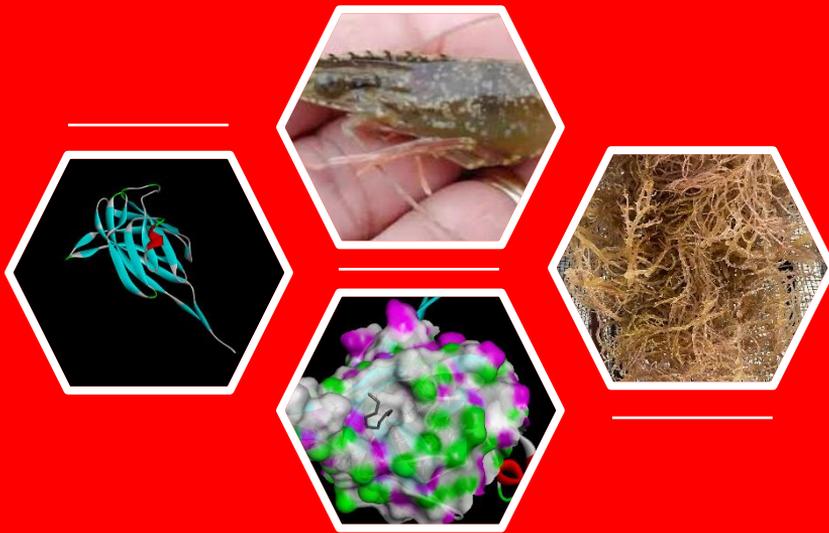


EVALUASI *IN SILICO* EKSTRAK SENYAWA RUMPUT LAUT *Eucheuma spinosum* TERHADAP KETAHANAN MELAWAN *White Spot Syndrome Virus (WSSV)* YANG SERING MENYERANG UDANG WINDU (*Penaeus monodon*)



**AMALIA HARNANDA ZAQIA
L031201015**



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

2024

EVALUASI *IN SILICO* EKSTRAK SENYAWA RUMPUT LAUT *Eucheuma spinosum* TERHADAP KETAHANAN MELAWAN *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) YANG SERING MENYERANG UDANG WINDU (*Penaeus monodon*)

**AMALIA HARNANDA ZAQIA
L031201015**



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

EVALUASI *IN SILICO* EKSTRAK SENYAWA RUMPUT LAUT *Eucheuma spinosum* TERHADAP KETAHANAN MELAWAN *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) YANG SERING MENYERANG WINDU (*Penaeus monodon*)

**AMALIA HARNANDA ZAQIA
L031201015**

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Budidaya Perairan

Pada

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

LEMBAR PENGESAHAN**SKRIPSI**

EVALUASI *IN SILICO* EKSTRAK SENYAWA RUMPUT LAUT *Eucheuma spinosum* TERHADAP KETAHANAN MELAWAN *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) YANG SERING MENYERANG UDANG WINDU (*Penaeus monodon*)

AMALIA HARNANDA ZAQIA

L031201015

Skripsi,

Telah dipertahankan didepan Panitia Ujian Sarjana pada 28 November 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan pada

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

Mengesahkan:

Pembimbing Tugas Akhir



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

NIP. 19721228 200604 2 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi



Dr. Andi Aliah 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 *In Silico* Ekstrak Senyawa Rumput Laut *Eucheuma Spinosum* Terhadap Ketahanan Melawan *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) Yang Sering Menyerang Udang Windu (*Penaeus Monodon*)” 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



AMALIA HARNANDA ZAQIA
NIM.L031201015

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian yang saya 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 skripsi. Saya mengucapkan berlimpah terima kasih kepada beliau. 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.

Terima kasih juga saya sampaikan kepada **Prof. Dr. Ir. Siti Aslamyah, MP.** selaku dosen pembimbing akademik. Tak lupa saya ucapkan terima kasih kepada **Prof. Hilal Anshary, M.Sc** selaku dosen penguji. Ucapan terima kasih juga saya ucapkan kepada pimpinan Universitas Hasanuddin yang telah memfasilitasi saya menempuh program sarjana serta seluruh dosen dan staf Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Unhas yang telah membantu banyak dan memberikan ilmunya selama masa perkuliahan.

Terima kasih dan penghargaan kepada orang tua saya, **Moch. Hariyono** dan **Endah Sulistio Warni** yang dengan penuh kesabaran memberikan banyak kasih sayang, motivasi dan dukungan baik materi maupun non materi selama saya menempuh pendidikan serta selalu mendoakan kebaikan kepada saya. Tak lupa juga kepada adik-adik saya yang telah memberikan banyak semangat serta dukungan dari awal perkuliahan hingga penyelesaian skripsi ini.

Terima kasih juga kepada teman-teman saya **Sheila, Uyung, Osy, Shafiya, Fani, Maria, Citta,** dan **Tegar**. Teman Seperjuangan **Budidaya Perairan 2020, Pakarena 12,** serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terima kasih atas segala dukungan dan partisipasi dalam penyelesaian skripsi ini.

Terimakasih juga saya ucapkan kepada diri sendiri yang telah berhasil berjuang melawati segala rintangan perkuliahan hingga di titik mampu menyelesaikan skripsi ini dengan baik, semoga pencapaian ini mampu membuka pintu kesempatan baru. Selamat kepada diriku yang tak kenal lelah dan semoga gelar ini menjadi bekal untuk mengabdikan pada masyarakat.

Penulis,



Amalia Harnanda Zaqia

ABSTRAK

AMALIA HARNANDA ZAQIA. **Evaluasi *In Silico* Ekstrak Senyawa Rumput Laut *Eucheuma Spinosum* Terhadap Ketahanan Melawan *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) Yang Sering Menyerang Udang Windu (*Penaeus Monodon*)** (dibimbing oleh Asmi Citra Malina).

Latar belakang. Berbagai macam penyakit yang ditemukan menyerang udang telah menimbulkan dampak negatif bagi industri budidaya udang. Salah satu penyakit yang telah menyerang selama 3 dekade terakhir dan menyebabkan dampak kerugian besar di sebabkan oleh *White Spot Syndrome Virus* (WSSV). Penularan WSSV sangat cepat dan menyebabkan kematian 100% dalam waktu 3-10 hari sejak timbul gejala klinis. Berbagai macam upaya dan penelitian telah dilakukan untuk mencegah udang terserang oleh WSSV salah satunya dengan pemberian immunostimulan. Salah satu bahan alami yang dapat dipergunakan untuk immunostimulan adalah rumput laut. Rumput laut merah (*Rhodophyta*) mengandung sejumlah senyawa bioaktif dengan potensi farmalogis yang besar seperti *Eucheuma spinosum*. Salah satu teknik prediksi penentuan immunostimulan yang saat ini mulai banyak digunakan adalah metode *in silico*. metode *in silico* yang banyak digunakan adalah *molecular docking*, ini adalah metode komputasi yang digunakan dalam memprediksi interaksi dan model pengikatan suatu ligan dengan reseptor. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis senyawa dari ekstrak etanol rumput laut yang memiliki kemampuan dalam menghambat WSSV melalui uji *molecular docking*. **Metode.** Penelitian ini menggunakan metode komputasi (*in silico*) yaitu dengan melakukan penelusuran ilmiah ekstrak senyawa rumput laut (*Eucheuma spinosum*) sebagai Anti Virus *White spot syndrome virus* (WSSV) pada udang windu (*Penaeus monodon*) menggunakan molecular docking dengan penambahan ekstrak senyawa rumput laut dan protein WSSV VP26. Senyawa yang terkandung pada rumput laut diidentifikasi menggunakan metode *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS). **Hasil.** Senyawa yang memiliki nilai *binding affinity* yang lebih rendah dibanding kontrol merupakan senyawa yang terbaik. Senyawa rumput laut memiliki nilai *binding affinity* -4.77 kcal/mol sedangkan *chloroquine* sebagai inhibitor kontrol dari virus WSSV memiliki nilai *binding affinity* -4.80 kcal/mol. **Kesimpulan.** Rumput laut *Eucheuma spinosum* berpotensi sebagai kandidat antivirus *White spot syndrome virus* (WSSV) pada udang windu (*Penaeus monodon*).

Kata kunci: Udang windu; WSSV; rumput laut; *In silico*

ABSTRACT

AMALIA HARNANDA ZAQIA. **In Silico Evaluation of Eucheuma Spinosum Seaweed Compound Extract on Resistance Against White Spot Syndrome Virus (WSSV) which often attacks Tiger Prawns (Penaeus Monodon)**(dibimbing oleh Asmi Citra Malina).

Background. The shrimp farming sector has been negatively impacted by a number of illnesses that have been discovered to harm shrimp. The White Spot Syndrome Virus (WSSV) is one of the illnesses that has struck throughout the past three decades and resulted in significant losses. Rapid transmission of WSSV results in 100% mortality within 3–10 days of the onset of clinical signs. The use of immunostimulants is one of the many initiatives and studies that have been conducted to stop WSSV from attacking shrimp. Seaweed is one natural substance that can be utilized as an immunostimulant. Eucheuma spinosum is one of several bioactive substances with significant pharmacological potential found in red seaweed (Rhodophyta). Currently, one of the most popular predictive methods for identifying immunostimulants is the in silico method. The in silico method that is widely used is molecular docking, this is a computational method used to predict interactions and binding models of a ligand with a receptor. **Objective.** This research aims to analyze compounds from seaweed ethanol extract that have the ability to inhibit WSSV through molecular docking tests. **Method.** This research uses computational methods (in silico), namely by carrying out scientific research on seaweed compound extracts (Eucheuma spinosum) as anti-virus for White spot syndrome virus (WSSV) in tiger prawns (Penaeus monodon) using molecular docking by docking seaweed compound extracts and proteins. WSSV VP26. Compounds contained in seaweed were identified using the Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) method. **Result** Compounds that have a lower binding affinity value than the control are the best compounds. The seaweed compound has a binding affinity value of -4.77 kcal/mol, while chloroquine as a control inhibitor of the WSSV virus has a binding affinity value of -4.80 kcal/mol. **Conclusion.** The seaweed *Eucheuma spinosum* has potential as an antiviral candidate for White spot syndrome virus (WSSV) in tiger prawns (Penaeus monodon).

Kata kunci: Tiger shrimp; WSSV; Seaweed; In silico

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	iii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iv
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI 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	4
2.3.2. Analisis Senyawa Aktif Rumput Laut dengan Metode <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)</i>	4
2.3.3. Analisis Interaksi Ligan (Rumput Laut) dengan Reseptor (Protein VP26) pada <i>White Spot Syndrome Virus Secara In Silico</i>	5
2.4. Analisis Data	15
BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN	16

3.1. Analisis Gas Chromathography-Mass Spectometry (GC-MS) Rumput Laut	16
3.2. Analisis <i>In Silico</i> Interaksi Antara Ligan-Protein (<i>Molecular Docking</i>)	17
3.2.1. Analisis Nilai <i>Binding Affinity</i>	18
3.2.2. Jenis Interaksi Antara Ligan (Senyawa <i>Eucheuma spinosum</i>) dengan Reseptor (VP26)	19
BAB IV. KESIMPULAN.....	23
DAFTAR PUSTAKA	24

DAFTAR TABEL

No.	Teks	Halaman
1.	Alat yang digunakan selama penelitian.....	3
2.	Bahan 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 dengan SI tinggi	17
8.	Nilai <i>Binding Affinity</i>	18
9.	Asam Amino yang Berikatan dengan Ligan	22

DAFTAR GAMBAR

No.	Teks	Halaman
1.	Prosedur Pelaksanaan <i>Uji In Silico</i>	4
2.	Tahapan Pelaksanaan <i>Molecular Docking</i>	5
3.	Hasil <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> <i>Eucheuma spinosum</i>	16
4.	Struktur 3D Viral Protein 26(VP26)	17
5.	Visualisasi Interaksi <i>Fumaric acid, ethyl 2-methylallyl ester</i> dengan VP26	19
6.	Visualisasi Interaksi <i>hexadecanoic acid, methyl ester</i> dengan VP26.....	20
7.	Visualisasi Interaksi <i>n-Hexadecanoic acid</i> dengan VP26	20
8.	Visualisasi Interaksi <i>Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester</i> dengan VP26	21
9.	Visualisasi Interaksi <i>Cholest-5-en-3-ol (3.beta.)- (CAS)</i> dengan VP26.....	21

DAFTAR LAMPIRAN

No.	Teks	Halaman
1.	Senyawa Rumput Laut <i>Eucheuma spinosum</i>	28
2.	Dokumentasi Kegiatan.....	42

CURRICULUM VITAE

A. Data Pribadi

1. Nama : Amalia Harnanda Zaqia
2. Tempat, tgl lahir : Surabaya, 09 September 2002
3. Alamat : Jl. Amethiz VI No. 8 GBA, Kebomas, Gresik
4. Kewarganegaraan : Warga Negara Indonesia

B. Riwayat Pendidikan

1. Tamat TK tahun 2008 di TKIT Al- Ibrah
2. Tamat SD tahun 2014 di SD Muhammadiyah 1 GKB
3. Tamat SMP tahun 2017 di SMPN 17 Gresik
4. Tamat SMA tahun 2020 di SMAN 1 Kebomas

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Udang merupakan komoditas primadona ekspor Indonesia. Salah satu jenis udang yang memiliki pasar skala ekspor adalah *black tiger prawn* atau secara nasional dikenal dengan udang windu (Cahyani *et al.*, 2024). Menurut Molla dan Aljahdali (2022) berbagai macam penyakit yang ditemukan menyerang udang windu telah menimbulkan dampak negatif bagi industri budidaya udang. Salah satu penyakit yang telah menyerang selama 3 dekade terakhir dan menyebabkan dampak kerugian besar adalah penyakit bintik putih (*White spot disease*) yang disebabkan oleh *White Spot Syndrome Virus* (WSSV). *White Spot Syndrome Virus* pertama kali ditemukan pada tahun 1992 di Asia yaitu Taiwan, Jepang dan Korea yang kemudian menyebar di seluruh dunia (Kumar *et al.*, 2021). Udang yang terserang WSSV ditandai dengan munculnya bercak putih pada permukaan kulit luarnya khususnya karapace (Tasakka *et al.*, 2022). Penularan WSSV sangat cepat dan menyebabkan kematian 100% dalam waktu 3-10 hari sejak timbul gejala klinis. Penyebaran WSSV dapat terjadi dengan 3 cara, yaitu transmisi vertikal dari induk ke larva, kemudian transmisi horizontal melalui air, dan kanibalisme pada udang.

Berbagai macam upaya dan penelitian telah dilakukan untuk mencegah udang terserang oleh WSSV salah satunya melalui peningkatan sistem imun dengan pemberian imunostimulan. Salah satu jenis imunostimulan yang telah terbukti mampu meningkatkan respon imun pada udang windu dan meningkatkan ketahanan terhadap penyakit bintik putih adalah rumput laut merah yaitu *Laurencia* sp. (Weldayanti, 2023). Pada saat ini, penggunaan rumput laut sebagai imunostimulan dan antivirus WSSV masih sangat minim diteliti dan dikembangkan.

Rumput laut dapat dikategorikan menjadi 3 divisi, yaitu *Chlorophyta*, *Phaeophyta*, dan *Rhodophyta* (Panggabean *et al.*, 2022). Menurut Nurshahida *et al.*, (2020) Rumput laut merah (*Rhodophyta*) mengandung sejumlah senyawa bioaktif dengan potensi farmalogis yang besar. Rumput laut sebagai metabolit sekunder berfungsi sebagai antioksidan, antivirus, antijamur dan antimikroba (Cokrowati *et al.*, 2024). Muahiddah dan Asri (2024) menyatakan bahwa rumput laut merah *Euचेuma cottoni* berpotensi sebagai imunostimulan dan antivirus pada bidang akuakultur karena dapat melawan serangan bakteri dan virus. Selain *Euचेuma cottoni* terdapat pula *Euचेuma spinosum* yang mengandung beberapa senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin (Damongilala *et al.*, 2021). Selanjutnya dijelaskan pula bahwa *Euचेuma spinosum* yang berasal dari perairan pulau Nain Sulawesi Utara telah terbukti berperan sebagai antibakteri *E. Coli*. Sampai saat ini belum ada penelitian terkait kemampuan *Euचेuma spinosum* sebagai imunostimulan dan antivirus, terutama pada hewan budidaya.

Saat ini, penemuan awal imunostimulan dan obat-obatan telah banyak menggunakan aplikasi atau *software* khusus pada komputer. Metode komputasi ini juga dikenal dengan metode *in silico*. Analisis *in silico* adalah suatu metode pendekatan menggunakan simulasi komputer dengan program tertentu untuk

mengidentifikasi senyawa dengan potensi dan selektifitas yang lebih tinggi (Wang *et al.*, 2015). Penggunaan metode ini dapat mempersingkat waktu, mudah dan tidak membutuhkan penggunaan biaya yang banyak (Molla dan Aljahdali, 2022). Salah satu metode *in silico* yang banyak digunakan adalah *molecular docking*. *Molecular docking* adalah metode komputasi yang digunakan dalam memprediksi interaksi dan model pengikatan antara mikromolekul yang dikenal sebagai ligan dengan daerah ikatan reseptor yang dipandang sebagai makromolekul protein yang menjadi target. *Molecular docking* atau penambatan molekuler diterapkan guna menghitung energi afinitas pengikatan dari suatu ligan terhadap reseptor dan memastikan posisi optimal. Pose pengikatan optimal dari reseptor dan ligan ditetapkan oleh energi afinitas yang lebih rendah (Zhu *et al.*, 2022).

Dalam rangka penelitian penggunaan rumput laut dalam hal ini *Eucheuma spinosum* sebagai antivirus WSSV maka diperlukan penentuan protein target yang berasal dari protein WSSV itu sendiri. WSSV memiliki lebih dari 40 protein struktural termasuk protein selubung seperti VP28, VP26, VP24 dan VP19, serta protein kapsid seperti VP15 dan VP664. Di antara protein-protein ini, *Viral protein 26* adalah salah satu protein tegument WSSV yang paling penting dan protein struktural yang melimpah kedua di dalam selubung (Liu *et al.*, 2024). VP26 bertindak sebagai jembatan molekuler antara selubung dan nukleokapsid partikel WSSV ketika virion keturunan berkumpul di inti sel inang (Wang *et al.*, 2021).

Berdasarkan uraian tersebut, maka perlu dilakukan penelitian terkait penggunaan ekstrak rumput laut *Eucheuma spinosum* sebagai kandidat antivirus *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) pada udang windu (*Penaeus Monodon*) dengan pendekatan *in silico* melalui metode *molecular docking* yang menggunakan VP26 sebagai protein target.

1.2 Tujuan dan Manfaat

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengevaluasi senyawa ekstrak etanol rumput laut *Eucheuma spinosum* yang memiliki kemampuan dalam menghambat *White spot syndrome virus* melalui uji *molecular docking*.

Manfaat dari penelitian ini sebagai sumber acuan untuk penggunaan metode *in silico* dalam bidang budidaya untuk menghambat protein WSSV dari ekstrak rumput laut *Eucheuma spinosum* 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 menggunakan metode *in vivo* dan *in vitro*.

BAB II. METODE PENELITIAN

2.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan selama 3 bulan yaitu pada bulan Agustus-Oktober pada tahun 2024 dilakukan di Laboratorium Biologi Kelautan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin untuk proses ekstraksi, untuk metode GC-MS di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang.

2.2. Tahap Persiapan

2.2.1. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan saat penelitian dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2 sebagai berikut.

Tabel 1. *Alat yang digunakan selama penelitian.*

Nama Alat	Fungsi
<i>Rotary Evaporator</i>	Alat untuk ekstraksi
GCMS QP-2010 Shimadzu Ultra	Alat uji GC-MS
PC AOC	Untuk uji <i>in silico</i>
Autodock4	Aplikasi docking
Autodock tools	Aplikasi docking
UCSF Chimera (3D Viewer)	Aplikasi preparasi ligan dan protein
BIOVIA Discovery Studio Visualizer	Aplikasi visualisasi hasil docking

Tabel 2. *Bahan yang digunakan selama penelitian.*

Nama Bahan	Fungsi
Rumput Laut <i>Eucheuma spinosum</i>	Bahan ekstraksi
Ethanol 96%	Pelarut ekstrak
Ekstrak <i>Eucheuma spinosum</i>	Bahan uji GC-MS
VP26	Bahan uji <i>in silico</i>

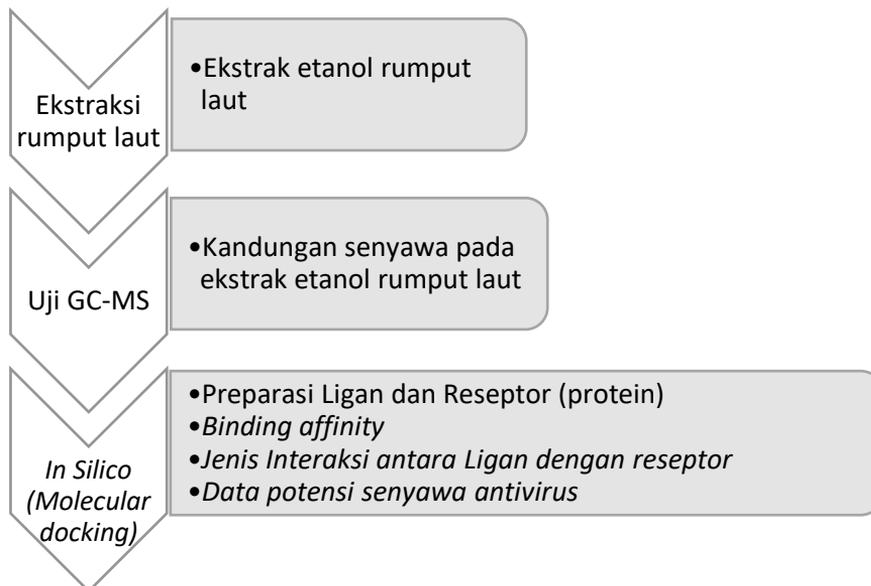
2.2.2. Pengambilan Sampel Rumput Laut dan Persiapan Ekstraksi

Sampel rumput laut yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari perairan Puntondo, Kabupaten Takalar, 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 sampel basah yang baru dipanen dilakukan pencucian sampel terlebih dahulu menggunakan air laut guna membersihkan sedimen-sedimen yang masih menempel pada rumput laut. Sampel di cuci kembali 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 dengan cara diangin anginkan selama 4 hari hingga betul-betul kering.

2.3. Tahap Pelaksanaan Uji *In Silico*



Gambar 1. Prosedur Pelaksanaan Uji *In Silico*

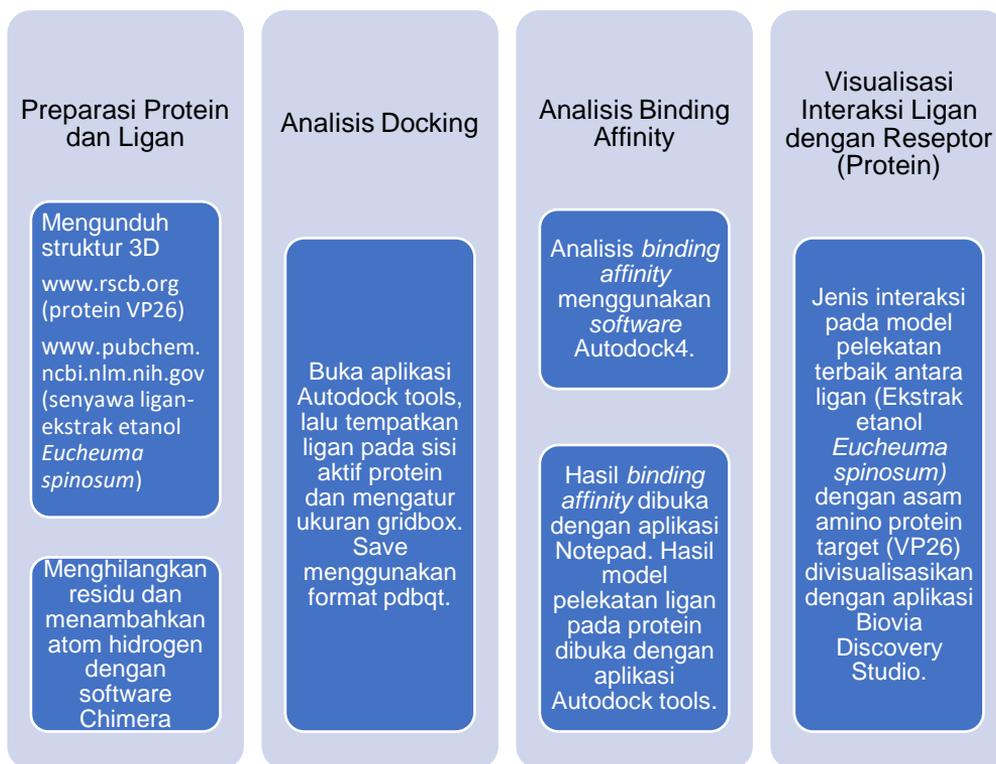
2.3.1. Ekstraksi Senyawa Rumput Laut

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

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

Hasil ekstrak rumput laut yang didapatkan selanjutnya akan dianalisis menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) QP 2010 Shimadzu Ultra untuk mengetahui senyawa aktif yang terkandung dalam *Eucheuma spinosum*. 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. Hasil GC-MS kemudian akan dipilih senyawa yang memiliki *similarity index* diatas 90 dan persen area yang besar.

2.3.3. Analisis Interaksi Ligan (Rumput Laut) dengan Reseptor (Protein VP26) pada *White Spot Syndrome Virus* Secara *In Silico*

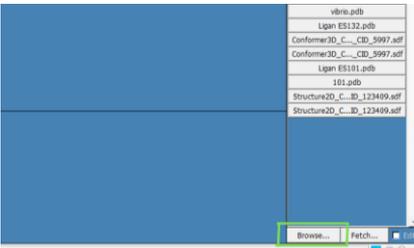
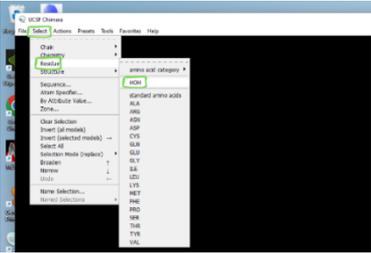
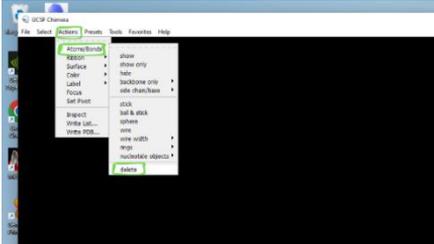
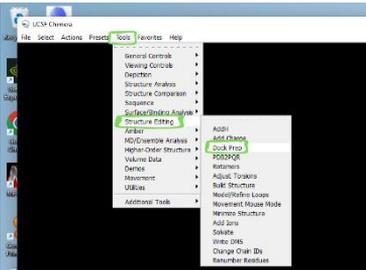
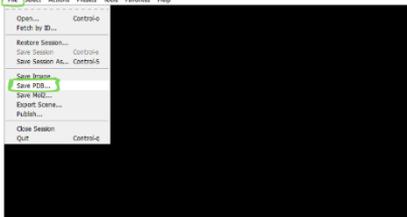


Gambar 2. Tahapan Pelaksanaan *Molecular Docking*

a. Preparasi protein (VP26)

Protein yang akan digunakan akan diunduh dari situs resmi *protein data bank* RSCB (www.rscb.org) dalam format PDB. Protein yang digunakan dalam penelitian ini adalah VP26 (PDB ID: 2EDM) untuk WSSV. Setelah protein diunduh dalam format PDB. Protein yang sudah diunduh kemudian divisualisasikan menggunakan Chimera dan dihilangkan residunya berupa air dan ligan yang terikat. 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

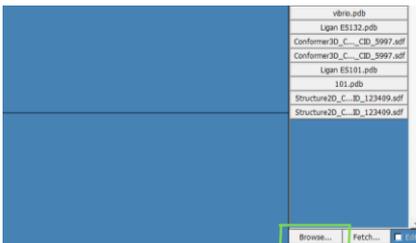
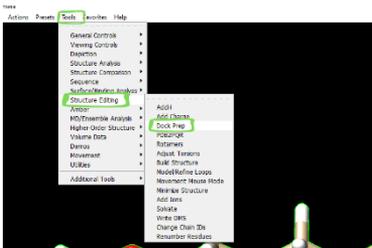
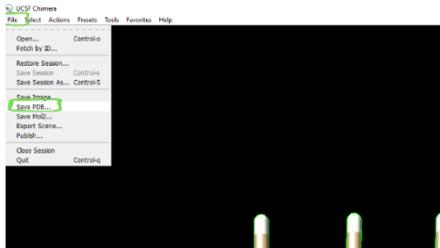
No	Gambar	Keterangan
1.		Buka aplikasi chimera kemudian klik icon bertuliskan browse dan pilih file protein yang akan dipreparasi.
2.		Klik icon select -> residue -> dan pilih residue nya
3.		Klik icon actions -> atom/bonds -> delete
4.		Klik icon tools -> structure editings -> dock prep
5.		Save protein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

b. Preparasi Ligan (Senyawa Rumput Laut *Eucheuma spinosum*)

Ligan yang digunakan dalam uji ini adalah senyawa alami dari ekstrak rumput laut *Eucheuma spinosum* yang didapatkan hasil dari 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 seperti *Choloroquine* untuk WSSV.

Setelah mengunduh senyawa aktif yang dibutuhkan dan inhibitor kontrol, masing-masing akan divisualisasi menggunakan Chimera lalu menambahkan atom hidrogen dan disimpan dengan format “.pdb”. Hal ini berfungsi untuk mempersiapkan kebutuhan *docking* yang meliputi ligan dan kontrol positif protein target. Prosedur preparasi ligan dapat dilihat pada Tabel 4.

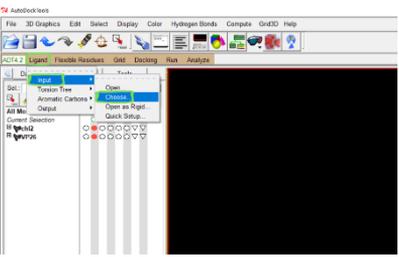
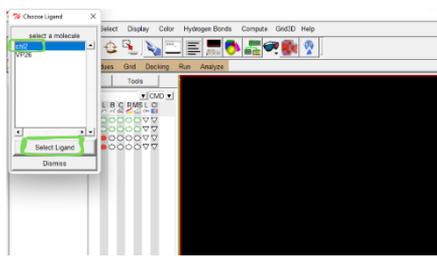
Tabel 4. Prosedur preparasi ligan

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

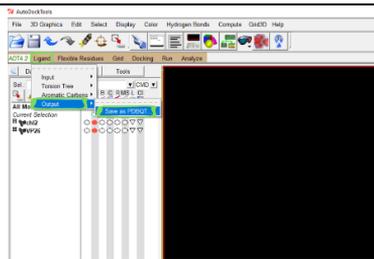
Proses *docking* dilakukan dengan menggunakan *software* Autodock tools dan Autodock4. Preparasi protein WSSV (VP26), serta inhibitor kontrol *Chloroquine* di masukkan dalam *software* Autodock tools dan mengatur *grid box* dengan ukuran 120x120x120 untuk menemukan model pelekatan dengan asam amino protein yang paling stabil. Setelah ditemukan model pelekatan yang stabil preparasi ligan dimasukkan dan disesuaikan dengan model pelekatan dari inhibitor kontrol. *Grid box* diatur menjadi lebih kecil dengan ukuran 40x40x40. Ligan dan protein target VP26 disimpan dengan format “.pdbqt” menyesuaikan dengan format yang dibutuhkan untuk analisis *binding affinity*. Kemudian *software* Autodock4 dijalankan untuk menganalisis nilai binding affinity pada setiap bentuk struktur molekul atau bentuk pelekatan yang terjadi. 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.

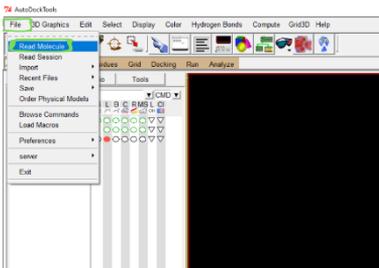
Lanjutan Tabel 5.

4.



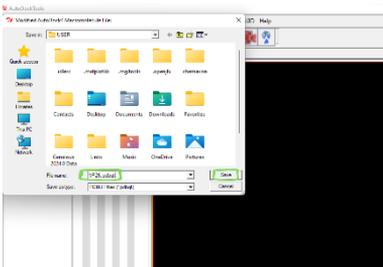
Setelah ligan dipilih klik icon ligand pilih output kemudian save as pdbqt. Simpan ke dalam folder yang diinginkan dengan format "nama file.pdbqt".

5.



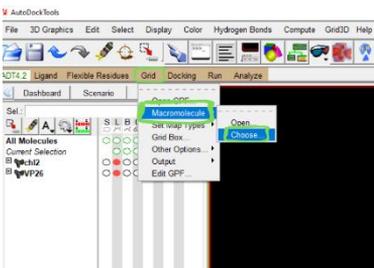
Untuk memasukkan file protein klik icon file pilih read molecule dan pilih file protein yang telah di preparasi.

6.



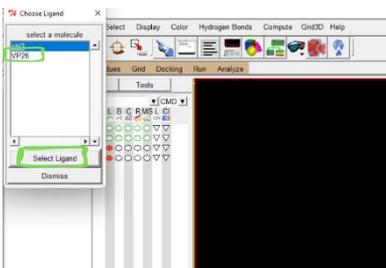
Akan muncul pop up box untuk menyimpan protein dengan format "nama file.pdbqt".

7.



Klik icon grid pilih macromolecule dan choose.

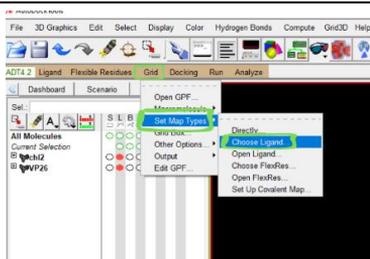
8.



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

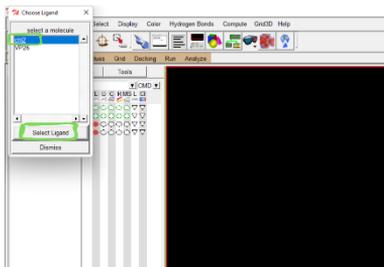
Lanjutan Tabel 5.

9.



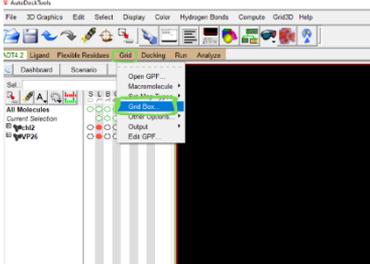
Klik icon grid pilih set map types dan choose ligand.

10.



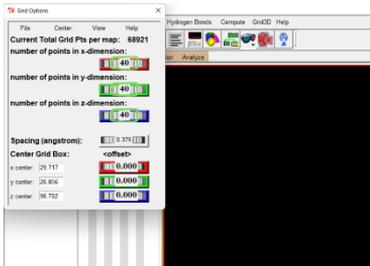
Kemu dian akan muncul pop up box dan pilih file ligan kemudian klik select.

11.



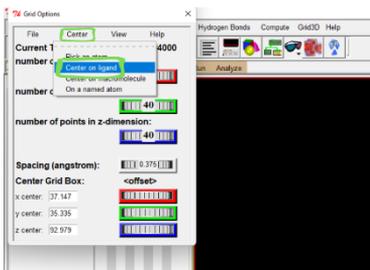
Klik icon grid dan pilih grid box.

12.



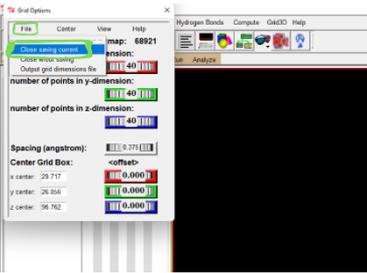
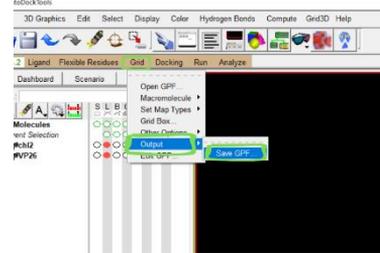
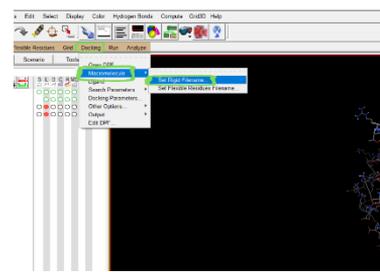
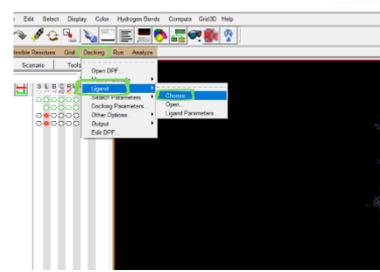
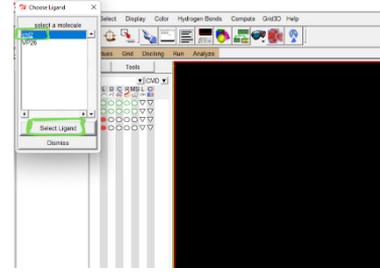
Muncul pop up box untuk mengatur ukuran box. Atar ukuran box pada ukuran 40x40x40.

13.

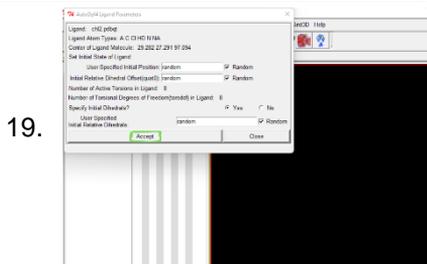


Klik icon center dan pilih center on ligand.

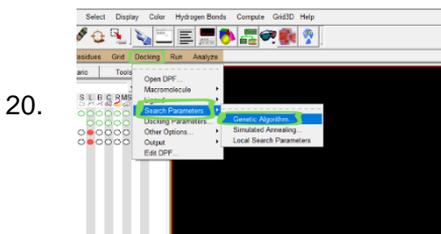
Lanjutan Tabel 5.

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

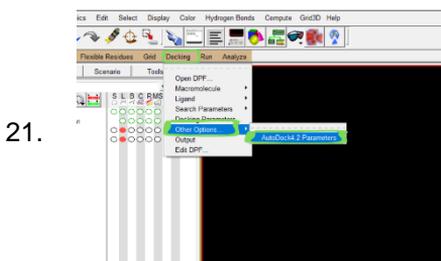
Lanjutan Tabel 5.



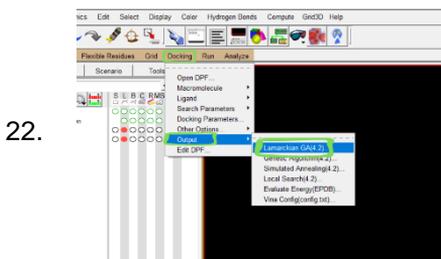
Kemudian akan muncul pop up box dan klik accept.



Klik icon docking pilih search parameters dan pilih genetic algorithm. 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.



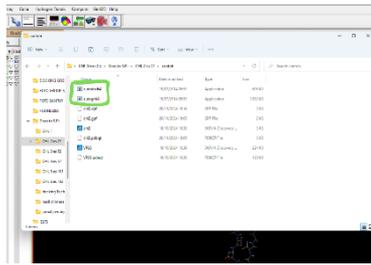
Klik icon docking pilih output dan lamarckian GA(4.2).



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

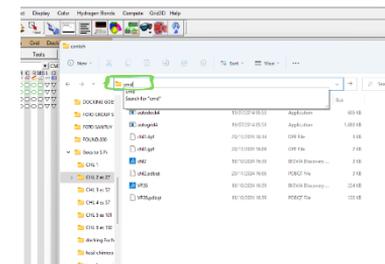
Lanjutan Tabel 5.

24.



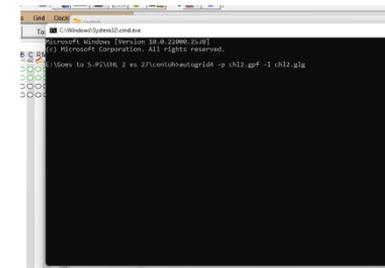
Buka folder pebelitan dan pastikan sudah terdapat software autodock4.

25.



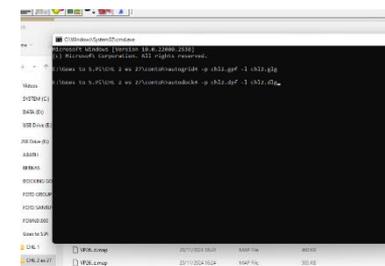
Ketik cmd pada bagian atas seperti pada gambar.

26.



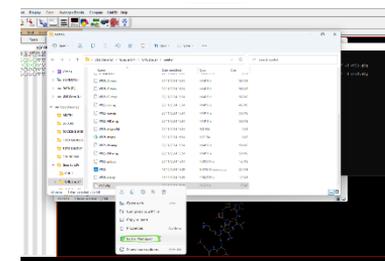
Setelah muncul pop up box dari cmd ketik "autogrid4 -p nama file.gpf -l nama file.glg".

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.

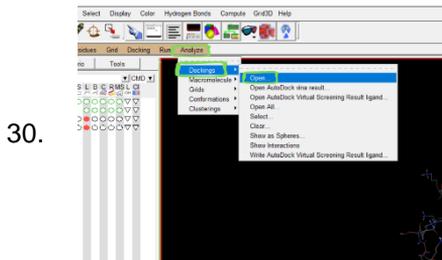
Rank	Score	Binding Energy	Cluster Size	Reference Rank	Group
1	4.27	-6.56	2	1	RM236
2	-4.46	-4.46	1	1	RM236
3	-4.46	-4.46	2	1	RM236
4	-4.31	-4.31	1	1	RM236
5	-4.31	-4.31	1	1	RM236
6	-3.91	-3.91	1	1	RM236
7	-3.43	-3.43	1	1	RM236

Number of multi-molecular conformational clusters found = 2, out of 30 runs.

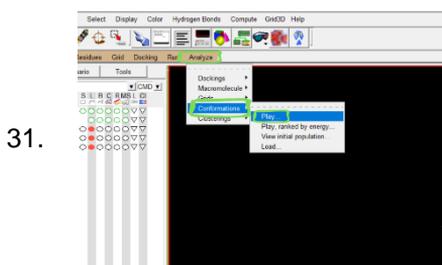
RPD TABLE

Rank	Sub Rank	Binding Energy	Cluster Size	Reference Rank	Group
1	1	-6.56	2	1	RM236
1	2	-4.46	1	1	RM236
1	3	-4.46	1	1	RM236
2	1	-4.31	1	1	RM236
2	2	-4.31	1	1	RM236
3	1	-4.31	1	1	RM236
4	1	-4.31	1	1	RM236
5	1	-3.91	1	1	RM236
6	1	-3.91	1	1	RM236
7	1	-3.43	1	1	RM236

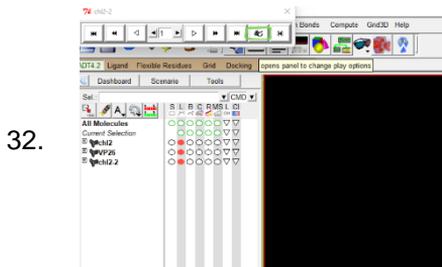
Pada notepad akan ada tabel binding affinity yang didapatkan.



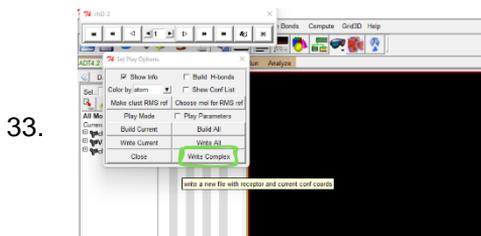
Kembali buka aplikasi autodock tools klik icon analyze pilih dockings dan open. Kemudian pilih file dengan format ".dlg"



Klik icon analyze pilih conformation dan play.



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

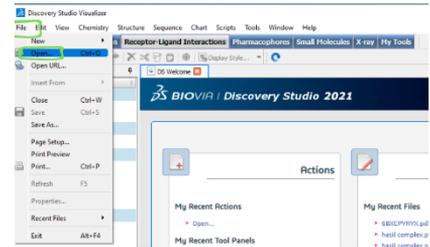
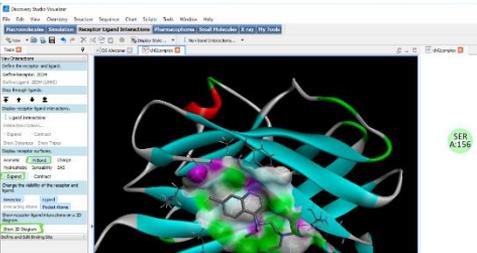
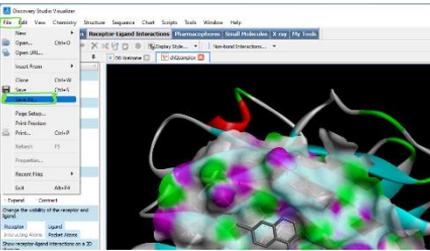


Kemudian akan muncul pop up box lain dan pilih write complex dan simpan pada folder dengan format ".pdb"

d. Visualisasi Interaksi Ligan Senyawa dengan Reseptor

Visualisasi analisis docking dilakukan menggunakan perangkat Biovia Discovery Studi 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 rendah *binding affinity* yang didapat maka menunjukkan kuatnya interaksi antara senyawa pada rumput laut *Eucheuma spinosum* yang berperan sebagai ligan dengan reseptor protein VP26 pada *white spot syndrome virus* (WSSV).