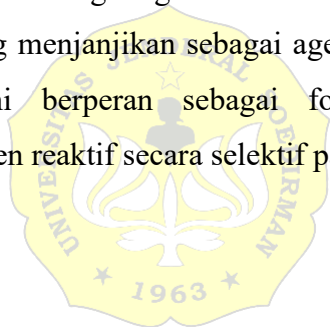


## RINGKASAN

Pantai Sepanjang merupakan kawasan pesisir dengan keanekaragaman makroalga merah (Rhodophyta) yang tinggi. Namun, identifikasi berbasis morfologi sering terkendala oleh plastisitas antarspesies. *DNA barcoding* digunakan sebagai metode yang lebih akurat untuk identifikasi spesies makroalga merah. Hasil genetik yang diperoleh menjadi dasar karakterisasi senyawa bioaktif melalui pendekatan metabolomik *profiling* menggunakan Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS). Pemilihan metode ekstraksi yang tepat dalam hal ini menjadi faktor penting untuk mengoptimalkan perolehan senyawa bioaktif tersebut. Senyawa bioaktif makroalga merah dilaporkan memiliki efek antikanker yang signifikan, sehingga relevan untuk diteliti mengingat kanker masih menjadi tantangan utama dalam dunia medis. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mengungkap identitas genetik makroalga merah melalui pendekatan *DNA barcoding* guna mendukung pemanfaatannya sebagai sumber kandidat agen antikanker berbasis sumber daya lokal.

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif yang dilakukan di kawasan pesisir Pantai Sepanjang. Sebanyak empat sampel makroalga merah dikoleksi pada awal tahun 2024 untuk diidentifikasi lebih lanjut. Identifikasi spesies dilakukan melalui pendekatan *DNA barcoding* menggunakan penanda gen *cox1* (COI-5P), *cox2-3* spacer, dan *rbcL*. Tahapan penelitian meliputi ekstraksi DNA, amplifikasi PCR, sekuensing, hingga analisis filogenetik menggunakan metode bootstrap dan Bayesian Inference. Analisis filogenetik dilakukan menggunakan perangkat lunak BioEdit dan MEGA11. Ekstraksi senyawa bioaktif makroalga merah dilakukan menggunakan metode maserasi bertingkat, *heat-assisted extraction* (HAE), dan *microwave extraction* (ME). Analisis metabolomik berbasis LC-HRMS menghasilkan data spektra massa. Data spektra tersebut dianotasi dan dianalisis menggunakan pendekatan *molecular networking* melalui GNPS dan Cytoscape. Senyawa kandidat yang teridentifikasi ditelusuri potensi antikankernya melalui Scopus.

Hasil identifikasi spesies menunjukkan empat spesimen sebagai *Aneurianna* sp., *Gracilaria* sp., *Gracilaria salicornia*, dan *Acanthophora spicifera*. Maserasi dengan akuades memberikan rendemen tertinggi sebesar 16,475% BK (Berat kering) dalam  $2 \times 24$  jam, sementara metode ME terbukti lebih efisien dengan perolehan 11,24% BK dalam 5 menit. Kedua nilai rendemen tersebut diperoleh dari ekstraksi spesimen *Gracilaria* sp. Rendemen ekstrak cenderung meningkat seiring bertambahnya polaritas pelarut menunjukkan bahwa makroalga merah didominasi oleh senyawa polar dan semipolar. Analisis *molecular networking* berbasis GNPS mendereplikasi empat senyawa utama, yaitu pheophorbide A  $m/z$  539.261  $[M+H]^+$ , erucamide  $m/z$  338.34  $[M+H]^+$ , 13-docosenamide  $m/z$  675.662  $[2M+H]^+$ , dan diacylglycerol-trimethylhomoserine (DGTS)  $m/z$  656.547  $[M+H]^+$ . Berdasarkan penelusuran literatur berbasis Scopus, keempat senyawa tersebut dilaporkan memiliki aktivitas sebagai agen antikanker. Senyawa pheophorbide A menunjukkan potensi paling menjanjikan sebagai agen terapi antikanker berbasis fotodinamik. Senyawa ini berperan sebagai fotosensitizer yang mampu menghasilkan spesies oksigen reaktif secara selektif pada sel kanker.



## SUMMARY

Sepanjang Beach is a coastal area with a high diversity of red macroalgae (Rhodophyta). However, morphology-based identification is often limited by interspecific morphological plasticity. DNA barcoding is employed as a more accurate approach for the identification of red macroalgae species. The genetic results obtained provide a basis for the characterization of bioactive compounds using a metabolomic profiling approach coupled with Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS). The selection of an appropriate extraction method is a critical factor in optimizing the recovery of bioactive compounds. Bioactive compounds derived from red macroalgae have been reported to exhibit anticancer activity, highlighting their relevance for investigation as cancer remains a major challenge in modern medicine. Accordingly, this study aims to elucidate the genetic identity of red macroalgae using a DNA barcoding approach to support their potential utilization as a source of locally derived anticancer agent candidates.

This study employed an exploratory design conducted in the coastal area of Sepanjang Beach. Four red macroalgae samples were collected in early 2024 and identified using a DNA barcoding approach based on the *cox1* (COI-5P), *cox2–3* spacer, and *rbcL* gene markers. The workflow comprised DNA extraction, PCR amplification, sequencing, and phylogenetic reconstruction using bootstrap and Bayesian Inference methods, with analyses performed in BioEdit and MEGA11. Bioactive compounds were extracted using sequential maceration, heat-assisted extraction, and microwave-assisted extraction, followed by LC-HRMS-based metabolomic analysis. Mass spectral data were annotated and analyzed using a molecular networking approach via GNPS and Cytoscape, and the anticancer potential of candidate compounds was assessed through a Scopus-indexed literature search.

Species identification results revealed four specimens as *Aneurianna* sp., *Gracilaria* sp., *Gracilaria salicornia*, and *Acanthophora spicifera*. Maceration using distilled water yielded the highest extraction recovery of 16,475% dry

weight (DW) within  $2 \times 24$  h, whereas the microwave-assisted extraction (ME) method demonstrated higher efficiency, producing an extract yield of 11,24% DW within 5 min. Both yields were obtained from the extraction of *Gracilaria* sp. Specimens. Extract yields tended to increase with increasing solvent polarity, indicating that red macroalgae are predominantly composed of polar and semi-polar compounds. GNPS-based molecular networking dereplicated four major compounds, namely pheophorbide A  $m/z$  539.261  $[M+H]^+$ , erucamide  $m/z$  338.34  $[M+H]^+$ , 13-docosenamide  $m/z$  675.662  $[2M+H]^+$ , and diacylglyceryl-trimethylhomoserine (DGTS)  $m/z$  656.547  $[M+H]^+$ . Based on a Scopus-indexed literature survey, all four compounds have been reported to exhibit anticancer activity. Among them, pheophorbide A showed the most promising potential as a photodynamic-based anticancer therapeutic agent, acting as a photosensitizer capable of selectively generating reactive oxygen species in cancer cells.

