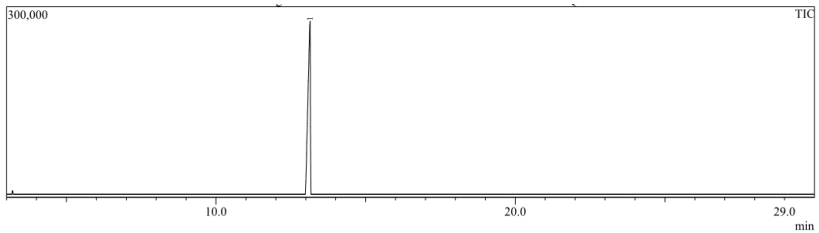


BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

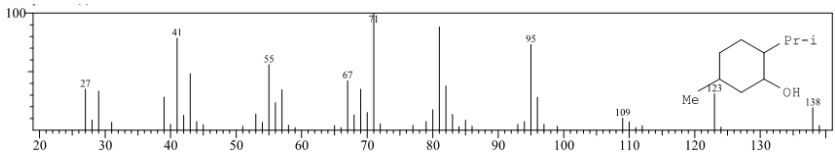
4.1 Analisis Hasil Uji In Vitro

4.1.1 Analisis Substrat (*Starting Material*) L-menthol

Senyawa l-menthol murni terlebih dahulu dianalisis menggunakan KGSM sebelum dilakukan reaksi asilasi. Berikut hasil analisis dari l-menthol murni yang dilakukan menggunakan KGSM. Dari hasil, diperoleh data seperti pada **Gambar 4.1** dan **Gambar 4.2** berikut.

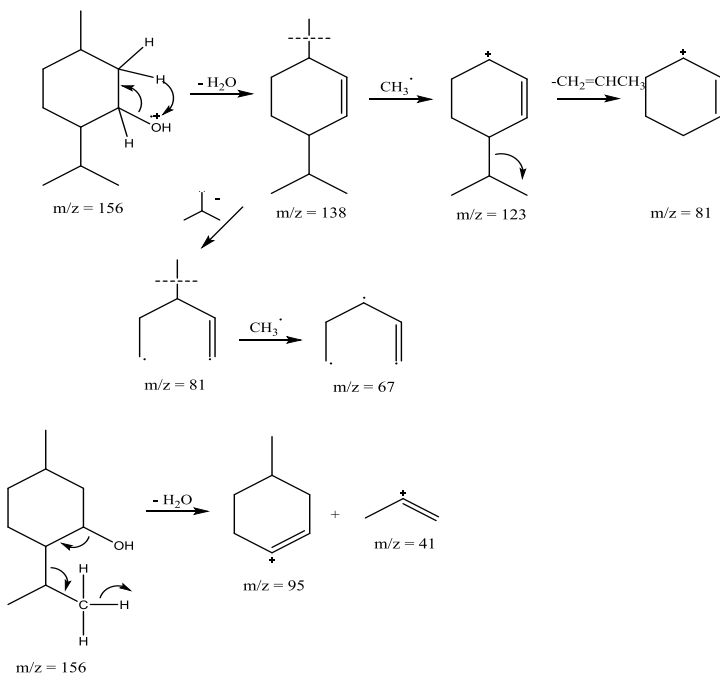


Gambar 4.1 Kromatogram senyawa l-menthol murni.



Gambar 4.2 Spektra MS l-menthol murni dengan t_R 13,139 menit.

Berdasarkan hasil KGSM tersebut, dapat diketahui bahwa *starting material* merupakan senyawa l-menthol murni. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya satu puncak dominan dengan waktu retensi 13,139 menit. Berdasarkan spektra MS pada **Gambar 4.2**, diperoleh puncak fragmentasi seperti pada **Gambar 4.3** berikut.



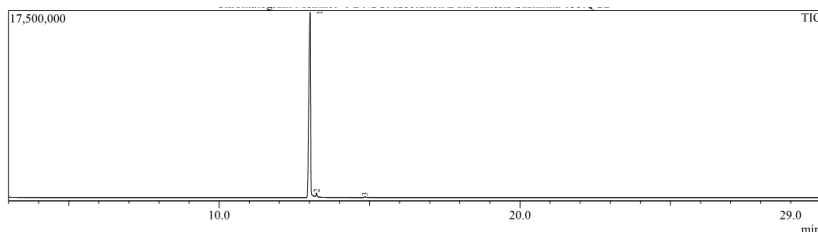
Gambar 4.3 Mekanisme fragmentasi l-menthol [26].

4.1.2 Peran Enzim Lipase *Candida antarctica Recombined Aspergillus oryzae* pada Reaksi Asilasi L-menthol

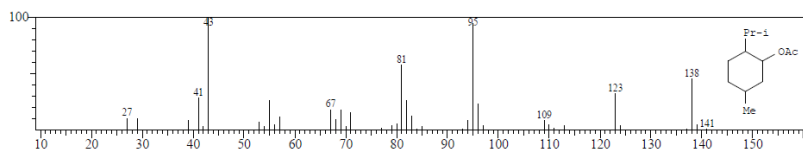
Peran enzim sebagai katalis biotik diuji melalui reaksi asilasi terhadap l-menthol selama 24 jam pada temperatur 50 °C. Pada reaksi asilasi ini digunakan variasi sumber asil, yaitu asam asetat anhidrid dan vinil asetat. Pada perlakuan ini, digunakan perbandingan mol menthol : mol sumber asil (1:3) serta pelarut yang digunakan yaitu n-heksana. Hasil reaksi yang diperoleh berupa larutan berwarna putih keruh yang diperoleh dari jam ke-4, 8, 12, 16, 20, dan 24. Keseluruhan hasil reaksi tersebut selanjutnya dianalisis menggunakan KG-SM. Produk yang mempunyai %area l-menthil asetat tertinggi dianalisis menggunakan FTIR.

A. Reaksi Asilasi L-Menthol dengan Sumber Asil Vinil Asetat

Pada reaksi asilasi menthol dengan vinil asetat sebagai sumber asil dilakukan analisis KGSM dan FTIR. Berdasarkan hasil dari KGSM pada jam ke-4, 8, 12, 16, 20, dan 24 diketahui bahwa menthil asetat hanya terbentuk pada jam ke-24. Pada jam ke-24 tersebut diperoleh 3 puncak pada kromatogram (**Gambar 4.4**).

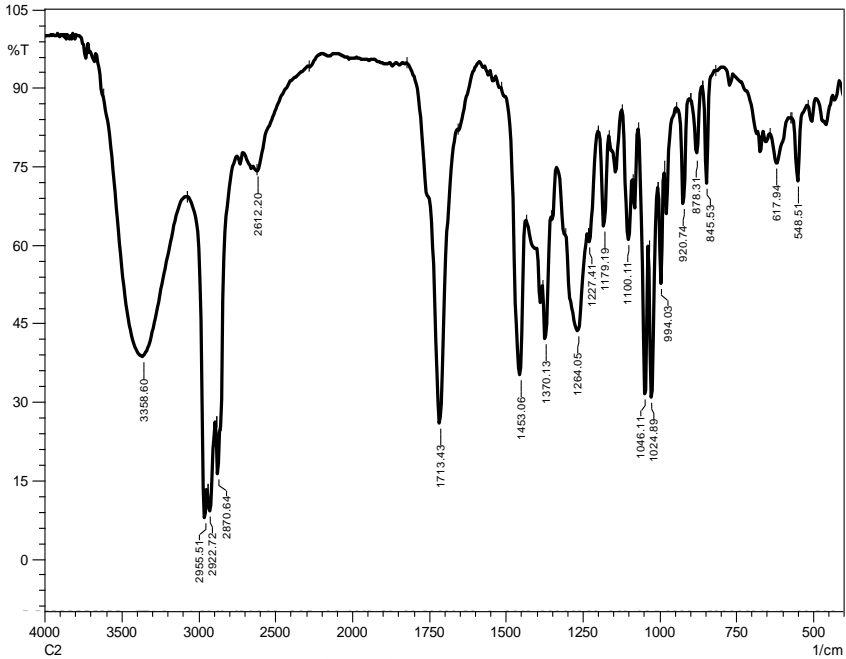


Gambar 4.4 Kromatogram reaksi asilasi l-menthol dengan sumber asil vinil asetat pada jam ke-24.



Gambar 4.5 Spektra MS l-menthil asetat pada jam ke-24.

Berdasarkan kromatogram dan spektra MS pada jam ke-24 dengan sumber asil vinil asetat, diketahui bahwa terdapat 3 puncak, dimana puncak ke-1 merupakan senyawa l-menthol dengan t_R 13,022 dan %area sebesar 98,72. Sedangkan, senyawa menthil asetat berada pada puncak ke-3 dengan t_R 14,848 menit dan %area 0,29. Sementara itu, pada jam ke-4, 8, 12, 16, dan 20, l-menthil asetat tidak terbentuk sama sekali. Oleh karenanya, dilakukan analisis menggunakan FTIR pada jam ke-24. Hasil analisis dengan FTIR tersebut ditunjukkan pada **Gambar 4.6** berikut.



Gambar 4.6 Spektra FTIR reaksi asilasi dengan sumber asil vinil asetat pada jam ke-24.

Analisis gugus fungsi berdasarkan data FTIR tersebut disajikan pada tabel berikut.

Tabel 4.1 Data serapan IR dan gugus fungsi senyawa l-menthil asetat hasil reaksi asilasi dengan sumber asil vinil asetat pada jam ke-24.

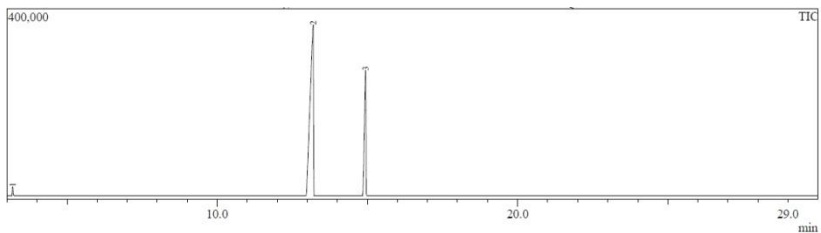
Serapan (cm^{-1})	Gugus Fungsi
2955,51	$-\text{CH}_3$
1713,43	$\text{C}=\text{O}$ karbonil
1264,05	$-\text{C}-\text{O}$ ester

Dari data FTIR tersebut dapat diketahui bahwa serapan ester yang terbentuk cenderung lemah. Hal tersebut bersesuaian dengan hasil dari KGSM, dimana l-menthil asetat (ester) yang dihasilkan mempunyai %area yang sedikit, yaitu hanya 0,29%.

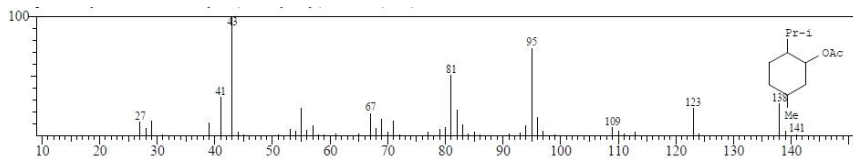
B. Reaksi Asilasi L-menthol dengan Sumber Asil Asam Asetat Anhidrid

Pada reaksi asilasi l-menthol menggunakan sumber asil asam asetat anhidrid dilakukan analisis menggunakan KGSM pada jam ke 4, 8, 12, 16, 20, dan 24. Dimana dari enam sampel tersebut setelah dianalisis dengan KGSM, semuanya menghasilkan l-menthil asetat kecuali pada jam ke-4. Berikut adalah kromatogram dan spektra MS pada jam ke-8, 12, 16, 20, dan 24.

1. Analisis Hasil pada Jam ke-8



Gambar 4.7 Kromatogram reaksi asilasi l-menthol dengan sumber asil asam asetat anhidrid pada jam ke-8.

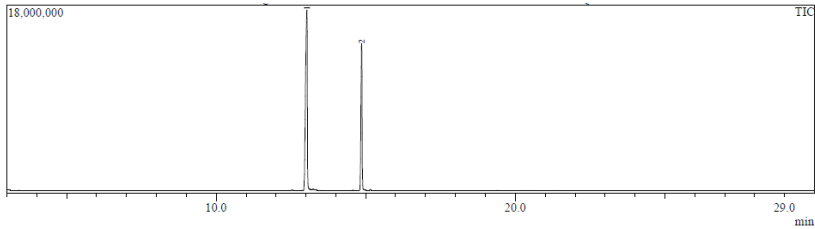


Gambar 4.8 Spektra MS l-menthil asetat pada jam ke-8.

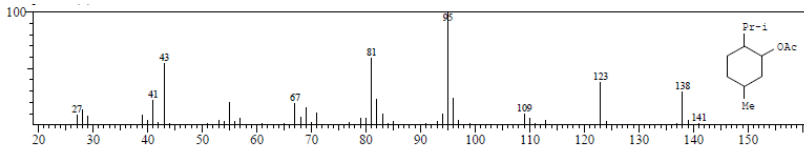
Dari kromatogram dan spektra MS tersebut diketahui bahwa terdapat 3 puncak, dimana 2 puncak tertinggi merupakan puncak dari menthol dan menthil asetat dengan %area masing-masing sebesar

74,35 dan 24,74. Waktu retensi menthol adalah 13,192 menit dan waktu retensi menthil asetat adalah 14,933 menit.

2. Analisis Hasil pada Jam ke-12



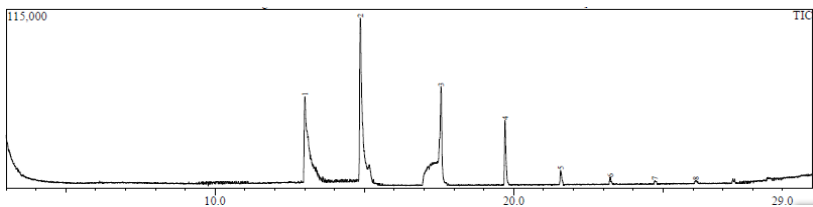
Gambar 4.9 Kromatogram reaksi asilasi l-menthol dengan sumber asil asam asetat anhidrid pada jam ke-12.



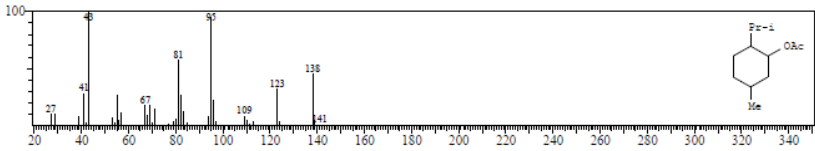
Gambar 4.10 Spektra MS l-menthil asetat pada jam ke-12.

Dari kromatogram dan spektra MS tersebut diketahui bahwa terdapat 2 puncak yang merupakan puncak dari menthol dan menthil asetat dengan %area masing-masing sebesar 64,55 dan 35,45. Waktu retensi menthol adalah 13,030 menit dan waktu retensi menthil asetat adalah 14,863 menit.

3. Analisis Hasil pada Jam ke-16



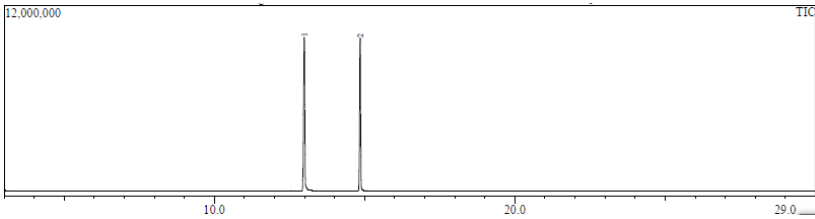
Gambar 4.11 Kromatogram reaksi asilasi l-menthol dengan sumber asil asam asetat anhidrid pada jam ke-16.



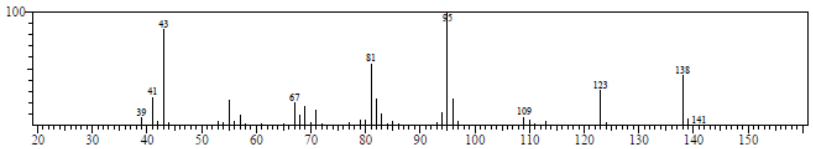
Gambar 4.12 Spektra MS l-menthil asetat pada jam ke-16.

Dari kromatogram dan spektra MS tersebut diketahui bahwa terdapat 8 puncak, dimana puncak untuk menthol dan menthil asetat masing-masing mempunyai %area sebesar 26,77 dan 43,37. Waktu retensi menthol adalah 13,006 menit dan waktu retensi menthil asetat adalah 14,864 menit.

4. Analisis Hasil pada Jam ke-20



Gambar 4.13 Kromatogram reaksi asilasi l-menthol dengan sumber asil asam asetat anhidrid pada jam ke-20.

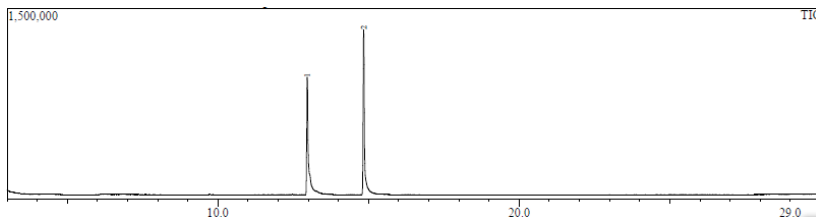


Gambar 4.14 Spektra MS menthil asetat pada jam ke-20.

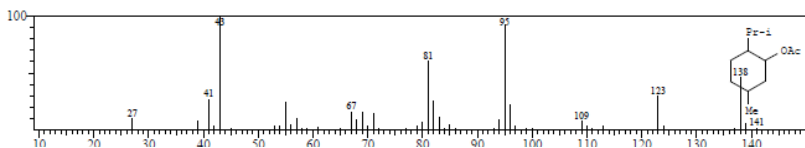
Dari kromatogram dan spektra MS tersebut diketahui bahwa terdapat 2 puncak, yaitu untuk menthol dan menthil asetat dengan masing-masing mempunyai %area sebesar 54,37 dan 45,63. Waktu

retensi menthol adalah 12,992 menit dan waktu retensi menthil asetat adalah 14,850 menit.

5. Analisis Hasil pada Jam ke-24



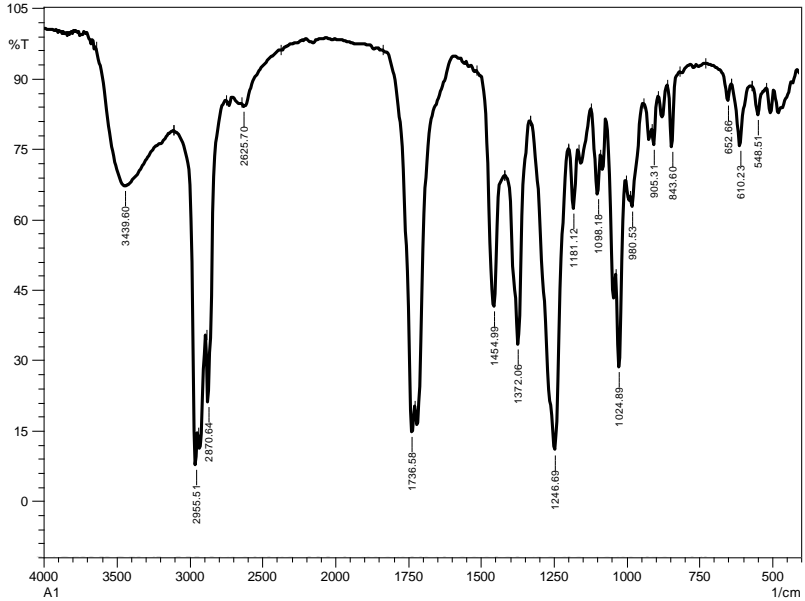
Gambar 4.15 Kromatogram reaksi asilasi dengan sumber asil asam asetat anhidrid pada jam ke-24.



Gambar 4.16 Spektra MS l-menthil asetat pada jam ke-24.

Dari kromatogram dan spektra MS tersebut diketahui bahwa terdapat 2 puncak, yaitu untuk menthol dan menthil asetat dengan masing-masing mempunyai %area sebesar 46,38 dan 58,45. Waktu retensi menthol adalah 12,966 menit dan waktu retensi menthil asetat adalah 14,837 menit.

Dari keseluruhan hasil tersebut, %area terendah senyawa menthil asetat adalah pada jam ke-8 (pada jam ke-4 tidak terbentuk menthil asetat) dan %area tertinggi pada jam ke-24. Oleh karena itu, dilakukan uji FTIR pada menthil asetat dengan %area tertinggi, yaitu pada jam ke-24. Sehingga, diperoleh spektra IR dari produk pada jam ke-24 seperti pada **Gambar 4.19** berikut.



Gambar 4.17 Spektra FTIR produk asilasi menggunakan sumber asil asam asetat anhidrid pada jam ke-24.

Analisis gugus fungsi berdasarkan data FTIR tersebut disajikan pada tabel berikut.

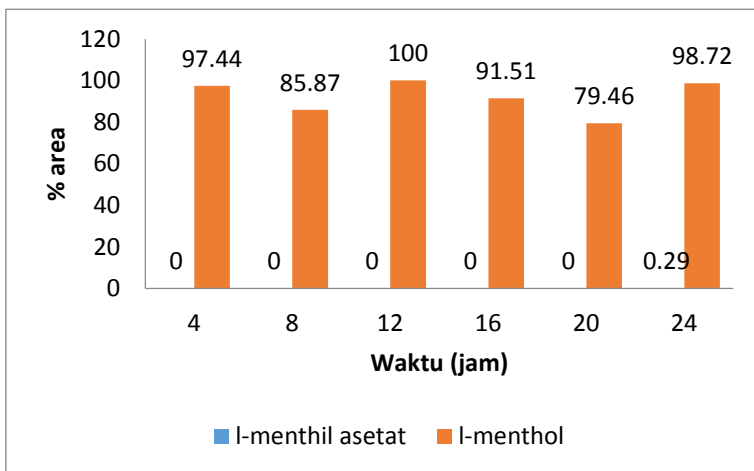
Tabel 4.2 Data serapan IR dan gugus fungsi hasil reaksi asilasi dengan sumber asil asam asetat anhidrid pada jam ke-24.

Serapan (cm^{-1})	Gugus Fungsi
2956,51	$-\text{CH}_3$
1736,58	$\text{C}=\text{O}$ karbonil
1246,69	$-\text{C}-\text{O}$ ester

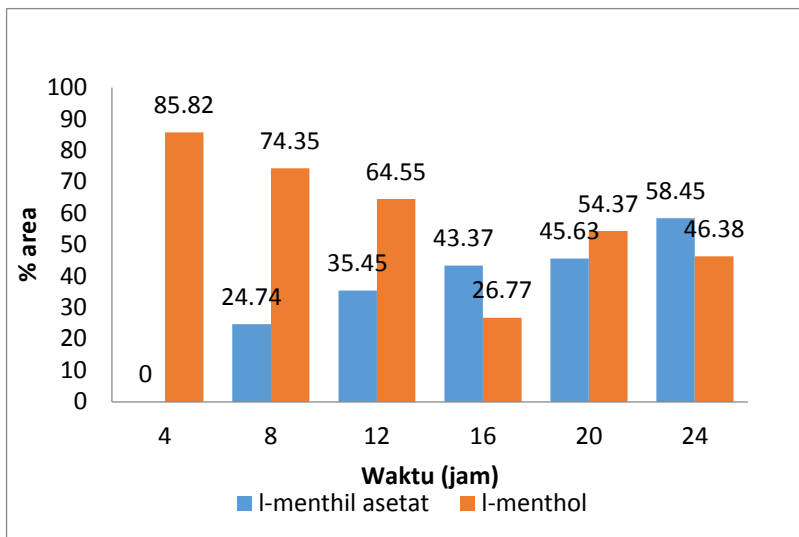
Dari spektra FTIR tersebut, dapat diketahui bahwa serapan ester relatif lebih nampak apabila dibandingkan dengan spektra FTIR dengan penggunaan vinil asetat sebagai sumber asil. Hal tersebut menunjukkan bahwa reaksi asilasi menggunakan sumber asil asam

asetat anhidrid lebih mampu menghasilkan produk ester jika dibandingkan dengan penggunaan vinil asetat sebagai sumber asil. Hal itu juga mendukung hasil dari data KGSM, dimana nilai %area reaksi asilasi menggunakan sumber asil asam asetat anhidrid pada jam ke-24 lebih banyak apabila dibandingkan dengan %area reaksi asilasi dengan sumber asil vinil asetat pada jam ke-24.

Berdasarkan hasil analisis KGSM dari reaksi asilasi l-menthol menggunakan sumber asil vinil asetat ataupun asam asetat anhidrid, dapat diketahui perbandingan %area masing-masing terhadap waktu. Berikut disajikan grafik hubungan antara %area l-menthil asetat terhadap waktu.



(a)



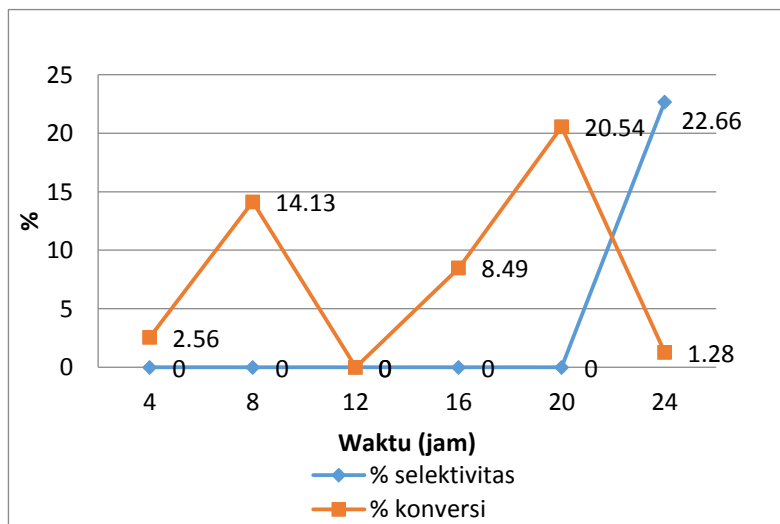
(b)

Gambar 4.18 Grafik hubungan %area l-menthyl asetat, %area l-menthol terhadap waktu: (a) sumber asil vinil asetat ; (b) sumber asil asam asetat anhidrid.

Nilai %area tersebut digunakan dalam perhitungan %selektivitas dan %konversi. Pertama adalah data perhitungan %selektivitas dan %konversi dari hasil reaksi asilasi l-menthol dengan sumber asil vinil asetat yang ditunjukkan pada **Tabel 4.3** dan **Gambar 4.19** berikut.

Tabel 4.3 Data perhitungan %selektivitas dan %konversi dari hasil reaksi asilasi l-menthol dengan sumber asil vinil asetat.

Jam	% area		% Selektivitas	% Konversi
	l-menthol	l-menthil asetat		
4	97.44	0	0	2.56
8	85.87	0	0	14.13
12	100	0	0	0
16	91.51	0	0	8.49
20	79.46	0	0	20.54
24	98.72	0.29	22.66	1.28



Gambar 4.19 Grafik hubungan %selektivitas dan %konversi terhadap waktu dari hasil reaksi asilasi l-menthol dengan sumber asil vinil asetat.

Nilai %selektivitas tersebut menyatakan prosentase kemampuan pengukuran senyawa dengan kemungkinan adanya zat-zat lain dalam reaksi (perngotor, dan sebagainya) secara tepat.

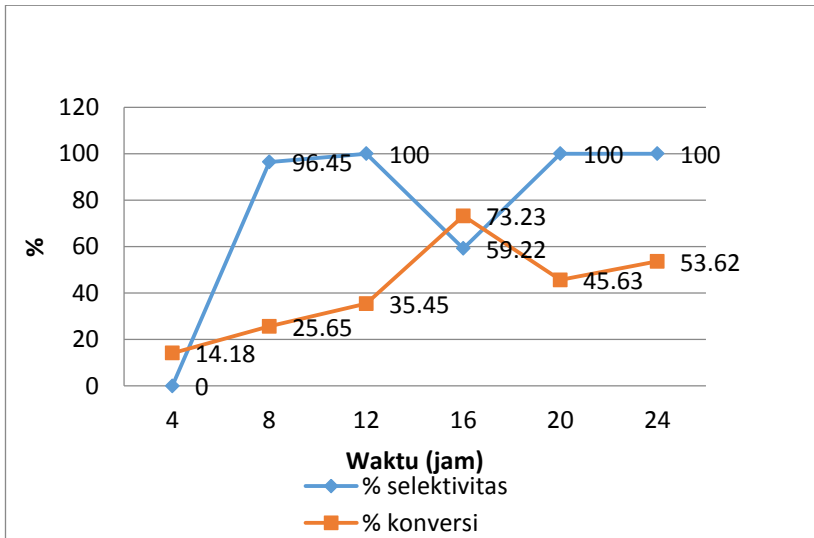
Sementara itu, %konversi menyatakan prosentase perubahan substrat menjadi produk. Dimana nilai %selektivitas dan %konversi yang tinggi menyatakan bahwa reaksi yang terjadi maksimal.

Berdasarkan data yang disajikan, dapat diketahui bahwa untuk reaksi asilasi l-menthol menggunakan sumber asil vinil asetat, %selektivitas tertinggi yaitu pada jam ke-24 dengan nilai 22,66% sementara %konversi tertinggi pada jam ke-20 dengan nilai 20,54%. Namun, pada jam ke-24 nilai %konversinya 1,28%. Tetapi, pada jam ke-20, nilai %selektivitasnya 0. Sehingga, dapat diketahui bahwa berdasarkan data tersebut, reaksi terbaik adalah pada jam ke-24. Hal tersebut dikarenakan pada jam ke-24 tersebut, nilai %selektivitas paling tinggi. Walaupun nilai %konversi pada jam ke-24 bukan merupakan %konversi tertinggi.

Selanjutnya, untuk data %selektivitas dan %konversi dari hasil reaksi asilasi l-menthol dengan sumber asil asam asetat anhidrid, ditunjukkan pada **Tabel 4.4** dan **Gambar 4.22** berikut.

Tabel 4.4 Data perhitungan %selektivitas dan %konversi dari hasil reaksi asilasi l-menthol dengan sumber asil asam asetat anhidrid.

Jam	% area		% Selektivitas	% Konversi
	l-menthol	l-menthil asetat		
4	85.82	0	0	14.18
8	74.35	24.74	96.45	25.65
12	64.55	35.45	100	35.45
16	26.77	43.37	59.22	73.23
20	54.37	45.63	100	45.63
24	46.38	58.45	100	53.62



Gambar 4.20 Grafik hubungan %selektivitas dan %konversi terhadap waktu dari hasil reaksi asilasi l-menthol dengan sumber asil asam asetat anhidrid.

Berdasarkan data yang disajikan, dapat diketahui bahwa untuk reaksi asilasi l-menthol menggunakan sumber asil asam asetat anhidrid, %selektivitas tertinggi yaitu 100% sementara %konversi tertinggi pada jam ke-16. Sama seperti pada reaksi menggunakan sumber asil vinil asetat, perbandingan %selektivitas dan %konversi di jam yang sama tidak sebanding. Dari data dapat diketahui bahwa pada jam ke-24, dengan nilai %selektivitas tertinggi, %konversi yang diperoleh hanya 53,62%. Sama halnya dengan pada jam ke-16, dengan %konversi tertinggi, %selektivitas yang diperoleh hanya 59,22%. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa reaksi asilasi optimum menggunakan sumber asil asam asetat anhidrid adalah pada jam ke-24. Hal tersebut dikarenakan nilai %selektivitasnya sudah mencapai 100% dan %konversi telah mencapai lebih dari 50%.

Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa reaksi asilasi l-menthol, baik menggunakan sumber asil vinil asetat maupun asam asetat anhidrid, sama-sama optimum pada jam ke-24. Namun,

berdasarkan data yang ada, hasil %konversi tidak menunjukkan nilai optimum. Hal tersebut dikarenakan nilai %selektivitas juga tidak menunjukkan hasil yang besar. Kemungkinan yang dapat terjadi adalah dikarenakan adanya inhibitor yang menghambat kerja enzim lipase. Pada umumnya, inhibitor lipase menyerang sisi aktif lipase yaitu serin dan glisin serta berikatan secara kovalen dengan sisi aktif tersebut. Inhibitor ini mampu bekerja optimal dalam menghambat sisi aktif lipase setelah 40% produk terbentuk. Tetapi, di sisi lain, inhibitor lipase tersebut juga mampu berikatan dengan bagian enzim yang bebas atau enzim yang telah berikatan dengan substrat (kompleks enzim-substrat). Inhibitor lipase yang sering menghambat dapat berasal dari produk samping yang dihasilkan selama reaksi. Jika dihubungkan dengan hasil penelitian yang diperoleh, dapat dikatakan bahwa setelah produk terbentuk pada jam-jam awal, terbentuk juga produk samping. Produk samping tersebut berikatan dengan kompleks enzim-substrat sehingga pada jam berikutnya enzim tidak mampu menghasilkan produk reaksi lebih banyak daripada jam sebelumnya.

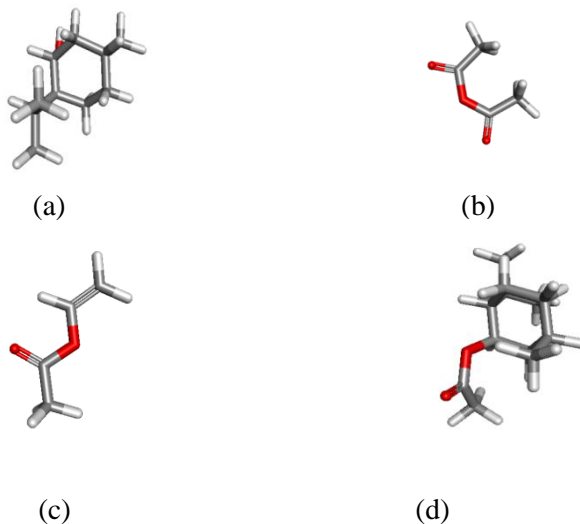
4.2 Analisis Hasil Uji *In Silico*

4.2.1 Optimasi Ligan dan Makromolekul

Metode pemodelan komputer (*in silico*) dilakukan untuk mengetahui interaksi yang terjadi antara ligan dengan reseptor yang dapat digunakan sebagai acuan dasar agar penelitian secara *in vitro* dilakukan dengan hasil yang optimal.

Ligan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain senyawa l-menthol, asam asetat anhidrid, vinil asetat, dan l-menthil asetat yang diperoleh dari *Chemspider Search and Share Chemistry* (www.chemspider.com). L-menthol merupakan substrat yang digunakan sebagai prekursor pembentuk senyawa menthil asetat, sedangkan asam asetat anhidrid dan vinil asetat merupakan senyawa yang akan mendonorkan asil pada l-menthol, serta l-menthil asetat digunakan sebagai ligan untuk docking dengan produk. Pada penelitian ini digunakan sumber asil yang berbeda, agar dapat dibandingkan hasil dengan sumber asil yang mana yang akan menghasilkan interaksi stabil. Sehingga, hasilnya nanti dapat dibandingkan dengan uji *in vitro*.

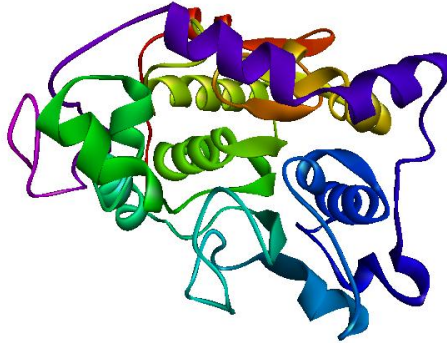
Preparasi ligan l-menthol, asam asetat anhidrid, vinil asetat, dan l-menthil asetat dilakukan menggunakan *HyperChem*. Hal tersebut bertujuan untuk memperoleh konformasi ligan dengan struktur geometri yang paling stabil. Selanjutnya hasil optimasi tersebut disimpan dalam bentuk file .pdb menggunakan *OpenBabel GUI*. Hal tersebut dimaksudkan agar dapat dilakukan docking pada ligan hasil optimasi. Hasil optimasi ligan dapat dilihat pada **Gambar 4.21** berikut.



Gambar 4.21 Hasil preparasi ligan: (a) l-menthol, (b) asam asetat anhidrat, (c) vinil asetat, (d) l-menthil asetat.

Makromolekul yang digunakan merupakan lipase *Candida antarctica Recombined Aspergillus oryzae*. Makromolekul ini diperoleh dari Protein Data Bank (www.rcsb.org) dengan kode 4zv7. Makromolekul dengan kode 4zv7 tersebut merupakan lipase triasilgliserol (EC 3.1.1.3). Makromolekul tersebut merupakan lipase B dengan struktur monomer, bersifat asimetris, dan mempunyai sistem ekspresi (rekombinan) *Aspergillus oryzae*. Makromolekul 4zv7 tersebut masih berikatan dengan air dan dua ligan NAG (N-acetyl-D-glucosamine), sehingga harus dilakukan optimasi. Tujuan dari optimasi makromolekul ini adalah untuk memperoleh

makromolekul yang hanya mengandung reseptor protein saja, sehingga interaksi yang terjadi hanya interaksi antara ligan dengan reseptor. Hasil optimasi makromolekul tersebut dapat dilihat pada **Gambar 4.25** berikut.



Gambar 4.22 Lipase-B dari *Candida antarctica Recombined Aspergillus oryzae* yang dioptimasi menggunakan *Accelrys Discovery Studio 2016*.

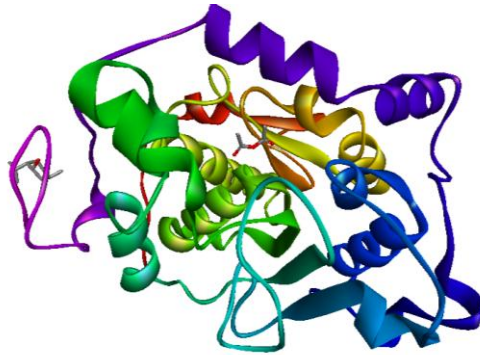
4.2.2 Analisis Hasil Docking

A. Hasil Docking Tanpa Produk

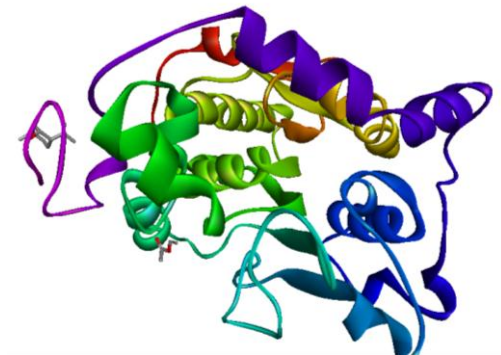
Tahapan selanjutnya adalah melakukan proses docking. Proses *docking* dilakukan menggunakan *software iGemDock v2.1* antara makromolekul dengan ligan, dimana setiap proses *docking* digunakan makromolekul (4zv7), 1-menthol, dan sumber asil. Sehingga dari *docking* yang telah dilakukan, diperoleh dua hasil *docking* yaitu *docking A* dan *docking B*. *Docking A* merupakan hasil *docking* antara makromolekul, 1-menthol, dan asam asetat anhidrid. *Docking B* merupakan hasil *docking* antara makromolekul, 1-menthol, dan vinil asetat. Pada setiap *docking* yang telah dilakukan, diperoleh nilai ΔG^0 .

Energi Gibbs tersebut digunakan untuk menghitung harga K_i (Konstanta Inhibisi). Konstanta inhibisi (K_i) diasumsikan sama dengan konstanta disosiasi (K_d). Semakin besar K_d , maka semakin mudah makromolekul untuk melepaskan substrat. Pada pendekatan

ini, dibutuhkan harga K_d yang besar. Hal tersebut dikarenakan apabila semakin besar harga K_d , maka ikatan antara makromolekul dan substrat tidak stabil, sehingga substrat mudah terlepas dari makromolekul dan mampu berikatan dengan substrat yang lain untuk membentuk produk. Selain itu, dengan harga K_d yang besar maka makromolekul (enzim lipase) akan dapat terlepas dari substrat dan kembali ke bentuk enzim semula. Hasil docking yang diperoleh ditunjukkan pada **Gambar 4.26** berikut.



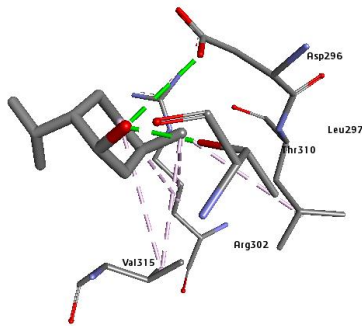
(a)



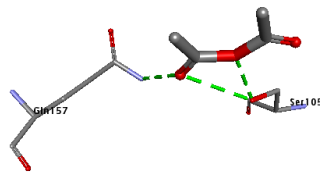
(b)

Gambar 4.23 Interaksi makromolekul dan ligan: (a) ligan l-menthol dan asam asetat anhidrid ; (b) ligan l-menthol dan vinil asetat.

Berdasarkan hasil interaksi tersebut, dilakukan analisis pada tiap-tiap ligan. Pada *docking* A diketahui bahwa sisi aktif yang berikatan dengan l-menthol adalah Asparagin, Threonin, Arginin, Valin, dan Leusin (**Gambar 4.27**). Pada gambar tersebut, dapat diketahui bahwa adanya garis putus-putus berwarna hijau menunjukkan ikatan hidrogen. Sedangkan, garis putus-putus berwarna merah muda menunjukkan ikatan antara sisi aktif enzim dengan alkil dari l-menthol.



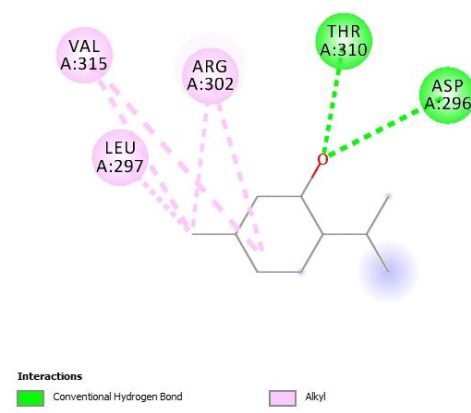
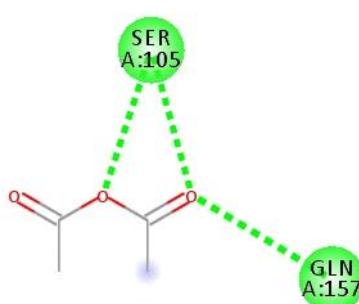
(a)



(b)

Gambar 4.24 Visualisasi 3D sisi aktif lipase dari *Candida antarctica recombinated Aspergillus oryzae* dengan (a) l-menthol ; (b) asam asetat anhidrid.

Secara lebih mendetail, ikatan antara tiap-tiap sisi aktif dengan l-menthol tersebut divisualisasikan melalui diagram 2D pada **Gambar 4.27** berikut.

Ligan	2D-Interaction (r = Å)
l-mentol	 <p>The diagram shows the chemical structure of l-mentol (1-menthyl ethanol) interacting with five amino acid residues. The interactions are as follows:</p> <ul style="list-style-type: none"> Conventional Hydrogen Bonds (green dashed lines): <ul style="list-style-type: none"> THR A:310 (O-H...O) ASP A:296 (O-H...O) Alkyl Interactions (pink dashed lines): <ul style="list-style-type: none"> VAL A:315 (C-H...O) ARG A:302 (C-H...O) LEU A:297 (C-H...O) <p>Legend: ■ Conventional Hydrogen Bond ■ Alkyl</p>
Asam asetat anhidrid	 <p>The diagram shows the chemical structure of acetic anhydride interacting with two amino acid residues. The interactions are as follows:</p> <ul style="list-style-type: none"> Conventional Hydrogen Bonds (green dashed lines): <ul style="list-style-type: none"> SER A:105 (O-H...O) GLN A:157 (O-H...O)

Gambar 4.25 Visualisasi 2D antara sisi aktif lipase dari *Candida antarctica recombined Aspergillus oryzae* dengan (a) l-menthol ; (b) asam asetat anhidrid.

Dari interaksi tersebut, dapat diketahui bahwa Arginin pada rantai asam amino nomor 302, Valin pada rantai 315, dan Leusin pada rantai 297 berikatan dengan alkil l-menthol. Untuk Arginin dan Valin, selain berikatan dengan alkil, keduanya juga berikatan dengan siklik enam dari l-menthol. Selain itu, gugus hidroksil pada l-menthol berikatan dengan Threonin pada rantai atom 310 dan Aspartat pada rantai 296 melalui ikatan hidrogen. Sementara itu untuk sisi aktif yang berikatan dengan asam asetat anhidrid yaitu Serin pada rantai 105 dan Glutamin pada rantai 157.

Energi gibbs yang diperoleh dari hasil docking merupakan energi yang berasal dari ikatan tiap-tiap sisi aktif dengan sumber asil ataupun l-menthol. Energi gibbs yang diperoleh berharga minus, yang menunjukkan bahwa reaksi terjadi secara spontan. Harga ΔG^0 tersebut dihitung menggunakan rumus berikut.

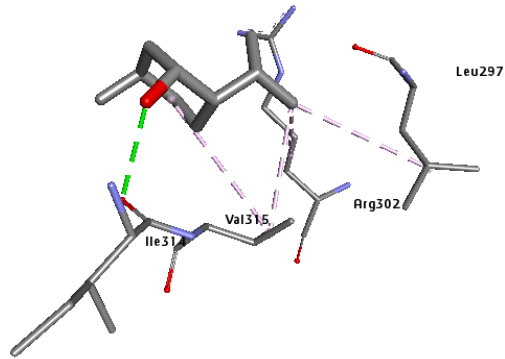
$$\Delta G^0 = -RT \ln[Kd]$$

Tabel 4.5 Data energi hasil docking A

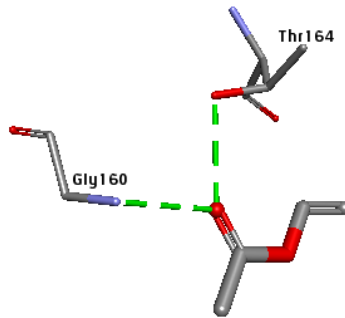
Ligan	ΔG^0	VDW	HBond	Kd
Asam asetat anhidrid	-50.986	-33.666	-17.320	1,267
l-menthol	-62.476	-51.855	-10.621	1,295

Kd merupakan konstanta disosiasi atau konstanta pengionan dan sering disebut konstanta ketidakstabilan. Makin besar harga Kd, maka semakin kurang stabil dan kompleksnya semakin lemah atau mudah terpecah menjadi komponen-komponennya dan sebaliknya.

Harga Kd l-menthol lebih besar dibandingkan harga Kd asam asetat anhidrid. Hal tersebut menunjukkan bahwa l-menthol lebih mudah terlepas dari makromolekul dan berikatan dengan ligan yang lainnya (dalam hal ini adalah asam asetat anhidrid). Sementara, untuk energi-energi pada docking B (makromolekul, l-menthol, dan vinil asetat) ditunjukkan pada **Tabel 4.6** berikut.



(a)

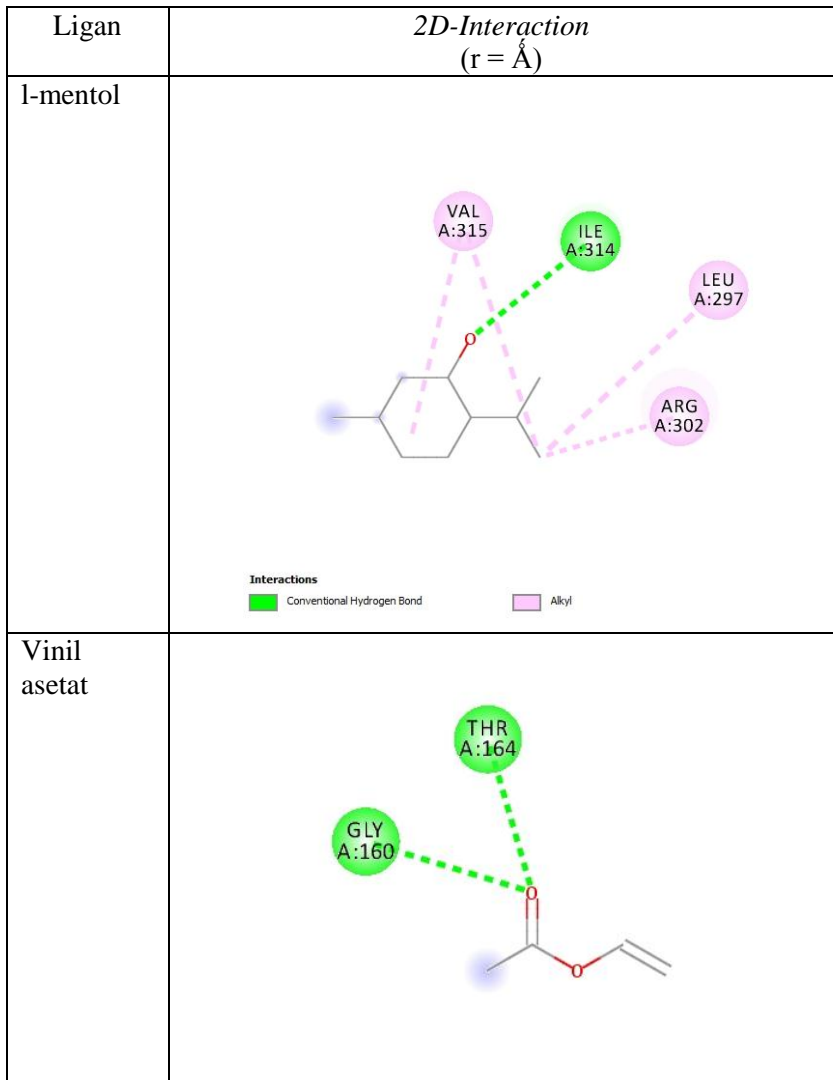


(b)

Gambar 4.26 Visualisasi 3D sisi aktif lipase dari *Candida antarctica recombinated Aspergillus oryzae* dengan (a) l-menthol ; (b) vinil asetat.

Berbeda dari docking A, docking B menunjukkan bahwa l-menthol berikatan dengan isoleusin melalui ikatan hidrogen. Sementara itu, valin, arginin, dan leusin berikatan secara alkil. Di sisi lain, untuk sumber asil yaitu vinil asetat berikatan dengan threonin dan glisin. Untuk lebih detailnya, ditunjukkan visualisasi 2D

interaksi antara makromolekul, l-menthol, dan vinil asetat pada **Gambar 4.29** berikut.



Gambar 4.27 Visualisasi 2D antara sisi aktif lipase dari *Candida antarctica recombined Aspergillus oryzae* dengan (a) l-menthol ; (b) vinil asetat.

Berikut tabel data energi dari hasil docking untuk docking antara makromolekul, l-menthol, dan vinil asetat (**Tabel 4.6**).

Tabel 4.6 Data energi hasil docking B

Ligan	ΔG^0	VDW	HBond	Kd
l-menthol	-63.445	-50.629	-12.816	1,295
Vinil asetat	-47.309	-34.309	-13.000	1,203

Sama halnya seperti data pada docking A. Docking B menunjukkan bahwa harga Kd l-menthol lebih besar dibandingkan dengan Kd vinil asetat. Hal tersebut juga menunjukkan bahwa pada docking menggunakan sumber asil vinil asetat, l-menthol lebih mudah terlepas dari makromolekul dan berikatan dengan ligan yang lainnya (dalam hal ini adalah vinil asetat).

Berdasarkan disosiasi molekul, asam asetat anhidrid mampu membentuk ion asetat dengan harga Kd sebesar 4,6. Sementara itu, vinil asetat mampu membentuk ion vinilat dengan Kd sebesar 1,6. Hal tersebut menunjukkan bahwa berdasarkan hasil docking dan teori bersesuaian, dikarenakan Kd dari asam asetat anhidrid lebih besar jika dibandingkan Kd vinil asetat. Hal itu yang menjadikan asam asetat anhidrid lebih mudah untuk melepaskan asil dan mendonorkannya kepada substrat (menthol), sehingga reaksi asilasi menggunakan asam asetat anhidrid lebih mudah terjadi.

Apabila dibandingkan dengan ikatan yang terjadi pada asil dari asam asetat anhidrat, sisi aktif yang berikatan dengan kedua sumber asil tersebut berbeda. Pada asam asetat anhidrat, sisi aktif yang berikatan dengan asil adalah serin dan glisin. Sedangkan pada vinil asetat, sisi aktif yang berikatan dengan asil adalah treonin dan glisin. Kedua asil tersebut sama-sama mengikat glisin, tetapi pada rantai asam amino yang berbeda. Dimana pada asam asetat anhidrat, glisin yang berikatan dengan asil adalah nomor 157 dan pada vinil asetat adalah glisin nomor 160. Sehingga, hal tersebut yang kemungkinan menyebabkan asam asetat anhidrid mempunyai kemampuan sebagai donor asil yang lebih bagus dibandingkan dengan vinil asetat. Selain ditinjau dari sisi aktif, perbedaan kedua sumber asil juga dapat dilihat melalui energi yang diperoleh dari hasil docking, yaitu melalui energi gibbs.

Energi gibbs yang diperoleh dari hasil docking merupakan energi yang berasal dari ikatan tiap-tiap sisi aktif dengan sumber asil ataupun menthol. Energi gibbs yang diperoleh berharga minus, yang menunjukkan bahwa reaksi terjadi secara spontan. Pada hasil docking antara makromolekul 4zv7 dengan l-menthol dan asam asetat anhidrat, diperoleh nilai energi gibbs (ΔG^0) untuk makromolekul dan l-menthol sebesar 62,48 kal/mol. Sementara, untuk ΔG^0 makromolekul dan asam asetat anhidrat sebesar -50,99 kal/mol. Harga ΔG^0 tersebut dihitung menggunakan rumus berikut.

$$\Delta G^0 = -RT \ln[K_d]$$

Sehingga, melalui hasil perhitungan tersebut diperoleh nilai Kd untuk makromolekul dan l-menthol sebesar 1,295 dan nilai Kd untuk makromolekul dan asam asetat anhidrat 1,267.

Harga Kd makromolekul-menthol lebih besar dibandingkan dengan Kd makromolekul-asetat anhidrid. Hal tersebut menandakan bahwa menthol lebih mudah terlepas dari enzim. Sehingga, dapat dengan mudah berikatan dengan asam asetat anhidrat. Hal tersebut memudahkan terjadinya donor asil dari asam asetat anhidrid ke l-menthol, sehingga reaksi asilasi dapat terjadi.

Pada hasil docking antara makromolekul 4zv7 dengan l-menthol dan vinil asetat, diperoleh nilai energi gibbs (ΔG^0) untuk makromolekul dan l-menthol sebesar -60,97 kal/mol. Sementara, untuk ΔG^0 makromolekul dan asam asetat anhidrid sebesar -43,65 kal/mol. Dimana dengan perhitungan seperti pada Kd hasil docking pertama, diperoleh harga Kd makromolekul-menthol sebesar 1,295 dan Kd makromolekul-vinil asetat sebesar 1,203. Sama seperti pada Kd docking pertama, Kd sumber asil (vinil asetat) lebih kecil dibandingkan Kd menthol. Hal tersebut menjadikan menthol mudah terlepas dari enzim dan berikatan dengan vinil asetat, sehingga terjadi donor asil dari vinil asetat ke menthol.

Selanjutnya, harga Kd asam asetat anhidrid dan vinil asetat dibandingkan (Kd asam asetat anhidrid = 1,267 ; Kd vinil asetat = 1,203). Hal tersebut menunjukkan bahwa vinil asetat lebih terikat dengan makromolekul (enzim) dikarenakan harga Kd-nya lebih kecil dari Kd asam asetat anhidrid, sehingga ikatan makromolekul-vinil asetat lebih stabil. Hal tersebut menjadikan vinil asetat sebagai

sumber asil tidak mudah untuk mendonorkan asilnya ke l-menthol, dikarenakan enzim dan vinil asetat terikat kuat. Oleh karena itu, jika dibandingkan dengan asam asetat anhidrat, vinil asetat tidak mampu menjadi donor asil yang baik pada reaksi asilasi.

Berdasarkan data tersebut juga dapat diketahui bahwa energi konformasi pada ikatan antara asam asetat anhidrid dengan l-menthol sebesar 11,49 kal sementara itu energi konformasi l-menthol dengan vinil asetat sebesar 16,14 kal. Hal tersebut menunjukkan bahwa energi asam asetat anhidrid lebih kecil dibandingkan vinil asetat. Semakin besar energi konformasi, maka semakin sulit untuk berikatan. Jika energi konformasi kecil, jarak asil ke menthol akan lebih pendek. Hal tersebut menunjukkan stabilitas molekul yang besar.

Analisis interaksi antara ligan dengan sisi aktif residu makromolekul juga menunjukkan terjadinya interaksi *electrostatic* dan interaksi *van der Waals*. Interaksi *electrostatic* merupakan interaksi yang terjadi karena adanya gaya tarik-menarik antara inti atom dengan elektron atom lain. Gaya ini umumnya terdapat pada senyawa yang bersifat polar. Interaksi *van der Waals* merupakan interaksi yang terjadi karena adanya gaya tarik-menarik suatu molekul akibat kepolaran dari molekul tersebut yang bersifat permanen atau terinduksi. Kepolaran permanen terjadi akibat adanya kepolaran di dalam molekul, sedangkan kepolaran tidak permanen terjadi akibat molekul terinduksi oleh partikel lain yang bermuatan sehingga molekul bersifat polar sesaat secara spontan [29].

Senyawa menthol merupakan senyawa yang mempunyai sifat kepolaran relatif lebih rendah daripada air. Hal tersebut dikarenakan menthol merupakan salah satu jenis senyawa alkohol. Pada umumnya, semakin panjang rantai karbon suatu alkohol maka polaritasnya semakin berkurang. Alkohol mengandung gugus hidroksil (R-OH) yang menjadi pusat interaksi yang bersifat hidrofilik. Dalam hal ini senyawa yang bertindak sebagai penginduksi merupakan ligan senyawa alkohol, sedangkan sisi aktif residu asam amino bertindak sebagai zat yang terinduksi. Sehingga makromolekul akan bermuatan sementara dan terjadi interaksi *van der Waals*. Oleh karena itu semakin banyak jumlah atom C pada senyawa ligan, maka senyawa tersebut semakin bersifat non polar

atau hidrofobik, sehingga interaksi *van der Waals* yang terjadi akan semakin meningkat dan interaksi *electrostatic* akan semakin sedikit.

Pada tinjauan ini, dapat diketahui bahwa harga energi *Van der Waals* hasil docking relatif besar. Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tersebut bersifat non polar atau hidrofobik. Oleh karenanya, energi elektrostatisnya kecil. Dalam artian, senyawa yang bersifat polar (hidrofilik) juga sangat sedikit.

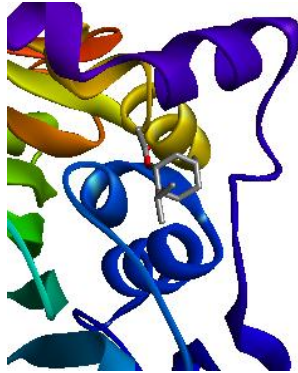
Selain menggunakan data energi docking, efektivitas sumber asil yang digunakan juga dapat ditinjau melalui harga hidrofobisitas. Melalui perhitungan diketahui bahwa untuk docking menggunakan sumber asil asam asetat anhidrid, diperoleh nilai hidrofobisitas sebesar 0,1. Sementara dengan menggunakan sumber asil vinil asetat diperoleh nilai hidrofobisitas sebesar -4.6.

Semakin minus atau semakin kecil harga perhitungan tersebut, maka semakin hidrofobik senyawa yang berikatan dengan makromolekul. Sebaliknya, semakin besar harga perhitungan tersebut, maka semakin hidrofilik senyawa yang berikatan dengan makromolekul. Hal tersebut sesuai dengan perhitungan yang dilakukan. Oleh karenanya dapat dikatakan bahwa, asam asetat anhidrid lebih bersifat hidrofilik dibandingkan vinil asetat. Hal tersebut menjadikan asam asetat anhidrid lebih bersifat polar dan mudah berikatan dengan molekul air melalui ikatan Hidrogen.

Dari uraian di atas, dapat dikatakan bahwa melalui teori docking, asam asetat anhidrid lebih mudah untuk mendonorkan asil kepada menthol jika dibandingkan dengan vinil asetat.

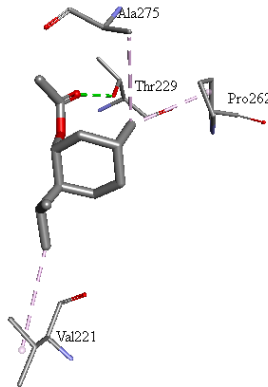
B. Hasil Docking Menggunakan Produk

Docking menggunakan produk berupa senyawa l-menthil asetat dilakukan untuk mengetahui sisi aktif yang mengikat l-menthil asetat tersebut. Sisi aktif tersebut nantinya dijadikan tinjauan untuk mekanisme reaksi, sama halnya dengan pada docking tanpa produk. Berikut hasil docking yang diperoleh (**Gambar 4.30**).



Gambar 4.28 Interaksi makromolekul dan produk (menthil asetat).

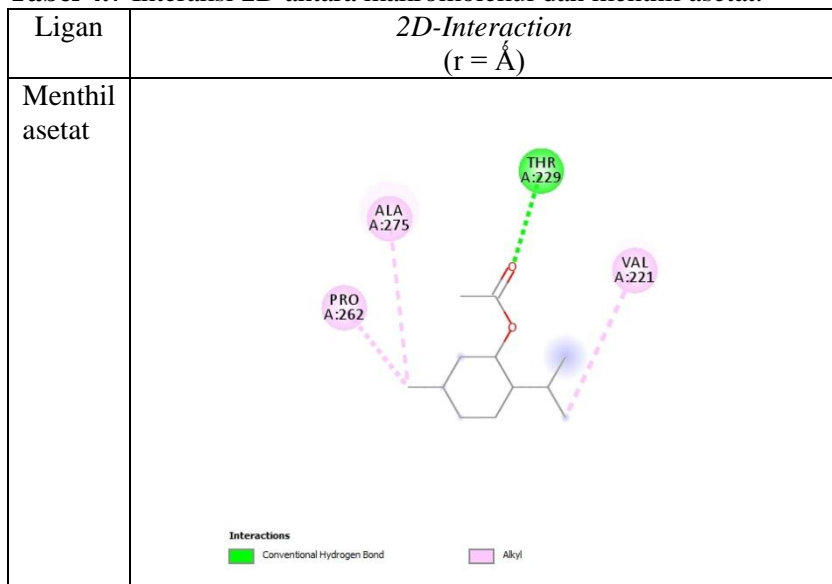
Secara lebih mendetail, ikatan antara tiap-tiap sisi aktif dengan l-menthil asetat tersebut divisualisasikan melalui diagram 3D pada **Gambar 4.31** berikut.



Gambar 4.29 Visualisasi 3D interaksi antara sisi aktif dengan l-menthil asetat.

Secara lebih detail, interaksi antara sisi aktif dan l-menthil asetat tersebut divisualisasikan melalui diagram 2D pada **Tabel 4.7**.

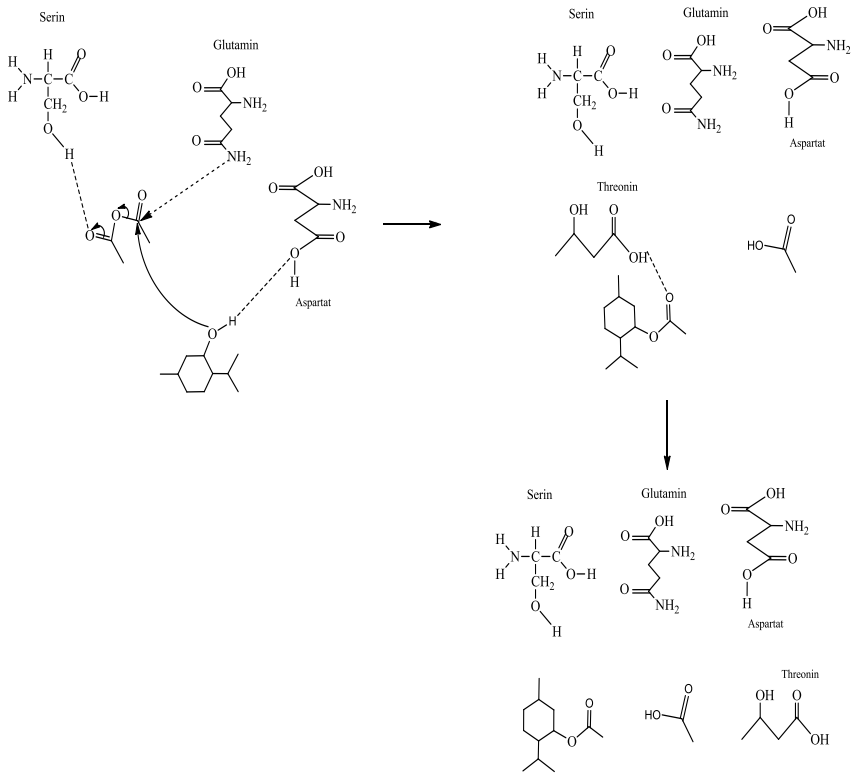
Tabel 4.7 Interaksi 2D antara makromolekul dan menthil asetat.



Berdasarkan hasil tersebut, dapat diketahui bahwa sisi aktif yang berikatan dengan menthil asetat adalah threonine, yaitu melalui ikatan Hidrogen. Sementara, prolin, alanine, dan valin berikatan melalui ikatan alkil. Threonin mengikatan O asil dari menthil asetat. Jika dihubungkan dengan hasil docking tanpa produk, maka dapat diketahui bahwa docking menggunakan asam asetat anhidrid, vinil asetat, maupun menthil asetat, ketiganya sama-sama berikatan dengan residu asam amino yaitu threonin. Selanjutnya, dilakukan analisis hubungan antara docking A dan docking B, masing-masing dengan docking menggunakan produk untuk mengetahui mekanisme reaksi asilasi yang mungkin terjadi.

4.3 Analisis Mekanisme Reaksi Asilasi Enzimatis

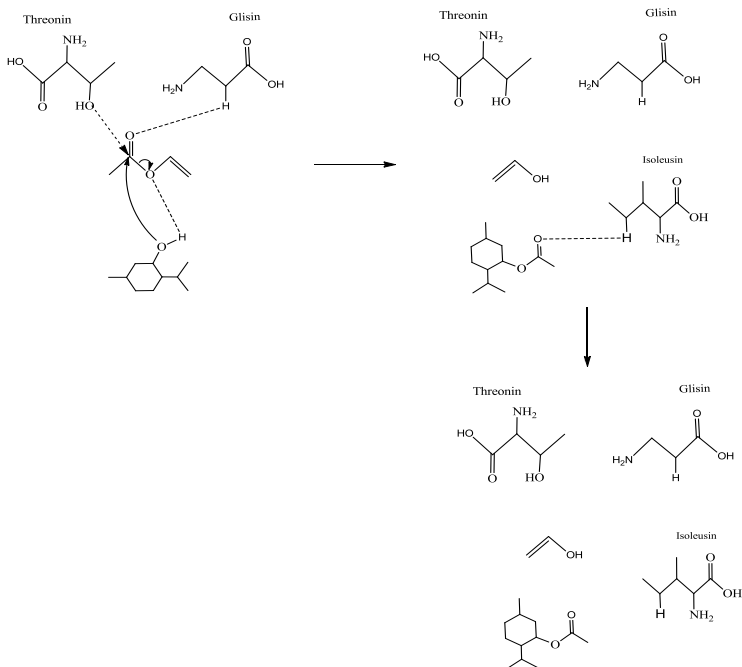
Dari data docking menggunakan produk dan tanpa produk, diketahui sisi aktif yang berikatan dengan l-menthol, sumber asil, maupun l-menthil asetat. Hal tersebut mampu dijadikan acuan dalam memprediksi mekanisme reaksi asilasi yang terjadi.



Gambar 4.30 Mekanisme reaksi asilasi menggunakan sumber asil asam asetat anhidrid.

Pada mekanisme tersebut dapat dijelaskan bahwa pada awal mekanisme reaksi, terbentuk asil dan ion asetat hasil dari putusanya ikatan pada asam asetat anhidrid. Sementara itu, H dari menthol terlepas. Selanjutnya, O⁻ dari ion asetat distabilkan oleh H dari residu asam amino serin dan juga mengikat H menthol yang terlepas. Di sisi lain, C asil (muatan positif) diikat oleh *lone pair*

electron yang berasal dari N amina pada residu asam amino glutamin. Sementara untuk menthol yang telah melepas H, atom O bermuatan negatif pada menthol tersebut mengikat H dari residu asam amino aspartat. Pada tahap kedua dari mekanisme tersebut, asil terlepas dari residu asam amino glutamin dan berikatan dengan O⁻ menthol. Pada tahap ketiga dari mekanisme, semua enzim kembali ke struktur awal dan H dari residu asam amino threonin menstabilkan =O dari menthil asetat yang sudah terbentuk. Pada akhir reaksi, selain terbentuk menthil asetat juga terbentuk asam asetat. Dimana OH asam asetat tersebut nantinya akan berikatan dengan H dari menthol lagi dan membentuk H₂O, sehingga H₂O dapat terlepas dan terbentuk asil lagi. Asil tersebut yang akan berikatan kembali dengan residu asam amino dan O⁻ menthol untuk membentuk menthil asetat lagi. Pada mekanisme reaksi yang kedua (**Gambar 4.31**) ditunjukkan mekanisme reaksi asilasi menggunakan sumber asil vinil asetat.



Gambar 4.31 Mekanisme reaksi asilasi menggunakan sumber asil vinil asetat.

Pada mekanisme tersebut, pertama ion vinilat dan asil terlepas. Selanjutnya, C asil (muatan positif) diikat oleh *lone pair electron* dari O gugus OH residu asam amino dari threonin. Sementara itu, O asil distabilkan oleh H residu asam amino dari glisin. Selanjutnya, atom H dari gugus OH menthol terlepas dan berikatan dengan O⁻ ion vinilat. Sementara itu, asil yang sudah berikatan dengan residu asam amino dari threonin, terlepas dan berikatan dengan -O menthol membentuk menthil asetat. Dimana sebelumnya, O dari menthol distabilkan dahulu oleh H dari CH₂ pada residu asam amino isoleusin.

Pada mekanisme reaksi dengan sumber asil vinil asetat, residu asam amino dari glisin hanya menstabilkan O asil dari vinil asetat. Penstabilan tersebut juga hanya berasal dari H pada CH₂ residu asam amino glisin. Hal tersebut yang menjadikan vinil asetat lebih sulit untuk mendonorkan asil. Sehingga produk reaksi asilasi dengan sumber asil vinil asetat lebih sedikit jika dibandingkan dengan menggunakan sumber asil asam asetat anhidrid. Hal ini juga didukung dengan data hasil docking, dimana harga Kd dari makromolekul-asetat anhidrid lebih besar daripada makromolekul-vinil asetat. Sehingga pelepasan asil dari asetat anhidrid lebih mudah jika dibandingkan dari vinil asetat.

Hal ini juga dapat ditinjau dari hasil uji *in vitro*. Dimana berdasarkan grafik selektivitas dan konversi dari uji *in vitro* pada **4.1**, dapat diketahui bahwa menthil asetat mengalami kenaikan seiring dengan bertambahnya waktu reaksi. Apabila dibandingkan dengan hasil dari reaksi menggunakan sumber asil vinil asetat, reaksi dengan sumber asil asam asetat anhidrid lebih maksimal. Hal itu dikarenakan pada reaksi dengan vinil asetat, hanya pada jam ke-24 saja terbentuk menthil asetat. dengan %area sebesar 0,29. Berbeda jauh dengan hasil reaksi menggunakan sumber asil asam asetat anhidrid, dimana pada setiap jam, kecuali pada jam ke-4, terjadi kenaikan produk.

Sehingga, berdasarkan hasil uji *in silico* dan juga analisis mekanisme reaksi, dapat dikatakan bahwa hasil dari uji *in silico* mendukung atau sesuai dengan hasil uji *in vitro*. Dimana kedua uji tersebut sama-sama menunjukkan bahwa reaksi asilasi menthol lebih mampu menghasilkan produk menthil asetat jika menggunakan sumber asil asam asetat anhidrid