

# Kandungan Senyawa Bioaktif dan Aktivitas Biologis Ekstrak Daun *Rhizophora apiculata* Asal Perairan Teluk Awur, Jepara

Mirsa Septiana Mutik<sup>1</sup>, Mada Triandala Sibero<sup>1,2,\*</sup>, Widianingsih<sup>1</sup>, Subagiyo<sup>1</sup>, Rudhi Pribadi<sup>1</sup>, Dwi Haryanti<sup>1</sup>, Ambariyanto Ambariyanto<sup>2</sup>, Retno Murwani<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Laboratorium Natural Product, UPT Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. H. Soedarto S.H, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50275 Indonesia

Email: madatriandalasibero@lecturer.undip.ac.id

## Abstract

### Evaluation of Bioactive Compounds and Biological Activities of *Rhizophora apiculata* Leaves from Teluk Awur, Jepara

*Rhizophora apiculata* is a type of mangrove that has the ability to adapt to extreme environmental conditions such as temperature, low oxygen levels, and high salinity. This adaptability affects the production of secondary metabolites. Information about the antibacterial activity of this mangrove against MDR (Multi-Drug Resistant) bacteria is still very limited. The content of secondary metabolites produced by mangrove *R. apiculata* is also expected to affect antioxidant activity against free radicals. The purposes of this study were to examine the presence of bioactive compounds by phytochemical tests and to evaluate the antibacterial activity against MDR bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus subtilis*; and antioxidants property of *R. Apiculata* leaves that were collected from Teluk Awur, Jepara. The leaves were extracted using the multilevel maceration method with solvent sequence n-hexane, ethyl acetate and methanol. Metabolite finger printing using TLC method was carried out to detect the presence of alkaloids, flavonoids, saponins, phenolics, quinones, steroids, and triterpenoids. The antibacterial test was carried out using agar well diffusion method while the antioxidant test was carried out using the DPPH method. The results of the phytochemical test showed that there were groups of alkaloids and steroids in the n-hexane solvent; alkaloids, phenolics, and steroids in ethyl acetate solvent; as well as alkaloids, flavonoids, phenolics, and saponins in methanol solvents. The results of this study indicate that *R. apiculata* from Teluk Awur Coastal Waters, Jepara had no potential as an antibacterial against MDR (Multi-Drug Resistant) bacteria, however the methanol extract has the potential to be used as an antioxidant with an IC<sub>50</sub> value of 85.999 ppm. The bioautography showed that compounds from the phenol group, flavonoids, triterpenoids and  $\beta$ -carotene pigments acted as antioxidant agents in the leaf extract of *R. apiculata*.

**Keywords:** Antioxidant, bioactive, bioautography, mangrove, *Rhizophora apiculata*

## Abstrak

*Rhizophora apiculata* merupakan salah satu jenis mangrove yang memiliki kemampuan beradaptasi terhadap kondisi lingkungan ekstrem seperti suhu, kadar oksigen rendah dan salinitas tinggi. Kemampuan beradaptasi tersebut mempengaruhi produksi metabolit sekunder. Informasi mengenai kemampuan aktivitas antibakteri mangrove jenis ini melawan bakteri MDR (Multi Drug Resistent) masih sangat terbatas. Kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan mangrove *R. apiculata* ini juga diharapkan dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan melawan radikal bebas. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkaji kandungan senyawa bioaktif serta aktivitas biologis berupa antibakteri melawan bakteri MDR *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* dan *Bacillus subtilis*; dan antioksidan dari ekstrak daun mangrove *R. apiculata* asal perairan Teluk Awur, Jepara. Sampel diekstraksi menggunakan 3 pelarut berbeda (n-heksana, etil asetat dan metanol) dengan metode maserasi bertingkat. Analisis metabolit sidik jari dilakukan menggunakan plat KLT untuk mengetahui kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, fenolik, kuinon, steroid dan triterpenoid. Uji antibakteri dilakukan menggunakan metode sumuran sedangkan uji antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH. Hasil uji fitokimia menunjukkan terdapat golongan senyawa alkaloid dan steroid pada pelarut n-heksana; alkaloid, fenolik dan steroid pada pelarut etil asetat; serta alkaloid, flavonoid, fenolik dan saponin pada pelarut metanol. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa *R. apiculata* asal perairan Teluk Awur, Jepara tidak potensial sebagai antibakteri melawan bakteri MDR (Multi Drug Resistent), akan tetapi ekstrak metanol potensial digunakan sebagai antioksidan dengan nilai IC<sub>50</sub> 85,999 ppm. Tahapan bioautografi menunjukkan bahwa senyawa dari golongan fenol, flavonoid, triterpenoid dan pigmen  $\beta$ -karoten berperan sebagai agen antioksidan pada ekstrak daun *R. apiculata*.

**Kata kunci :** Antioksidan, bioautografi, mangrove, *Rhizophora apiculata*



## PENDAHULUAN

Mangrove adalah salah satu tumbuhan pesisir yang memiliki kemampuan beradaptasi terhadap kondisi lingkungan yang ekstrem seperti suhu yang tidak stabil, kadar oksigen rendah dan salinitas tinggi (Dahibhate *et al.*, 2018). Kemampuan beradaptasi yang unik tersebut mempengaruhi metabolisme mangrove dalam mensintesis metabolit sekunder. Metabolit ini berfungsi untuk beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang fluktuatif serta sebagai respon pertahanan diri (Abdel-Aziz *et al.*, 2016). Tumbuhan mangrove memiliki senyawa bioaktif yang terdapat pada bagian akar, daun, batang dan bunganya (Karim *et al.*, 2020). Lebih lagi, daun mangrove diketahui berperan penting dalam beradaptasi dengan tingkat salinitas tinggi serta beradaptasi dengan paparan suhu maupun sinar matahari (Naskar *et al.*, 2020). Tipe morfologi daun mangrove mempengaruhi kemampuan dalam beradaptasi. Struktur kutikula yang tebal mampu melindungi daun dalam menerima radiasi sinar matahari (Lucena *et al.*, 2011). Hal ini diduga mempengaruhi produksi metabolit sekunder pada daun mangrove. Potensi metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mangrove sangat berpotensi dalam pengembangan produk farmaseutika, kosmesetika dan nutrasetika (Vinoth *et al.*, 2019).

*Rhizophora apiculata* adalah salah satu jenis mangrove yang keberadaannya umum ditemui di pesisir Indonesia (Ciptaningrum dan Putri, 2019). Lebih lagi mangrove spesies ini juga ditemukan di pesisir Teluk Awur, Jepara (Ridlo *et al.*, 2019). Perairan Teluk Awur adalah salah satu pantai yang terletak di Kabupaten Jepara, Jawa Tengah. Perairan ini merupakan salah satu daerah pengembangan pariwisata di Jawa Tengah (Deviana *et al.*, 2019). Keberadaan flora dan fauna di kawasan mangrove Teluk Awur membuat pemerintah daerah setempat menetapkan kawasan tersebut dijadikan tempat pendidikan dan penelitian. Spesies mangrove yang ada pada perairan Teluk Awur merupakan spesies asli dan hasil pengkayaan jenis dari *Mangrove Replant* (MR) yang dilakukan oleh organisasi KeSEMaT (Pradana *et al.*, 2013). Keberadaan mangrove *R. apiculata* pada lokasi ini belum banyak dikaji sebagai sumber metabolit sekunder.

Pemanfaatan mangrove *R. apiculata* di Indonesia belum optimal meski kandungan metabolit sekunder seperti tannin, saponin dan terpenoid dapat digunakan sebagai sumber antibakteri (Ramli *et al.*, 2020). Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ekstrak daun *R. apiculata* memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* (Dewanto *et al.*, 2021). Potensi ekstrak daun *R. apiculata* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus cereus* juga telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya (Sormin *et al.*, 2021). Akan tetapi, potensi *R. apiculata* melawan bakteri strain *multidrug resistant* (MDR) belum banyak dilaporkan.

Disamping potensinya dalam melawan bakteri patogen, *R. apiculata* asal perairan Teluk Awur Jepara juga diharapkan dapat digunakan sebagai sumber antioksidan melawan radikal bebas. Penelitian sebelumnya melaporkan kandungan metabolit sekunder pada mangrove *R. apiculata* meliputi fenol, alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, terpenoid dan steroid (Akasia *et al.*, 2021). Kandungan senyawa golongan fenolik mengindikasikan kemampuan suatu ekstrak sebagai sumber antioksidan yang baik (Palaniyandi *et al.*, 2020). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkaraktisasi senyawa bioaktif serta aktivitas potensi antibakteri melawan bakteri MDR dan aktivitas antioksidan ekstrak daun *R. apiculata* yang berasal dari Teluk Awur, Jepara.

## MATERI DAN METODE

Sampel berupa daun mangrove *R. apiculata* diambil dari perairan Teluk Awur, Jepara, Jawa Tengah. Identifikasi sampel daun *R. apiculata* dilakukan berdasarkan Noor *et al.* (2012), dengan mengamati bentuk morfologi sampel. Pengambilan sampel dilakukan pada daun yang memiliki karakteristik berwarna hijau, tidak cacat dan tidak terdapat serangga yang menempel. Selanjutnya sampel diletakkan pada *container box* kemudian dibawa menuju laboratorium untuk selanjutnya dilakukan preparasi.

Sampel daun berjumlah 20 helai yang telah diambil kemudian dibersihkan menggunakan *tissue*. Selanjutnya sampel dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40°C selama 3 x 24 jam. Setelah dilakukan pengeringan kemudian sampel dipotong menjadi ukuran kecil lalu ditimbang sebanyak 250 gram dan 200 gram kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi bertingkat dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol masing-masing 200 ml (Ridlo *et al.*, 2017). Sampel dimaserasi dalam n-heksana 200 mL selama 24 jam pada suhu ruang  $\pm 27^\circ\text{C}$ , lalu disaring. Residu dimaserasi kembali berturut-turut dalam etil asetat dan metanol dengan cara yang sama. Didapatkan 3 filtrat dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol. Hasil ekstraksi selanjutnya dievaporasi dengan suhu 31°C.

Kandungan senyawa bioaktif pada ekstrak kasar daun *R. apiculata* dilakukan menggunakan metode fitokimia (Akasia *et al.* 2021; Sibero *et al.* 2019; Sibero *et al.* 2020 dan Maria *et al.* 2018). Masing-masing ekstrak kasar dilarutkan dalam pelarut awal.

Dua mL masing-masing ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 2N, kemudian diaduk hingga larut. Sampel disaring menggunakan kertas saring *whatman* 0,45  $\mu\text{m}$ . Pelarut *Dragendorff* diteteskan ke dalam tabung lalu diamati endapan yang terbentuk. Adanya senyawa alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan kuning menuju orange ketika ditambahkan *Dragendorff*.

Sebanyak 0,5 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan HCl pekat 0,25 mL, kemudian dipanaskan selama 15 menit kemudian diamati perubahan warnanya. Adanya senyawa flavonoid ditandai dengan warna orange, merah atau magenta tergantung dengan struktur flavonoid yang terkandung dalam sampel tersebut.

Sebanyak 0,5 mL sampel daun yang telah dipekatkan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan aquadest 1,25 mL, kemudian tabung tersebut dipanaskan hingga mendidih. Selanjutnya tabung reaksi dikocok secara vertikal hingga terbentuk busa. Diamati selama 30 menit, kemudian diteteskan satu tetes HCl 2N ke tengah permukaan larutan. Adanya busa yang stabil menunjukkan hasil yang positif pada metode ini.

Sebanyak 0,5 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan tiga tetes asetat anhidrida, kemudian dipanaskan hingga mendidih dan didinginkan pada suhu ruangan. Selanjutnya ditambahkan satu tetes asam sulfat  $\text{H}_2\text{SO}_4$  melalui dinding tabung reaksi. Adanya senyawa golongan steroid ditandai dengan munculnya warna hijau pada lapisan atas dan warna merah pekat pada lapisan bawah menandakan adanya senyawa triterpenoid.

Uji Fenolik dilakukan dengan cara menambahkan 0,5 mL ekstrak daun mangrove yang ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  1%, kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Indikator positif dari uji fenol adalah terbentuknya warna biru kehitaman

Sebanyak 0,5 mL sampel daun dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan aquadest 1,25 mL kemudian ditambahkan 0,25 mL NaOH 2N. Adanya kandungan senyawa kuinon ditandai dengan timbulnya warna pink kemerahan/ungu.

Analisis metabolit sidik jari pada daun *R. apiculata* dilakukan menggunakan plat KLT silica gel 60 F<sub>254</sub> (merek) sebagai fase diam, sedangkan fase gerak menggunakan kombinasi pelarut organik n-heksana:etil asetat (7:3) (Frederick *et al.*, 2021). Kombinasi pelarut dilakukan berdasarkan percobaan *trial and error*. Hasil uji KLT selanjutnya dilakukan visualisasi menggunakan sinar ultraviolet 366 nm dan perendaman beberapa pereaksi seperti; pereaksi vanillin,  $\text{FeCl}_3$ , *Dragendorff*, DPPH dan  $\text{AlCl}_3$ .

Bakteri MDR *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. cereus* dan *B. subtilis* diremajakan pada media *Nutrient Agar* selama 24 jam sebelum digunakan dalam uji antibakteri. Tahap ini mengacu pada standar

pengujian oleh CLSI (2016). Ekstrak daun yang telah dipekatkan diencerkan menggunakan DMSO hingga konsentrasinya menjadi 2000 µ/mL, 1000 µ/mL, 500 µ/mL dan 250 µ/mL (Sibero *et al.*, 2019). Tahap uji antibakteri dilakukan berdasarkan Nurhayati *et al.* (2020). Bakteri diencerkan menggunakan media *Mueller Hilton Broth* hingga mencapai kekeruhan 0,5 *McFarland*. Suspensi bakteri uji diinokulasikan pada media MHA menggunakan *cotton swab* lalu didiamkan hingga agak kering. Kemudian lubang sumuran (*agar well*) dibuat menggunakan alat pembolong steril kemudian *crude extract* dimasukkan dengan masing-masing konsentrasi yang telah ditentukan sebanyak 50 µL ke dalam sumuran. Selanjutnya petri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C kemudian diamati zona bening yang terbentuk. Diameter zona hambat kemudian diukur menggunakan jangka sorong untuk mengetahui efektivitas konsentrasi (Sibero *et al.*, 2018).

Tiga mL larutan ekstrak dengan konsentrasi 7.81, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 dan 500 ppm ditambah 1 mL DPPH, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang (27°C) dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm (Ridlo *et al.*, 2019). Penentuan % *radical scavenging activity* adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ RSA} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam IC<sub>50</sub> yang merupakan konsentrasi sampel untuk menghambat 50% radikal bebas. Nilai ini dihitung menggunakan regresi linear (Haerani *et al.*, 2019).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi menggunakan tiga pelarut didapatkan ekstrak kasar dengan pelarut n-heksana sebesar 0,1 gram; pelarut etil asetat sebesar 2,8 gram; sedangkan pelarut metanol sebesar 6,6 gram. Ketiga ekstrak kasar berbentuk pasta. Ekstrak n-heksana berwarna coklat tua; ekstrak etil asetat berwarna coklat kehitaman; sedangkan ekstrak metanol berwarna hijau tua kehitaman. Selanjutnya seluruh ekstrak kasar dilanjutkan untuk uji fitokimia. Rendemen ekstrak dipengaruhi oleh jenis dan polaritas pelarut serta karakteristik alami sampel seperti kandungan proksimatnya (). Jumlah rendemen yang diperoleh dari pelarut n-heksana tercatat sebagai yang paling rendah karena pelarut ini umumnya akan menarik senyawa-senyawa non-polar, khususnya asam lemak. Pelarut etil asetat bersifat semi-polar sehingga mampu mengekstrak beberapa senyawa non-polar dan polar. Sedangkan, metanol mampu menarik berbagai senyawa dengan rentang kepolaran yang sangat besar maupun kandungan air yang berasal dari sampel. Hal ini yang diduga mempengaruhi berat rendemen ekstrak yang diperoleh (Sibero *et al.*, 2019<sup>b</sup>). Selanjutnya, keberadaan senyawa bioaktif pada seluruh ekstrak dideteksi menggunakan metode fitokimia. Hasil deteksi dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil analisis fitokimia ekstrak daun *R. apiculata*

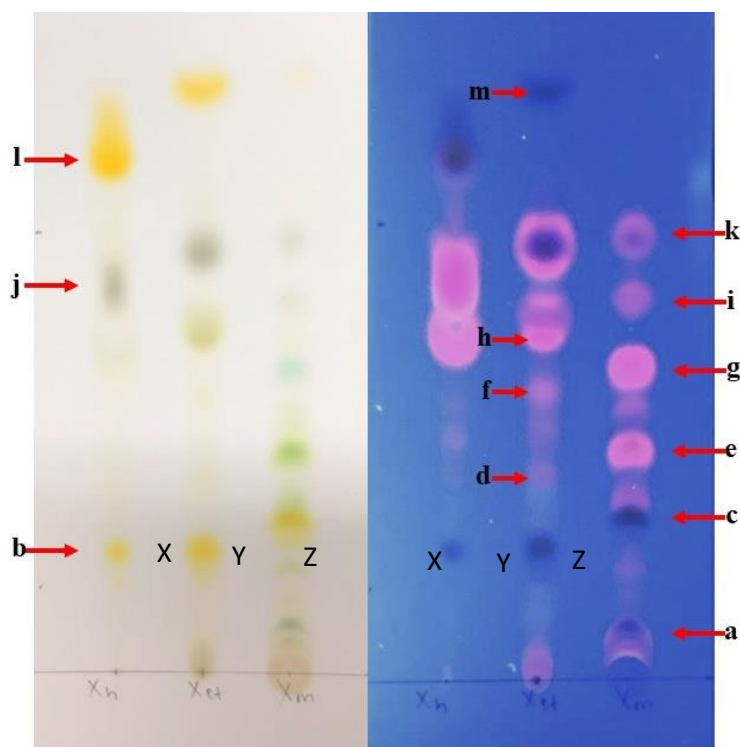
No	Analisis	Pelarut		
		n-heksana	Etil Asetat	Metanol
1	Alkaloid	+	+	+
2	Flavonoid	-	-	+
3	Fenolik	-	+	+
4	Steroid	+	+	-
5	Triterpenoid	-	-	-
6	Kuinon	-	-	-
7	Saponin	-	-	+

Keterangan: (+ : hasil positif, - : hasil negatif)

Berdasarkan hasil pengujian fitokimia diketahui bahwa ekstrak metanol daun *R. apiculata* mengandung senyawa bioaktif dari golongan alkaloid, flavonoid, fenolik, dan saponin. Ekstrak *R. apiculata* dengan pelarut etil asetat terdeteksi memiliki golongan senyawa bioaktif dari golongan alkaloid, fenolik dan steroid. Sedangkan ekstrak *R. apiculata* dengan pelarut n-heksana menunjukkan adanya golongan senyawa bioaktif alkaloid dan steroid. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Akasia *et al.* (2021), menunjukkan bahwa hasil uji fitokimia terhadap mangrove jenis *R. apiculata* dengan pelarut metanol mampu mengekstrak senyawa bioaktif dari golongan fenolik, alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa pelarut metanol mampu mengekstrak lebih banyak senyawa bioaktif, di mana hal tersebut terjadi karena pelarut metanol merupakan pelarut universal, seperti yang dijelaskan dalam Verdiana *et al.* (2018), bahwa metanol dapat menarik senyawa dengan berbagai tingkat kepolaran.

Analisis metabolit sidik jari (*metabolite finger printing analysis*) merupakan suatu metode karakterisasi perubahan kandungan metabolit suatu sampel akibat perbedaan kondisi lingkungan (Liang *et al.*, 2015). Namun penelitian yang dilakukan menggunakan metode ini untuk mengetahui perbedaan profil metabolit sampel yang di ekstrak menggunakan pelarut yang berbeda. Analisis ini dilakukan menggunakan plat KLT sebagai fase diam dan eluen n-heksana:etil asetat (7:3) sebagai fase gerak (Frederick *et al.*, 2021). Metode yang paling sederhana untuk melakukan analisis ini adalah menggunakan plat KLT. Kelebihan metode ini dibandingkan fitokimia adalah data yang didapatkan lebih *reliable* karena mampu menggambarkan perbedaan metabolit secara presisi dari perbedaan karakteristik noda pada plat KLT. Perbedaan nilai  $R_f$  serta warna setiap noda mengindikasikan jenis metabolit yang berbeda pula (Karthika dan Paulsamy, 2015).

Penelitian ini melakukan analisis metabolit sidik jari melalui visualisasi noda pada plat KLT menggunakan iluminasi dengan sinar UV serta penambahan reagent. Hasil visualisasi di bawah sinar UV 366 nm menunjukkan bahwa perbedaan pelarut ekstraksi menghasilkan noda dengan nilai  $R_f$  berbeda. Nilai  $R_f$  dan warna noda yang sama mengindikasikan adanya senyawa golongan yang sama pada ekstrak.



**Gambar 1.** Profil ekstrak di bawah sinar tampak dan UV menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (7:3)

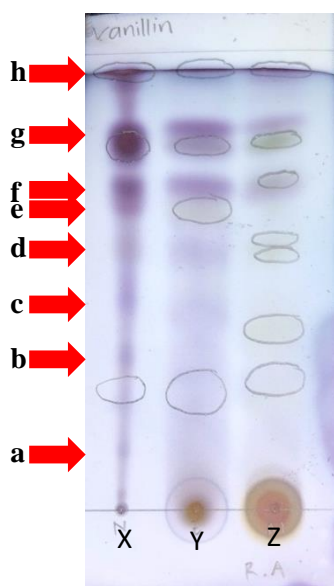
Hasil visualisasi KLT di bawah sinar tampak dan UV terlihat bahwa terdapat 5 noda yang muncul pada ekstrak n-heksana, 7 noda pada ekstrak etil asetat dan 6 noda pada ekstrak metanol. Terdapat 2 noda dengan nilai  $R_f$  yang sama pada ekstrak n-heksana dan etil asetat, begitu pula terdapat 2 noda dengan nilai  $R_f$  yang sama pada ekstrak etil asetat dan metanol. Bercak noda yang memiliki  $R_f$  yang sama diduga menunjukkan bahwa beberapa senyawa tersebut dapat di ekstrak menggunakan pelarut yang berbeda kepolaran. Lebih lagi, noda berwarna kuning pada plat KLT diduga pigmen karotenoid sedangkan noda berwarna hijau merupakan pigmen klorofil yang terdapat pada sampel daun (Lumbessy *et al.*, 2021). Selanjutnya, hasil deteksi senyawa golongan steroid dan terpenoid ditampilkan pada Gambar 2 dan Tabel 3.

Hasil visualisasi vanilin pada plat KLT (Gambar 2) menunjukkan adanya bercak noda ungu pada ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol dengan nilai  $R_f$  yang berbeda-beda. Hasil penyempotan dengan reagen vanilin menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana menunjukkan jumlah

**Tabel 2.** Retention factor ( $R_f$ ) ekstrak kasar daun *R. apiculata*

Ekstrak	Retention Factor ( $R_f$ )												
	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m
X		0,26			0,38			0,60		0,79		0,91	
Y		0,26		0,35		0,52		0,60	0,76		0,85		0,95
Z	0,11		0,29		0,38		0,57		0,76		0,85		

Keterangan : X : ekstrak n-heksana, Y : ekstrak etil asetat, Z : ekstrak metanol



**Gambar 2.** Profil Ekstrak dengan reagen vanillin dan UV menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (7:3)

**Tabel 3.** Retention factor ( $R_f$ ) ekstrak daun *R. apiculata* dengan reagen vanillin

Ekstrak	Retention Factor ( $R_f$ )							
	a	b	c	d	e	f	g	H
X	0,12	0,30	0,51		0,70	0,71	0,82	0,96
Y				0,62		0,71	0,82	0,96
Z						0,71	0,82	0,96

Keterangan: X : ekstrak n-heksana, Y : ekstrak etil asetat, Z : ekstrak metanol

noda ungu yang lebih banyak dibandingkan ekstrak dari pelarut lainnya. Warna ungu yang muncul pada plat KLT yang disemprotkan dengan reagen vanillin diduga adalah senyawa terpenoid dan steroid (Alen *et al.*, 2017). Hal ini sesuai dengan penelitian Jiang *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa n-heksana merupakan pelarut yang tepat untuk mengekstrak senyawa dari golongan terpenoid. Golongan senyawa berikutnya yang dideteksi adalah fenolik. Hasil deteksi ini ditampilkan pada Gambar 3 dan Table 4.

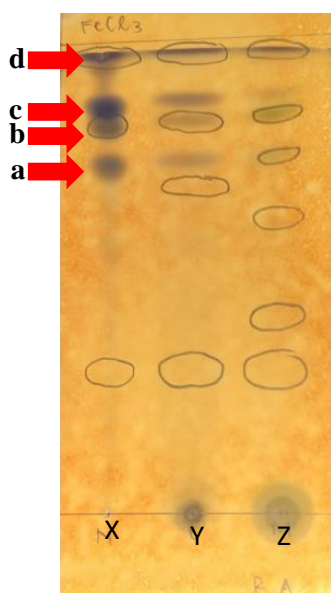
Hasil visualisasi  $FeCl_3$  pada plat KLT (Gambar 3) menunjukkan adanya bercak noda hitam kebiruan pada ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol dengan nilai  $R_f$  0,70 (a); 0,78 (b); 0,80 (c) dan 0,98 (d). Warna hitam kebiruan yang muncul pada plat KLT yang disemprotkan dengan reagen  $FeCl_3$  diduga sebagai senyawa dari golongan fenolik (Alen *et al.*, 2017). Selanjutnya deteksi senyawa dari golongan alkaloid ditampilkan pada Gambar 4.

Hasil visualisasi menggunakan reagen Dragendorf pada plat KLT (Gambar 4) menunjukkan tidak adanya bercak warna kuning/jingga pada ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol. Penyemprotan Dragendorf dilakukan untuk mendeteksi senyawa alkaloid pada ekstrak (Alen *et al.*, 2017). Hal ini diduga akibat konsentrasi alkaloid yang rendah pada ekstrak yang dianalisis sehingga tidak dapat terdeteksi menggunakan metode plat KLT. Selanjutnya deteksi keberadaan senyawa dari golongan flavonoid dilakukan dengan penyemprotan reagen  $AlCl_3$  (Guntarti *et al.*, 2017). Hasil deteksi ditampilkan pada Gambar 5.

**Tabel 4.** Retention factor ( $R_f$ ) ekstrak daun *R. apiculata* dengan reagen  $FeCl_3$

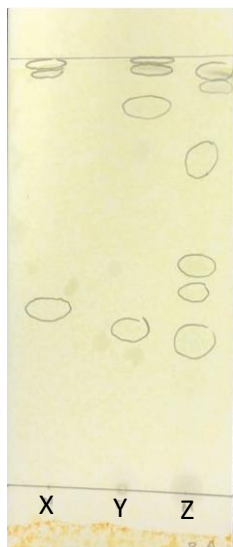
Ekstrak	Retention Factor ( $R_f$ )			
	a	b	c	d
X	0,74	0,82	0,87	0,96
Y	0,74	0,82	0,87	0,96
Z	0,74	0,82	0,87	0,96

Keterangan: X : ekstrak n-heksana, Y : ekstrak etil asetat, Z : ekstrak metanol

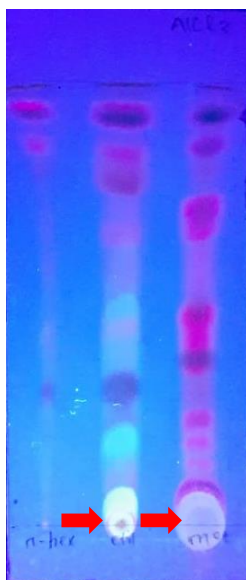


**Gambar 3.** Profil ekstrak dengan reagen  $FeCl_3$  menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (7:3)





**Gambar 4.** Profil ekstrak dengan reagen Dragendorff menggunakan eluen n-heksana: etil asetat (7:3)



**Gambar 5.** Profil ekstrak dengan Reagen  $AlCl_3$  setelah diiluminasi dengan UV menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (7:3)

Hasil visualisasi  $AlCl_3$  pada plat KLT (Gambar 5) ditemukan adanya perubahan warna noda menjadi kuning berpendar di bawah sinar UV pada  $R_f$  0,33 yang dimiliki oleh ekstrak etil asetat dan metanol. Hasil ini sesuai dengan kajian sebelumnya yang menyatakan bahwa flavonoid dapat di ekstrak oleh pelarut metanol dan etil asetat (Sibero *et al.*, 2019b). Setelah mengetahui profil metabolit sekunder pada setiap sampel maka dilakukan bioassay untuk mengetahui potensi antibakteri dan antioksidan ekstrak daun *R. apiculata* asal perairan Teluk Awur, Jepara. Hasil uji antibakteri melawa patogen MDR dapat dilihat pada Tabel 5.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa seluruh ekstrak daun *R. apiculata* tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen MDR yang digunakan. Hasil ini bertentangan dengan beberapa penelitian sebelumnya yang menunjukkan ekstrak *R. apiculata* memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri pathogen manusia. Dewanto *et al.* (2021) melaporkan bahwa ekstrak daun *R. apiculata* dengan pelarut metanol dan dichloromethane mampu

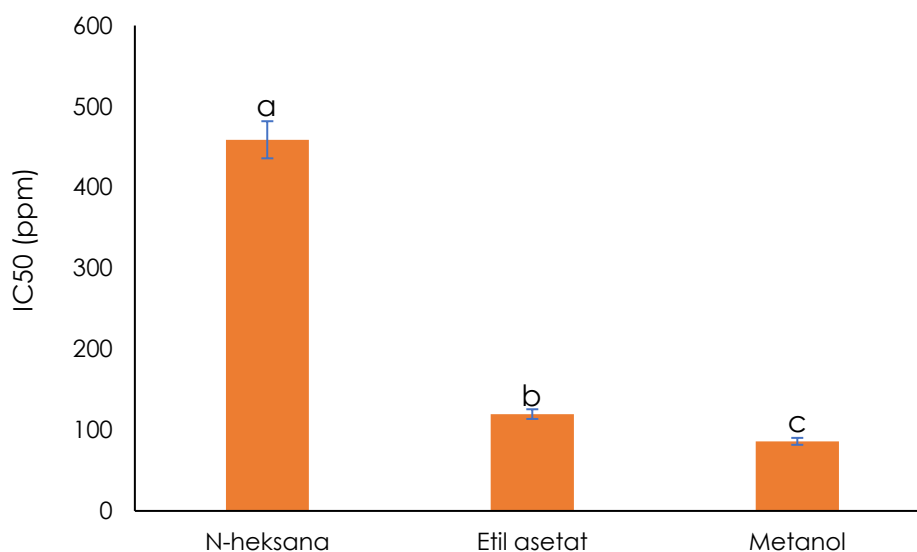
menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif *Pseudomonas aeruginosa*. Penelitian yang dilakukan oleh Sormin *et al.* (2021) menunjukkan bahwa ekstrak daun *R. apiculata* dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri Gram positif: *Bacillus cereus* dan *Staphylococcus aureus* maupun Gram negatif: *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. Perbedaan ini dapat dipengaruhi oleh jenis strain patogen yang digunakan. Pada penelitian ini menggunakan bakteri strain *clinical multidrug-resistant (MDR)*. Strain *clinical MDR* mengindikasikan bahwa bakteri patogen yang digunakan merupakan hasil isolasi langsung dari pasien yang diinfeksi oleh bakteri yang sudah resisten terhadap berbagai jenis antibiotik (Megiorakos *et al.*, 2012). Bakteri MDR diketahui memiliki berbagai mekanisme resistensi untuk mencegah kerusakan sel yang diakibatkan oleh induksi berbagai substansi yang bersifat sebagai antimikroba. Hal ini dapat diasumsikan sebagai penyebab ketidak mampuan ekstrak daun *R. apiculata* untuk menghambat pertumbuhan bakteri MDR yang diujikan. Dengan demikian, ekstrak daun *R. apiculata* tidak disarankan untuk digunakan sebagai sumber antibakteri melawan bakteri MDR. Kajian bioassay selanjutnya yang dilakukan adalah uji antioksidan. Hasil uji ini ditampilkan oleh Gambar 7.

Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam nilai *inhibition concentration (IC<sub>50</sub>)*. Nilai ini berarti konsentrasi minimal yang dibutuhkan untuk menghambat radikal bebas sebesar 50%, sehingga semakin kecil nilai *IC<sub>50</sub>* maka aktivitasnya akan semakin baik (Sibero *et al.*, 2022). Hasil uji antioksidan ekstrak daun *R. apiculata* menunjukkan bahwa ekstrak metanol memberikan kemampuan aktivitas antioksidan tertinggi dengan nilai *IC<sub>50</sub>*  $85.999 \pm 0,1483$  ppm, diikuti dengan etil asetat dengan nilai *IC<sub>50</sub>*  $119.69 \pm 0,407$  ppm dan aktivitas antioksidan paling lemah ditunjukkan pada ekstrak n-heksana dengan nilai *IC<sub>50</sub>*  $458.77 \pm 0,217$  ppm. Muttakin *et al.* (2019) menyatakan bahwa nilai *IC<sub>50</sub>* 50-100 ppm

**Tabel 5.** Aktivitas antibakteri ekstrak daun *R. apiculata*

No	Bakteri Uji	Konsentrasi (mg/mL)					
		2	1	0,5	0,25	(+) Amoxicillin	(-) DMSO
1.	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	++	-
2.	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	++	-
3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	++	-
4.	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	++	-

Keterangan: ++ (menghasilkan zona hambat), - (tidak menghasilkan zona hambat)

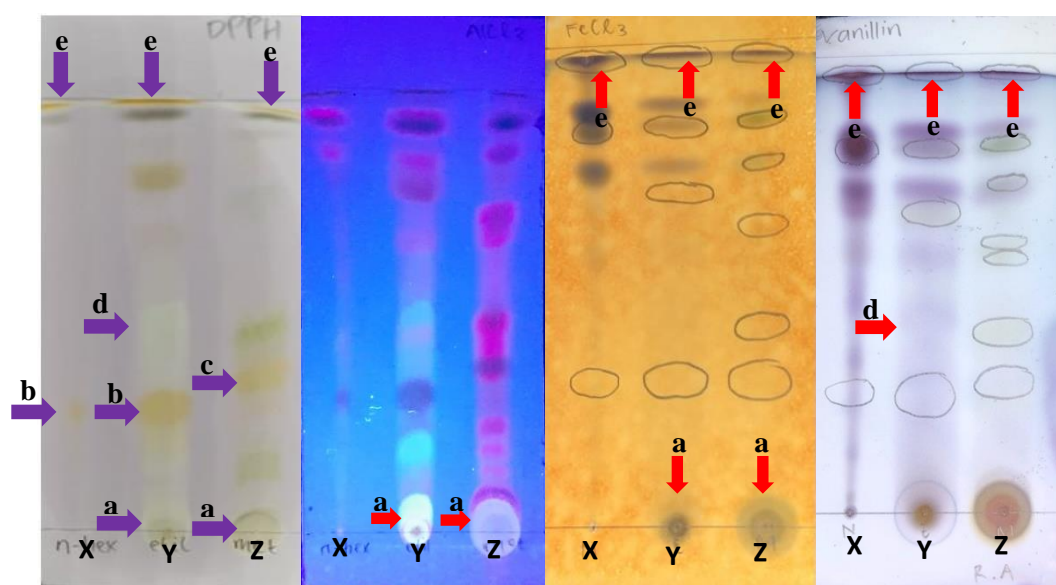


**Gambar 7.** Aktivitas Antioksidan (IC<sub>50</sub>) Ekstrak Daun *R. apiculata*

dikategorikan sebagai antioksidan kuat. Ekstrak metanol memiliki kemampuan antioksidan paling kuat dibanding ekstrak etil asetat dan n-heksana. Hal ini diduga karena pelarut metanol memiliki kepolaran tinggi sehingga mampu mengekstrak senyawa-senyawa bioaktif polar dan non polar. Aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh keberadaan metabolit sekunder yang terkandung pada suatu sampel. Senyawa dari golongan fenolik seperti flavonoid, tannin dan kuinon diketahui sebagai agen antioksidan yang sangat baik. Hal ini diperkuat oleh Palaniyandi *et al.* (2020), bahwa senyawa fenolik dari tumbuhan merupakan sumber antioksidan alami yang baik. Flavonoid, tannin dan fenolik dikenal sebagai sumber antioksidan yang kuat karena kemampuannya mendonorkan proton untuk menstabilkan radikal bebas. Menurut Ridlo *et al.* (2017), senyawa fenolik akan memutuskan reaksi berantai (*chain reaction*) radikal dan akan mendonorkan atom hidrogennya sehingga dihasilkan radikal bebas yang lebih stabil. Berdasarkan hasil yang didapatkan, penelitian ini menemukan bahwa ekstrak metanol daun *R. apiculata* berpotensi digunakan sebagai antioksidan.

Penelitian ini melakukan bioautografi menggunakan KLT dengan penyemprotan reagen DPPH. Bioautografi merupakan suatu metode yang dilakukan untuk mendeteksi hingga mengisolasi suatu senyawa berdasarkan aktivitas biologis yang ditargetkan menggunakan kromatografi yang sesuai (Wang *et al.*, 2012). Pada penelitian ini, bioautografi dilakukan untuk menduga golongan senyawa bioaktif dari ekstrak daun *R. apiculata* yang berfungsi sebagai agen antioksidan. Pendugaan golongan senyawa dilakukan dengan mengkombinasikan pemahaman dari analisis metabolit sidik jari dengan hasil penyemprotan reagen DPPH. Hasil tahapan ini ditampilkan pada Gambar 8.

Hasil visualisasi menggunakan reagent DPPH pada plat KLT (Gambar 8) menunjukkan adanya bercak noda kuning pada ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol dengan nilai  $R_f$  yang berbeda-beda. Warna putih pudar hingga kuning yang muncul pada plat KLT yang disemprotkan dengan reagen DPPH diduga adalah komponen senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan (Jesionek *et al.*, 2015). Berdasarkan hasil analisis metabolit sidik jari menggunakan observasi warna dan pemberian reagent maka dapat diketahui bahwa senyawa yang memberikan efek antioksidan pada sampel daun *R. apiculata* merupakan golongan flavonoid (a), terpenoid (d) dan fenolik (e). Sebagai catatan, noda a dan e diduga sebagai kumpulan senyawa yang tidak dapat terpisahkan dengan sempurna sehingga pada noda tersebut juga terdeteksi beberapa golongan senyawa. Hasil ini kembali menegaskan bahwa senyawa golongan flavonoid dan fenolik memiliki potensi sebagai antioksidan (Ridlo *et al.*, 2017; Palaniyandi *et al.*, 2020). Berdasarkan hasil visualisasi di bawah sinar tampak (Gambar 1) diduga bahwa noda b dan c merupakan pigmen yang terkandung di



**Gambar 8.** Profil Ekstrak dengan Reagen DPPH dan UV menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (7:3)

dalam duan *R. apiculata*. Hasil ini sesuai dengan laporan Rumengan *et al.* (2021) yang menyatakan bahwa daun mangrove *Rhizophora* mengandung berbagai pigmen alami yang berpotensi sebagai antioksidan seperti lutein, neoxanthin, violaxanthin, dan  $\beta$ -karoten. Lebih lagi, pigmen  $\beta$ -karoten sering ditemukan pada noda terakhir dengan nilai  $R_f$  terbesar pada plat KLT (Zeb dan Murkovic, 2010). Sehingga noda e diduga sebagai pigmen  $\beta$ -karoten.

## KESIMPULAN

Ekstrak daun *R. apiculata* asal perairan Teluk Awur Jepara mengandaung beberapa senyawa bioaktif seperti: golongan senyawa bioaktif alkaloid, flavonoid, fenolik, dan saponin pada pelarut metanol; golongan senyawa alkaloid, fenolik dan steroid pada pelarut etil asetat; sedangkan golongan senyawa alkaloid dan steroid pada pelarut n-heksana. Ekstrak daun *R. apiculata* pada ketiga pelarut tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri melawan bakteri MDR (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. cereus* dan *B. subtilis*). Ekstrak metanol menunjukkan potensi antioksidan tertinggi dengan nilai  $IC_{50}$   $85.999 \pm 0,1483$  ppm. Berdasarkan hasil analisis metabolit sidik jari yang dikombinasikan dengan bioautografi diduga bahwa senyawa yang bersifat antioksidan berasal dari golongan pigmen  $\beta$ -karoten, flavonoid, fenol dan terpenoid.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Artikel ini merupakan luaran dari program penelitian yg didanai oleh FPIK UNDIP melalui skema penelitian tahun 2022 dengan nomor kontrak 246/UN7.5.10.2/PP/2022 yang diterima oleh Dr. Mada Triandala Sibero.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Aziz, S.M., Mouafi, F.E., Moustafa, Y.A., & Abdelwahed, N.A. (2016). Medicinal Importance of Mangrove Plants. *Microbes in Food and Health*. Springer, Cham, pp. 77-96.
- Akasia, A.I., Putra, I.D.N.N., & Putra, I.N.G. (2021). Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Mangrove *Rhizophora mucronata* dan *Rhizophora apiculata* yang Dikoleksi dari Kawasan Mangrove Desa Tuban, Bali. *Journal of Marine Research and Technology*, 4(1), 16–22.
- Alen, Y., Agresa, F.L., & Yuliandra, Y. (2017). Test and repair of non-volatile commodity and embedded memories. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 3(2), 146–152. doi: 10.1109/TEST.2002.1041926.
- Ciptaningrum, I., & Putri, R.A. 2019. Efek Antimikroba *Rhizophora apiculata* untuk Menghambat Pertumbuhan Bakteri. *Jurnal Farmasetis*, 8(2), 75-82.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (2016) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th Edition, Wayne.
- Dahibhate, N.L., Saddhe, A.A., & Kumar, K. (2018). Mangrove Plants as a Source of Bioactive Compounds: A Review. *The Natural Products Journal*, 9(2), 86–97. doi: 10.2174/2210315508666180910125328.
- Deviana, D.A., Purwanti, F., & Rudiyaniti, F. (2019). Analisis Kesesuaian Wisata Pantai Teluk Awur di Kabupaten Jepara Jawa Tengah. *Journal of Maquares*, 8(2), 93-101.
- Dewanto, D.K., Hermawan, R., Muliadin., Riyadi, P.H., Aisiah, S., & Tanod, W.A. (2021). Gc-MS Profile Of *Rhizophora Apiculata* Leaf Extract From The Coast Of Tomini Bay, Central Sulawesi With Antibacterial And Antioxidant Activity. *Jurnal Kelautan*. 14(1), 30–42. doi: 10.21107/jk.v14i1.8904.
- Frederick, E.H., Sibero, M.T., Wijaya, A.P., & Syafitri, E. (2021). Preliminary Evaluation of Anti Fish Pathogenic Bacteria and Metabolite Profile of Andaliman Fruit (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) Ethanol Extract. *The 6th International Conference on Tropical and Coastal Region Eco-Development*, May, 1–6. doi: 10.1088/1755-1315/750/1/012026.
- Guntarti, A., Annisa, J., Mughniy, M., & Rizqi, F. (2017). Effect of Regional Variation on the Total Flavonoid Level of Ethanol Extract of Mangosteen (*Garcinia mangostana*) Peels. *Indonesian Journal of Medicine and Health*, 8(2), 136-143. doi: 10.20885/JKKI.Vol8.Iss2.art9.
- Haerani, A., Chaerunisa, A.Y., & Subarnas, A. (2019). Antioxidant Activities of *Muntingia calabura*, *Syzygium cumini*, *Ocimum basilicum*, and *Eleutherine bulbosa* using DPPH Method. *Indonesian*

- Journal of Pharmaceutics*, 1(2), 57–61. doi: 10.24198/idjp.v1i2.21531.
- Jesionek, W., Majer-Dziedzic, B., & Choma, I. (2015). Separation, Identification, and Investigation of Antioxidant Ability of Plant Extract Components Using TLC, LC-MS, and TLC-DPPH. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38(11), 1147-1153. doi: 10.1080/10826076.2015.1028295.
- Jiang, Z., Kempinski, C., & Chappell, J. (2016). Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids. *Current Protocols in Plant Biology*, 1, 345-358. doi: 10.1002/cppb.20024.
- Karim, M.A., Islam, M. A., Islam, M. M., Rahman, M. S., Sultana, S., Biswas, S., Hosen, M. J., Mazumder, K., Rahman, M.M., & Hasan, M.N. (2020). Evaluation of antioxidant, anti-hemolytic, cytotoxic effects and anti-bacterial activity of selected mangrove plants (*Bruguiera gymnorrhiza* and *Heritiera littoralis*) in Bangladesh. *Clinical Phytoscience*, 6(8), 1-12. doi: 10.1186/s40816-020-0152-9.
- Karthika, K., & Paulsamy, S. (2015). TLC and HPTLC fingerprints of various secondary metabolites in the stem of the traditional medicinal climber, *Solena amplexicaulis*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77(1), 111-6. doi: 10.4103/0250-474x.151591.
- Liang, Q., Wang, C., Li, B., & Zhang, A. (2015). Metabolic fingerprinting to understand therapeutic effects and mechanisms of silybin on acute liver damage in rat. *Pharmacognosy Magazine*, 11(43), 586–593. doi: 10.4103/0973-1296.160469
- Lucena, I., Maciel, V.E.D.O., Silva, J.B.D., Galvencio, J.D., & Pimentel, R.M.D.M. (2011). Leaf Structure of Mangrove Species to Understand the Spectral Responses. *Journal of Hyperspectral Remote Sensing*, 02, 19-31.
- Lumbessy, S.Y., Junaidi, M., Diniarti, N., Setyowati, D.N., Mukhlis, A., & Tambaru, R. (2021). Identification of Chlorophyll Pigment on *Gracilaria salicornia* Seaweed. *IOP Conference. Series: Earth and Environmental Science*, 681(1), p. 012017. doi: 10.1088/1755-1315/681/1/012017.
- María, R., Shirley, M., Xavier, C., Jaime, S., David, V., Rosa, S., & Jodie, D. (2018). Science Preliminary phytochemical screening , total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. *Journal of King Saud University*. 30, 500–505. doi: 10.1016/j.jksus.2017.03.009.
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vataopoulos, A., Weber, J.T. & Monnet, D.L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbial Infection*, 18(3), 268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Muttakin., Zulfajri, M., & Mariati. (2019). Antioxidant Activity from *SyzygiumCumini* (L.) Skeels. *Journal of Physics: Conference Series*. 1232(1), p. 012009. doi: 10.1088/1742-6596/1232/1/012009.
- Naskar, S., Mondal, S., & Ankure, S. (2020). Leaf Anatomical Adaptations of Mangroves. *Handbook of Halophytes*, p.1-15. doi: 10.1007/978-3-030-17854-3\_36-1
- Noor, R., Khazali, M., & Suryadiputra, I.N.N. (1999). Panduan Pengamatan Mangrove di Indonesia. PHKA/WI-IP, Bogor.
- Nurhayati, L.S., Yahdiyani, N. & Hidayatulloh, A. (2020). Perbandingan Pengujian Aktivitas Antibakteri Starter Yogurt Dengan Metode Difusi Sumuran Dan Metode Difusi Cakram. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*. 1(2), 41-46. doi: 10.24198/jthp.v1i2.27537.
- Palaniyandi, T., Sivaji, A., Thirugnanasambandam, R., Durairaj, P., Reddy, R.K. & Vishwanathan, S. (2020). Isolation and identification of Anti-Oxidant Fraction from Active Extract of *Rhizophora mucronata* Poir Leaves. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 54(4), 380–385. doi: 10.1007/s11094-020-02208-9.
- Pradana, O.Y., Soenardjo, N. & Suryono. (2013). Kajian Bioekologi dan Strategi Pengelolaan Ekosistem Mangrove: Studi Kasus di Teluk Awur Jepara. *Journal of Marine Research*, 2(1), 54-61. doi: 10.14710/jmr.v2i1.2056.
- Ramli, H. K., Yuniarti, T., Lita, N.P.S.N, & Sipahutar, Y.H. (2020). Uji Fitokimia Secara Kualitatif Pada Buah dan Ekstrak Air Buah Mangrove. *Jurnal Penyuluhan Perikanan Dan Kelautan*. 14(1), 1–12. doi: 10.33378/jppik.v14i1.198.
- Ridlo, A., Pramesti, R., Koesoemadji, Supriyantini, E, & Soenardjo, N. (2017). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Mangrove *Rhizophora mucronata*. *Buletin Oseanografi Marina*. 6(2), 110-116. doi:

10.14710/buloma.v6i2.16555.

- Ridlo, A., Supriyantini, E., & Sedjati, S. (2019). Kandungan Total Fenolat pada Ekstrak *Rhizophora* sp Dari Teluk Awur, Jepara. *Jurnal Kelautan Tropis*. 22(1), 27-34. doi: 10.14710/jkt.v22i1.4304.
- Rumengan, A.P., Mandiangan, E.S., Tanod, W.A., Paransa, D.S.J., Paruntu, C.P., Mantiri, D.M.H. (2021). Identification of pigment profiles and antioxidant activity of *Rhizophora mucronata* mangrove leaves origin Lembeh, North Sulawesi, Indonesia. *Biodiversitas*, 22(7), 2805-2816.
- Sibero, M.T., Igarashi, Y., Radjasa, O.K., Sabdono, A., Trianto, A., Zilda, D.S. & Wijaya, Y.J. (2019). Sponge-associated fungi from a mangrove habitat in Indonesia: species composition, antimicrobial activity, enzyme screening and bioactive profiling. *International Aquatic Research*. 11(2), 173–186. doi: 10.1007/s40071-019-0227-8.
- Sibero, M.T., Sabdaningsih, A., Radjasa, O.K., Sabdono, A., Trianto, A., & Subagiyo, S. (2018). Karakterisasi Senyawa Bioaktif Kapang Laut *Trichoderma asperellum* MT02 dengan Aktivitas Anti-Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) *E. coli*. *Jurnal Kelautan Tropis* 9(22), 9-18 doi: 10.14710/jkt.v22i1.3528
- Sibero, M.T., Sabdono, A., Radjasa, O.K., & Trianto, A. (2018). Antibacterial Activity of Indonesian Sponge Associated Fungi Against Clinical Pathogenic Multidrug Resistant Bacteria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 8(2), 088-094. doi: 10.7324/JAPS.2018.8214.
- Sibero, M.T., Siswanto, A. P., Murwani, R., Frederick, E. H., Wijaya, A.P., Syafitri, E., Farabi, K., Saito, S, & Igarashi, Y. (2020). Antibacterial, cytotoxicity and metabolite profiling of crude methanolic extract from andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium*) fruit. *Biodiversitas*. 21(9), 4147–4154. doi: 10.13057/biodiv/d210928.
- Sormin, R.B.D., Nendissa, D.M., Mailoa, M.N., Rieuwpassa, F. & Wenno, M.R. (2021). Antibacterial activity of *Rhizophora apiculata* extract originated from Inner Ambon Bay against selected pathogen bacteria. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 797, 1-8. doi: 10.1088/1755-1315/797/1/012017.
- Vinoth, R., Kumaravel, S. & Ranganathan, R. (2019). Therapeutic and traditional uses of mangrove plants. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 9, 849-854. doi: 10.22270/jddt.v9i4-s.3457
- Zeb, A. & Murkovic, M. (2010). Thin-layer chromatographic analysis of carotenoids in plant and animal samples. *Journal of Planar Chromatography*. 23(2), 94-103. doi: 10.1556/jpc.23.2010.2.1