JURNAL PESISIR DAN LAUT TROPIS
E-ISSN: 2339-1537
Vol 14 No. 4 : 329-344 (2026)

Preliminary Characterisation of *Rhizophora apiculata* Fruit Carotenoids by TLC and Zeaxanthin–iNOS Docking

(*Karakterisasi Awal Karotenoid Buah Rhizophora apiculata Menggunakan KLT dan Analisis Penambatan Molekuler Zeaxanthin terhadap iNOS*)

Baba K. Montolalu, Darus Saadah J. Paransa*, Desy M.H. Mantiri, Jane M. Mamuaja, Robert A. Bara, Nickson J. Kawung

Marine Science Study Program, Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Sam Ratulangi University, Manado, Indonesia

(Received 4 Sep. 2026; Revised 22 Sep. 2026; Accepted 17 Okt. 2026)

ABSTRACT. *Rhizophora apiculata* fruit potentially contains carotenoid pigments that may contribute to the biological properties of mangrove plants. This study aimed to separate and preliminarily identify carotenoid pigments from *R. apiculata* fruit and to predict the molecular interaction of zeaxanthin with inducible nitric oxide synthase (iNOS). Pigments were extracted with ethanol, partitioned into an *n*-hexane phase, and separated by thin-layer chromatography on silica gel using acetone-petroleum ether (70:30) as the mobile phase. Pigments were characterized based on zone color, retardation factor (*Rf),* and UV-Vis absorption spectra. Molecular docking was performed against the human iNOS oxygenase domain (PDB ID: 3E7G) using Molegro Virtual Docker 6.0, with AT2 as the co-crystallized ligand for redocking validation. TLC separation produced seven zones with Rf values ranging from 0.62 to 1.00. TLC-derived fraction F1 was orange and exhibited absorption maxima at 425, 453, and 480 nm, supporting its preliminary identification as β-carotene. Fraction F3 was yellow, had an Rf value of 0.83, and showed a maximum absorption at 475 nm, supporting its preliminary identification as zeaxanthin. Redocking validation produced a mean RMSD of 0.9223 ± 0.0372 Å. Zeaxanthin yielded mean MolDock and Rerank Scores of −153.419 ± 19.994 and −120.843 ± 20.801, respectively, which were more negative than those obtained for AT2. Zeaxanthin interacted with several residues also recognized by AT2, including Trp372, Gly371, Trp194, Cys200, Met374, and Met434, with predominantly hydrophobic interactions. These findings provide preliminary evidence for the presence of β-carotene and zeaxanthin in *R. apiculata* fruit and support the predicted interaction of zeaxanthin within the iNOS binding pocket.
Keywords: *Rhizophora apiculate,* carotenoids, thin-layer chromatography, iNOS, molecular docking

ABSTRAK. Buah Rhizophora apiculata berpotensi mengandung pigmen karotenoid yang berkontribusi terhadap aktivitas biologis tumbuhan mangrove. Penelitian ini bertujuan memisahkan dan melakukan identifikasi awal pigmen karotenoid pada buah R. apiculata serta memprediksi interaksi molekuler zeaxanthin terhadap inducible nitric oxide synthase (iNOS). Pigmen diekstraksi menggunakan etanol dan dipartisi ke dalam fase n-heksana, kemudian dipisahkan menggunakan kromatografi lapis tipis pada pelat silika gel dengan fase gerak petroleum eter dan aseton (70:30). Karakterisasi pigmen dilakukan berdasarkan warna zona, nilai retardation factor (Rf), dan spektrum serapan UV-Vis. Penambatan molekuler dilakukan terhadap domain oksigenase iNOS manusia (PDB ID: 3E7G) menggunakan Molegro Virtual Docker 6.0, dengan AT2 sebagai ligan ko-kristal untuk validasi redocking. Pemisahan KLT menghasilkan tujuh zona dengan nilai Rf 0,62-1,00. Fraksi hasil KLT F1 berwarna oranye dengan serapan maksimum pada 425, 453, dan 480 nm sehingga diidentifikasi secara awal sebagai β-karoten, sedangkan F3 berwarna kuning dengan 0,83 dan serapan maksimum pada 475 nm sehingga diidentifikasi secara awal sebagai zeaxanthin. Validasi redocking menghasilkan RMSD rata-rata 0,9223 ± 0,0372 Å. Zeaxanthin memberikan MolDock Score dan Rerank Score rata-rata masing-masing sebesar −153,419 ± 19,994 dan −120,843 ± 20,801, yang lebih negatif dibandingkan AT2. Zeaxanthin berinteraksi dengan beberapa residu yang juga dikenali AT2, yaitu Trp372, Gly371, Trp194, Cys200, Met374, dan Met434, dengan pola interaksi yang didominasi kontak hidrofobik. Hasil penelitian menunjukkan keberadaan awal β-karoten dan zeaxanthin pada buah R. apiculata serta mendukung kemungkinan interaksi zeaxanthin pada kantong pengikatan iNOS.
Kata kunci: *Rhizophora apiculate*, karotenoid, kromatografi lapis tipis, iNOS, penambatan molekuler

*corresponding author :
Email: darusparansa@unsrat.ac.id

PENDAHULUAN

Stres oksidatif dan inflamasi merupakan proses biologis yang saling berkaitan dalam perkembangan berbagai gangguan degeneratif. Ketidakseimbangan antara pembentukan spesies reaktif dan kapasitas pertahanan antioksidan dapat memicu peroksidasi lipid, oksidasi protein, kerusakan DNA, serta gangguan fungsi sel. Pada kondisi inflamasi, *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) menghasilkan *nitric oxide* (NO) dalam jumlah tinggi. NO dapat bereaksi dengan anion superoksida membentuk peroksinitrit dan spesies nitrogen reaktif lainnya yang berkontribusi terhadap kerusakan jaringan dan keberlanjutan respons inflamasi. Oleh karena itu, iNOS dipandang sebagai target molekuler yang relevan dalam modulasi stres nitrosatif dan inflamasi (Ryszkiewicz *et al*., 2025).

Karotenoid merupakan pigmen triterpenoid dengan sistem ikatan rangkap terkonjugasi yang berperan dalam fotosintesis dan perlindungan terhadap proses foto-oksidatif. Struktur poliena tersebut memungkinkan karotenoid meredam oksigen singlet, menstabilkan radikal bebas, dan membatasi propagasi peroksidasi lipid. Berdasarkan komposisi kimianya, karotenoid dikelompokkan menjadi karoten yang tersusun atas karbon dan hidrogen serta xantofil yang memiliki gugus mengandung oksigen. Zeaxanthin merupakan salah satu xantofil yang memiliki dua gugus hidroksil pada kedua ujung molekul dan rantai poliena di bagian tengah. Karakter tersebut mendukung orientasinya pada membran biologis serta perannya dalam perlindungan terhadap kerusakan oksidatif (Saini *et al*., 2022; Sun *et al*., 2022). Keberadaan karotenoid dan senyawa bioaktif pada organisme laut sebelumnya telah dilaporkan oleh Warouw *et al.* (2024) pada *Valonia aegagropila*, yang menunjukkan adanya pigmen karotenoid bersama klorofil dan senyawa bioaktif lainnya.

Potensi zeaxanthin tidak hanya berkaitan dengan kemampuannya menangkap spesies reaktif secara langsung. La Russa *et al*. (2024) melaporkan bahwa paparan zeaxanthin sebesar 25 µM selama 24 jam membalikkan peningkatan ekspresi iNOS pada makrofag sumsum tulang mencit yang distimulasi TNF-α. Zeaxanthin juga menekan peningkatan ROS serum dan hidroperoksida jaringan otak pada model iskemia serebral mencit. Temuan tersebut menunjukkan keterkaitan biologis antara zeaxanthin, stres oksidatif, inflamasi, dan jalur iNOS serta memberikan dasar untuk mengevaluasi kemungkinan interaksi zeaxanthin dengan protein tersebut.

Mangrove merupakan kelompok tumbuhan intertidal yang beradaptasi terhadap salinitas tinggi, genangan, hipoksia, radiasi matahari, dan fluktuasi lingkungan. Tekanan ekologis tersebut berkaitan dengan pembentukan berbagai metabolit sekunder yang berperan dalam pertahanan tumbuhan dan memiliki potensi biologis. Senyawa yang diperoleh dari tumbuhan mangrove maupun mikroorganisme asosiasinya telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, antimikroba, antiinflamasi, antidiabetes, dan sitotoksik, sehingga ekosistem mangrove dipandang sebagai sumber potensial senyawa alam untuk pengembangan pangan fungsional dan kandidat obat (Parthiban *et al*., 2022; Lin *et al*., 2023).

Salah satu spesies mangrove yang ditemukan di kawasan pesisir Indonesia adalah *Rhizophora apiculata*. Pada bagian

buah, Sianipar *et al*. (2025) melaporkan keberadaan senyawa fenolik, tanin, alkaloid, dan flavonoid serta aktivitas antibakteri ekstraknya terhadap *Salmonella typhi*. Penelitian tersebut belum mengkarakterisasi pigmen karotenoid tertentu pada buah *R. apiculata*. Dengan demikian, kajian mengenai profil karotenoid, termasuk zeaxanthin, masih diperlukan untuk memperluas informasi kimia dan potensi bioaktif buah spesies tersebut.

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode sederhana, cepat, dan ekonomis untuk memisahkan pigmen berdasarkan perbedaan afinitas terhadap fase diam dan fase gerak. Pada sistem dengan fase diam silika dan fase gerak yang didominasi pelarut nonpolar, karoten cenderung bermigrasi lebih jauh, sedangkan xantofil yang memiliki gugus mengandung oksigen umumnya berinteraksi lebih kuat dengan fase diam. Identitas awal pigmen dapat dievaluasi melalui kombinasi nilai *retardation factor* (*Rf*), warna zona KLT, dan karakteristik spektrum serapan. Pendekatan KLT yang dipadukan dengan analisis spektroskopi telah digunakan untuk memisahkan dan mengidentifikasi karotenoid pada jaringan tumbuhan (Saini *et al.,* 2022; Payne *et al*., 2024).

Penggunaan KLT untuk karakterisasi karotenoid juga dilaporkan oleh Bawias *et al.* (2018) pada mikroalga *Nannochloropsis* sp., yang mengidentifikasi beberapa pigmen dengan nilai *Rf* 1,00. Zona KLT yang menunjukkan pola migrasi, warna, dan serapan maksimum yang sesuai dengan karakteristik zeaxanthin menjadi dasar pemilihan senyawa tersebut sebagai ligan uji. Analisis kemudian dilanjutkan menggunakan penambatan molekuler (*molecular docking*) untuk memprediksi orientasi zeaxanthin di dalam kantong pengikatan iNOS, interaksinya dengan residu asam amino, dan kestabilan relatif kompleks protein–ligan. Pemilihan iNOS sebagai target didasarkan pada bukti eksperimental mengenai keterkaitan zeaxanthin dengan penurunan ekspresi iNOS pada model inflamasi (La Russa *et al*., 2024).

Protokol penambatan molekuler umumnya divalidasi melalui *redocking* ligan ko-kristal untuk menilai kemampuan metode dalam mereproduksi pose eksperimental. Skor *docking* merupakan parameter komputasional yang dipengaruhi oleh fungsi skor, fleksibilitas ligan dan protein, serta karakteristik kantong pengikatan. Parameter tersebut bermanfaat untuk membandingkan kestabilan relatif pose dan mengevaluasi kecenderungan interaksi ligan terhadap target protein. Hasil penambatan pada penelitian ini digunakan untuk menggambarkan kemungkinan orientasi pengikatan dan pola interaksi zeaxanthin terhadap iNOS sebagai dasar awal untuk memahami potensi keterlibatan senyawa tersebut pada target yang berkaitan dengan proses inflamasi (Shamsian *et al*., 2024).

Berdasarkan uraian tersebut, informasi mengenai karotenoid spesifik pada buah *R. apiculata* serta evaluasi interaksi molekuler zeaxanthin terhadap iNOS masih terbatas. Penelitian ini bertujuan memisahkan dan melakukan identifikasi awal pigmen karotenoid pada buah *R. apiculata* menggunakan KLT dan spektrofotometri UV-Vis, serta memprediksi interaksi zeaxanthin terhadap iNOS melalui analisis penambatan molekuler. Pendekatan tersebut diharapkan memberikan informasi awal mengenai profil pigmen buah *R. apiculata*

dan kemungkinan interaksi zeaxanthin dengan target yang berkaitan dengan stres nitrosatif.

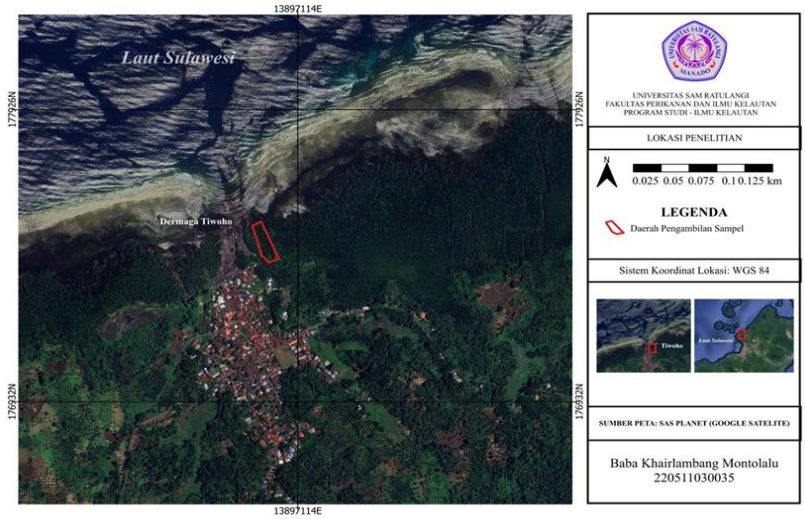
METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Sampel buah *Rhizophora apiculata* diambil dari kawasan mangrove Desa Tiwoho, Kecamatan Wori, Kabupaten Minahasa Utara, Sulawesi Utara pada bulan April 2026. Lokasi pengambilan sampel ditampilkan pada Gambar 1.

Prosedur Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan menggunakan metode survei jelajah mengacu pada Salvanes *et al*. (2018). Buah diambil dari lima pohon dengan jarak antar pohon 1-4 m dan tinggi pohon sekitar 6-8 m. Sampel yang dipilih merupakan buah yang telah berwarna kecokelatan.



Gambar 1. Peta lokasi penelitian



Gambar 2. Pengambilan sampel

Seluruh sampel selanjutnya dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasetika Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, untuk dipreparasi dan dianalisis.

Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi spektrofotometer UV-Vis, timbangan analitik, rotary evaporator, pelat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) silika gel, pipa kapiler, gelas beaker, oven, kertas saring, pipet kaca, corong pemisah, corong gelas, desikator, chamber, pinset, aluminium foil, ATM, beserta perangkat lunak Molegro Virtual Docker (MVD), ChemDraw, dan BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2026 untuk analisis molecular docking. Bahan yang digunakan meliputi buah Rhizophora apiculata, etanol, n-heksana, petroleum eter, aseton, aquades, serta struktur protein inducible nitric oxide synthase (iNOS) manusia (PDB ID: 3E7G), ligan zeaxanthin (PubChem CID: 5280899), dan ligan ko-kristal AT2 sebagai pembanding.

Preparasi Sampel dan Ekstraksi Pigmen Karotenoid

Preparasi dan ekstraksi pigmen karotenoid dilakukan dengan memodifikasi metode Sianipar *et al*. (2025) serta Rodriguez-Amaya & Kimura (2004). Buah R. apiculata dicuci hingga tidak bergetah, kemudian dikeringkan pada suhu ruang selama 3-4 hari. Sampel kering dihaluskan hingga diperoleh serbuk yang homogen. Sebanyak 10 g serbuk dimaserasi menggunakan 25 mL etanol PA selama 24 jam di dalam freezer. Wadah maserasi dilindungi menggunakan aluminium foil dan dikocok setiap tiga jam untuk meningkatkan kontak antara sampel dan pelarut. Hasil maserasi disaring, kemudian filtrat dimasukkan ke dalam labu pisah dan ditambahkan n-heksana PA dan aquades. Campuran dikocok, didiamkan hingga terpisah, kemudian fase organik dicuci dengan aquades. Lapisan bawah dibuang, sedangkan lapisan atas berupa fase n-heksana yang mengandung pigmen ditampung dan diuapkan hingga diperoleh ekstrak kering.

Pemisahan Pigmen Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis

Pemisahan pigmen dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan memodifikasi metode Das *et al*. (2017). Pelat silika gel berukuran 10 × 7 cm digunakan sebagai fase diam dan diaktivasi dalam oven pada suhu 30 °C selama enam jam, kemudian didinginkan didalam desikator. Ekstrak pigmen total ditotolkan secara berulang pada garis awal yang berjarak 1 cm dari tepi bawah pelat hingga diperoleh zona aplikasi yang cukup pekat.Pelat dielusi di dalam bejana pengembang menggunakan campuran petroleum eter dan aseton dengan perbandingan 70:30 sebagai fase gerak. Penggunaan campuran tersebut sebelumnya telah digunakan untuk memisahkan karotenoid dari matriks tumbuhan (Das *et al.,* 2017). Elusi dihentikan setelah front pelarut mencapai garis akhir yang berjarak 1 cm dari tepi atas pelat. Zona pigmen diamati berdasarkan warna dan jarak migrasinya, kemudian nilai Rf dihitung menggunakan persamaan:

$$R_f = \frac{jarak\ migrasi\ zona\ pigmen}{jarak\ migrasi\ front\ pelarut}$$

Analisis Spektrofotometri UV-Vis dan Karakterisasi Pigmen

Analisis spektrofotometri dilakukan dengan memodifikasi metode Das *et al.*

(2017). Setiap zona pigmen hasil pemisahan KLT digunting dari pelat, kemudian direndam dalam 3 mL aseton selama 24 jam untuk mengekstraksi pigmen dari fase diam. Larutan hasil ekstraksi selanjutnya dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Zona berwarna kuning hingga oranye dipindai pada rentang panjang gelombang 380-550 nm untuk mengevaluasi karakteristik serapan pigmen karotenoid, sedangkan zona berwarna hijau dipindai pada rentang 380-770 nm untuk mengevaluasi karakteristik serapan pigmen klorofil.

Panjang gelombang serapan maksimum masing-masing zona ditentukan berdasarkan spektrum yang diperoleh. Karakterisasi awal pigmen dilakukan dengan mempertimbangkan kombinasi warna zona, nilai Rf, dan panjang gelombang serapan maksimum. Penetapan jenis pigmen mengacu pada karakteristik spektral karotenoid yang dilaporkan oleh Britton *et al*. (1995), Rodriguez-Amaya dan Kimura (2004), serta Ashenafi *et al.* (2023). Zona yang menunjukkan karakteristik spektral sesuai dengan zeaxanthin selanjutnya menjadi dasar pemilihan zeaxanthin sebagai ligan uji pada analisis penambatan molekuler.

Analisis Penambatan Molekuler

Analisis penambatan molekuler dilakukan menggunakan Molegro Virtual Docker (MVD) versi 6.0. Struktur kristal domain oksigenase inducible nitric oxide synthase (PDB ID: 3E7G) diperoleh dari RCSB Protein Data Bank. Struktur zeaxanthin (PubChem CID: 5280899) diperoleh dari basis data PubChem, kemudian dipreparasi menggunakan ChemDraw 22.2.0. Penambatan dilakukan menggunakan MolDock Score [GRID] dengan resolusi grid 0,30 Å. Pencarian pose ligan menggunakan algoritma simplex evolution dengan maksimum 1.500 iterasi, ukuran populasi 50, dan sedikitnya 10 runs untuk setiap ligan.

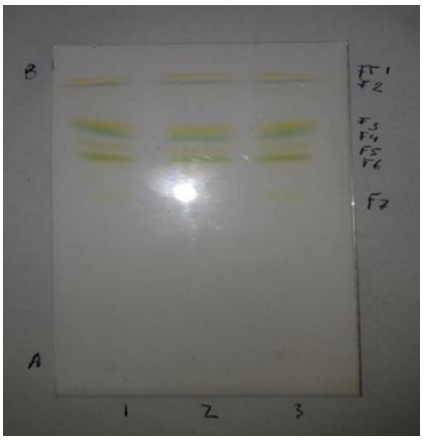
Validitas protokol ditentukan berdasarkan nilai root-mean-square deviation (RMSD) antara pose hasil redocking dan pose kristalografi ligan ko-kristal. Protokol dinyatakan valid apabila menghasilkan RMSD ≤2,0 Å (Shamsian *et al*., 2024). Zeaxanthin kemudian ditambatkan menggunakan parameter yang sama dengan tahap validasi. Kompleks iNOS-zeaxanthin dan iNOS-AT2 selanjutnya divisualisasikan menggunakan BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2026.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemisahan Pigmen Karotenoid Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis

Pemisahan ekstrak pigmen buah *R. apiculata* menghasilkan tujuh zona berwarna dengan nilai *Rf* antara 0,62-1,00. Zona 1 memiliki nilai *Rf* 1,00 (oranye); zona 2 memiliki *Rf* 0,97 (abu-abu); zona 3 memiliki *Rf* 0,83 (kuning); zona 4 memiliki *Rf* 0,80 (hijau kebiruan); zona 5 memiliki *Rf* 0,75 (kuning); zona 6 memiliki *Rf* 0,71 (hijau kekuningan); sedangkan zona 7 memiliki *Rf* 0,62 (kuning). Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak buah *R. apiculata* mengandung beberapa komponen pigmen dengan afinitas yang berbeda terhadap fase diam dan fase gerak.

Perbedaan nilai *Rf* berkaitan dengan karakter kimia dan polaritas masing-masing komponen. Pada sistem KLT fase normal dengan silika gel sebagai fase diam, senyawa yang relatif nonpolar memiliki interaksi lebih lemah dengan permukaan silika sehingga lebih mudah



Gambar 3. Profil pemisahan ekstrak pigmen buah *R. apiculata* menggunakan KLT

terbawa oleh fase gerak dan menghasilkan nilai *Rf* yang lebih tinggi. Sebaliknya, senyawa yang memiliki gugus mengandung oksigen cenderung berinteraksi lebih kuat dengan fase diam dan bermigrasi lebih lambat. Pola tersebut sesuai dengan karakter umum karoten yang lebih non polar dibandingkan xantofil, meskipun nilai *Rf* tetap dipengaruhi oleh komposisi fase gerak, kondisi pelat, jumlah sampel, dan kejenuhan bejana pengembang (Saini *et al*., 2022; Payne *et al*., 2024).

Karakterisasi Pigmen Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

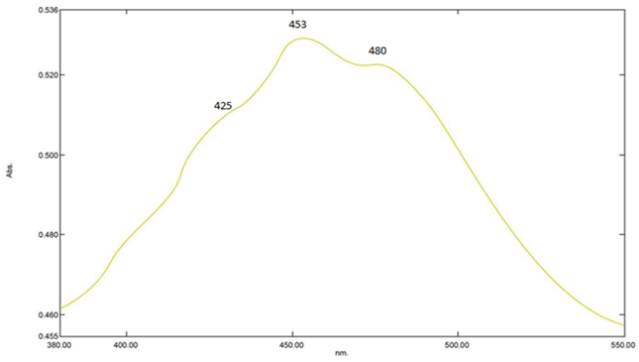
Penetapan jenis pigmen tidak hanya didasarkan pada nilai *Rf*, tetapi juga mempertimbangkan warna zona dan karakteristik spektrum serapan UV-Vis. Kombinasi data kromatografi dan spektroskopi memberikan dasar yang lebih kuat untuk karakterisasi awal pigmen pada matriks tumbuhan (Payne *et al*., 2024). Hasil pemisahan KLT dan analisis spektrofotometri UV-Vis ekstrak pigmen buah *R. apiculata* disajikan pada Tabel 1.

Zona KLT 1 berwarna oranye, memiliki nilai *Rf* 1,00, dan menghasilkan tiga serapan maksimum pada 425, 453, dan 480 nm. Spektrum serapan UV-Vis fraksi hasil KLT F1 ditampilkan pada Gambar 4.

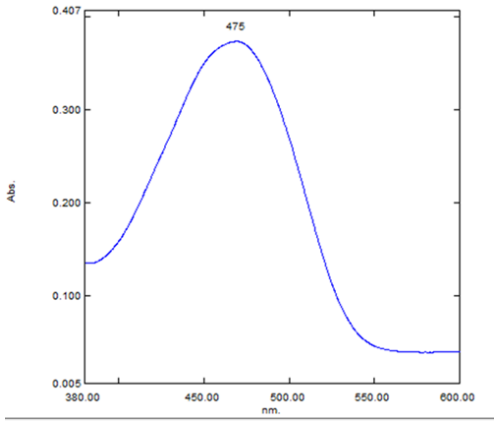
Pola tiga serapan maksimum tersebut mencerminkan keberadaan sistem ikatan rangkap terkonjugasi yang khas pada karotenoid. Posisi serapan yang diperoleh mendekati profil β-karoten dalam pelarut organik, yang umumnya menunjukkan puncak pada kisaran 430, 453, dan 480 nm. Kesesuaian warna oranye, nilai *Rf* yang tinggi, dan pola serapan tersebut mendukung identifikasi awal F1 sebagai β-karoten (Britton *et al.,*

Tabel 1. Hasil pemisahan KLT dan karakterisasi spektrum UV-Vis pigmen buah *R. apiculata*

Zona KLT	*Rf*	Warna	Serapan maksimum (nm)	Identifikasi awal
1	1,00	Oranye	425, 453, 480	β-karoten
2	0,97	Abu-abu	Tidak terdeteksi jelas	Belum ditetapkan
3	0,83	Kuning	475	Zeaxanthin
4	0,80	Hijau kebiruan	Tidak terdeteksi jelas	Belum ditetapkan
5	0,75	Kuning	Tidak terdeteksi jelas	Belum ditetapkan
6	0,71	Hijau kekuningan	Tidak terdeteksi jelas	Belum ditetapkan
7	0,62	Kuning	Tidak terdeteksi jelas	Belum ditetapkan



Gambar 4. Spektrum serapan UV-Vis fraksi hasil KLT F1 ekstrak pigmen buah *R. apiculata* dengan λmaks 425, 453, dan 480 nm



Gambar 5. Spektrum serapan UV-Vis fraksi hasil KLT F3 ekstrak pigmen buah *R. apiculata* dengan λmaks 475 nm

1995; Ashenafi *et al*., 2023).

β-Karoten termasuk kelompok karoten yang tidak memiliki gugus oksigen sehingga bersifat sangat lipofilik. Karakter tersebut menjelaskan migrasinya yang tinggi pada plat silika ketika dielusi menggunakan fase gerak yang didominasi petroleum eter. Sistem poliena terkonjugasi pada β-karoten juga menentukan warna orange dan kemampuannya menyerap cahaya pada daerah tampak. Struktur yang sama berkontribusi terhadap kemampuannya meredam oksigen singlet dan menstabilkan spesies radikal (Saini *et al*., 2022; Maoka, 2023).

Zona KLT 3 berwarna kuning, memiliki nilai *Rf* 0,83, dan menunjukkan serapan maksimum dominan pada 475 nm. Spektrum serapan UV-Vis fraksi hasil KLT F3 ditampilkan pada Gambar 5.

Warna kuning dan posisi serapan tersebut sesuai dengan karakter xantofil, terutama zeaxanthin, yang menyerap kuat pada wilayah biru spektrum tampak dan dapat menunjukkan serapan maksimum pada kisaran 475-480 nm. Posisi puncak karotenoid dapat mengalami pergeseran bergantung pada polaritas pelarut,

lingkungan molekuler, dan kondisi analisis. Berdasarkan kesesuaian warna, migrasi kromatografi, dan serapan maksimum, F3 diidentifikasi secara awal sebagai zeaxanthin (Britton *et al*., 1995; Ashenafi *et al*., 2023). Mokoginta *et al.* (2021) juga melaporkan keberadaan zeaxanthin pada organisme invertebrata laut, yaitu pada karapas kepiting *Grapsus albolineatus*.

Nilai *Rf* F3 yang lebih rendah dibandingkan F1 sejalan dengan perbedaan struktur kedua pigmen. Zeaxanthin memiliki dua gugus hidroksil pada kedua ujung molekul, sedangkan β-karoten tidak memiliki gugus oksigen. Keberadaan gugus hidroksil meningkatkan interaksi zeaxanthin dengan fase diam silika sehingga migrasinya lebih rendah daripada β-karoten. Data KLT dan UV-Vis dengan demikian saling mendukung dalam membedakan karoten yang lebih nonpolar dari xantofil yang relatif lebih polar (Saini *et al*., 2022; Ashenafi *et al*., 2023).

Zona KLT 2, 4, 5, 6, dan 7 belum menunjukkan serapan maksimum yang cukup jelas untuk mendukung identifikasi jenis pigmen tertentu. Kondisi tersebut dapat dipengaruhi oleh rendahnya konsentrasi pigmen, keberadaan lebih dari satu komponen dalam satu zona, atau intensitas serapan yang berada di bawah sensitivitas pengukuran. Oleh karena itu, identitas pigmen pada zona-zona tersebut belum ditetapkan dan memerlukan analisis lanjutan menggunakan metode dengan selektivitas lebih tinggi.

Validasi Protokol Penambatan Molekuler

Zeaxanthin yang teridentifikasi secara awal pada fraksi hasil KLT F3 selanjutnya dianalisis melalui penambatan molekuler terhadap *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). Struktur protein yang digunakan adalah domain oksigenase iNOS manusia (PDB ID: 3E7G), yang diperoleh melalui difraksi sinar-X pada resolusi 2,20 Å dan berkompleks dengan inhibitor AR-C95791 atau AT2. Struktur tersebut dipilih karena berasal dari manusia, tidak mengandung mutasi, dan memiliki ligan ko-kristal yang dapat digunakan untuk menentukan kantong pengikatan serta memvalidasi protokol penambatan (Garcin *et al*., 2008).

Validasi protokol dilakukan melalui *redocking* AT2 ke dalam kantong pengikatan asalnya. Ruang pencarian dipusatkan pada koordinat x = 55,28; y = 21,10; dan z = 78,92 dengan radius 12 Å. Nilai RMSD pada tiga pengulangan berturut-turut sebesar 0,9652; 0,9028; dan 0,8988 Å, dengan rata-rata 0,9223 ± 0,0372 Å. Seluruh nilai berada di bawah batas penerimaan 2 Å, yang menunjukkan bahwa protokol mampu mereproduksi orientasi ligan ko-kristal secara konsisten dan mendekati konformasi kristalografinya. Konsistensi nilai RMSD antara pengulangan juga menunjukkan bahwa pusat koordinat, radius, dan parameter pencarian yang digunakan memiliki reprodusibilitas yang baik untuk penambatan zeaxanthin pada kantong pengikatan yang sama (Shamsian *et al*., 2024).

Hasil Penambatan Zeaxanthin terhadap iNOS

Penambatan zeaxanthin terhadap iNOS dilakukan sebanyak tiga pengulangan menggunakan parameter yang sama dengan tahap validasi. Hasil penambatan dievaluasi berdasarkan *MolDock Score*, *Rerank Score*, dan nilai H-bond. *MolDock Score* merupakan fungsi skor utama yang digunakan selama pencarian pose dengan

mempertimbangkan interaksi sterik, elektrostatik, dan ikatan hidrogen antara ligan dan protein. *Rerank Score* digunakan untuk mengevaluasi kembali dan menentukan peringkat pose hasil penambatan menggunakan perhitungan energi yang lebih terperinci. Nilai kedua parameter yang semakin negatif menunjukkan interaksi protein-ligan yang diprediksi semakin menguntungkan secara komputasional. Nilai H-bond merepresentasikan kontribusi interaksi ikatan hidrogen terhadap skor kompleks, dengan nilai yang lebih negatif menunjukkan kontribusi yang lebih menguntungkan secara komputasional (Bitencourt-Ferreira and de Azevedo Jr., 2019). Nilai *MolDock Score*, *Rerank Score*, dan H-bond zeaxanthin dibandingkan dengan ligan ko-kristal AT2 sebagaimana disajikan pada Tabel 2.

Zeaxanthin menghasilkan rata-rata *MolDock Score* sebesar −153,419 dan *Rerank Score* sebesar −120,843. Kedua nilai tersebut lebih negatif dibandingkan nilai rata-rata AT2, yaitu −98,418 untuk *MolDock Score* dan −88,448 untuk *Rerank Score*. Berdasarkan fungsi skor MVD, hasil tersebut menunjukkan bahwa zeaxanthin membentuk interaksi yang menguntungkan secara komputasional dengan kantong pengikatan iNOS. Struktur zeaxanthin yang panjang memungkinkan terbentuknya kontak non kovalen yang luas di sepanjang permukaan kantong pengikatan.

Perbandingan skor antar ligan perlu mempertimbangkan perbedaan ukuran dan karakter molekul. Zeaxanthin mempunyai rantai poliena panjang dan jumlah atom non hidrogen yang lebih banyak dibandingkan AT2 sehingga dapat membentuk lebih banyak kontak van der Waals dan hidrofobik. Banyaknya kontak tersebut dapat menghasilkan skor yang lebih negatif. Skor zeaxanthin tersebut menunjukkan interaksi komputasional yang lebih menguntungkan, tetapi tidak secara langsung menyatakan afinitas eksperimental yang lebih tinggi daripada AT2.

Nilai H-bond rata-rata AT2 sebesar −2,566 lebih negatif dibandingkan zeaxanthin sebesar −1,153. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kontribusi ikatan hidrogen terhadap skor kompleks AT2 lebih menguntungkan, sedangkan pengikatan zeaxanthin diperkirakan lebih banyak distabilkan oleh kontak nonpolar. Pola ini sesuai dengan karakter zeaxanthin yang didominasi oleh rantai hidrokarbon

Tabel 2. Hasil penambatan zeaxanthin dan ligan ko-kristal AT2 terhadap iNOS

Ligan	*MolDock Score*	*Rerank Score*	*H-Bond*
Zeaxanthin	−130,651	−97,018	0,000
	−168,117	−135,395	−0,599
	−161,488	−130,115	−2,858
	Rata-rata = −153,419 ± 19,994	Rata-rata = −120,843 ± 20,801	Rata-rata = −1,153 ± 1,507
AT2	−98,517	−88,508	−2,619
	−98,422	−88,163	−2,507
	−98,314	−88,673	−2,572
	Rata-rata = −98,418 ± 0,101	Rata-rata = −88,448 ± 0,260	Rata-rata = −2,566 ± 0,056

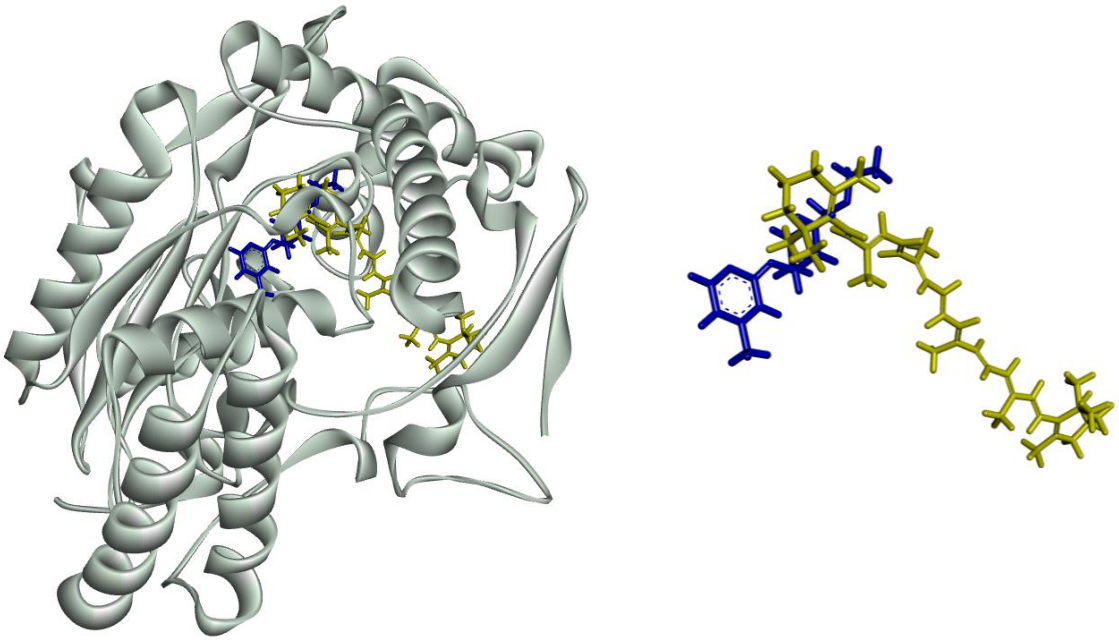
terkonjugasi dan hanya memiliki dua gugus hidroksil pada bagian terminal molekul.

Variasi *Rerank Score* zeaxanthin juga lebih besar daripada AT2. Nilai *Rerank Score* zeaxanthin berkisar antara −97,018 hingga −135,395, sedangkan AT2 hanya berkisar antara −88,163 hingga −88,673. Variasi tersebut menunjukkan bahwa proses pencarian menghasilkan pose zeaxanthin dengan nilai energi yang lebih beragam. Kondisi ini dapat berkaitan dengan bentuk molekul zeaxanthin yang memanjang dan kemampuannya menyesuaikan orientasi di sepanjang area hidrofobik kantong pengikatan iNOS.

Visualisasi Pose Pengikatan Zeaxanthin dan AT2

Visualisasi tiga dimensi dilakukan untuk membandingkan posisi ligan ko-kristal AT2 dan zeaxanthin pada kantong pengikatan iNOS. Hasil superimposisi menunjukkan bahwa sebagian struktur zeaxanthin menempati wilayah yang berdekatan dengan posisi AT2, sedangkan rantai poliena zeaxanthin memanjang mengikuti ruang pengikatan yang lebih luas sebagaimana ditampilkan pada Gambar 6.

Superimposisi pose memperlihatkan adanya tumpang tindih parsial antara AT2 dan salah satu bagian terminal zeaxanthin. Zeaxanthin memiliki ukuran dan bentuk yang lebih panjang sehingga sebagian besar rantai polienanya menempati area lain di dalam kantong pengikatan. Perbedaan orientasi tersebut sejalan dengan karakter lipofilik zeaxanthin dan mendukung kemungkinan terbentuknya kontak hidrofobik yang lebih luas daripada ligan ko-kristal. Posisi kedua ligan selanjutnya dianalisis secara dua dimensi untuk menentukan residu asam amino dan jenis interaksi yang terbentuk.



A **B**

Gambar 6. Pose tiga dimensi AT2 dan zeaxanthin pada iNOS: (A) posisi ligan dalam kantong pengikatan dan (B) superimposisi kedua ligan. Protein ditampilkan abu-abu, AT2 biru, dan zeaxanthin kuning

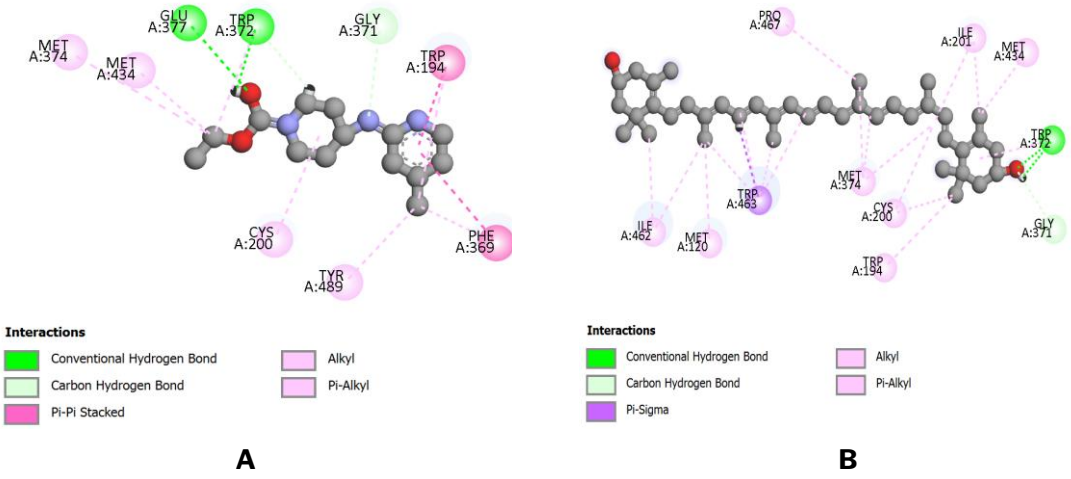
Interaksi Zeaxanthin dengan Residu Asam Amino iNOS

Visualisasi dua dimensi menunjukkan adanya persamaan dan perbedaan pola interaksi antara AT2 dan zeaxanthin pada kantong pengikatan iNOS. Perbandingan interaksi kedua ligan disajikan pada Gambar 7.

AT2 membentuk ikatan hidrogen konvensional dengan Glu377 dan Trp372 serta ikatan hidrogen karbon dengan Gly371. Interaksi hidrofobik AT2 melibatkan Trp194, Phe369, Cys200, Met374, Met434, dan Tyr489. Pola tersebut menunjukkan bahwa AT2 berinteraksi dengan residu polar dan nonpolar di sekitar kantung pengikatan substrat iNOS. Glu377 dan Trp372 berada pada lingkungan pengikatan arginin dan berperan dalam pengenalan substrat maupun inhibitor pada domain oksigenase iNOS (Garcin *et al*., 2008; Dong *et al*., 2023).

Zeaxanthin membentuk ikatan hidrogen konvensional dengan Trp372 dan ikatan hidrogen karbon dengan Gly371. Rantai poliena dan cincin terminal zeaxanthin juga membentuk interaksi hidrofobik berupa alkil, π-alkil, dan π-sigma dengan Pro467, Ile462, Met120, Trp463, Met374, Cys200, Trp194, Ile201, dan Met434. Dominasi interaksi nonpolar tersebut sesuai dengan struktur zeaxanthin yang sebagian besar tersusun atas rantai hidrokarbon terkonjugasi, sedangkan dua gugus hidroksil terminalnya memungkinkan pembentukan interaksi hidrogen.

Zeaxanthin dan AT2 berinteraksi dengan beberapa residu yang sama, yaitu Trp372, Gly371, Trp194, Cys200, Met374, dan Met434. Kesamaan tersebut menunjukkan bahwa zeaxanthin menempati sebagian wilayah pengikatan yang juga dikenali oleh ligan ko-kristal. Ikatan hidrogen dengan Trp372 dan kontak dengan Gly371 menjadi temuan penting karena kedua residu tersebut terletak di sekitar lingkungan pengikatan substrat pada iNOS. Analisis struktural terhadap protein NOS manusia juga menempatkan Trp372, Phe369, Trp194, dan Glu377 sebagai bagian penting dari lingkungan interaksi ligan pada iNOS (Dong *et al.,* 2023).



Gambar 7. Interaksi ligan ko-kristal AT2 (A) dan zeaxanthin (B) pada kantong pengikatan iNOS

Pola interaksi zeaxanthin tidak sepenuhnya sama dengan AT2. Zeaxanthin tidak menunjukkan interaksi langsung dengan Glu377 pada pose representatif, sedangkan residu tersebut membentuk ikatan hidrogen dengan AT2. Perbedaan ini menunjukkan bahwa zeaxanthin tidak meniru seluruh pola pengikatan ligan ko-kristal. Namun, zeaxanthin tetap mampu menempati wilayah kantong yang berdekatan melalui kombinasi ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik dengan beberapa residu yang sama.

Keterkaitan Hasil Penambatan dengan Aktivitas Biologis Zeaxanthin

Hasil penambatan molekuler menunjukkan bahwa zeaxanthin dapat menempati kantong pengikatan iNOS dan berinteraksi dengan sejumlah residu penting melalui kombinasi ikatan hidrogen dan kontak hidrofobik. Temuan tersebut memiliki kesesuaian biologis dengan penelitian La Russa *et al*. (2024), yang melaporkan bahwa zeaxanthin 25 µM mampu membalikkan peningkatan ekspresi iNOS pada makrofag sumsum tulang mencit yang distimulasi TNF-α. Pemberian zeaxanthin pada model iskemia serebral mencit juga menurunkan ROS serum dan hidroperoksida pada jaringan otak.

Morone *et al*. (2024), juga melaporkan bahwa ekstrak karotenoid sianobakteri yang mengandung β-karoten dan zeaxanthin mampu menangkap radikal NO dan superoksida serta memodulasi aktivitas iNOS pada sel RAW 264.7 yang distimulasi LPS. Hasil tersebut mendukung keterkaitan zeaxanthin dengan jalur yang melibatkan stres oksidatif, inflamasi, dan pembentukan spesies nitrogen reaktif.

Bukti eksperimental tersebut terutama menunjukkan modulasi ekspresi atau aktivitas jalur iNOS, sedangkan hasil penelitian ini memberikan gambaran komputasional mengenai kemungkinan interaksi langsung zeaxanthin pada kantong pengikatan protein. Oleh karena itu, hasil penambatan molekuler dapat dipandang sebagai informasi pendukung yang menghubungkan karakter struktur zeaxanthin dengan target biologis yang relevan, bukan sebagai bukti tunggal bahwa zeaxanthin menghambat aktivitas katalitik iNOS.

Keberhasilan validasi *redocking*, nilai *Rerank Score* yang negatif, tumpang tindih parsial dengan pose AT2, serta keterlibatan residu Trp372, Gly371, Trp194, Cys200, Met374, dan Met434 menunjukkan bahwa zeaxanthin diprediksi mampu menempati kantong pengikatan iNOS dan membentuk kompleks yang didominasi oleh interaksi hidrofobik. Hasil tersebut memberikan dukungan komputasional terhadap potensi keterlibatan zeaxanthin pada jalur yang berkaitan dengan iNOS dan stres nitrosatif. Pengujian aktivitas enzim iNOS, produksi NO, atau simulasi dinamika molekuler dapat dilakukan pada penelitian berikutnya untuk mengevaluasi kestabilan kompleks dan memperkuat implikasi biologis hasil penambatan.

KESIMPULAN

Pemisahan ekstrak pigmen buah *R. apiculata* meggunakan KLT menghasilkan tujuh zona dengan nilai *Rf* 0,62-1,00. Berdasarkan kombinasi warna, nilai Rf, dan karakteristik spektrum Uv-Vis, fraksi hasil KLT F1 diidentifikasi secara awal sebagai β-karoten dengan serapan maksimum pada 425, 453, dan 480 nm,

sedangkan F3 diidentifikasi secara awal sebagai zeaxanthin dengan serapan maksimum pada 475 nm. Protokol penambatan molekuler terhadap iNOS (PDB ID: 3E7G) dinyatakan valid berdasarkan RMSD *redocking* rata-rata sebesar 0,9223±0,0372 Å. Zeaxanthin menunjukkan *MolDock Score* dan *Rerank Score* yang lebih negative dibandingkan ligan ko-kristal AT2 serta berinteraksi dengan sejumlah residu yang sama di dalam kantong pengikatan iNOS. Interaksi zeaxanthin terutama didominasi oleh kontak hidrofobik, disertai interaksi ikatan hydrogen dengan Trp372 dan Gly371. Hasil tersebut memberikan bukti awal mengenai keberadaan karotenoid pada buah R. apiculate dan kemungkinan interaksi molekuler zeaxanthin terhadap iNOS. Konfirmasi identitas iNOS diperlukan untuk memperkuat implikasi biologis temuan ini.

DAFTAR PUSTAKA

Ashenafi, E. L., Nyman, M. C., Shelley, J. T., Mattson, N. S. 2023. Spectral Properties and Stability of Selected Carotenoid and Chlorophyll Compounds in Different Solvent Systems. *Food Chemistry Advances, 2*, 100178. https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100178

Bawias, M., Kemer, K., Mantiri, D. M., Kumampung, D. R., Paransa, D. S. J., Mantiri, R. 2018. Isolasi Pigmen Karotenoid pada Mikroalga *Nannochloropsis* sp. dengan Menggunakan Beda Pelarut. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis,* 6(2), 1–8. https://doi.org/10.35800/jplt.6.2.2018.20641

Bitencourt-Ferreira, G., de Azevedo, W. F. 2019. Molegro Virtual Docker for Docking. *Methods in Molecular Biology, 2053*, 149–167. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_10

Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Eds.). 1995. *Carotenoids: Volume 1B—Spectroscopy*. Birkhäuser. p 360.

Das, S., Gupta, P., and De, B. 2017. Thin Layer Chromatographic Characterization of Carotenoid Isolates in Sugar Date Palm (*Phoenix sylvestris*) Fruit Epicarp and Inflorescence Axis. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research,* 9(5), 680–684. https://doi.org/10.25258/phyto.v9i5.8148

Dong, J., Li, D., Kang, L., Luo, C., Wang, J. 2023. Insights into Human eNOS, nNOS and iNOS Structures and Medicinal Indications from Statistical Analyses of Their Interactions with Bound Compounds. *Biophysics Reports,* 9(3), 159–175. https://doi.org/10.52601/bpr.2023.210045

Garcin, E. D., Arvai, A. S., Rosenfeld, R. J., Kroeger, M. D., Crane, B. R., Andersson, G., Getzoff, E. D. 2008. Anchored Plasticity Opens Doors for Selective Inhibitor Design in Nitric Oxide Synthase. *Nature Chemical Biology,* 4(11), 700–707. https://doi.org/10.1038/nchembio.115

La Russa, D., Manni, G., Di Santo, C., Pieroni, B., Pellegrino, D., Barba, F. J., Bagetta, G., Fallarino, F., Montesano, D., Amantea, D. 2024. Zeaxanthin Exerts Anti-Inflammatory Effects In Vitro and Provides Significant Neuroprotection in Mice Subjected To Transient Middle Cerebral Artery Occlusion. *PharmaNutrition, 27*, 100368. https://doi.org/10.1016/j.phanu.2023.100368

Lin, W., Feng, Y., Li, D., and Lin, H. 2023. Bio-active Products from Mangrove Ecosystems. *Marine Drugs,* 21(4), 239. https://doi.org/10.3390/md21040239

Maoka, T. 2023. Carotenoids: Distribution, Function in Nature, and Analysis Using Lc-Photodiode Array Detector

(DAD)-MS and MS/MS system. *Mass Spectrometry*, 12(1), A0133-A0133. https://doi.org/10.5702/massspectrometry.A0133

Morone, J., Hentschke, G., Pinto, E., Morais, J., Cruz, P., Vasconcelos, V., Martins, R., Lopes, G. 2024. Carotenoids from Cyanobacteria Modulate iNOS and Inhibit The Production of Inflammatory Mediators: Promising Agents for The Treatment of Inflammatory Conditions. *Algal Research,* 83, 103729. https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103729

Mokoginta, F. S., Paransa, D. S., Kemer, K., Paulus, J. J., Kawung, J., Manoppo, H. 2021. Analisis Jenis Pigmen Karotenoid pada Karapas Kepiting Jantan Grapsus *albolineatus* Latreille in Milbert 1812. *Jurnal Ilmu Platax*, 9(1), 132-137. https://doi.org/10.35800/jip.9.1.2021.34421.

Parthiban, A., Sivasankar, R., Sachithanandam, V., Khan, S. A., Jayshree, A., Murugan, K., Sridhar, R. 2022. An Integrative Review on Bioactive Compounds from Indian Mangroves for Future Drug Discovery. *South African Journal of Botany,* 149, 899–915. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.10.004

Payne, T. D., Dixon, L. R., Schmidt, F. C., Blakeslee, J. J., Bennett, A. E., Schultz, Z. D. 2024. Identification and Quantification of Pigments in Plant Leaves Using Thin Layer Chromatography–Raman spectroscopy (TLC–Raman). *Analytical Methods,* 16(16), 2449–2455. https://doi.org/10.1039/D4AY00082J

Rodriguez-Amaya, D. B., Kimura, M. 2004. HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. HarvestPlus Technical Monograph 2. International Food Policy Research Institute. p 63.

Ryszkiewicz, P., Schlicker, E., Malinowska, B. 2025. Is Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Promising as A New Target Against Pulmonary Hypertension?. *Antioxidants*, 14(4), 377.

Saini, R. K., Prasad, P., Lokesh, V., Shang, X., Shin, J., Keum, Y.-S., Lee, J.-H. 2022. Carotenoids: Dietary Sources, Extraction, Encapsulation, Bioavailability, and Health Benefits—A Review of Recent Advancements. *Antioxidants, 11*(4), 795. https://doi.org/10.3390/antiox11040795

Salvanes, A. G. V., Devine, J., Jensen, K. H., Hestetun, J. T., Sjøtun, K., Glenner, H. (Eds.). 2018. Marine Ecological Field Methods: A Guide for Marine Biologists and Fisheries scientists. John Wiley & Sons. p 240. https://doi.org/10.1002/9781119184362

Shamsian, S., Sokouti, B., Dastmalchi, S. 2024. Benchmarking Different Docking Protocols for Predicting The Binding Poses of Ligands Complexed With Cyclooxygenase Enzymes and Screening Chemical Libraries. *BioImpacts,* 14(2), 29955. https://doi.org/10.34172/bi.2023.29955

Sianipar, H. F., Sinaga, M. P., Barat, W. O. B. 2025. The Potential Bioactive Compound of *Rhizophora apiculata* Mangrove Fruit Extract in Inhibiting The Growth of *Salmonella typhi* Bacteria. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA,* 11(8), 1068–1073. https://doi.org/10.29303/jppipa.v11i8.12344

Sun, T., Rao, S., Zhou, X., and Li, L. 2022. Plant Carotenoids: Recent Advances and Future Perspectives. *Molecular Horticulture, 2*, 3. https://doi.org/10.1186/s43897-022-00023-2

Warouw, F., Pertiwi, J. M., Mantiri, D. M., Paransa, D. S., Montolalu, R. I., Lumoindong, F., Kepel, R. C. 2024. Phytochemical Screening, Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Green Macroalga *Valonia aegagropila* from Coastal Waters of Korakora, North Sulawesi,

Indonesia. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 17(6), 2609-2619.