

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2017 hingga bulan Mei 2017 di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Instrumentasi Jurusan Kimia FMIPA UNIVERSITAS BRAWIJAYA

3.2 Alat Penelitian

Alat – alat yang digunakan pada penelitian secara *in vitro* adalah neraca analitik, seperangkat alat gelas, *magnetic stirrer*, bola hisap, termometer raksa spektroskopi massa KG-SM QP2010S shimadzu dan FT-IR shimadzu. Sedangkan alat-alat yang digunakan pada penelitian berdasarkan metode *in silico* adalah perangkat keras berupa laptop Acer dengan spesifikasi *processor AMD C-Series C50 @ 1.0 GHz* dengan memory *RAM 1.00 GB*, beberapa jenis perangkat lunak yang digunakan meliputi *HyperChem*, *Open Babel GUI*, *Accelrys Discovery Studio Visualizer2.5*, *AutoDockTools-1.5.6.*, *iGEMDOCK*, dan *Discovery Studio 2016*.

3.3 Bahan Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian secara *in vitro* adalah enzim lipase dari mikroorganisme *Candida antarctica* *terimobil (immobead 150) rekombinan Aspergillus oryzae*, n-hexana, etil asetat, l-mentil asetat, etanol, larutan Na_2CO_3 . Sedangkan bahan - bahan yang digunakan pada penelitian berdasarkan metode *in silico* meliputi struktur 3D makromolekul CALB yang diunduh dari (www.pdb.org) dengan kode akses 4ZVJ. Ligan yang digunakan ialah n-hexana, etil asetat, l-mentil asetat, etanol, dan l-mentol yang diperoleh dari *Chemspider Search and Share Chemistry* (www.chemspider.com).

3.4 Tahapan Penelitian

1. Uji *in vitro* reaksi hidrolisis l-mentil asetat menggunakan enzim lipase dari *Candida antarctica* B
2. Karakterisasi produk menggunakan KG-SM dan FT-IR
3. Uji *in silico* ligan terhadap makromolekul CALB
4. Analisis data

3.5 Prosedur Penelitian

- 3.5.1 Uji *in vitro* reaksi hidrolisis l-mentil asetat menggunakan enzim lipase dari *Candida antarctica* B

A. Analisis starting material

l-mentil asetat sebanyak 0.1 mL dimasukkan dalam botol vial, kemudian ditambah pelarut n-hexana sebanyak 0.7 mL. Kemudian dianalisis menggunakan KG-SM. Setelah dianalisis dengan KG-SM, dilanjutkan dengan analisis menggunakan FTIR tanpa penambahan pelarut.

B. Hidrolisis l-mentil asetat dengan variasi pelarut

Pada reaksi hidrolisis l-mentil asetat, enzim lipase dari *Candida antarctica* ditimbang sebanyak 0.15 g, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer *with screw up* 100 mL. Kemudian ditambah pelarut n-hexana sebanyak 17 mL, setelah itu ditambah 3 mL larutan Na_2CO_3 dan 5 mL l-mentil asetat. Kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 24 jam dengan temperatur 50°C . Sampel dicuplik setiap 8, 16, dan 24 jam dan dimasukkan ke dalam botol vial. Kemudian dilakukan prosedur yang sama untuk pelarut etanol.

3.5.2 Karakterisasi produk menggunakan KG-SM dan FT-IR

Hasil hidrolisis l-mentil asetat selama 24 jam diinjeksikan menggunakan *syringe* pada instrumen KG-MS shimadzu QP2010S. Setiap puncak yang terdeteksi dianalisis menggunakan spektra massa. Hasil akhirnya akan diperoleh data berupa kromatogram dan spektra massa dari produk yang dihasilkan. Dari kromatogram dapat terbaca jenis senyawa yang terkandung dalam produk yang dihasilkan. Serta persen area dan berat molekul dari produk yang telah dianalisis. Sehingga dapat diperkirakan jenis senyawa yang telah terbentuk. Spesifikasi alat KG-MS adalah:

Jenis kolom	: Kolom kapiler Restrex Rtx-5
Fasa diam	: 5% difenil atau 95% dimetil polisiloksan
Panjang kolom	: 30 meter
Temperatur kolom	: $60 - 215^\circ\text{C}$
Temperatur injector	: 310°C
Kecepatan aliran gas	: 50 mL/menit
Gas pembawa	: Gas He

Produk hasil hidrolisis l-mentil asetat perlu dianalisis dengan spektrofotometer FT-IR untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat pada produk yang telah terbentuk. Analisis dilakukan

meneteskan produk yang diperoleh ke pellet KBr. Kemudian diletakkan di dalam ruang sampel pada spektrofotometer FT-IR.

Berdasarkan profil hasil analisis melalui KG-MS hidrolisis l-mentil asetat dapat diketahui %konversi serta %selektivitas enzim lipase dari mikroorganisme *Candida antarctica* Lipase B terhadap l-mentil asetat melalui rumus:

$$\% \text{selektivitas} = \frac{\%1 - \text{mentol}}{\% \text{substrat awal} - \% \text{substrat akhir}} \times 100\%$$
$$\% \text{konversi} = \frac{\% \text{substrat awal} - \% \text{substrat akhir}}{\% \text{substrat awal}} \times 100\%$$

3.5.1 Uji *in silico* senyawa l-mentil asetat terhadap makromolekul CALB

A. Preparasi ligan

Pertama – tama ligan diunduh terlebih dahulu melalui *chemspider.com*, sehingga diperoleh ligan dengan ekstensi (.mol). Setelah itu dilakukan optimasi ligan menggunakan perangkat lunak *hyperchem*. Optimasi bertujuan untuk memperoleh ligan dengan struktur yang paling stabil, kemudian ligan yang telah dioptimasi diubah dalam bentuk pdb menggunakan perangkat lunak *Open Babel GUI*, sehingga dapat dibaca oleh perangkat *Autodock* dan *iGEMDOCK*.

B. Preparasi makromolekul

Makromolekul CALB diunduh terlebih dahulu melalui *pdb.org*. Sehingga akan diperoleh makromolekul CALB dengan kode 4ZVJ dalam bentuk 3 dimensi. Kemudian makromolekul dioptimasi menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio Visualizer 2016* untuk menghilangkan air dan ligan yang terikat pada sisi aktif makromolekul. Sehingga diperoleh interaksi ligan dan makromolekul yang paling ideal. Kemudian makromolekul disimpan dalam bentuk pdb, sehingga dapat dibaca dalam perangkat lunak *AutoDockTools-1.5.6* dan *iGemdock*.

C. Proses docking

Running melalui perangkat lunak *AutoDockTools-1.5.6* diawali dengan preparasi koordinat ligan dan makromolekul. Dimana ligan dan makromolekul diubah dari format *pdb* menjadi *pdqt*. Kemudian dilakukan *running autogrid*. Pada tahap ini dapat

ditentukan posisi dan ukuran *grid box* (kisi kubus) pada makromolekul yang akan di *docking*. Kemudian disimpan dalam format *.gpf*. Kemudian dilakukan *running grid* menggunakan program *cmd*:

Running autodock meliputi tahapan penentuan rigiditas pada makromolekul, pemilihan ligan, penentuan parameter menggunakan *genetic algorithm*, serta penentuan output pada *lamarckian GA*, kemudian disimpan dalam format *.dpf*.

Multiligan doking berguna untuk mengetahui interaksi antara ligan – ligan yang terlibat terhadap makromolekul CALB. Serta dapat mengetahui bagaimana pengaruh pelarut terhadap interaksi antara substrat dengan makromolekul. Pada *docking* multiligan, senyawa ligan l-mentil asetat dan l-mentol akan berinteraksi dengan makromolekul CALB menggunakan perangkat lunak iGEMDOCK. Selain itu pelarut n-hexana dan etanol juga akan bertindak sebagai ligan yang berinteraksi dengan substrat dan makromolekul CALB. Dari program iGEMDOCK, diperoleh hasil berupa *best pose*, hasil analisis, dan tabel interaksi. Dari hasil analisis dapat diketahui harga delta G, sehingga dapat digunakan untuk menentukan nilai Kd.

Analisa hasil *docking* menunjukkan nilai Kd dan delta G, berdasarkan nilai tersebut dapat diketahui seberapa kuat interaksi antar makromolekul dengan ligan. Kemudian untuk mengetahui interaksi antara ligan dengan makromolekul maka perlu digunakan perangkat lunak *Discovery Studio Visualizer 2016*. Sehingga dapat diketahui interaksi dan residu asam amino yang terlibat.