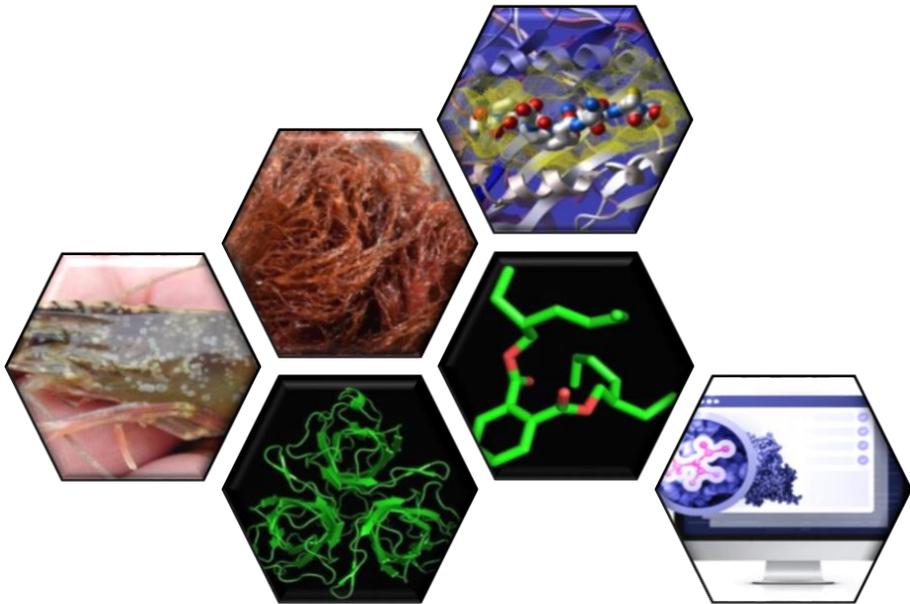


**EVALUASI *IN-SILICO* BERBAGAI JENIS EKSTRAK
RUMPUT LAUT YANG BERPOTENSI SEBAGAI ANTIVIRUS
PADA UDANG WINDU (*Penaeus monodon* Fabr.)**

**In-Silico Evaluation of Various Types of
Seaweed Extract with Potential as Antivirus
in Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabr.)**



LATIFA BAHARUDDIN

L012202015



**PROGRAM MAGISTER ILMU PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**EVALUASI IN-SILICO BERBAGAI JENIS EKSTRAK
RUMPUT LAUT YANG BERPOTENSI SEBAGAI ANTIVIRUS
PADA UDANG WINDU (*Penaeus monodon* Fabr.)**

**LATIFA BAHARUDDIN
L012202015**



**PROGRAM MAGISTER ILMU PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**EVALUASI IN-SILICO BERBAGAI JENIS EKSTRAK
RUMPUT LAUT YANG BERPOTENSI SEBAGAI ANTIVIRUS
PADA UDANG WINDU (*Penaeus monodon* Fabr.)**

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Ilmu Perikanan

Disusun dan diajukan oleh

LATIFA BAHARUDDIN
L012202015

Kepada

**PROGRAM MAGISTER ILMU PERIKANAN
FAKULTAS ILMU KELAUTAN DAN PERIKANAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

TESIS

EVALUASI IN-SILICO BERBAGAI JENIS EKSTRAK
RUMPUT LAUT YANG BERPOTENSI SEBAGAI ANTIVIRUS
PADA UDANG WINDU (*Penaeus monodon* Fabr.)

LATIFA BAHARUDDIN
L012202015

telah dipertahankan di depan panitia ujian magister pada tanggal 03 bulan
Oktober Tahun 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada

Program Studi Magister Ilmu Perikanan
Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



Asmi Citra Malina, S.Pi., M.Agr., Ph.D.
NIP 19721228 200604 2 001

Dr. Marlina Achmad, S.Pi., M.Si.
NIP 19830406 200501 2 002

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Perikanan,

Dekan Fakultas Ilmu Kelautan
dan Perikanan, Universitas
Hasanuddin



Dr. Ir. Badraeni, M.P.
NIP 19680726 199403 2 002



Prof. Saifuddin, S.Pi., MP., Ph.D.
NIP 19750611 200312 1 003

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "Evaluasi In-Silico Berbagai Jenis Ekstrak Rumput Laut yang Berpotensi Sebagai Antivirus Pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabr.)" adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing (Asmi Citra Malina, S.Pi., M.Agr., Ph.D. dan Dr. Marlina Achmad, S.Pi., M.Si.). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun 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 tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di Jurnal Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology sebagai artikel dengan judul "Potential Inhibitors of *Sargassum polycystum* Against White Spot Syndrome Virus (WSSV) VP26 of Tiger Shrimp *Penaeus monodon*: In-Silico Studies". Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis 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 tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 03 Oktober 2024



Latifa Baharuddin
L012202015

Ucapan Terima Kasih

Penelitian yang saya lakukan dapat terlaksana dengan sukses dan disertasi ini dapat terampungkan atas bimbingan, diskusi dan arahan Asmi Citra Malina, S.Pi., M.Agr., Ph.D. sebagai pembimbing utama, Dr. Marlina Achmad, S.Pi., M.Si. sebagai anggota pembimbing, serta kepada Dr. Andi Aliah Hidayani, S.Si., M.Si., Dr. Ir. Dody Dharmawan Trijuno, M.App.Sc. dan Ir. Muhammad Iqbal Djawad, M.Sc., Ph.D. sebagai penguji. Saya mengucapkan berlimpah terima kasih kepada mereka. Penghargaan yang tinggi juga saya sampaikan kepada Kakak Israini Wiyulanda Iskandar yang banyak memberikan dukungan berupa bantuan dalam pelaksanaan penelitian saya.

Ucapan terima kasih juga saya ucapkan kepada pimpinan Universitas Hasanuddin dan Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin yang telah memfasilitasi saya menempuh program magister serta para dosen dan rekan-rekan dalam tim penelitian.

Akhirnya, kepada kedua orang tua tercinta Ibu Dra. Hamsiah Amin dan Bapak Baharuddin Ali, saya mengucapkan limpah terima kasih dan sembah sujud atas doa, pengorbanan dan motivasi mereka selama saya menempuh pendidikan. Penghargaan yang besar juga saya sampaikan kepada Suami saya, apt. Iswanto, S.Si. yang selalu memberikan afirmasi dan dukungan yang sangat berarti, serta kepada Adik Muh. Luthfial dan seluruh keluarga atas motivasi dan dukungan yang tak ternilai.

Penulis,



Latifa Baharuddin

ABSTRAK

Latifa Baharuddin. L012202015. "Evaluasi *In-Silico* Berbagai Jenis Ekstrak Rumput Laut yang Berpotensi sebagai Antivirus pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabr.)" dibimbing oleh **Asmi Citra Marlina** sebagai Pembimbing Utama dan **Marlina Achmad** sebagai Pembimbing Anggota.

Latar Belakang. *White spot syndrome virus* (WSSV) merupakan virus yang dapat menyebabkan *White Spot Disease* (WSD) pada udang windu yang berujung pada kematian hingga 100% dalam waktu 3-10 hari sejak udang terinfeksi. WSSV memiliki 22 protein yang berperan dalam infeksi virus, salah satunya adalah VP26 yang merupakan protein utama dan memiliki peran penting dalam tahap awal infeksi virus sehingga penting untuk menghambat protein ini. Upaya untuk menghambat VP26 dapat dilakukan dengan memanfaatkan senyawa alami yang bersumber dari beberapa jenis rumput laut seperti *Caulerpa racemosa*, *Sargassum polycystum*, dan *Halymenia durvillei*. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis senyawa dari beberapa ekstrak etanol rumput laut yang memiliki kemampuan dalam menghambat WSSV melalui uji *molecular docking*, dan menentukan senyawa terbaik pada masing-masing ekstrak rumput laut dalam kapasitasnya menghambat WSSV serta profil fisikokimia, farmakokinetik dan toksisitas dari senyawa-senyawa tersebut. **Metode.** Senyawa yang terkandung pada rumput laut diidentifikasi menggunakan metode GC-MS. Senyawa yang memiliki nilai *binding affinity* yang lebih rendah dibanding kontrol merupakan senyawa yang terbaik dan kemudian dievaluasi profil fisikokimia, farmakokinetik dan toksisitasnya. **Hasil.** Pada rumput laut *Caulerpa racemosa* senyawa dengan nilai terendah yaitu *2h-1-Benzopyran-6-Ol, 3,4-Dihydro-2,8-Dimethyl-2-(4,8,12-Trimethyltridecyl)-, [2r [2r@(4r@,8r@)]]* (Pubchem ID: 586537) dengan skor -7,6 kcal/mol, senyawa ini memenuhi aturan Lipinski, memiliki profil farmakokinetik yang baik dan tidak memiliki aktivitas toksisitas. Pada rumput laut *Sargassum polycystum* senyawa yang memiliki nilai terendah yaitu *1,2-Benzenedicarboxylic Acid* (Pubchem ID: 8343) dengan skor -7.3 kcal/mol, memenuhi aturan Lipinski, tidak menunjukkan aktivitas toksisitas dan menunjukkan aktivitas *P-glycoprotein inhibitor* dan CYP2C9 inhibitor pada profil farmakokinetik. Pada rumput laut *Halymenia durvillei* diperoleh senyawa yang memiliki nilai ikatan afinitas terendah yaitu *2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-, (All-E)-* (Pubchem ID: 638072) dengan skor -7.4 kcal/mol, memenuhi aturan Lipinski, memiliki profil farmakokinetik yang baik dan tidak memiliki aktivitas toksisitas. **Kesimpulan.** Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa senyawa dari tiga jenis rumput laut memiliki potensi sebagai antivirus WSSV pada udang windu. Dari masing-masing jenis rumput laut, senyawa dengan aktivitas penghambatan terbaik. Ketiga senyawa ini menunjukkan profil fisikokimia yang mendukung pemberian antivirus secara oral melalui pakan. Senyawa dari *Sargassum polycystum* memiliki profil farmakokinetik terbaik dalam hal absorpsi dan metabolisme. Selain itu, ketiga senyawa tidak menunjukkan efek toksik pada udang windu, menjadikannya kandidat yang aman sebagai antivirus WSSV.

Kata kunci: *In-silico*, *Molecular docking*, Rumput Laut, Udang Windu, VP26, WSSV.

ABSTRACT

Latifa Baharuddin. L012202015. “*In-Silico* Evaluation of Various Types of Seaweed Extract with Potential as Antivirus in Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabr.)” supervised by **Asmi Citra Marlina** as the principle Supervisor and **Marlina Achmad** as the co-supervisor.

Background. White spot syndrome virus (WSSV) is a virus responsible for causing White Spot Disease (WSD) in black tiger shrimp, leading to mortality rates of up to 100% within 3-10 days post-infection. WSSV contains 22 proteins that play significant roles in the viral infection process, among which VP26 is a major protein that is crucial during the early stages of viral infection. Therefore, inhibiting this protein is vital for controlling the spread of WSSV. The inhibition of VP26 can potentially be achieved through natural compounds derived from various seaweed species, including *Caulerpa racemosa*, *Sargassum polycystum*, and *Halymenia durvillei*. **Objective.** This study aims to analyze compounds from several seaweed ethanol extracts that have the ability to inhibit WSSV through molecular docking tests, and determine the best compounds in each seaweed extract in terms of their capacity to inhibit WSSV as well as the physicochemical, pharmacokinetic and toxicity profiles of these compounds. **Methods.** The compounds contained in seaweed are identified using the GC-MS method. Compounds that have a lower binding affinity value than control are the best compounds and then evaluated physicochemical profiles, pharmacokinetics and their toxicity. **Result.** In *Caulerpa racemosa*, the compound with the lowest binding affinity was *2h-1-Benzopyran-6-Ol, 3,4-Dihydro-2,8-Dimethyl-2-(4,8,12-Trimethyltridecyl)-, [2r [2r@(4r@,8r@)]]* (PubChem ID: 586537), with a score of -7.6 kcal/mol. This compound adheres to Lipinski's rule, exhibits a favorable pharmacokinetic profile, and shows no toxic activity. In *Sargassum polycystum*, the compound with the lowest affinity was *1,2-Benzenedicarboxylic Acid* (PubChem ID: 8343), with a score of -7.3 kcal/mol. It complies with Lipinski's rule, exhibits no toxicity, and shows P-glycoprotein inhibitor and CYP2C9 inhibitor activity in its pharmacokinetic profile. For *Halymenia durvillei*, the compound with the lowest affinity score was *2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-Hexamethyl-, (All-E)-* (PubChem ID: 638072), with a score of -7.4 kcal/mol, which also complies with Lipinski's rule, exhibits a good pharmacokinetic profile, and shows no toxic activity. **Conclusion.** Based on this, it can be concluded that compounds from three types of seaweed have the potential as antivirus against WSSV in tiger shrimp. From each type of seaweed, the compound with the best inhibitory activity. These three compounds show a physicochemical profile that supports oral administration of antivirus through feed. Compounds from *Sargassum polycystum* have the best pharmacokinetic profile in terms of absorption and metabolism. In addition, the three compounds do not show toxic effects on tiger shrimp, making them safe candidates for application as WSSV antivirus.

Keywords: *In-silico*, molecular docking, Seaweed, Tiger Shrimp, VP26, WSSV.

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iv
Ucapan Terima Kasih	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan dan Kegunaan.....	3
1.4 Teori	3
1.4.1 Udang Windu (<i>Penaeus monodon</i>)	3
1.4.4 <i>Gas Chromathography-Mass Spectrometry</i> (GC-MS)	8
1.4.5 Ekstraksi.....	9
1.4.6 Pelarut.....	10
1.4.7 Molekuler Docking	11
1.4.8 Sifat Fisikokimia, Farmakokinetik dan Toksisitas	12
1.4.9 Kerangka Pemikiran.....	13
BAB II METODE PENELITIAN	14
2.1 Waktu dan Tempat.....	14
2.3 Tahap Pelaksanaan	15
2.3.1 Ekstraksi Senyawa Aktif Rumput Laut.....	15
BAB III HASIL.....	17
3.1 Analisis GC-MS Rumput Laut.....	17
3.2 Analisis Interaksi Protein-Ligan (<i>Molecular docking</i>).....	18
3.3 Prediksi Fisikokimia	24
3.4 Prediksi Farmakokinetik.....	25
BAB IV PEMBAHASAN	27
4.1 Analisis GC-MS Rumput Laut.....	27
4.2 <i>Molecular docking</i>	28

4.3 Prediksi Fisikokimia	30
4.4 Prediksi Farmakokinetik.....	31
BAB V SIMPULAN DAN SARAN.....	33
5.1 Simpulan	33
5.2 Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA.....	34
LAMPIRAN.....	42

DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Nilai <i>binding affinity</i>	23
2. <i>Lipinski rules of five</i>	27
3. Prediksi farmakokinetik (ADME)	28
4. Prediksi toksisitas	30

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. Udang Windu (<i>Penaeus monodon</i>)	4
2. Visualisasi protein virus WSSV VP26 (PDB ID: 2EDM)	8
3. Kromatogram hasil analisis GC-MS rumput laut	22
4. Visualisasi interaksi antara ligan dari rumput laut <i>Caulerpa racemose</i> dan protein WSSV VP26	25
5. Visualisasi interaksi antara ligan dari rumput laut <i>Caulerpa racemose</i> dan protein WSSV VP26	26
6. Visualisasi interaksi antara ligan kontrol (<i>Chloroquine</i>) dan protein WSSV VP26	27

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut	Halaman
1. Senyawa rumput laut <i>Caulerpa racemosa</i>	45
2. Senyawa rumput laut <i>Sargassum polycystum</i>	49
3. Senyawa rumput laut <i>Halymenia durvillei</i>	51
4. Nilai <i>binding affinity</i> senyawa rumput laut <i>Caulerpa racemosa</i>	53
5. Nilai <i>binding affinity</i> senyawa rumput laut <i>Sargassum polycystum</i>	55
6. Nilai <i>binding affinity</i> senyawa rumput laut <i>Halymenia durvillei</i>	56

DAFTAR SINGKATAN

Lambang/Singkatan	Arti dan Penjelasan
Å	Angstrom
ADMET	Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi dan Toksisitas
ASN	Asparagin
ASP	Aspartat
BBB	<i>Blood-Brain Barrier</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrum</i>
HBA	<i>H-Bond Acceptors</i>
HBD	<i>H-Bond Donors</i>
kDa	Kilodalton
MET	Metionin
MW	<i>Molecul Weight</i>
P-glyS	<i>P-glycoprotein substrate</i>
P-I glyI	<i>P-glycoprotein inhibitor</i>
P. Caco-2	Permeabilitas Caco-2
PDB	Protein Data Bank
PHE	Felinalin
Ro5	<i>Lipinski rule of five</i>
TPSA	<i>Topological surface area</i>
VP26	<i>Viral protein 26</i>
WSSV	<i>White spot syndrome virus</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Udang windu (*Penaeus monodon*) merupakan sumber utama protein konsumsi manusia dan sumber pendapatan utama (Hossain et al., 2023). Saat ini, udang windu merupakan krustasea terpenting di pasar global dan berkembang pesat di negara-negara berkembang Asia (Aguirre-Pabón et al., 2023). Akan tetapi, tingginya insiden patogen dalam akuakultur, dan juga di alam, merupakan masalah yang terus-menerus bagi kelangsungan hidup udang windu. Salah satu patogen yang sering menyerang udang windu adalah *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) (Santos et al., 2020).

WSSV dilaporkan menyebabkan sekitar dua pertiga kerugian ekonomi tahunan, sekitar US\$ 1 miliar dan kerugian 15% dalam produksi udang global (Patil et al., 2021). Penularan WSSV sangat cepat dan menyebabkan kematian 100% dalam waktu 3-10 hari sejak timbul gejala klinis. Virus ini dapat menginfeksi udang pada post larva (PL) sampai ukuran 40 g. Lebih jauh lagi, WSSV dapat hidup setidaknya selama 30 hari di air laut pada suhu 30°C dalam kondisi laboratorium dan 3-4 hari di kolam pembesaran. WSSV yang utuh memiliki ekstensi amplop yang panjang seperti ekor dan berbentuk batang, agak elips, berukuran panjang 260–350 NM dan diameter 110–130 NM (Lai et al., 2020). Terdapat protein selubung pada partikel WSSV. Protein selubung utamanya telah diidentifikasi sebagai *Viral Protein* (VP) yaitu VP28, VP29, VP24, dan VP26 (Ren et al., 2023).

VP26 merupakan 60% dari protein selubung (Zhou et al., 2009; Molla & Aljahdali, 2022). VP 26 memiliki massa molekul terhitung 22 kDa dan mengandung sekitar 204 asam amino. Protein virus ini diekspresikan pada tahap akhir infeksi. VP26 adalah protein tegument yang dapat membantu mengangkut nukleokapsid WSSV ke inti inang melalui sitoskeleton (Liao et al., 2021). Oleh karena itu, penghambatan VP26 juga dapat merusak infeksi dan morfogenesis virus sehingga dapat mencegah replikasi virus (Escobedo-Bonilla et al., 2015). Hingga saat ini, banyak penelitian telah dikembangkan untuk menghambat WSSV (Palanikumar et al., 2018; Shan et al., 2021). Salah satunya adalah penggunaan bahan alami yang bersumber dari tumbuhan laut yaitu rumput laut.

Ekstrak rumput laut telah banyak digunakan untuk pencegahan dan pengobatan penyakit bakteri dan virus pada hewan air (Li et al., 2018). Menurut Torres et al., (2019) berbagai senyawa ditemukan dalam makroalga, seperti pigmen (misalnya, *phycobiliprotein* dan karotenoid), senyawa fenolik (misalnya, florotanin dan bromofenol), senyawa nitrogen (misalnya, alkaloid), polisakarida (misalnya, agaran, karaginan, dan alginat), dan terpenoid (misalnya, diterpen dan seskuiiterpen). Beberapa sifat biologis tersebut telah ditetapkan untuk senyawa ini termasuk antioksidan, antibakteri, antivirus, antipenuaan, antiinflamasi, dan antikanker.

Pemanfaatan rumput laut *Caulerpa racemosa* pada penelitian sebelumnya oleh Maulana et al., (2023) menunjukkan bahwa penambahan ekstrak *Caulerpa racemosa* dapat mencegah penyakit AHPND pada udang vaname. Selanjutnya, penggunaan polisakarida *Sargassum polycystum* sebagai suplemen pakan dengan dosis 2000 mg/kg merupakan pendekatan praktis dalam peningkatan ketahanan penyakit pada budidaya udang windu (Victoriano-Blancia et al., 2022). Ekstrak kasar metanol dan heksana rumput laut merah *Halymenia durvillei* mempunyai aktivitas antibakteri yang tinggi, terutama terhadap bakteri gram negatif *Salmonella typhi* dan *Aeromonas hydrophila* (Kasmiasi et al., 2022). Penelitian terkait pemanfaatan jenis rumput laut tersebut terhadap penghambatan WSSV pada udang windu masih minim dilaporkan sehingga dianggap perlu untuk melakukan pembuktian secara ilmiah terhadap kemampuan rumput laut sebagai antivirus WSSV, salah satunya dengan memanfaatkan teknologi komputer.

Dalam bidang penemuan antivirus, tawaran yang menarik akhir-akhir ini adalah pemanfaatan komputer sebagai alat bantu penemuan antivirus. Kemampuan komputasi yang meningkat eksponensial merupakan peluang untuk mengembangkan simulasi dan kalkulasi dalam merancang antivirus. Komputer menawarkan metode *in-silico* sebagai komplemen metode *in vitro* dan *in vivo* yang lazim digunakan dalam proses penemuan antivirus (Sari et al., 2020). *In-silico* merupakan metode riset yang memanfaatkan teknologi komputasi dan database untuk mengembangkan penelitian lebih lanjut (Makatita et al., 2020; Kinasih et al., 2023). Menurut Molla & Aljahdali (2022) teknik desain antivirus *in-silico* adalah kunci terbaik untuk menghemat waktu dan biaya dengan memprediksi perkiraan protein dan memilih senyawa bioaktif kecil. Metode *in silico* yang sering digunakan yaitu *molecular docking*.

Molecular docking adalah studi yang mempelajari bagaimana dua atau lebih struktur molekul dapat berikatan satu sama lain, dengan kata lain memecahkan masalah secara 3 dimensi. *Molecular docking* adalah alat dalam biologi molekular struktural dan penemuan antivirus berbasis struktur. Tujuan dari penambatan ligan-protein adalah untuk memahami dan memprediksi pengenalan molekular, menemukan kemungkinan mode ikatan dan memprediksi afinitas pengikatan (Prasetyo et al., 2021). Ikatan afinitas menunjukkan jumlah energi yang dibutuhkan untuk membentuk ikatan antara ligan dengan reseptor. Semakin kecil energi ikatan berarti semakin stabil ikatan tersebut. Semakin stabil ikatan ligan dengan reseptor maka dapat diprediksikan bahwa aktivitasnya juga semakin besar (Pramudiyawati et al., 2024). Selain dapat memprediksi mode ikatan, studi *in silico* juga dapat memprediksi profil fisikokimia, farmakokinetik dan toksisitas dari suatu senyawa.

Mekanisme aksi suatu antivirus dipengaruhi oleh profil fisikokimia, farmakokinetik dan toksisitasnya yang penting untuk diketahui karena digunakan untuk menentukan keberadaan zat aktif didalam tubuh dan efek samping yang mungkin timbul (Bahi et al., 2020). Berdasarkan uraian tersebut, maka perlu dilakukan penelitian terkait potensi beberapa ekstrak rumput laut yaitu *Caulerpa*

racemosa, *Sargassum polycystum* dan *Halymenia durvillei* sebagai antivirus WSSV pada udang windu secara *in silico*.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini yaitu:

1. Apakah terdapat senyawa pada ekstrak etanol beberapa rumput laut yang memiliki kemampuan dalam menghambat WSSV?
2. Senyawa manakah yang terbaik pada masing-masing ekstrak rumput laut dalam kapasitasnya menghambat WSSV serta Bagaimana profil fisikokimia, farmakokinetik dan toksisitas dari senyawa yang terbaik pada masing-masing ekstrak rumput laut dalam kapasitasnya menghambat WSSV?

1.3 Tujuan dan Kegunaan

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk:

1. Menganalisis senyawa dari beberapa ekstrak etanol rumput laut yang memiliki kemampuan dalam menghambat WSSV melalui uji *molecular docking*.
2. Menentukan senyawa terbaik pada masing-masing ekstrak rumput laut dalam kapasitasnya menghambat WSSV serta profil fisikokimia, farmakokinetik dan toksisitas dari senyawa-senyawa tersebut.

Kegunaan dari penelitian ini yaitu sebagai sumber acuan untuk penggunaan metode *in-silico* dalam bidang budidaya untuk memperoleh kandidat antivirus dari ekstrak rumput laut 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 vivo* dan *in vitro*.

1.4 Teori

1.4.1 Udang Windu (*Penaeus monodon*)

Udang windu (*Penaeus monodon*) (Gambar 1.) atau dalam bahasa latinnya disebut *Penaeus monodon*, merupakan salah satu dari sekian banyak jenis udang-udangan yang bisa dimanfaatkan untuk kehidupan manusia, terutama sebagai bahan konsumsi (Herlina et al., 2017). Udang windu merupakan salah satu komoditas ekspor dari sektor perikanan unggulan di Indonesia. Udang windu merupakan salah satu udang konsumsi yang nilai ekonomisnya terus meningkat dan banyak dikonsumsi oleh masyarakat. Total produksi udang Indonesia tahun 2018 mencapai 400.073 ton, ekspor udang mencapai 150.000ton pada tahun 2015 dan terus meningkat hingga tahun 2018, ekspor udang mencapai 170.000ton (KKP 2018; Syukroni & Santi, 2021). Udang windu menurut Solis (1988) diklasifikasikan dalam Kingdom Animalia; Filum Arthropoda; Kelas Crustacea; Ordo Decapoda; Family Penaeidae; Genus *Penaeus*; Spesies *Penaeus monodon* Fabricius, 1798.

Udang digolongkan ke dalam hewan crustacea karena mereka memiliki lapisan keras yang disebut *carapace*, sedangkan penggolongan udang windu ke dalam filum arthropoda karena mereka memiliki tubuh yang tersegmentasi atau terbagi menjadi segmen-segmen serta sendi-sendi (Herlina et al., 2017). Udang windu memiliki beberapa karakteristik biologis dan ekologis yang memungkinkan untuk dianggap sebagai spesies invasif yang berpotensi mengubah komunitas laut lokal. Beberapa ciri tersebut antara lain ukuran tubuh yang besar (panjang 33 cm; berat 320 g) (Petatan-ramirez et al, 2019).

Menurut Harahap et al., (2017) *Panaeus monodon* terdiri dari dua bagian yaitu: Bagian kepala *P. monodon* dilindungi oleh cangkang kepala. Bagian depan meruncing dan melengkung membentuk huruf S yang disebut rostum. Pada bagian rostum terdapat 7 gerigi, bagian kepala lainnya yaitu mempunyai sepasang mata majemuk bertangkai, sepasang sirip kepala, 5 pasang kaki jalan, sepasang alat pembantu rahang, sepasang antena dan 2 pasang antenula. Pada bagian badan *P. Monodon* tertutup oleh 6 ruas yang satu sama lainnya dihubungkan oleh selaput tipis, 5 pasang kaki renang yang melekat pada ruas pertama sampai ruas 5, sedangkan pada ruas 6 kaki renang mengalami perubahan bentuk menjadi ekor kipas. Di antara 2 pasang ekor kipas terdapat satu telson yang berbentuk runcing, badan *P. monodon* mempunyai cangkang yang sangat keras. *P. monodon* memiliki panjang tubuh 15cm, panjang antena 25cm, dan warnanya hijau kehitaman dengan garis kuning di seluruh tubuhnya.



Gambar 1. Udang Windu (*Panaeus monodon*) (Dokumentasi pribadi)

Menurut Pratiwi (2008), Udang dewasa hidup dan berkembang biak di tengah laut (jauh dari pantai). Beberapa saat sebelum kawin, udang betina berganti kulit terlebih dahulu. Matang telur ditandai dengan ovarium yang memanjang di bagian dorsal, melebar ke kiri dan kanan, berwarna kehijau-hijauan sampai hijau tua atau coklat tua. Keadaan tersebut biasanya menandakan udang betina sudah siap bertelur dan spermatofora telah diterima dari udang jantan. Induk udang matang telur akan melepaskan telur-telurnya (berpijah) di laut pada malam hari. Telur-telur diletakkan di dasar laut dan akan menetas, menjadi larva (dalam bentuk beberapa tingkatan) dan bersifat planktonik. Larva akan terbawa arus hingga ke daerah mangrove (yang dekat dengan muara sungai) atau ke daerah-daerah asuhan.

P. monodon mempunyai sifat nokturnal yang artinya aktif bergerak dan mencari makan pada suasana gelap bila sinar cahaya terlalu cerah udang ini akan diam berlindung di dasar perairan. *P. monodon* hidup di perairan dalam (Harahap et al., 2017). Udag windu adalah pemakan non-selektif yang mengkonsumsi berbagai macam mangsa, seperti kepiting, udang lainnya, polychaetes, ophiuroids, moluska, ikan kecil dan kadang-kadang, detritus. Sebagai spesies *euryhaline*, larva *P. monodon* memasuki laguna pesisir dan muara, tetap berada di lingkungan pesisir tersebut hingga mencapai tahap remaja di mana potensi kompetisi makanan dengan larva dan juvenil udang lainnya dapat terjadi (Petatan-ramirez et al, 2019).

1.4.2 White Spot Syndrome Virus (WSSV)

WSSV merupakan patogen utama penyebab wabah *white spot disease* (WSD) yang menjadi penyebab signifikan penurunan produksi udang. Awalnya terdeteksi di 3 negara Asia (Taiwan, Jepang, dan Korea), penyakit ini kemudian menyebar ke sebagian besar negara penghasil udang di Asia dan Amerika. Infeksi WSSV ditandai dengan munculnya bercak putih pada permukaan dalam exoskeleton, terutama karapas, sehingga dikenal sebagai penyakit bercak putih (Tassakka et al., 2022).

Identifikasi morfologi menunjukkan bahwa *White Spot Syndrome Virus* merupakan virus yang memiliki lapisan lipid yang mengelilingi nukleokapsid atau disebut amplop. Virus yang memiliki amplop dapat dilindungi dari antigen sel inang. Amplop virus berperan penting dalam penargetan sel inang yang akan terinfeksi (Sun et al., 2016). Menurut Reddy et al., (2013) Virion WSSV diselubungi, nukleokapsid berbentuk batang dengan bentuk bacilliform hingga ovoid atau ellipsoid. Pada beberapa virion, fitur yang paling khas adalah proyeksi mirip ekor yang memanjang dari satu ujung. Selubung virus, memiliki ketebalan 6-7 nm, adalah lipid, struktur membran trilaminar dengan dua lapisan transparan elektron dibagi dengan lapisan buram elektron. Nukleokapsid terletak di dalam selubung dan memiliki kenampakan lurik dan berukuran sekitar 300 x 70 nm dengan dinding luar setebal 6 nm. Ukuran nukleokapsid ditemukan bervariasi antara isolat. Striasi mungkin merupakan hasil dari struktur seperti cincin bertumpuk yang terdiri dari barisan subunit globular dengan diameter sekitar 10 nm. Subunit ini disusun dalam 14-15 striasi vertikal yang terletak setiap 22 nm sepanjang sumbu panjang, memberikan tampilan garis silang. Ketika dilepaskan dari selubung, nukleokapsid bertambah panjang yang menunjukkan bahwa ia dikemas rapat dengan virion.

Udag windu merupakan spesies yang rentan terhadap infeksi White Spot Syndrome Virus. Studi yang dilakukan oleh Alifuddin et al., (2003); Hamjah et al., (2024) menunjukkan bahwa setiap udang windu yang terinfeksi memiliki respon yang berbeda terhadap Whispovirus. Perbedaan tersebut dipengaruhi oleh struktur masing-masing organ yang berbeda. Kaki renang udang windu merupakan organ yang sering terkena penyakit white spot karena tersusun atas sel-sel epitel subkutikuler yang strukturnya mudah terinfeksi. Sel epitel kutikula merupakan tempat yang paling disukai untuk Whispovirus dan merupakan tempat pertama

masuknya virus (Hidayani et al., 2015; Christianti et al., 2021). Target utama infeksi WSSV adalah jaringan yang berasal dari ektodermal dan mesodermal termasuk jaringan epidermis, insang, usus depan, usus belakang, kelenjar antena, organ limfoid, gonad, sel hematopoietik, dan sel yang berhubungan dengan sistem saraf. Sel-sel epitel organ asal endodermal seperti hepatopankreas, *caeca midgut anterior* dan posterior dan batang midgut refrakter terhadap infeksi WSSV. Pada tahap akhir infeksi, epitel lambung, insang, dan integumen dapat rusak parah. Ini dapat menyebabkan banyak disfungsi organ dan mungkin menyebabkan kematian (Reddy et al., 2013).

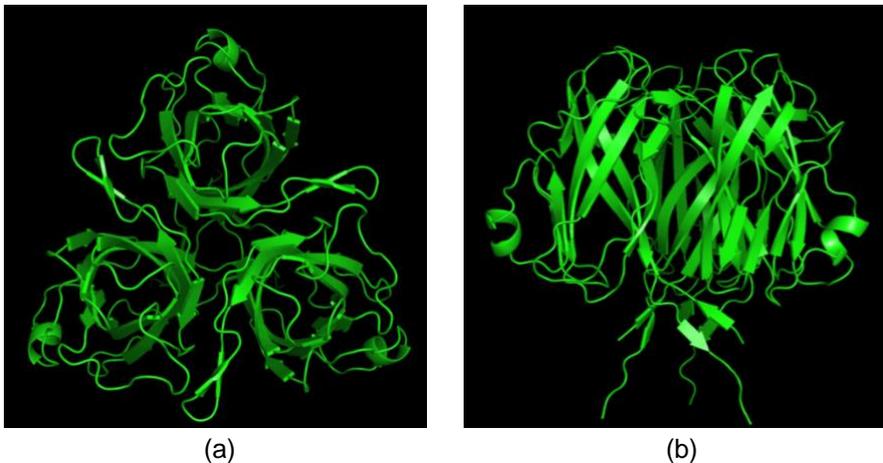
Udang yang terinfeksi WSSV menunjukkan hilangnya karapas, pewarnaan gelap kemerahan atau merah muda pada permukaan tubuh, bitnik putih pada eksoskeleton dan badan inklusi eosinofilik pada jaringan yang terinfeksi menyebabkan kematian dalam waktu 3-10 hari (Verma et al., 2017; Dekham et al., 2022). Menurut Xua et al., (2022) sistem imun udang berperan penting dalam infeksi WSSV. Sistem kekebalan udang terutama terdiri dari kerak, insang dan organ limfoid. Sel kekebalan udang terutama adalah sel hemolymph. Ketika pathogen menyerang udang, system kekebalan tubuh dapat membunuh dan menghilangkan pathogen untuk mencapai tujuan anti infeksi.

WSSV memiliki 22 protein kapsid yang mengekspresikan empat protein yang paling banyak seperti VP26, VP28, VP24, dan VP19 dimana VP26 dan VP28 merupakan 60% dari protein selubung (Zhou et al., 2009; Molla & Aljahdali, 2022). Menurut Wan et al., (2008) bahwa VP26 pertama kali diyakini sebagai protein nukleokapsid, namun kemudian diidentifikasi sebagai protein selubung virus dengan mikroskop imunoelektron. Gen VP26 memiliki Panjang total 612 bp. Zhang et al., (2002) mengemukakan bahwa VP26 ada dalam amplop WSSV. Xie dan Yang (2005) melaporkan bahwa VP26 berinteraksi dengan aktin inang dan dengan VP28 dan mengusulkan bahwa VP26 adalah protein penghubung antara selubung dan nukleokapsid.

VP26 tidak memiliki homologi urutan yang jelas dengan protein mana pun yang saat ini disimpan di GenBank. VP26 mengandung 204 asam amino dan memiliki massa molekul terhitung 22 kDa. Nilai ini berbeda dari nilai yang diperoleh secara eksperimental sebesar 4 kDa, yang mungkin mencerminkan modifikasi pasca translasi, seperti glikosilasi, fosforilasi, atau penyambungan. Dengan menggunakan teknologi transfer penanda biotin, VP26 terbukti berperan sebagai protein penghubung antara selubung virus dan nukleokapsid dengan cara berikatan dengan protein tegumen virus VP51, yang menunjukkan bahwa VP26 terlibat dalam proses selubung virus. VP26 adalah protein tegument (atau protein persimpangan mirip stroma antara selubung virus dan nukleokapsid) yang dapat membantu mengangkut nukleokapsid WSSV ke inti inang melalui sitoskeleton. Selain itu, VP26 juga berinteraksi dengan berbagai molekul protein di WSSV yang berperan besar dalam tahap invasi virus selanjutnya (Liao et al., 2021)

Penularan WSSV melibatkan tiga jalur utama: penularan horizontal antar individu melalui kontak langsung, penularan vertikal dari induk ke keturunannya, dan penularan interspesifik antara berbagai jenis virus. hewan melalui kontak

langsung. Kanibalisme udang merupakan salah satu jalur terpenting penularan WSSV. Ujung yang sehat mati setelah konsumsi udang yang terinfeksi WSSV secara oral. Saluran pencernaan udang merupakan tempat utama infeksi WSSV. Partikel virus yang mencapai saluran pencernaan udang sehat harus berikatan dengan permukaan sel inang untuk memulai infeksi virus. Selama interaksi antara WSSV dan inangnya, VP26 berinteraksi dengan beberapa molekul inang untuk memfasilitasi invasi WSSV (Liao et al., 2021). VP26 tersedia pada *protein data bank* dengan PDB ID: 2EDM (Molla & Aljahdali, 2022). Visualisasi 3D protein virus WSSV VP 26 disajikan pada gambar 2.



Gambar 2. Visualisasi 3D protein virus WSSV VP26 (PDB ID: 2EDM) (a) Tampak atas, (b) Tampak Samping (Dokumentasi pribadi)

Berdasarkan penelitian Rajendran et al., (2005) sebagaimana yang dikutip oleh Christianti et al., (2021) menunjukkan bahwa *White Spot Syndrome Virus* paling efektif menyerang udang windu melalui media air dan melalui inokulasi oral. Hal ini terjadi pada udang windu yang tidak tahan sehingga dapat terinfeksi oleh *White Spot Syndrome Virus* melalui insang. Hasil analisis menunjukkan bahwa sampel udang yang terinfeksi melalui air yang terkontaminasi *Whispovirus* dapat menyebabkan penyebaran virus lebih luas.

1.4.3 Rumput Laut

1.4.3.1 *Caulerpa racemose*

Caulerpa merupakan salah satu genus alga hijau yang dapat tumbuh di daerah tropis dan subtropics. *Caulerpa* terdiri dari beberapa cabang yang dihubungkan oleh stolon yang melekat pada substrat berpasir oleh rizoid. Cabang-cabangnya terpisah beberapa sentimeter dan tumbuh setinggi 30 cm. Pucuknya bulat sehingga spesies ini juga disebut anggur laut. Potensi pengembangan *Caulerpa* cukup baik karena rumput laut ini mengandung nutrisi yang dibutuhkan tubuh dan telah dikenal sebagai makanan tradisional masyarakat pesisir di Indonesia. Beberapa jenis zat bioaktif yang terdapat dalam *Caulerpa* seperti

alkaloid, flavonoid, terpenoid, tanin, dan saponin dapat dimanfaatkan sebagai bahan pangan dan farmasi (Zaw et al., 2020).

1.4.3.2 *Sargassum polycystum*

Panjang thallus 35 cm, berwarna coklat, holdfast pipih, bentuk batang silinder, percabangan alternate, ukuran *thallus* 13-42 mm untuk panjang dan lebar 2.5-11.5 mm, daun berbentuk panjang cenderung runcing dan bergerigi (Widowaty et al., 2018). *Sargassum* sp. mengandung bahan alginat dan iodin yang digunakan pada industri makanan, farmasi, kosmetik dan tekstil. Selain itu juga, *Sargassum* sp. mengandung senyawa-senyawa aktif steroida, alkaloida, fenol, dan triterpenoid berfungsi sebagai antibakteri, antivirus, dan anti jamur. *Sargassum* memproduksi beberapa jenis senyawa sekunder, seperti florotanin, steroid dan sterol (Pakidi & Suwoyo, 2017).

1.4.3.3 *Halymenia durvillei*

Spesies dari *Halymenia* sp. umumnya merupakan foliose dengan talus yang tegak terdiri dari bagian yang menyerupai daun (*blades*) yang berbentuk sederhana, berbentuk lancet (*lanceolate*) ke bentuk cabang majemuk tidak beraturan, cabang yang menipis ataupun silindris, dengan maupun tanpa stem yang sejati menempel pada substratum oleh *holdfast* berbentuk *discoïd*. Bagian *blades* sangat lembut hingga bergelatin atau berdaging, secara struktural merupakan multiaksial dengan korteks tipis dengan sel korteks bintang bagian dalam sebuah medulla dibentuk oleh filamen medulla yang disusun tidak rapat dan sebuah jaringan dari sel bintang dengan lengan yang Panjang (Rodriguez-Prieto et al., 2018).

1.4.4 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Metode GC-MS merupakan metode dengan mekanisme pemisahan sampel dilakukan menggunakan kromatografi gas yaitu pemisahan solut-solut yang mudah menguap sedangkan analisis menggunakan spektrofotometri massa. Prinsip dasar dari spektrofotometri massa adalah untuk menghasilkan ion baik dari senyawa anorganik atau organik dengan metode yang sesuai, untuk memisahkan ion-ion suatu senyawa dengan berdasarkan *mass-to-charge* (m/z) dan mendeteksinya secara kualitatif dan kuantitatif dengan m/z dari masing-masing senyawa dan kelimpahannya. Keunggulan metode GC-MS antara lain: efisien, resolusi tinggi sehingga dapat digunakan untuk menganalisis partikel yang sangat kecil. Aliran gas sangat terkontrol dan kecepatannya tetap. Analisis cepat, biasanya hanya beberapa menit. Tidak merusak sampel. Sensitivitas tinggi, dapat memisahkan berbagai senyawa yang bercampur satu sama lain dan dapat menganalisis berbagai senyawa bahkan dalam kadar/konsentrasi rendah. Selain keunggulan metode GC-MS juga memiliki kekurangan antara lain: hanya untuk zat yang mudah menguap, tidak dapat memisahkan campuran dalam jumlah besar. Fase gerak

tidak bersifat reaktif terhadap fase diam dan zat terlarut (Candradiningrat et al., 2021).

Teknik GC pertama kali diperkenalkan oleh James dan Martin pada tahun 1952. GC merupakan salah satu teknik kromatografi yang hanya dapat digunakan untuk mendeteksi senyawa- senyawa yang mudah menguap. Kriteria menguap adalah dapat menguap pada kondisi vakum tinggi dan tekanan rendah serta dapat dipanaskan. Dasar pemisahan menggunakan kromatografi gas adalah penyebaran cuplikan pada fase diam sedangkan gas sebagai fase gerak mengelusi fase diam. Cara kerja dari GC adalah suatu fase gerak yang berbentuk gas mengalir di bawah tekanan melewati pipa yang dipanaskan dan disalut dengan fase diam cair atau dikemas dengan fase diam cair yang disalut pada suatu penyangga padat. Analit tersebut dimuatkan ke bagian atas kolom melalui suatu portal injeksi yang dipanaskan. Suhu oven dijaga atau diprogram agar meningkat secara bertahap. Ketika sudah berada dalam kolom, terjadi proses pemisahan antar komponen. Pemisahan ini akan bergantung pada lamanya waktu relatif yang dibutuhkan oleh komponen-komponen tersebut di fase diam (Darmapatni et al., 2016).

Seiring dengan perkembangan teknologi maka instrument GC digunakan secara bersama-sama dengan instrumen lain seperti *Mass-Spectrometer* (MS). Spektrometer massa diperlukan untuk identifikasi senyawa sebagai penentu bobot molekul dan penentuan rumus molekul. Prinsip dari MS adalah pengionan senyawa-senyawa kimia untuk menghasilkan molekul bermuatan atau fragmen molekul dan mengukur rasio massa/muatan. Molekul yang telah terionisasi akibat penembakan elektron berenergi tinggi tersebut akan menghasilkan ion dengan muatan positif, kemudian ion tersebut diarahkan menuju medan magnet dengan kecepatan tinggi. Medan magnet atau medan listrik akan membelokkan ion tersebut agar dapat menentukan bobot molekulnya dan bobot molekul semua fragmen yang dihasilkan. Kemudian detektor akan menghitung muatan yang terinduksi atau arus yang dihasilkan ketika ion dilewatkan atau mengenai permukaan, scanning massa dan menghitung ion sebagai *mass to charge ratio* (m/z). Terdapat 4 (empat) proses dalam spektrometri massa yakni ionisasi, percepatan, pembelokkan dan pendeteksian (Darmapatni et al., 2016).

1.4.5 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses yang bertujuan untuk memisahkan komponen-komponen yang diinginkan dari suatu tanaman sehingga didapatkan senyawa aktif dengan kemurnian tinggi. Proses ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya jenis pelarut, perbandingan pelarut dengan bahan ekstraksi, suhu, tekanan dan waktu ekstraksi serta komponen bioaktif tumbuhan. Jika kondisi suhu dan temperatur sama, maka jenis pelarut dan komponen senyawa kimia yang terdapat pada tanaman adalah dua faktor penting yang menentukan keberhasilan proses ekstraksi (Hidayah et al., 2016).

Prinsip proses ekstraksi yaitu: Pelarut ditransfer dari bulk menuju ke permukaan. Pelarut menembus masuk atau terjadi difusi massa pelarut pada

permukaan padatan inert ke dalam pori padatan (*intraparticle diffusion*). Zat terlarut (solut) yang ada dalam padatan larut kedalam pelarut lalu karena adanya perbedaan konsentrasi. Campuran solut dalam pelarut berdifusi keluar dari permukaan padatan inert. Selanjutnya, zat terlarut (solut) keluar dari pori padatan inert dan bercampur dengan pelarut yang ada pada luar padatan. Dalam proses ekstraksi, beberapa macam faktor yang ikut menentukan nilai koefisien transfer massa adalah kecepatan putaran pengadukan, ukuran partikel, suhu, dan sifat fisis padatan. Nilai koefisien transfer massa ikut bertujuan untuk menentukan kecepatan difusi dari sebuah zat yang terlarut kedalam pelarut. Meskipun leaching banyak diaplikasikan didalam dunia industri terutama produk farmasi, namun sampai saat ini belum banyak penelitian yang berkaitan dengan proses ekstraksi yang optimum, oleh karena itu perlu penelitian yang meninjau tentang koefisien transfer massa agar dalam pemakaiannya proses ekstraksi dapat berjalan (Prayudo et al., 2015). Salah satu metode ekstraksi yang sering digunakan yaitu metode ekstraksi maserasi.

Menurut Mukhriani (2014) Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri. Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun di sisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil.

1.4.6 Pelarut

Pelarut merupakan salah satu faktor yang menentukan dalam proses ekstraksi, sehingga banyak faktor yang harus diperhatikan dalam pemilihan pelarut. Terdapat dua pertimbangan utama dalam memilih jenis pelarut, yaitu pelarut harus mempunyai daya larut yang tinggi dan pelarut tidak berbahaya atau tidak beracun. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus dapat melarutkan ekstrak yang diinginkan saja, mempunyai kelarutan yang besar, tidak menyebabkan perubahan secara kimia pada komponen ekstrak, dan titik didih kedua bahan tidak boleh terlalu dekat (Arsa & Achmad, 2020). Pelarut yang baik untuk ekstraksi adalah yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan yang tinggi ini berhubungan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstraksi. Terdapat kecenderungan kuat bagi senyawa polar larut dalam pelarut polar dan sebaliknya. Pelarut organik berdasarkan konstanta dielektrikum dapat dibedakan menjadi dua, yaitu polar dan nonpolar. Konstanta dielektrikum dinyatakan sebagai gaya tolak menolak antara

dua pertikel yang bermuatan listrik dalam suatu molekul. Semakin tinggi konstanta dielektrikunya maka pelarut bersifat semakin polar. Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi yaitu etanol.

Menurut Aziz et al. (2018) Etanol atau sering juga disebut dengan alkohol adalah suatu cairan transparan, mudah terbakar, tidak berwarna, mudah menguap, dengan rumus kimia C_2H_5OH , dapat bercampur dengan air, eter, dan kloroform, yang diperoleh melalui fermentasi karbohidrat dari ragi yang disebut juga dengan *etil alcohol*. Etanol atau etil alkohol (C_2H_5OH) termasuk kelompok hidroksil yang memberikan polaritas pada molekul dan mengakibatkan meningkatnya ikatan hidrogen intermolekuler. Etanol mempunyai kelarutan yang relatif tinggi dan bersifat inert sehingga tidak bereaksi dengan komponen lainnya. Etanol memiliki massa jenis 0.7893 g/mL. Titik didih etanol pada tekanan atmosfer adalah $78.32^{\circ}C$. Indeks bias dan viskositas pada temperatur $20^{\circ}C$ adalah 1.36143 dan 1.17 cP. Etanol adalah pelarut *volatile* bersifat semipolar karena dapat melarutkan baik senyawa polar maupun nonpolar. Gugus $-OH$ polar dan $-CH_2CH_3$ bersifat nonpolar. Karbon pendek pada etanol ini menyebabkan sifat nonpolar. Mengingat pemanfaatan etanol beraneka ragam, sehingga *grade* etanol yang dimanfaatkan harus berbeda sesuai dengan penggunaannya. Untuk etanol dengan *grade* 90-96,5% dapat digunakan pada industry, sedangkan etanol yang mempunyai *grade* 96-99,5% dapat digunakan sebagai campuran untuk miras dan bahan dasar industri farmasi. Besarnya *grade* etanol yang dimanfaatkan sebagai campuran bahan bakar untuk kendaraan sebesar 99,5- 100%. Perbedaan *grade* akan berpengaruh terhadap proses konversi karbohidrat menjadi gula (glukosa) larut air.

1.4.7 Molecular Docking

Molecular docking adalah proses mengidentifikasi pengikatan antara dua atau lebih molekul menggunakan pencocokan geometris dan energi. Penggunaan pendekatan ini dapat membantu dalam prediksi konformasi pengikatan dan mode pengikatan atau orientasi antara reseptor dan ligan dan sangat berharga untuk mempelajari perubahan konformasi substrat selama pembentukan kompleks. Docking molekuler adalah dasar untuk menentukan mekanisme pengikatan obat ke target dan sangat penting untuk skrining virtual berbasis reseptor (Zhang et al., 2022). Menurut Prieto-Martínez et al., (2018) Baru-baru ini, docking juga diterapkan untuk memprediksi mode pengikatan antara dua makromolekul, misalnya docking protein-protein.

Sejak kemunculan pertamanya pada pertengahan 1970-an, docking telah terbukti menjadi alat penting untuk membantu memahami bagaimana senyawa kimia berinteraksi dengan target molekulnya, dan untuk penemuan dan pengembangan obat. Faktanya, jumlah penelitian yang melaporkan: (i) penggunaan docking molekuler untuk mengidentifikasi determinan struktural yang diperlukan untuk pengikatan reseptor ligan yang efisien, dan (ii) pengembangan metode docking yang lebih akurat, telah meningkat pesat sejak pertama kali penampilan. Di antara studi pertama dan lebih menarik tentang penggunaan

docking dalam penemuan obat dan biologi adalah salah satu dari *Kuntz et al.* pada awal 1980-an (Pinzi et al., 2019).

Docking memainkan peran penting dalam desain obat rasional. Mempertimbangkan pentingnya biologi dan farmakologis studi docking, banyak upaya telah dilakukan untuk meningkatkan algoritma untuk prediksi docking. Docking adalah teknik matematika yang mengantisipasi orientasi yang lebih disukai dari satu molekul relatif terhadap yang lain ketika mereka dihubungkan bersama untuk menciptakan kompleks yang stabil. Dengan menggunakan fungsi skor, dimungkinkan untuk memperkirakan kekuatan koneksi atau afinitas pengikatan di dua senyawa berdasarkan orientasi preferensial mereka. Transduksi sinyal tergantung pada interaksi zat fisiologis yang signifikan seperti protein, asam nukleat, karbohidrat, dan lipid. Akibatnya, docking dapat digunakan untuk meramalkan intensitas dan jenis sinyal yang dihasilkan. Docking banyak digunakan untuk mengantisipasi penyelarasan kandidat obat relatif terhadap molekul target spesifik untuk mengelola afinitas dan aktivitas molekul kecil. Sehingga, docking sangat penting dalam karakterisasi struktural obat. Tujuan dari studi docking adalah untuk mengoptimalkan bentuk ligan dan protein, serta orientasi relatif protein dan ligan, untuk mengurangi energi bebas total system (Raval & Ganatra, 2022).

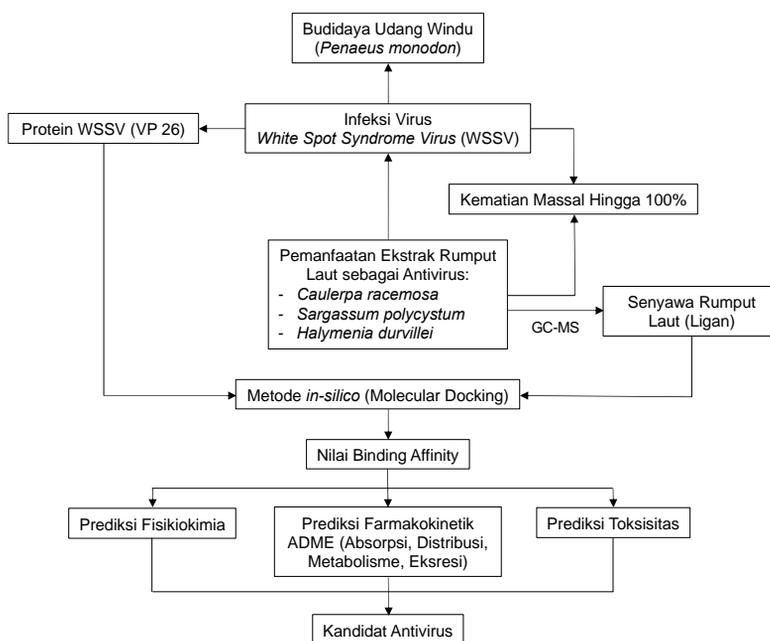
Molekuler docking diawali dengan preparasi dan optimasi molekul dan protein untuk mendapatkan hasil yang baik. Langkah awal ini penting karena penambatan melibatkan pergerakan atom/molekul secara fisik dalam waktu yang dinamik dengan tuntutan kecepatan simulasi pada ketepatan tinggi. Optimasi dapat dilakukan melalui minimisasi energi yang melibatkan kalkulasi mekanika molekul. Minimalisasi energi dapat mempermudah dan menyetabilkan susunan ikatan selama penambatan molekul, penambahan hidrogen, dan konversi struktur dua dimensi menjadi tiga dimensi. Optimasi melalui minimisasi energi yang dilakukan dengan baik dan tepat dapat meningkatkan ketepatan dan performa hasil penambahan molekuler. Hasil penambahan molekuler selanjutnya dilaporkan dalam afinitas ikatan (*binding affinity*) dan interaksi molekul yang mempengaruhi aktivitas intermolekuler senyawa dan berimbang pada kekuatan ikatan (Hanif et al., 2020).

1.4.8 Sifat Fisikokimia, Farmakokinetik dan Toksisitas

Sifat fisikokimia berupa data berat molekul, koefisien partisi oktanol-air, jumlah akseptor ikatan hidrogen, jumlah donor ikatan hidrogen, dan *topological surface area* (TPSA) digunakan untuk evaluasi drug-likeness berdasarkan aturan Lipinski (Fadlan et al., 2021). Aturan lipinski mampu menentukan sifat fisikokimia dengan melihat permeabilitas senyawa dengan mekanisme difusi pasif terhadap lipid bilayer pada target, serta dapat digunakan untuk mempertimbangkan apakah senyawa dapat diadministrasikan secara oral. Lipinski Rules of Five (RO5) memiliki persyaratan yang terdiri dari berat molekul tidak boleh diatas 500 Da, nilai koefisien partisi (logP) tidak lebih dari dari 5, jumlah ikatan donor dan ikatan hidrogen harus

kurang dari 5, dan akseptor ikatan hidrogen harus kurang dari 10. Senyawa uji dikatakan memenuhi persyaratan untuk dijadikan sediaan oral apabila tidak lebih dari satu pelanggaran terhadap aturan Lipinski RO5 (Lipinski, 2004; Wulandari et al., 2023). Sifat fisikokimia tidak terlepas TPSA yang dalam kimia medisinal digunakan untuk menganalisis kemampuan obat untuk masuk kedalam sel (Abdullah et al., 2021). Nilai TPSA harus kurang dari 140(Å) (Ertl et al., 2000; Wulandari et al., 2020). Analisis profil farmakokinetik bertujuan untuk memprediksi profil ADME (Absorpsi, Distribusi, Metabolisme dan Eksresi) suatu obat yang dapat memberikan informasi mengenai bioavailabilitas oral, permease sel, metabolisme, eliminasi, dan toksisitas yang menjadi karakteristik farmakokinetik dari sebuah molekul obat (Nusantoro & Fadlan, 2020). Farmakokinetik melalui parameternya membahas mengenai korelasi kadar obat dalam plasma-waktu dalam tubuh, sehingga dapat menjelaskan keberadaan sejumlah obat di dalam tubuh pada waktu tertentu. Parameter farmakokinetik dapat menjelaskan lebih baik mengenai efektivitas obat karena dapat menerangkan berapa lama masa efektivitas obat dalam tubuh (Wijayanti et al. 2010).

1.4.9 Kerangka Pemikiran



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan selama 2 bulan yaitu pada bulan Februari-Maret pada tahun 2023 dilakukan di Laboratorium Biofarmaka Pusat Kegiatan Penelitian (PKP) Universitas Hasanuddin untuk metode ekstraksi, untuk metode GC-MS di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang.

2.2 Tahap Persiapan

2.2.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut:

- a. Alat yang digunakan dalam ekstraksi adalah *Rotary Evaporator*
- b. Alat yang digunakan dalam uji GC-MS adalah GCMS QP-2010 Shimadzu Ultra
- c. Alat yang digunakan untuk uji *in-silico* adalah seperangkat *Personal Computer* (PC/Laptop) Apple Macbook yang dilengkapi dengan perangkat lunak seperti sistem operasi dan aplikasi pendukung. Sistem operasi yang digunakan adalah sistem operasional terbaru (MacOs High Sierra) dan aplikasi pendukung yang digunakan adalah Microsoft Office 2020, PyRx 0.8, UCSF Chimera (3D Viewer), PyMOL.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut:

- a. Bahan yang digunakan untuk ekstraksi adalah rumput laut *Caulerpa racemosa*, *Sargassum polycystum*., dan *Halymenia durvillei*
- b. Bahan yang digunakan untuk uji GC-MS adalah ekstrak dari rumput laut *Caulerpa racemosa*, *Sargassum polycystum*, dan *Halymenia durvillei*
- c. Bahan yang digunakan untuk uji *in-silico* adalah protein target virus WSSV yaitu VP26 dan hasil identifikasi senyawa rumput laut sebagai ligan.

2.2.2 Pengambilan Sampel Rumput Laut dan Persiapan Ekstraksi

Sampel rumput laut yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Pulau Khayangan, Kota Makassar, Provinsi Sulawesi Selatan. Setelah dikoleksi, sampel basah yang baru dipanen kemudian akan dimasukkan kedalam wadah untuk diproses lebih lanjut.

Sebelum dilakukan ekstraksi, terlebih dahulu dilakukan penyiapan sampel dengan cara sebanyak 11 kg sampel basah yang baru dipanen dilakukan pencucian sampel terlebih dahulu menggunakan air mengalir beberapa kali hingga bersih dari presipitat air garam dan dilakukan sortasi basah untuk menghilangkan pengotor berupa epifit yang terikut saat proses koleksi sampel. Kemudian, sampel dikeringkan dibawah sinar matahari selama lebih kurang 8 jam per hari hingga betul-betul kering.

2.3 Tahap Pelaksanaan

2.3.1 Ekstraksi Senyawa Aktif Rumput Laut

Metode ekstraksi yang digunakan yaitu metode maserasi. Sampel rumput laut dimaserasi menggunakan larutan Etanol 96% selama 3-4 hari. Kemudian disaring menggunakan kertas saring untuk mendapatkan filtrat. Hasil dari filtrasi tersebut kemudian diekstrak menggunakan *Rotary Evaporator* hingga didapatkan ekstrak dari rumput laut.

2.3.2 Analisis Senyawa Aktif Rumput Laut dengan Metode Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS)

Hasil ekstrak rumput laut yang didapatkan selanjutnya dianalisis menggunakan GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS) QP 2010 Shimadzu Ultra untuk mengetahui senyawa aktif yang terkandung dalam *Caulerpa racemosa*, *Sargassum polycystum.*, dan *Halymenia durvillei*. 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-protein secara *in-silico*

2.3.3.1 Preparasi protein

Protein yang digunakan diunduh dari situs resmi *protein data bank* (www.uniprot.org) dalam format PDB. Protein yang digunakan dalam penelitian ini adalah VP 26 untuk WSSV.

2.3.3.2 Preparasi Ligan

Ligan yang digunakan dalam uji ini adalah senyawa aktif alami dari ekstrak beberapa rumput laut yang diperoleh dari hasil GCMS, kemudian mengumpulkan struktur 3D senyawa alami dari ekstrak rumput laut melalui situs resmi <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dengan mengunduh file berformat SDF dan mengunduh inhibitor kontrol yaitu *Chloroquine*.

Setelah mengunduh senyawa aktif yang dibutuhkan dan inhibitor kontrol, masing-masing akan divisualisasi menggunakan PyMOL lalu menambahkan atom hidrogen dan disimpan dalam bentuk ".mol2". Hal ini berfungsi untuk mempersiapkan kebutuhan *docking* yang meliputi ligan dan protein target.

2.3.3.3 Proses *Docking*

Proses *docking* dilakukan dengan menggunakan *software* PyRx dengan memasukkan preparasi ligan, preparasi protein WSSV serta inhibitor kontrol *Chloroquine* dalam *software* PyRx 0.8.

2.3.3.4 Profil Fisikokimia

Profil fisikokimia dilakukan menggunakan *web server* SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>) dan digunakan aturan *Lipinski rule of five*. *Lipinski rule of five* terdiri dari bobot molekul (MW) ≤ 500 , lipofilisitas (LogP) ≤ 5 , *H-Bond Acceptors* ≤ 10 , dan *H-Bond Donors* (NH or OH) ≤ 5 , TPSA $< 140 \text{ \AA}^2$ (Lipinski et al., 2001; Daina et al., 2017).

2.3.3.5 Profil Farmakokinetik

Profil farmakokinetik dengan profil ADME (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion*) dari beberapa senyawa yang terbaik dari rumput laut. Prediksi ADME menggunakan *web server* Admet-SAR 2.0 (<https://lmmd.ecust.edu.cn/admet-sar2/>).

2.3.3.6 Profil Tosisitas

Profil toksisitas dilakukan untuk mengetahui profil keamanan dari suatu senyawa, uji toksisitas menggunakan *web server* ProTox II (https://tox-new.charite.de/protox_II/).

2.4 Analisis Data

Molecular docking dan analisis data *docking* dilakukan untuk mengetahui nilai *binding affinity*. Pada penelitian ini, jika memperoleh nilai *binding affinity* yang semakin rendah maka hal ini dapat menunjukkan adanya interaksi yang kuat antara protein VP26 dan ligan yang diperoleh dari rumput laut *Caulerpa racemosa*, *Sargassum polycystum*, dan *Halymenia durvillei*. Data interaksi ligan dan protein VP26 ditampilkan menggunakan aplikasi *Biovia Discovery Studio* untuk melihat letak dan model perlekatan pada protein. Analisis lebih lanjut terkait profil fisikokimia, farmakokinetik dan toksisitas untuk mengetahui efek yang akan ditimbulkan oleh senyawa.