

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya. Analisis produk sintesis dengan FTIR dan GC-MS dilakukan di UPT Instrumen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya. Pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan Februari sampai dengan Juni 2017.

3.2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan untuk pemodelan interaksi ligan dengan reseptor berdasarkan kajian *in silico* adalah ligan senyawa lain (-)-isopulegol, L-mentol, asam asetat anhidrat, vinil asetat. Ligan diperoleh dari Chemspider Search and Share Chemistry (<http://www.chemspider.com>). Reseptor yang digunakan berupa enzim Rhizomucor miehei Triacylglycerolacyl hidrolase dengan kode 3TGL yang diperoleh dari RCSBProtein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian berdasarkan kajian *in vitro* antara lain (-)-isopulegol, L-mentol, enzim lipase *Rhizomucor miehei* teramobil pada Immobead 100 dari Sigma-Aldrich, n-heksana, asam asetat anhidrat, vinil asetat.

3.3. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan untuk pemodelan interaksi ligan dengan reseptor berdasarkan kajian *in silico* adalah perangkat keras berupa laptop dengan spesifikasi *processor Intel(R)Core (TM)i3—350M CPU @ 2.27 GHz* dengan *memory 2,00 GB RAM*, dan *operating system Windows 7 ultimate 64-bit*, beberapa jenis perangkat lunak yang digunakan meliputi *HyperChem, Open Babel GUI, Accelrys Discovery Studio Visualizer 2.5* dan *iGEMDOCK v2.1*. Peralatan yang digunakan dalam penelitian berdasarkan kajian *in-vitro* antara lain seperangkat alat gelas, bola hisap, *magnetic stirrer, sentrifuge*, neraca analitik, pemanas listrik, thermometer raksa, dan kromatografi gas-spektroskopi massa (GCMS-QP2010S Shimadzu) dan FT-IR shimadzu.

3.4. Tahapan Penelitian

3.4.1 Tahapan Penelitian In Vitro

Tahapan penelitian berdasarkan kajian *in vitro* adalah sebagai berikut:

1. Analisis substrat (starting material) campuran isopulegol dan mentol
2. Penentuan efektifitas lipase *Rhizomucor miehei* dengan dilakukan reaksi asilasi campuran isopulegol dan mentol dengan sumber asil asam asetat anhidrida dan vinil asetat
3. Penentuan perbedaan reaksi asilasi campuran isopulegol dan mentol menggunakan sumber asil asam asetat anhidrat yang dibandingkan dengan sumber asil vinil asetat
4. Karakterisasi produk reaksi enzimatik menggunakan KG-SM dan FTIR
5. Analisis data

3.4.2 Tahapan Penelitian *In Silico*

Tahapan penelitian berdasarkan kajian *in silico* adalah sebagai berikut:

1. Download struktur molekul ligan senyawa (-)-isopulegol, L-mentol, asam asetat anhidrat, vinil asetat di *ChemSpider Search and Share Chemistry*
2. Download makromolekul enzim *Rhizomucor miehei Triacylglycerolacyl hidrolase 3TGL* di *RCSB Protein data Bank*
3. Optimasi struktur molekul ligan menggunakan *HyperChem Professional* dan *Open Babel GUI*
4. Optimasi struktur makromolekul 3TGL di *Discovery Studio Visualizer 2.5*
5. Proses *docking* ligan terhadap makromolekul menggunakan *iGEMDOCK v2.1*
6. Analisis parameter hasil *docking*

3.5. Prosedur Kerja

3.5.1 Tahapan Interaksi Ligan-Reseptor berdasarkan Kajian *In Vitro*

A Analisis substrat (*starting material*) senyawa campuran (-)-isopulegol dan l-mentol

Substrat berupa campuran (-)-isopulegol dan L-mentol sintetis sebanyak 0.1 mL dimasukkan ke dalam botol vial dan ditambahkan n-heksana 0.7 mL, kemudian dilakukan analisis dengan KG-SM dan FT-IR.

B Penentuan efektifitas lipase *Rhizomucor miehei* dengan melakukan reaksi asilasi campuran isopulegol dan mentol dengan sumber asil asam asetat anhidrat dan vinil asetat

Enzim lipase ditimbang sebanyak 0.15 g kemudian enzim tersebut dimasukkan ke dalam wadah tertutup (volume 100 mL). Selanjutnya ditambahkan n-heksana 15 mL dan asam asetat anhidrat 5 mL. Campuran tersebut diaduk menggunakan magnetic stirrer sambil ditambahkan(-) isopulegol sebanyak 5 mL perlahan (tetes demi tetes) ke dalam wadah tertutup tersebut. Proses pengadukan dilakukan pada pemanasan 50°C selama 24 jam. Kemudian campuran tersebut di sentrifuge selama 5 menit. Produk asilasi yang diperoleh dianalisis dengan KG-SM dan FTIR. Prosedur yang sama dilakukan untuk reaksi asilasi campuran isopulegol dan mentol dengan sumber asil vinil asetat.

C Karakterisasi produk hasil reaksi siklisasi-asilasi sitronelal dan isopulegol

C.1 Karakterisasi dengan kromatografi gas spektrometer massa (KG-SM)

Produk hasil reaksi siklisasi-asilasi dianalisis dengan menginjeksikan sampel 0,2 μ L menggunakan *syringe* pada instrumen KG-SM Shimadzu QP2010S. Puncak yang terdeteksi pada kromatogram di analisis menggunakan spektra massa, sehingga hasil akhir analisis didapatkan 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 injektor	: 225°C
Kecepatan aliran gas	: 50 mL/menit
Gas pembawa	: Gas He

Hasil yang diperoleh dari analisis KGSM berupa kromatogram massa. Dari kromatogram tersebut. Selain itu, dari pola fragmentasi senyawa yang ada pada kromatogram massa, dapat diperkirakan struktur senyawa yang terbentuk.

C.2 Karakterisasi menggunakan spektrofotometer FTIR

Karakterisasi produk asilasi dengan spektrofotometer FT-IR akan menghasilkan spektra yang menunjukkan hubungan antara % transmisi dengan bilangan gelombang yang berkisar antara 4000-400 cm^{-1} . Analisis dilakukan dengan meneteskan sampel berupa hasil reaksi asilasi pada pellet KBr untuk padatan dan NaCl *window* untuk sampel 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.

D Analisis data

Karakterisasi hasil reaksi menggunakan kromatografi gas-spektroskopi massa (KG/SM) sehingga didapatkan data berupa spektrogram dari KG dan pola fragmentasi yang didapatkan dari MS. Berdasarkan profil KG/SM produk siklisasi-asilasi campuran sitronelaldan isopulegoldapat diketahui % konversi serta % selektivitas enzim lipase terhadap isopulegil asetat melalui rumus,

$$\% \text{ selektivitas} = \frac{\% \text{ Isopulegil asetat}}{\% \text{ substrat awal} - \% \text{ substrat akhir}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Konversi} = \frac{\% \text{ substrat awal} - \% \text{ substrat akhir}}{\% \text{ substrat awal}} \times 100\%$$

$$\% \text{ selektivitas} = \frac{\% \text{ Mentilasetat}}{\% \text{ substrat awal} - \% \text{ substrat akhir}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Konversi} = \frac{\% \text{ substrat awal} - \% \text{ substrat akhir}}{\% \text{ substrat awal}} \times 100\%$$

3.5.2 Tahapan Pemodelan Interaksi Ligan-Reseptor berdasarkan Kajian *In Silico*

Pemodelan ini dilakukan terhadap ligan senyawa campuran L-mentol dan (-) isopulegol, asam asetat anhidrat, vinil asetat dengan makromolekul enzim Rhizomucor miehei *Triacylglyceride lipase*. Upaya dalam pemodelan ini digunakan untuk pemetaan residu asam amino pada reseptor yang berinteraksi secara selektif dengan senyawa alkohol. Pemodelan interaksi antara ligan dengan makromolekul secara *in silico* diuraikan dalam subbab sebagai berikut:

A Persiapan Ligan

Persiapan ligan dilakukan dengan cara mengunduh berbagai ligansenyawa L-mentol, (-)isopulegol, asam asetat anhidrat, vinil asetat dari *ChemSpider Search and Share Chemistry*(<http://www.chemspider.com>) dengan type 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 *iGEMDOCK*.

B. Persiapan reseptor

Persiapan reseptor dilakukan dengan cara mengunduh makromolekul enzim Rhizomucor miehei *Triacylglycerolacyl hidrolasee* dari *RCSB Protein Data Bank*(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) dengan kode 3TGL dengan type file.pdb. Makromolekul yang diunduh merupakan makromolekul kompleks yang mengandung air dan terdapat molekul ligan. Optimasi makromolekul ini menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio Visualizer 2.5* dengan menghilangkan kandungan air dan melepaskan molekul ligan dari pengikatan sisi aktifnya dengan cara dihapus (delete). Tujuan dari optimasi makromolekul ini

untuk memperoleh makromolekul yang hanya mengandung reseptor protein saja, sehingga interaksi yang terjadi hanya interaksi antara ligan dengan reseptor. Hasil optimasi makromolekul yang diperoleh disimpan dengan format file.pdb agar dapat dibaca oleh perangkat lunak *iGEMDOCK*

C. Running docking

Penentuan *grid box* interaksi antara ligan dengan reseptor menggunakan perangkat lunak *iGEMDOCK v2.1* dengan tahap *setup GA(generic evolutionary) parameter*. Tahap *generic evolutionary* merupakan tahap penentuan parameter yang digunakan untuk docking. Parameter yang digunakan meliputi *population size = 200*, *generations = 70*, *number of solution = 3*. Kemudian dilakukan *docking*. File disimpan dalam ekstensi *.dock*. Perkiraan posisi dan energi dilihat pada *view docked poses and post-analyze*.