

Comparative Modeling and Molecular Docking of Alcohol Acyltransferase in Fruit Aroma Biosynthesis

Wa Ode Kamillah^{1*} & Wa Ode Siti Purnamasari²

¹Department of Biology, Faculty of Science and Mathematics, Hasanuddin University, Makassar, Indonesia;

²Bachelor of Applied Medical Laboratory Technology, Paramata Polytechnic Raha, Muna, Indonesia;

Article History

Received : September 20th, 2025

Revised : September 30th, 2025

Accepted : October 12th, 2025

*Corresponding Author:

Wa Ode Kamillah, Department of Biology, Faculty of Science and Mathematics, Hasanuddin University, Makassar, Indonesia; Email: waodekamillah@unhas.ac.id

Abstract: Fruit aroma arises from volatile esters synthesized by alcohol acyltransferase (AAT) of the BAHD family. This study analyzes AATs from *Citrus sinensis*, *Vitis vinifera*, *Malus domestica*, and *Fragaria × ananassa* through sequence alignment, secondary structure prediction, 3D modeling, and docking with acetyl-CoA. Secondary structure prediction shows conserved α -helices and β -sheets forming the characteristic α/β fold, with loops providing interspecies variation. All AATs retain the HXXXD motif and DFGWG/NFGWG variants with ~450 residues. Docking reveals a consistent acetyl-CoA orientation but species-specific interactions: polar/charged residues (Arg, Ser, His, Gln/Asn) form hydrogen and electrostatic bonds, whereas aromatic/aliphatic residues (Phe, Ile, Met) provide hydrophobic stabilization. *Malus domestica* exhibits the strongest polar network (6 H-bonds; ≈ -7.8 kcal·mol⁻¹), whereas *Citrus sinensis* relies more on hydrophobic contacts (≈ -6.9 kcal·mol⁻¹). These findings indicate that a conserved structural framework preserves the core catalytic mechanism of AATs while species-specific active-site microarchitecture modulates substrate affinity and selectivity, likely contributing to differences in fruit volatile ester profiles and offering candidate residues for targeted functional validation and aroma improvement.

Keywords: Alcohol acyltransferase, Acetyl-CoA docking, BAHD acyltransferase, fruit aroma.

Pendahuluan

Kualitas sensoris merupakan aspek penting yang menentukan daya saing produk hortikultura, terutama buah-buahan. Di antara berbagai atribut kualitas, aroma memiliki peran yang sangat dominan dalam memengaruhi persepsi rasa, preferensi konsumen, serta nilai ekonominya (Baldwin et al., 2011). Aroma merupakan hasil interaksi kompleks berbagai senyawa volatil. Komposisi dan konsentrasi senyawa volatil ini dapat berbeda antarspesies maupun antarvarietas (Dudareva et al., 2013; Schwieterman et al., 2014).

Senyawa volatil pada buah berasal dari metabolisme asam lemak, asam amino rantai bercabang, terpenoid, dan fenilpropanoid (Dudareva et al., 2013; Klee & Tieman, 2018; Schwab et al., 2008). Di antara kelompok senyawa

tersebut, ester mendominasi dan dikenal sebagai kontributor utama aroma manis dan segar khas buah (Beekwilder et al., 2004; El Hadi et al., 2013). Pembentukan ester volatil dikatalisis oleh *alcohol acyltransferase* (AAT). Enzim ini merupakan anggota keluarga BAHD *acyltransferase* yang mentransfer gugus asil dari asil-KoA ke alkohol untuk menghasilkan beragam ester volatil (Aharoni et al., 2003; Beekwilder et al., 2004; Tang et al., 2025). Aktivitas AAT menentukan profil ester yang berbeda pada tiap spesies atau kultivar buah, dan dipengaruhi oleh variasi genetik, ketersediaan substrat, serta spesifisitas enzim (Dunemann et al., 2012; Wang et al., 2025). Faktor-faktor seperti poliploid, hibridisasi, dan diversifikasi isoenzim semakin memperkaya kompleksitas metabolisme aroma (Chen et al., 2024; Eduardo et al., 2013; Shojaee et al., 2025).

Meskipun peran AAT sebagai enzim kunci dalam biosintesis ester telah banyak dilaporkan, mekanisme struktural yang mendasari spesifisitas substrat dan aktivitas katalitiknya masih belum dipahami secara menyeluruh (D'Auria, 2006; Saez et al., 2024). Motif konservatif seperti HXXXD dan DFGWG diduga penting bagi pengikatan substrat dan mekanisme transfer asil, tetapi belum diuji secara komprehensif lintas spesies (Morales-Quintana et al., 2015; Tuominen et al., 2011). Sebagian besar studi terdahulu berfokus pada satu spesies atau gen tunggal tanpa membandingkan konservasi struktur dan variasi fungsi secara sistematis lintas spesies (Liu et al., 2025; Wang et al., 2025). Akibatnya, wawasan mendalam mengenai determinan molekuler biosintesis ester volatil pada tingkat lintas spesies masih jarang tersedia.

Pemahaman mekanisme molekuler enzim pembentuk aroma menjadi kunci untuk meningkatkan kualitas rasa dan aroma buah melalui pemuliaan molekuler serta rekayasa metabolik. Beberapa peneliti menegaskan urgensi penelitian ini, termasuk Tang et al. (2025) yang menekankan peran AAT, serta Goff & Klee (2006) dan Klee & Tieman (2018). Pendekatan bioinformatika menyediakan sarana efektif untuk memetakan situs katalitik, mengidentifikasi residu kunci, dan memprediksi interaksi substrat–produk (Shojaee et al., 2025; Wang et al., 2025). Berdasarkan urgensi tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi konservasi struktural dan variasi fungsional AAT pada berbagai spesies buah. Penelitian ini secara khusus berfokus pada identifikasi motif konservatif dan residu katalitik penting, pemodelan struktur 3D, serta evaluasi interaksi AAT dengan asetil-KoA. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan dasar ilmiah yang kuat bagi pengembangan strategi pemuliaan molekuler dan rekayasa metabolik untuk meningkatkan mutu aroma buah.

Bahan dan Metode

Pengambilan Data Sekuens

Data sekuens protein *Alcohol Acyltransferase* (AAT) diperoleh dari basis data NCBI GenBank dengan format FASTA. Empat spesies tanaman buah digunakan dalam penelitian ini, yaitu *Citrus sinensis* (ID: WZD84690.1), *Vitis vinifera* tipe III (ID: UUA44385.1), *Malus domestica* (ID: AAS79797.1), dan *Fragaria × ananassa* (ID:

APB87286.1). Semua sekuens diunduh secara manual dan kemudian digunakan sebagai dasar untuk analisis komparatif.

Multiple Sequence Alignment (MSA)

Sekuens AAT dari keempat spesies dianalisis menggunakan MEGA X versi 12.0.11. Proses MSA dilakukan dengan algoritma MUSCLE dengan parameter default. Hasil *alignment* divisualisasikan dalam format FASTA dan disimpan untuk analisis motif. Analisis konservasi residu dilakukan dengan MEME Suite untuk mengidentifikasi motif asam amino yang dipertahankan di seluruh spesies.

Pemodelan Struktur 3D

Struktur 3D AAT diprediksi menggunakan metode comparative modeling melalui server SWISS-MODEL. Template dipilih berdasarkan homologi tertinggi dari database Protein Data Bank (PDB).

Analisis Interaksi Ligan–Protein (*Molecular Docking*)

Analisis interaksi antara enzim dan substrat potensial dilakukan menggunakan perangkat lunak AutoDock Vina 1.2.0 melalui PyRx 0.8. Struktur 3D ligan diunduh dari database PubChem dalam format SDF dan dikonversi ke format PDBQT menggunakan OpenBabel 3.1.1. *Docking* dilakukan dengan grid box maksimal yang meliputi keseluruhan protein sehingga semua kemungkinan situs pengikatan dapat dieksplorasi. Hasil *docking* dianalisis berdasarkan nilai energi ikatan (*binding affinity*, kcal/mol) dan mode interaksi, kemudian divisualisasikan menggunakan Discovery Studio Visualizer 2025.

Hasil dan Pembahasan

Analisis Panjang dan Identitas Sekuens ATT

Analisis awal dilakukan untuk membandingkan panjang dan identitas sekuens protein *Alcohol Acyltransferase* (AAT). Data panjang sekuens ini digunakan untuk mengidentifikasi kesesuaian dengan karakteristik keluarga BAHD *acyltransferase* dan memastikan bahwa seluruh protein yang dianalisis berada dalam kisaran ukuran yang umum dilaporkan.

Berdasarkan Tabel 1, panjang sekuens AAT dari keempat spesies sangat mirip, yaitu 453 asam amino untuk Jeruk *Citrus sinensis*, 455 aa untuk Anggur *Vitis vinifera*, 450 aa untuk Apel *Malus domestica*, dan 452 aa untuk Stroberi *Fragaria* × *ananassa*. Rentang variasi yang hanya 2–5 residu ini menunjukkan bahwa hanya sedikit penyisipan atau penghapusan pada domain AAT antar-spesies. Nilai panjang sekuens sekitar 450 aa konsisten dengan karakteristik umum BAHD.

Tabel 1. Identitas sekuens *Alcohol Acyltransferase*

No	Spesies	ID GenBank	Ukuran
1	<i>Citrus sinensis</i>	WZD84690.1	453 aa
2	<i>Vitis vinifera</i> tipe III	UUA44385.1	455 aa
3	<i>Malus domestica</i>	AAS79797.1	450 aa
4	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	APB87286.1	452 aa

Multiple Sequence Alignment (MSA) dan Prediksi Struktur Sekunder

Prediksi struktur sekunder berdasarkan penyelarasan urutan (Gambar 1) menunjukkan

bahwa pola heliks α dan lembar β pada AAT dari *Vitis vinifera*, *Malus domestica*, *Citrus sinensis*, dan *Fragaria* × *ananassa* sangat terkonservasi, mencerminkan lipatan dua-domain α/β khas keluarga BAHD (Liu et al., 2023). Heliks α umumnya berada di permukaan, sedangkan lembar β bertumpuk membentuk inti struktur yang menopang residu katalitik konservatif, termasuk His pada motif HXXXD dan motif DFGWG di bagian C-terminal.

Sementara itu, elemen loop berperan sebagai penghubung dengan variasi antarspesies yang lebih tinggi, konsisten dengan laporan bahwa perbedaan utama struktur BAHD terdapat pada daerah loop (Liu et al., 2023; Dare et al., 2025). Konservasi heliks α dan lembar β yang ditemukan di keempat spesies menegaskan pentingnya struktur sekunder ini dalam menjaga integritas lipatan α/β , serta menempatkan residu katalitik pada posisi yang tepat untuk mendukung fungsi AAT dalam pembentukan ester.

UUA44385.1	MASSSSPLVFSVNRCDPQIVRPANPTPREVK--QLSDIDDQEGRLRFQIPVIMFYRKNF-LMEGKDPVKVIRE	69
AAS79797.1	---MMPFSVLQVKRLQLELITPAKPTLQEAQ--FLSDIDDQEGRLRFQVPVIMCYKDNPSLNKNCNPVKVIRE	67
WZD84690.1	-----MEIGIVSREVVRPSSLHVHLLKPFKISLLDQITPTTF-APLVLFYPMKSTHLKGTQISTQLKE	62
APB87286.1	-----MEKIEVSIINSKHTIKPSTSTP-LQPYKLTLLDQLTPPAY-VPIVFYYPITDHFVNLPQTLADLRQ	64
UUA44385.1	ALGKALIYYFPFAGRLIEGDNRKLMVDCTGEGVLFTEADDTTLENLGDAIQPMCIFYEELLYDVPGSTRI	141
AAS79797.1	ALSRLVYYYPLAGRLKEGPNRKLMDVDCNGEGILFVEASADVTLEQLGDKILPPCPLEEFLFNFPDSDGII	139
WZD84690.1	SLSKTIEHFYPLAGVRD-----NLIINDYDEGVLYIETRVNTHLFEF--LQNRPMELLNQCLPYPPFSHQPN	128
APB87286.1	ALSETLTLYPLSGRVKN---NLYIDDFEEGVPLYEARVNCMDTDF--LRLRKIECLNEFVPIKPFMSMAI	130
UUA44385.1	G---SPLILIQVTRLRCGGFIFALRLHTLSDAAGLIQFLNTIGEMAQ-GLSVPSLLP-IWQRELLNARNPP	208
AAS79797.1	G---CPILLVQVTCCTCGGFILALRVHTMCDAPGILLFLTAIAEMAR-GAHAPSILP-VWERELLFSRDPP	206
WZD84690.1	PHQ-VPQVAVQLNTFDCGGIALGLCFSEHKIIDEGTASAFRLSWAANTRGGYHKAVKYENLSQASMIFF---PP	196
APB87286.1	SDERYPLLGQVQNVFDS-GIAIGVSVSEHKLIDEGTADCFKLSWGAVER-GCRENIHPSLSAALLF---PP	197
UUA44385.1	QITRIHHEYKVTN-TKGTLMAMDENNLVHRRFFFGREEIRALNRNLP-LSGACSTFEVLMACVWRCRTIA	278
AAS79797.1	RITCAHHEYEDVIDHSDGLYASSNQSNMVQSRFYFCAKEMRVLRKQIPPHLISTCSTFDLITACLWRCRTIA	278
WZD84690.1	QNPSNHNQYLSVME---KNWFR--EAKYKTRRFVFDKAIATLRSECKGERVNPTRTEALSAFILKSTMLA	263
APB87286.1	RDDLPE-KYADQME---GLWFA--GKKVATRRFVFCVKAISIIQDEAKSESVPKPSRVQAVTGLWKHLIAA	263
UUA44385.1	FAV---DPDEVVRISCI---INMPGKHGFE-LPPGYGNFAVTPASITKAGM---LCKNPLEFAIRLVKKAK	340
AAS79797.1	LNI---NPKEAVRVSCI---VNARGKHNNVRLPLGYGNFAFPAASKAEP---LCKNPLGYALELVKKAK	341
WZD84690.1	L----RPTASSRF-VLHQAVNLR-RLTEPRLSTCSVGNLFLWATAAYDMEH---AAEMGLHGLVARMRQGV	325
APB87286.1	SRALTSGTTSTRLSIAAQAVNLRTRNMETVLDNATGNLIWWAQAILELSHTTPEISDLKLCDLVNLNGSV	335
UUA44385.1	AEMSQEIYIKSVADLMVIGKRLPFTQPGNYI-----VSDVTRAGIGEVDFGWGKPVYGGVA	395
AAS79797.1	ATMNEEYLRVADLLVLRGRPQYSSTGSYL-----IVSDNTRAGFGDVNFGWGQPVFAGPA	397
WZD84690.1	GKINSEYLKT-----LHGDEGFPPKVCYIYKRMEEVSAHENL-EALKFSSWVKFGLNEVDFGWGNPISWGIF	390
APB87286.1	KQCNGDYFET-----FKGKEGYGRMCEYLDFORTMSSMEPAPDIYLFSSWTNF-FNPIDFGWGRTSWIGVA	400
UUA44385.1	-----KAFFIISFRMFRNSKGEEGNVPICLPPPVMERFEQELKRMTKEAE-----LLITSMI	449
AAS79797.1	-----KALDLISFYVQHKNN-TEDGILVPMCLPSSAMERFQOELERITQEPKEDICNNLRSTRIMSMM	459
WZD84690.1	GEVGSNSFQNLTFKETSIVYDNVAEAWVTLDEKIMSVLEHDPQFLALASPNP-----SIIV---	448
APB87286.1	GKIESASCKFIILVPTQ---CGSGIEAWVNLEEEKMAMLEQDPHFLALASPK-----TLI---	452

Gambar 1. Multiple sequence alignment dari empat sekuens protein *Alcohol Acyltransferase* (AAT) pada *Vitis vinifera* (UUA44385.1), *Malus domestica* (AAS79797.1), *Citrus sinensis* (WZD84690.1), dan *Fragaria* × *ananassa* (APB87286.1) berdasarkan struktur sekunder: heliks α ditunjukkan dalam warna magenta, strand β dalam warna kuning, dan loop dalam warna abu-abu. Motif katalitik HxxxD dan DFGWG ditandai dengan huruf tebal dalam kotak berwarna merah

Gambar 1. terlihat juga dua motif konservasi utama yang merupakan ciri khas keluarga enzim acyltransferase BAHD yaitu HXXXD (His-any-any-any-Asp) dan DFGWG (Asp-Phe-Gly-Trp-Gly) (D'Auria, 2006). Motif HXXXD terletak di pusat struktur enzim dan bersifat absolut-konservasi, sedangkan motif DFGWG berada dekat ujung C-terminal dan cenderung lebih bervariasi. Semua empat sekuens mengandung pola HxxxD. Misalnya, *Vitis vinifera* memiliki urutan HTLSD, *Malus domestica* HTMCD, *Citrus sinensis* HKIID, dan *Fragaria × ananassa* HKLID. Ini konsisten dengan Tuominen et al. (2011) yang menyatakan motif HXXXD sangat konservasi pada BAHD acyltransferase dan krusial untuk aktivitas katalitik enzim. Sebaliknya, Tiga sekuens (*Vitis vinifera*, *Citrus sinensis*, *Fragaria × ananassa*) memperlihatkan motif DFGWG persis, masing-masing sebagai DFGWG pada ujung C-terminal. Namun, pada sekuens *Malus domestica* pola ini berubah menjadi NFGWG (residu D pertama berubah menjadi N).

Modifikasi tersebut berarti sekuens *Malus domestica* tidak memiliki DFGWG persis, melainkan varian NFGWG. Variasi semacam ini wajar karena motif DFGWG di BAHD tidak selalu identik. Dengan kata lain, keempat sekuens ini memang mengikuti pola dasar BAHD dengan adanya motif HXXXD. Namun satu sekuens (*Malus domestica*) menunjukkan perbedaan kecil pada motif DFGWG yang digantikan NFGWG. Fenomena substitusi asam amino pada motif DFGWG tersebut sesuai dengan literatur yang menyebutkan motif ini bisa bervariasi tanpa sepenuhnya menghilangkan fungsi dasarnya (Tuominen et al., 2011; Xu et al., 2023).

Melengkapi hasil MSA, dilakukan analisis konservasi residu menggunakan logo sekuens. Representasi ini memberikan gambaran visual mengenai tingkat konservasi asam amino pada posisi tertentu di dalam sekuens protein AAT (lihat Gambar 2). Terlihat bahwa area paling konservatif terdapat pada motif HXXXD dan DFGWG. Huruf-huruf pada posisi His dan Asp motif HXXXD (yang terletak di bagian tengah sekuens) sangat dominan, demikian pula rangkaian huruf “DFGWG” di ujung C-terminal, menandakan pelestarian residu kunci pada keempat spesies (D'Auria, 2006; Morales-

Quintana et al., 2015). Sebaliknya, bagian lain di luar motif-motif tersebut menampilkan huruf-logo yang lebih pendek dan beragam. Tingginya keragaman huruf pada region non-motif ini mengindikasikan variasi asam amino yang tinggi antar-spesies.



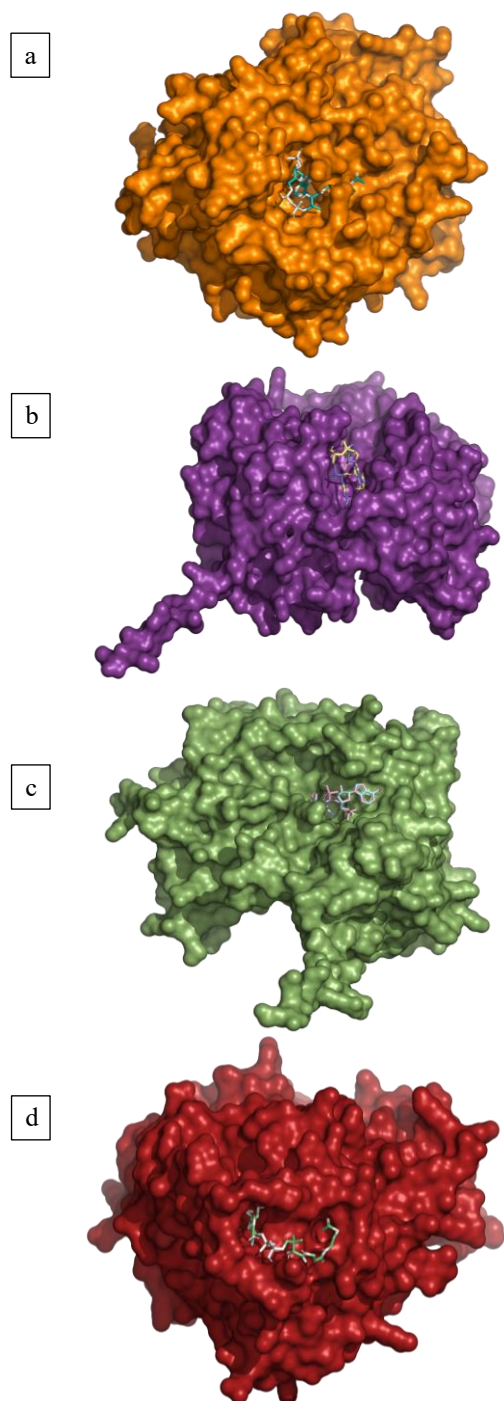
Gambar 2. Logo sekuens protein Alcohol Acyltransferase (AAT). Logo sekuens diturunkan dari hasil alignment untuk menunjukkan pola konservasi residu asam amino. Tinggi huruf merepresentasikan tingkat konservasi (semakin besar huruf, semakin tinggi konservasi).

Motif HXXXD (His-any-any-any-Asp) yang terletak di sekitar tengah protein BAHD sangat penting untuk katalisis. Residu His di motif ini berperan sebagai basa katalitik, sedangkan Asp membantu menata struktur pusat aktif (Tuominen et al., 2011; Xu et al., 2023). Morales-Quintana et al. (2015), juga melaporkan bahwa mutasi terhadap kedua residu HXXXD dapat menghilangkan aktivitas enzim. Motif FGWG juga sangat konservatif namun juga kadang bervariasi seperti DFGWA, DFGFG, dsb.) (Tuominen et al., 2011; Xu et al., 2023). Meski tidak langsung berinteraksi dengan substrat, DFGWG penting untuk stabilitas struktur dan ikatan KoA donor. Misalnya, studi kristal *vinorine synthase* (BAHD) memperlihatkan His pada HXXXD sebagai residu katalitik utama, sedangkan residu-residu dalam motif DFGWG menjaga integritas saluran substrat dan pengikatan CoA (Ma et al., 2005).

Pemodelan Struktur 3D dan Docking Ligan

Tahap pemodelan struktur 3D dilakukan untuk mengevaluasi konformasi keseluruhan protein AAT pada keempat spesies serta memvisualisasikan interaksi dengan ligan asetil-KoA. Analisis ini memberikan gambaran mengenai topologi kantung aktif dan posisi

pengikatan substrat, yang berperan penting dalam menentukan spesifisitas katalitik enzim. Model permukaan (*surface*) dari struktur 3D enzim AAT dari empat spesies ditunjukkan pada Gambar 3. Ligan asetil-KoA divisualisasikan sebagai struktur stik yang tertanam di dalam kantung aktif setiap protein.



Gambar 1. Representasi permukaan 3D *Alcohol Acyltransferase* (AAT) hasil pemodelan struktur homologi dari spesies: a. *Vitis vinifera*; b. *Citrus*

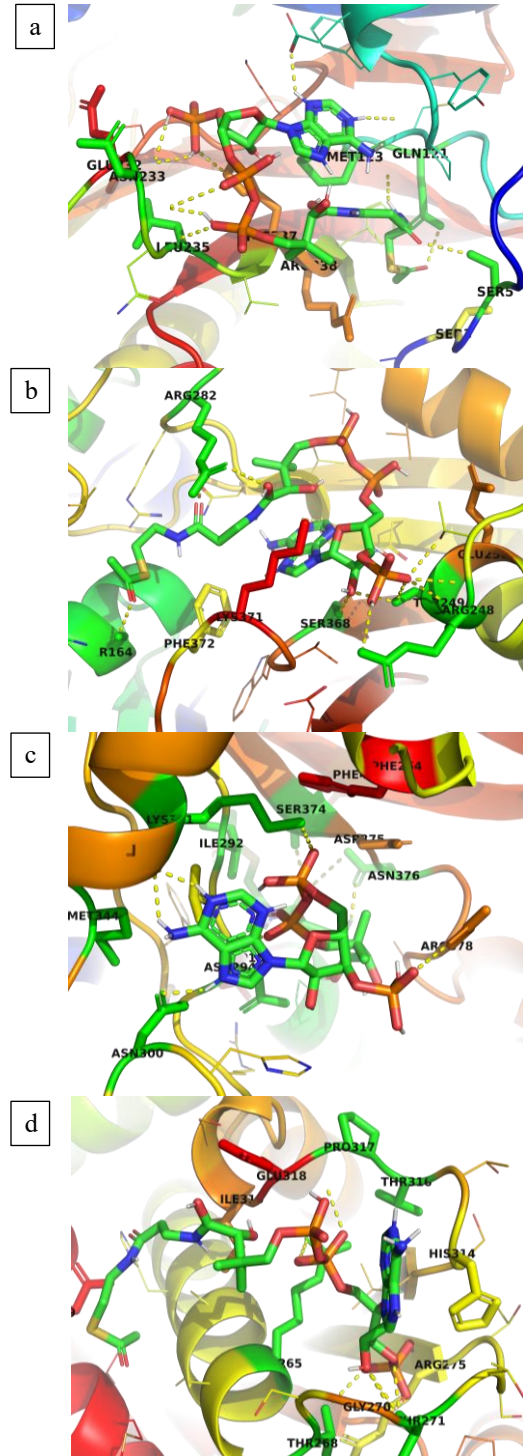
sinensis; c. *Malus domestica*; d. *Fragaria* × *ananassa*. Ligan hasil *docking* divisualisasikan dalam bentuk *stick*.

Hasil pemodelan homologi dan visualisasi kantung aktif enzim AAT dari empat spesies buah tersebut menunjukkan bahwa struktur permukaan dan orientasi ligan asetil-KoA di pusat kantung pengikatan memiliki topologi yang mirip. Hal ini sejalan dengan teori bahwa AAT merupakan enzim kunci dalam biosintesis ester aroma buah yang bekerja dengan mekanisme konservatif pada berbagai spesies, di mana homologi *modeling* mampu memprediksi struktur protein berdasarkan kemiripan sekuens dan *docking* molekuler mengungkap interaksi spesifik ligan di situs aktif (Song et al., 2021). Penelitian terdahulu pada *Fragaria* dan *Malus* juga menunjukkan bahwa AAT memiliki situs aktif yang terkonservasi dengan fungsi serupa dalam membentuk ester volatil penentu aroma khas buah (Souleyre et al., 2022).

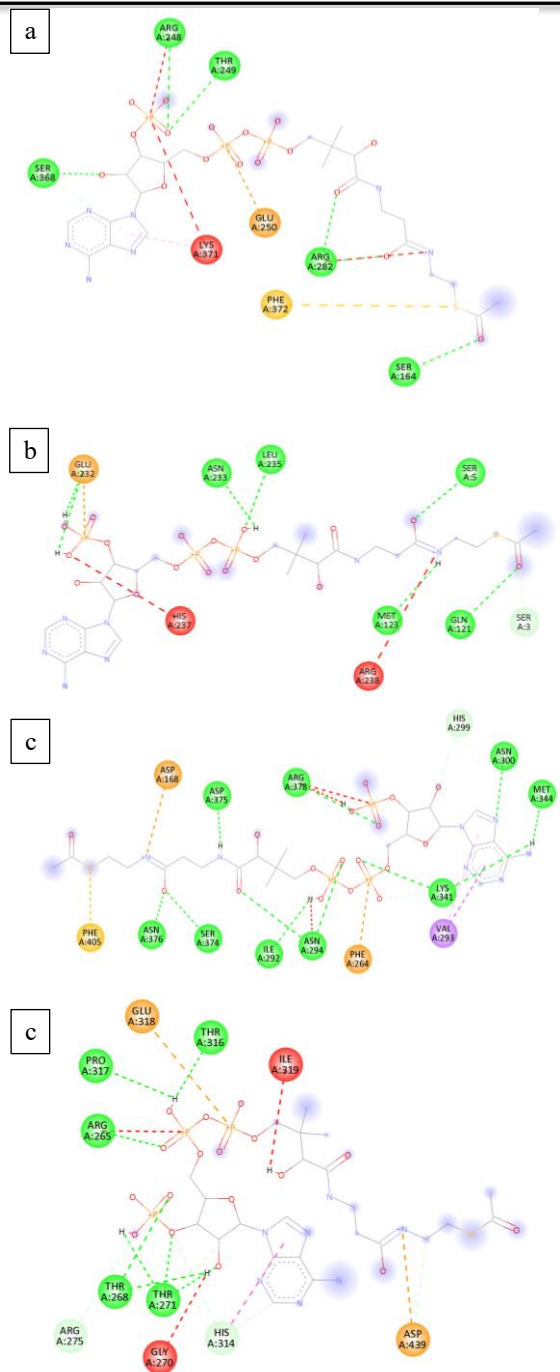
Ilustrasi detail 3D hasil *docking* residu-residu AAT yang berinteraksi dengan asetil-KoA ditunjukkan pada Gambar 4. Diagram interaksi 2D pada Gambar 5 juga memberikan representasi yang selaras dengan analisis 3D. Analisis interaksi menunjukkan bahwa asetil-KoA berinteraksi dengan berbagai residu aktif AAT pada keempat spesies buah. Pada *Citrus sinensis*, ligan terutama berikatan dengan residu polar seperti Arg248, Thr249, Ser368, Ser164, Arg282, dan Glu250 melalui ikatan hidrogen dan elektrostatik, sementara residu aromatik Phe372 dan alifatik Ile248 memberikan kontribusi hidrofobik pada stabilitas kompleks.

Vitis vinifera, interaksi polar didominasi oleh Glu232, Asn233, Ser45, Ser3, Gln121, dan His237 yang membentuk ikatan hidrogen/elektrostatik dengan gugus fosfat serta karbonil asetil-KoA, sedangkan Leu235 dan Met123 menyumbang kontak hidrofobik. *Malus domestica* memperlihatkan jaringan ikatan paling padat, melibatkan Asp168, Ser374, Asn376, Asn300, His299, Arg378, Lys431, dan residu aromatik Phe405 serta Val299. Residu Arg378 dan Lys431 menghasilkan ikatan garam yang kuat dengan gugus fosfat asetil-KoA. Sementara itu, *Fragaria* × *ananassa* menunjukkan pola yang hampir serupa dengan residu polar Arg265, Arg275, Thr268, Thr271, Thr316, His314, dan Glu318 yang membentuk

ikatan hidrogen dan elektrostatis, disertai kontak hidrofobik melalui Pro317 dan Ile319.



Gambar 2. Ilustrasi detail 3D hasil docking residu-residu *Alcohol Acyltransferase* (AAT) yang berinteraksi dengan asetil-KoA dari spesies: a. *Vitis vinifera*; b. *Citrus sinensis*; c. *Malus domestica*; d. *Fragaria* × *ananassa*. Ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan interaksi elektrostatis ditampilkan dengan garis putus-putus berwarna.



Gambar 3. Peta interaksi 2D antara protein *Alcohol Acyltransferase* (AAT) dan ligan pada spesies: a. *Citrus sinensis*; b. *Vitis vinifera*; c. *Malus domestica*; d. *Fragaria* × *ananassa*. Ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, serta interaksi elektrostatis divisualisasikan dengan garis berwarna berbeda. Residu-residu yang terlibat dalam interaksi ditampilkan dengan label asam amino dan posisi dalam sekuens

Nilai afinitas pengikatan pada Tabel 2 bervariasi antarspesies. Afinitas tertinggi yang

ditunjukkan oleh *Malus domestica* (–7,8 kcal/mol) kemungkinan dipengaruhi oleh banyaknya ikatan hidrogen (enam) yang terbentuk. Ikatan hidrogen yang lebih tinggi akan meningkatkan stabilitas kompleks enzim–ligan, sehingga menurunkan energi bebas pengikatan (Chen et al., 2016). Sebaliknya, *Citrus sinensis* menunjukkan afinitas terendah (–6,9 kcal/mol) dengan hanya empat ikatan hidrogen, menandakan bahwa interaksi polar lebih sedikit sehingga kompleks kurang stabil dibandingkan spesies lain. *Fragaria* × *ananassa* dan *Vitis vinifera* berada di antara keduanya, dengan jumlah ikatan hidrogen menengah (masing-masing lima dan empat). Hal ini sejalan dengan laporan bahwa variasi jumlah ikatan hidrogen pada residu polar kantong aktif berpengaruh langsung pada stabilitas kompleks enzim–substrat (Mwaniki et al., 2025; Sebastiani et al., 2023; Veldman & Tastan Bishop, 2025).

Tabel 2. Binding affinity dan ikatan hidrogen AAT dengan asetil-CoA

No	Spesies	Binding Affinity (kcal/mol)	Jumlah Ikatan Hidrogen
1	<i>Citrus sinensis</i>	-6,9	4
2	<i>Vitis vinifera</i> tipe III	-7,2	4
3	<i>Malus domestica</i>	-7,8	6
4	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	-7,4	5

Pola ini menunjukkan bahwa jumlah dan kualitas ikatan hidrogen menjadi faktor utama penentu kekuatan pengikatan asetil-CoA pada AAT. Interaksi hidrofobik dan aromatik turut menstabilkan cincin adenin serta mengatur orientasi ligan, tetapi pengaruhnya tidak sebesar ikatan hidrogen. Residu polar terbukti menstabilkan kompleks enzim–ligan (Song et al., 2021).

Kesimpulan

Berdasarkan analisis komparatif, keempat AAT yang diteliti memiliki panjang ~450 residu dan mempertahankan motif katalitik HXXXD serta varian DFGWG/NFGWG, mencerminkan kerangka lipatan α/β BAHD yang konservatif meski loop penghubung menunjukkan variasi antarspesies. Pemodelan dan docking

mengungkap orientasi asetil-KoA yang konsisten tetapi pola interaksi spesifik-spesies, residu polar/bermuatan (Arg, Ser, His, Gln/Asn) membentuk jaringan ikatan hidrogen/elektrostatik yang meningkatkan afinitas (terkuat pada *Malus domestica*, ~6 H-bond, $\approx -7,8$ kcal·mol⁻¹), sedangkan residu aromatik/alifatik (Phe, Ile, Met) memberikan stabilisasi hidrofobik lebih dominan pada *Citrus sinensis* ($\approx -6,9$ kcal·mol⁻¹). Kesimpulannya, AAT mempertahankan mekanisme katalitik inti tetapi perbedaan mikroarsitektur kantong aktif didorong oleh variasi lokal pada loop dan residu pengikat memodulasi afinitas serta spesifisitas substrat dan dengan demikian berkontribusi pada keragaman profil ester volatil buah, sehingga residu yang diidentifikasi layak divalidasi lebih lanjut melalui mutagenesis terarah, uji enzimatis in vitro, dan analisis volatil.

Ucapan Terima Kasih

Penulis menyampaikan apresiasi atas ketersediaan basis data publik dan perangkat lunak komputasional yang memungkinkan pelaksanaan penelitian ini secara mandiri dan efisien. Penulis juga menghargai dukungan dan motivasi dari keluarga serta pihak-pihak yang memberikan inspirasi selama proses penelitian.

Referensi

- Aharoni, A., Giri, A. P., Deuerlein, S., Griepink, F., de Kogel, W.-J., Verstappen, F. W. A., Verhoeven, H. A., Jongsma, M. A., Schwab, W., & Bouwmeester, H. J. (2003). Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. *The Plant Cell*, 15(12), 2866-2884. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.016253>.
- Baldwin, E. A., Bai, J., Plotto, A., & Dea, S. (2011). Electronic noses and tongues: Applications for the food and pharmaceutical industries. *Sensors*, 11(5), 4744-4766. DOI: <https://doi.org/10.3390/s110504744>.
- Beekwilder, J., Alvarez-Huerta, M., Neef, E., Verstappen, F. W. A., Bouwmeester, H. J., & Aharoni, A. (2004). Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiology*, 135, 1865-

1878. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.104.04258>.
- Chen, D., Oezguen, N., Urvil, P., Ferguson, C., Dann, S. M., & Savidge, T. C. (2016). Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. *Science Advances*, 2(3), e1501240. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501240>.
- Chen, X., Zhang, Y., Tang, W., Zhang, G., Wang, Y., & Yan, Z. (2024). Genetic variation, polyploidy, and hybridization influencing the aroma profiles of Rosaceae family. *Genes*, 15(10), 1-7. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes15101339>.
- D'Auria, J. C. (2006). Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Current Opinion Plant Biology*, 9(3), 331–340. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.016>.
- Dare, A. P., Wu, C., Carvajal, J. I., Nguyen, H. M., Günther, C. S., Hamiaux, C., Bailey, S., Deng, C., Mengist, M. F., Iorizzo, M., Foster, T. M., Chagné, D., Montanari, S., & Espley, R. V. (2025). Haplotyped genome mapping and functional characterization of a blueberry anthocyanin acetyltransferase (AAT) controlling the accumulation of acylated anthocyanins. *Journal of Experimental Botany*, 76(6), 1607–1624. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erae489>.
- Dudareva, N., Klempien A., Muhlemann, J. K., & Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198(1), 16–32. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.12145>.
- Dunemann, F., Ulrich, D., Malysheva-Otto, L., Weber, W. E., Longhi, S., Velasco, R., & Costa, F. (2012). Functional allelic diversity of the apple alcohol acyltransferase gene MdAAT1 associated with fruit ester volatile contents in apple cultivar. *Molecular Breeding*, 29(3), 609–625. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11032-011-9577-7>.
- Eduardo, I., Chietera, G., Pirona, R., Pacheco, I., Troggio, M., Banchi, E., Bassi, D., Rossini, L., Vecchietti, A., & Pozzi, C. (2013). Genetic dissection of aroma volatile compounds from the essential oil of peach fruit: QTL analysis and identification of candidate genes using dense SNP maps. *Tree Genetics & Genomes*, 9(1), 189–204. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11295-012-0546-z>.
- El Hadi, M. A. M., Zhang, F.-J., Wu, F.-F., Zhou, C.-H., & Tao, J. (2013). Advances in fruit aroma volatile research. *Molecules*, 18(7), 8200–8229. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules18078200>.
- Goff, S. A., & Klee, H. J. (2006). Plant volatile compounds: Sensory cues for health and nutritional value? *Science*, 311(5762), 815–819. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1112614>.
- Klee, H. J., & Tieman, D. M. (2018). The genetics of fruit flavour preferences. *Nature Reviews Genetics*, 19(6), 347–356. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0002-5>.
- Liu, G., Huang, L., & Lian J. (2023). Alcohol acyltransferases for the biosynthesis of esters. *Biotechnology Biofuels and Bioproducts*, 16(1), 1–16. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02343-x>.
- Liu, D., Du, Y., Abdiriyim, A., Zhang, L., Song, D., Deng, H., Wen, X., Zhang, Y., & Sun, B. (2025). Molecular functional mechanisms of two alcohol acetyltransferases in *Lavandula x intermedia* (lavandin). *Frontiers in Chemistry*, 13, 1–11. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2025.1627286>.
- Ma, X., Koepke, J., Panjikar, S., Fritzsche, G., & Stöckigt, J. (2005). Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13576–13583. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M414508200>.
- Mauliana, L., Jamil, A. S., & Siti, S. (2022). Curcuma longa as a natural immunomodulator for preventing infection from COVID-19 with an in silico approach. *Jurnal Biologi Tropis*, 22(2), 345–352. DOI: <https://doi.org/10.29303/jbt.v22i2.3281>.
- Morales-Quintana, L., Moya-León, M. A., & Herrera, R. (2015). Computational study

- p enlightens the structural role of the alcohol acyltransferase DFGWG motif.
- Journal Molecular Modeling*
- , 21(8), 1-10. DOI:
- <https://doi.org/10.1007/s00894-015-2762-6>
- .
- Mwaniki, R. M., Veldman, W., Sanyanga, A., Chamboko, C. R., & Bishop, Ö. T. (2025). Decoding allosteric effects of missense variations in drug metabolism: Afrocentric CYP3A4 alleles explored. *Journal of Molecular Biology*, 437(20), 169160. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2025.169160>.
- Saez, D., Rodríguez-Arriaza, F., Urra, G., Fabi, J. P., Hormazábal-Abarza, F., Méndez-Yáñez, A., Castro, E., Bustos, D., Ramos, P., & Morales-Quintana, L. (2024). Unraveling the key step in the aroma puzzle: Insights into alcohol acyltransferases in strawberries. *Plant Physiology and Biochemistry*, 212, 108668. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108668>.
- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., & Lewinsohn, E. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*, 54(4), 712–732. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03446.x>.
- Schwieterman, M. L., Colquhoun, T. A., Jaworski, E. A., Bartoshuk, L. M., Gilbert, J. L., Tieman, D. M., Odabasi, A. Z., Moskowicz, H. R., Folta, K. M., Klee, H. J., Sims, C. A., Whitaker, V. M., & Clark, D. G. (2014). Strawberry flavor: Diverse chemical compositions, a seasonal influence, and effects on sensory perception. *PLOS ONE*, 9(2), e88446. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088446>.
- Sebastiani, F., Baroni, C., Patil, G., Dali, A., Becucci, M., Hofbauer, S., & Smulevich, G. (2023). The role of the hydrogen bond network in maintaining heme pocket stability and protein function specificity of *C. diphtheriae* coproheme decarboxylase. *Biomolecules*, 13(2). DOI: <https://doi.org/10.3390/biom1302023>.
- Shojaee, F. M., Kazemian, M., Kolahi, M., Nosrati, H., & Kazemi, E. M. (2025). The role of volatile compounds and genes involved in ester biosynthesis during strawberry fruit (*Fragaria × ananassa* Duchesne) development. *Acta Agriculturae Slovenica*, 121(1), 1–11. DOI: <https://doi.org/10.14720/aas.2025.121.2.18538>.
- Song, Z.-Z., Peng, B., Gu, Z.-X., Tang, M.-L., Li, B., Liang, M.-X., Wang, L.-M., Guo, X.-T., Wang, J.-P., Sha, Y.-F., & Zhang, H.-X. (2021). Site-directed mutagenesis identified the key active site residues of alcohol acyltransferase PpAAT1 responsible for aroma biosynthesis in peach fruits. *Horticulture Research*, 8(32). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00461-x>.
- Souleyre, E. J. F., Nieuwenhuizen, N. J., Wang, M. Y., Winz, R. A., Matich, A. J., Ileperuma, N. R., Tang, H., Baldwin, S. J., Wang, T., List, B. W., Hoeata, K. A., Popowski, E. A., & Atkinson, R. G. (2022). Alcohol acyl transferase genes at a high-flavor intensity locus contribute to ester biosynthesis in kiwifruit. *Plant Physiology*, 190(2), 1100–1116. DOI: <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac31>.
- Tang, Y., Yao, Y., Wu, Y., & Yang, S. (2025). The volatile composition, biosynthesis pathways, breeding strategies, and regulation measures of apple aroma: A review. *Horticulturae*, 11(3), 310. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae11030310>.
- Tuominen, L. K., Johnson, V. E., & Tsai, C. J. (2011). Differential phylogenetic expansions in BAHD acyltransferases across five angiosperm taxa and evidence of divergent expression among *Populus* paralogues. *BMC Genomics*, 12(1), 236. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-236>.
- Veldman, W., & Tastan Bishop, Ö. (2025). Residue variations in human N-acetyltransferase 2 enzyme alleles: From rapid to slow acetylation. *ACS Omega*, 10(30), 33045–33062. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c02316>.
- Wang, J., Guo, X., Wu, Z., Wang, D., Guo, P., Han, Y., Jiang, H., & Lü, Z. (2025).

Integration of volatile and non-volatile metabolites and the transcriptome reveals the formation mechanisms of differential aroma compounds between *Pyrus communis* and *Pyrus pyrifolia* cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 16, 1559012. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1559012>

Xu, D., Wang, Z., Zhuang, W., Wang, T., & Xie, Y. (2023). Family characteristics, phylogenetic reconstruction, and potential applications of the plant BAHD acyltransferase family. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1218914. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1218914>