

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari hingga Mei 2017 di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Instrumentasi Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya.

3.2 Alat Penelitian

Pada metode *in-vitro*, digunakan peralatan berupa seperangkat alat gelas, bola hisap, *magnetic stirrer*, neraca analitik, termometer raksa, seperangkat alat sentrifugasi, kromatografi gas-spektroskopi massa (GCMS-QP2010S Shimadzu), dan FT-IR shimadzu.

Pada metode *in-silico*, digunakan perangkat keras berupa laptop Acer dengan spesifikasi *processor Intel(R) Pentium(R) CPU P6200 @2.13 GHz* dengan *memory RAM 2.00 GB*, serta beberapa perangkat lunak seperti *Discovery Studio 2016*, *Hyperchem*, *Open Babel GUI*, dan *iGemDock v2.1*.

3.3 Bahan Penelitian

Pada metode *in vitro*, digunakan bahan-bahan berupa enzim lipase-B dari *Candida antarctica recombined Aspergillus oryzae*, l-menthol, n-heksana, vinil asetat, dan asam asetat anhidrid.

Pada metode *in-silico*, digunakan bahan-bahan berupa makromolekul dari *Candida antarctica recombined Aspergillus oryzae* yang diunduh melalui Protein Data Bank (www.rcsb.org) dengan kode akses 4ZV7. Ligan yang digunakan adalah l-menthol, vinil asetat, asam asetat anhidrid, dan l-menthil asetat yang diperoleh dari *Chemspider Search and Share Chemistry* (www.chemspider.com).

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Uji *in vitro* (tahap penentuan reaksi asilasi) senyawa menthol dengan enzim Lipase-B dari *Candida antarctica recombined Aspergillus oryzae*
2. Karakterisasi produk reaksi menggunakan KG-SM dan FTIR
3. Uji *in-silico* (tahap pemodelan) pada enzim lipase dari *Candida antarctica recombined Aspergillus oryzae* dengan substrat berupa l-menthol, vinil asetat, asam asetat anhidrid, dan l-menthil asetat.
4. Analisis data.

3.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Uji In Vitro

A. Pengaruh Sumber Asil terhadap Reaksi Asilasi L-Menthol

Enzim lipase ditimbang sebanyak 0.15 g kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer *with screw cap* (volume 100 mL). Setelah itu ditambahkan n-heksana sebanyak 13 mL dan asam asetat anhidrat sebanyak 5 mL.

Campuran diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 200 rpm pada temperatur 50 °C selama 24 jam. Kemudian ditambahkan menthol sebanyak 6 mL secara perlahan (tetes demi tetes) ke dalam erlenmeyer. Cara yang sama dilakukan menggunakan sumber asil berupa vinil asetat. Kemudian, campuran enzim dan substrat hasil reaksi disentrifugasi selama 10-15 menit agar diperoleh larutan bening. Selanjutnya, larutan bening tersebut dianalisis menggunakan KG-SM dan FTIR.

B. Karakterisasi Produk Hasil Reaksi Asilasi Menthol

1. Karakterisasi dengan Kromatografi Gas Spektrometer Massa (KG-SM)

Produk hasil reaksi asilasi dianalisis dengan menginjeksikan sampel 0,2 µL menggunakan *syringe* pada instrumen KG-SM Shimadzu QP2010S. Puncak yang terdeteksi pada kromatogram

dianalisis menggunakan spektra massa, sehingga diperoleh hasil akhir analisis berupa kromatogram dan spektra massa dari produk. Spesifikasi alat KG-SM adalah sebagai berikut:

Jenis kolom	: Kolom kapiler Restrex Rtx-5
Fasa diam	: 5% difenil atau 95% dimetil polisiloksan
Panjang kolom	: 30 meter
Temperatur kolom	: 60-215°C
Temperatur injector	: 225°C
Kecepatan aliran gas	: 50 mL/menit
Gas pembawa	: Gas He

2. Karakterisasi menggunakan spektrofotometer FTIR

Analisis produk hasil asilasi dilakukan dengan meneteskan sampel berupa hasil reaksi asilasi pada pellet KBr untuk padatan dan NaCl untuk sampel cairan. Pada analisis ini, digunakan *pellet* NaCl karena produk yang diperoleh berupa cairan. Selanjutnya sampel di-*press* hingga terbentuk lapisan tipis. Sampel ini diletakkan pada *sample holder* dan dimasukkan ke dalam ruang sampel pada spektrofotometer FT-IR. Karakterisasi produk asilasi dengan spektrofotometer FT-IR akan menghasilkan spektra yang menunjukkan hubungan antara % transmitansi dengan bilangan gelombang yang berkisar antara 4000- 400 cm^{-1} .

3. Analisis Data

Karakterisasi hasil reaksi dilakukan menggunakan kromatografi gas-spektroskopi massa (KG/SM) sehingga diperoleh data berupa spektra dari KG dan pola fragmentasi yang diperoleh dari MS. Berdasarkan profil KG/SM produk asilasi menthol dapat diketahui selektivitas enzim lipase melalui rumus berikut:

$$\% \text{ selektivitas} = \frac{\% \text{ produk reaksi}}{\% \text{ menthol} - \% \text{ menthol tidak bereaksi}} \times 100$$

$$\% \text{ konversi} = \frac{\% \text{ mentol murni} - \% \text{ mentol tidak bereaksi}}{\% \text{ mentol murni}} \times 100\%$$

3.5.2 Uji *In Silico*

A. Persiapan Ligan

Ligan yang digunakan dalam penelitian ini adalah l-menthol, vinil asetat, asam asetat anhidrid, dan l-menthil asetat. Ligan-ligan tersebut diperoleh dari *Chemspider Search and Share Chemistry* (www.chemspider.com) dengan tipe file.mol. Optimasi geometri ligan menggunakan perangkat lunak *HyperChem Professional* untuk memperoleh struktur ligan yang paling stabil. Hasil optimasi yang diperoleh disimpan dengan format file.hin yang kemudian dikonversi ke bentuk file.pdb menggunakan *Open Babel GUI* agar dapat dibaca oleh perangkat lunak *Discovery Studio 2016* dan *iGemDock v2.1*.

B. Persiapan Makromolekul (Enzim)

Makromolekul yang digunakan adalah struktur tiga dimensi enzim lipase dari *Candida antarctica recombined Aspergillus oryzae* yang diperoleh dari Protein Data Bank (www.pdb.org) dengan kode akses 4ZV7 dan disimpan dalam format file.pdb sehingga dapat dibaca oleh *Discovery Studio 2016* dan *iGemDock v2.1*. Makromolekul yang diunduh merupakan makromolekul kompleks yang mengandung air dan molekul ligan, sehingga makromolekul tersebut perlu dioptimasi.

Optimasi makromolekul menggunakan *Discovery Studio 2016*. Tujuan dari optimasi makromolekul ini adalah untuk memperoleh makromolekul berupa protein saja, sehingga interaksi yang terjadi hanya antara ligan dengan sisi aktif enzim. Hasil optimasi disimpan dengan format file.pdb agar dapat dibaca oleh perangkat lunak *Discovery Studio 2016*.

C. Proses *Docking*

Proses *docking* dilakukan dengan memasukkan enzim yang telah dioptimasi pada “prepare binding site.” Kemudian, dimasukkan ligan yang telah dioptimasi pada “prepare compound.” Ligan yang dimasukkan berupa sumber asil dan substrat sekaligus. Setelah itu, dilakukan *docking* dengan pilihan “standar docking.” Hasil *docking* kemudian dapat dilihat melalui “view docked and post-analyze.” Untuk mengetahui interaksi ligan dengan makromolekul serta residu

asam amino pada sisi aktif makromolekul secara tiga dimensi, file pdb yang telah tersimpan di file “bin” pada program *iGemdock v2.1* divisualisasikan menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio 2016*. Selain itu, untuk mengetahui pengikatan sisi aktif dengan produk reaksi, dilakukan docking antara makromolekul dan 1-menthil asetat.