

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai Juli 2022. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI), Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dan tempat tinggal peneliti di Kecamatan Bojongloa Kaler, Kota Bandung, Jawa Barat melalui sistem dalam jaringan (daring) menggunakan *software* Molekuler *docking*.

#### 3.2. Alat dan Bahan

##### 3.2.1. Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian secara *in vitro* diantaranya neraca analitik Mettler Toledo ME204; *vacuum rotary evaporator* Buchi R3; *Fourier Transform Infra Red* Shimadzu 8400; Spektrofotometer UV-Vis mini Shimadzu 1240; sentrifugator Corona 80-2; *water bath* EYELA SB-24; *freezedryer*; mikropipet; plat 96-well, *hotplate* dan *stirrer* CIMAREC<sup>+</sup>; sonikator LABOCON.

Adapun alat yang digunakan untuk penelitian secara *in silico* diantaranya perangkat keras untuk sistem operasi berupa laptop dengan spesifikasi sebagai berikut: Prosesor 11<sup>th</sup> Gen Intel® Core™ i3-1115G4 @ 3,00 GHz (4CPUs), ~3,0 GHz, RAM 8GB, 475GB SSD, dengan sistem operasi Windows 10 *Home Single Language* 64-bit; Perangkat lunak Avogadro; Orca 4.2.1; AutoDock Tools 1.5.6; AutoDock Vina 1.1.2; OpenBabel GUI 2.3.1; PyMOL 2.5.2; BIOVIA *Discovery Studio Visualizer*; dan situs SwissADME.

##### 3.2.2. Bahan

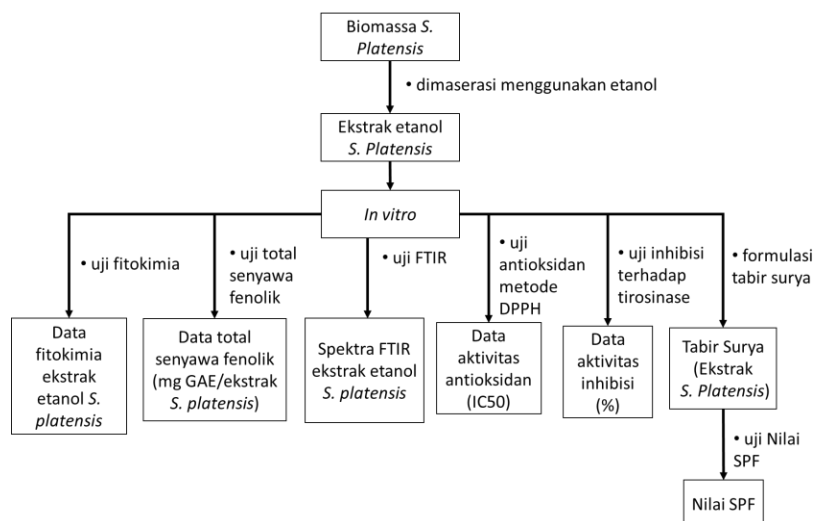
Bahan yang digunakan dalam studi *in vitro* pada penelitian ini adalah biomassa *Spirulina platensis* dari PT. Amorina Kirana Adiwarna; etanol (pro analis, Merck) yang diencerkan menjadi 80%; kertas saring Whatman No.1 (ukuran pori 11 µm); akuades; reagen Folin-ciocalteu (Merck); natrium karbonat (pro analis, Merck); asam galat (pro analis, May & Baker); reagen DPPH (Himedia); propilen glikol (Dow Chemical Pacific); gliserin; tirtanolamin (Petronas chemical); asam stearat (pro analis, Merck); setil alkohol (Croda chemical); *emulgide*; metil paraben

(Gilmart Organics); buffer fosfat 50 mM (pH 6,8); L-tirosin 2 mM; dimetil sulfoksida (DMSO); Tirosinase (333 unit/mL); HCl pekat (pro analis, Merck); reagen Mayer; kloroform (pro analis, Merck); H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat (pro analis, Merck); FeCl<sub>3</sub> (pro analis, Merck); NaOH (PHILIP HARRIS).

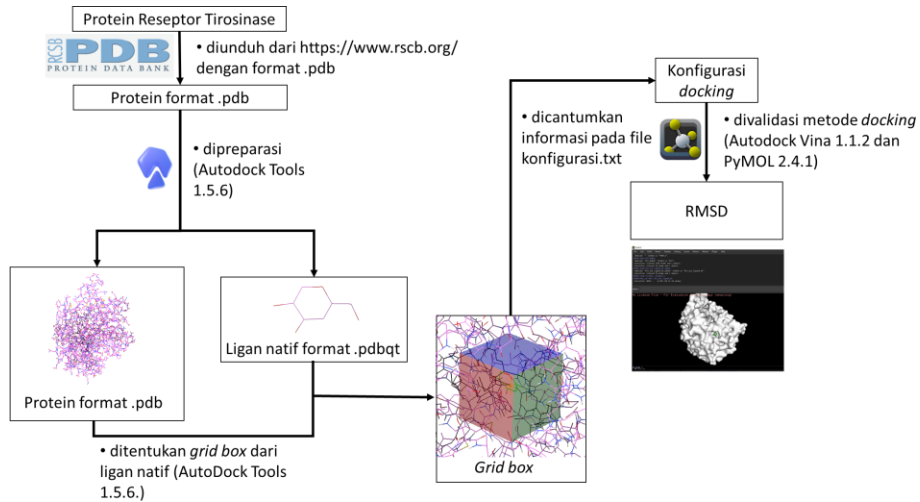
Adapun bahan yang digunakan untuk penelitian secara *in silico* meliputi struktur 3D senyawa fenolik pada *Spirulina platensis* yaitu asam galat (CID: 370); asam vanilat (CID: 8468); asam siringat (CID: 10742); asam protokatekuat (CID: 72); asam klorogenat (CID: 1794427); asam kafeat (CID: 689043); asam *p*-kumarat (CID: 637542); dan asam ferulat (CID: 445858) yang diperoleh dari *database* PubChem dengan format sdf. Adapun struktur 3D dari protein enzim tirosinase (PDB: 5M8M) diperoleh dari Protein Data Bank dengan format pdb.

### 3.3. Prosedur penelitian

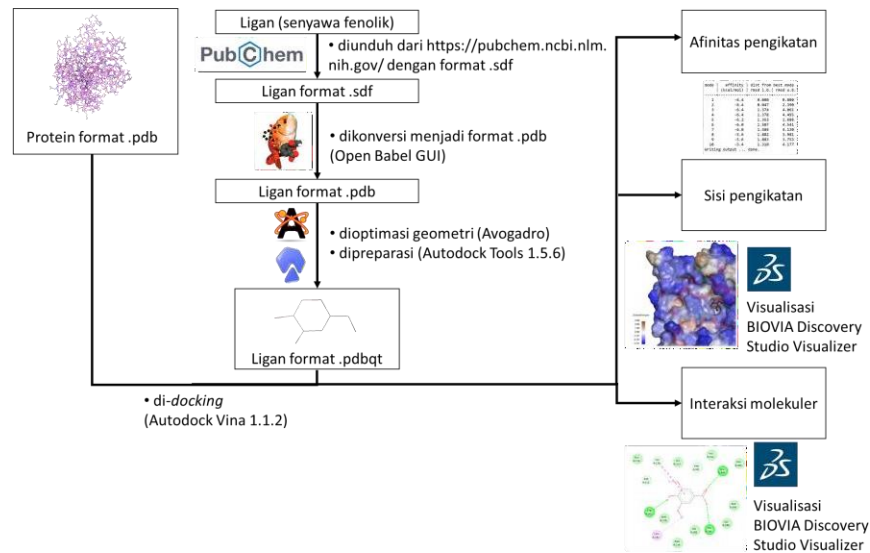
Diagram alir prosedur penelitian secara *in vitro* (**Gambar 3.1**) meliputi uji fitokimia, uji total senyawa fenolik, uji FTIR, uji antioksidan metode DPPH, uji inhibisi terhadap tirosinase, formulasi tabir surya, dan uji nilai SPF tabir surya hasil formulasi. Diagram alir prediksi *in silico* meliputi validasi metode (**Gambar 3.2**), proses *docking* (**Gambar 3.3**), uji farmakokinetik (**Gambar 3.4**), dan perhitungan energi HOMO LUMO (**Gambar 3.5**).



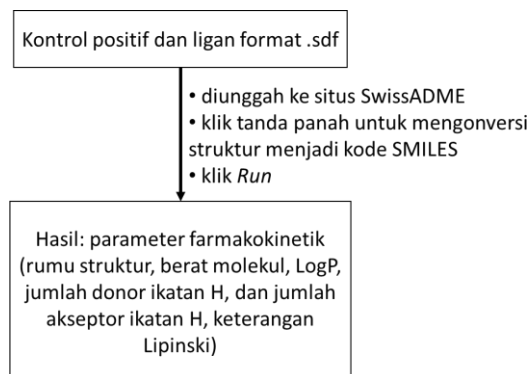
**Gambar 3.1.** Diagram alir penelitian *in vitro*.



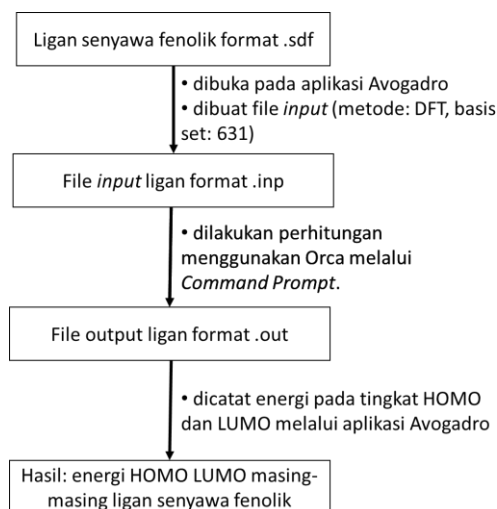
**Gambar 3.2.** Validasi metode *docking*.



**Gambar 3.3.** Proses *docking* ligan senyawa fenolik dengan tirosinase.



**Gambar 3.4.** Uji farmakokinetik kontrol positif dan ligan senyawa fenolik.



**Gambar 3.5.** Perhitungan energi HOMO LUMO ligan senyawa fenolik.

### 3.3.1. Prosedur penelitian secara *in vitro*

Pada studi *in vitro* terdapat beberapa tahapan yang meliputi preparasi sampel, preparasi ekstrak, uji fitokimia, kuantifikasi total kandungan fenolik, uji FTIR, uji aktivitas antioksidan, uji aktivitas inhibisi tirosinase, formulasi tabir surya, dan uji nilai SPF tabir surya hasil formulasi.

#### 3.3.1.1. Preparasi Sampel

Biomassa *Spirulina platensis* diperoleh dari PT. Amorina Kirana Adiwarna, Jl. Ciumbuleuit, No. 73 Bandung, 40141, Jawa Barat, Indonesia.

#### 3.3.1.2. Preparasi Ekstrak *Spirulina platensis*

Preparasi ekstrak *S. platensis* dilakukan melalui maserasi berdasarkan Rahim *et al.* (2021) dengan sedikit modifikasi. Ekstrak *S. platensis* dipreparasi dengan menimbang 30 g biomassa dan dilarutkan dalam 300 mL etanol 80% (grade, merk) selama 24 jam pada suhu ruang. Pelarut dievaporasi pada suhu 55°C menggunakan *vacuum rotary evaporator*. Ekstrak dalam bentuk pasta disimpan pada suhu 4°C kemudian dikeringkan dengan cara *freeze-drying*.

#### 3.3.1.3. Uji Fitokimia Ekstrak Etanol *Spirulina platensis*

Uji fitokimia ekstrak etanol *S. platensis* dengan merujuk pada metode Mane dan Chakraborty (2018). Pengujian fitokimia yang dilakukan meliputi golongan senyawa alkaloid, terpenoid, steroid, tanin, saponin, flavonoid, fenol, dan kumarin.

#### **3.3.1.3.1 Uji Alkaloid**

Uji alkaloid dilakukan dengan menambahkan 2 mL HCl pekat ke dalam 2 mL ekstrak *S. platensis*, dilanjut penambahan beberapa tetes reagen Mayer. Terbentuknya endapan putih mengindikasikan keberadaan alkaloid.

#### **3.3.1.3.2. Uji Terpenoid**

Uji terpenoid dilakukan dengan menambahkan 2 mL campuran kloroform dan asam sulfat pekat ke dalam 0,5 mL ekstrak *S. platensis*. Terbentuknya lapisan berwarna coklat kemerahan pada permukaan larutan menunjukkan keberadaan terpenoid.

#### **3.3.1.3.3. Uji Steroid**

Uji steroid dilakukan dengan menambahkan campuran 2 mL kloroform dan 1 mL asam sulfat ke dalam 0,5 mL ekstrak *S. platensis*. Terbentuknya cincin berwarna coklat mengindikasikan keberadaan steroid.

#### **3.3.1.3.4. Uji Tanin**

Uji tanin dilakukan dengan menambahkan 1 mL  $\text{FeCl}_3$  5% ke dalam 1 mL ekstrak *S. platensis*. Terbentuknya warna biru atau hijau kehitaman mengindikasikan keberadaan tanin.

#### **3.3.1.3.5. Uji Saponin**

Uji saponin dilakukan dengan menambahkan 2 mL akuades ke dalam 2 mL ekstrak *S. platensis*, dilanjut pengocokan dalam gelas ukur selama 15 menit. Terbentuknya 1 cm lapisan buih mengindikasikan keberadaan saponin.

#### **3.3.1.3.6. Uji Flavonoid**

Uji flavonoid dilakukan dengan menambahkan 1 mL NaOH 2 N ke dalam 2 mL ekstrak *S. platensis*. Perubahan warna larutan menjadi warna kuning mengindikasikan keberadaan flavonoid.

### 3.3.1.3.7. Uji Fenol

Uji keberadaan fenol dilakukan dengan menambahkan 2 mL akuades ke dalam 1 mL ekstrak *S. platensis*, dilanjut penambahan beberapa tetes 10% FeCl<sub>3</sub>. Perubahan warna larutan menjadi warna biru atau hijau mengindikasikan keberadaan fenol.

### 3.3.1.3.8. Uji Kumarin

Uji kumarin dilakukan dengan menambahkan 1 mL NaOH 50% (b/b) ke dalam 1 mL ekstrak *S. platensis*. Perubahan warna menjadi warna kuning mengindikasikan keberadaan kumarin.

### 3.3.1.4. Analisis FTIR Ekstrak *Spirulina platensis*

Analisis FTIR ekstrak *S. platensis* dilakukan berdasarkan metode Zghari *et al.* (2017). Sampel ekstrak *S. platensis* dipindai pada panjang gelombang 4000-400 cm<sup>-1</sup> dengan resolusi 4 cm<sup>-1</sup>. Pemindaian dilakukan sebanyak 16 kali dan puncak yang diperoleh merupakan rata-rata dari 16 kali pemindaian.

### 3.3.1.5. Kuantifikasi Total Kandungan Fenolik dalam Ekstrak *Spirulina platensis*

Kuantifikasi total kandungan fenolik ekstrak *S. platensis* dilakukan berdasarkan metode Chatatikun & Chiabchalard (2013) dan Maciel *et al.* (2011). Ekstrak *S. platensis* sebanyak 500 mg dilarutkan ke dalam akuades 50 mL, dengan demikian diperoleh konsentrasi ekstrak 10.000 ppm. Sebanyak 0,5 mL ekstrak ditambahkan 2,5 mL larutan folin 10%, dilanjut penambahan larutan natrium bikarbonat (20% b/v) sebanyak 2 mL. Selanjutnya campuran diinkubasi selama 5 menit pada *water bath* dengan suhu 50 °C. Absorbansi kompleks biru dievaluasi pada panjang gelombang 760 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Larutan standar asam galat dibuat dengan melarutkan asam galat ke dalam akuades dengan konsentrasi 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; dan 100 (mg/L). Akuades digunakan sebagai blanko. Total kandungan fenolik diekspresikan sebagai mg *gallic acid equivalent* (GAE) per gram ekstrak *S. platensis*.

### 3.3.1.6. Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak *Spirulina platensis*

Aktivitas antioksidan dari ekstrak *Spirulina platensis* diuji menggunakan metode DPPH dengan merujuk pada metode Molyneux P. (2004). Ekstrak *Spirulina platensis* ditimbang sebanyak 0,1 g kemudian dilarutkan dalam etanol sebanyak 10 mL dengan bantuan sonikator. Larutan ekstrak disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, filtrat diambil untuk pengujian antioksidan. Larutan stok sampel diencerkan menjadi 1000; 100; 50; 12,5; 6,25; dan 3,125 ppm dengan penambahan etanol dan DPPH. Larutan diinkubasi selama 30 menit dan diukur absorbansinya pada 517 nm.

### 3.3.1.7. Uji Aktivitas Inhibisi Tirosinase dari Ekstrak *Spirulina platensis*

Uji aktivitas anti tirosinase dilakukan secara spektrofotometri dengan ELISA *microplat reader* berdasarkan metode Dolorosa *et al.* (2019). Ekstrak etanol *S. platensis* ditimbang sebanyak 200 mg dan dilarutkan ke dalam DMSO sebanyak 100 mL, dengan demikian diperoleh konsentrasi larutan induk sebesar 2000 ppm. Larutan induk ekstrak diencerkan ke konsentrasi 1.000, 500, 250, 100, dan 10 ppm menggunakan buffer fosfat 50 mM (pH 6,8). Kemudian masing-masing larutan hasil pengenceran diambil sebanyak 70  $\mu$ L dan diteteskan ke *96-well plate*, dilanjutkan penambahan enzim tirosinase (333 unit/mL dalam buffer fosfat pH 6,8) sebanyak 30  $\mu$ L, dan substrat L-tirosin 2 mM sebanyak 10  $\mu$ L. Campuran ekstrak, enzim, dan substrat diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, kemudian diukur absorbansinya pada 475 nm untuk menentukan % inhibisi. Langkah pengujian yang sama diulang untuk kontrol positif asam kojat.

### 3.3.1.8. Formulasi Tabir Surya

Formulasi tabir surya dilakukan berdasarkan Mishra *et al.* (2014) dengan modifikasi. Bahan fasa air dan fasa minyak dipanaskan secara terpisah pada suhu 70–75°C sampai melebur. Kemudian fasa air dan fasa minyak dicampurkan sedikit demi sedikit dengan kecepatan pengaduk yang konstan. Ekstrak *S. platensis* ditambahkan ke dalam sediaan krim pada suhu  $\pm 40^\circ\text{C}$ . Formulasi tabir surya tercantum pada **Tabel 3.1**.

**Tabel 3.1.** Formulasi tabir surya.

Bahan	Krim A	Krim B	Krim C	Krim D
	(gram)			
<b>Fasa Air</b>				
Propilen glikol	0,25	0,25	0,25	0,25
Gliserin	0,24	0,24	0,24	0,24
TEA (trietanolamin)	0,05	0,05	0,05	0,05
Akuades	3,65	3,60	3,55	3,75
<b>Fasa Minyak</b>				
Asam stearat	0,2	0,2	0,2	0,2
Setil alkohol	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Emulgide</i>	0,4	0,4	0,4	0,4
<b>Bahan Tambahan</b>				
Metil paraben	0,01	0,01	0,01	0,01
Ekstrak etanol <i>S. platensis</i>	0,1	0,15	0,2	-

### 3.3.1.9. Uji Nilai SPF Tabir Surya hasil Formulasi

Pengujian nilai *Sun Protection Factor* (SPF) dilakukan melalui spektrofotometri UV-Vis berdasarkan Sayre *et al.* (1979). Sebanyak 400 mg sampel dilarutkan ke dalam etanol 25 mL sampai homogen. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 290–320 nm. Serapan rerata (Abs) ditentukan dengan interval 5 nm. Spektrum Efek Eritemal (EE) adalah jumlah minimal sinar UV yang dibutuhkan untuk menimbulkan eritema (kemerahan). Nilai  $EE \times I$  (**Tabel 3.2**) adalah konstanta yang nilainya sudah ditetapkan berdasarkan Sayre *et al.* (1979).

**Tabel 3.2.** Data nilai  $EE \times I$  pada rentang panjang gelombang 290–320 nm.

Panjang Gelombang ( $\lambda$ ) nm	$EE \times I$
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1,0000



Data yang diperoleh diolah menggunakan persamaan Mansur (Zarkogianni & Nikolaidis, 2016) yang tertera di bawah ini:

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times abs(\lambda)$$

CF: Faktor koreksi

EE: Spektrum efek eritemal

I: Spektrum intensitas UVB (290-320 nm)

Abs: Absorbansi sampel

### 3.3.2. Prosedur penelitian secara *in silico*

Penelitian secara *in silico* dilakukan dengan menggunakan simulasi molekuler *docking*. Masing-masing protein diuji aktivitas pembentukan ikatan dengan tirosinase. Pada studi *in silico* terdapat beberapa tahapan yang meliputi preparasi protein tirosinase, preparasi ligan, perhitungan dan validasi molekuler *docking*, dan visualisasi molekuler *docking*.

#### 3.3.2.1. Preparasi Protein Tirosinase

Protein yang digunakan pada uji *in silico* adalah enzim tirosinase (5M8M) yang diunduh strukturnya (3D) dari Protein Data Bank dengan format .pdb. Struktur protein yang diunduh masih mengandung pelarut (air) dan residu lainnya. Preparasi protein dilakukan menggunakan aplikasi AutoDock Tools 1.5.6 dengan menghilangkan pelarut (semua molekul air), kristal pelarut, dan ligan natif. Langkah tersebut dilakukan agar tidak mengganggu proses docking, sehingga interaksi hanya terjadi pada ligan (senyawa fenolik) dan protein (tirosinase). Selanjutnya, salah satu rantai protein dipilih dan ligan *native* yang terikat pada protein dipisahkan dari molekul protein. Hasil preparasi protein disimpan dalam format .pdb. Hidrogen pada file .pdb hasil preparasi sudah dihilangkan, sehingga dilakukan penambahan atom hidrogen polar dan *Gasteiger charge* pada struktur (Khedidja *et al.*, 2018). Penambahan atom hidrogen polar dilakukan untuk menyesuaikan suasana docking mendekati pH 7 (suasana pH dalam tubuh) dan

interaksi ikatan hidrogen pada struktur protein dengan ligan dapat diamati. Penambahan *Gasteiger charge* dilakukan untuk menyesuaikan dengan suasana penambatan molekul, sehingga perhitungan yang lebih akurat dapat diperoleh (Bikadi & Hazai, 2009). Kemudian, *grid box* diatur untuk sisi pengikatan pada protein dengan ligan. Pengaturan tersebut disimpan dalam format .txt.

### 3.3.2.2. Preparasi Ligan (Senyawa Fenolik)

Struktur 3D dari asam galat (CID: 370); asam vanilat (CID: 8468); asam siringat (CID: 10742); asam protokatekuat (CID: 72); asam klorogenat (CID: 1794427); asam kafeat (CID: 689043); asam *p*-kumarat (CID: 637542); dan asam ferulat (CID: 445858) diperoleh dari database PubChem dengan format sdf. Struktur tersebut diubah formatnya menjadi pdb menggunakan aplikasi OpenBabel GUI 2.3.1. Tahapan selanjutnya yaitu optimasi geometri struktur ligan menggunakan perangkat lunak Avogadro. Langkah tersebut dilakukan untuk memperoleh struktur molekul yang paling stabil dan memiliki energi potensial yang lebih rendah. Tahapan optimasi geometri dilakukan dengan cara *Extensions > Optimize Geometry > kembali ke Extensions > Molecular Mechanics > Setup Force Field > pilih MMFF94 sebagai Force Field > Number of Steps* diatur menjadi 50 > klik *OK > kembali ke Extensions > Conformer Search > Genetic algorithm search > Number of conformers* diatur menjadi 200 > klik *OK*. Kemudian, ligan senyawa fenolik dipreparasi menggunakan perangkat lunak AutoDock Tools 1.5.6. Tahapan preparasi ligan meliputi pengaturan torsi yang diatur dengan cara *Ligand > Torsion Tree > Choose Torsion dan Ligand > Torsion Tree > Set Number of Torsion*, selanjutnya disimpan dengan format .pdbqt melalui *Ligand > Output > Save as PDBQT*.

### 3.3.2.3. Perhitungan dan Validasi Molekuler Docking

Validasi metode *docking* dilakukan menggunakan metode *pose selection* yaitu ligan yang telah diketahui orientasi dan konformasi pada sisi aktif reseptor protein di-*docking* kembali. Validasi metode *docking* dilakukan untuk memverifikasi reliabilitas simulasi docking (Lin *et al.*, 2014). Senyawa fenolik dan peptida yang telah dipreparasi dibuat *file config* untuk simulasi molekuler *docking*.

Analisis *docking* molekuler dilakukan menggunakan AutoDock Vina pada AutoDock Tools dengan *Command prompt*: `vina -config conf.txt -log log.txt`. Hasil *docking* akan diperoleh dalam bentuk prediksi struktur dan nilai energi gibbs (-). Afinitas pengikatan molekuler dikatakan baik apabila energi bebas gibbs senyawa fenolik dan peptida lebih rendah atau memiliki nilai afinitas pengikatan yang besar (-) (Trott & Olson, 2009) jika dibandingkan dengan energi bebas gibbs inhibitor komersial. Hasil simulasi *docking* dikatakan valid apabila memenuhi nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) kurang dari sama dengan 2 Å (Trott & Olson, 2009). Hal tersebut menandakan bahwa semakin kecil nilai RMSD, maka semakin dekat posisi ligan *native* hasil *docking* dengan ligan *native* hasil kristalografi. Nilai RMSD diperoleh dari perhitungan menggunakan perangkat lunak PyMOL.

Posisi situs penambatan (*grid box*) pada proses *redocking* diatur sesuai dengan ukuran dan posisi inhibitor dengan tahapan *Grid > Set Map Types > Choose Ligand*, pilih *Grid Box > Center > Center on Ligand Spacing Angstrom = 1*. Ukuran *grid box* tidak lebih kecil ataupun terlalu besar dari ukuran ligan. Konfigurasi molekuler *docking* dibuat dan disimpan pada *note* dengan format .txt. Koordinat *grid box* untuk simulasi *docking* ligan uji berdasarkan hasil validasi metode ditunjukkan pada **Tabel 3.3**.

**Tabel 3.3.** Koordinat *grid box* untuk simulasi molekuler *docking*

Koordinat (Å)			Ukuran (Å)			RMSD (Å)
X	Y	Z	X	Y	Z	
-31,471	-3,610	-24,849	8	8	8	2

#### 3.3.2.4. Visualisasi Molekuler *Docking*

Visualisasi molekuler yang terbentuk dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak PyMoL dan BIOVIA *Discovery Studio Visualizer*. Visualisasi yang terbentuk dapat diamati dengan mengklik *surface* dan ligan melalui *ball and stick*. Gambar yang terbentuk disimpan dalam bentuk format .PNG. Posisi interaksi ligan dengan enzim diamati, sehingga letak dan interaksinya dapat dianalisis. Selain itu, pengamatan interaksi antara enzim dengan ligan dapat divisualisasikan dalam bentuk 2D maupun 3D pada BIOVIA *Discovery Studio Visualizer*. Interaksi yang teramati meliputi gaya Van der Waals, Ikatan hidrogen, Interaksi hidrofobik, serta

interaksi lain yang mungkin terbentuk seperti interaksi elektron bebas Pi (Guedes *et al.*, 2011). **Tabel 3.4** menunjukkan kategori ikatan hidrogen panjang ikatan yang terbentuk.

**Tabel 3.4.** Klasifikasi jarak ikatan hidrogen (Guedes *et al.*, 2011).

No.	Jarak (Å)	Keterangan
1.	2,2-2,5	Kuat
2.	2,5-3,2	Moderat
3.	3,2-4,0	Lemah

### 3.3.2.5. Analisis Farmakokinetik Ligan Senyawa Fenolik dari Ekstrak Etanol

#### *Spirulina platensis*

Analisis farmakokinetik ligan senyawa fenolik dari ekstrak etanol *Spirulina platensis* dilakukan berdasarkan metode Julia & Komari (2022). Analisis farmakokinetik dilakukan melalui situs SwissADME dengan tahapan *Import > Choose File >* unggah ligan senyawa fenolik dengan format *.sdf >* klik tanda panah untuk mengonversi struktur menjadi kode SMILES *>* klik *Run >* Catat parameter farmakokinetik meliputi rumus struktur, berat molekul, jumlah donor ikatan H, jumlah akseptor ikatan H, LogP, dan keterangan Lipinski.

### 3.3.2.6. Penentuan Energi HOMO dan LUMO

Penentuan energi HOMO dan LUMO ligan senyawa fenolik diawali dengan pembuatan file *input* pada aplikasi Avogadro melalui tahapan *File > Open >* pilih struktur ligan dalam format *.sdf > Extensions > Orca > Generate orca input >* pilih *Method DFT >* atur basis set menjadi 631 *> generate >* beri nama dengan format *nama\_senyawa >* klik OK. Selanjutnya, lakukan perhitungan pada Orca melalui *Command Prompt* dan beri nama *output* *nama\_senyawa.out*. Hasil perhitungan energi HOMO dan LUMO diperoleh dengan membuka file *nama\_senyawa.out* pada Avogadro dengan tahapan *Open >* pilih file *nama\_senyawa.out >* catat energi HOMO dan LUMO.