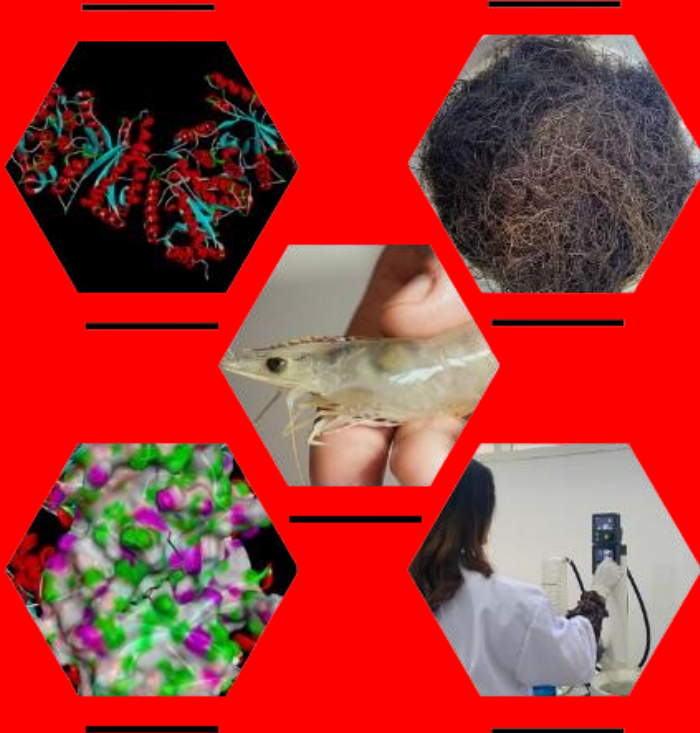


**EVALUASI POTENSI SENYAWA RUMPUT LAUT *Gracilaria changii*
SEBAGAI ANTIBAKTERI *Vibrio harveyi* YANG SERING MENYERANG
UDANG VANAME (*Penaeus vannamei*) MENGGUNAKAN UJI
MOLECULAR DOCKING**



NURHAYYUL ALFAHNI

L031201026



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2024

**EVALUASI POTENSI SENYAWA RUMPUT LAUT *Gracilaria changii*
SEBAGAI ANTIBAKTERI *Vibrio harveyi* YANG SERING MENYERANG
UDANG VANAME (*Penaeus vannamei*) MENGGUNAKAN UJI
MOLECULAR DOCKING**

NURHAYYUL ALFAHNI

L031 20 1026



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**EVALUASI POTENSI SENYAWA RUMPUT LAUT *Gracilaria changii*
SEBAGAI ANTIBAKTERI *Vibrio harveyi* YANG SERING MENYERANG
UDANG VANAME (*Penaeus vannamei*) MENGGUNAKAN UJI
MOLECULAR DOCKING**

NURHAYYUL ALFAHNI

L031 20 1026

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana

Program Studi Budidaya Perairan

Pada

**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

LEMBAR PENGESAHAN**SKRIPSI**

**EVALUASI POTENSI SENYAWA RUMPUT LAUT *Gracilaria changii*
SEBAGAI ANTIBAKTERI *Vibrio harveyi* YANG SERING MENYERANG
UDANG VANAME (*Penaeus vannamei*) MENGGUNAKAN UJI
MOLECULAR DOCKING**

NURHAYYUL ALFAHNI

L031 20 1026

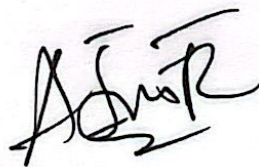
Skripsi,

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana pada 29 November 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan pada

Program Studi Budidaya Perairan
Departemen Perikanan
Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing Tugas Akhir



Asmi Citra Malina, S.Pi., M.Agr., Ph.D

NIP. 19721228 200604 2 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi



Dr. Andi Alfar Hidayani, S.Si., M.Si

NIP. 19800502 200501 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Evaluasi Potensi Senyawa Rumput Laut *Gracilaria changii* Sebagai Antibakteri *Vibrio harveyi* yang Sering Menyerang Udang Vaname (*Penaeus vannamei*) Menggunakan Uji *Molecular Docking*" adalah benar karya saya dengan arahan dari Ibu Asmi Citra Malina, S.Pi., M.Agr., Ph.D. sebagai pembimbing. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 30 November 2024



NURHAYYUL ALFAHNI
L031201026



UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian yang penulis lakukan dapat terlaksana dengan sukses dan skripsi ini dapat terampungkan atas bimbingan, diskusi, dan arahan Ibu **Asmi Citra Malina, S.Pi., M.Agr., Ph.D.**, sebagai pembimbing utama yang selama ini telah memberikan arahan dan bimbingannya serta telah banyak memberikan saran, arahan, serta kritik yang membangun kepada penulis. Kepada Bapak **Prof. Dr. Ir. Hilal Anshary, M.Sc.**, selaku pembimbing akademik sekaligus dosen penguji, dan Ibu **Dr. Ir. Sriwulan, MP.**, sebagai dosen penguji. Ucapan terima kasih juga saya ucapkan kepada seluruh civitas akademika Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin yang telah membantu dan memfasilitasi penulis menempuh program sarjana. Terimakasih juga saya sampaikan kepada Pak **Muh. Anshar S.Si, M.Sc** dan Kak **Latifa Baharuddin S.Pi, M.Si** yang telah membantu selama proses penelitian berlangsung.

Kepada Orang Tua tercinta Ayahanda **Amul. M** yang selalu mendoakan keberhasilan dan kelancaran setiap rintangan yang penulis hadapi, serta segala bentuk kasih sayang dan pengorbanannya selama ini kepada penulis. Kepada saudara penulis **Haklan** yang telah membantu segala keperluan dan senantiasa mendoakan penulis. Kepada Sahabat karib penulis **Jesika, Aurelia, Reski Syahrir, Wahyuni, dan Ana** terima kasih atas segala doa, dukungan, dan semangat yang diberikan kepada penulis. Kepada teman seperjuangan penelitian **Amalia Harnanda Zaqia, Maria Cecelia Peni, dan Andi Tenri Unga Citta** yang senantiasa memberikan dukungan, doa, dan bantuannya. Kepada teman, kakak dan adek di **UKM Seni Tari UNHAS** yang senantiasa memberikan doa dan dukungan. Serta untuk sepupu saya **A. Tria Mortheza Herens** yang telah banyak mendoakan, memberikan semangat dan motivasi. Tak lupa saya ucapkan terima kasih kepada **Alfian Dwi Afandi** dan keluarga yang memberikan dukungan baik secara materi maupun non materi. Tak lupa pula saya ucapkan banyak terima kasih kepada teman-teman **BDP 2020** yang telah memberikan dukungan, semangat, dan do'a. Doa terbaik untuk segala hal yang akan kita lalui di masa depan. Selamat merayakan kelulusan dan semangat untuk apapun yang di cita-citakan. Semoga apapun yang diimpikan di masa depan bisa terwujud. Tidak ada yang sulit jika dijalani bersama-sama.

Terakhir, terima kasih kepada diri sendiri **Nurhayyul Alfahni** sebagai penulis dalam skripsi ini. Terima kasih karena tetap ada dan kuat sampai sekarang menghadapi apapun yang terjadi. Selamat dan semangat ini bukan akhir tapi ini awal dari segala hal yang ingin dicapai. Apapun yang terjadi tetaplah hidup.

Penulis,



Nurhayyul Alfahni

ABSTRAK

NURHAYYUL ALFAHNI. **Evaluasi Potensi Senyawa Rumput Laut *Gracilaria changii* Sebagai Antibakteri *Vibrio harveyi* yang Sering Menyerang Udang Vaname (*Penaeus vannamei*) Menggunakan Uji *Molecular Docking*** (dibimbing oleh Asmi Citra Malina).

Latar belakang. Udang vaname (*Penaeus vannamei*) merupakan komoditas perikanan penting, namun penyakit seperti vibriosis yang disebabkan oleh *Vibrio harveyi* dapat mengancam budidaya udang. Salah satu metode penanggulangan yang efektif adalah penggunaan imunostimulan alami, seperti rumput laut. Beberapa jenis rumput laut, seperti *Gracilaria verrucosa*, *Sargassum polycystum*, dan *Caulerpa racemosa* diketahui memiliki potensi antibakteri dan imunostimulasi. Namun, belum ada penelitian terkait potensi *Gracilaria changii* sebagai antibakteri pada hewan budidaya. Untuk itu, penelitian ini bertujuan mengevaluasi potensi senyawa dari ekstrak rumput laut *Gracilaria changii* sebagai antibakteri terhadap *Vibrio harveyi* yang sering menyerang udang vaname menggunakan metode *in silico* dengan pendekatan *molecular docking*. Metode *in silico* ini dapat memprediksi interaksi molekuler secara efisien, tanpa membutuhkan uji hewan dan dengan biaya yang lebih rendah. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi senyawa ekstrak rumput laut *Gracilaria changii* sebagai antibakteri *Vibrio harveyi* melalui uji *molecular docking*. **Metode.** Penelitian ini menggunakan metode komputasi (*in silico*) yaitu dengan melakukan penelusuran ilmiah ekstrak senyawa rumput laut (*Gracilaria changii*) sebagai kandidat antibakteri *Vibrio harveyi* pada udang vaname (*Penaeus vannamei*) menggunakan *molecular docking* dengan penambahan ekstrak senyawa rumput laut dan protein luxA. Senyawa yang terkandung pada rumput laut diidentifikasi menggunakan metode *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS). **Hasil.** Senyawa yang memiliki nilai *binding affinity* paling mendekati kontrol positif dan paling negatif merupakan senyawa yang terbaik. Senyawa yang paling efektif dari lima senyawa terbaik untuk dijadikan sebagai kandidat antibakteri dari rumput laut *Gracilaria changii* yaitu senyawa *Cholest-5-en-3-ol (3.beta.)* dengan nilai *binding affinity* -6.0 kcal/mol, sedangkan *Tetracycline* sebagai inhibitor kontrol memiliki nilai *binding affinity* -7.37 kcal/mol. Namun, terdapat senyawa lain yang berpeluang yaitu senyawa *n-Hexadecanoic acid* dan *Octadec-9-enoic acid*. **Kesimpulan.** Rumput laut uji memiliki senyawa yang potensial yang dapat dijadikan sebagai kandidat antibakteri *Vibrio harveyi* pada udang vaname berdasarkan hasil analisis secara *in silico* melalui *molecular docking* interaksi antara ligan dan protein.

Kata kunci: udang vaname; *Vibrio harveyi*; rumput laut; *Gracilaria changii*; *molecular docking*; *in silico*; antibakteri

ABSTRACT

NURHAYYUL ALFAHNI. **Evaluation of the Potential of *Gracilaria changii* Seaweed Compounds as Antibacterial *Vibrio harveyi* that Often Attack Vaname Shrimp (*Penaeus vannamei*) Using Molecular Docking Tests** (supervised by Asmi Citra Malina).

Background. Vaname shrimp (*Penaeus vannamei*) is an important fisheries commodity, but diseases such as vibriosis caused by *Vibrio harveyi* can threaten shrimp farming. One effective countermeasure is the use of natural immunostimulants, such as seaweed. Several types of seaweed, such as *Gracilaria verrucosa*, *Sargassum polycystum*, and *Caulerpa racemosa* are known to have antibacterial and immunostimulating potential. However, there is no research related to the potential of *Gracilaria changii* as an antibacterial in cultured animals. For this reason, this study aims to evaluate the potential of compounds from *Gracilaria changii* seaweed extract as antibacterial against *Vibrio harveyi* which often attacks vaname shrimp using in silico methods with a molecular docking approach. This in silico method can predict molecular interactions efficiently, without the need for animal tests and at a lower cost. **Objective.** This study aims to evaluate *Gracilaria changii* seaweed extract compounds as *Vibrio harveyi* antibacterial through molecular docking test. **Method.** This study uses a computational method (in silico) by conducting scientific searches of seaweed compound extracts (*Gracilaria changii*) as *Vibrio harveyi* antibacterial candidates in vaname shrimp (*Penaeus vannamei*) using molecular docking by tethering seaweed compound extracts and luxA protein. Compounds contained in seaweed were identified using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) method. **Results.** The compound that has the closest binding affinity value to the positive control and the most negative is the best compound. The most effective compound of the five best compounds to be used as antibacterial candidates from *Gracilaria changii* seaweed is the compound *Cholest-5-en-3-ol (3.beta.)* with a binding affinity value of -6.0 kcal/mol, while Tetracycline as a control inhibitor has a binding affinity value of -7.37 kcal/mol. However, there are other compounds that are likely, namely *n-Hexadecanoic acid* and *Octadec-9-enoic acid*. **Conclusion.** The test seaweed has potential compounds that can be used as *Vibrio harveyi* antibacterial candidates in vaname shrimp based on the results of in silico analysis through molecular docking of interactions between ligands and proteins.

Key words: vaname shrimp; *Vibrio harveyi*; seaweed; *Gracilaria changii*; molecular docking; in silico; antibacterial

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI.....	v
DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
<i>CURRICULUM VITAE</i>	xiv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan dan Manfaat	2
BAB II. METODE PENELITIAN	3
2.1. Waktu dan Tempat.....	3
2.2. Tahap Persiapan.....	3
2.2.1. Alat dan Bahan	3
2.2.2. Pengambilan Sampel Rumput Laut dan Persiapan Ekstraksi.....	3
2.3. Tahap Pelaksanaan Uji <i>In Silico</i>	4
2.3.1. Ekstraksi Senyawa Rumput Laut <i>Gracilaria changii</i>	4
2.3.2. Analisis Senyawa Rumput Laut <i>Gracilaria changii</i> dengan Metode Gas <i>Chromatography-Mass Spectrometry</i> (GC-MS)	4
2.3.3. Analisis Interaksi Ligan (Rumput Laut) –Reseptor (Protein luxA) pada <i>Vibrio harveyi</i> secara <i>In Silico</i>	5
2.4 Analisis Data	15
BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	16
3.1. Analisis <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (GC-MS) Rumput Laut <i>Gracilaria changii</i>	16
3.2. Analisis <i>In Silico</i> Interaksi Antara Ligan (Rumput Laut) – Protein (luxA) Menggunakan Uji <i>Molecular Docking</i>	18
3.2.1. Nilai <i>Binding Affinity</i>	18
3.2.2. Jenis Interaksi Antara Ligan (Senyawa <i>Gracilaria changii</i>) dengan Reseptor (luxA).....	20

BAB IV. KESIMPULAN	24
DAFTAR PUSTAKA.....	25
LAMPIRAN.....	29

DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Bahan yang digunakan selama penelitian	3
2. Alat yang digunakan selama penelitian	3
3. Prosedur preparasi protein	6
4. Prosedur preparasi ligan	7
5. Prosedur <i>molecular docking</i>	8
6. Prosedur visualisasi hasil <i>molecular docking</i>	15
7. Senyawa dominan dengan nilai SI diatas 90%	17
8. Nilai <i>binding affinity</i>	19
9. Asam amino yang berikatan dengan ligan dan jenis interaksinya	23

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. Prosedur Pelaksanaan Uji <i>In Silico</i>	4
2. Proses Pelaksanaan <i>Molecular Docking</i>	5
3. Hasil <i>Gas Chromatography-Mass Spectometry Glacilaria changii</i>	17
4. Struktur 3D Protein luxA (PDB ID : 3FGC)	18
5. Visualisasi Interaksi <i>1,6-Anhydro-.beta.-d-talopyranose</i> dengan luxA.....	20
6. Visualisasi Interaksi <i>n-Hexadecanoic acid</i> dengan luxA	21
7. Visualisasi Interaksi <i>Octadec-9-enoic acid</i> dengan luxA.....	21
8. Visualisasi Interaksi <i>Arachidonic acid</i> dengan luxA.....	22
9. Visualisasi Interaksi <i>Cholest-5-en-3-ol (3.Beta.)</i> dengan luxA	22

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut	Halaman
1. Senyawa rumput laut <i>Gracilaria changii</i>	29
2. Dokumentasi kegiatan	33

CURRICULUM VITAE

A. Data Pribadi

1. Nama : Nurhayyul Alfahni
2. Tempat, tgl lahir : Palopo, 24 Desember 2001
3. Alamat : Jl. Lasaktia Raja KM 05 Lebang, Kota Palopo
4. Kewarganegaraan : Warga Negara Indonesia

B. Riwayat Pendidikan

1. Tamat SD tahun 2014 di SDN 27 Lebang
2. Tamat SMP tahun 2017 di SMPN 2 Palopo
3. Tamat SMA tahun 2020 di SMAN 1 Palopo

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Udang vaname (*Penaeus vannamei*) adalah salah satu komoditas perikanan yang bernilai ekonomis dan nilainya tinggi di berbagai negara, termasuk Indonesia.. Menurut data yang dirilis oleh Kementerian Kelautan dan Perikanan, permintaan ekspor udang vaname pada tahun 2018 telah melampaui angka 180.000 ton, meningkat dari 147.000 ton pada tahun sebelumnya (Syaripah dan Mulatsih, 2024). Udang vaname menjadi salah satu komoditas unggulan dalam pengembangan usaha budidaya (Jannah *et al.*, 2018). Akan tetapi, keberadaan penyakit merupakan hal yang tidak bisa dihindari. Penyakit menjadi salah satu tantangan utama dalam kegiatan budidaya karena dapat menyebabkan kematian massal pada udang. Salah satu penyakit yang sangat membahayakan dalam budidaya udang adalah vibriosis. Penyakit vibriosis dapat menimbulkan dampak negatif bagi pertumbuhan udang (Apriliani *et al.*, 2016). Vibriosis disebabkan oleh bakteri *Vibrio harveyi*. Bakteri *Vibrio harveyi* merupakan agen infeksius yang dapat menginfeksi hewan budidaya khususnya pada udang. Bakteri ini dapat menyebabkan lisis sel-sel darah pada tubuh inang, tubuh udang mengalami perubahan menjadi merah bahkan menyebabkan kematian (Jannah *et al.*, 2018).

Upaya pencegahan penyakit vibriosis yang sering menginfeksi udang vaname harus diatasi sedini mungkin. Beberapa metode yang telah diterapkan dalam penanganan penyakit antara lain penggunaan antibiotik atau bahan kimia, vaksin, probiotik, penggunaan SPF/SPR, dan biosekuriti (Affandi *et al.*, 2023). Menurut Ridlo dan Pramesti (2009), metode penanganan penyakit yang sering digunakan yaitu dengan penggunaan imunostimulan. Penggunaan imunostimulan telah dikembangkan dan mulai diterima dalam terapi pengobatan sejak pertengahan abad XIX dengan tujuan untuk meningkatkan daya tahan tubuh (Aldi *et al.*, 2014). Menurut Erniati dan Ezraniati (2020), Imunostimulan dapat meningkatkan sistem imun, baik sistem imun non spesifik dan spesifik. Imunostimulan dalam penanganan penyakit dapat diandalkan karena ramah lingkungan dan tidak meninggalkan residu pada lingkungan perairan. Salah satu sumber imunostimulan yang bisa digunakan untuk meningkatkan sistem pertahanan tubuh udang adalah rumput laut (Suleman, 2020).

Beberapa rumput laut yang terbukti dapat dijadikan sebagai imunostimulan adalah *Caulerpa racemosa* dan *Caulerpa lentillifera* karena memiliki bahan aktif yang efektif sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen *Vibrio harveyi* (Hertika *et al.*, 2024), *Gracillaria verrucosa* yang memiliki sifat antibakteri dan dapat meningkatkan respon imun serta ketahanan terhadap penyakit vibriosis (Rudi *et al.*, 2019), dan hasil penelitian Riyanto *et al.*, (2014) menunjukkan bahwa ekstrak *Sargassum polycystum* dari pelarut etil asetat mempunyai aktivitas antibakteri *Vibrio harveyi* karena mengandung senyawa bioaktif. Kandungan senyawa bioaktif yang terdapat dalam rumput laut berperan penting dalam menstimulus sistem imun dan bekerja sebagai antibakteri, antifungi serta antioksidan (Suharli *et al.*, 2024).

Ketersediaan rumput laut sangat melimpah di perairan, khususnya di perairan Sulawesi Selatan. Salah satunya yaitu rumput laut *Gracillaria changii*. *Gracillaria changii* merupakan salah satu jenis alga merah (*Rhodophyta*). *Gracillaria changii* telah dilaporkan berkhasiat sebagai antiinflamasi (Erniati dan Ezraniati, 2020). Sedangkan menurut Chan

et.al., (2015) menyebutkan bahwa *Gracilaria changii* memiliki potensi sebagai antioksidan. Berdasarkan penelitian Sasidharan *et al.*, (2009) menyebutkan bahwa *Gracilaria changii* memiliki berbagai macam aktivitas antimikroba terhadap mikroorganisme patogen. Namun hingga kini, belum ada penelitian tentang potensi *Gracilaria changii* sebagai imunostimulan dan antibakteri *Vibrio harveyi* pada hewan budidaya, khususnya udang vaname . Karena itu, perlu penelitian lebih lanjut mengenai efektivitasnya. Saat ini, penemuan imunostimulan dan obat-obatan sering menggunakan aplikasi atau *software* khusus pada komputer atau yang dikenal dengan *in silico*.

Adapun *in silico* merupakan uji yang dilakukan menggunakan simulasi komputer (Herman, 2019). Di mana ini adalah teknologi yang menggunakan komputer untuk melakukan prediksi aktifitas dan sifat molekul sebelum dilakukan pengujian lebih lanjut di laboratorium (Arba, 2019). Pada umumnya, untuk meneliti dan menemukan senyawa calon obat baru membutuhkan biaya yang sangat besar, waktu yang lama dan tenaga yang dibutuhkan sangat banyak. Oleh karena itu, merancang obat secara *in silico* dinilai lebih ekonomis dalam hal biaya dan mempersingkat waktu yang dibutuhkan (Gunawan *et al.*, 2021). Selain itu, menurut Sinurat *et al.*, (2021) penggunaan metode *in silico* tidak menggunakan hewan uji. Analisis *in silico* untuk mengidentifikasi senyawa aktif yaitu dengan menggunakan metode *molecular docking* atau yang dikenal dengan simulasi penambatan molekul. *Molecular docking* merupakan salah satu metode CADD (*Computer Aided Drug Design*) yang dapat digunakan untuk memberikan gambaran interaksi suatu senyawa terhadap protein target dengan memprediksi bentuk atau susunan tiga dimensi dari sebuah molekul dan energi ikatannya (Hasan *et al.*, 2022). Dalam melakukan penambatan molekul dibutuhkan beberapa aplikasi penunjang, ligan, dan reseptor protein. Ligan adalah senyawa aktif yang terikat pada asam-asam amino suatu protein, sedangkan reseptor protein merupakan molekul tempat terikatnya ligan, umumnya memiliki ukuran molekul yang besar (Syahputra, 2015). Protein berperan sebagai kunci, sedangkan ligan sebagai gembok (*lock and key*). Protein yang digunakan untuk *Vibrio harveyi* pada *molecular docking* adalah luxA (PDB:3FGC) (Brodli *et al.*, 2018), sedangkan ligan yang digunakan adalah senyawa hasil GC-MS.

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengevaluasi potensi dari senyawa rumput laut *Gracilaria changii* sebagai salah satu kandidat antibakteri terhadap *Vibrio harveyi* yang menginfeksi udang vaname (*Penaeus vannamei*) menggunakan *molecular docking*.

1.2 Tujuan dan Manfaat

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengevaluasi senyawa ekstrak rumput laut *Gracilaria changii* yang memiliki kemampuan sebagai antibakteri *Vibrio harveyi* melalui uji *molecular docking*.

Manfaat dari penelitian ini yaitu sebagai sumber acuan untuk penggunaan metode *in silico* dalam bidang budidaya untuk menghambat bakteri *Vibrio harveyi* menggunakan ekstrak rumput laut *Gracilaria changii* yang merupakan bahan herbal sehingga membutuhkan biaya yang lebih sedikit dan tidak memberikan dampak yang negatif, serta dapat digunakan sebagai sumber referensi untuk penelitian selanjutnya dan melakukan penelitian lebih lanjut menggunakan metode *in vitro* dan *in vivo*.

BAB II. METODE PENELITIAN

2.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan yaitu pada bulan Agustus-Oktober pada tahun 2024 dilakukan di Laboratorium Biologi Kelautan (FIKP) Universitas Hasanuddin untuk metode ekstraksi, untuk metode GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang.

2.2. Tahap Persiapan

2.2.1. Alat dan Bahan

Bahan dan alat yang digunakan saat penelitian dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2 sebagai berikut.

Tabel 1. Bahan yang digunakan selama penelitian

Nama Bahan	Fungsi
Rumput laut <i>Gracilaria changii</i>	Bahan ekstraksi
Ekstrak <i>Gracilaria changii</i>	Bahan uji GC-MS
Protein luxA	Bahan uji <i>in silico</i>
Etanol 96%	Pelarut ekstrak

Tabel 2. Alat yang digunakan selama penelitian

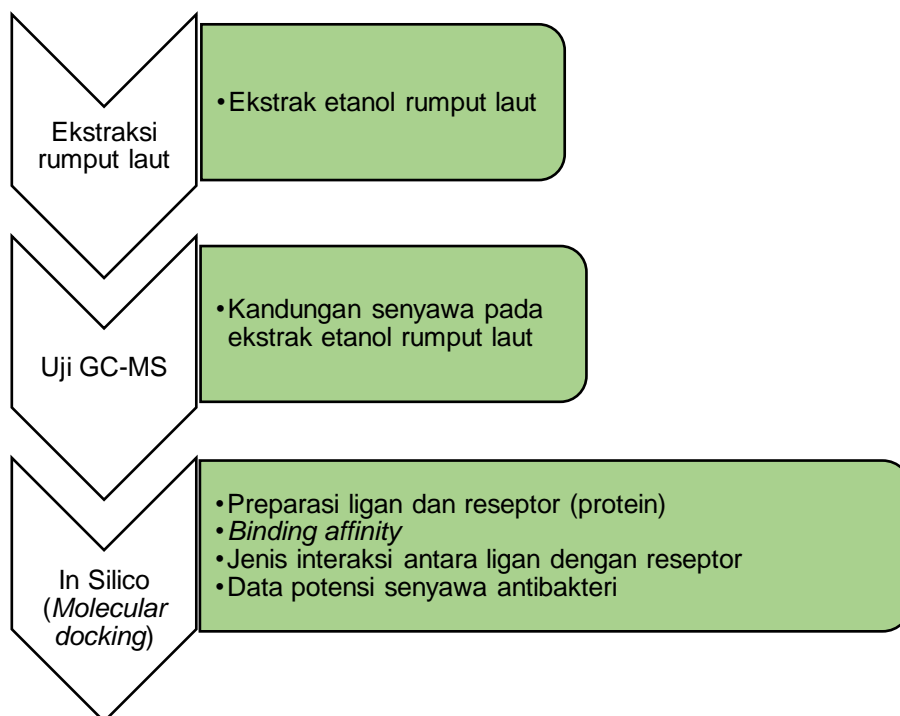
Nama Alat	Fungsi
<i>Rotary Evaporator</i>	Alat untuk ekstraksi
GCMS QP-2010 Shimadzu Ultra	Alat uji GC-MS
Komputer	Untuk uji <i>in silico</i>
Microsoft Office 2019	Aplikasi pendukung
Autodock Tools	Aplikasi <i>docking</i>
Autodock 4.0	<i>Software docking</i> yang akan menghitung dan menampilkan nilai <i>binding affinity</i>
UCSF Chimera (3D Viewer)	Aplikasi untuk preparasi ligan dan protein
BIOVIA Discovery Studio Visualizer	Aplikasi untuk visualisasi hasil <i>docking</i>

2.2.2. Pengambilan Sampel Rumput Laut dan Persiapan Ekstraksi

Sampel rumput laut yang digunakan pada penelitian ini diperoleh diperoleh dari desa Maccini Baji, Kabupaten Takalar, Provinsi Sulawesi Selatan. Setelah dikoleksi, sampel basah yang baru dipanen kemudian akan dimasukkan kedalam wadah untuk diproses lebih lanjut.

Sebelum dilakukan ekstraksi, sampel basah yang telah dipanen dicuci dengan air laut guna menghilangkan sedimen-sedimen yang menempel pada rumput laut. Selanjutnya, dicuci kembali menggunakan air mengalir hingga bersih dari presipitat air garam dan selanjutnya dilakukan sortasi basah untuk menghilangkan pengotor berupa

epifit yang terikut saat proses pengambilan sampel. Kemudian sampel dikeringkan dibawah sinar matahari selama 4 hari hingga sampel kering.



Gambar 1. Prosedur Pelaksanaan Uji *In Silico*

2.3. Tahap Pelaksanaan Uji *In Silico*

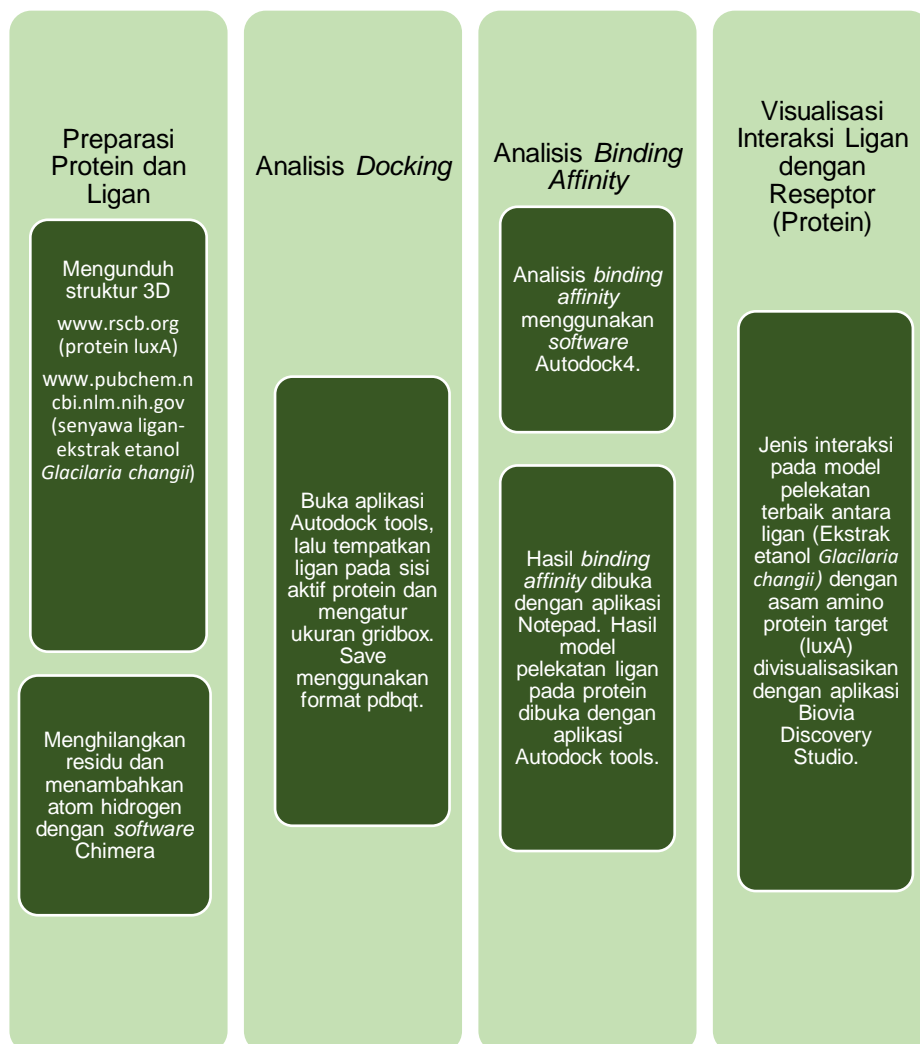
2.3.1. Ekstraksi Senyawa Rumput Laut *Gracilaria changii*

Metode ekstraksi yang digunakan dalam mengekstrak sampel yaitu metode maserasi. Sampel rumput laut dimaserasi menggunakan larutan Etanol 96% dengan perbandingan 1:6 selama 3 hari. Kemudian disaring menggunakan kertas saring untuk mendapatkan filtrat. Remaserasi dilakukan pada sampel selama 2x24 jam agar kandungan senyawa tidak ada yang tertinggal pada sampel. Hasil dari filtrasi tersebut kemudian diekstrak menggunakan *Rotary Evaporator* hingga didapatkan ekstrak dari rumput laut.

2.3.2. Analisis Senyawa Rumput Laut *Gracilaria changii* dengan Metode *Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)*

Hasil ekstrak rumput laut yang didapatkan selanjutnya dianalisis menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy QP 2010 Shimadzu Ultra* untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam *Gracilaria changii*. Sampel sebanyak 0,5 mL diinjeksikan ke GC-MS yang dioperasikan menggunakan kolom yang panjangnya 30 m dengan diameter 0,25 mm. Suhu sumber ion dan interface 200°C dan 280°C. Suhu awal kolom 70°C dengan waktu tahan 2 menit hingga 200°C dan untuk suhu akhir 280°C.

2.3.3. Analisis Interaksi Ligan (Rumput Laut) – Reseptor (Protein luxA) pada *Vibrio harveyi* secara *In Silico*

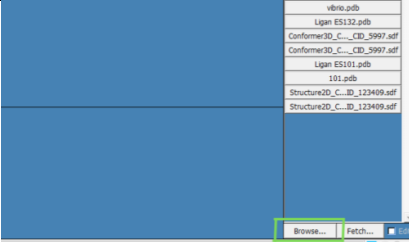
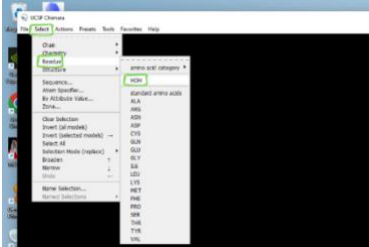
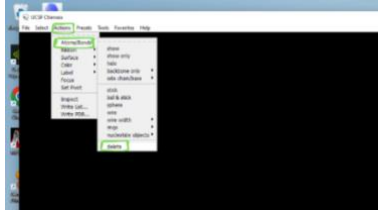
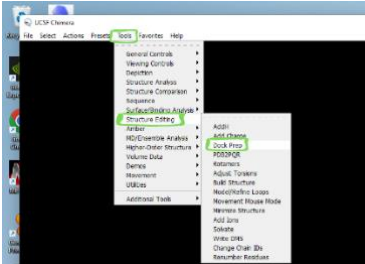
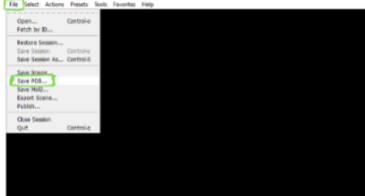


Gambar 2. Proses Pelaksanaan *Molecular Docking*

a. Preparasi Protein (luxA)

Protein yang akan digunakan diunduh dari situs resmi protein *data bank* RSCB (www.rscb.org) dalam format PDB. Protein yang digunakan dalam penelitian ini adalah protein luxA (PDB ID : 3FGC) untuk *Vibrio harveyi*. Setelah protein diunduh dalam format PDB, protein yang sudah diunduh kemudian divisualisasikan menggunakan Chimera dan dihilangkan residunya. Protein yang sudah tidak memiliki residu ditambahkan atom hidrogen dan disimpan dengan format “pdb”. Hal ini berfungsi untuk mempersiapkan kebutuhan *docking* yang meliputi protein target. Prosedur preparasi protein dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Prosedur preparasi protein

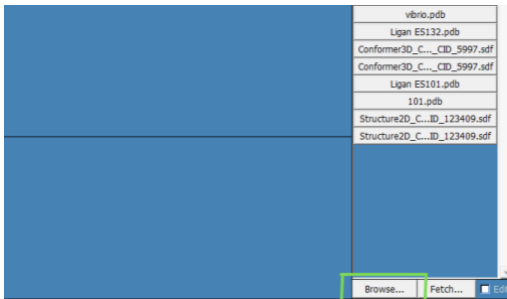
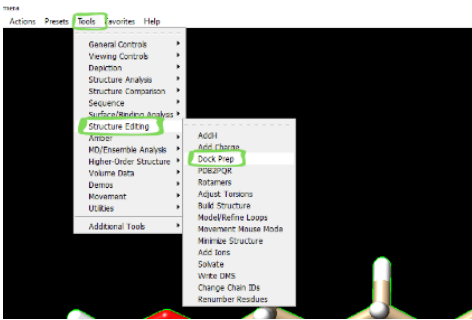
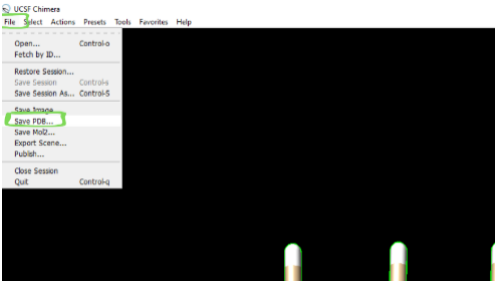
No	Gambar	Keterangan
1.		Buka aplikasi Chimera kemudian klik icon bertuliskan browse dan pilih file protein yang akan dipreparasi.
2.		Klik icon select -> residue -> dan pilih residue nya
3.		Klik icon actions -> atom/bonds -> delete
4.		Klik icon tools -> structure editings -> dock prep
5.		Save protein dengan klik icon file -> save pdb, kemudian save file dengan format "nama protein.pdb"

b. Preparasi Ligan (Senyawa Rumput Laut *Gracilaria changii*)

Ligan yang digunakan dalam uji ini adalah senyawa dari ekstrak rumput laut *Gracilaria changii* yang didapatkan hasil dari GCMS, kemudian mengumpulkan struktur 3D senyawa dari ekstrak rumput laut melalui situs resmi <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dengan mengunduh file berformat SDF dan mengunduh inhibitor kontrol seperti *Tetracycline* untuk *Vibrio harveyi*.

Setelah mengunduh senyawa aktif dan inhibitor kontrol yang dibutuhkan, selanjutnya akan divisualisasi menggunakan UCSF Chimera (3D Viewer) lalu menambahkan atom hidrogen dan disimpan dalam bentuk “pdb”. Hal ini berfungsi untuk mempersiapkan kebutuhan *docking* yang meliputi ligan dan kontrol positif protein target. Prosedur preparasi ligan dapat dilihat pada Tabel 4.

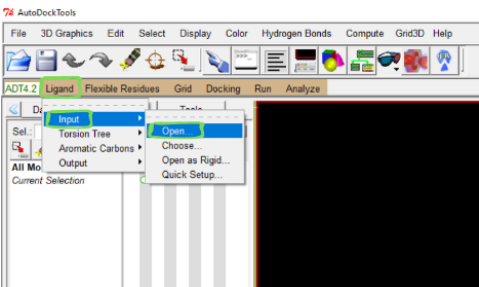
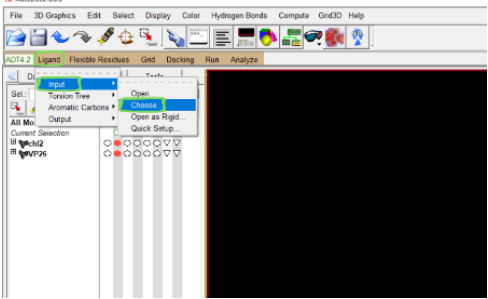
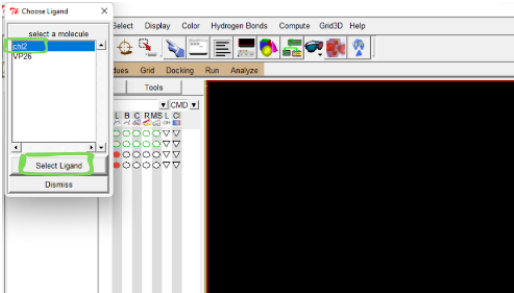
Tabel 4. Prosedur preparasi ligan

No	Gambar	Keterangan
1.		Buka aplikasi chimera kemudian klik icon bertuliskan browse dan pilih file ligan yang akan dipreparasi.
2.		Klik icon tools -> structure editing -> dan dock prep
3.		Simpan ligan dengan klik icon file -> save pdb, dan simpan dengan format “ nama ligan.pdb”

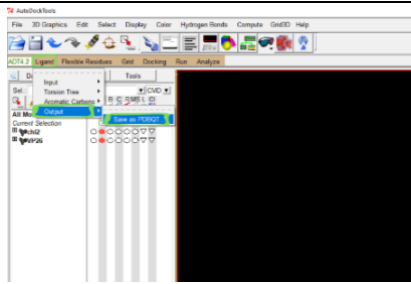

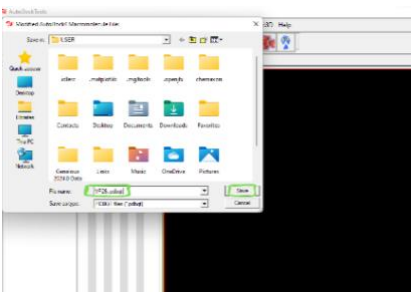
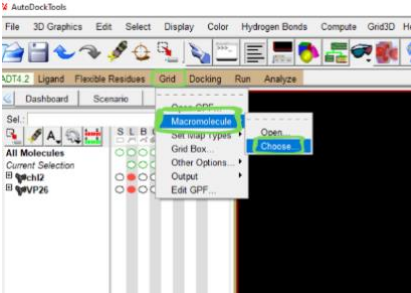
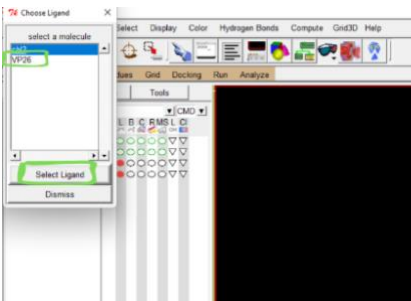
c. Proses *Docking* (Penambatan Molekul) dengan Autodocktools dan Autodock4

Proses *docking* dilakukan dengan menggunakan aplikasi Autodock tools dan *software* Autodock4. Preparasi protein *Vibrio harveyi* (luxA), serta inhibitor kontrol *Tetracycline* di masukkan dalam *software* Autodock tools dan mengatur grid box dengan ukuran 120x120x120 untuk menemukan sisi aktif dari protein. Setelah ditemukan sisi aktif dari protein dengan konformasi yang sesuai, maka preparasi ligan dimasukkan dan disesuaikan dengan konformasi dari inhibitor kontrol. Grid box diatur menjadi lebih kecil dengan ukuran 40x40x40. Kemudian *software* Autodock4 dijalankan untuk menghitung nilai *binding affinity* pada setiap bentuk struktur molekul atau bentuk pelekatan yang terjadi. Data interaksi ligan dan protein akan ditampilkan menggunakan *Biovia Discovery Studio* untuk melihat letak dan model pelekatan pada target protein dalam bentuk 3D dan 2D. Prosedur *molecular docking* dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Prosedur *molecular docking*

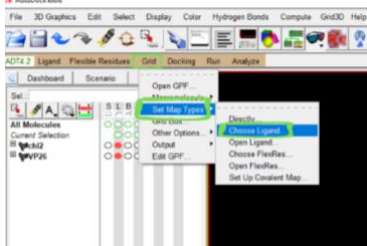
No	Gambar	Keterangan
1.		Buka aplikasi autodock tools kemudian klik icon ligan pilih input kemudian open untuk memasukkan file ligan yang telah di preparasi.
2.		Setelah file ligan telah masuk klik kembali icon ligan pilih input kemudian choose.
3.		Kemudian akan muncul pop up box dan pilih file ligan kemudian klik select.

Lanjutan Tabel 5.

4.  Setelah ligan dipilih klik icon ligan pilih output kemudian save as pdbqt. Simpan ke dalam folder yang diinginkan dengan format "nama file.pdbqt".
5.  Untuk memasukkan file protein klik icon file pilih read molecule dan pilih file protein yang telah di preparasi.
6.  Akan muncul pop up box untuk menyimpan protein dengan format "nama file.pdbqt".
7.  Klik icon grid pilih macromolecule dan choose.
8.  Kemudian akan muncul pop up box dan pilih file protein kemudian klik select.

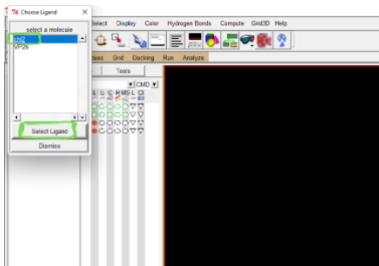
Lanjutan Tabel 5.

9.



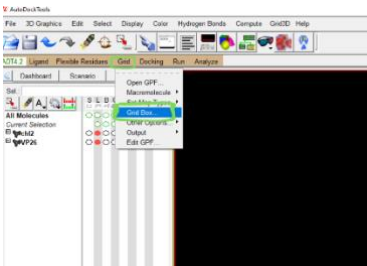
Klik icon grid pilih set map types dan choose legend.

10.



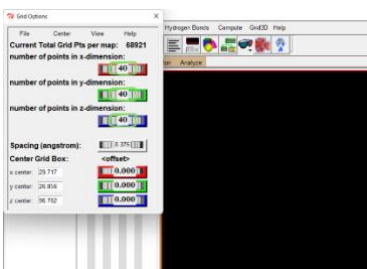
Kemudian akan muncul pop up box dan pilih file ligan kemudian klik select.

11.



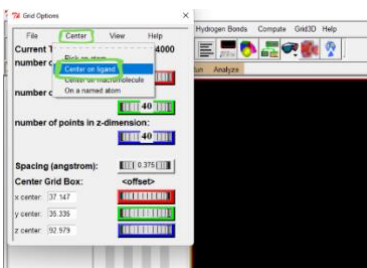
Klik icon grid dan pilih grid box.

12.




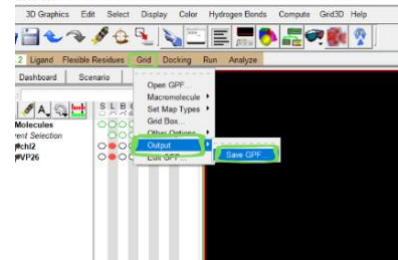
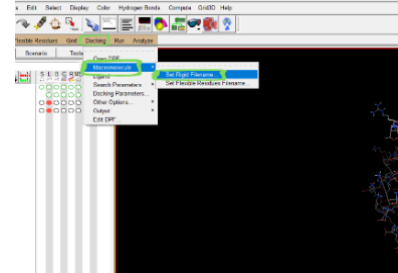
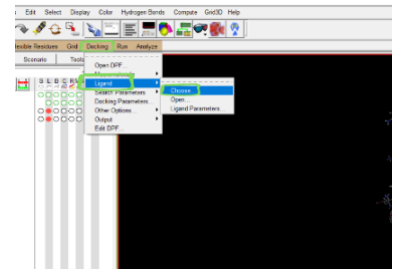
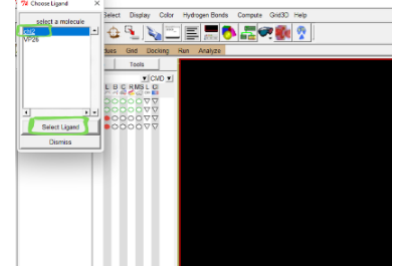
Muncul pop up box untuk mengatur ukuran box. Atur ukuran box pada ukuran 40x40x40.

13.

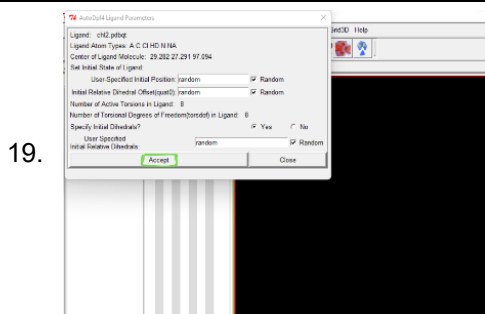


Klik icon center dan pilih center on ligand.

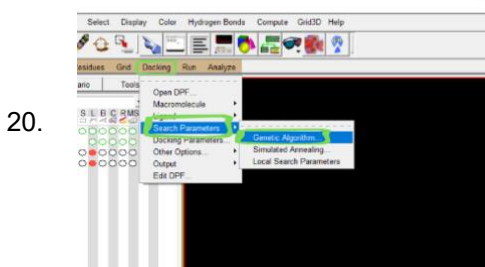
Lanjutan Tabel 5.

14. 
- Klik icon file dan pilih close saving current dan kemudian tutup pop up box tersebut.
15. 
- Klik icon grid pilih output kemudian save gpf. Lalu simpan dengan format "nama file.gpf"
16. 
- Klik icon docking pilih macromolecule dan set rigid file name. Kemudian pilih file yang telah di save dengan format ".pdbqt".
17. 
- Klik icon docking pilih ligand dan choose.
18. 
- Kemudian akan muncul pop up box dan pilih file ligan kemudian klik select.

Lanjutan Tabel 5.



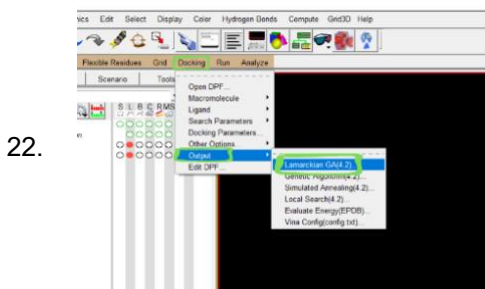
Kemudian akan muncul pop up box dan klik accept.



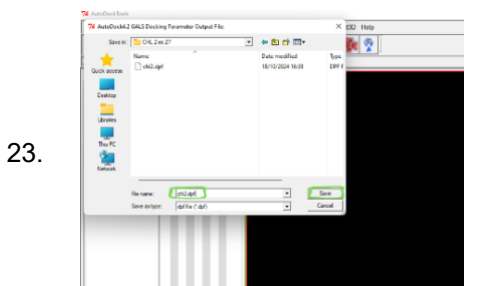
Klik icon docking pilih search parameters dan pilih genetic alhorithm. Kemudian akan muncul pop up box dan klik accept. Kemudian akan muncul pop up box dan klik accept.



Klik icon docking pilih other option dan autodock4.2 parameters. Kemudian akan muncul 2 pop up box secara berurutan dan klik accept pada keduanya.



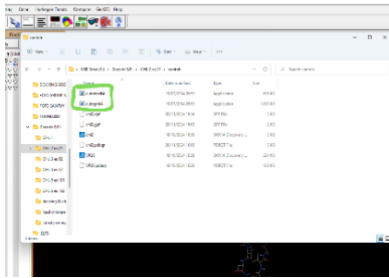
Klik icon docking pilih output dan lamarckian GA (4.2).



Simpan pada folder penelitian dengan fromat "nama file.dpf".

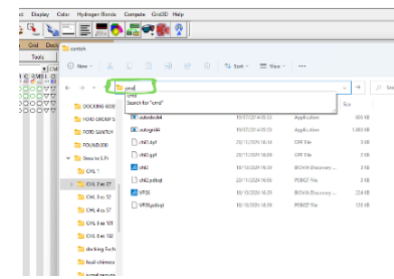
Lanjutan Tabel 5.

24.



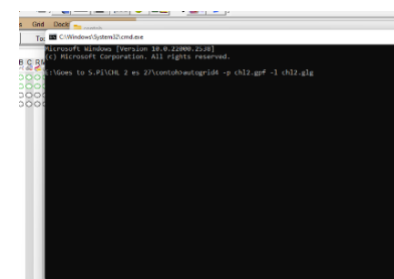
Buka folder penelitian dan pastikan sudah terdapat software autodock4.

25.



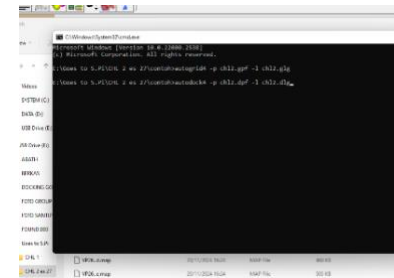
Ketik cmd pada bagian atas seperti pada gambar.

26.



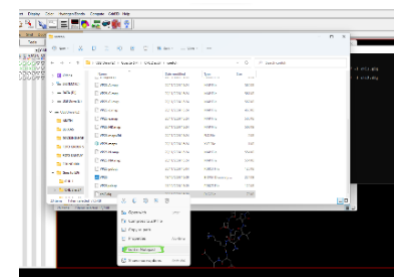
Setelah muncul pop up box dari cmd ketik "autogrid4 -p nama file.gpf -l nama file.dlg".

27.



Setelah selesai berproses ketik "autodock4 -p nama file.dpf -l namafile.dlg".

28.



Setelah autodock selesai akan muncul file dengan format ".dlg". Klik kanan pada file tersebut dan pilih edit in notepad.

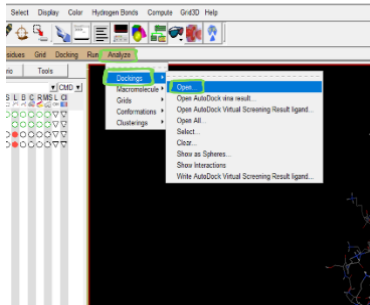
Lanjutan Tabel 5.

29.

Rank	Sub Rank	Binding Energy	Cluster RMSD	Reference RMSD	Group
1	1	-4.77	0.00	2.11	MSK20
1	2	-4.48	1.30	2.31	MSK20
1	3	-4.48	1.76	1.62	MSK20
2	1	-4.10	0.00	1.30	MSK20
2	2	-4.08	0.00	1.30	MSK20
3	1	-4.02	1.35	2.42	MSK20
4	1	-3.73	0.00	1.17	MSK20
5	1	-3.59	0.00	2.07	MSK20
6	1	-3.51	0.00	1.65	MSK20
7	1	-3.43	0.00	2.05	MSK20

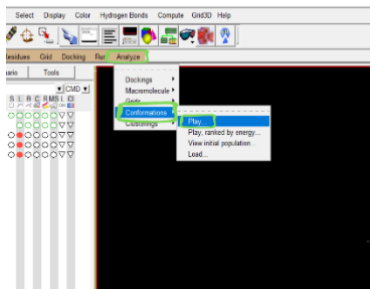
Pada notepad akan ada tabel *binding affinity* yang didapatkan.

30.



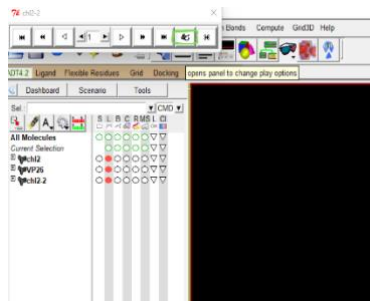
Kembali buka aplikasi autodock tools klik icon analyze pilih dockings dan open. Kemudian pilih file dengan format “.dlg”

31.



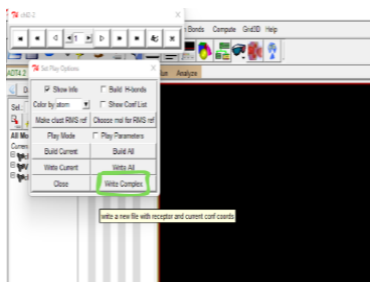
Klik icon analyze pilih conformation dan play.

32.



Kemudian akan muncul pop up box dan klik icon seperti pada gambar.

33.

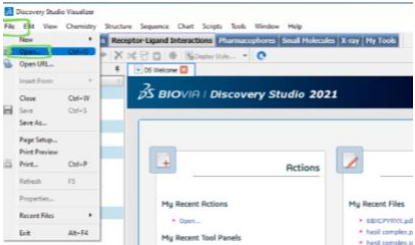
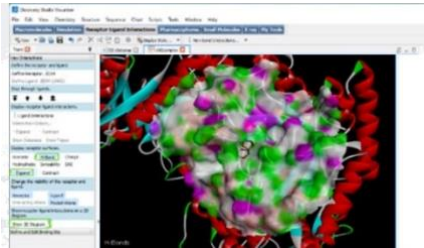
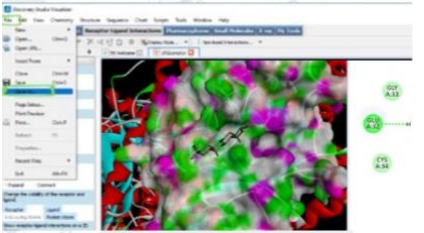


Kemudian akan muncul pop up box lain dan pilih write complex dan simpan pada folder dengan format “.pdb”

d. Visualisasi Interaksi Ligan Senyawa dengan Reseptor

Visualisasi analisis *docking* dilakukan menggunakan perangkat *Biovia Discovery Studio* untuk menggambar residu-residu asam amino dan melihat letak dan model perlekatan pada target protein. Prosedur visualisasi dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Prosedur visualisasi hasil *molecular docking*

No	Gambar	Keterangan
1.		Buka aplikasi Biovia Discovery Studio kemudian klik icon files pilih open dan pilih file pada folder yang telah di save sebelumnya dengan format “.pdb”.
2.		Klik H-bond untuk menampilkan bentuk struktur pada protein dan expand untuk memperluas nya. Klik show 2D diagram untuk menampilkan gambar dalam bentuk 2D
3.		Klik icon file lalu pilih save as dan simpan pada folder dalam bentuk foto.

2.4 Analisis Data

Molecular docking dan analisis data *docking* dilakukan untuk mengetahui nilai *binding affinity*. Semakin negatif *binding affinity* yang didapat maka menunjukkan kuatnya interaksi antara senyawa pada rumput laut *Gracilaria changii* yang berperan sebagai ligan dengan reseptor protein luxA pada *Vibrio harveyi*.