru, dan pengenalan gugus fungsi [9, 16].

Biotransformasi enzimatis pembentukan γ -dodekalakton terdiri dari dua langkah. Yang pertama yaitu oksidasi asam oleat menjadi asam 10-hidroksistein dan langkah kedua yaitu pembentukan γ -dodekalakton dari asam hidroksi [4].



Gambar 2.4. Proses biotransformasi enzimatis

Gambar 2.4 merupakan proses biotransformasi menurut An, dkk., (2013) yang menggambarkan reaksi biotransformasi enzimatis Asam oleat menjadi γ -dodekalakton dalam tiga langkah reaksi. Asam 10-Hidoksistearat dimetabolisme menjadi Asam 4-hidroksidodekanoat dan Asam setat melalui siklus β -oksidasi. Asam 4-Hidroksidodekanoat dikonversi menjadi γ -dodekalakton oleh laktonisasi, dan asam asetat digunakan untuk sintesis Asam oleat oleh beberapa reaksi asetil koenzim A (asetil-KoA) sintase, asetil-KoA karboksilase, asam lemak sintetase, asam lemak elongase, dan desaturase asam lemak [3].

2.5 Radiasi Gelombang Microwave

Gelombang mikro merupakan gelombang elektromagnetik dengan frekuensi berkisar 300 MHz hingga 300 GHz. Gelombang mikro menghasilkan getaran yang tidak tergantung pada suhu reaksi. *Microwave* mengarah langsung ke sistem reaksi sehingga memberikan hasil yang lebih baik. Reaksi dengan pemakaian *microwave* membutuhkan waktu yang lama [5].

Dalam cara kerjanya, efek termal yang dihasilkan oleh gelombang mikro dapat meningkatkan suhu dengan cepat karena penyerapan energi oleh sample secara efisien [17].

Pada reaksi menggunakan enzim, radiasi gelombang mikro dapat mengubah laju enzim dari reaksi yang dikatalisis. Gelombang menyebabkan ion bergerak lebih cepat dan bertubrukan dengan molekul lain sehingga menyebabkan perubahan konformasi protein [17]. Penggunaan radiasi mikro telah dibuktikan meningkatkan hasil yang lebih baik dibandingkan penggunaan metode konvensional [5].

2.6 Molecular Docking

Docking merupakan metode yang digunakan untuk memprediksi orientasi suatu molekul yang berikatan dengan molekul lain untuk membentuk kompleks. Pendekatan ini digunakan untuk memprediksikan kekuatan afinitas ikatan antara dua molekul. Tujuan utama *molecular docking* agar suatu protein dan ligan dapat mencapai kondisi yang optimal dan relatif sehingga secara keseluruhan energi bebas dalam system diminimalkan [18].

Molecular docking adalah proses yang menempatkan molekul dalam konfigurasi yang sesuai untuk berinteraksi dengan molekul lain. Molekul akan berinteraksi dengan cepat dengan molekul lainnya untuk kompleks yang lebih stabil. *Molecular docking* merupakan salah satu analisis secara *in silico* yang dapat menghasilkan prediksi afinitas, spesifisitas dan selektivitas protein dari informasi strukturnya [18].

Dalam industri, *molecular docking* juga digunakan untuk pendekatan reaksi secara bioremediasi dan penggunaan enzim dan jamur. Metode ini memprediksi kompleks enzim-substrat melalui dua langkah: pertama, oleh konformasi sampel ligan (misalnya asam lemak, tripalmitin, dll) di situs aktif protein, dan kedua dengan mengklasifikasikannya konformasi oleh skor yang menempati peringkat nilai paling negatif di antara semua konformasi yang dihasilkan menunjukkan stabilitas yang lebih besar [19].



(Halaman ini sengaja dikosongkan)

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian dilakukan selama 4 bulan. Dimulai dari bulan Februari 2020 sampai Mei 2020.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu seperangkat alat gelas, bola hisap, pipet *micro*, kertas pH *indicator*, *microwave* modifikasi, shaker, *oven*, *rotary evaporator*, GC-MS, software Autodocktools, Pubchem (*database* senyawa), PDB (Protein Data Bank) dan Discovery studio 2.0.

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu asam oleat. Enzim lipase dari *Aspergillus oryzae*, n-Hexana, Na_2CO_3 , HCl, struktur 3D ligan lipase dari *Aspergillus oryzae* dengan kode 5XK2, Struktur Asam oleat dengan kode PubChem CID 445639, struktur Asam 10-hidroksistearat didapatkan dari Chemspider, struktur Asam 4-hidroksidodekanoat dengan kode PubChem CID 5282900, Etil dodekanoat dengan kode PubChem CID 7800 dan Etil 4-hidroksidodekanoat dengan kode PubChem CID 85822990.

3.3. Tahapan penelitian

1. Biotransformasi Enzimatis Asam oleat dengan Metode Konvensional pada variasi waktu 12 jam
2. Analisis produk hasil biotransformasi dengan metode konvensional pada variasi waktu 12 jam menggunakan GC-MS
3. Biotransformasi Enzimatis Asam oleat dengan metode radiasi *microwave* pada variasi waktu 30 menit

4. Analisis produk hasil biotransformasi dengan metode radiasi *microwave* pada variasi waktu 30 menit menggunakan GC-MS
5. *Molekular docking* terhadap mekanisme reaksi hasil biotransformasi enzimatis
6. *Molekular docking* terhadap mekanisme reaksi biotransformasi berdasarkan jurnal An, dkk., (2013)
7. Prediksi mekanisme reaksi hasil biotransformasi enzimatis

3.4. Prosedur Kerja

3.4.1. Biotransformasi Enzimatis dengan Metode Konvensional

Sebanyak 6 gram Asam oleat ditimbang dan dimasukkan kedalam erlenmayer 100 ml. Selanjutnya ditambahkan 40 ml n-Heksana, dan 5 ml Na_2CO_3 ke dalam erlenmayer 100 ml. Kemudian ditambahkan lipase dari *Aspergillus oryzae* sebanyak 100 μl menggunakan pipet mikro. Campuran larutan diukur pHnya menggunakan kertas pH *indicator*. Kemudian larutan dimasukkan ke dalam *incubator shaker*. Kecepatan yang digunakan rendah sampai sedang. Dilakukan waktu reaksi selama 12 jam dan suhu ruang. Hasil biotransformasi dilakukan *inaktivasi* enzim menggunakan HCl sampai pH 2. Selanjutnya dilakukan pemisahan antara fasa minyak dan fasa airnya. Fasa minyak selanjutnya dipanaskan dalam oven 100°C selama 30 menit. Kemudian dilakukan penguapan untuk menghilangkan pelarut n-Heksana dengan suhu *evaporator* 45°C . Produk biotransformasi dilakukan analisis menggunakan GC-MS.

3.4.2. Biotransformasi Enzimatis dengan Metode Radiasi Microwave

Sebanyak 6 gram Asam oleat ditimbang dan dimasukkan kedalam tabung gelas *microwave* modifikasi. Selanjutnya ditambahkan 40 ml n-Heksana, dan 5 ml Na_2CO_3 ke dalam erlenmayer 100 ml. Kemudian ditambahkan lipase dari *Aspergillus oryzae* sebanyak 100 μl menggunakan pipet mikro. Campuran larutan diukur pHnya menggunakan kertas pH *indicator*. Kemudian *microwave* modifikasi dinyalakan dan diatur kecepatan putaran dan suhunya. Kecepatan yang digunakan rendah sampai sedang. Dilakukan waktu reaksi selama 30 menit dan suhu 40°C . Hasil biotransformasi dilakukan *inaktivasi* enzim menggunakan HCl sampai pH 2. Selanjutnya

dilakukan pemisahan antara fasa minyak dan fasa airnya. Fasa minyak selanjutnya dipanaskan dalam oven 100°C selama 30 menit. Kemudian dilakukan penguapan untuk menghilangkan pelarut n-Heksana dengan suhu *evaporator* 45°C. Produk biotransformasi dilakukan analisis menggunakan GC-MS.

3.4.3. Karakterisasi GC-MS

Produk hasil biotransformasi dilakukan preparasi dengan melarutkan 0,1 ml produk dalam 3 ml n-Heksana. Karakteristik GC-MS yang digunakan sebagai berikut:

Temperatur *injector* : 200°C

Temperatur *detector* : 250°C

Temperatur oven : kenaikan 60°C sampai 200°C/menit, ditahan 10 menit kemudian dilanjutkan dengan kenaikan 20°C/menit

3.4.4. Molecular Docking

Analisis menggunakan alat berupa *software* Autodocktools, Pubchem (*database* senyawa), PDB (Protein Data Bank) dan Discovery studio 2.0.

Bahan yang digunakan yaitu struktur 3D reseptor lipase dari *Aspergillus oryzae* dengan kode 5XK2 yang telah didapatkan dari PDB (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Dan Struktur ligan berupa Asam oleat, Asam 10-hiroksistearat, Asam 4-hidroksidodekanoat, Etil dodekanoat dan Etil 4-hidroksidodekanoat. Struktur Asam oleat dengan kode PubChem CID 445639, struktur Asam 10-hiroksistearat didapatkan dari Chemspider, 4-hidroksidodekanoat dengan kode PubChem CID 5282900, Etil dodekanoat dengan kode PubChem CID 7800 dan Etil 4-hidroksidodekanoat dengan kode PubChem CID 85822990 yang diperoleh dari PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Docking dilakukan dengan persiapan ligan dan target. Kemudian dilakukan docking pada software Autodocktools. Hasil docking divisualisasikan dengan Discovery Studio 2.0. Hasil dari docking disajikan melalui data tabel. Langkah melakukan molecular docking sebagai berikut:

3.4.4.1. Persiapan reseptor lipase dari *Aspergillus oryzae*

Struktur lipase dari *Aspergillus oryzae* diperoleh dari website Protein Data Bank (PDB) <http://www.rcsb.org> yang diunduh dengan

format .pdb. Melalui software Biovia Discovery Studio Visualizer 2.0 dilakukan preparasi pemisahan makromolekul dari molekul yang tidak diperlukan dengan cara tekan ctrl + H. Lipase dari *Aspergillus oryzae* yang masih mengandung molekul air dan tertambat ligan alaminya dihilangkan dari struktur lipase agar tidak menghambat proses penambatan. Hasil pemisahan ini berupa reseptor murni yang disimpan dalam format .pdb (Protein Data Bank).

3.4.4.2. Penyiapan Ligan

Ligan yang digunakan adalah Asam oleat, Asam 10-hiroksisistearat, Asam 4-hidroksidodekanoat, Etil dodekanoat dan Etil 4-hidroksidodekanoat. Struktur Asam 10-hiroksisistearat didapatkan dari Chemspider. Struktur Asam oleat dengan kode PubChem CID 445639, Struktur Asam 4-hidroksidodekanoat dengan kode PubChem CID 5282900, Etil dodekanoat dengan kode PubChem CID 7800 dan Etil 4-hidroksidodekanoat dengan kode PubChem CID 85822990 berupa struktur 3D yang diperoleh dari <http://PubChem.ncbi.nlm.nih.gov> dengan format .sdf dan dikonversikan disimpan hasilnya dalam format .pdb.

3.4.4.3. Validasi Metode Penambatan (*Redocking*)

Validasi metode penambatan molekul dilakukan dengan metode *redocking* adalah menambatkan kembali ligan dengan target senyawa. Validasi ini dilakukan menggunakan perangkat lunak berupa program AutoDockTools (versi 1.5.6), untuk memastikan metode penambatan molekul yang digunakan telah memenuhi persyaratan. Parameter yang digunakan adalah dengan cara melihat nilai RMSD (Root Mean Square Deviation) jika $<2\text{\AA}$ maka dinyatakan valid dan reseptor tersebut bisa digunakan untuk penambatan molekul dengan semakin kecil nilai RMSD menunjukkan posisi ligan *redocking* yang makin mendekati posisi ligan hasil kristalografi [8]

3.4.4.4. Penyiapan Reseptor dan Ligan

Reseptor yang telah dilakukan preparasi dengan cara (File-Read Molecule-Choose Receptor-Open) dan reseptor dioptimasi dengan penambahan atom hidrogen tetapi pada gugus polar saja melalui (Edit-Hydrogens-Add Hydrogens-Polar Only-Ok). Lalu, memasukan ligan dengan memilih (Ligand-Input-Open) sampai ketika ligan muncul kemudian dilakukan pemeriksaan rotasi dengan mengoreksi

kebenaran pada rotasi ligan melalui (Ligand-Torsion Tree-Choose Root), melihat titik rotasi dari ligan melalui (Ligand-Torsion Tree-Detect Root), (Ligand-Torsion Tree-Set number of torsion-Dismiss) untuk nomor active torsions diatur diantara 1-6, dan hasil ligan disimpan berformat .pdbqt (Ligand-Output-Save as PDBQT).

3.4.4.5. Mengatur Grid Box

Pengaturan grid box dilakukan untuk reseptor melalui (Grid-Macromolecule-Choose-Receptor-Select Molecule), hasil dari reseptor ini disimpan berformat .pdbqt. Kemudian, menentukan jenis peta yang dibuat dengan (Grid-Set Map Types-Choose Ligand-Select Ligand), dan mengatur ukuran kotak pencarian ligan sehingga kompleks antara reseptor dan ligan tertambat dengan memasukan titik pencarian pada posisi kotak (x, y, dan z) yang melingkupi daerah dari situs pengikatan pada ligan pada docking pertama gunakan ukuran 126x126x126 dengan posisi center on macromolecule. Sedangkan pada docking kedua dari kompleks gunakan ukuran grid box 40x40x40 dengan posisi center on ligand. Kemudian sipan perubahan dengan cara memilih (File-Close Saving Current). Lalu hasilnya disimpan melalui cara (Grid-Output-Save GPF). Maka diperoleh berformat (.gpf).

3.4.4.6. Mengatur Parameter Docking

Pengaturan parameter docking dengan cara memilih makromolekul berupa reseptor berformat pdbqt dengan membuka (Docking-Macromolecule-Set Rigid Filename-Choose Receptor), memilih ligan berformat pdbqt (Docking-Ligand-Choose-Open Ligand-Accept (using default)), dan mengatur parameter docking sesuai energi yang digunakan (Docking-Search Parameter-Genetic Algorithm-Number of GA Runs-Accept (using default)). Untuk parameter docking yang digunakan (docking –docking parameter –accept). Hasil disimpan dengan cara (Docking-Output-Lamarckian GA 4.2-Save DPF), dan diperoleh berformat (.dpf). Untuk pengaturan parameter .dpf sama seperti pengaturan pada format.gpf

3.4.4.7. Running Docking

Tahapan terakhir running docking dapat dilakukan apabila semua proses sebelumnya telah selesai dengan baik, dengan cara menyalin program AutoDock4 dan AutoGrid4 yang berada pada

AutoDockTools (versi 1.5.6) ke dalam folder kerja yang digunakan untuk menyimpan semua data dari awal hingga akhir. Melalui software berupa program AutoDockTools (versi 1.5.6) maka penambatan molekul dilakukan dengan cara menjalankan program AutoGrid melalui Command Prompt (Cmd) dengan perintah (“Autogrid4.exe -p a.gpf -l a.glg”) tekan enter, kemudian diketik (“Autodock4.exe -p a.dpf -l a.dlg”) tekan enter. Hasil dari running docking berupa file dengan format a.dlg.

3.4.4.8. Analisis dan Visualisasi Penambatan Molekul

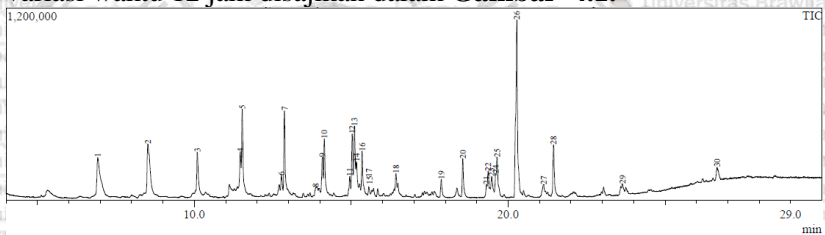
Analisis hasil dengan cara (Analyze-klik Docking-klik Open-klik file format .dlg - klik Open). Lalu, untuk melihat nilai-nilai energy bebas ikatan (FG) atau *binding energy*, konstanta inhibisi prediksi (Ki) atau Inhibition constant dan RMSD (Root Mean Square Deviation). Interaksi ikatan ligan pada reseptor dan residu asam amino yang terlibat pada ligan di visualisasikan dengan software Biovia : Discovery Studio Visualizer untuk melihat ikatan antar ligan pada situs aktif reseptor. *nding energy*. Hasil terbaik dari docking disimpan dalam format kompleks.pdb. Parameter hasil terbaik dilihat dari nilai *binding energy*, Ki dan RMSD.

Nilai Ki yang semakin kecil maka semakin besar afinitas pengikatan untuk menghambat aktivitas suatu enzim. Energi ikat menunjukkan berapa besar kebutuhan energi untuk mengikat antara substrat dan enzim. Semakin kecil nilai energi ikat, maka semakin besar kemungkinan ikatan antara substrat dan enzim [9]. Sedangkan nilai RMSD merupakan nilai yang menjelaskan nilai jarak atom pada satu konformasi dengan atom terdekat yang memiliki tipe sama dengan atom tersebut pada konformasi lain. Semakin kecil nilai RMSD menunjukkan bahwa posisi ligan yang diperkirakan semakin baik karena semakin mendekati konformasi asal. Nilai RMSD < 2 Å menunjukkan bahwa semakin kecil kesalahan dari perhitungan, sehingga dapat dikatakan lebih akurat perhitungannya [20].

BAB IV PEMBAHASAN

4.1 Analisis produk hasil biotransformasi dengan metode konvensional pada variasi waktu 12 jam menggunakan GC-MS

Produk hasil biotransformasi yang telah diuapkan pelarutnya diambil 0.1 ml dan dilarutkan dalam 3 ml n-Heksana untuk dilakukan karakterisasi GC-MS. Hasil kromatografi gas berupa kromatogram dianalisis dengan spektroskopi massa. Sehingga hasil analisis berupa kromatogram dan spectra massa produk biotransformasi yang kemudian diinterpretasikan dalam data tabel. Kromatogram hasil analisis produk biotransformasi dengan metode konvensional pada variasi waktu 12 jam disajikan dalam **Gambar 4.1**.



Gambar 4.1. Kromatogram hasil analisis produk biotransformasi dengan metode konvensional pada variasi waktu 12 jam

Pada kromatogram terdapat 30 peak dan peak ke-26 merupakan *best peak* dengan waktu retensi 20.274 dan %area 17.32. Peak ke 26 berupa senyawa (Z) Asam 9-dodekanoat yang merupakan produk utama dari hasil biotransformasi ini. Produk hasil biotransformasi dengan metode konvensional pada variasi waktu 12 jam ini tidak menghasilkan γ - dodekalakton seperti hasil yang diharapkan. Tidak terbentuknya γ - dodekalakton dikarenakan tidak terjadinya reaksi hidroksilasi sehingga tidak adanya gugus OH yang masuk ke dalam rantai karbon Asam oleat menjadi senyawa hidroksi. Hal ini menyebabkan reaksi tidak dapat berlanjut ke reaksi laktonisasi yang menghasilkan γ - dodekalakton. Rata-rata Produk hasil biotransformasi telah berubah menjadi ester dengan rantai karbon

yang telah memendek. Proses biotransformasi terjadi proses esterifikasi dan pemendekan rantai karbon saja. Produk senyawa hasil biotransformasi enzimatis disajikan selengkapnya dalam **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1. Hasil analisis produk biotransformasi dengan metode konvensional pada variasi waktu 12 jam

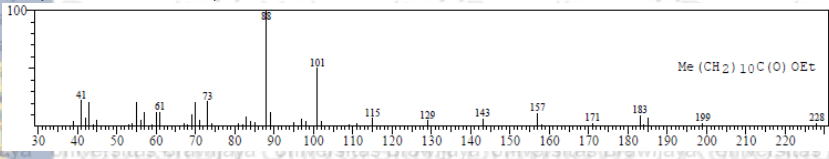
Peak	Waktu Retensi	% Area	Nama Senyawa
1	6.925	6.94	Ethyl Heptanoat
2	8.520	7.69	Ethyl Caprylat
3	10.095	3.24	N-Hexadecane
4	11.464	2.54	Ethyl Decanoate
5	11.526	5.99	N-Tetradecane
6	12.778	1.03	1-Hexadecanol
7	12.871	5.09	N-Pentadecane
8	13.867	1.75	4,5-Dimethyl-1-Phenyl-Hex-4-En-1-One
9	14.078	2.53	Ethyl Dodecanoate
10	14.142	3.95	N-Pentadecane
11	14.953	1.47	1,E-11,Z-13-Octadecatriene
12	15.030	4.52	9-Octadecyn
13	15.104	5.22	Heptadec-8-Ene
14	15.167	2.87	Heptadec-8-Ene
15	15.275	0.93	Diocetadecyl Phosphite
16	15.345	3.69	N-Tetradecane
17	15.560	1.67	Myristylaldehyde
18	16.425	1.25	Ethyl Palmitate
19	17.867	1.25	Methyl Palmitate
20	18.554	2.77	Ethyl Palmitate
21	19.308	0.79	Dodecane-1,12-Diol
22	19.361	1.62	9-Eicosene
23	19.474	2.44	2-Methylenecyclododecanone

Peak	Waktu Retensi	% Area	Nama Senyawa
24	19.600	1.44	Methyl 7,10-Hexadecadienoate
25	19.644	3.30	11-Octadecenoic Acid,
26	20.274	17.32	9-Octadecenoic acid
27	21.129	0.57	Cis-9-Octadecen-1-Ol
28	21.446	3.69	Methyl Ester Of Ricinoleic Acid
29	23.639	1.08	Cis-9-Octadecen-1-Ol
30	26.656	1.36	Cholesta-4,6-Dien-3-Ol, Benzoate

Untuk menentukan produk terbaik yang diambil sebagai intermediet pada reaksi biotransformasi dipilih produk yang sejalan dan semakin mendekati pembentukan produk akhir γ -dodekalakton. Pada metode konvensional, 9-Octadecenoic acid merupakan produk utama. 9-Octadecenoic acid merupakan bentuk Asam oleat dalam bentuk konformasi trans. Terbentunya senyawa ini diperkirakan reaksi belum terjadi sempurna dan keadaan reaksi yang belum optimal. 9-Octadecenoic acid sebagai *major* produk tidak dapat dijadikan intermediet karena masih sangat jauh dari produk yang diharapkan.

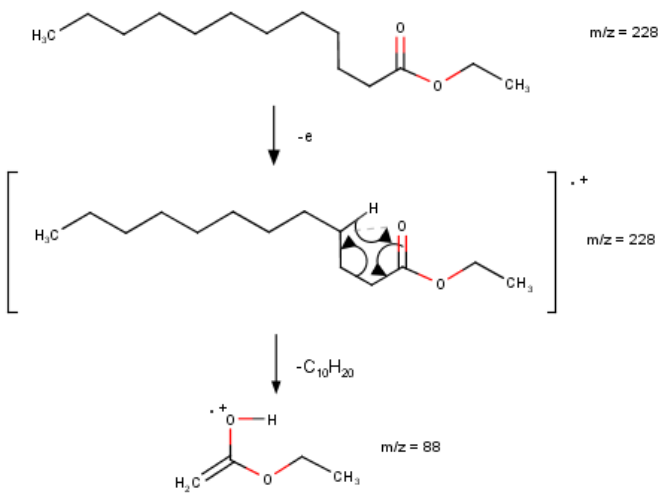
Penentuan intermediet dilihat dari hasil GC-MS menunjukkan adanya Etil dodekanoat pada peak ke-9 dengan waktu retensi 11,464 dan % area 2,54. Adanya senyawa ini menunjukkan bahwa enzim lipase dapat melakukan esterifikasi dan pemendekkan rantai karbon. Menurut Fabood, dkk., (1983) *Aspergillus oryzae* merupakan salah satu enzim yang dapat melakukan reaksi β -oksidasi [21]. Etil dodekanoat merupakan senyawa *minor* dari produk hasil biotransformasi ini. Keberadaannya yang sangat kecil melihatkan Etil dodekanoat sebagai senyawa yang kurang stabil dan cepat berubah bentuk menjadi senyawa lain. Produk Etil dodekanoat yang terbentuk sangat sedikit diperkirakan reaksi belum sempurna. Reaksi biotransformasi dengan metode konvensional masih harus diperhitungkan kembali waktu, suhu serta keadaan reaksi yang mempengaruhi pembentukan produk yang lebih baik dengan *yield* yang besar. Etil dodekanoat sebagai senyawa terbaik yang telah bertransformasi sebagai senyawa yang sejalan dengan mekanisme reaksi dan paling mendekati produk yang diharapkan.

Spekta MS (**Gambar 4.2**) Etil dodekanoat memiliki best peak dengan m/z 88. Kemudian dua peak tertinggi selanjutnya pada m/z 101 dan 41. Pola fragmentasi Etil dodekanoat tersaji pada **Gambar 4.3**, **Gambar 4.4**, dan **Gambar 4.5**.

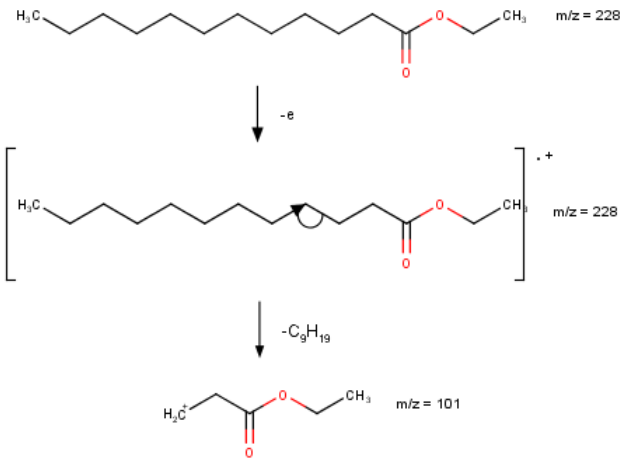


Gambar 4. 2. Spektra masa Etil dodekanoat

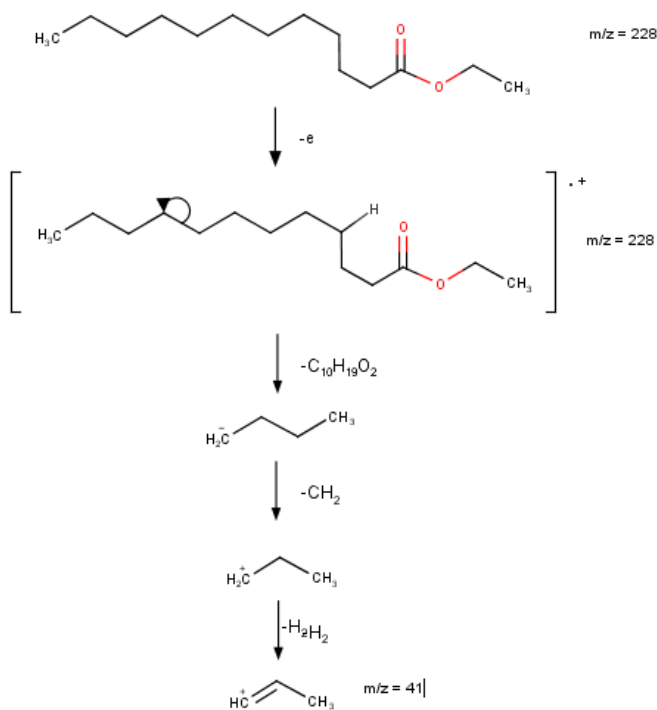
Pola fragmentasi Etil dodekanoat sebagai berikut



Gambar 4. 3. Pola fragmentasi Etil dodekanoat pada m/z 88



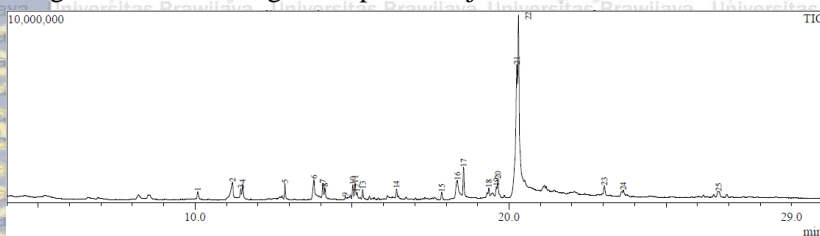
Gambar 4. 4. Pola fragmentasi Etil dodekanoat pada m/z 101



Gambar 4. 5. Pola fragmentasi Etil dodekanoat pada m/z 41

4.2 Analisis produk hasil biotransformasi dengan metode radiasi microwave pada variasi waktu 30 menit menggunakan GC-MS

Produk hasil biotransformasi dianalisis menggunakan GC-MS dan menghasilkan kromatogram seperti disajikan dalam **Gambar 4.6**.



Gambar 4. 6. Kromatogram hasil analisis produk biotransformasi dengan metode radiasi microwave pada variasi waktu 30 menit

Peak ke-22 merupakan *best peak* dengan waktu retensi 20,299 dan %area 33,23. Senyawa pada *peak* ini adalah Ethyl Octadec-9-Enoate atau nama lain dari Asam oleat dengan struktur trans. Sama seperti metode konvensional, dalam produk hasil biotransformasi masih terdapat kandungan asam oleat yang belum beraksi. Produk yang diharapkan terbentuk yaitu γ - dodekalakton juga belum terbentuk. Sama seperti metode konvensional, belum adanya gugus OH yang masuk dalam rantai. Sehingga tidak terbentuknya intermediet yang diharapkan yaitu Asam hidroksi. Belum terbentuknya produk yang diharapkan diperkirakan akibat belum baiknya keadaan reaksi, enzim yang digunakan kurang dioptimasi dan belum tercapainya kesetimbangan reaksi. Menurut Saropah, dkk., (2013) kinetika enzim berkaitan dengan pengukuran laju reaksi enzimatik serta dengan faktor-faktor yang mempengaruhi laju reaksi tersebut. Faktor-faktor yang mempengaruhi laju reaksi enzimatik adalah konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, pH, suhu, dan adanya kofaktor serta ion logam [22]. Faktor-faktor ini harus diperhatikan dipenelitian selanjutnya. Selanjutnya, parameter dalam kinetika reaksi enzimatik lainnya adalah persamaan Michaelis-Menten. Kecepatan reaksi dan kecepatan reaksi maksimum sangat berkaitan dengan substrat. Pada batas kecepatan maksimum (V_{maks}),

enzim menjadi jenuh oleh substratnya, dan tidak dapat berfungsi lebih cepat [23]. Berikut ini merupakan tabel hasil GC-MS produk biotransformasi dengan metode radiasi *microwave* (Tabel 4.2).

Tabel 4.2. Hasil analisis produk biotransformasi dengan metode radiasi *microwave* pada variasi waktu 30 menit

Peak	Waktu Retensi	% Area	Nama Senyawa
1	10.084	1.01	Hexadecane
2	11.191	3.16	Decanoid Acid
3	11.454	1.05	Etil Decanoate
4	11.516	1.78	Hexadecane
5	12.862	1.65	Pentadecane
6	13.786	3.48	Dodecanoic Acid
7	14.068	1.70	Ethyl Pentadecanoate
8	14.133	1.37	N-Pentadecane
9	14.783	0.69	Monotrimethylsilyl Lauric Acid
10	15.022	1.72	9-Octadecyne
11	15.098	1.910	Heptadec-8-Ene
12	15.158	0.75	Heptadec-8-Ene
13	15.339	0.97	N-Pentadecane
14	16.416	1.09	Hexadecanoic Acid Ethyl Ester
15	17.854	0.90	Methyl Hexadecanoate
16	18.349	5.27	9-Octadecenoic Acid
17	18.552	3.74	Hexadecanoic Acid Ethyl Ester
18	19.354	0.85	9-Eicosene
19	19.593	1.03	9,12-Octadecadienoic Acid
20	19.640	2.47	9-Octadecenoic Acid
21	20.246	26.18	Ethyl 9,12-Octadecadienoate
22	20.299	33.23	Ethyl Octadec-9-Enoate
23	23.036	1.19	1,2-Propanediol
24	23.637	1.42	9-Octadecen-1-Ol

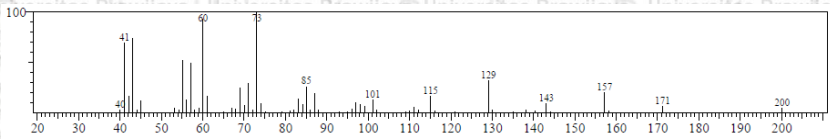
Peak	Waktu Retensi	% Area	Nama Senyawa
25	26.674	1.41	Cholesta-3,5-Diene

Menurut jurnal Khan, dkk., (2018) penggunaan radiasi mikro telah dibuktikan meningkatkan hasil yang lebih baik dibandingkan penggunaan metode konvensional. Contohnya dalam sintesis ester asam laurat menggunakan Novozym 435, pemanasan ventilasi diperlukan 24 jam sedangkan, reaksi selesai pada hanya 8 menit di bawah sistem *microwave*. Penggunaan *microwave* juga dapat meningkatkan produk konversi. Karena gelombang mikro menyebabkan ion bergerak lebih cepat dan bertubrukan dengan molekul lain sehingga menyebabkan perubahan konformasi protein [5]. Namun pada hasil belum didapatkan keunggulan dari hasil senyawa yang lebih baik daripada metode konvensional. Hasil yang didapatkan kedua metode masih cenderung sama. Pada penggunaan *microwave* sipangan suhu dalam mencapai kestabilan dapat mempengaruhi hasil. Pergeseran suhu mengakibatkan perbedaan energi yang dipancarkan. Hal tersebut dapat mempengaruhi proses bioansformasi. Penelitian selanjutnya disarankan untuk menghitung energi yang dihasilkan dari reaksi metode konvensional dengan metode *microwave* dan dilakukan persamaan sebagai batasan masalah.

Penentuan produk terbaik dari hasil GC-MS biotransformasi menggunakan metode radiasi *microwave* berdasarkan senyawa yang sejalan dengan mekanisme reaksi dan paling mendekati produk yang diharapkan. Hasil GC-MS didapatkan asam karboksilat pada *peak* ke-6 berupa Asam dodekanoat. Dibandingkan dengan *peak* yang lain, *peak* ke-6 mendekati jalur mekanisme reaksi. Dari Asam oleat hingga Asam dodekanoat telah terjadi pemendekan rantai hidrokarbon.

Peak ke-22 merupakan *best peak* dengan waktu retensi 20,299 dan %area 33,23. Senyawa pada *peak* ini adalah Ethyl Octadec-9-Enoate atau nama lain dari Asam oleat dengan struktur trans. Kondisi ini sama seperti metode konvensional. Sehingga asam dodekanoat lebih dipilih sebagai produk terbaik. Tetapi kandungan Asam dodekanoat dalam produk sangatlah kecil. Asam dodekanoat senyawa yang kurang stabil dan cepat berubah bentuk menjadi senyawa lain. Produk Etil dodekanoat yang terbentuk sangat sedikit diperkirakan reaksi belum sempurna. Untuk itu perlu dilakukan perhitungan lebih lanjut

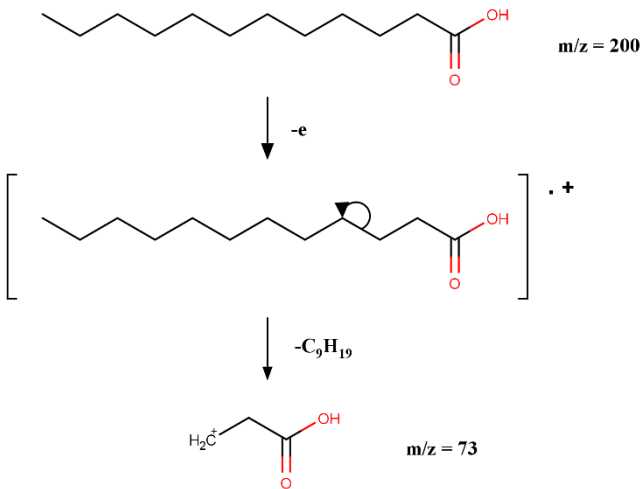
mengenai kinetika reaksi kimia yang berhubungan dengan suhu serta waktu reaksi.



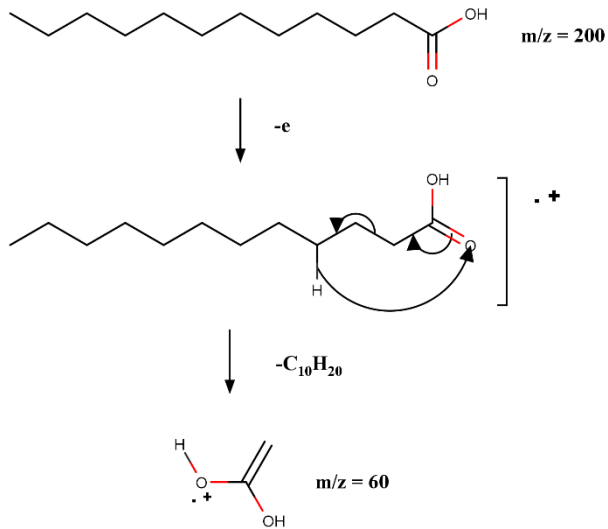
Gambar 4. 7. Spektra masa Asam dodekanoat

Pada spectrum MS senyawa Asam dodekanoat (**Gambar 4.7**), memiliki best peak pada m/z 73. Peak kedua tertinggi pada m/z 60 dan ketiga tertinggi pada m/z 41.

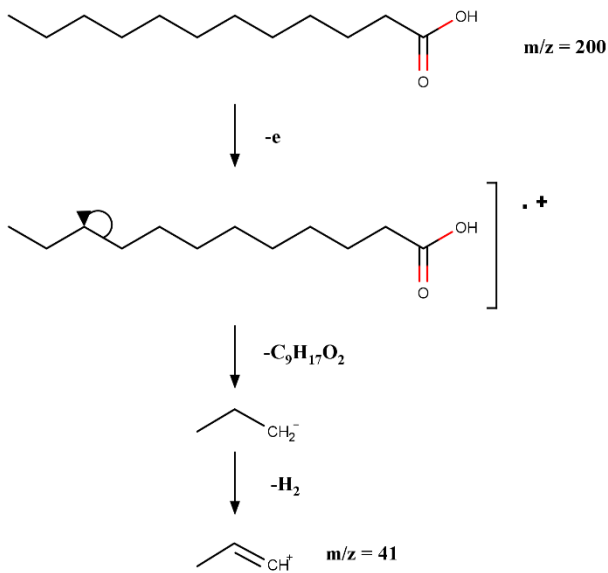
Pola fragmentasi dari Asam dodekanoat tersaji pada **Gambar 4.8**, **Gambar 4.9** dan **Gambar 4.10**.



Gambar 4. 8. Pola fragmentasi Asam doekanoat pada m/z 73



Gambar 4. 9. Pola fragmentasi Asam dodekanoat pada m/z 60



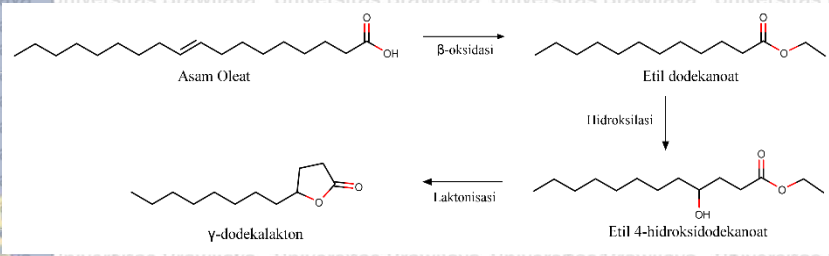
Gambar 4. 10. Pola fragmentasi Asam dodekanoat pada m/z 41

4.3 Analisis dengan pendekatan *molecular docking* untuk memprediksi jalur mekanisme reaksi

Analisis dengan pendekatan *molecular docking* ditunjukkan untuk melihat interaksi antara reseptor lipase dari *Aspergillus oryzae* (5XK2) yang didapatkan dari <https://www.rcsb.org/pdb/home/home>. dengan ligan yang merupakan intermediet dari mekanisme reaksi yang diprediksi maupun mekanisme reaksi yang diharapkan.

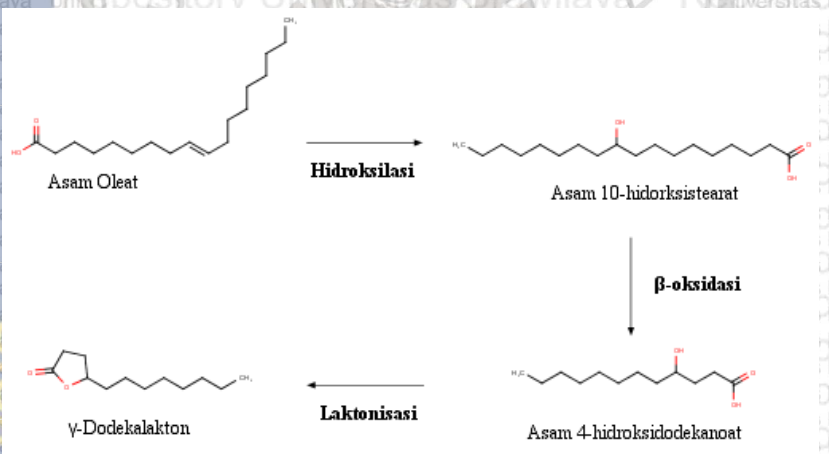
Dari hasil biotransformasi enzimatik dengan metode konvensional dan radiasi *microwave* menghasilkan produk berbeda. Produk terbaik dari metode konvensional yaitu Etil dodekanoat sedangkan produk terbaik dari metode radiasi *microwave* yaitu Asam dodekanoat. Produk konvensional lebih unggul karena telah melalui tahap β -oksidasi dan esterifikasi. Pemendekan rantai pada produk konvensional semakin mendekati produk utama yang diharapkan yaitu γ -dodekalakton. Sehingga hasil produk konvensional ini yaitu Etil dodekanoat dijadikan intermediet pertama pada mekanisme yang diprediksikan disajikan dalam **Gambar 4.11**.

Pembuatam mekanisme reaksi biotransformasi enzimatik pada **Gambar 4.11** mengacu pada tahapan reaksi jurnal An, dkk. (2013). Jurnal An, dkk. (2013) yang tergambar pada **Gambar 4.12** mengusulkan tiga tahapan reaksi yaitu hidroksilasi, β -oksidasi, dan laktonisasi. Reaksi biotransformasi enzimatik Asam oleat menjadi Etil dodekanoat telah melewati tahap β -oksidasi. Berdasarkan tahapan reaksi diatas, tersisa dua tahapan reaksi yaitu hidroksilasi dan laktonisasi. Etil dodekanoat selanjutnya akan mengalami hidroksilasi menjadi Etil 4-hidroksidodekanoat. Dan tahapan terakhir laktonisasi menghasilkan produk γ -dodekalakton. Namun dalam reaksi biotransformasi enzimatik, Etil 4-hidroksidodekanoat dan γ -dodekalakton tidak terdeteksi dalam produk. Adanya Etil 4-hidroksidodekanoat dan γ -dodekalakton dalam mekanisme reaksi maupun analisis dengan pendekatan *molecular docking* sebagai data tambahan untuk memperlengkap penelitian biotransformasi enzimatik ini.



Gambar 4. 11. Mekanisme reaksi hasil biotransformasi dengan metode konvensional

Mekanisme diatas berbeda dengan mekanisme dari jurnal An, dkk., (2013) yang menggambarkan proses biotransformasi enzimatis Asam oleat menjadi γ -dodekalakton. Pada mekanisme reaksi yang diharapkan reaksi pertama yaitu hidroksilasi sehingga intermediet pertamanya adalah Asam 10-hidroksistearat. Kemudian dilanjutkan dengan reaksi β -oksidasi dan laktonisasi seperti pada **Gambar 4.12**.



Gambar 4. 12. Mekanisme reaksi biotransformasi berdasarkan jurnal An, dkk., (2013)

Perbedaan mekanisme reaksi akan dilakukan analisis melalui pendekatan *molecular docking* untuk melihat kemungkinan terbaik

dari interaksi antara lipase dari *Aspergillus oryzae* dengan intermediet dari masing-masing mekanisme reaksi.

4.3.1. Molekular docking terhadap hasil biotransformasi enzimatis dengan metode konvensional

Etil dodekanoat merupakan hasil biotransformasi enzimatis dengan metode konvensional yang dianggap sebagai intermediet pertama. Jalur mekanisme reaksi yang terbentuk yaitu dengan *starting material* asam oleat terjadi reaksi β -oksidasi menjadi Etil dodekanoat. Kemudian melalui tahap hidroksilasi menghasilkan Etil 4-hidroksidodekanoat dan terjadi laktonisasi dengan produk akhir γ -dodekalakton.

Analisis dengan pendekatan *molecular docking* ditujukan untuk melihat interaksi antara reseptor lipase dari *Aspergillus oryzae* (5XK2) yang didapatkan dari <https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> dengan tiga macam ligan yaitu Asam oleat, Etil dodekanoat dan Etil 4-hidroksidodekanoat.

Hasil analisa dengan pendekatan *molecular docking* menghasilkan interaksi senyawa aktif dan reseptornya dan energi ikat. Data pada **Tabel 4.3** merupakan data terbaik nilai hasil analisa *molecular docking* secara berulang (data asli dilampiran).

Tabel 4. 3. Data hasil *molekular docking* mekanisme reaksi hasil biotransformasi enzimatis metode konvensional

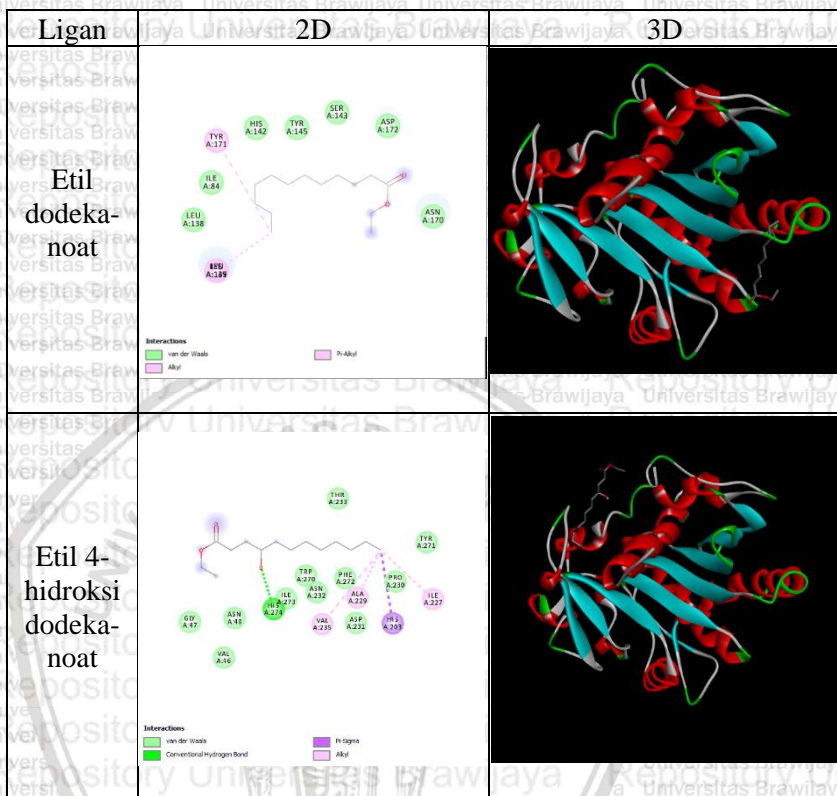
Senyawa	Reseptor	Ki (μ M)	Energi ikat (kcal/mol)	RMSD (\AA)
Asam oleat	Lipase dari <i>Aspergillus</i> <i>oryzae</i> (5XK2)	1.3	-3.94	1.28
Etil dodekanoat		1.12	-4.02	1.6
Etil 4- hidroksidodekanoat		1.18	-3.99	1.57

Hasil *molecular docking*, nilai RMSD yang dihasilkan sudah kurang dari 2 \AA . Nilai ini menunjukkan nilai yang menjelaskan nilai jarak atom pada satu konformasi dengan atom terdekat yang memiliki

tipe sama dengan atom tersebut pada konformasi lain. Semakin kecil nilai RMSD menunjukkan bahwa posisi ligan yang diperkirakan semakin baik karena semakin mendekati konformasi asal. Nilai $RMSD < 2 \text{ \AA}$ menunjukkan bahwa semakin kecil kesalahan dari perhitungan, sehingga dapat dikatakan lebih akurat perhitungannya [20]. Hasil analisa melalui *molecular docking* antara lipase dari *Aspergillus oryzae* sebagai ligan dengan Asam oleat, Etil dodekanoat, dan Etil 4-hidroksidodekanoat dapat dikatakan baik. Pada penambatan antara Asam oleat dan enzim lipase (5XK2) memiliki K_i sebesar $1.3 \mu\text{M}$ dan eneri ikat sebesar -3.94 kcal/mol . Penambatan dengan senyawa Etil dodekanoat memiliki K_i sebesar $1.12 \mu\text{M}$ dan energi ikat sebesar -4.02 kcal/mol . Dan penambatan dengan senyawa Etil 4-dodekanoat memiliki K_i sebesar $1.18 \mu\text{M}$, energi ikat sebesar -3.99 kcal/mol . Data di atas dapat dikatakan baik karena nilai Konstanta inhibitor (K_i) adalah gambaran kekuatan substrat dan inhibitor dalam mengikat enzim. Nilai K_i yang semakin kecil maka semakin besar afinitas pengikatan untuk menghambat aktivitas suatu enzim. Energi ikat menunjukkan berapa besar kebutuhan energi untuk menikat antara substrat dan enzim. Semakin kecil nilai energi ikat, maka semakin besar kemungkinan ikatan antara substrat dan enzim [24].

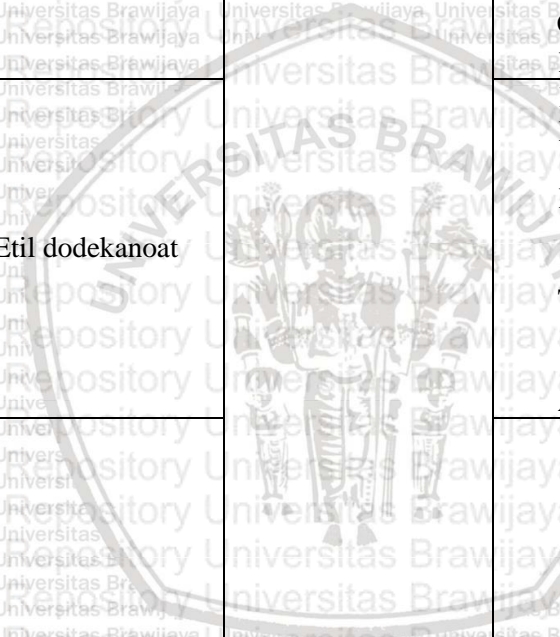
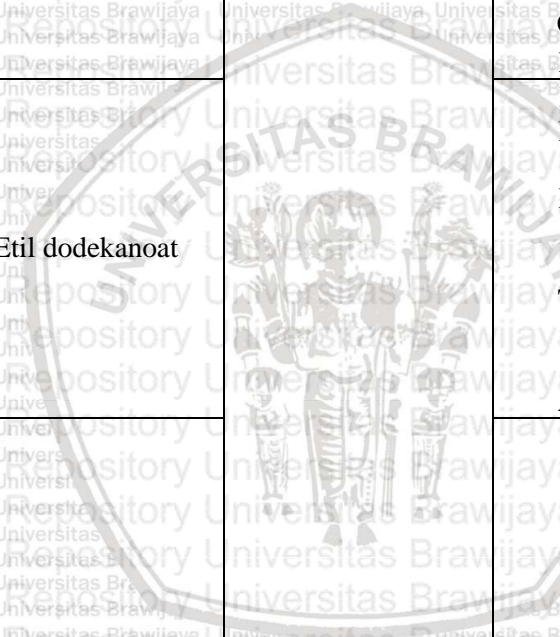
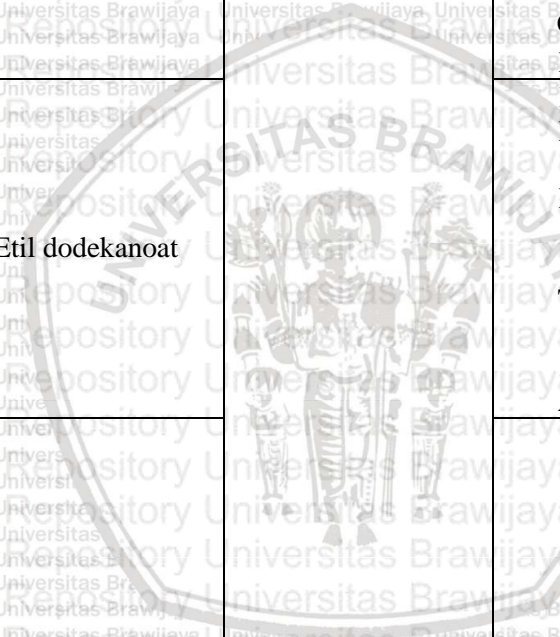
Tabel 4. 4. Visualisasi hasil *molekular docking* mekanisme reaksi hasil biotransformasi enzimatik metode konvensional

Ligan	2D	3D
Asam oleat		



Tabel 4.5. Residu asam amino yang berinteraksi pada *molecular docking* terhadap mekanisme reaksi hasil biotransformasi enzimatis metode konvensional

Senyawa	Reseptor	Residu asam amino yang berinteraksi
Asam oleat	Lipase dari <i>Aspergillus oryzae</i> (5XK2)	THR A:69
		ASP A:70
		THR A:71
		SER A:91
		GLY A:90
		LEU A:154

Senyawa	Reseptor	Residu asam amino yang berinteraksi
		PHE A:120
		TRP A:97
		THR A:102
		PHE A:103
		GLU A:117
		PRO A:104
		GLY A:119
		LEU A:118
		LYS A:149
		LEU A:139
Etil dodekanoat		TYR :171
		LEU A:138
		ILE A:84
		HIS A:142
		TYR A:145
		SER A:143
		ASP A:172
		ASN A:170
		VAL A:46
		GLY A:47
Etil 4-hidroksidodekanoat		ASN A:48
		HIS A:274
		ILE A:273
		TRP A:270
		ASN A:232
		PHE A:272
		VAL A:235
		ASP A:231
		ALA A:229
		THR A:233
32		HIS A:203
		PRO A:230
		ILE A:227
		TYR A:271

Tabel 4.5 menampilkan residu asam amino yang berinteraksi dengan ligan dari setiap penabatan. Setiap penabatan dengan senyawa yang berbeda, memiliki interaksi residu asam amino yang berbeda dengan jumlah yang berbeda. Residu asam amino yang berinteraksi pada penabatan dengan reseptor memiliki ikatan. Pada interaksi dengan asam oleat terjadi Ikatan van der Waals dengan THR A:69, dan ikatan hidrogen dengan ASP A:70 ; THR A:71 ; SER A:91 ; GLY A:90 ; LEU A:154 ; PHE A:120 ; TRP A:97 ; THR A:102 ; PHE A:103 ; GLU A:117 ; PRO A:104 ; GLY A:119 ; LEU A:118. Penabatan dengan Etil dodekanoat memiliki interaksi dengan residu asam amino sebanyak 10 interaksi. Ikatan pi-Alkil terjadi dengan LYS A:149; LEU A:139; TYR :171 dan selebihnya ikatan van der Waals dengan LEU A:138; ILE A:84; HIS A:142; TYR A:145; SER A:143; ASP A:172; ASN A:170. Sedangkan penabatan dengan Etil 4-hidroksidodekanoat menghasilkan 16 interaksi. Ikatan pi-Alkil dengan VAL A:235; ALA A:229; ILE A:227, juga terdapat satu ikatan pi-sigma dengan HIS A:203. Ikatan hydrogen terdapat satu dengan HIS A:274 dan sisanya merupakan ikatan van der Waals dengan VAL A:46; GLY A:47; ASN A:48; ILE A:273; TRP A:270; ASN A:232; PHE A:272; ASP A:231; THR A:233; PRO A:230; TYR A:271.

4.3.2. Molecular docking terhadap biotransformasi berdasarkan jurnal An, dkk., (2013)

Dalam jurnal An, dkk., (2013), mekanisme reaksi dimulai dari *starting material* Asam oleat yang kemudian terhidroksilasi menjadi Asam 10-hidroksistearat. Selanjutnya terjadi reaksi β -oksidasi menjadi Asam 4-hidroksidodekanoat dan reaksi laktonisasi dengan produk akhir γ -dodekalakton.

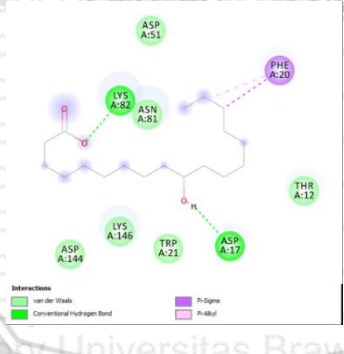

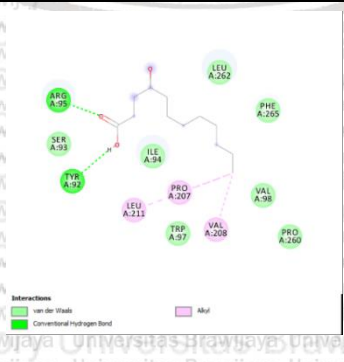



Docking molecular dilakukan dengan penabatan antara reseptor lipase dari *Aspergillus oryzae* (5XK2) yang didapatkan dari <https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> dengan ligan antara lain Asam oleat, Asam 10-hidroksistearat, dan Asam 4-hidroksidodekanoat. Hasil molecular docking berupa Energi ikat (ΔG), Konstanta inhibisi (K_i), dan RMSD yang tersedia dalam **Tabel 4.6**.

Tabel 4.6. Data hasil *molecular docking* terhadap mekanisme reaksi biotransformasi berdasarkan jurnal An, dkk., (2013)

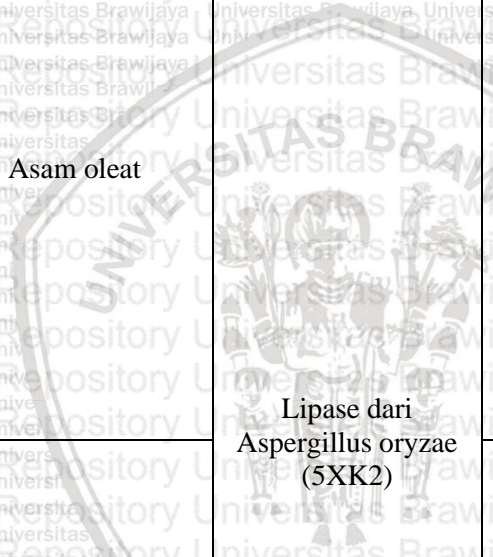
Senyawa	Reseptor	Ki (μM)	Energi ikat (kcal/mol)	RMSD (Å)
Asam oleat	Lipase dari <i>Aspergillus oryzae</i> (5XK2)	1.3	-3.94	1.28
Asam 10-hidroksistearat		16.09	-2.45	1.65
Asam 4-hidroksidodekanoat		1.87	-3.72	1.14

Data hasil *Molecular docking* terhadap mekanisme reaksi biotransformasi berdasarkan jurnal An, dkk., (2013) menghasilkan data yang berbeda khususnya pada penambatan dengan Asam 10-hidroksistearat. Dari hasil penambatan, nilai RMSD dibawah 2Å sehingga lebih akurat dalam perhitungan penambatan. Nilai energi ikat pada Asam oleat dan Asam 4 –hidroksidodekanoat yaitu -3.94 kcal/mol dan -3.72 kcal/mol lebih kecil dari Asam 10-hidroksistearat yaitu -2.45 kcal/mol. Ini menunjukkan penambatan pada Asam oleat dan Asam 4 –hidroksidodekanoat lebih baik sehingga kekuatan ikatan lebih kuat dari Asam 10-hidroksistearat. Pada nilai Konstanta Inhibisi (Ki) dari Asam 10-hidroksistearat sangat besar yaitu 16.09 μM, berbeda jauh dari nilai Ki Asam oleat dan Asam 10-hidroksistearat yang memiliki nilai Ki dikisaran 1, yaitu 1.3 μM dan 1.87 μM. Nilai Ki sendiri menggambarkan kekuatan substrat dan inhibitor dalam mengikat enzim. Dengan nilai Ki yang besar, artinya semakin kecil afinitas pengikatan untuk menghambat aktivitas suatu enzim. Hasil terbaik dari penambatan divisualisasikan dalam bentuk 2D dan 3D yang tersaji dalam **Tabel 4.7**.

Tabel 4.7. Visualisasi hasil *molecular docking* terhadap mekanisme reaksi biotransformasi berdasarkan jurnal An, dkk., (2013)

Ligan	2D	3D
Asam oleat		
Asam 10-hidroksi stearat		
Asam 4-hidroksi dodekan oat		

Tabel 4.8. Residu asam amino yang berinteraksi pada *molecular docking* terhadap mekanisme reaksi biotransformasi berdasarkan jurnal An, dkk., (2013)

Senyawa	Reseptor	Residu asam amino yang berinteraksi
Asam oleat	 Lipase dari Aspergillus oryzae (5XK2)	THR A:69
		ASP A:70
		THR A:71
		SER A:91
		GLY A:90
		LEU A:154
		PHE A:120
		TRP A:97
		THR A:102
		PHE A:103
GLU A:117		
Asam 10- hidroksistearat		PRO A:104
		GLY A:119
		LEU A:118
		ASP A:144
		LYS A:146
		TRP A:21
		ASP A:17
THR A:12		
Asam 4- hidroksidodekanoat		PHE S:20
		ASN A:81
		LYS A:82
		ASP :51
		TYR A:92
		SER A:93
		ARG A:95
		LEU A:262
		PHE A:265
		VAL A:98
		PRO A:260

Senyawa	Reseptor	Residu asam amino yang berinteraksi
		VAL A:208 TRP A:97 PRO A:207 LEU A:211 ILE A:94

Residu Asam amino yang berinteraksi dengan Asam oleat disajikan pada **Tabel 4.8**. Interaksi memiliki 2 jenis ikatan yaitu ikatan van der Waals dan ikatan hidrogen. Ikatan van der Waals dengan ASP A:70 ; THR A:71 ; SER A:91 ; GLY A:90 ; LEU A:154 ; PHE A:120 ; TRP A:97 ; THR A:102 ; PHE A:103 ; GLU A:117 ; PRO A:104 ; GLY A:119 ; LEU A:118, dan ikatan hidrogen dengan THR A:69. Pada interaksi dengan Asam 10-hidroksistearat memiliki 4 jenis ikatan. Ikatan pi-Sigma dan pi-Alkil dengan PHE A:20. Ikatan hidrogen dengan LYS A:82 dan ASP A:17. Sedangkan ikatan van der Waals ditemukan dengan residu asam amino ASP A:51; ASN A:81; ASP A:144; LYS A:146; TRP A:21 dan THR A:12. Penambatan dengan Asam 4-hidroksidodekanoat memiliki 3 jenis ikatan dan 12 residu asam amino. Ikatan alkil dengan residu asam amino LEU A:211; PRO A:207; dan VAL A:208. Ikatan hidrogen dengan residu asam amino ARG A:95 dan TYR A:92. Dan ikatan van der Waals dengan LEU A:262; PHE A:265; ILE A:94; TRP A:97; VAL A:98 dan PRO A:260.

4.4 Penentuan jalur mekanisme reaksi biotransformasi enzimatis

Berdasarkan hasil *molecular docking* antara lipase dari *Aspergillus oryzae* dengan *starting material* asam oleat dan intermediet dari masing-masing mekanisme reaksi dihasilkan data energi ikat, Konstanta inhibisi (Ki) dan residu asam amino yang berinteraksi. Dari data tersebut jalur mekanisme reaksi dapat dipresiksi dengan membandingkan data nilai energi ikat dan Ki dari intermediet setiap jalur. Data hasil *molecular docking* dari dua jalur berbeda di rangkum pada **Tabel 4.9**.

Tabel 4. 9. Hasil data *molecular docking*

Senyawa	Konstanta inhibisi (μM)	Energi ikat (kcal/mol)	
Mekanisme reaksi hasil biotransformasi dengan metode konvensional	Asam oleat (<i>Starting material</i>)	1.3	-3.94
	Etil dodekanat (intermediet 1)	1.12	-4.02
	Etil 4-hidroksidodekanoat (intermediet 2)	1.18	-3.99
Mekanisme reaksi biotransformasi berdasarkan jurnal An, dkk., (2013)	Asam oleat (<i>Starting material</i>)	1.3	-3.94
	Asam 10-hidroksistearat (intermediet 1)	16.09	-2.45
	Asam 10-hidroksistearat (intermediet 2)	1.87	-3.72

Hasil *molecular docking* dari intermediet pertama dapat dilihat perbedaan nilai energi ikat yang sangat jauh. Pada jalur mekanisme reaksi hasil biotransformasi dengan metode konvensional, Etil dodekanoat sebagai intermediet pertama menghasilkan energi ikat dan nilai K_i yang lebih kecil dibandingkan Asam 10-hidroksistearat sebagai intermediet pertama dari mekanisme reaksi biotransformasi berdasarkan jurnal An, dkk., (2013). Perbedaan yang signifikan menjadikan Etil dodekanoat sebagai intermediet pertama yang lebih baik menurut hasil *molecular docking*.

Pada Asam 10-hidroksidodekanoat nilai energi ikat dari penambatan yang masih besar dan nilai K_i yang bervariasi antara 16.09 μM sampai 911.47 μM memperlihatkan kurang baiknya penambatan tersebut. Nilai RMSD yang masih banyak diatas 2Å

memperkuat dugaan ketidak sesuaian enzim daalam reaksi. Besanya nilai RMSD dapat diartikan bahwa posisi ligan kurang baik. Semakin kecil nilai RMSD menunjukkan bahwa posisi ligan yang diperkirakan semakin baik karena semakin mendekati konformasi asal.

Penggunaan enzim lipase dari *Aspergillus oryzae* dalam proses hidrosilasi memberikan hasil yang kurang baik karena dari hasil invitro tidak dihasilkan senyawa intermediat yang mengandung gugus OH. Hasil penelitian An, dkk., (2013) pada intermediet pertama menghasilkan Asam 10-hidroksistearat karena menggunakan enzim yang berbeda yaitu *Saccharomices cerevisiae*. Oleh karena itu, perbedaan senyawa intermediet tidak dapat dilakukan.

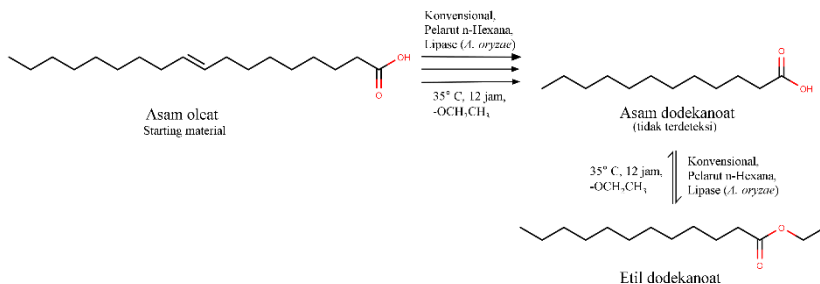
Pemilihan Etil dodekanoat sebagai intermediet pertama dilihat dari hasil *molecular docking* yang lebih baik dari Asam 10-hidroksidodekanoat. Namun hasil dan jalur mekanisme ini tidak dapat dikatakan terbaik dan lebih baik dai jurnal An, dkk., (2013) karena hasil ini hanya penelitian dari data teoritis secara *in-silico*. Perlu adanya data hasil lab yang akurat dan sesuai dengan hasil dari penelitian ini agar dapat dipastikan jalur mekanisme reaksi dengan Etil dodekanoat sebagai intermediet utamanya lebih baik.

Mekanisme reaksi hasil biransformasi diprediksikan seperti **Gambar 4.11** (halaman 27). Asam oleat menjadi Etil dodekanoat telah melewati tahap β -oksidasi. Etil dodekanoat selanjutnya akan mengalami hidrosilasi menjadi Etil 4-hidroksidodekanoat. Dan tahapan terakhir laktonisasi menghasilkan produk γ -dodekalakton. Namun dalam reaksi biotransformasi enzimatiss, Etil 4-hidroksidodekanoat dan γ -dodekalakton tidak terdeteksi dalam produk. Adanya Etil 4-hidroksidodekanoat dan γ -dodekalakton dalam mekanisme reaksi maupun analisis dengan pendekatan *molecular docking* sebagai data tambahan untuk memperlengkap penelitian biotransformasi enzimatiss ini.

4.4.1. Prediksi jalur mekanisme reaksi biotransformasi Asam oleat berdasarkan hasil *molecular docking*

Langkah pertama reaksi biotransformasi enzimatiss Asam oleat untuk mendapatkan γ -dodekalakton yaitu reaksi β -oksidasi. Asam oleat sebagai *starting material* mengalami pemendekan rantai dari C18 menjadi C12 menjadi Asam dodekanoat (tidak terdeteksi) kemudian menjadi Etil dodekanoat pada **Gambar 4.13**. Etil

dodekanoat sebagai produk biotransformasi enzimatis Asam oleat dengan Lipase dari *Aspergillus oryzae* tersaji pada **Tabel 4.10**. Lipase dari *Aspergillus oryzae* merupakan enzim yang dapat melakukan reaksi β -oksidasi atau pemendekan rantai.



Gambar 4.13. Reaksi β -oksidasi Asam oleat menjadi Etil dodekanoat

Tabel 4.10. Hasil GC-MS reaksi biotransformasi enzimatis

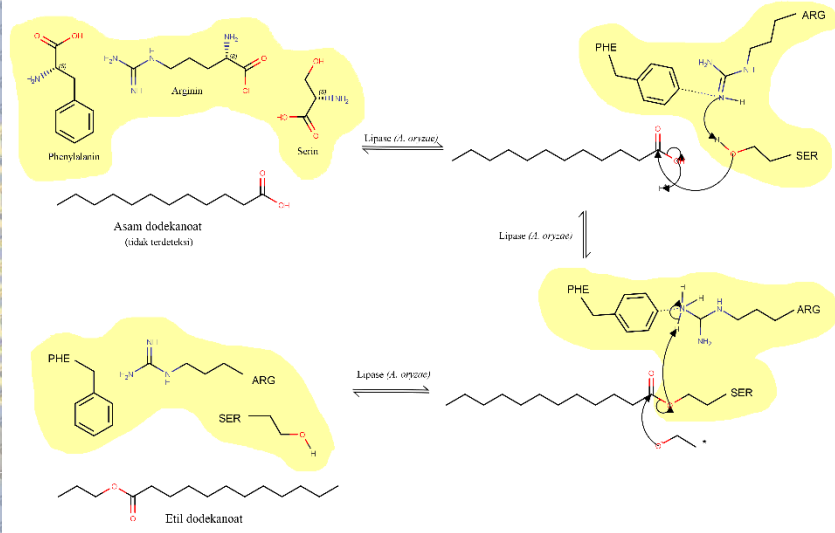
Peak	Waktu Retensi	% Area	Nama Senyawa
1	6.925	6.94	Ethyl Heptanoat
2	8.520	7.69	Ethyl Caprylat
3	10.095	3.24	N-Hexadecane
4	11.464	2.54	Ethyl Decanoate
5	11.526	5.99	N-Tetradecane
6	12.778	1.03	1-Hexadecanol
7	12.871	5.09	N-Pentadecane
8	13.867	1.75	4,5-Dimethyl-1-Phenyl-Hex-4-En-1-One
9	14.078	2.53	Ethyl Pentadecanoate
10	14.142	3.95	N-Pentadecane
11	14.953	1.47	1,E-11,Z-13-Octadecatriene
12	15.030	4.52	9-Octadecyn
13	15.104	5.22	Heptadec-8-Ene
14	15.167	2.87	Heptadec-8-Ene

Peak	Waktu Retensi	% Area	Nama Senyawa
15	15.275	0.93	Diocetadecyl Phosphite
16	15.345	3.69	N-Tetradecane
17	15.560	1.67	Myristylaldehyde
18	16.425	1.25	Ethyl Palmitate
19	17.867	1.25	Methyl Palmitate
20	18.554	2.77	Ethyl Palmitate
21	19.308	0.79	Dodecane-1,12-Diol
22	19.361	1.62	9-Eicosene
23	19.474	2.44	2-Methylenecyclododecanone
24	19.600	1.44	Methyl 7,10-Hexadecadienoate
25	19.644	3.30	11-Octadecenoic Acid,
26	20.274	17.32	(Z) asam 9-dodekanoat
27	21.129	0.57	Cis-9-Octadecen-1-Ol
28	21.446	3.69	Methyl Ester Of Ricinoleic Acid
29	23.639	1.08	Cis-9-Octadecen-1-Ol
30	26.656	1.36	Cholesta-4,6-Dien-3-Ol, Benzoate

Etil dodekanoat dipilih menjadi produk terbaik karena menjadi senyawa yang paling mendekati tahapan mekanisme reaksi dengan tujuan akhir γ -dodekallakton. Etil dodekanoat sebagai hasil reaksi bitransformasi enzimatis telah melewati satu tahap reaksi β -oksidasi. Sehingga Etil dodekanoat dijadikan intermediet pertama. Reaksi β -oksidasi dari Asam oleat (C18) diperpendek menjadi Asam dodekanoat yang kemudian menjadi Etil dodekanoat. Senyawa Asam dodekanoat adalah benbuk terpendek dari reaksi β -oksidasi sehingga mekanisme reaksi dipersingkat interaksi dengan residu asam amino hasil *molecular docking*.

Reaksi β -oksidasi dibantu oleh residu asam amino dari hasil *molecular docking* PHE A:120, ARG A:89 dan SER A:91. Sisi aktif residu Asam amino akan berinteraksi dengan Asam oleat

menghasilkan Etil dodekanoat sebagai produk reaksi pertama. Mekanisme reaksi enzimatis dapat dilihat pada Gambar 4.14.



*1) senyawa yang berasal dari hasil yang tidak terdeteksi

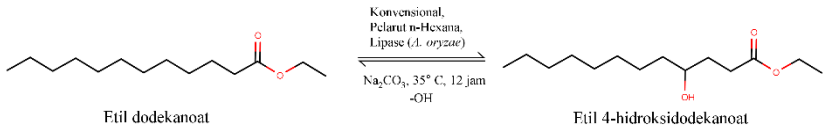
Gambar 4. 14. Mekanisme reaksi Reaksi β-oksidasi Asam oleat menjadi Etil dodekanoat

Tiga residu asam amino yaitu Phenylalanin, arginine dan serin membentuk triad karalitik. Kemudian atom O pada serin menyerang gugus karbonil dan gugus OH dari Asam oleat mengikat atom H⁺ dan meninggalkan senyawa sehingga terbentuk kompleks enzim-Asam oleat. Selanjutnya terjadi reaksi esterifikasi dengan masuknya gugus etoksi. Etoksi merupakan senyawa yang dikontribusikan dari hasil yang tidak terdeteksi. Atom O dalam etoksi menyerang gugus karbonil dan melepaskan residu asam amino serin. Hasil akhir dari reaksi ini berupa Etil dodekanoat.

4.4.2. Prediksi jalur mekanisme reaksi biotransformasi Etil dodekanoat berdasarkan hasil *molecular docking*

Setelah terbentuk Etil dodekanoat sebagai intermediet pertama, reaksi biotransformasi berlanjut ke tahap hidroksilasi menghasilkan Etil 4-hidroksidodekanoat. Reaksi hidroksilasi dibantu oleh Na₂CO₃

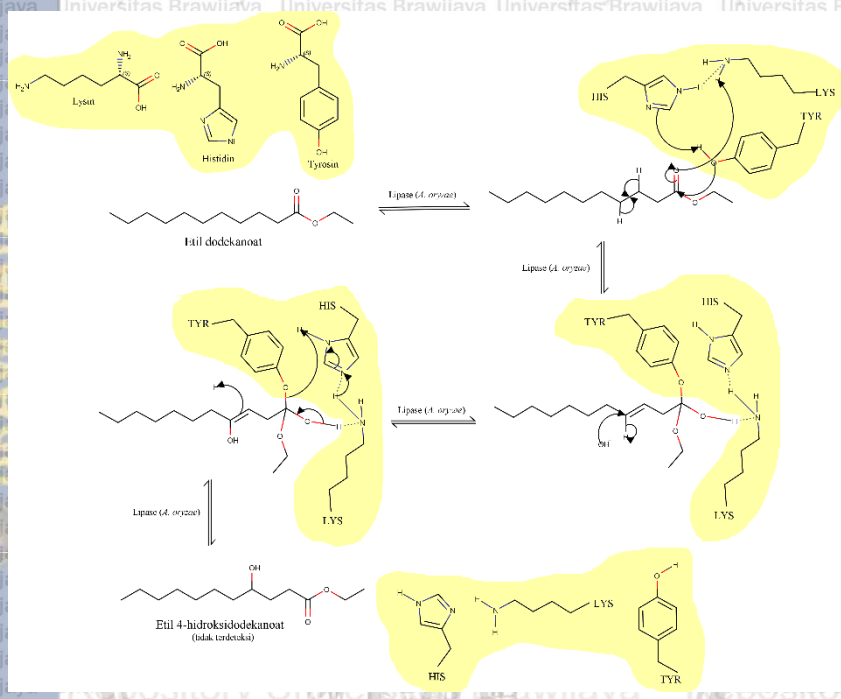
sebagai penyedia air dalam reaksi. Na_2CO_3 dalam air akan membentuk ion OH^- yang dijadikan sumber nukleofil. Reaksi hidroksilasi Etil 4-hidroksidodekanoat belum dapat terbentuk dalam reaksi. Perkiraan mekanisme pada **Gambar 4.15** dan secara rinci pada **Gambar 4.16** merupakan gambaran sebagai data tambahan mekanisme reaksi biotransformasi enzimatis.



Gambar 4. 15. Reaksi hidroksilasi Etil dodekanoat menjadi Etil 4-hidroksidodekanoat

Hasil *molecular docking* menunjukkan interaksi residu asam amino HIS A:142, LYS A:139 dan TYR A:14 dengan ligan Etil dodekanoat. Ketiga residu asam amino berinteraksi membentuk *triad catalitik* kemudian berinteraksi dengan Etil dodekanoat. Mekanisme reaksi hidroksilasi tergambar pada **Gambar 4.16**.





Gambar 4. 16. Mekanisme reaksi hidroksilasi Etil dodekanoat menjadi Etil 4-hidroksidodekanoat

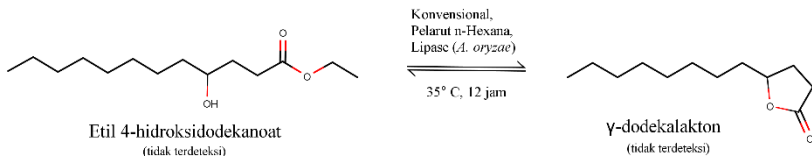
Reaksi hidroksilasi dengan memasukkan gugus –OH dalam reaksi dibantu oleh enzim lipase. Langkah pertama pemutusan salah satu atom H dan terjadi reaksi adisi dengan memasukkan gugus –OH dalam senyawa. Gugus –OH didapatkan dari Na_2CO_3 yang larut dalam air dan mengion menghasilkan –OH. Kemudian terjadi pemutusan ikatan anngkap menjadi ikata tunggal dan kembalinya ikatan anngkap pada atom O yang diikuti pemutusan interaksi antara residu asam amino dengan produk akhir pada tahap ini yaitu Etil 4-hidroksidodekanoat.

4.4.3. Prediksi jalur mekanisme reaksi biotransformasi Etil 4-hiroksidodekanoat bedasarkan hasil *molecular docking*

Tahap akhir mekanisme untuk menghasilkan γ -dodekalakton yaitu reaksi laktonisasi atau siklisasi. Etil 4-hidroksidodekanoat (tidak terdeteksi) mengalami siklisasi menjadi siklik 5, γ -dodekalakton (tidak terdeteksi). Sama seperti reaksi hidroksilasi, reaksi laktonisasi

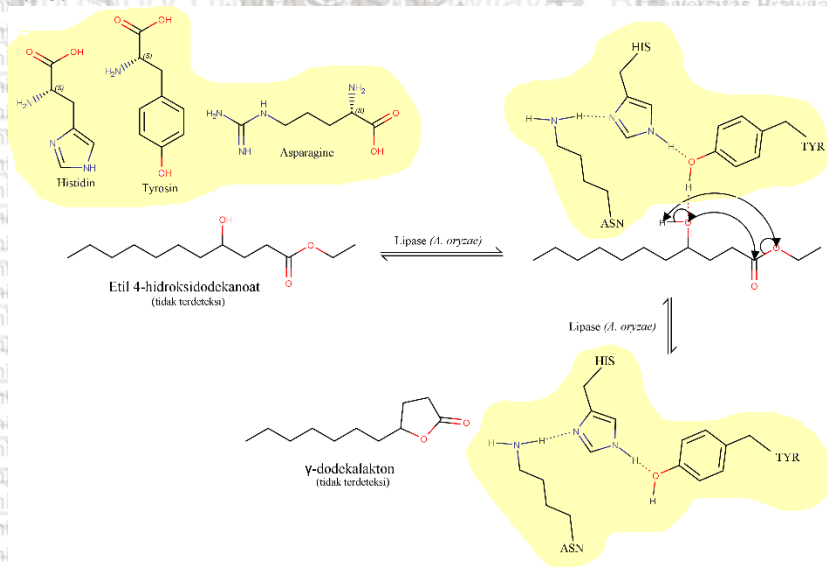
juga digambarkan sebagai data tambahan untuk memprediksi mekanisme reaksi dengan harapan produk akhir γ -dodekalakton.

Reaksi laktonisasi dapat terjadi jika adanya gugus hidroksil dan gugus karboksil yang membentuk siklik. Reaksi laktonisasi ditunjukkan pada **Gambar 4.17**.



Gambar 4. 17. Reaksi laktonisasi Etil 4-hidroksidodekanoat menjadi γ -dodekalakton

Tiga residu asam amino yang membentuk triad catalytic dan berinteraksi dengan Etil 4-hidroksidodekanoat yaitu HIS A:203, TYR A:27, dan ASN A:204. Mekanisme reaksi secara rinci pada **Gambar 4.18**.



Gambar 4. 18. Mekanisme reaksi reaksi laktonisasi Etil 4-hidroksidodekanoat menjadi γ -dodekalakton



Histidin, tirosin, dan asparagin dipilih menjadi triad katalitik yang berinteraksi dengan Etil 4-hidroksidodekanoat. Reaksi laktonisasi diawali dengan atom O dari gugus OH menyerang karbonil dan ikatan dengan atom hidrogen terputus. Kemudian diikuti terputusnya ikatan C karbonil dengan O etoksi. Reaksi ini menghasilkan siklik lima dengan produk akhir γ -dodekalakton.



BAB V PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Penelitian ini melakukan biotransformasi enzimatis Asam oleat dengan enzim lipase dari *Aspergillus oryzae* dengan harapan menghasilkan γ -dodekalakton sebagai produk. Biotransformasi dilakukan dengan dua metode yaitu metode konvensional dan radiasi *microwave*. Produk biotransformasi metode konvensional berupa Etil dodekanoat sedangkan produk biotransformasi metode *microwave* berupa Asam dodekanoat. Etil dodekanoat dapat dijadikan intermediet dalam reaksi bioransformasi karena sejalan dengan mekanisme reaksi dan paling mendekati produk yang diharapkan. Jalur mekanisme reaksi dengan Etil dodekanoat sebagai intermediet diprediksikan dengan jurnal An, dkk., (2013) sebagai auan tahapan reaksi. Hasil dari prediksi terdapat perbedaan dengan mekanisme reaksi acuan dari junal An, dkk., (2013). Untuk memprediksikan jalur mekanisme reaksi yang sesuai dilakukan analisis dengan *molecular docking*. *Molecular docking* membandingkan nilai energi ikat, konstanta inhibisi dan RMSD dari penambatan. Reseptor yang digunakan yatu lipase dari *Aspergillus oryzae* dengan kode 5XK2. Struktur ligan berupa Asam oleat, Asam 10-hiroksistearat, Asam 4-hidroksidodekanoat, Etil dodekanoat dan Etil 4-hidroksidodekanoat. Hasil *molecular doking* dari ligan yang ada cukup baik kecuali pada ligan Asam 10-hiroksistearat. Pada ligan Asam 10-hiroksistearat energi ikatnya masih besar yaitu -2.45 kcal/ mol dan konstanta inhibisinya yang terbesar sbesar 16.09 μM . Untuk memprediksi mekanisme reaksi dibandingkan nilai energi ikat, konstanta inhibisi dari intermediet pertama. Etil dodekanoat sebagai intermediet pertama jalur mekanisme reaksi hasil biransformasi memiliki hasil *molecular doking* yang lebih baik dari Asam 10-hiroksistearat. Sehingga mekanisme reaksi dapat diprediksikan. Namun hasil dan jalur mekanisme ini tidak dapat dikatakan terbaik dan lebih baik dai jurnal An, dkk., (2013) karena hasil ini hanya penelitian dari data teoritis secara in-silico. Perlu adanya data hasil lab yang akurat dan sesuai dengan hasil dari penelitian ini agar dapat dipastikan jalur mekanisme reaksi dengan Etil dodekanoat sebagai intermediet utamanya lebih

baik. Jalur mekanisme reaksi hasil biotransformasi menurut hasil *molecular docking* sebagai berikut: Asam oleat - Etil dodekanoat - Etil 4-hidroksidodekanoat – γ -dodekalakton

5.2. Saran

Penelitian ini membutuhkan studi lebih lanjut tentang kesesuaian enzim yang digunakan dalam reaksi sehingga dapat menghasilkan γ -dodekalakton sebagai produk. Penggunaan enzim dalam reaksi biotransformasi dapat ditambah dengan tandem dengan beberapa enzim yang sesuai tahapan mekanisme reaksi. Enzim yang digunakan dalam reaksi perlu dioptimasi agar kerja enzim maksimal. Untuk memaksimalkan kerja enzim perlu diperhatikan kesetimbangan kinetika reaksi enzimatik dan factor-faktor yang mempengaruhi reaksi seperti konsentrasi substrat, konsentras enzim, pH, suhu dan adanya kofaktor serta ion logam. Selain itu penambahan senyawa-senyawa penunjang reaksi sangat diperlukan untuk menghasilkan produk yang lebih baik.



DAFTAR PUSTAKA

1. Junaidi, L. (2008). Flavor Alami: Produksi, Sumber, Teknik Isolasi dan Recovery. *Journal of Agro-Based Industry*, 25, 44–58.
2. Hui, Y. H., Chen, F., & Nollet, L. M. L. (2010). *Handbook of Fruit and Vegetable Flavors*. John Wiley and Sons.
3. An, J.-U., Joo, Y.-C., & Oh, D.-K. (2013). New Biotransformation Process for Production of the Fragrant Compound γ -Dodecalactone from 10-Hydroxystearate by Permeabilized *Waltomyces lipofer* Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2636–2641.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02602-12>
4. Gocho, S., Tabogami, N., Inagaki, M., Kawabata, C., & Komai, T. (1995). Biotransformation of Oleic Acid to Optically Active γ -Dodecalactone. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(8), 1571–1572. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.1571>
5. Khan, N. R., & Rathod, V. K. (2018). Microwave assisted enzymatic synthesis of speciality esters: A mini - review. *Process Biochemistry*, 75, 89–98.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.08.019>

6. Iftitah, E. D., Yulasandini, I. F., & Utomo, E. P. (2019). In-vitro and In-silico study on the acylation reaction of (-)-Isopulegol and L-Menthol Mixtures with Lipase from *Rhizomuchor miehei*. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 546, 022006. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/546/2/022006>
7. Nurfaury, A., Utomo, E. P., & Iftitah, E. D. (2017). Studi Hubungan Aktivitas Struktur Terhadap Penentuan Karakteristik Aroma Senyawa melalui Pengujian Molecular Docking. *Indonesian Journal of Essential Oil*, 2(1), 10–19. <https://doi.org/10.21776/ub.ijeo.2017.002.01.02>
8. Choulis, N. H. (2011). Chapter 49 - Miscellaneous drugs, materials, medical devices, and techniques. In J. K. Aronson (Ed.), *Side Effects of Drugs Annual* (Vol. 33, pp. 1009–1029). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53741-6.00049-0>
9. PubChem. (n.d.). Oleic acid. Retrieved February 11, 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445639>
10. Choi, S.-G., Won, S.-R., & Rhee, H.-I. (2010). Chapter 153 - Oleic Acid and Inhibition of Glucosyltransferase. In V. R. Preedy & R. R. Watson (Eds.), *Olives and Olive Oil in Health and*

- Disease Prevention* (pp. 1375–1383). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00153-4>
11. Hernandez, E. M. (2016). 4 - Specialty Oils: Functional and Nutraceutical Properties. In T. A. B. Sanders (Ed.), *Functional Dietary Lipids* (pp. 69–101). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-247-1.00004-1>
12. PubChem. (n.d.). gamma-Dodecalactone. Retrieved February 8, 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16821>
13. Sumarlin, L. O., Mulyadi, D., Suryatna, & Asmara, Y. (2013). Identifikasi Potensi Enzim Lipase dan Selulase pada Sampah Kulit Buah Hasil Fermentasi. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*.
14. Djarkasi, G. S. S., Raharjo, S., & Noor, Z. (2017). Isolasi dan Aktivitas Spesifik Enzim Lipase Indigenous Biji Kenari. *Jurnal Teknologi Pertanian (Agricultural Technology Journal)*, 8(1).
15. Hutasoit, N., Ina, P. T., & Permana, I. D. G. M. (n.d.). Optimasi pH dan Suhu Pada Aktivitas Enzim Lipase dari Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Berkapang. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*.

16. Singh, R. (2017). Microbial bio transformation: a process for chemical alterations. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, Volume 4(Issue 2).
<https://doi.org/10.15406/jbmoa.2017.04.00085>
17. Pavelkić, V. M., Stanislavljev, D. R., Gopčević, K. R., & Beljanski, M. V. (2009). Influence of microwave irradiation on enzyme kinetics. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 83(9), 1473–1477. <https://doi.org/10.1134/S0036024409090106>
18. Supriya, T., Shankar, M., Lalitha, S. K., Dastgiri, J., & Babu, M. N. (2016). A Over View on Molecular Docking. *American Journal of Biological and Pharmaceutical Research*, 3(2), 83–89.
19. Moya-Salazar, J., Rupa, R., VÃ©rtiz-Osores, J., AlarcÃ³n-DÃ¡az, M., Jibaja, S., Acevedo-Espinola, R., ... Flores, R. C.-. (2019). Fungi Lipases Homology Modeling and Molecular Docking with Fatty Acids and Tripalmitin of Palm Oil Effluent. *Archive of organic and inorganic chemical sciences*, 4(2), 493–500.
20. Masula, A., Puspitasari, D., S.W, E., Ummah, K., Rokhmatin, D., Mubarrok, M., ... Purnama, E. R. (2018). Docking Molekuler

Senyawa Metabolit Sekunder Lantana Camara Sebagai
Antiinflamasi Terhadap Enzim COX-1. *Jurnal Biota*, 4, 79–83.

<https://doi.org/10.19109/Biota.v4i2.2172>

21. Farbood, M., & Willis, B. (1983). Production of Gamma-
dodecalactone.

22. Saropah, D., Jannah, A., & Maunatin, A. (2013). Kinetika Reaksi
Enzimatis Ekstrak Kasar Enzim Selulase Bakteri Selulolitik Hasil

Isolasi dari Bekatul. *ALCHEMY*.

<https://doi.org/10.18860/al.v0i0.2297>

23. Puspitasari, G., & Atikah, W. S. (2019). Studi Kinetika Reaksi
Dari Enzim α -Amilase pada Proses Penghilangan Kanji Kain

Kapas. *Arena Tekstil*, 34(1).

<https://doi.org/10.31266/at.v34i1.5097>

24. Sealy Ananta Dewi, N. (2018). Study Komputasi Aktivitas
Senyawa Turunan Mangiferin Sebagai Anti Diabetes Tipe 1

Menggunakan Metode Hksa (Hubungan Kuantitatif Struktur Dan

Aktivitas) Dan Penambatan Molekul. *UNESA Journal of
Chemistry*, 7(1). Retrieved from



<http://jurnalmahasiswa.unesa.ac.id/index.php/unesa-journal-of-chemistry/article/view/22945>



LAMPIRAN

Lampiran A: Diagram alir penelitian

A.1. Diagram alir biotransformasi enzimatis lipase dari *Aspergillus Oryzae* dengan metode konvensional terhasap Asam Oleat

6 gram Asam oleat dimasukkan ke dalam erlenmayer

Ditambahkan n-Heksana sebanyak 40 ml

Ditambahkan larutan Na_2CO_3 sebanyak 5 ml

Diukur pH campuran substrat dan pelarut

Ditambahkan *free* enzim lipase dari *Aspergillus oryzae* sebanyak 100 μl

Dilakukan inkubasi dengan rotary shaker selama 12 jam

Diinaktivasi enzim dengan penambahan HCl sampai pH 2

Dilakukan pemisahan fasa minyak dan fasa air

Dilakukan pemanasan dengan suhu 100°C

Dilakukan penguapan pelarut dengan rotatory evaporator

Dilakukan karakterisasi menggunakan GC-MS

A.2. Diagram alir biotransformasi enzimatis lipase dari *Aspergillus Oryzae* dengan metode *microwave* terhasap Asam Oleat

6 gram Asam oleat dimasukkan ke dalam erlenmayer

Ditambahkan n-hexana sebanyak 40 ml

Ditambahkan larutan Na_2CO_3 sebanyak 5 ml

Diukur pH campuran substrat dan pelarut

Ditambahkan *free* enzim lipase dari *Aspergillus oryzae* sebanyak 100 μl

Dilakukan reaksi dengan *microwave* termodifikasi selama 30 menit

Diinaktivasi enzim dengan penambahan HCl sampai pH 2

Dilakukan pemisahan fasa minyak dan fasa air

Dilakukan pemanasan dengan suhu 100°C

Dilakukan penguapan pelarut dengan rotatory evaporator

Dilakukan karakterisasi menggunakan GC-MS

A.3. Diagram alir *molecular docking* terhadap mekanisme reaksi hasil biotransformasi enzimatis dengan metode konvensional

Struktur 3D reseptor lipase dari *Aspergillus oryzae* dengan kode 5XK2 yang didapatkan dari PDB (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

Struktur ligan berupa Asam oleat, Etil dodekanoat dan Etil-4-hidroksidodekanoat yang diperoleh dari PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Dilakukan persiapan target dan ligan dalam Discovery Studio 2.0

Docking dilakukan pada Autodocktools

Hasil *Docking* divisualisasikan dalam Discovery Studio 2.0

A.4. Diagram alir molekular docking terhadap mekanisme reaksi biotransformasi berdasarkan jurnal An, dkk., (2013)

Struktur 3D reseptor lipase dari *Aspergillus oryzae* dengan kode 5XK2 yang didapatkan dari PDB (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

Struktur ligan berupa Asam olet, Asam 10-hidroksistearat, dan Asam 4-hidroksidodekanoat yang diperoleh dari PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Dilakukan persiapan target dan ligan dalam Discovery Studio 2.0

Docking dilakukan pada Autodocktools

Hasil *Docking* divisualisasikan dalam Discovery Studio 2.0

Lampiran B: Data Hasil *molecular docking*B.1. Analisis *molecular docking* reseptor Lipase dari *Aspergillus oryzae* dengan Asam oleat

<i>Conformation</i>	Energi ikat (kcal/mol)	Ki (μM)	RMSD (\AA)
1	-3.16	4.82	1.63
2	-3.4	3.21	3.73
3	-3.62	2.22	2.03
4	-3.36	3.44	2.47
5	-3.94	1.3	1.28
6	-3.22	4.38	2.27
7	-2.93	7.07	4.46
8	-2.52	14.18	3.3
9	-4.2	831.09	2.28
10	-3.15	4.88	2.16

B.2. Analisis *molecular docking* reseptor Lipase dari *Aspergillus oryzae* dengan Etil dodekanoat

<i>Conformation</i>	Energi ikat (kcal/mol)	Ki (μM)	RMSD (\AA)
1	-3.58	2.37	5.28
2	-4.15	913.93	5.04
3	-3.37	3.41	1.64
4	-3.88	1.44	1.78
5	-4.34	657.5	4.98
6	-4.02	1.12	1.6
7	-3.98	1.21	1.63
8	-3.34	3.59	4.36
9	-3.8	1.63	1.75
10	-3.54	2.53	3.92

B.3. Analisis *molecular docking* reseptor Lipase dari *Aspergillus oryzae* dengan Etil 4-hidroksidodekanoat

Conformation	Energi ikat (kcal/mol)	Ki (μM)	RMSD (\AA)
1	-5.03	204.99	2.86
2	-4.21	814.94	2.74
3	-5.18	159.84	2.94
4	-3.99	1.18	1.57
5	-5.05	200.23	2.72
6	-5.07	193.67	2.8
7	-4.94	240.53	2.76
8	-3.01	6.2	2.82
9	-3.96	1.25	0.82
10	-4.37	629.82	1.37

B.4. Analisis *molecular docking* reseptor Lipase dari *Aspergillus oryzae* dengan Asam 10-hidroksistearat

Conformation	Energi ikat (kcal/mol)	Ki (μM)	RMSD (\AA)
1	-3.02	6.16	4.47
2	-0.97	195.85	2.62
3	-2.22	23.42	4.91
4	-2.37	18.37	4.14
5	-3.21	4.43	4.75
6	-3.55	2.48	4.55
7	-1.09	158.07	4.6
8	-2.45	16.09	1.65
9	-1.69	57.7	5.06
10	-1.35	101.92	5.27

B.5. Analisis *molecular docking* reseptor Lipase dari *Aspergillus oryzae* dengan Asam 4-hidroksidodekanoat

<i>Conformation</i>	Energi ikat (kcal/mol)	Ki (μM)	RMSD (\AA)
1	-3.48	2.83	2.14
2	-3.61	2.26	1.78
3	-3.61	2.24	1.52
4	-3.12	5.19	1.02
5	-3.44	3.03	0.84
6	-3.14	5.03	1.73
7	-3.58	2.38	1.24
8	-3.72	1.87	1.14
9	-3.49	2.77	1.35
10	-3.25	4.16	1.61