



Analisis Profil Metabolit Ekstrak Etanol *Gracilaria verrucosa* Menggunakan *Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry*

Andriani Noerlita Ningrum^{1*}, Yesi Ihdina Fityatal Hasanah²

¹STIKES Mamba'ul 'Ulum, Surakarta

²UIN Raden Mas Said, Surakarta

*Corresponding Author's e-mail: andrianinoerlita.n@gmail.com

Article History:

Received: October 11, 2025

Revised: November 27, 2025

Accepted: November 29, 2025

Keywords:

Gracilaria verrucosa, LC–HRMS, secondary metabolites

Abstract: *Gracilaria verrucosa* is a red alga with promising potential as a source of bioactive metabolites. Previous studies have mainly reported antioxidant or antibacterial activity and total phenolic content without resolving specific molecular entities. This study aimed to generate a non-targeted LC–HRMS profile of semi-polar secondary metabolites from the ethanol extract of *G. verrucosa* and to annotate dominant ion features into defined chemical classes. Dried biomass was macerated with 96% ethanol and analysed using UHPLC–Orbitrap HRMS in Full MS/dd-MS² mode. After QC filtering, 325 ion features were detected; 51 could be annotated with Schymanski level 2–3 confidence into five classes: oxylipins/jasmonate derivatives, phytosterols, ionone-type apocarotenoids, phenolic–flavonoids, and carnitine-conjugated lipids. Representative candidates included jasmonic acid, 6-hydroxy-3-oxo- α -ionone, cholesteryl triol, flavonoid derivatives, and eicosadienoylcarnitine. These results indicate that the semi-polar metabolome of *G. verrucosa* is enriched in signalling-related oxylipins and sterols, antioxidant phenolic scaffolds, and acylcarnitines linked to energy metabolism, thereby providing a more mechanistic basis for its reported bioactivities. To our knowledge, this is the first comprehensive LC–HRMS-based metabolite map of Indonesian *G. verrucosa*, and it offers a chemically resolved framework to support subsequent fractionation, isolation, structural elucidation, and targeted pharmacological studies.

Copyright © 2025, The Author(s).

This is an open access article under the CC–BY–SA license



How to cite: Ningrum, A. N., & Hasanah, Y. I. F. (2025). Analisis Profil Metabolit Ekstrak Etanol *Gracilaria verrucosa* Menggunakan *Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry*. *SENTRI: Jurnal Riset Ilmiah*, 4(11), 3080–3089. <https://doi.org/10.55681/sentri.v4i11.4771>

PENDAHULUAN

Rumput laut merupakan sumber hayati penting yang dimanfaatkan luas untuk pangan, industri, hingga kesehatan. Indonesia sebagai negara maritim memiliki potensi besar dalam produksi alga, termasuk alga merah (Rhodophyta). Salah satu spesies yang paling banyak dibudidayakan adalah *Gracilaria verrucosa*, yang selama ini dikenal terutama sebagai bahan baku agar. Namun, literatur terkini menunjukkan bahwa *G. verrucosa* juga menyimpan beragam metabolit sekunder dengan potensi bioaktivitas luas (Gómez-Zorita et al., 2025; Cotas et al., 2020). Temuan tersebut menempatkan *Gracilaria verrucosa* tidak hanya bernilai ekonomis, tetapi juga prospektif sebagai sumber kandidat obat alami.

Metabolit sekunder pada alga, meliputi fenolik, flavonoid, sterol, oksilipin, dan karotenoid, berperan dalam mekanisme pertahanan diri terhadap stres lingkungan seperti radiasi UV, fluktuasi salinitas dan patogen. Dari sisi farmasi, kelompok senyawa ini diketahui memiliki aktivitas antioksidan, antiinflamasi, antimikroba, imunomodulator,

hingga antikanker (Tavakoli et al., 2020; Yang et al., 2020). Karena itu, karakterisasi molekuler kelompok metabolit tersebut pada *G. verrucosa* penting secara biologis untuk memahami jalur adaptasi dan potensi terapetiknya di perairan Indonesia.

Sejumlah studi awal di Indonesia menunjukkan potensi bioaktivitas *G. verrucosa*, tetapi dengan keterbatasan pada identifikasi senyawa. Putra et al. (2019) melaporkan variasi fenolik total dan aktivitas antioksidan pada ekstrak *G. verrucosa* asal Yogyakarta, namun tanpa penetapan molekul spesifik. Studi lain oleh Sibero et al. (2023) menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan pasca fermentasi dan mengindikasikan kontribusi metabolit semi-polar tetapi belum memperjelas kelas kimianya. Kesenjangan ini menegaskan perlunya pemetaan kimiawi komprehensif agar hasil uji hayati terhubung langsung dengan kandidat senyawa aktif.

Dalam konteks tersebut, LC–HRMS merupakan pendekatan yang tepat. Teknologi ini mendeteksi metabolit pada konsentrasi rendah dengan akurasi massa tinggi, menghasilkan fragmen diagnostik melalui MS/MS, dan memungkinkan anotasi tanpa isolasi murni. LC–HRMS telah banyak dipakai dalam studi *untargeted metabolomics* pada alga untuk mengungkap profil kimia kompleks yang sulit dicapai metode konvensional (Pereira et al., 2022; Hughes, A.H., et al., 2021). Dengan demikian, LC–HRMS menjadi jembatan langsung dari observasi bioaktivitas menuju identifikasi molekuler dan prioritasasi senyawa.

Pada genus *Gracilaria*, beberapa kelompok metabolit relevan telah dilaporkan. Oksilipin/derivat jasmonat berperan dalam respons pertahanan oksidatif dan berpotensi antiinflamasi (Tavakoli et al., 2020). Apokarotenoid tipe ionone—produk degradasi karotenoid—bertindak sebagai molekul sinyal dan antioksidan (Yang et al., 2020). Fitosterol berkaitan dengan aktivitas hipokolesterolemik dan antiinflamasi (Gómez-Zorita et al., 2025; Cotas et al., 2020). Fenolat–flavonoid dikenal sebagai antioksidan kuat (Putra et al., 2019), sedangkan lipid karnitin, meskipun jarang dikaji pada *Gracilaria*, berperan dalam bioenergetika seluler dan berpotensi terlibat dalam respons stres (Meierhofer, 2019; NIST, 2019). Karakterisasi kelompok-kelompok ini pada *G. verrucosa* penting secara biologis untuk memetakan jalur metabolik kunci yang mendasari adaptasi dan bioaktivitas.

Hingga kini, belum ada laporan komprehensif berbasis LC–HRMS mengenai profil metabolit sekunder semi-polar pada *G. verrucosa* di Indonesia. Mayoritas studi masih terbatas pada data bioaktivitas atau parameter total senyawa tanpa identifikasi molekul. Padahal, pengetahuan mengenai kelas kimia dan fragmen diagnostik sangat krusial sebagai dasar fraksinasi, isolasi, elusidasi struktur, dan uji farmakologis lanjutan.

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini memfokuskan *profiling untargeted* metabolit sekunder dari ekstrak etanol *G. verrucosa* menggunakan LC–HRMS. Fitur utama yang terdeteksi akan dianotasi ke dalam kelompok metabolit relevan yaitu oksilipin/derivat jasmonat, fitosterol, apokarotenoid tipe ionone, fenolat–flavonoid, dan lipid karnitin, berdasarkan *accurate mass*, waktu retensi, dan kecocokan MS/MS. Kebaruan ilmiah penelitian ini terletak pada profil pertama yang komprehensif untuk *G. verrucosa* di Indonesia melalui LC–HRMS, yang menjembatani hasil bioaktivitas dengan identitas molekuler untuk mendukung riset kimia dan farmakologi berikutnya.

LANDASAN TEORI

Metabolit sekunder pada alga merah berperan dalam respons terhadap stres lingkungan dan memiliki nilai bioaktif. Fenolat–flavonoid berkontribusi besar pada aktivitas penangkap radikal bebas dan telah dikaji untuk pangan fungsional, kosmetik, dan

bahan tambahan pangan; pada *G. verrucosa*, kandungan fenolat berkorelasi dengan aktivitas antioksidan, dan profilnya dapat berubah setelah fermentasi (De la Fuente et al., 2021; Cotas et al., 2020; Putra et al., 2019; Sibero et al., 2023). Oksilipin, termasuk derivat jasmonat, berfungsi sebagai mediator stres dan dikaitkan dengan efek antiinflamasi (Tavakoli et al., 2020). Apokarotenoid tipe ionone merupakan produk degradasi karotenoid yang berperan dalam pensinyalan dan pertahanan oksidatif, sebagian menunjukkan potensi antimikroba (Yang et al., 2020; Dhargalkar & Verma, 2021). Fitosterol umum ditemukan pada alga merah dan berkaitan dengan efek hipokolesterolemik serta antiinflamasi (Gómez-Zorita et al., 2025; Gómez-Zorita et al., 2025; Cotas et al., 2020). Lipid karnitin (acylcarnitine) berperan dalam transport asam lemak ke mitokondria dan mencerminkan status bioenergetik; kelas ini mulai muncul dalam kajian metabolomik alga dan relevan untuk dibahas meski masih jarang dilaporkan pada *Gracilaria* (Kelly et al., 2019; Xi et al., 2021; Meierhofer, 2019; NIST, 2019). Dari sisi metode, LC–HRMS memisahkan senyawa secara kromatografis lalu mendeteksi massa dengan resolusi tinggi. Identifikasi awal dalam studi *untargeted* biasanya menggabungkan *accurate mass* (toleransi hingga beberapa ppm), waktu retensi, dan pola fragmen MS/MS yang dicocokkan dengan pustaka spektrum dan basis data seperti mzCloud (Kelly et al., 2019; Xi et al., 2021; Cotas et al., 2020). Pendekatan ini memberi landasan yang jelas untuk menghubungkan kelas kimia dengan hasil uji hayati, sehingga temuan pada *G. verrucosa* dapat ditafsirkan lebih kuat dan siap ditindaklanjuti ke tahap fraksinasi, isolasi, serta uji farmakologis.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Analisis dilakukan menggunakan sistem kromatografi cair ultra-tinggi (UHPLC) Thermo Scientific™ Vanquish™ Horizon yang dipasangkan dengan Orbitrap™ Exploris 240 High Resolution Mass Spectrometer (HRMS). Analisis LC–HRMS dilakukan di laboratorium Corpora Science, Yogyakarta. Perangkat lunak Xcalibur dan Compound Discoverer 3.3 digunakan untuk akuisisi serta pengolahan data. Kolom yang digunakan adalah Accucore™ Phenyl Hexyl (100 × 2,1 mm; 2,6 μm).

Bahan penelitian meliputi etanol 96% (pro analisis), metanol LC–MS grade, asetonitril (ACN) LC–MS grade, asam format (≥ 99%), serta membran PTFE 0,22 μm. Sampel *Gracilaria verrucosa* diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau, Jepara.

Preparasi sampel

Sampel *G. verrucosa* dikeringkan menggunakan lemari pengering, kemudian digiling hingga menjadi serbuk halus. Sebanyak ± 300 g serbuk dimaserasi dengan etanol 96% (perbandingan 1:3) selama 3 × 24 jam dengan pengadukan sesekali. Filtrat disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 1, lalu diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu < 50 °C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kemudian dilarutkan kembali dalam metanol LC–MS grade hingga konsentrasi 1 mg/mL dan difiltrasi menggunakan membran PTFE 0,22 μm sebelum dianalisis.

Kondisi Kromatografi dan Spektometri Massa

Analisis LC–HRMS dilakukan pada sistem Thermo Scientific™ Vanquish™ Horizon UHPLC yang dipasangkan dengan Orbitrap™ Exploris 240 HRMS dalam mode

Full MS/dd-MS² dengan *polarity switching*. Kolom yang digunakan adalah Accucore™ Phenyl Hexyl (100 × 2,1 mm; 2,6 µm). Fase gerak A berupa air LC–MS dengan 0,1% asam format, sedangkan fase gerak B berupa ACN LC–MS dengan 0,1% asam format. Program gradien dimulai dari 5% B (0 menit) hingga 90% B (16 menit), ditahan pada 90% B (16–20 menit), kemudian dikembalikan ke 5% B dan dilakukan *re-equilibration* hingga menit ke-25. Laju alir ditetapkan 0,30 mL/menit, suhu kolom 40 °C, dan volume injeksi 5 µL.

Full scan direkam pada resolusi 60.000 FWHM (*m/z* 200) dengan rentang *m/z* 70–800. Akuisisi *dd-MS²* dilakukan pada resolusi 22.500 dengan *higher-energy collisional dissociation* (HCD) menggunakan *stepped normalized collision energy* (NCE) 30/50/70. Sumber *Heated ESI* dioperasikan pada tegangan +3.500 V (mode positif) dan –2.500 V (mode negatif). Parameter instrumen lainnya mengikuti spesifikasi platform yang terdokumentasi.

Kolom Phenyl Hexyl dipilih karena memberikan selektivitas *mixed-mode* (retensi fase balik dan interaksi π – π) yang efektif untuk campuran metabolit semi-polar multikelas, mulai dari fenolat–flavonoid hingga apokarotenoid dan sterol. Penambahan 0,1% asam format pada kedua fase gerak memperbaiki bentuk puncak dan efisiensi protonasi pada mode ionisasi ESI(+), serta tetap kompatibel untuk pembentukan $[M-H]^-$ pada ESI(–). ACN digunakan sebagai pelarut organik karena viskositasnya lebih rendah dan kemampuannya yang baik untuk mengelusi komponen hidrofobik. Rentang gradien 5–90% B dirancang untuk mencakup spektrum kepolaran yang luas dalam satu kali *run*. Dua mode ionisasi digunakan secara komplementer: ESI(–) untuk oksilipin/derivat jasmonat dan fenolat yang mudah terdeprotonasi, sedangkan ESI(+) untuk karnitin (amonium kuarternar) serta sebagian apokarotenoid/sterol yang terbaca sebagai $[M+H]^+$ atau $[M+NH_4]^+$. Penggunaan *dd-MS²* dengan *stepped NCE* dimaksudkan untuk memperoleh cakupan fragmen yang lebih kaya lintas kelas kimia sehingga meningkatkan kekuatan diagnostik spektrum.

Prosedur QC

Sampel QC terpadu (*pooled QC*) disiapkan dengan mencampurkan *aliquot* setara dari setiap ekstrak sampel hingga homogen. Larutan QC ini diinjeksikan 5–6 kali pada awal rangkaian analisis untuk pengondisian sistem dan penstabilan waktu retensi, kemudian disisipkan kira-kira setiap 10 injeksi sampel untuk memantau stabilitas sistem dan *drift* sinyal. Blangko pelarut dijalankan di awal, secara berkala, dan setelah sampel dengan respons tinggi; suatu fitur dieliminasi apabila rasio intensitas blangko terhadap sampel melebihi 0,1.

System suitability dilakukan sebelum *batch* utama untuk memastikan akurasi massa, kestabilan waktu retensi, dan konsistensi respons instrumen (misalnya *mass error* ≤ 5 ppm dan $\Delta RT \leq 0,2$ menit pada injeksi berulang). Normalisasi berbasis QC (misalnya *QC-LOESS*) diterapkan apabila terdeteksi *drift* sinyal sepanjang *run*. Fitur yang digunakan untuk interpretasi dipertahankan bila RSD pada injeksi QC < 30%.

Pemrosesan dan Validasi Anotasi

Deteksi puncak, penyelarasan waktu retensi, penggabungan *adduct/isotope*, *gap-filling*, normalisasi berbasis QC, dan *blank subtraction* dilakukan di Compound Discoverer 3.3. Fitur dipertahankan apabila intensitas $\geq 1 \times 10^5$, muncul konsisten pada $\geq 80\%$ injeksi QC, dan *RSD_QC* < 30%. Anotasi kandidat didukung oleh: (i) akurasi

massa prekursor dan fragmen $|\Delta m| \leq 5$ ppm; (ii) kecocokan pola isotop ($\geq 90\%$ bagi kandidat yang relevan); (iii) adduct sesuai mode ionisasi (ESI(-): $[M-H]^-/[M+FA-H]^-$; ESI(+): $[M+H]^+/[M+NH_4]^+/[M+Na]^+$); (iv) kecocokan spektrum MS/MS di mzCloud dengan skor $\geq 80/100$ dan ≥ 3 fragmen diagnostik; serta (v) dukungan metrik FISH-coverage dan pemeringkatan mzLogic. Tingkat kepercayaan dilaporkan dengan skema: Level 1 (terkonfirmasi standar autentik; $RT \pm 0,1$ menit; MS/MS identik), Level 2 (kecocokan pustaka HRMS/MS berkualitas dan RT koheren), Level 3 (kelas/kerangka struktur), Level 4 (formula empiris), dan Level 5 (massa saja).

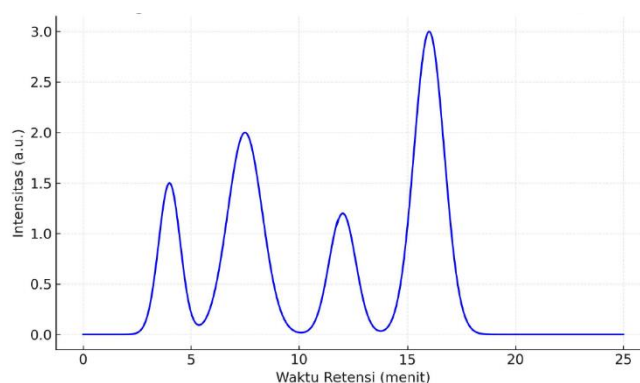
HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Profiling Metabolit dengan LC-HRMS

Analisis LC-HRMS terhadap ekstrak etanol *Gracilaria verrucosa* menghasilkan kromatogram total ion (TIC) dengan puncak utama pada rentang waktu retensi 4–17 menit. Pola ini menunjukkan kompleksitas metabolit semi-polar yang berhasil dipisahkan, dengan puncak dominan di menit ke-16 yang kemudian dianotasi sebagai kandidat fitosterol (**Gambar 1**). Profil ini sejalan dengan laporan bahwa genus *Gracilaria* merupakan sumber beragam metabolit bioaktif, termasuk fenolik, flavonoid, sterol, oksilipin, dan pigmen karotenoid (Gómez-Zorita et al., 2025; Cotas et al., 2020; Wijesekara & Kim, 2014). Secara kuantitatif, pemrosesan data menghasilkan 325 fitur ion yang memenuhi kriteria intensitas dan QC, dengan sekitar dua pertiga di antaranya (± 166 fitur) terelusi pada rentang 4–12 menit, yang konsisten dengan dominasi metabolit semi-polar dalam ekstrak etanol.

Sebagian besar fitur terdeteksi pada mode ionisasi positif sebagai ion $[M+H]^+$ dan adduct turunannya (± 290 fitur), sedangkan hanya sebagian kecil muncul dominan pada mode ionisasi negatif sebagai ion $[M-H]^-$ dan adduct terkait (± 36 fitur). Pola ini menunjukkan bahwa banyak kandidat metabolit utama lebih stabil dan lebih mudah terprotonasi dalam kondisi ESI positif, terutama untuk kelas sterol, apokarotenoid, dan lipid karnitin.

Beberapa puncak berintensitas sangat tinggi pada TIC teranotasi sebagai senyawa seperti salicylsulfuric acid dan (C10–C16) alkylbenzenesulfonic acid, yang kemungkinan besar berkaitan dengan kontaminan proses atau komponen antropogenik dari matriks. Fitur-fitur tersebut tidak dibahas lebih lanjut karena tidak merefleksikan metabolit endogen *G. verrucosa* dan dikeluarkan dari fokus interpretasi biologis.

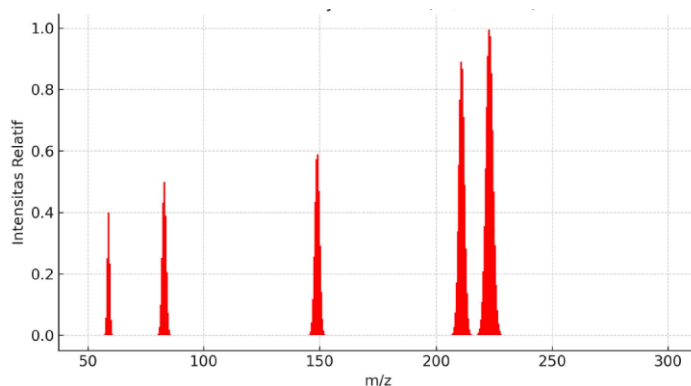


Gambar 1. Kromatogram TIC LC-HRMS ekstrak etanol *G. verrucosa* (mode ESI+, rentang m/z 70–800)

Temuan ini sejalan dengan laporan sebelumnya bahwa genus *Gracilaria* mengandung senyawa semi-polar penting, termasuk fenolik, flavonoid, dan sterol (Gómez-Zorita et al., 2025; Cotas et al., 2020). Profil TIC memberikan gambaran awal tentang kompleksitas metabolit, tetapi anotasi lebih lanjut diperlukan untuk memastikan identitas molekul penyusun puncak-puncak utama. Dalam konteks ini, data LC–HRMS yang dihasilkan tidak hanya menggambarkan pola elusi, tetapi juga menyediakande landasan kuantitatif (jumlah fitur, distribusi RT dan mode ionisasi) yang memperkuat argumen mengenai kekayaan kimiawi ekstrak etanol *G. verrucosa*.

2. Anotasi Senyawa Utama

Identifikasi metabolit dilakukan dengan mengkombinasikan *accurate mass*, waktu retensi, serta pola fragmentasi khas. **Gambar 2** memperlihatkan spektrum MS/MS kandidat 6-hydroxy-3-oxo- α -ionone ($m/z \sim 223$) dan asam jasmonat ($m/z \sim 211$). Fragmen diagnostik keduanya sesuai dengan data pustaka, sehingga memperkuat anotasi sebagai apokarotenoid dan oksilipin. Kedua fitur ini mewakili bagian dari kelompok sinyal oksilipin–apokarotenoid yang terdiri atas beberapa fitur lain dengan m/z dan pola fragmentasi serupa, sehingga bukan hanya bersifat tunggal, tetapi merefleksikan motif struktural yang berulang dalam metabolom set semi-polar *G. verrucosa*.



Gambar 2. Spektrum MS/MS kandidat 6-hydroxy-3-oxo- α -ionone ($m/z \sim 223$) dan asam jasmonat ($m/z \sim 211$)

Secara keseluruhan, hasil anotasi dapat dikelompokkan menjadi lima kelas utama: oksilipin/derivat jasmonat, apokarotenoid tipe ionone, fitosterol, fenolat–flavonoid, serta lipid karnitin. Ringkasan kandidat metabolit ditampilkan pada **Tabel 1**. Kelima kelas ini dihasilkan dari kurasi terhadap ratusan fitur awal (325 fitur), sehingga kelas yang dilaporkan benar-benar merepresentasikan gugus senyawa yang konsisten secara kromatografis, massa, dan fragmentasi, bukan sekadar kecocokan pustaka tunggal.

Tabel 1. Ringkasan kandidat senyawa hasil LC–HRMS ekstrak etanol *G. verrucosa*

| Nama Senyawa | Formula Molekul | m/z [M+H] ⁺ | RT (menit) | Fragmen kunci (m/z) | Kelas Kimia |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------|------------|---------------------|------------------------|
| (-)-Jasmonic acid | C ₁₂ H ₁₈ O ₃ | 211.13 | 7.41 | 59, 83, 151 | Oksilipin/Jasmonat |
| 6-Hydroxy-3-oxo- α -ionone | C ₁₃ H ₁₈ O ₃ | 223.13 | 4.62 | 91, 149, 177 | Apokarotenoid (Ionone) |
| (24S)-Cholest-5-ene-3 β ,7 α ,24-triol | C ₂₇ H ₄₆ O ₃ | 401.34 | 16.27 | 161, 189, 369 | Fitosterol |
| (11Z,14Z)-Eicosadienoylcarnitine | C ₂₇ H ₄₉ NO ₄ | 452.37 | 15.96 | 85, 144, 285 | Lipid Karnitin |
| Flavonoid turunan | – | Beragam | 5–12 | 119, 137, 153 | Fenolat–Flavonoid |

Note : RT = waktu retensi. Fragmen kunci ditentukan dari pola *MS/MS* dan digunakan sebagai dasar anotasi senyawa. Anotasi dilakukan berdasarkan *accurate mass* (≤ 5 ppm), waktu retensi, dan kesesuaian pola fragmentasi dengan pustaka (*mzCloud*, *ChemSpider*, *Lipid Maps*, *NP Atlas*). Tingkat keyakinan anotasi mengikuti standar *Metabolomics Standards Initiative*. Sebagian besar kandidat pada Tabel 1 berada pada tingkat kepercayaan anotasi Schymanski level 2–3, yakni didukung oleh kecocokan spektrum HRMS/MS berkualitas dan fragmen diagnostik yang jelas, meskipun standar autentik belum digunakan untuk konfirmasi penuh.

Kelompok oksilipin/derivat jasmonat terkonfirmasi melalui anotasi asam jasmonat. Senyawa ini dikenal sebagai mediator stres pada alga dan memiliki peran penting dalam mekanisme pertahanan. Dari sisi farmasi, jasmonat terbukti mampu menghambat jalur proinflamasi sehingga potensial sebagai agen antiinflamasi dan imunomodulator (Tavakoli et al., 2020). Kehadiran jasmonat dalam *G. verrucosa* mendukung pemanfaatan alga merah ini sebagai sumber senyawa antiinflamasi alami, melengkapi laporan aktivitas biologis yang sebelumnya hanya berdasarkan uji hayati umum (Putra et al., 2019). Selain asam jasmonat, anotasi juga mengindikasikan keberadaan turunan jasmonat lain (misalnya jasmone dan N-jasmonoyl-dopamine), yang secara keseluruhan memperkuat peran jalur sinyal jasmonat dalam metabolisme sekunder *G. verrucosa*.

Kelompok apokarotenoid tipe ionone diwakili oleh 6-hydroxy-3-oxo- α -ionone. Apokarotenoid merupakan hasil degradasi karotenoid yang berfungsi sebagai molekul sinyal dan antioksidan. Kehadiran apokarotenoid pada *G. verrucosa* memperluas informasi metabolit semi-polar, karena kelompok ini jarang dilaporkan pada studi lokal. Studi global menunjukkan bahwa apokarotenoid dari alga memiliki aktivitas antimikroba dan mendukung adaptasi organisme terhadap stres oksidatif (Yang et al., 2020; Dhargalkar & Verma, 2021). Data LC–HRMS juga mengindikasikan adanya fitur lain dengan kerangka ionone (misalnya β -ionone) pada rentang RT 4–11 menit, yang mengisyaratkan bahwa degradasi karotenoid pada *G. verrucosa* menghasilkan lebih dari satu jenis apokarotenoid.

Kelompok fitosterol ditandai oleh kandidat cholest-triol. Fitosterol diketahui berkontribusi pada kesehatan kardiovaskular dengan mekanisme menurunkan kadar kolesterol darah dan menghambat jalur inflamasi (Gómez-Zorita et al., 2025; Cotas et al.,

2020). Gómez-Zorita et al. (2025) juga melaporkan bahwa alga merah lain kaya akan sterol dengan potensi bioaktivitas tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa *G. verrucosa* Indonesia dapat menjadi sumber alternatif sterol alami yang relevan untuk terapi nutraseutikal. Dalam data ini terdeteksi beberapa kandidat sterol lain (misalnya zymosterol dan turunannya) dengan RT menengah–tinggi, sehingga profil sterol *G. verrucosa* tampak lebih beragam dibandingkan satu molekul penanda tunggal.

Kelompok fenolat–flavonoid muncul dalam rentang waktu retensi 5–12 menit. Senyawa fenolik berperan sebagai antioksidan utama melalui mekanisme penangkapan radikal bebas (Putra et al., 2019). Cotas et al. (2020) menegaskan bahwa fenolat dari alga memiliki aplikasi luas mulai dari pangan fungsional hingga kosmetik, sementara De la Fuente et al. (2021) menunjukkan potensinya sebagai bahan tambahan dalam industri pangan. Dengan demikian, identifikasi fenolat–flavonoid pada *G. verrucosa* memperkuat relevansi biofarmasi dan bioindustri dari spesies ini. Meskipun beberapa anotasi fenolat dan flavonoid masih berada pada level kepercayaan 3 (kerangka struktur), keberadaannya secara konsisten pada rentang RT yang sama dengan fenolat alga pada studi lain mendukung bahwa kelompok ini merupakan bagian nyata dari metabolom semi-polar *G. verrucosa*.

Kelompok terakhir adalah lipid karnitin, yang ditunjukkan oleh kandidat eicosadienoylcarnitine. Acylcarnitine terlibat dalam transportasi asam lemak ke dalam mitokondria dan terkait erat dengan metabolisme energi (Meierhofer, 2019; NIST, 2019). Laporan tentang lipid karnitin pada alga merah masih sangat terbatas, tetapi penelitian metabolomik terbaru menunjukkan bahwa kelas ini dapat berfungsi sebagai biomarker status metabolisme (Kelly et al., 2019; Xi et al., 2021). Kehadiran acylcarnitine pada *G. verrucosa* memberikan perspektif baru yang sebelumnya belum banyak dibahas. Selain eicosadienoylcarnitine, terdeteksi pula satu acylcarnitine rantai lebih pendek dengan RT menengah, yang mengisyaratkan adanya variasi panjang rantai asam lemak pada lipid karnitin *G. verrucosa* dan membuka peluang eksplorasi perannya sebagai penanda status metabolik alga.

Secara keseluruhan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol *G. verrucosa* mengandung beragam senyawa semi-polar dengan fungsi biologis yang saling melengkapi. Oksilipin dan apokarotenoid menegaskan potensi antioksidan dan antimikroba, fitosterol memberikan relevansi antiinflamasi dan hipokolesterolemik, fenolat–flavonoid mendukung kapasitas antioksidan, sementara lipid karnitin memperkenalkan dimensi baru terkait metabolisme energi. Kombinasi hasil ini memperlihatkan kekayaan kimia *G. verrucosa* sekaligus mengisi celah penelitian terdahulu yang hanya berfokus pada aktivitas umum tanpa identifikasi molekul. Dengan adanya informasi jumlah fitur, distribusi waktu retensi, dan pemetaan ke lima kelas kimia utama, kontribusi spesifik studi ini adalah menyediakan kerangka metabolom yang lebih terukur dan dapat direplikasi untuk *G. verrucosa*, yang menjadi pijakan kuat bagi perancangan studi fraksinasi dan uji hayati terarah pada kelompok metabolit yang paling menjanjikan.

KESIMPULAN

Penelitian ini menghasilkan pemetaan komprehensif metabolit sekunder semi-polar ekstrak etanol *Gracilaria verrucosa* berbasis LC–HRMS. Dari 325 fitur ion yang terdeteksi, sejumlah fitur kunci berhasil dianotasi dengan tingkat kepercayaan Schymanski level 2–3 ke dalam lima kelas utama, yaitu oksilipin/derivat jasmonat, apokarotenoid tipe ionone, fitosterol, fenolat–flavonoid, dan lipid karnitin, dengan kandidat penting seperti asam

jasmonat, 6-hydroxy-3-oxo- α -ionone, cholest-triol, turunan flavonoid, serta eicosadienoylkarnitin. Secara spesifik, profil ini memperkaya pemahaman kimiawi *G. verrucosa* yang sebelumnya didominasi oleh laporan fenolik total dan aktivitas antioksidan umum, dengan menyediakan informasi kelas senyawa dan kerangka struktur yang jelas serta dapat ditelusuri kembali melalui data LC–HRMS.

Keterkaitan antara profil kimia dan potensi bioaktivitas juga menjadi lebih terarah: oksilipin/derivat jasmonat dan fitosterol berasosiasi dengan aktivitas antiinflamasi, apokarotenoid tipe ionone serta fenolat–flavonoid mendukung kapasitas antioksidan, sedangkan lipid karnitin terkait regulasi metabolisme energi seluler. Dengan demikian, temuan ini tidak hanya menegaskan bahwa *G. verrucosa* merupakan sumber potensial metabolit bioaktif, tetapi juga mengidentifikasi kelompok senyawa yang paling relevan untuk ditindaklanjuti melalui fraksinasi, isolasi, elusidasi struktur, dan uji farmakologis. Profil metabolit yang dihasilkan menyediakan landasan kimiawi yang lebih jelas bagi pengembangan *G. verrucosa* dalam bidang farmasi dan bioteknologi kelautan.

PENGAKUAN/ACKNOWLEDGEMENTS

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (DPPM) Kemendikristek atas dukungan pendanaan hibah melalui Program Penelitian Dosen Pemula Tahun Anggaran 2025 berdasarkan kontrak pelaksanaan Nomor 127/C3/DT.05.00/PL/2025. Dukungan pendanaan ini sangat berperan dalam kelancaran pelaksanaan seluruh rangkaian penelitian.

DAFTAR REFERENSI

1. Cotas, J., L. Leandro, A. Pacheco, et al. "Seaweed Phenolics: From Extraction to Applications." *Marine Drugs* 18, no. 8 (2020): 384.
2. De la Fuente, G., M. S. Palacio, and R. D. Enriz. "Metabolites with Antioxidant Activity from Marine Macroalgae." *Antioxidants* 10, no. 9 (2021): 1431.
3. Dhargalkar, K., and P. Verma. "Bioactive Metabolites from Marine Algae as Potent Pharmacophores." *Molecules* 26, no. 1 (2021): 37.
4. Gómez-Zorita, S., N. Martínez-González, and M. Á. Martínez. "Bioactive Compounds of Marine Algae and Their Potential Health and Environmental Applications." *Marine Drugs* 23, no. 4 (2025): 152.
5. Hughes, A. H., F. Magot, A. F. Tawfike, C. Rad-Menéndez, N. Thomas, L. C. Young, et al. "Exploring the Chemical Space of Macro- and Micro-Algae Using Comparative Metabolomics." *Microorganisms* 9, no. 2 (2021): 311.
6. Kelly, R. S., K. A. Praud, L. M. Kachroo, et al. "Filtering Procedures for Untargeted LC-MS Metabolomics Data." *BMC Bioinformatics* 20 (2019): 487.
7. Meierhofer, D. "Acylcarnitine Profiling by Low-Resolution LC-MS." *PLOS ONE* 14, no. 8 (2019): e0221342.
8. NIST. "Mass Spectral Library of Acylcarnitines Derived from Human Urine." National Institute of Standards and Technology (2019).
9. Pereira, H., et al. "Seaweed Metabolomics: Current Knowledge and Future Perspectives." *Algal Research* 66 (2022): 102751.
10. Putra, R. A., A. Djunaedi, S. Suryono, G. W. Santosa, and S. Sunaryo. "Potensi Antioksidan Rumput Laut *Gracilaria verrucosa* dari Pantai Gunung Kidul, Yogyakarta." *Jurnal Kelautan Tropis* 22, no. 1 (2019): 81–86.

11. Sibero, M. T., A. M. Savitri, E. H. Frederick, and S. Sedjati. "Metabolites Alteration and Antioxidant Activity of *Gracilaria verrucosa* after Fermentation Using *Aureobasidium melanogenum* MTGK.31." *Squalen Bulletin* 18, no. 1 (2023): 9–20.
12. Tavakoli, S., A. F. Lehner, and O. Werz. "Mammalian-Like Inflammatory and Pro-Resolving Oxylipins: Are They Produced by Marine Algae?" *ChemBioChem* 21, no. 17 (2020): 2326–2346.
13. Wijesekara, I., and S.-K. Kim. "Exploring Bioactive Properties of Marine Algae." *Marine Drugs* 12, no. 7 (2014): 4009–4051.
14. Xi, M., L. O. Dragsted, M. Tullin, et al. "Discovery of Urinary Biomarkers of Seaweed Intake Using Untargeted LC–MS Metabolomics in a Three-Way Cross-Over Human Study." *Metabolites* 11, no. 1 (2021): 11.
15. Yang, Y., Q. Liu, Y. Liang, et al. "Apocarotenoids as Bioactive Compounds from Marine Algae." *Molecules* 25, no. 7 (2020): 1643.