

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan terbesar di dunia, dengan sekitar 75% wilayah kedaulatannya terdiri atas lautan. Kekayaan hayati laut Indonesia menjadikannya dikenal sebagai salah satu negara dengan keanekaragaman hayati tertinggi di dunia, atau disebut juga sebagai "*Mega Biodiversity Country*". Salah satu biota laut yang memiliki potensi besar adalah tumbuhan laut, khususnya algae. Menurut penelitian Mulawarmanti (2018), lebih dari 10.000 senyawa bioaktif berhasil diekstraksi dari berbagai jenis biota laut. Senyawa-senyawa bioaktif ini berpotensi besar sebagai bahan baku obat dan memberikan prospek baru dalam pengembangan pengobatan berbagai jenis penyakit (Mulawarmanti, 2019).

Rumput laut, atau ganggang laut, atau alga, adalah komoditas ekspor yang sangat menguntungkan. Kandungan nutrisi rumput laut sangat beragam tergantung pada spesies, tingkat kedewasaan, dan kondisi lingkungan, termasuk kualitas air laut, cahaya, dan jumlah air. Perubahan dalam kondisi ekologi sangat mempengaruhi kandungan nutrisi rumput laut. Alga merah (*Rhodophyta*) adalah kelompok rumput laut dengan spesies paling banyak. Salah satu alga yang dapat memberikan keuntungan yaitu alga laut *Eucheuma spinosum* serta salah satu spesies alga merah yang paling banyak dibudidayakan. *Eucheuma spinosum* adalah jenis alga berpotensi ekonomis tinggi yang mengandung vitamin, mineral, serat, natrium, kalium, dan senyawa bioaktif hasil dari metabolit sekunder. *Eucheuma spinosum* bernilai ekonomis karena Teknik budidaya yang mudah dan murah. Kandungan nutrisi *Eucheuma spinosum* yang diperoleh di berbagai tempat perairan di seluruh dunia telah menjadi subjek beberapa penelitian (Siddique et al., 2013; Nurjannah et al., 2017; Xiren dan Aminah, 2017; Diharmi dan Irasari, 2020; Lumbessy et al., 2019). Hasil dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa, meskipun spesies yang sama, kandungan nutrisi *Eucheuma spinosum* sangat berbeda pada berbagai perairan (Lumbessy et al., 2020; Yoga dan Komalasari, 2022).

Kandungan asam amino dalam rumput laut menentukan tingkat protein yang berbeda. Protein dibentuk dari beberapa asam amino yang diikat oleh peptida (Gazali et al., 2018). Peptida bioaktif adalah zat organik yang terdiri dari asam amino yang bergabung dengan ikatan kovalen. Peptida bioaktif dapat mempengaruhi efek fisiologis tubuh, salah satunya yaitu kekebalan tubuh. Selain itu, peptida memiliki kemampuan untuk memicu berbagai reaksi yang bermanfaat bagi tubuh, termasuk aktivitas imunomodulator atau imunostimulan, serta memiliki banyak keuntungan, seperti tingkat toksisitas yang rendah dan risiko efek samping yang rendah. Sebagian besar peptida bioaktif dibuat melalui aktivitas protease asli atau melalui penambahan enzim secara sengaja (Sinthary dan Arief, 2023).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Chen et al. (2019) menemukan potensi bioaktif yang telah diuji dari ekstrak alga, yaitu senyawa bioaktif seperti

fenolik, polisakarida, dan siponaxantin dan menunjukkan sifat antioksidan, antikoagulan, dan imunostimulan yang tinggi, serta mencegah kanker dan menghalangi glikogenesis. Adapun hasil penelitian Asmi (2021), menunjukkan bakteri laut dapat menjadi metabolit bioaktif dan dapat menjadi sumber bahan baku obat. Protein memainkan peran kunci dalam struktur dan fungsi semua sel hidup dan virus dan merupakan molekul yang paling banyak dipelajari dalam biokimia, yang ditemukan oleh Jacob Berzelius pada tahun 1838 (Ayun et al., 2023).

Alga laut sangat penting untuk membentuk ekosistem perairan pantai. Alga laut tidak hanya merupakan bagian penting dari produksi primer, tetapi juga merupakan tempat berlindung dan mencari makan bagi banyak spesies invertebrata. Banyak mikroorganisme tinggal di permukaan tubuh alga laut. Ada bukti bahwa mikroorganisme yang berasosiasi dengan alga bertanggung jawab secara khusus untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup alga sebagai inangnya. Mikroorganisme asosiatif pada alga juga dapat membantu pertumbuhan berbagai jenis alga. Mikroorganisme juga bertanggung jawab atas pelepasan spora alga serta meningkatkan penyediaan nutrisi untuk alga (Taarelun et al., 2020).

Adapun penelitian terdahulu berdasarkan Abbas et al (2023), menyatakan bahwa penggunaan ekstrak *Sargassum dentifolium* sebagai imunostimulan pada udang *litopenaeus vannamei* dapat meningkatkan pertumbuhan udang *vannamei*. Dengan dosis pakan optimal 3 g ekstrak *Sargassum dentifolium* per kilogram. Pada akhirnya, penelitian menunjukkan bahwa penambahan polisakarida dari ekstrak *Sargassum dentifolium* dapat meningkatkan ekspresi gen pertumbuhan, gen imun, gen stres yang diamati dari jaringan otot udang. Ekspresi gen pertumbuhan yang lebih tinggi pada udang yang diberikan ekstrak menunjukkan bahwa reaksi imun meningkat dan berdasarkan Angulo et al. (2020) menyatakan bahwa pemberian pakan yang diperkaya dengan ekstrak alga coklat *Sargassum sp.* sebagai imunostimulan pada kambing muda (*goat kids*) dapat meningkatkan respons kekebalan tubuh secara signifikan. Dengan dosis suplementasi pakan sebesar 2,5% dan 5% selama 70 hari, penelitian menunjukkan adanya peningkatan aktivitas enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD) dan katalase (CAT), serta peningkatan konsentrasi imunoglobulin IgA dan IgG baik di serum maupun mukosa usus. Hasil ini menunjukkan bahwa kandungan polisakarida dan senyawa bioaktif lain dalam *Sargassum spp.* berperan dalam merangsang sistem imun bawaan dan adaptif. Oleh karena itu, penggunaan ekstrak *Sargassum spp.* terbukti efektif dalam meningkatkan status imun dan kesehatan hewan melalui penguatan sistem pertahanan tubuh.

Berdasarkan informasi latar belakang, proses isolasi protein dari bakteri relatif lebih mudah dilakukan karena bakteri dapat dikultur dengan mudah di laboratorium dalam kondisi yang terkontrol. Banyak bakteri laut yang hidup bersimbiosis dengan alga merah, seperti *Eucheuma spinosum*, yang diketahui dapat menghasilkan senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh bakteri simbiosis ini memiliki potensi untuk serupa atau bahkan mirip dengan senyawa yang diproduksi oleh inangnya. Berdasarkan hal ini, penelitian ini bertujuan untuk melakukan studi in vivo yang lebih mendalam terhadap protein bioaktif yang diisolasi dari bakteri simbiosis yang berasosiasi dengan *Eucheuma spinosum*.

1.2 Teori

1.2.1 Alga (Rumput Laut)

Indonesia sebagai negara kepulauan, memiliki kekayaan sumber daya hayati kelautan yang sangat melimpah dan potensi besar untuk dioptimalkan, baik dalam sektor ekonomi, lingkungan, maupun kesehatan (Yoga dan Komalasari, 2022). Salah satu sumber daya hayati laut yang tumbuh subur di perairan Indonesia adalah rumput laut, yang memiliki berbagai manfaat dan potensi untuk dikembangkan dalam berbagai industri, seperti pangan, kosmetik, dan farmasi (Komala dan Husni, 2021). Perairan Indonesia yang relatif jernih dan iklim tropisnya yang mendukung memungkinkan budidaya rumput laut dilakukan sepanjang tahun. Luas area budidaya rumput laut diperkirakan mencapai 1.110.900 hektar, yang tersebar mulai dari Maluku, Gorontalo, Sulawesi Tengah, Sulawesi Selatan, Sulawesi Tenggara, Nusa Tenggara Timur, Nusa Tenggara Barat, Bali, Jawa Timur, Jawa Barat, hingga Sumatera. Meskipun demikian, sekitar 222.180 hektar, atau sekitar 20% dari total area budidaya, hanya dimanfaatkan sebagai penghasil rumput laut. Rumput laut merupakan alga makro dengan biomassa yang melimpah dan banyak ditemukan di daerah pasang surut yang mendapat sinar matahari cukup (Wahyuni, 2021). Dalam ilmu pengetahuan, rumput laut juga dikenal sebagai ganggang (*algae*), termasuk dalam kelompok makroalga dan merupakan tumbuhan berklorofil. Semua bagian dari tanaman rumput laut ini disebut talus (Nasmia et al., 2020).

Alga berukuran besar (makroalga) merupakan salah satu sumber daya hayati kelautan yang melimpah di Indonesia, dengan potensi yang sangat besar untuk dimanfaatkan. Terdapat tiga kategori utama makroalga, yaitu *Chlorophyta* (alga hijau), *Phaeophyta* (alga coklat), dan *Rhodophyta* (alga merah). Ketiga jenis alga ini memiliki beragam manfaat yang tidak hanya terbatas pada pemanfaatan di industri makanan, tetapi juga di sektor kosmetik, farmasi, serta kedokteran (Yoga dan Komalasari, 2022). Rumput laut, khususnya alga merah, telah terbukti menghasilkan senyawa metabolik aktif yang memiliki potensi besar dalam mendukung kesehatan manusia, seperti sifat antioksidan, antikanker, dan antiinflamasi yang bermanfaat dalam pencegahan berbagai penyakit (Wahyuni, 2021). Di antara berbagai jenis alga, alga merah (*Rhodophyta*) dikenal luas karena manfaatnya yang signifikan dan sering digunakan sebagai bahan dasar dalam produk olahan rumput laut, salah satunya yaitu produk kesehatan yang kaya akan nutrisi (Yoga dan Komalasari, 2022).

Masyarakat Indonesia telah lama mengandalkan rumput laut, yang termasuk dalam kelompok makroalga, sebagai salah satu sumber pendapatan utama, bahkan di beberapa daerah, rumput laut telah menjadi mata pencaharian utama. Perairan Indonesia yang mencakup sekitar 70% dari total luas wilayah nusantara, memiliki potensi besar untuk usaha budidaya laut, salah satunya adalah budidaya rumput laut. Beberapa jenis rumput laut yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan dapat dibudidayakan dengan baik di perairan Indonesia antara lain *Eucheuma sp.* dan *Gracilaria sp.* (Sarita et al., 2021). Keunggulan ini menjadikan rumput laut sebagai salah satu komoditas perairan yang sangat berharga, baik dari sisi ekonomi maupun

ekologi, dan berperan penting dalam mendukung ketahanan pangan serta kesejahteraan masyarakat pesisir (Nasmia et al., 2020).

1.2.2 Alga Merah (*Eucheuma spinosum*)

Eucheuma spinosum memiliki morfologi berbentuk *thallus silindris* dan percabangan *thallus* berujung runcing atau tumpul dengan ditumbuhi nodulus. Ciri-ciri morfologi rumput laut menunjukkan bahwa rumput laut termasuk dalam jenis Alga Merah (*Rhodophyta*) (Sarita et al., 2021). Alga laut merah, seperti *Eucheuma spinosum*, biasanya tumbuh di perairan yang tersebar luas di hampir semua perairan Indonesia. Rumput laut memiliki banyak manfaat, termasuk kemampuan untuk digunakan sebagai sumber antioksidan. Selain sebagai penghasil karagenan, *Eucheuma spinosum* merupakan salah satu jenis rumput laut yang paling dicari, karena berperan sebagai antioksidan (Komala dan Husni, 2021).

1.2.3 Hidrolisis Protein

Hidrolisis protein merupakan protein yang mengalami degradasi hidrolitik dengan asam, basa, atau enzim proteolitik yang menghasilkan produk berupa asam amino dan peptida. Penggunaan enzim dalam menghidrolisis protein dianggap paling aman dan menguntungkan. Hal ini disebabkan kemampuan enzim dalam menghidrolisis protein dapat menghasilkan produk hidrolisat yang terhindar dari perubahan dan kerusakan produk. Hidrolisis protein dipengaruhi oleh konsentrasi bahan penghidrolisis, suhu, pH dan waktu hidrolisis (Kurniawan et al., 2012).

Hidrolisis enzimatis dilakukan dengan menggunakan enzim, baik satu jenis enzim atau beberapa jenis enzim yang berbeda. Besarnya aktivitas enzim dipengaruhi beberapa faktor antara lain: pH, suhu, dan konsentrasi enzim. Hidrolisis enzimatis lebih menguntungkan daripada hidrolisis secara kimia, karena tidak mengakibatkan kerusakan asam amino dan asam amino bebas serta peptida dengan rantai yang dihasilkan lebih bervariasi. Reaksi dapat dipercepat, tingkat kehilangan asam amino esensial lebih rendah, biaya produksi relatif murah dan menghasilkan komposisi asam tertentu terutama peptida rantai pendek (dipeptida dan tripeptida) yang mudah diabsorpsi oleh tubuh (Yana dan Permatasari, 2022).

Hidrolisis protein secara enzimatis memiliki sejumlah kelebihan dibandingkan dengan hidrolisis protein menggunakan asam dan alkali. Salah satu keuntungan utama adalah bahwa produk peptida yang dihasilkan memiliki komposisi dan urutan asam amino yang spesifik, sesuai dengan jenis protease yang digunakan. Proses hidrolisis enzimatis berlangsung pada kondisi yang lebih mild (tidak pada kondisi ekstrem) dibandingkan dengan hidrolisis menggunakan asam atau basa, yang memungkinkan reaksi berlangsung dengan lebih terkontrol tanpa merusak struktur asam amino yang dihasilkan. Sebaliknya, hidrolisis menggunakan NaOH cenderung merusak asam amino esensial, seperti triptofan, sistein, atau serin, serta dapat mengubah konformasi struktur L-asam amino menjadi D-asam amino, yang bentuknya tidak dapat dimetabolisme atau dikonsumsi oleh manusia. Dengan

demikian, hidrolisis enzimatis lebih aman dan efektif dalam menghasilkan peptida dengan kualitas yang lebih baik dan lebih terjaga (Restiani, 2016).

1.2.4 Peptida Bioaktif

Peptida bioaktif didefinisikan sebagai fragmen protein yang memiliki efek positif terhadap fungsi, kondisi dan kesehatan tubuh. Peptida bioaktif dapat tersedia secara alami ataupun terbentuk selama proses proteolisis baik melalui hidrolisis enzimatis *in vitro*, fermentasi, maupun pemecahan selama pencernaan makanan di saluran cerna. Peptida ini bisa saja tidak memiliki aktivitas dalam bentuk rantai protein, namun kemudian diubah menjadi bentuk aktifnya setelah mengalami proses metabolisme enzimatis pada saluran cerna, fermentasi, pematangan ataupun proses penyiapan makanan yang lain (Rusydan dan Zulfaidah., 2024).

Peptida bioaktif umumnya terdiri dari 2 hingga 20 residu asam amino dengan bobot 0,4-2 kDa. Umumnya peptida bioaktif dikelompokkan menjadi dua jenis: endogen, yang diproduksi oleh sel di dalam tubuh, dan juga eksogen, yang didapat dari sumber luar seperti obat, suplemen dan makanan (Rusydan dan Zulfaidah., 2024). Peptida bioaktif menjadi subjek penelitian yang berharga dikarenakan potensinya untuk mengatur berbagai fungsi fisiologis, seperti sistem kardiovaskular, endokrin, imun, dan syaraf. Selain itu, beberapa penelitian terakhir menunjukkan bahwa peptida bioaktif juga memiliki potensi sebagai antiinflamasi, antidiabetes, antiobesitas, antihiperlipidemia imunoregulator, imunostimulan, sitoregulator, dan aktivitas opioid. Peptida bioaktif diduga memiliki spesifisitas yang tinggi pada jaringan target, sedikit atau bahkan tidak toksik, tidak mengalami akumulasi pada tubuh, serta mudah terdegradasi di lingkungan (Rusydan dan Zulfaidah., 2024).

1.2.5 Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Tanaman menghasilkan berbagai senyawa metabolit sekunder yang bersifat toksik dan memiliki potensi besar dalam pengobatan berbagai jenis penyakit pada manusia. Golongan senyawa metabolit sekunder ini meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid, dan triterpenoid, yang masing-masing memiliki aktivitas biologis yang signifikan. Senyawa-senyawa ini, meskipun bersifat toksik pada dosis tertentu, dapat memberikan manfaat kesehatan jika digunakan dengan tepat. Untuk menilai potensi toksik senyawa-senyawa tersebut, dapat dilakukan analisis kemampuan sitotoksiknya melalui metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode BSLT adalah salah satu cara yang paling efektif dan umum digunakan untuk mengetahui tingkat toksisitas terhadap sel (sitotoksik) dari suatu senyawa yang dihasilkan oleh ekstrak tanaman, dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai bioindikator. Keunggulan metode BSLT terletak pada biaya yang relatif murah, prosedur yang mudah dan cepat, serta hasil yang akurat dalam menilai potensi toksik senyawa tanaman (Baud et al., 2014).

1.2.6 Uji Antioksidan dengan Metode DPPH

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat, dan mencegah proses oksidasi lipid. Antioksidan juga biasa didefinisikan sebagai zat yang mampu mencegah terbentuknya radikal bebas (peroksida) yang terlibat dalam oksidasi lipid (Lung dan Destiani, 2017). Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut bisa terhambat. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas (Winarsi, 2007). Salah satu metode yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH, akan menetralkan radikal bebas dari DPPH dan membentuk DPPH tereduksi. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang (Malangngi, 2012).

Senyawa antioksidan semakin berkembang pemanfaatannya pada bidang dan kesehatan. Pada bidang kesehatan senyawa antioksidan memiliki peranan yang sangat penting. Mekanisme kerja senyawa antioksidan dalam mencegah penyakit kronis tersebut adalah dengan cara menangkap radikal bebas dalam tubuh. Senyawa antioksidan banyak ditemukan pada tumbuhan, baik pada bunga, daun maupun buah. Tumbuhan yang mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, dan terpenoid merupakan bahan baku yang potensial yang dapat digunakan sebagai antioksidan alami (Purwanto et al., 2017).

1.3 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang maka maksud dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana mengisolasi dari bakteri epifit simbiosis alga laut yang dapat bersifat imunostimulan?
2. Bagaimana pemurnian protein dan peptida bioaktif yang dihasilkan memiliki sifat imunostimulan?
3. Bagaimana menghidrolisis protein bakteri epifit simbiosis alga laut menjadi peptida bioaktif sebagai imunostimulan?

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh isolat bakteri epifit simbiosis alga laut yang berpotensi menghasilkan peptida bersifat imunostimulan.
2. Memperoleh protein murni dari bakteri epifit simbiosis alga laut yang berpotensi sebagai imunostimulan.
3. Memperoleh hasil hidrolisis protein bakteri epifit simbiosis alga laut menjadi peptida bioaktif sebagai imunostimulan.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian adalah memberikan informasi ilmiah mengenai bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum*, khususnya terkait dengan isolasi dan karakterisasi bakteri epifit simbion alga laut yang berpotensi menghasilkan peptida yang memiliki sifat imunostimulan. Penelitian ini juga dapat memperluas wawasan mengenai potensi mikroba laut sebagai sumber bioaktif alami yang dapat dimanfaatkan untuk kepentingan kesehatan dan bioteknologi.

BAB II

METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam percobaan ini adalah isolat bakteri simbiosis alga merah *Eucheuma spinosum*, media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB), *Bovine Serum Albumin* (BSA), serbuk DPPH (2,2-Difenil-2-Pikrilhidrazil), Tris (*hidroksimetil*) amino metana, asam trikloroasetat (TCA) 20%, HCl (Merck), NaCl (Merck), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, β -merkaptotanol, Triton X-100, metanol p.a, folin ciocalteu, Na_2CO_3 , NaOH (Merck), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Natrium K-tartrat, CuSO_4 , CaCl_2 , telur *Artemia Salina* Leach, air laut steril, buffer A, buffer B, buffer C, Lowry A, Lowry B, enzim pepsin, hewan uji (tikus), akuades, alkohol, kertas saring, kapas, kasa, tali, spiritus, es batu, parasetamol 500 mg, tinta india (Winsor & Newton Black Ink), CMC Na dan Asam Asetat 0,1%, pH meter, label, *tissue roll*, plastik wrap, plastik tahan panas, kertas saring, sabun dan aluminium foil.

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam percobaan ini adalah neraca analitik, *cool box*, *magnetic stirrer*, spektrofotometer *Ultraviolet-Visible*, *sentrifuge*, mikropipet, tip, *shaker incubator*, inkubator, *autoclave*, membran MWCO, *vortex*, *ependorf tube*, *falcon tube*, botol vial, seperangkat alat BSLT, enkas, pinset, labu semprot, lemari pendingin, *hot plate*, cawan petri, jarum ose, bunsen, spuit intravena, mortir dan alu, jarum sonde oral, tabung *vacutainer*, pipa kapiler dan alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Juli 2024 s.d Mei 2025 di Laboratorium Biokimia, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Bioteknologi Terpadu, Fakultas Peternakan, dan Laboratorium Biofarmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Pembuatan Media

2.4.1.1 Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA). Media *Nutrient Agar* (NA) dibuat dengan menimbang media *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 1 gram, yang kemudian dimasukkan dan dilarutkan dalam 50 mL aquades yang sebelumnya telah disterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C dan tekanan 2 atm. Selanjutnya media *Nutrient Agar* (NA) ditunggu hingga dingin dan memadat,

sehingga dapat dituang secara aseptis pada cawan petri yang sudah steril sebanyak ± 20 mL. Dibiarkan dingin dan memadat (Zamilah et al., 2020).

2.4.1.2 Pembuatan Media *Nutrient Broth* (NB). Media *Nutrient Broth* (NB) dibuat dengan menimbang media NB sebanyak 8 gram, dimasukkan kedalam erlenmeyer 1000 mL. Kemudian media disterilkan dengan cara di *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121 °C (Mahmudah dan Atun, 2017).

2.4.1.3 Pembuatan Media Inokulum. Sebanyak 4 gram Media *Nutrient Broth* (NB) dilarutkan dalam 500 mL akuades. Disterilisasi dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C. Diambil 1-2 koloni bakteri yang telah ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* (NA) yang telah memadat menggunakan jarum ose steril. Selanjutnya koloni bakteri dimasukkan ke dalam media cair yang telah disterilisasi. Kemudian bakteri pada media cair diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C serta di shaker dengan kecepatan 150 rpm (Mahmudah dan Atun, 2017; Maryanty et al., 2019).

2.4.1.4 Pembuatan Media Produksi. Media Inokulum diambil sebanyak 10% ditambahkan pada medium kultur bakteri baru. Tahap berikutnya erlenmeyer yang telah berisikan medium produksi dan starter diinkubasi selama 60 jam menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm. Media kultur diambil setiap 6 jam dan dilakukan pengukuran kadar protein (Yogyawasari et al., 2016; Budi et al., 2018).

2.4.2 Pembuatan Buffer

2.4.2.1 Pembuatan Buffer A (Buffer Lisis). Tris (Hidroksimetil) aminometana sebanyak 6,05 g dilarutkan dengan akuades sampai 125 mL. Kemudian ditambahkan HCl 2 M sedikit demi sedikit sambil diatur pH-nya hingga mencapai pH 8,3. Selanjutnya ditambahkan NaCl sebanyak 58,5 g dan 0,555 g CaCl_2 , 5 mL β -mercaptoetanol dan 2,5 mL triton X-100 kemudian dicukupkan volumenya sampai 500 mL dengan akuades (Karim et al., 2019).

2.4.2.2 Pembuatan Buffer B. Tris (Hidroksimetil) aminometana sebanyak 6,05 g dilarutkan dengan akuades sampai 125 mL. Kemudian ditambahkan HCl 0,2 M sedikit demi sedikit sambil diatur pH-nya hingga mencapai pH 8,3. Selanjutnya ditambahkan NaCl sebanyak 5,85 g dan 0,555 g CaCl_2 , kemudian dicukupkan volumenya sampai 500 mL dengan akuades (Karim et al., 2019).

2.4.2.3 Pembuatan Buffer C. Tris (Hidroksimetil) aminometana sebanyak 0,605 g dilarutkan dengan akuades sampai 125 mL. Kemudian ditambahkan HCl 2 M sedikit demi sedikit sambil diatur pH-nya hingga mencapai pH 8,3. Selanjutnya ditambahkan

NaCl sebanyak 5,85 g dan 0,555 g CaCl_2 , kemudian dicukupkan volumenya sampai 500 mL dengan akuades (Karim et al., 2019).

2.4.3 Peremajaan Isolat Bakteri Simbion Alga Merah

Bakteri epifit yang digunakan sebelumnya telah diisolasi dan diidentifikasi jenis bakterinya. Bakteri epifit yang telah diisolasi dan diidentifikasi jenis bakterinya kemudian dilakukan peremajaan. Isolat murni sebanyak 1-2 ose diinokulasikan ke dalam 500 mL medium *Nutrient Broth* (NB) yang telah disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit dan diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 24 jam pada suhu 37°C . Kemudian, dituang pada cawan petri steril yang berisi media *Nutrient Agar* (NA) yang telah memadat, lalu diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu 37°C . Isolat yang telah dikondisikan pada suhu ruang kemudian diinokulasi kembali dalam media *Nutrient Agar* (NA) baru dengan jarum ose steril. Hasil inokulasi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam (Sriningsih dan Shovitri., 2015;Astari et al., 2021;Handayani et al., 2016).

2.4.4 Penentuan Waktu Optimum Bakteri Simbion Alga Merah *Eucheuma spinosum*

Optimasi pertumbuhan dan produksi optimum isolat bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum* dilakukan dengan memindahkan kultur murni dari media NA yang telah diremajakan sebanyak 2–3 ose ke dalam 250 mL media inokulum steril dalam erlenmeyer, lalu diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu 37°C dan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Sebanyak 10% inokulum aktif kemudian diinokulasikan ke dalam 500 mL media produksi steril (*Nutrient Broth*) dan diinkubasi kembali dalam *shaker incubator* pada suhu 37°C dan kecepatan 150 rpm selama ± 3 hari. Pengambilan sampel dilakukan setiap 6 jam selama 60 jam untuk memantau pertumbuhan bakteri melalui pengukuran *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm (Oktavia et al., 2018; Mardiana, 2019; Asmi, 2021).

2.4.5 Produksi Protein dari Isolat Bakteri Simbion Alga Merah *Eucheuma spinosum*

Isolat bakteri hasil peremajaan diambil 2-3 ose, dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi media inokulum steril, lalu diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm dan pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, diinokulasikan kultur bakteri sebanyak 10% ke dalam 1000 mL media produksi steril, kemudian dikocok dalam *shaker incubator* pada kecepatan 150 rpm dan suhu 37°C selama waktu produksi optimum. Setelah itu, media produksi yang mengandung kultur dipisahkan dengan disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm dan suhu 4°C selama 30 menit. Filtrat yang merupakan ekstrak kasar protein ekstraseluler dan endapan yang merupakan protein intraseluler dipisahkan, kemudian protein intraseluler

ditambahkan buffer A, lalu disimpan di dalam lemari es untuk proses selanjutnya (pemurnian) (Asmi, 2021).

2.4.6 Pemurnian Protein Bioaktif dari Bakteri Epifit Simbion Alga Merah *Eucheuma spinosum*

Filtrat yang diperoleh ditambahkan ammonium sulfat secara bertahap sesuai dengan tingkat kejenuhan, kemudian didiamkan selama 24 jam dalam lemari es, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 °C selama 30 menit. Filtrat dan endapan yang didapat dari setiap sentrifugasi tersebut dipisahkan, kemudian endapan dilarutkan kembali dalam buffer B hingga larut. Langkah-langkah tersebut dilakukan untuk ammonium sulfat dengan kejenuhan F1 (0-40%); F2 (40-60%); F3 (60-80%); F4 (80-100%). Adapun fraksi yang telah dilarutkan tersebut disimpan dalam lemari es dan diuji kadar proteinnya (Rohmah et al., 2019).

2.4.7 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

2.4.7.1 Pembuatan Larutan Standar. Kadar protein dari hasil pemurnian ditentukan berdasarkan metode Lowry. Kadar protein dalam sampel selama pemurnian ditentukan dengan cara membuat larutan induk protein Bovine Serum Albumine (BSA) dengan konsentrasi 1 mg/mL. Kemudian membuat larutan standar protein Bovine Serum Albumine (BSA) dengan berbagai tingkat konsentrasi 0,02 mg/mL; 0,04 mg/mL; 0,08 mg/mL; 0,16 mg/mL; dan 0,32 mg/mL dimasukkan ke dalam deret tabung reaksi dan dicukupkan volumenya hingga 2 mL, kemudian ditambahkan 2,75 mL reagen lowry B dan dicampur merata dan didiamkan selama 15 menit pada suhu kamar. Selanjutnya, ditambahkan 0,25 mL reagen Lowry A, dikocok merata dengan cepat dan didiamkan selama 30 menit sampai warna biru terbentuk. Diukur absorbansinya pada λ max dan didiamkan kurva standarnya untuk mendapatkan persamaan standar.

2.4.7.2 Penentuan Kadar Protein pada Sampel. Sampel protein sebanyak 2 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan ke dalam masing-masing tabung 2,75 mL reagen Lowry B dan disimpan pada suhu kamar selama 15 menit. Kemudian ditambahkan 0,25 mL reagen Lowry A, dihomogenkan dan disimpan selama 30 menit pada suhu ruang. Kemudian dibaca absorbansi pada panjang gelombang 600 nm dengan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis (Harjanto, 2017; Rohmah et al., 2019). Perhitungan kadar protein enzim dilakukan dengan mensubstitusikan nilai absorbansi larutan yang diperoleh dari hasil pengukuran spektrometri ke dalam persamaan kurva regresi larutan standar protein. Kadar protein dihitung menggunakan persamaan (1) & (2).

$$y=ax+b \quad (1)$$

$$x = \frac{y-b}{a} \text{ fp} \quad (2)$$

Keterangan:

a = slope

b = intersept

y = absorbansi

x = kadar protein (mg/mL)

fp = faktor pengenceran.

2.4.8 Hidrolisis Protein

Ekstrak protein hasil pemurnian dihidrolisis dengan enzim pepsin. Hidrolisis dilakukan pada berbagai variasi waktu (0; 30; 90; 120 menit) dengan perbandingan enzim:substrat 3:100 pada suhu 37 °C untuk menentukan kondisi optimum pada pembuatan hidrolisis protein, kemudian diinaktifkan dengan pemanasan dalam air mendidih selama 10 menit dan disentrifugasi pada 10.000 rpm, suhu 4 °C selama 20 menit. Hidrolisat protein ditentukan derajat hidrolisisnya (DH) lalu disimpan pada suhu -20 °C sebelum digunakan (Ahmad et al., 2021). Hidrolisat yang diperoleh di simpan di freezer untuk selanjutnya di ultrafiltrasi menggunakan membran *cut off* 10 kDa; 5 kDa; 3 kDa dan dilakukan uji toksisitas serta antioksidan (Kusumaningtyas et al., 2015; Yana dan Permatasari, 2022). Derajat hidrolisis (DH) dapat ditentukan dengan menghitung persentase protein dalam TCA 20% dibagi dengan protein terlarut dengan menggunakan rumus pada persamaan (3).

$$\text{DH\%} = \frac{\text{Protein terlarut TCA 20\%}}{\text{Protein total}} \times 100\% \quad (3)$$

2.4.9 Cut Off Peptida dengan Membran MWCO

Membran cut off dibilas dengan buffer C sebanyak 3 kali untuk memastikan bahwa tidak ada kontaminan atau sisa-sisa bahan sebelumnya, dengan masing-masing bilasan dilakukan selama 10 menit. Setelah itu, proses sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 5.500 rpm pada suhu 15 °C. Bilasan kedua dan ketiga dilakukan dengan waktu 5 menit dan pada suhu serta kecepatan yang sama dengan bilasan pertama. Hidrolisat protein yang diperoleh selanjutnya diultrafiltrasi menggunakan membran MWCO berdasarkan berat molekul. Hidrolisat yang telah melalui proses hidrolisis kemudian disentrifugasi menggunakan membran cut off dengan berbagai ukuran 10 kDa, 5 kDa, dan 3 kDa, pada kecepatan 5.500 rpm selama 20 menit pada suhu 15 °C. Penyaringan dilakukan secara bertahap, dimulai dengan menggunakan membran cut off 10 kDa untuk memisahkan peptida yang memiliki ukuran lebih besar dari 10 kDa. Selanjutnya, dilakukan penyaringan dengan membran cut off 5 kDa, untuk memisahkan peptida yang berada pada rentang 10-5 kDa. Terakhir, dilakukan

penyaringan dengan membran cut off 3 kDa untuk memisahkan peptida yang berukuran 5-3 kDa dan peptida yang lebih kecil dari 3 kDa. Proses ini menghasilkan empat fraksi peptida yang berbeda, yaitu peptida yang berukuran >10 kDa, 10-5 kDa, 5-3 kDa, dan <3 kDa. Masing-masing fraksi dipisahkan dalam botol yang berbeda untuk pengujian lebih lanjut. Selanjutnya, hasil dari proses cut off ini diuji untuk menilai tingkat toksisitas serta aktivitas antioksidannya (Lestari dan Giordan, 2020; Lestari et al., 2020; Ahmad et al., 2021).

2.4.10 Penentuan Aktivitas Antioksidan Fraksi Peptida dengan metode DPPH

2.4.10.1 Pembuatan Larutan DPPH 0,4 Mm. Ditimbang sebanyak 0,015 gram DPPH dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian dilarutkan menggunakan pelarut metanol dan ditepatkan volumenya hingga tanda batas. Selanjutnya ukur panjang gelombang maksimum DPPH pada panjang gelombang maksimum 515 nm (Purwanto et al., 2017).

2.4.10.2 Penentuan Larutan Induk Asam Askorbat 500 ppm. Larutan stok asam askorbat 500 ppm 0,1 mL kemudian ditambahkan metanol p.a sebanyak 9,9 mL sehingga didapatkan larutan asam askorbat konsentrasi 5 ppm dengan volume total 10 mL, kemudian dibuat deret standar dengan konsentrasi 5 ppm masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL dan 4 mL ke dalam tabung reaksi yang berbeda untuk membuat deret standar 0,25 ppm; 0,5 ppm; 1 ppm; 2 ppm; dan 4 ppm dengan penambahan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dan dicukupkan dengan metanol p.a masing-masing 3,75 mL; 3,5 mL; 3 mL; 2 mL; dan 0 mL hingga 5 mL untuk masing-masing deret standar. Pengukuran dilakukan dengan cara menginkubasi deret standar asam askorbat dalam ruangan gelap selama 30 menit. Deret standar kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya, masing-masing larutan asam askorbat dengan konsentrasi yang berbeda tersebut diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum (Maesaroh et al., 2018; Suryanita et al., 2019).

2.4.10.3 Penentuan Aktivitas Antioksidan pada Sampel. Sampel yang akan diuji disiapkan terlebih dahulu dengan konsentrasi awal 500 ppm. Untuk membuat deret ukur, sampel tersebut dipipet sebanyak 0,1 mL, 0,2 mL, 0,4 mL, 0,8 mL, dan 1,6 mL, yang kemudian masing-masing diperkirakan untuk mencapai konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 80 ppm, dan 160 ppm. Setelah sampel dipipet, masing-masing volume sampel dimasukkan ke dalam vial, kemudian ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM. Setelah itu, metanol p.a. ditambahkan hingga volume campuran mencapai 5 mL. Campuran ini kemudian dikocok hingga homogen. Selanjutnya, campuran yang telah homogen dibiarkan selama 30 menit dalam kondisi gelap. Setelah waktu inkubasi selesai, aktivitas antioksidan diukur dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis

pada panjang gelombang maksimum 515 nm. Pengukuran absorbansi dilakukan untuk setiap konsentrasi sampel yang telah dibuat (Purwanto et al., 2017).

2.4.11 Uji Toksisitas Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

2.4.11.1 Penyiapan Larva Udang *Artemia salina* Leach. Uji toksisitas dilakukan dengan metode BSLT dilakukan dengan cara menetasakan telur udang 2 hari sebelum dilakukan uji yang diberi penerangan dengan cahaya lampu pijar/neon 40-60 watt untuk menghangatkan. Telur yang telah ditempatkan/direndam pada wadah berisi air laut yang telah di aerasi selama 30 menit sebanyak 300 mL didiamkan selama 2 x 24 jam sampai menetas menjadi benur (*nauplius*) (Kurniawan dan Ropiqa, 2021).

2.4.11.2 Pengujian Toksisitas Fraksi Protein dan Peptida. Tabung reaksi disediakan untuk setiap kelompok fraksi protein sesuai dengan konsentrasi masing-masing 1000 ppm; 100 ppm; dan 10 ppm sebanyak 3 kali (triplo), kemudian 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam dimasukkan dalam tabung reaksi. Air laut steril yang didalamnya terdapat 10 larva udang ditambahkan ke dalam tabung hingga volume akhir menjadi 5 mL dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruangan di bawah lampu pijar 50 watt. Setelah itu, jumlah larva yang mati dan yang hidup dihitung dengan bantuan kaca pembesar serta ditentukan nilai LC50 ($\mu\text{g/mL}$) (Kurniawan dan Ropiqa, 2021). Efek toksik diperoleh dari pengamatan dengan menghitung % kematian (mortalitas) larva *Artemia salina* Leach pada tiap konsentrasi dalam 24 jam. Persen kematian diperoleh dari hasil perkalian rasio dengan 100%, yaitu larva yang mati dibagi jumlah larva awal dikali 100% untuk tiap replikasi. Lalu dibandingkan dengan kontrol dan dilakukan analisis hasil dengan analisis probit sehingga diperoleh harga LC50 (Kurniawan dan Ropiqa, 2021). Jumlah larva yang mati pada sampel uji dan kontrol dihitung kemudian ditentukan % kematiannya menggunakan rumus pada persamaan (4).

$$\% \text{ Kematian larva} = \frac{\sum \text{larva uji yang mati} - \sum \text{larva kontrol yang mati}}{\sum \text{larva uji}} \times 100\% \quad (4)$$

2.4.12 Uji Immunostimulan secara In Vivo

2.4.12.1 Pengelompokkan Hewan Uji. Hewan uji yang digunakan adalah tikus jantan jenis *Wistar*, yang memiliki kondisi sehat, belum pernah diberikan perlakuan sebelumnya, berusia antara dua hingga tiga bulan, dengan berat badan 200 hingga 250 gram, sebanyak 15 ekor. Pemeliharaan tikus dilakukan dalam kandang yang bersih dan steril, sebanyak 5 kandang, dengan masing-masing kandang diisi oleh 3 ekor tikus jantan. Keadaan lingkungan kandang harus dijaga tetap bersih dan steril agar selama periode aklimatisasi selama 7 hari, hewan tetap berada dalam kondisi lingkungan yang stabil dan tidak terkontaminasi. Setelah aklimatisasi, hewan uji

dibagi ke dalam beberapa kelompok perlakuan dengan jumlah 5 ekor per grup, sebagai berikut:

- a) kelompok kontrol normal: tikus diberi pakan standar dan diberikan aquadest sebagai kontrol yang tidak mendapat perlakuan apapun.
- b) kelompok kontrol positif: tikus diberi pakan standar dan diberikan suspensi paracetamol dengan dosis 500 mg/kgBB.
- c) kelompok kontrol negatif: tikus diberi pakan standar dan diberikan suspensi CMC Na 0,5%.
- d) kelompok perlakuan: tikus diberi pakan standar dan diberikan suspensi sampel yang mengandung protein dan peptida bioaktif dengan dua kelompok dosis masing-masing 500 mg/kgBB.

12.4.12.2 Uji Immunostimulan In Vivo. Uji immunostimulan dilakukan dengan uji *carbon clearance* dengan menggunakan tinta india yang akan di uji aktivitas fagositiknya pada 5 kelompok konsentrasi. Uji *carbon clearance* dilakukan pengujian terhadap respon imun non spesifik didasarkan pada aktivitas fagositik. Setiap kelompok perlakuan akan di diberikan suspensi secara oral pada setiap kelompok perlakuan, selama satu kali sehari selama 6 hari. Pada hari ke-7 tikus diambil darah melalui vena sebagai nilai awal (menit ke-0). Kemudian, tikus akan diinjeksikan suspensi karbon 0,1 mL melalui vena ekor tikus. Darah dari tikus akan diambil setiap 4 menit sekali (pada menit 4, 8, 12, dan 16) sebanyak 50 µl lalu ditampung kedalam tube, kemudian dicampur dengan 4 ml asam asetat 0,1%. Sampel divorteks agar sel darah merah lisis, lalu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang 660 nm (Luhurningtyas et al., 2020; Sebayang dan Hasibuan, 2021; Semara et al., 2023; Fauzi et al., 2024).

12.4.12.3 Pembuatan Suspensi Parasetamol. Dimasukkan 2 tablet paracetamol (setiap tablet mengandung 500 mg zat aktif) ke dalam lumpang dan digerus, kemudian ditimbang 71,8 mg. Ditambahkan secukupnya suspensi CMC-Na 1% sampai 10 mL dan dihomogenkan (Sebayang dan Hasibuan, 2021).

12.4.12.4 Pembuatan Suspensi Carbon Clearance. Pembuatan suspensi karbon dilakukan dengan cara disuspensikan 1,6 ml tinta india lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan suspensi CMC-Na 1% sebanyak 8,4 mL yang dilarutkan dalam larutan fisiologis NaCl 0,9% secukupnya dan dihomogenkan (Sebayang dan Hasibuan, 2021).

12.4.12.5 Pembuatan Suspensi CMC Na. Larutan Na CMC 0,5% dibuat dengan aquadest panas berisi 50 mL dimasukkan 0,5 g CMC Na. Dihomogenkan sampai diperoleh suspensi jernih dan ditambahkan sedikit air, disiapkan labu ukur 100 mL

dimasukkan suspensi lalu dicukupkan dengan aquadest sampai batas tanda (Sebayang dan Hasibuan, 2021).