

STUDI MOLEKUL ODORANT DARI TURUNAN ESTER ASETAT BERDASARKAN KAJIAN *IN SILICO* DAN *IN VITRO*

Febriyana Rizky Hapsari, Edi Priyo Utomo*, Siti Mariyah Ulfa

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran Malang 65145

*Alamat korespondensi, Tel : +62-341-575838, Fax : +62-341-575835
Email : edipu2000@yahoo.com

ABSTRAK

Hubungan Struktur dan Bau (HSB) suatu molekul telah dipelajari berdasarkan interaksinya dengan reseptor olfaktori tikus (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini dilakukan melalui pendekatan pemodelan (*in silico*) dan sintesis kandidat molekul beraroma dari molekul patchouli asetat (*in vitro*). Reseptor yang digunakan adalah protein olfaktori tikus yang diunduh dari *Protein Data Bank* dengan kode akses 3FIQ. Struktur molekul tiga dimensi odorant dari kelompok senyawa ester asetat rantai lurus, siklis, dan bisiklis diunduh dari *National Center for Biotechnology Information*. Struktur molekul ligan dioptimasi dengan perangkat lunak Hyperchem hingga diperoleh struktur molekul stabil. Setiap ligan didocking pada reseptor olfaktori untuk membentuk kompleks reseptor – ligan menggunakan *AutoDock Tools* – 1.5.4. Percobaan *in vitro* dilakukan dengan mensintesis patchouli asetat dari patchouli alkohol, asam asetat anhidrat, dan asam sulfat pekat sebagai katalis. Hasil sintesis dianalisis menggunakan GCMS dan uji organoleptik. Hasil kajian *in silico* menunjukkan bahwa konstanta disosiasi (K_d) dari ester asetat semakin kecil dengan bertambahnya jumlah atom karbon, namun aroma yang dihasilkan semakin enak dengan *note fruity, sweet* dan *waxy*. Akan tetapi untuk ester asetat rantai siklis dan bisiklis menunjukkan aroma dengan kecenderungan *note waxy* dan *woody*. Kandidat molekul beraroma patchouli asetat menunjukkan aroma *soft woody* dan *sineol (eucalyptus)*, sedangkan patchouli alkohol memiliki aroma *hard woody*. Semua ester asetat membentuk ikatan van der Waals dengan residu Leu116, interaksi elektrostatis semakin melemah tetapi interaksi hidrofobik semakin meningkat.

Kata kunci : Ester asetat, Hubungan Struktur dan Bau, *in silico*, *in vitro*

ABSTRACT

Structure-Odor Relationship (SOR) of molecules has been studied by investigating the interaction odorant molecules with rat olfactory receptors (*Rattus norvegicus*). This study was conducted by modeling approach (*in silico*) and synthesis of molecule candidate of patchouli acetate (*in vitro*). The receptor is a rat protein crystal which downloaded from Protein Data Bank with the access code 3FIQ. Three-dimensional molecular of odorant from the compound of straight-chain, cyclic and bicyclic of acetate esters was downloaded from National Center for Biotechnology Information. Its molecular structure was optimized using Hyperchem software to obtain the most stable structures. Each ligands were docked into the olfactory receptor to form receptor – ligand complex by using Autodock Tools – 1.5.4. An experiment performed by synthesizing patchouli acetate from patchouli alcohol, acetic acid anhydride, and sulfuric acid as catalyst. The product were analyzed using GCMS and organoleptic test. Based on *in silico* studies, the dissociation constant (K_d) of acetic ester trend to smaller value when the number of carbon atoms increased, but the aroma with notes of fruit, sweet and waxy more pleasant. But, for the cyclic and bicyclic ester derivatives showed a trend with waxy and woody note. Candidate aroma molecules patchouli acetate showed a soft woody aroma and sineol (eucalyptus), while patchouli alcohol has a hard woody aroma. All the acetate ester forming van der Waals bonds with residues Leu116, but electrostatic interactions become weaker while increasing hydrophobic interactions.

Keywords : Ester acetate, *in silico*, *in vitro*, Structure-Odor Relationship

PENDAHULUAN

Tanaman nilam (*Pogostemon cablin Benth*) menghasilkan minyak atsiri yang mengandung patchouli alkohol sebesar 44,5% yang digunakan sebagai bahan pengikat (fiksatif) pada industri parfum [1]. Berdasarkan hasil penelitian, minyak nilam dapat memberikan berbagai macam

pengaromaan yang dideskripsikan sebagai aroma *woody*, *earthy*, dan *sweet* [2]. Hingga saat ini penelitian tentang deskripsi aroma masih berkembang. Teori bentuk molekul beraroma (*odotope*) menyatakan bahwa ukuran, bentuk, dan kelompok fungsional senyawa *odorant* menentukan aktivitas reseptor penciuman, sehingga akan menghasilkan karakter bau tertentu. Akan tetapi, teori *odotope* memiliki daya prediksi lemah karena tidak semua molekul yang memiliki bentuk sama, akan menghasilkan aroma yang sama [3]. Selanjutnya, Turin mengemukakan bahwa aroma suatu molekul dipengaruhi oleh vibrasi ikatan dalam molekul beraroma. Teori tersebut menyatakan bahwa semua molekul mempunyai spektrum vibrasi, sehingga molekul yang tidak bervibrasi tidak dapat menghasilkan aroma [4]. Hingga saat ini untuk mendeskripsikan molekul beraroma masih menggunakan metoda hedonik [5]. Identifikasi tipe bau dengan metoda hedonik sangat bersifat individualistik dan tergantung pada ketajaman penciuman peserta panelis.

Setiap reseptor mengenali berbagai *odorant* dan setiap *odorant* dapat terikat pada lebih dari satu reseptor untuk membangkitkan pola aktivasi spesifik pada setiap bau yang berbeda [6]. Beberapa *odorant* berinteraksi dengan residu-residu asam amino tertentu pada reseptor secara spesifik. Namun, untuk mengetahui interaksi *odorant* dan reseptor diperlukan analisis yang membutuhkan sejumlah variabel *odorant* yang sangat banyak, serta berbagai tipe reseptor. Oleh karena itu, untuk mengurangi biaya dan pekerjaan penelitian yang panjang diperlukan metoda yang sederhana, salah satunya melalui pemodelan (*in silico*). Secara virtual, interaksi *odorant* dengan reseptor olfaktori digambarkan dalam perspektif tiga dimensi pada sisi-sisi aktif residu asam amino. Interaksi ini menghasilkan informasi seberapa besar afinitas *odorant* berinteraksi dengan reseptor yang dinyatakan sebagai aktivitas disosiasi kompleks L – R menurut persamaan reaksi $L + R \rightleftharpoons LR$, dimana konstanta inhibisi (K_i) sebanding dengan konstanta disosiasi (K_d) dengan persamaan $K_d = \frac{(L)(R)}{(L-R)}$ [7].

Pada penelitian ini, dilakukan pengkajian hubungan struktur dan bau dari senyawa turunan ester asetat melalui kajian *in silico* dan *in vitro*. Berdasarkan kajian *in silico*, dilakukan pendekatan antara sisi aktif reseptor terhadap berbagai konformasi ligan beraroma senyawa-senyawa ester asetat, sedangkan sebagai makromolekul adalah reseptor olfaktori dari tikus (*Rattus norvegicus*) dengan kode akses 3FIQ. Pada kajian *in vitro*, dilakukan sintesis senyawa beraroma dari patchouli asetat dan dilanjutkan dengan uji organoleptik. Dari kedua kajian tersebut, maka dapat diperoleh persepsi bau hasil sintesis sehingga dapat diketahui hubungan struktur dan bau dari senyawa turunan ester asetat.

METODA PENELITIAN

Bahan dan Alat

Peralatan yang digunakan adalah perangkat keras berupa *Notebook* dengan spesifikasi *processor Intel(R) Core(TM) i3-2310M 2.10 GHz* dengan *RAM 2.00 GB*, *eksternal hardisk 1 TB*, perangkat lunak yang meliputi *HyperChem*, *AutoDock 4*, *Discovery Studio Visualizer 3.5*, dan *AutoDock Vina*.

Peralatan sintesis meliputi seperangkat alat refluks, corong pisah, erlenmeyer, gelas kimia, spatula, neraca analitik, pipet ukur 10 ml, pipet tetes, bola hisap, botol semprot, botol sampel, dan seperangkat alat GCMS merek *Shimadzu* QP 2010.

Bahan-bahan yang digunakan adalah struktur molekul ligan beraroma dari turunan ester asetat ($\text{CH}_3\text{-C-O-OR'}$). R' adalah alkil rantai lurus, siklis, dan bisiklis dengan atom $\text{C}_2 - \text{C}_{15}$ diunduh dari NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), reseptor olfaktori dari tikus (*Rattus norvegicus*) yang diunduh dari PDB (www.pdb.org), sedangkan standarisasi aroma diunduh dari www.thegoodscentscompany.com. Bahan-bahan sintesis meliputi patchouli alkohol, larutan asam asetat anhidrat, asam asetat glasial, asam sulfat pekat, larutan NaHCO_3 jenuh, dan akuades.

Prosedur

Pemodelan Interaksi Aroma dengan Olfaktori secara *In Silico*

Molekul beraroma sebagai ligan diunduh dalam bentuk struktur tiga dimensi, dioptimasi geometri struktur molekulnya menggunakan *HyperChem* berdasarkan perhitungan semi-empirik AM1 hingga diperoleh struktur yang stabil. Makromolekul diunduh dengan kode akses 3FIQ dalam bentuk tiga dimensi dan selanjutnya hanya digunakan monomer dari makromolekul tersebut. Jika di dalam monomer tersebut terdapat ligan yang bukan senyawa beraroma, maka ligan tersebut harus dihapus untuk ditempati ligan beraroma yang digantikan. Dengan menggunakan perangkat lunak *AutoDock 4*, molekul ligan beraroma di-*docking* pada makromolekul olfaktori pada posisi *grid box* berdimensi $x = 8,907$; $y = -7,712$; dan $z = -27,732$ dengan ukuran spasi 0,375 angstrom. Validasi *docking* dilakukan menggunakan perangkat lunak *AutoDock Vina* dengan posisi *grid box* dan ukuran spasi yang sama.

Analisis Hasil *Docking*

Hasil *docking* direkam dalam format *WordPad* yang berisi informasi harga K_i , ΔG , dan RMSD. Selanjutnya, dilakukan analisis konformasi interaksi ligan – makromolekul menggunakan *Discovery Studio Visualizer 3.5* untuk menghasilkan informasi tipe-tipe ikatan hidrogen, van der Waals, dan elektrostatik.

Sintesis Patchouli Asetat secara *In Vitro*

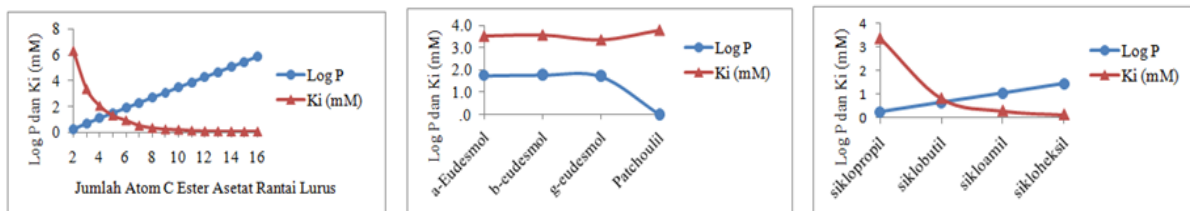
Patchouli alkohol ditimbang sebanyak 2,22 gram. Selanjutnya, patchouli alkohol dimasukkan ke dalam labu alas bulat leher tiga dan ditambahkan 10 ml asam asetat anhidrat. Setelah itu, labu alas bulat leher tiga dirangkai dengan seperangkat alat refluks yang lain, kemudian ditambahkan larutan H_2SO_4 sebanyak 1-2 tetes sebagai katalis dan dilakukan refluks selama 8-9 jam dengan temperatur $\pm 110^\circ\text{C}$. Larutan didinginkan pada temperatur ruang dan setelah dingin dicuci dengan 90 ml akuades. Larutan dipindahkan ke dalam corong pisah dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan fasa organik dicuci dengan larutan NaHCO_3 jenuh untuk menghilangkan sisa asam asetat dan katalis

hingga sedikit basa. Hasil sintesis yang diperoleh dianalisis menggunakan GCMS dan dikarakterisasi sifat organoleptiknya menggunakan metode panel yang terdiri dari 10 panelis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemodelan Struktur 3D Ligan

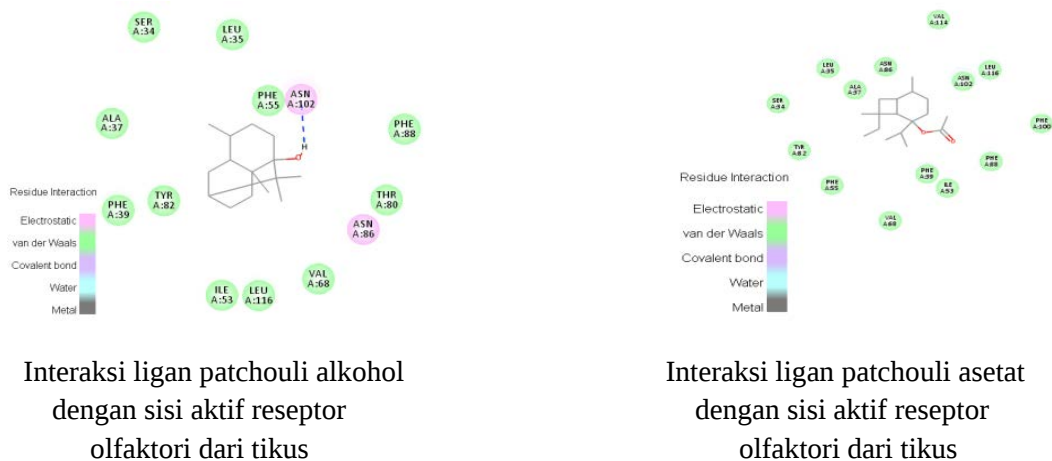
Pemodelan struktur 3D ligan dilakukan dengan mengoptimasi ligan yang menghasilkan energi bebas paling rendah, momen dipole, serta memberikan informasi log P. Log P menyatakan distribusi ligan dalam fasa n-oktanol dan air. Fasa n-oktanol analog dengan fasa lemak yang ada dalam sel reseptor. Jika log P semakin besar maka ligan semakin mudah larut dalam lemak atau ligan semakin mudah menembus mukosa hidung sehingga semakin besar jumlah atom C, maka nilai log P dan sifat hidrofobitasnya akan semakin besar pula. *Odorant* ester asetat dengan log P semakin besar akan menghasilkan bau yang semakin enak. Turunan ester asetat dengan jumlah atom C semakin besar menunjukkan penurunan harga K_i . Hal ini menunjukkan bahwa interaksi ligan dengan reseptor olfaktori semakin kuat, dengan kata lain aroma yang diuji secara organoleptik menunjukkan tingkat penerimaan yang lebih besar dibandingkan turunan ester asetat yang jumlah atom C-nya lebih rendah.



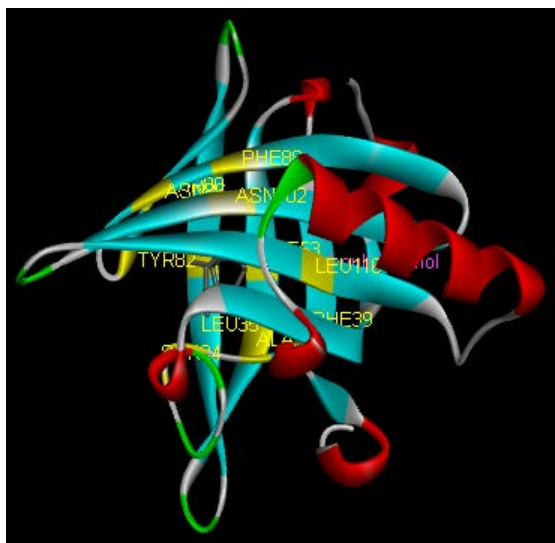
Gambar 1. Grafik hubungan antara jumlah atom C turunan ester asetat dengan log P. Kiri: turunan ester asetat rantai lurus, tengah: turunan ester asetat rantai siklis, kanan: turunan ester asetat rantai bisiklis

Docking Ligan pada Makromolekul

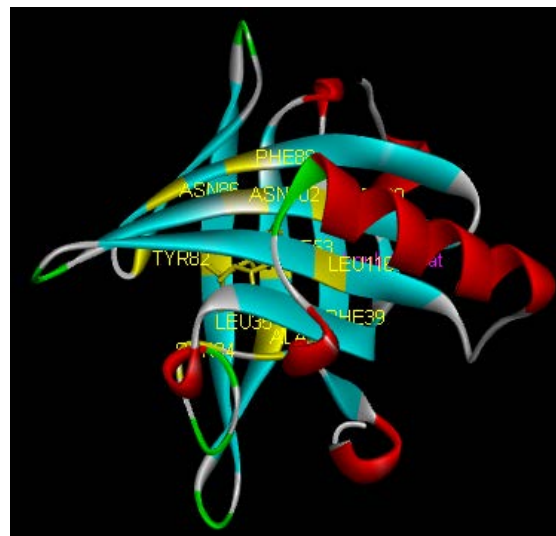
Proses *docking* menghasilkan beberapa macam mode konformasi ligan dengan reseptor dan dipilih satu mode konformasi yang paling stabil dengan ditunjukkan harga K_i yang paling rendah.



Gambar 2. Model 2D interaksi ligan dengan sisi aktif reseptor olfaktori dari tikus (*Rattus norvegicus*)



Interaksi ligan patchouli alkohol
dengan sisi aktif reseptor
olfaktori dari tikus



Interaksi ligan patchouli asetat
dengan sisi aktif reseptor
olfaktori dari tikus

Gambar 3. Model 3D interaksi ligan dengan sisi aktif reseptor olfaktori dari tikus (*Rattus norvegicus*)

Harga ΔG pengikatan menunjukkan nilai kurang dari nol yang berarti interaksi berlangsung spontan. Interaksi ligan turunan ester asetat dengan reseptor olfaktori tikus terjadi pada residu asam amino Leu116 dengan terjadinya pembentukan ikatan van der Waals lebih dominan. Hal ini hampir sama seperti yang ditemukan oleh Orna Man dkk yang menunjukkan sisi aktif olfaktori pada residu asam amino Leu102, hal yang sama terjadi pada mukosa hidung yang berinteraksi dengan ligan bahwa K_i semakin rendah berasal dari ligan beraroma enak [8]. Hasil uji organoleptik dari patchouli asetat menunjukkan kecenderungan aroma *soft woody* dan *sineol (eucalyptus)* dengan K_i sangat kecil (262,56 nM) dibandingkan dengan harga K_i patchouli alkohol (642,81 nM) yang beraroma *hard woody*.

Tabel 1. ΔG pengikatan dan harga K_i hasil *docking*

Nama Senyawa	ΔG Pengikatan (kkal/mol)	K_i (μM)
Patchouli alkohol	-8,45	0,642
Patchouli asetat	-8,98	0,262

Validasi *Docking* Ligan pada Makromolekul

Docking menggunakan *AutoDock Vina* menghasilkan ΔG pengikatan dari reseptor olfaktori tikus dengan ligan asam asetat, etil asetat, β -eudesmol, β -eudesmol asetat, patchouli alkohol, dan patchouli asetat masing-masing adalah -2,6 kkal/mol, -3,6 kkal/mol, -8,3 kkal/mol, -5,8 kkal/mol, -8,1 kkal/mol, dan -9,4 kkal/mol. Berdasarkan hasil tersebut, baik *docking* menggunakan *AutoDock 4* maupun *AutoDock Vina*, interaksi yang terjadi sama-sama berlangsung spontan dengan ditunjukkannya ΔG pengikatan bernilai kurang dari nol. Berdasarkan analisis statistika uji t dua sampel bebas yang dilakukan menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan hasil yang signifikan antara *docking* menggunakan *AutoDock 4* dengan *AutoDock Vina*.

Tabel 2. Perbandingan hasil perhitungan ΔG pengikatan (kkal/mol)

Program Docking	Rata-rata ΔG Pengikatan (kkal/mol)
AutoDock 4	-5,0920 $\pm$ 2,06809
AutoDock Vina	-5,2158 $\pm$ 1,75197

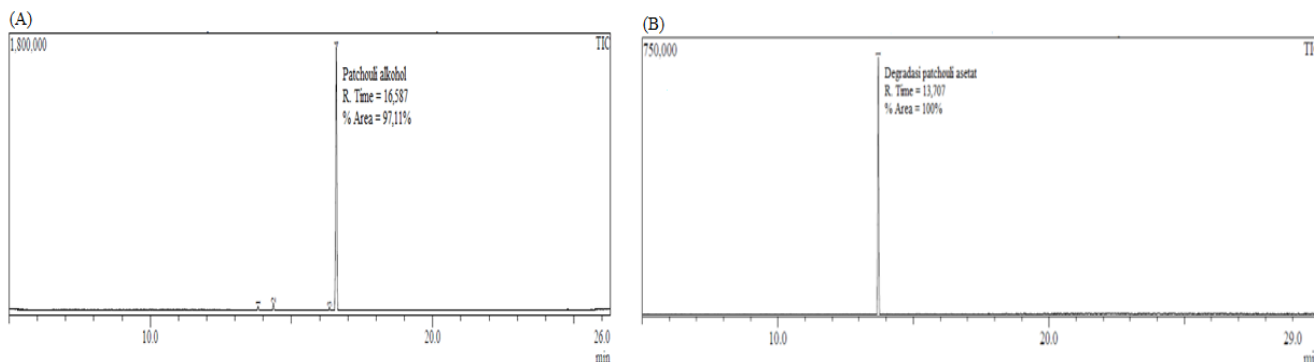
Sintesis Patchouli Asetat dan Uji Organoleptik

Sintesis patchouli asetat dilakukan sebanyak empat kali dengan berbagai pereaksi dan lama refluks yang berbeda seperti yang digambarkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil sintesis patchouli asetat dengan berbagai pereaksi dan lama refluks

Sintesis ke-	Sampel	Metode	Pereaksi	Katalis	% Rendemen	Aroma
1	Patchouli alkohol 2,22 gram	Refluks 9 jam	Asam asetat glasial 10 ml	H ₂ SO ₄ pekat 2 tetes	79,27%	Soft woody, sineol
2	Patchouli alkohol 2,22 gram	Refluks 9 jam	Asam asetat anhidrat 10 ml	H ₂ SO ₄ pekat 2 tetes	99,09%	Soft woody, sineol
3	Patchouli alkohol 2,22 gram	Refluks 8 jam	Asam asetat glasial 10 ml	H ₂ SO ₄ pekat 1 tetes	62,16%	Soft woody, sineol
4	Patchouli alkohol 2,22 gram	Refluks 8 jam	Asam asetat anhidrat 10 ml	H ₂ SO ₄ pekat 1 tetes	95,49%	Soft woody, sineol

Sintesis kedua memiliki % rendemen terbesar dibandingkan sintesis yang lain, yaitu 99,09%. Hal ini disebabkan oleh waktu refluks pada sintesis ini lebih lama (9 jam) dibandingkan dengan sintesis ketiga dan keempat, sehingga kesempatan untuk membentuk patchouli asetat relatif lebih lama. Jika dibandingkan dengan sintesis pertama, sintesis kedua relatif lebih baik karena pereaksi yang digunakan adalah asam asetat anhidrat yang lebih reaktif dibandingkan asam asetat glasial.



Gambar 4. (A): Kromatogram patchouli alkohol kristal, (B): kromatogram hasil sintesis patchouli asetat sintesis kedua

Berdasarkan Gambar 4, patchouli alkohol kristal memiliki kemurnian 97,11% dan setelah dilakukan esterifikasi dengan asam asetat anhidrat, diperoleh hasil ester patchouli asetat. Akan tetapi, senyawa ester ini tidak stabil pada suhu tinggi dengan ditunjukkan hasil degradasi senyawa patchouli asetat menjadi *patchoulene* dengan kemurnian 100%. Berdasarkan uji organoleptik, 8 dari 10 panelis menyatakan bahwa patchouli asetat memiliki aroma *soft woody* dengan kecenderungan aroma *sineol* (*eucalyptus*), sedangkan patchouli alkohol memiliki aroma *hard woody*.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian telah dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Interaksi *odorant* senyawa turunan ester asetat dengan sisi aktif residu olfaktori tikus (*Rattus novergicus*) ditunjukkan dengan adanya konformasi antara ligan – reseptor dengan interaksi van der Waals dan interaksi elektrostatis
2. Berdasarkan kajian *in silico*, semakin besar jumlah atom C maka harga K_i akan semakin kecil dan akan menghasilkan bau yang semakin enak
3. Analisis statistika uji t menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan hasil yang signifikan antara *docking* menggunakan *AutoDock 4* dengan *AutoDock Vina*
4. Senyawa patchouli asetat hasil sintesis memberikan aroma *soft woody* dan *sineol*
5. Hasil sintesis berdasarkan kajian *in silico* dan *in vitro* memberikan deskripsi aroma yang sama, yaitu *soft woody* dengan kecenderungan aroma *sineol (eucalyptus)*

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Brawijaya yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk terlibat dalam kegiatan penelitian unggulan perguruan tinggi SKIM Dsentralisasi pada tahun anggaran 2013.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sufriadi, E., 2004, Strategi Pengembangan Menyeluruh terhadap Minyak Nilam (*Patchouli Oil*) di Provinsi Nanggroe Aceh Darussalam, *Perkembangan Teknologi TRO*, 16, 2
2. Guenther, E., 1987, Minyak Atsiri Jilid 1, diterjemahkan oleh: S. Ketaren, Universitas Indonesia, Jakarta
3. Haffecden, Yaylayan, Fortin, 2001, The Lock and Key Theory of Olfaction, *Food Chemistry*, 73,67
4. Turin, L., dan Yoshii, F., 1996, Structure – Odor Relations : A Modern Perspective, *Department of Physiology*, UK
5. Zarzo, M., dan Stanton, D.T., 2006, Identification of Latent Variables in a Semantic Odor Profile Database Using Principal Component Analysis, *Corporate Research, Modeling, and Simulations Department*, USA
6. Zozulya, S., Echeverri, F., dan Nguyen, T., 2001, The Human Olfactory Receptor Repertoire, *Genome Biology*, USA
7. Hulme, Edwadr C., dan Trevethick, Mike A., 2010, Ligand Binding Assays At A Equilibrium, Validation and Interpretation British Journal of Pharmacology
8. Vincent, F., Ramoni, R., dkk, 2004, Crystal Structures of Bovine Odorant-Binding Protein in Complex With Odorant Molecules, *Journal Biochemistry*, 271, 3832