

## Pengaruh Fermentasi *Gracilaria verrucosa* dengan Penambahan Starter *Lactobacillus plantarum* pada Profil Metabolit dan Aktivitas Biologisnya

Pola Risda Aswita Silitonga<sup>1,2</sup>, Wilis Ari Setyati<sup>1</sup>, AB Susanto<sup>1</sup>, Mada Triandala Sibero<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

<sup>2</sup>Laboratorium Natural Product, UPT Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro  
Jl. Prof. H. Soedarto S.H, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50275 Indonesia

\*Corresponding author, e-mail: madatriandalasibero@lecturer.undip.ac.id

**ABSTRAK:** *Gracilaria verrucosa* merupakan salah satu spesies penting Rhodophyta yang telah banyak dimanfaatkan dalam berbagai industri. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *G. verrucosa* memiliki aktivitas biologis sebagai antioksidan, namun laporan mengenai potensi sebagai antibakteri dan antikanker masih sedikit dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh fermentasi menggunakan *L. plantarum* terhadap aktivitas antibakteri, toksisitas, dan karakteristik metabolit ekstrak rumput laut *G. verrucosa* dengan waktu fermentasi yang berbeda. Metode dalam penelitian ini adalah preparasi, fermentasi, ekstraksi, uji antibakteri, uji toksisitas, dan karakterisasi metabolit. Uji aktivitas antibakteri dengan metode *agar well diffusion* terhadap bakteri *foodborne disease* sedangkan uji toksisitas dengan metode BSLT. Karakterisasi metabolit dilakukan menggunakan KLT dengan eluent kloroform: etil asetat (9:1), serta visualisasi metabolit dengan reagen Dragendorff, dan Ninhidrin. Hasil analisis KLT menunjukkan ekstrak *G. verrucosa* yang difermentasi menggunakan *L. plantarum* menghasilkan senyawa yang diduga senyawa alkaloid dan asam amino bebas. Uji aktivitas antibakteri ekstrak *G. verrucosa* menunjukkan hasil negatif dan tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri MDR *E. coli* dan *S. typhi*. Analisis toksisitas menunjukkan bahwa setiap ekstrak rumput laut dikategorikan toksik terhadap larva *A. salina* L. dengan nilai LC<sub>50</sub> ETA (73,26 µg/mL), EDA (218,09 µg/mL), Fr 24 (316,69 µg/mL), Fr 48 (316,69 µg/mL), dan Fr 72 (316,69 µg/mL). Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa fermentasi menggunakan *L. plantarum* tidak dapat meningkatkan aktivitas biologis rumput laut *G. verrucosa*.

**Kata kunci:** *G. verrucosa*; *L. plantarum*; Metabolit; Antibakteri; Toksisitas

### **Effect of *Gracilaria verrucosa* Fermentation with the Addition of Starter *Lactobacillus plantarum* on Metabolite Profiles and Biological Activities**

**ABSTRACT:** *Gracilaria verrucosa* is one of the most important Rhodophyta species that has been widely used in various industries. The results of previous studies showed that *G. verrucosa* has a weak antioxidant activity, however, reports on its potential as antibacterial and anticancer are still under explored. This study aimed to determine the effect of fermentation using *L. plantarum* in *G. verrucosa*'s metabolites and biological activities with different fermentation times. This study consisted of preparation, fermentation, extraction, antibacterial test, toxicity test, and metabolite characterization. The antibacterial activity assay was conducted by agar well diffusion method against foodborne disease bacteria while toxicity test using BSLT method. Metabolite characterization was carried out using TLC with chloroform : ethyl acetate (9:1) as the eluent, spot visualization was conducted by the addition of Dragendorff, and Ninhydrin reagents. The result of TLC analysis showed that *G. verrucosa* produced alkaloids and amino acids derivative compounds after fermentation. *G. verrucosa* extracts had no antibacterial activity against MDR *E. coli* and *S. typhi*. Toxicity assay showed that each seaweed extract was categorized as toxic to *A. salina* L. larvae with an LC<sub>50</sub> value of ETA (73.26 ug/mL), EDA (218.09 ug/mL), Fr 24 (316.69 ug/mL), Fr 48 (316.69 ug/mL), and Fr 72 (316.69 ug/mL). Based on the results of the study showed that fermentation using *L. plantarum* could not elevate the antimicrobial and toxicity of *G. verrucosa*.

**Keywords:** *G. verrucosa*; *L. plantarum*; Metabolite; Antibacterial; Toxicity

## PENDAHULUAN

Rumput laut merah (*Gracilaria verrucosa*) kaya akan kandungan metabolit primer dan sekunder dibandingkan jenis rumput laut hijau dan coklat, seperti 75% senyawa alkaloid dan 89% senyawa poliketida ditemukan di Rhodophyta (Leal *et al.*, 2013). *Gracilaria verrucosa* merupakan salah satu spesies penting Rhodophyta penghasil agar - agar yang telah banyak dimanfaatkan dalam berbagai industri. Menurut Arunkumar *et al.* (2014) bahwa *G. verrucosa* memiliki kandungan klorofil total serta pigmen aksesoris yang lebih tinggi dibandingkan spesies Rhodophyta lainnya. *G. verrucosa* memiliki kandungan senyawa bioaktif alkaloid, fenolik, tanin, flavonoid (Maftuch *et al.*, 2016), saponin (Arsianti *et al.*, 2018). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa *G. verrucosa* memiliki aktivitas biologis seperti antioksidan, namun laporan mengenai potensinya sebagai antibakteri masih sedikit dilaporkan. Hal ini diduga karena rumput laut ini memang tidak terlalu potensial sebagai agen antibakteri maupun antikanker.

Penelitian Prasad *et al.* (2012) melaporkan bahwa ekstrak kasar *G. verrucosa* memberikan hasil negatif pada bakteri patogen makanan *Salmonella typhi*. Sebelumnya, Widodo *et al.* (2019) juga menyebutkan bahwa rumput laut *G. verrucosa* asal BBPBAP Jepara tidak memiliki aktivitas antibakteri melawan bakteri patogen manusia. Lebih lagi, kajian toksisitas dari rumput laut ini belum banyak dilaporkan. Salah satu metode yang dapat dilakukan untuk meningkatkan potensi aktivitas biologi ialah melalui fermentasi. Fermentasi merupakan proses perubahan secara biokimiawi pada bahan pangan yang melibatkan aktivitas mikroorganisme dan aktivitas enzim oleh mikroorganisme. Pada beberapa produk fermentasi dilaporkan adanya peningkatan kandungan vitamin, antioksidan dan senyawa lainnya yang bermanfaat bagi kesehatan manusia (Setiarto, 2020).

Bakteri asam laktat telah banyak digunakan dalam fermentasi makanan karena sifatnya yang tidak berbahaya. Salah satu spesies BAL yang menjanjikan adalah *Lactobacillus plantarum* atau yang baru ini disebut *Lactiplantibacillus plantarum* berdasarkan publikasi Zheng *et al.* (2020). Spesies *L. plantarum* telah diakui aman "Generally Recognized As Safe" (GRAS) oleh FDA dan telah memenuhi status praduga keselamatan yang memenuhi syarat (QPS) (Behera *et al.*, 2018). Penelitian Ambarsari *et al.* (2018) melaporkan bahwa fermentasi dengan starter *L. plantarum* meningkatkan aktivitas antioksidan dan total fenol rumput laut *Ulva lactuca*. Rianingsih dan Sumardianto (2020) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa proses fermentasi menggunakan *L. plantarum* dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dari rumput laut *Sargassum* sp. meski tidak secara signifikan. Chye *et al.* (2018) mengungkapkan bahwa *Gracilaria fisheri* yang difermentasi menggunakan *L. plantarum* memiliki aktivitas antikanker dan aktivirus. Rendahnya aktivitas antibakteri dan belum banyaknya laporan toksisitas *G. verrucosa* serta adanya potensi peningkatan aktivitas biologis melalui fermentasi menggunakan *L. plantarum* sehingga penelitian ini sangat penting untuk dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh fermentasi menggunakan *L. plantarum* terhadap aktivitas antibakteri dan toksisitas serta pengaruh fermentasi menggunakan *L. plantarum* terhadap karakterisasi metabolit ekstrak rumput laut *G. verrucosa* dengan waktu fermentasi yang berbeda.

## MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Natural Product, UPT Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro pada bulan Februari – Agustus 2021. Isolat *Lactobacillus plantarum* (Murwani *et al.*, 2021) diremajakan dalam 10 ml media MRS Broth (Himedia) steril dalam tabung reaksi. Biakan bakteri kemudian diinkubasi pada inkubator shaker dengan suhu 37°C dan 150 rpm selama 24 jam (Irwanto *et al.*, 2018).

Rumput laut *G. verrucosa* diperoleh dari BBPBAP (Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau) Jepara. Sampel rumput laut diambil dengan keadaan segar dengan tujuan agar senyawa metabolit yang terkandung pada sampel tidak mengalami perubahan. Rumput laut segar selanjutnya dicuci dengan air tawar mengalir untuk membersihkan sampel dari epifit, sedimen, dan pengotor lainnya. Rumput laut kemudian ditiriskan.

Metode fermentasi rumput laut mengacu pada Wandansari *et al.* (2013) dengan beberapa modifikasi. Sampel rumput laut *G. verrucosa* dipotong kecil-kecil hingga ukuran 0,5 cm dan selanjutnya diblender. Rumput laut halus diambil sebanyak 40 gram dan ditambahkan 100 ml aquades, 5 % glukosa, 0,5% yeast extract, dan 0,5% peptone. Selanjutnya disterilisasi pada 121 °C selama 30 menit. Setelah sterilisasi selesai, sampel diinokulasikan 10% inokulum. Sampel inkubasi pada suhu 37°C dan 150 rpm. Pada 24 jam, 48 jam dan 72 jam dilakukan pengamatan fermentasi meliputi pengukuran pH dan total bakteri laktat pada awal dan akhir fermentasi.

Sebanyak 5 sampel rumput laut *G. verrucosa* yang digunakan terdiri dari 200 gram sampel rumput laut segar, 200 gram sampel rumput laut autoklaf, dan 3 sampel hasil fermentasi. Ekstraksi dilakukan dengan metode Marraskuranto *et al.* (2021) yang telah dimodifikasi, metode maserasi menggunakan pelarut tunggal yaitu etil asetat. Penggunaan pelarut etil asetat karena pelarut yang ini tidak akan melarutkan garam, mudah menguap, dan bersifat semipolar dengan toksisitas rendah. Maserasi dilakukan dengan menambahkan pelarut etil asetat kedalam masing-masing erlenmeyer sampel dengan rasio berat sampel terhadap pelarut 1:2 (b/v) selanjutnya erlenmeyer diletakkan di atas *orbital shaker* 100 rpm agar proses maserasi semakin cepat dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Hasil penyaringan filtrat atau ekstrak larutan maserasi selanjutnya dilakukan pemekatan sampel menggunakan *rotary evaporator*. Selanjutnya ekstrak kasar (*crude extract*) ditimbang massanya (mg) dan dilapisi menggunakan pelapis aluminium foil kemudian disimpan dalam *cold storage* -20°C.

Metode Uji KLT sebagai berikut ekstrak kasar rumput laut ditotolkan pada Silica Gel (Merck, F254) sebagai fase diam dan fase gerak yang digunakan kombinasi pelarut kloroform dan etil asetat dengan perbandingan 9:1 (v/v). Noda pada plat silika diobservasi di bawah lampu UV 366 nm dan nilai  $R_f$  dihitung. Plat KLT disemprot dengan pereaksi *Dragendorff* (Ahmad *et al.*, 2017) dan *Ninhidrin* (Sinhababu, 2013) dan diamati pada sinar tampak.

Untuk mengetahui potensi antibakteri ekstrak rumput laut untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen Foodborne Disease MDR, aktivitas antibakteri dari setiap ekstrak diuji dilakukan terhadap bakteri Foodborne Disease MDR *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* yang diperoleh dari Laboratorium Natural Product. Metode uji antibakteri mengacu pada Balouiri *et al.* (2016) dengan beberapa modifikasi. Kultur patogen diremajakan ke dalam Nutrien Agar (NA, HiMedia) diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sebelum pengujian dilakukan. Agar well diffusion adalah metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri. Kelima ekstrak kasar rumput laut masing - masing diencerkan dalam DMSO pada konsentrasi 2000 ug/mL, Amoxicilin 100 ug/mL digunakan sebagai kontrol positif, dan DMSO tanpa ekstrak sebagai kontrol negatif. Setiap bakteri patogen usia 24 jam diencerkan menjadi 0,5 McFarland dalam Mueller Hinton Broth (MHB, HiMedia). Pengenceran bakteri MDR diinokulasikan pada Mueller Hinton Agar (MHA, HiMedia). Media uji MHA dilubangi menggunakan *borer*. Setiap ekstrak rumput laut konsentrasi 2000 ug/mL, Amoxicilin, dan DMSO sebanyak 40 uL diinokulasikan pada media uji. Inkubasi dilakukan pada 37°C selama 24 jam. Adanya zona bening menunjukkan aktivitas antibakteri dari ekstrak rumput laut negatif (Sibero *et al.*, 2018).

Uji toksisitas ekstrak rumput laut dilakukan dengan menggunakan metode BSLT (Meyer *et al.*, 1982). Tahapan uji toksisitas meliputi penetasan larva udang, penyiapan larutan uji, dan uji toksisitas ekstrak. Metode tahap penyiapan larva udang dan larutan uji mengacu pada Puspitasari *et al.* (2018) dan metode tahap uji toksisitas mengacu pada Puspasari *et al.* (2020) dengan beberapa modifikasi. Sebanyak 1 gram kista udang *Artemia salina* L. direndam dalam air laut 100 mL dan diberikan penerangan lampu 20 Watt serta diaerasi selama 48 jam. Setiap ekstrak kasar rumput laut *G. verrucosa* dilarutkan dalam pelarut metanol dan didapat larutan uji dengan konsentrasi 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, dan 62,5 µg/mL. Setiap ekstrak masing-masing konsentrasi diambil 5 ml dan dimasukkan ke dalam vial 10 mL kemudian dievaporasi untuk menghilangkan pelarutnya dan selanjutnya ditambahkan dengan 1% DMSO.

Larutan uji dengan konsentrasi 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, dan 62,5 µg/mL yang telah dilarutkan menggunakan 1% DMSO selanjutnya ditambahkan 10 ekor larva *A. salina* L. yang berumur 48 jam (nauplius) dan air laut hingga mencapai volume 5 mL. Setiap konsentrasi dilakukan 3 replikasi untuk setiap konsentrasi. Setiap vial diinkubasi selama 24 jam

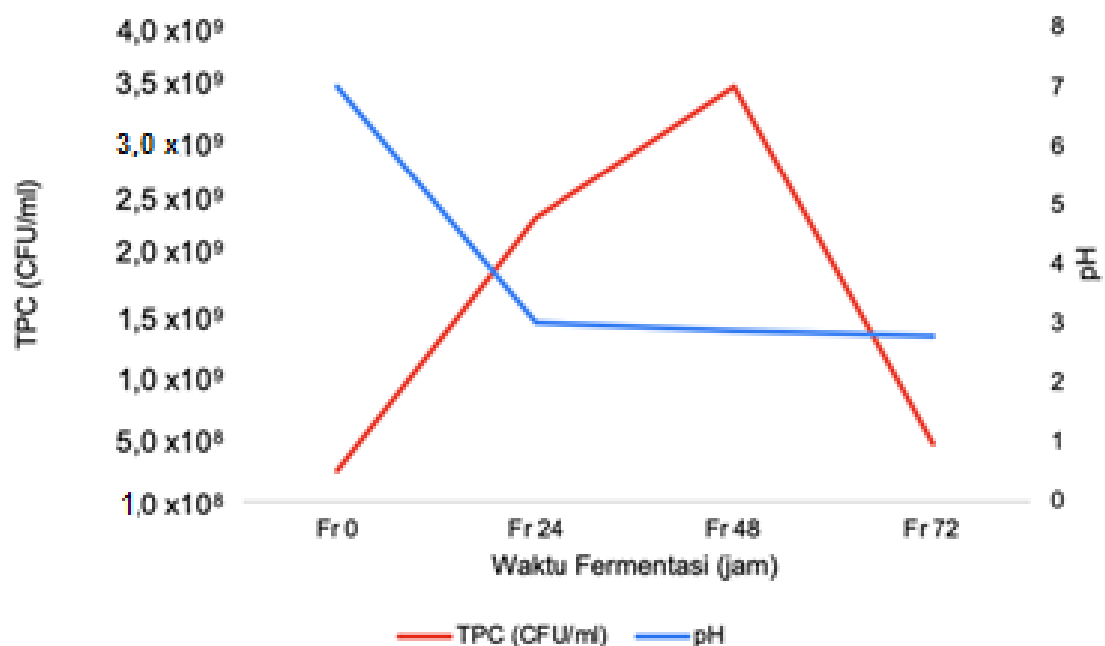
pada suhu ruang (26 °C) dibawah penerangan lampu 20 Watt. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi 24 jam dan dihitung jumlah larva *A. salina* L. yang mati/tidak bergerak selama 10 detik observasi. Data hasil pengamatan toksisitas diolah dan dianalisis dengan analisis probit menggunakan Ms. *Excel* untuk mencari regresi linearnya berdasarkan grafik garis.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### **Total Plate Count dan Perubahan pH Fermentasi *G. verrucosa***

Jumlah total BAL dan pH pada awal dan akhir fermentasi sampel yang difermentasi selama 24, 48, 72 jam dihitung untuk mengetahui kurva pertumbuhan pada proses fermentasi. Penambahan starter *Lactobacillus plantarum* pada sampel rumput laut *Gracilaria verrucosa* dan lama waktu fermentasi berpengaruh terhadap jumlah bakteri asam laktat dan pH akhir produk fermentasi rumput laut. Hasil pengukuran total bakteri dan pH pada awal dan akhir fermentasi ditunjukkan pada Gambar 1.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah sel bakteri mengalami peningkatan selama proses fermentasi Fr 0 sampai Fr 48 jam dan selanjutnya mengalami penurunan/ kematian. Pada awal fermentasi Fr 0 tercatat jumlah bakteri  $2,7 \times 10^8$  CFU/mL, setelah fermentasi Fr 24 jumlah bakteri mengalami peningkatan menjadi  $2,4 \times 10^9$  CFU/mL selanjutnya fermentasi Fr 48 jumlah bakteri menjadi  $3,5 \times 10^9$  CFU/mL dan jumlah bakteri mengalami penurunan setelah fermentasi Fr 72 menjadi  $4,9 \times 10^8$  CFU/mL. Penambahan jumlah bakteri pada waktu inkubasi menandakan pertumbuhan pada fase logaritmik (pertumbuhan) pada Fr 0 – Fr 24 jam, fase stasioner pada Fr 24 – Fr 48, dan selanjutnya memasuki fase kematian pada Fr 48 - Fr 72 jam. Pada akhir fermentasi, jumlah bakteri mengalami penurunan diduga bakteri berada pada fase kematian yang dapat disebabkan oleh kadar nutrisi berkurang atau akumulasi produk asam yang mengganggu proses pembelahan sel (Mangalisu *et al.*, 2015). Menurut Ambarsari *et al.* (2017) bahwa pertumbuhan bakteri asam laktat meningkat dengan bertambahnya waktu inkubasi, optimalisasi suhu, kelembaban, cahaya, pH, dan nutrisi. Fermentasi yang dilakukan pada suhu 37 °C mendukung pertumbuhan bakteri.



**Gambar 1.** Grafik *Total Plate Count* Bakteri dan pH Rumput Laut Fermentasi Dengan Waktu Fermentasi Berbeda

Berdasarkan Gambar 1 menunjukkan bahwa nilai pH semua perlakuan fermentasi tercatat mengalami penurunan. Nilai pH tercatat terus menurun dari Fr 0 jam sebesar 7,01 kemudian turun menjadi 3 pada Fr 24 jam, menurun menjadi 2,9 pada Fr 48 jam, dan semakin asam 2,77 pada Fr 72 jam. Menurut Alhaag *et al.* (2019) mengatakan bahwa penurunan pH terjadi karena adanya aktivitas mikroorganisme menghasilkan asam laktat dari hasil metabolisme, asam laktat yang terbentuk terakumulasi dan menyebabkan nilai pH menjadi menurun selama proses fermentasi. *L. plantarum* memiliki kemampuan untuk meningkatkan produksi asam laktat dan menurunkan pH lingkungan fermentasi dengan cara mengubah karbohidrat/gula dalam bahan/ rumput laut menjadi asam laktat (metabolit primer) (Rianingsih *et al.*, 2021). *L. plantarum* dapat mencerna senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana dengan hasil akhir berupa asam laktat (Ambarsari *et al.*, 2017).

Penurunan pH pada fermentasi yang dilakukan berkaitan dengan reaksi fermentasi yang terjadi. Proses fermentasi asam laktat diawali dengan glikolisis yang pemecahan karbohidrat menjadi 2 molekul asam piruvat. Pada glikolisis  $NAD^+$  direduksi menjadi NADH dan ion hidrogen ( $H^+$ ) (Elving *et al.*, 1982). Ketika oksigen tidak tersedia, asam piruvat akan direduksi menjadi asam laktat dan reoksidasi NADH menjadi  $NAD^+$  untuk digunakan kembali dalam glikolisis. Semakin banyak asam laktat yang dihasilkan di media, ion hidrogen ( $H^+$ ) yang terbentuk dan terakumulasi juga semakin banyak, hal tersebut diduga menyebabkan penurunan pH media fermentasi.

### Profil Metabolit Ekstrak *G. verrucosa*

Karakterisasi senyawa metabolit pada KLT dilakukan dengan penyemprotan reagen Dragendorff dan Ninhidrin pada plat KLT. Penyemprotan reagen Dragendorff dilakukan untuk mengetahui keberadaan alkaloid pada sampel (Raal *et al.*, 2020). Plat KLT yang disemprotkan dengan Dragendorff akan menunjukkan bercak noda kuning ke oranye, merah hingga coklat dengan latar belakang kuning pada pengamatan dengan sinar tampak. Uji Ninhidrin dilakukan untuk mendeteksi komponen asam amino pada ekstrak. Hasil positif plat KLT yang disemprotkan dengan Ninhidrin akan muncul bercak noda berwarna merah muda atau ungu pada pengamatan dengan sinar tampak.

Analisis metabolit menggunakan KLT terhadap ekstrak rumput laut segar, autoklaf, dan fermentasi menggunakan eluent kloroform: etil asetat (9:1) di bawah sinar UV 366 nm menunjukkan bahwa proses fermentasi menghasilkan metabolit yang berbeda dengan rumput laut segar dan autoklaf. Pemisahan senyawa dengan KLT pada ekstrak rumput laut yang diamati di bawah sinar UV 366 nm menghasilkan bercak noda senyawa dengan nilai  $R_f$  berbeda.

Berdasarkan Tabel 2 menunjukkan bahwa ekstrak rumput laut segar dan fermentasi memiliki bercak noda berwarna kuning setelah disemprotkan dengan reagen *Dragendorff*. Warna kuning yang muncul pada plat KLT yang disemprotkan dengan reagen *Dragendorff* diduga adalah senyawa alkaloid (Ahmad *et al.*, 2017). Noda kuning pada ekstrak rumput laut segar (ETA) diduga senyawa alkaloid, karena rumput laut *G. verrucosa* mengandung metabolit sekunder alkaloid

**Tabel 1.** Nilai  $R_f$  ekstrak kasar *G. verrucosa* menggunakan eluen kloroform: etil asetat= 9:1 pengamatan di sinar UV.

Ekstrak	<i>Retention (R<sub>f</sub>) Value</i>										
	0,07	0,11	0,13	0,17	0,39	0,40	0,43	0,47	0,67	0,76	0,85
ETA	×	×	×	×	✓	×	×	✓	×	✓	✓
EDA	×	×	×	✓	×	×	✓	×	×	✓	✓
Fr 24	✓	×	×	×	×	×	×	×	×	✓	✓
Fr 48	×	×	✓	×	×	×	×	×	×	✓	✓
Fr 72	×	✓	×	✓	×	✓	×	×	✓	✓	✓

Keterangan: ETA: Ekstrak Tanpa Autoklaf; EDA: Ekstrak Dengan Autoklaf; Fr 24: Ekstrak Fermentasi 24 jam; Fr 48: Ekstrak Fermentasi 48 jam; Fr 72: Ekstrak Fermentasi 72 jam; × : tidak ada; ✓: ada.

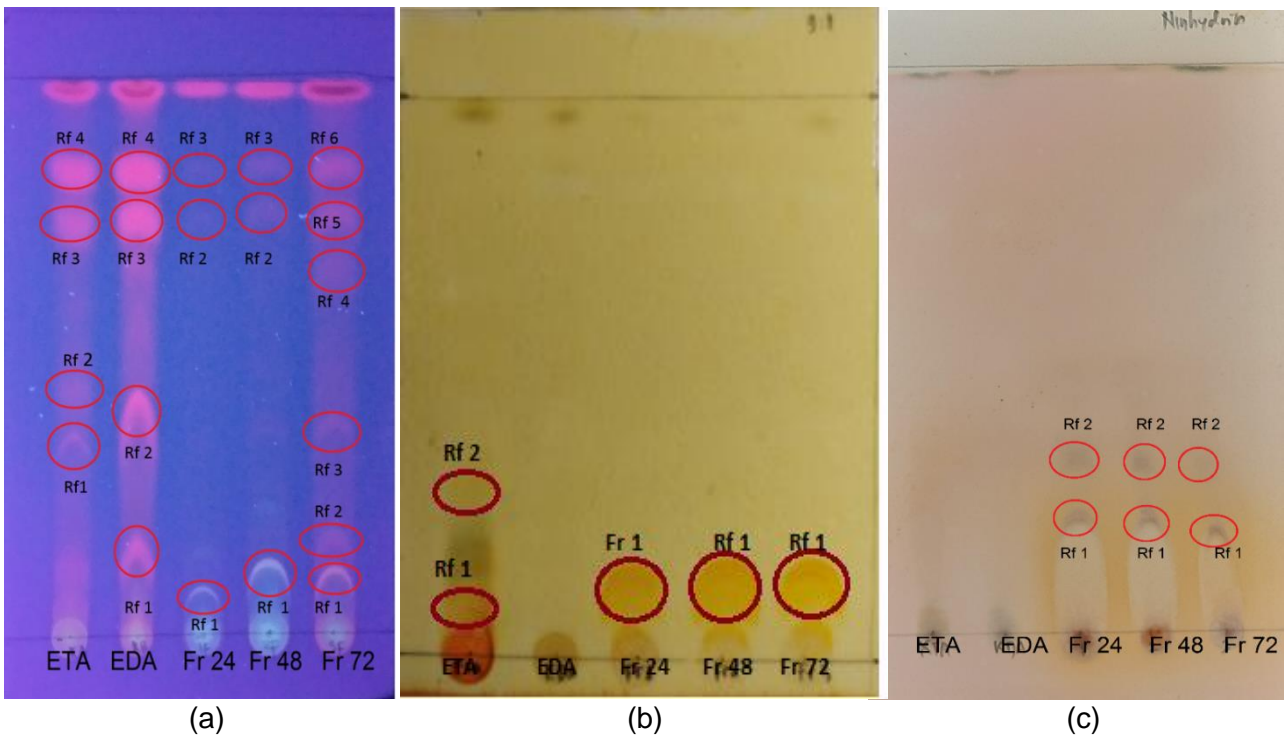
(Widowati *et al.*, 2014; Cyril *et al.*, 2017). Pada ekstrak dengan autoklaf (EDA) tidak ditemukan noda yang diduga senyawa alkaloid, hal ini diduga disebabkan oleh proses pemanasan atau sterilisasi yang merusak kandungan senyawa metabolit sekunder pada rumput laut. Pada ekstrak Fr 24, Fr 48 dan Fr 72 ditemukan noda kuning, hal ini menunjukkan bahwa rumput laut yang difermentasi menggunakan bakteri *L. plantarum* dapat menghasilkan senyawa yang diduga senyawa alkaloid.

Hasil penyemprotan Ninhidrin pada plat KLT (Tabel 3) menunjukkan adanya bercak noda ungu pada ekstrak rumput laut fermentasi Fr 24, Fr 48, dan Fr 72 jam dengan nilai  $R_f$  yang berbeda-beda.

**Tabel 2.** Nilai  $R_f$  ekstrak kasar *G. verrucosa* dengan penyemprotan reagen *Dragendorff*

Ekstrak	Retention ( $R_f$ ) Value			
	0,13	0,17	0,25	0,33
ETA	✓	×	✓	✓
EDA	×	×	×	×
Fr 24	×	✓	×	×
Fr 48	×	✓	×	×
Fr 72	×	✓	×	×
Warna	Kuning	Kuning-jingga	Hijau	Kuning
Dugaan	Alkaloid	Alkaloid	-	Alkaloid
	(Raal <i>et al.</i> , 2020)	(Raal <i>et al.</i> , 2020)		(Raal <i>et al.</i> , 2020)

Keterangan: ETA: Ekstrak Tanpa Autoklaf; EDA: Ekstrak Dengan Autoklaf; Fr 24: Ekstrak Fermentasi 24 jam; Fr 48: Ekstrak Fermentasi 48 jam; Fr 72: Ekstrak Fermentasi 72 jam; × : tidak ada; ✓: ada.



**Gambar 2.** Hasil analisis KLT masing masing ekstrak *G. verrucosa* menggunakan eluen kloroform: etil asetat (9:1) (a) pengamatan di sinar UV 366 nm; (b) penyemprotan reagen Dragendorff; (c) penyemprotan reagen Ninhidrin

**Tabel 3.** Nilai  $R_f$  ekstrak kasar *G. verrucosa* dengan penyemprotan reagen Ninhidrin.

Ekstrak	Retention ( $R_f$ ) Value		
	0,18	0,20	0,30
ETA	×	×	×
EDA	×	×	×
Fr 24	×	✓	✓
Fr 48	×	✓	✓
Fr 72	✓	×	✓
Warna	Ungu	Ungu	Ungu
Dugaan	Asam amino (Sinhababu, 2013).	Asam amino (Sinhababu, 2013).	Asam amino (Sinhababu, 2013).

Keterangan: ETA: Ekstrak Tanpa Autoklaf; EDA: Ekstrak Dengan Autoklaf; Fr 24: Ekstrak Fermentasi 24 jam; Fr 48: Ekstrak Fermentasi 48 jam; Fr 72: Ekstrak Fermentasi 72 jam; × : tidak ada; ✓: ada.

Berdasarkan uji Ninhidrin ini menunjukkan bahwa proses fermentasi berlangsung dan terbentuk asam amino bebas. Menurut Mangalisu *et al.* (2015) bakteri *L. plantarum* bersifat proteolitik. Selama pertumbuhan, bakteri memetabolisme nutrisi dalam medium, memecah protein menjadi asam amino dan peptida sehingga dapat mendukung pertumbuhan dan pembelahan sel.

#### Analisis Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar *G. verrucosa*

Pengujian antibakteri dilakukan untuk mengetahui sensitivitas bakteri uji terhadap sampel ekstrak uji. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak rumput laut segar, autoklaf dan fermentasi dengan menunjukkan bahwa ekstrak tidak memiliki efek antibakteri terhadap mikroba patogen uji. Hal ini dapat dilihat dari tidak terbentuknya zona hambat pada media uji (Gambar 3).

Penelitian Widowati *et al.* (2014) melaporkan bahwa ekstrak rumput laut memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan *E. coli*, namun hasil penelitian ini tidak menunjukkan hasil yang sama. Menurut Muharni *et al.* (2017) hal tersebut kemungkinan disebabkan ekstrak memiliki banyak senyawa lain yang mempengaruhi kemampuannya untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen uji. Kemampuan aktivitas antibakteri ekstrak dipengaruhi oleh kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak.

Bakteri uji yang digunakan adalah *foodborne disease Multidrug Resistant* (MDR) *E. coli* dan *S. typhi* yang termasuk kelompok bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif diketahui kurang lebih resisten terhadap beberapa senyawa antibakteri/antibiotik. Hal tersebut disebabkan struktur dinding sel bakteri gram negatif lebih kompleks dibanding dengan bakteri gram positif. Lapisan lipopolisakarida pada dinding sel bakteri gram negatif memperkuat kekakuan sel melalui ikatan silang kationik sehingga menyebabkan bakteri gram negatif lebih kokoh dan sulit ditembus oleh beberapa senyawa antibakteri/antibiotik (Nurhayati *et al.*, 2020). Selain itu, kedua bakteri uji ini merupakan isolat MDR artinya bakteri ini memiliki kemampuan resistensi terhadap beberapa golongan senyawa antibiotik (Nikaido, 2009). Hal ini juga diduga berpengaruh terhadap sensitivitas kedua bakteri ini terhadap ekstrak yang digunakan. Salah satu mekanisme resistensi bakteri MDR *E. coli* dan *S. typhi* yang diduga membuat ekstrak sampel tidak aktif adalah *efflux pump* (Soto, 2013). Pratiwi (2017) menyatakan bahwa bakteri dengan *efflux pump* aktif dapat mengeliminasi senyawa antibakteri atau mengeluarkan senyawa toksik yang masuk ke dalam sel dengan cepat sebelum senyawa tersebut berdifusi, sehingga senyawa tersebut menjadi tidak efektif.

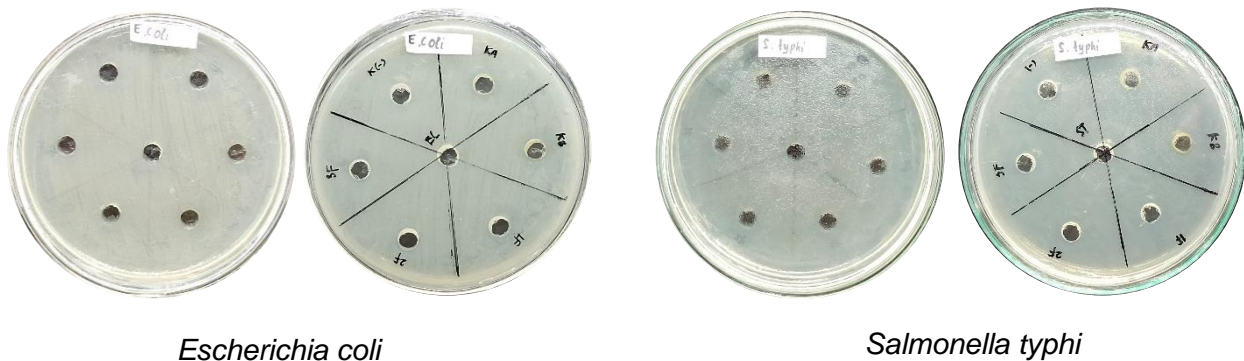
*Foodborne disease* merupakan penyakit yang disebabkan oleh kontaminasi mikroorganisme patogen pada bahan makanan. Bakteri patogen penyebab *foodborne disease* biasanya bersifat toksik dan atau infeksius. Beberapa bakteri penyebab *foodborne disease* adalah *E. coli* dan *S. typhi*. Secara alami *E. coli* merupakan flora normal yang dapat ditemukan pada usus manusia dan kebanyakan tidak berbahaya. Namun strain *E. coli* tertentu dapat menginfeksi daerah usus dan menyebabkan penyakit diare (Yang *et al.*, 2017). *S. typhi* bakteri yang dapat mengkontaminasi

makanan dan minuman. Bakteri ini dapat menginfeksi dan menyebabkan penyakit tipus dan gastroenteritis. Menurut Eng *et al.* (2015) *Salmonella* sebagai patogen makanan paling sering ditemukan pada unggas, produk susu. Menurut Yogita *et al.* (2018) kasus infeksi bakteri *S. typhi* cukup tinggi di Indonesia, bakteri ini diketahui resistensi terhadap agen antibiotik seperti Ampisilin, Kloramfenikol dan Trimetoprim-sulfametoksazol.

### Analisis Toksisitas Ekstrak Kasar *G. verrucosa*

Pengujian terhadap toksisitas ekstrak rumput laut segar (ETA), autoklaf (EDA), dan fermentasi (Fr 24, Fr 48, dan Fr 72) terhadap larva *A. salina* L. menunjukkan nilai LC<sub>50</sub> yang berbeda. Berdasarkan Tabel 4 dapat diketahui bahwa kelima ekstrak rumput laut memiliki nilai LC<sub>50</sub> di bawah 1000 µg/mL. Merujuk Meyer *et al.* (1982) jika nilai LC<sub>50</sub> < 1000 µg/mL dikategorikan toksik dan berpotensi sebagai antikanker. Berdasarkan Tabel 4 diketahui bahwa ETA memiliki sifat toksik yang lebih kuat dibandingkan dengan keempat ekstrak EDA, Fr 24, Fr 48, dan Fr 72.

Ekstrak rumput laut autoklaf (EDA) dan fermentasi (Fr 24, Fr 48, dan Fr 72) menunjukkan penurunan toksisitas. Hal ini diduga disebabkan proses pemanasan (sterilisasi) yang menyebabkan kerusakan senyawa bioaktif pada rumput laut. Berdasarkan hasil uji, tingkat toksisitas terendah ditemukan pada ekstrak rumput laut fermentasi. Fermentasi dengan menggunakan *L. plantarum* justru memperlemah toksisitas rumput laut. Melemahnya toksisitas diduga disebabkan senyawa yang dihasilkan saat fermentasi bersifat antagonis dan mengganggu fungsi senyawa pada rumput laut yang memiliki aktivitas antikanker. Niksic *et al.* (2021) menyatakan bahwa penggunaan BSLT dalam pengujian toksisitas suatu senyawa berkorelasi positif terhadap aktivitas sitotoksiknya, sehingga dapat digunakan dalam pengujian awal toksisitas.



**Gambar 3.** Hasil uji antibakteri ekstrak rumput laut

**Tabel 4.** LC<sub>50</sub> ekstrak *G. verrucosa*.

Sampel Ekstrak	Nilai LC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>a</sup>
ETA	73,26
EDA	218,09
Fr 24	316,69
Fr 48	316,69
Fr 72	316,69

Keterangan: a: pengolahan data menggunakan Ms. Excel; ETA: Ekstrak Tanpa Autoklaf, EDA: Ekstrak Dengan Autoklaf; Fr 24: Ekstrak Fermentasi 24 jam; Fr 48: Ekstrak Fermentasi 48 jam; Fr 72: Ekstrak Fermentasi 72 jam



Pengujian toksisitas pada penelitian ini dilakukan dengan metode BSLT. Penggunaan *A. salina* L. sebagai hewan uji yang efektif dalam toksikologi karena mudah ditetaskan, pertumbuhan yang cepat, dan mudah diperoleh (Sorgeloos *et al.*, 1978; Yuniyanto *et al.*, 2014). Larva udang ini memiliki kulit yang tipis dan peka terhadap perubahan lingkungannya (Jelita *et al.*, 2020). Pengujian BSLT menggunakan larva *Artemia salina* L. pada fase nauplius. Pada fase nauplius larva paling aktif membelah secara mitosis dan sesuai dengan sel kanker yang aktif melakukan pembelahan secara mitosis (Puspa *et al.*, 2017).

Hasil penyempotan Dragendorff pada plat KLT menunjukkan bahwa ekstrak ETA dan fermentasi (Fr 24, Fr 48, dan Fr 72) mengandung senyawa alkaloid. Eksplorasi metabolit sekunder sebagai antikanker telah banyak dilakukan dan alkaloid menunjukkan efek antikanker dan kemopreventif yang menjanjikan (Ballout *et al.*, 2019). Senyawa alkaloid diduga toksik pada konsentrasi tertentu dan mekanisme toksik alkaloid yaitu bertindak sebagai *stomach poisoning* (racun perut). Alkaloid yang masuk ke dalam tubuh larva akan mengganggu alat pencernaan, mengganggu stimulus rasa sehingga larva tidak dapat mengenali makanannya dan berakhir dengan mati kelaparan (Puspa *et al.*, 2017). Menurut Jelita *et al.* (2020) bahwa suatu zat atau senyawa asing yang ada di lingkungan secara difusi terserap ke dalam tubuh dan mempengaruhi metabolisme udang. Larva udang akan mati apabila suatu senyawa asing tersebut bersifat toksik. Ekstrak yang bersifat toksik dapat masuk melalui mulut larva *A. salina* L. dan diabsorpsi ke dalam saluran pencernaan, kemudian terdistribusi ke dalam tubuh, dan metabolisme menjadi terganggu. Perbedaan gradien konsentrasi antara membran sel larva dengan lingkungan di luar sel menyebabkan senyawa toksik dapat menyebar dengan baik ke tubuh larva, sehingga dalam 24 jam dapat menyebabkan 50% kematian larva *A. salina* L. (Ningdyah *et al.*, 2015).

## KESIMPULAN

Pengujian aktivitas biologis menunjukkan bahwa perlakuan fermentasi tidak dapat meningkatkan aktivitas antibakteri maupun toksisitas ekstrak kasar rumput laut *G. verrucosa*. Karakterisasi metabolit sekunder ekstrak kasar *G. verrucosa* menunjukkan bahwa fermentasi menggunakan *L. plantarum* menghasilkan metabolit yang berbeda dan ditemukannya senyawa yang diduga sebagai turunan alkaloid dan asam amino.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alhaag, H., Yuan, X., Mala, A., Bai, J. & Shao, T. 2019. Fermentation characteristics of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus* species isolated from sweet sorghum silage and their application as silage inoculants. *Applied Sciences*, 9(6):p.1247 DOI: 10.3390/app9061247
- Ambarsari, N.D., Rushanti, I.R.P.A., Setyaji, A., Ningsih, T.R., Nurhana, N., Subekhi, I. & Dewi, E.N. 2018. The Influenced of *Lactobacillus plantarum* Starter Addition and the Length Time of Fermentation Process on the Activity of Seaweed Antioxidant *Ulva lactuca* from Krakal Beach, Yogyakarta. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 116(1): p. 012074. DOI: 10.1088/1755-1315/116/1/012074
- Arunkumar, K., Palanivelu, A. & Darsis, A. 2014. Proximate Composition, Nutraceutical Constituents and Fatty Acid Profile on GCMS Of Seaweeds Collected From Balk Bay (Thondi), India. *International Journal of Current Science Research and Review*, 12:57-71
- Ballout, F., Monzer, A., Habli, Z., Rahal, O.N., Fatfat, M. & Muhtasib, H.G. 2019. Anticancer Alkaloids: Molecular Mechanisms and Clinical Manifestations. In: Sharma A. (eds) *Bioactive Natural Products for the Management of Cancer: from Bench to Bedside*. Springer, Singapore. DOI: 10.1007/978-981-13-7607-8\_1
- Chye, F.Y., Ooi, P.W., Young Ng, S. & Sulaiman, M.R. 2018. Fermentation-Derived Bioactive Components from Seaweeds: Functional Properties and Potential Applications. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 27(2): 144–164. DOI: 10.1080/10498850.2017.1412375

- Cyril, R., Lakshmanan, R. & Thiyagarajan, A. 2017. In vitro bioactivity and phytochemical analysis of two marine macro-algae. *Journal of Coastal Life Medicine*, 5(10):427–432. DOI: 10.12980/jclm.5.2017J7-124
- Elving, P.J., Bresnahan, W.T., Moiroux, J. & Samec, Z. 1982. 524-<sub>NAD</sub>/NADH as A Model Redox System: Mechanism, Mediation, Modification by The Environment. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 141(3):365-378. DOI: 10.1016/0022-0728(82)85223-6
- Eng, S.K., Pusparajah P., Mutalib, N.S.A., Ser, H.L., Chan, K.G. & Lee, L.H. 2015. *Salmonella*: A review on Pathogenesis, Epidemiology and Antibiotic Resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3):284–293. DOI: 10.1080/21553769.2015.1051243
- Irwanto, D., Wiratni, & Rochmadi. 2018. Effect of Alkaloids on Lactic Acid Fermentation from Cocoa Pod Husk using *Lactobacillus plantarum*. *Reaktor*, 18(1):51-56. DOI: 10.14710/reaktor.18.1.51-56
- Jelita, S.F., Setyowati, G.W., Ferdinand, M. & Zuhrotun, A. 2020. Uji Toksisitas Infusa Acalypha Simensis Dengan Metode *Brine Shrip Lethality Test* (BSLT). *Jurnal Farmaka*, 18(1):14–22.
- Leal, M.C., Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Puga, J., Jesus, B., Calado, R., Rosa, R. & Madeira, C. 2013. Biogeography and biodiscovery hotspots of macroalgal marine natural products. *Natural Product Reports*, 30(11):1380–1390. DOI: 10.1039/c3np70057g
- Maftuch, Kurniawati, I., Adam, A. & Zamzami, I. 2016. Antibacterial effect of *Gracilaria verrucosa* bioactive on fish pathogenic bacteria. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42(4):405–410. DOI: 10.1016/j.ejar.2016.10.005
- Mangalisu, A., Nahariah & Hatta, W. 2015. Kemampuan Fermentasi *Lactobacillus plantarum* Pada Telur Infertil dengan Waktu Inkubasi yang Berbeda. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan*, 4(2):70-73.
- Marraskuranto, E., Nursid, M., Utami, S., Setyaningsih, I. & Tarman, K. 2021. Kandungan Fitokimia, Potensi Antibakteri dan Antioksidan Hasil Ekstraksi *Caulerpa racemosa* dengan Pelarut Berbeda. *Jurnal Pascapanen Dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 16(1):1–10. DOI: 10.15578/jpbkp.v16i1.696
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., & McLaughlin, J.L. 1982. *Brine Shrimp*: A convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*, 45(3):31–34. DOI: 10.1055/s-2007-971236
- Muharni, Fitriya & Farida, S. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Tanaman Obat Suku Musi di Kabupaten Musi Banyuasin, Sumatera Selatan. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 7(2):127-135. DOI: 10.22435/jki.v7i2.6070.127-135
- Murwani, R., Sibero, M.T., Silitonga, P.R.A. & Ambariyanto, A. 2021. Bioprospecting of Cow's Ruminant Microbiota From A Slaughterhouse in Ambarawa, Central Java, Indonesia. *Biodiversitas*, 22(11):5030-5038. DOI: 10.13057/biodiv/d221139
- Nikaido, H. 2009. Multidrug Resistance in Bacteria. *Annual review of biochemistry*, 78:119–146. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923
- Niksic, H., Becic, F., Koric, E, Gusic, I., Omeragic, E., Muratovic, S., Miladinovic, B. & Duric, K. 2021. Cytotoxicity screening of *Thymus vulgaris* L. essential oil in brine shrimp nauplii and cancer cell lines. *Scientific Reports*, 11(1):1-9. DOI: 10.1038/s41598-021-92679-x
- Ningdyah, A.W., Alimuddin, A.H. & Jayuska, A. 2015. Uji Toksisitas Dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) Terhadap Hasil Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Tampoi (*Baccaurea macrocarpa*). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 4(1):75–83.
- Nurhayati, L.S., Yahdiyani, N. & Hidayatulloh, A. 2020. Perbandingan Pengujian Aktivitas Antibakteri Starter Yogurt Dengan Metode Difusi Sumuran Dan Metode Difusi Cakram. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 1(2):41-46. DOI: 10.24198/jthp.v1i2.27537
- Pratiwi, R.H. 2017. Mekanisme Pertahanan Bakteri Patogen Terhadap Antibiotik. *Jurnal Pro-Life*, 4(3):418-428.
- Puspa, O.E., Syahbanu, I. & Wibowo, M.A. 2017. Uji Fitokimia Dan Toksisitas Minyak Atsiri Daun Pala (*Myristica fragans* Houtt) Dari Pulau Lemukutan. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 6(2):1–6.

- Puspasari, S., Nurhamidah, N. & Amir, H. 2020. Uji Sitotoksik Dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pandan Laut (*Pandanus Odorifer*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Alotrop*, 4(1):42–50. DOI: 10.33369/atp.v4i1.13708
- Puspitasari, E., Rozirwan & Henri, M. 2018. Uji Toksisitas dengan Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) Pada Ekstrak Mangrove (*Avicennia Marina*, *Rhizophora Mucronata*, *Sonneratia Alba* dan *Xylocarpus Granatum*) yang Berasal dari Banyuasin, Sumatera Selatan. *Jurnal Biologi Tropis*, 18(1):91-103. DOI: 10.29303/jbt.v18i1.733
- Raal, A., Meos, A., Hinrikus, T., Heinämäki, J., Romāne, E., Gudienė, V., Jakštas, V., Koshovyi, O., Kovaleva, A., Fursenco, C., Chiru, T. & Nguyen, H.T. 2020. *Dragendorff's reagent*: Historical perspectives and current status of a versatile reagent introduced over 150 years ago at the University of Dorpat, Tartu, Estonia. *Pharmazie*, 75(7):299–306.
- Rianingsih, L. & Sumardianto. 2020. Antioxidant activity in seaweed (*Sargassum* sp.) extract fermented with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 530(1):p.012011. DOI: 10.1088/1755-1315/530/1/012011
- Rianingsih, L., Sumardianto Riyadi, P.H., & Romadhon, A.A.D. 2021. Phenol content and antioxidant activity in seaweed fermented with lactic acid bacteria. *Food Research*, 5:7–13. DOI: 10.26656/fr.2017.5(S3).006
- Setiarto, R.H.B. 2020. Teknologi Fermentasi Pangan Tradisional dan Produk Olahannya. Guepedia.
- Sibero, M.T., Radjasa, O.K., Sabdono, A., Trianto, A., Triningsih, D.W. & Hutagaol, I.D. 2018. Antibacterial activity of Indonesian sponge associated fungi against clinical pathogenic multidrug resistant bacteria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(2):088–094.
- Sinhababu, A. 2013. Modified Ninhidrin reagent for the detection of amino acids on TLC plates. *Journal of Applied and Natural Science*, 5 (1):125-127. DOI: 10.31018/jans.v5i1.292
- Sorgeloos, P., Remiche-Van Der Wielen, C. & Persoone, G. 1978. The use of *Artemia* nauplii for toxicity tests-A critical analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2(3–4):249–255. DOI: 10.1016/S0147-6513(78)80003-7
- Soto, S.M. 2013. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 4(3):223–229. DOI: 10.4161/viru.23724
- Wandansari, B.D., Agustina, L.N.A., & Mulyani, N.S. 2013. Fermentasi Rumput Laut *Eucheuma cottonii* oleh *Lactobacillus plantarum*, 1(1):64–69.
- Widodo, R. W., Subagiyo, S., & Pramesti, R. 2019. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*, Greville, 1830 (Florideophyceae : Gracilariaceae) di Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau Jepara. *Journal of Marine Research*, 8(3):285–290. DOI: 10.14710/jmr.v8i3.25271
- Widowati, I., Lubac, D., Puspita, M. & Bourgougnon, N. 2014. Antibacterial and Antioxidant Properties of The Red Alga *Gracilaria verrucosa* from The North Coast of Java, Semarang, Indonesia. *International Journal of Latest Research in Science and Technology*, 3(3):179–185.
- Yang, S.C., Lin, C.H., Aljuffali, I.A., & Fang, J.Y. 2017. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Archives of Microbiology*, 199(6):811–825. DOI: 10.1007/s00203-017-1393-y
- Yogita, S.P., Agus, H. & Sukrama, I.D.M. 2018. Pola Kepekaan Bakteri *Salmonella typhi* Terisolasi dari Darah Terhadap Siprofloksasin dan Seftriakson di RSUP Sanglah Periode Januari 2015-Maret 2017. *E-Jurnal Medika*, 7(12):1–6.
- Yunianto, H.P., Widowati, I. & Radjasa, O.K. 2014. Skrining Antibakteri Ekstrak Rumput Laut *Sargassum plagyophyllum* dari Perairan Bandengan Jepara Terhadap Bakteri Patogen *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*. *Diponegoro Journal of Marine Research*, 3(3):165–172.