

## Aktivitas Anti-elastase dan Antioksidan dari Ekstrak Etanol Kayu Bangkal (*Nauclea subdita*) Korth. Steud. dengan Variasi Metode Ekstraksi

Sintiarni Ramadhani, Berna Elya\*, Roshamur Cahyan Forestrania

Program Studi Magister Herbal, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia, Depok 16424, Jawa Barat, Indonesia

**Sitasi:** Ramadhani, S., Elya, B., & Forestrania, R.C. (2023). Aktivitas Anti-elastase dan Antioksidan dari Ekstrak Etanol Kayu Bangkal (*Nauclea subdita*) Korth. Steud. dengan Variasi Metode Ekstraksi. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 9(2), 228-243. <https://doi.org/10.35311/jmpi.v9i2.347>

**Submitted:** 13 Juni 2023

**Accepted:** 19 November 2023

**Published:** 18 Desember 2023

\*Penulis Korespondensi:

Berna Elya

Email:

berna.elya@farmasi.ui.ac.id



Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

### ABSTRAK

Kayu Bangkal (*Nauclea subdita*) (Korth.) Steud. telah digunakan secara tradisional oleh penduduk asli Kalimantan Selatan, sebagai produk perawatan kulit berupa masker wajah, yang diyakini dapat melindungi kulit dari pengaruh buruk sinar matahari. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan rendemen, aktivitas anti-elastase, efek proliferasi sel, total polifenol, dan total flavonoid dan aktivitas antioksidan dari berbagai metode ekstraksi. Ekstraksi dilakukan dengan metode UAE (*Ultrasound Assisted Extraction*), MAE (*Microwave Assisted Extraction*), dan Soxhlet. Aktivitas anti-elastase dilakukan secara enzimatis menggunakan *Porcine Pancreatic Elastase* (PPE). Ekstrak teraktif dilanjutkan dengan pengujian proliferasi sel menggunakan HDFa. Pengujian kadar total polifenol dan flavonoid dilakukan dengan metode kolorimetri dan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, ABTS, dan FRAP. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rendemen metode ekstraksi UAE (*Ultrasound Assisted Extraction*) kayu bangkal menghasilkan rendemen tertinggi, dengan nilai 7,12% lebih tinggi dibandingkan metode MAE (*Microwave Assisted Extraction*) dan Soxhlet, aktivitas anti-elastase tertinggi diperoleh pada ekstrak metode UAE (361,22 µg/mL). Ekstrak teraktif memiliki efek proliferasi terhadap sel HDFa dependent dose, total fenol dan flavonoid tertinggi pada metode MAE dengan kadar berturut-turut 124.96±0.42 mg EAG/g ekstrak dan 16.62±0.23 mg EK/g ekstrak. Pengujian antioksidan dari masing-masing ekstrak umumnya menunjukkan aktivitas yang kuat dalam meredam radikal ABTS, DPPH dan reduksi besi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa metode ekstraksi UAE dalam menarik senyawa aktif *N. subdita* berpotensi sebagai anti elastase, antiaging, dan antioksidan dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat untuk dapat dikembangkan pada penelitian lebih lanjut.

**Kata Kunci :** Anti-elastase, Antioksidan, *Nauclea subdita*, Ekstraksi

### ABSTRACT

Bangkal Wood (*Nauclea subdita*) (Korth.) Steud. has been used traditionally by the natives of South Kalimantan, as a skin care product in the form of a face mask, which is believed to protect the skin from the harmful effects of sunlight. This study aims to compare the yield, anti-elastase activity, cell proliferation effect, total polyphenols, total flavonoids and antioxidant activity of various extraction methods. Extraction was carried out using the UAE (*Ultrasound Assisted Extraction*), MAE (*Microwave Assisted Extraction*), and Soxhlet methods. Anti-elastase activity was carried out enzymatically using porcine pancreatic elastase (PPE). The most active extract was followed by cell proliferation testing using HDFa. Tests for total levels of polyphenols and flavonoids were carried out using the colorimetric method and antioxidant activity using the DPPH, ABTS, and FRAP methods. The results showed that The Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) method of bangkal wood produced the highest yield, with a value of 7.12% higher than the Microwave Assisted Extraction (MAE) and Soxhlet methods. The highest anti-elastase activity was obtained in the UAE method extract (361.22 µg/mL). The most active extract has a dose-dependent proliferative effect on HDFa cells. The total phenols and flavonoids were highest in the MAE method with levels of 124.96±0.42 mg GAE/g extract and 16.62±0.23 mg QE/g extract, respectively. Antioxidant testing of each extract generally showed strong activity in reducing ABTS radicals, DPPH and iron reduction. The results of this study indicate that the UAE extraction method in extracting the active compounds of *N. subdita* has the potential to act as anti-elastase, antiaging and antioxidant compared to other extraction methods. This research is expected to provide information to the public to be developed for further research.

**Keywords :** Anti-elastase, Antioxidant, *Nauclea subdita*, Extraction

## PENDAHULUAN

Proses penuaan sangat dipengaruhi oleh paparan stres oksidatif pada kulit (Anggraini et al., 2020). Proses biologis dari penuaan sangat rumit sehingga menyebabkan perubahan morfologis dan fisiologis, terutama pada lapisan kulit yang terpapar sinar matahari (Anggraini et al., 2021). Dalam respons *photoaging*, ROS yang diproduksi secara berlebih, akan merangsang peningkatan ekspresi *Matrix metalloproteinase* (MMP) dan elastase, sehingga dapat menyebabkan penurunan sintesis protokollagen dan elastin. Elastin merupakan protein serat elastis, yang dibentuk oleh sel fibroblas, dan bersama dengan kolagen, dapat mempengaruhi sifat mekanik pada jaringan ikat, yang bertanggung jawab dalam menjaga elastisitas dan ketahanan kulit. Sel fibroblas akan mengalami penurunan populasi seiring bertambahnya usia. Penurunan populasi sel fibroblas menyebabkan penurunan biosintesis kolagen pada lapisan dermis yang dapat menyebabkan kerutan pada kulit serta mengarah pada proses penuaan (Nur et al., 2021).

Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan berbagai upaya untuk mencegah terjadinya penuaan dini. Saat ini, banyak bahan sintesis yang dipasarkan sebagai bahan kosmetik anti-penuaan, namun bahan tersebut dapat menimbulkan efek negatif seperti fotoalergi dan dermatitis kontak, yang dapat mengiritasi kulit dan menyebabkan alergi. Akibatnya, sumber alami, seperti ekstrak herbal sebagai bahan produk perawatan kulit, sangat penting untuk diteliti. Penelitian *in vitro* telah menunjukkan sifat antioksidan dan anti-elastase dari ekstrak herbal yang mengandung komponen fenolik (Desmiaty et al., 2020).

Beberapa tumbuhan dari famili Rubiaceae memiliki aktivitas anti-elastase yang kuat, seperti daun *Psychotria capensis* (Eckl.) Vatke (Rubiaceae) yang dapat menghambat elastase sebesar 80% ( $92,84 \pm 1,13\%$ ), dan ixorapeptide II, isolat dari *Ixora coccinea* L. (Rubiaceae), yang mengurangi

pelepasan elastase dengan nilai IC<sub>50</sub> 5,6  $\mu$ M (Ndlovu et al., 2013)(Ahmad et al., 2020). *Nauclea subdita*, (Korth.) Steud., anggota dari keluarga Rubiaceae, merupakan salah satu spesies dalam genus *Nauclea*. Penduduk asli Kalimantan Selatan secara empiris memanfaatkan kayu bangkal (*N. subdita*) sebagai perawatan kulit berupa masker wajah untuk melindungi kulit dari sinar matahari dan menghilangkan flek hitam (Rahmi et al., 2021). Penggunaan kayu bangkal mungkin terkait dengan aktivitas anti-elastasinya, namun penelitian tentang pengaruh aktivitas anti-elastase pada kulit kayu bangkal sebagai produk perawatan kulit belum pernah diteliti secara ilmiah. Menurut Jamaluddin, ekstrak kasar metanol kayu bangkal mengandung fenolik, flavonoid, terpenoid, alkaloid, fitosterol, dan saponin (Jamaluddin et al., 2012). Alkaloid, flavonoid, dan polifenol merupakan zat aktif antioksidan. Jumlah komponen flavonoid dalam ekstrak mempengaruhi potensi aktivitas anti-elastase (Ambarwati et al., 2019). Jika dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya (perkolasi, maserasi, dan air suling), dan jenis pelarut (seperti etanol 96%, etanol 70%, dan etil asetat), sokletasi dengan etanol 96% memberikan konsentrasi fenolik total terbesar yaitu  $81,121 \pm 1,66$  mg EAG/g ekstrak (Rahmi et al., 2021). Selain itu, penelusuran literatur sebelumnya, metode ekstraksi konvensional berpengaruh pada hasil rendemen, maka dari itu pada penelitian ini digunakan berbagai metode ekstraksi konvensional dan non konvensional untuk membandingkan hasil rendemen pada kayu bangkal. Pada penelitian ini dilakukan evaluasi terkait optimasi ekstraksi dengan metode konvensional yaitu Soxhlet, dan metode non konvensional yaitu *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) dan *Microwave Assisted Extraction* (MAE) menggunakan pelarut etanol 96%. Keuntungan dari metode sokletasi adalah lebih banyak minyak yang dapat diekstraksi, dan lebih sedikit pelarut yang digunakan. UAE merupakan metode ekstraksi menggunakan gelombang

ultrasonik, keuntungan dari metode ini yaitu efisiensi lebih besar, suhu ekstraksi lebih rendah, waktu operasinya lebih singkat (Panja, 2018). MAE merupakan metode ekstraksi menggunakan gelombang mikro, keuntungan dari metode ini yaitu waktu ekstraksi yang lebih pendek, selektivitas yang lebih tinggi dan kualitas ekstrak target yang lebih baik dibandingkan dengan metode ekstraksi konvensional (Chemat & Vian, 2014).

Menurut penelitian Charissa, aktivitas antioksidan gel ekstrak kulit batang dengan menggunakan etanol 96% tergolong kuat dan memiliki IC<sub>50</sub> sebesar 48,78 µg/mL (Charissa et al., 2017). Oleh karena itu dalam penelitian ini bertujuan untuk membandingkan rendemen ekstrak etanol 96% dari kayu

bangkal dengan menggunakan metode konvensional (Soxhlet) dan non konvensional (UAE dan MAE), membandingkan aktivitas anti-elastase, efek proliferasi terhadap sel kulit, kadar polifenol dan flavonoid total, dan aktivitas antioksidan (DPPH, FRAP, dan ABTS) dari berbagai metode ekstraksi.

## METODE PENELITIAN

### Bahan tanaman

Kayu bangkal (*Nauclea subdita*) (Korth.) Steud. (Famili Rubiaceae) dikoleksi pada Juli 2022 dari Tabalong, Kalimantan Selatan. Tumbuhan tersebut diidentifikasi oleh Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat. Kayu dibersihkan dan dikeringkan pada suhu 16°C dan digiling menjadi halus (Gambar 1).



Gambar 1. Kayu bangkal (*Nauclea subdita*) (Korth.) Steud. (Sumber Pribadi)

### Bahan Dan Reagen Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini antara lain Trizma Base (Sigma Aldrich No.T1503), Porcine pankreas elastase (Sigma Aldrich SLBV 9311), N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide / SANA (Sigma Aldrich SLBR 7591V), asam galat, quercetin (Sigma Aldrich, India), asam askorbat, HCl, aqua demineralisata (Brataco Chemika, Indonesia), natrium asetat (Merck, Jerman), 2,4,6- Tris(2-Pyridyl)-S-Triazine (TPTZ) (Sigma Aldrich, USA) , besi(III) klorida heksahidrat (Merck, Jerman), besi(II) sulfat heptahidrat (Merck, Jerman), DMSO (Merck, Jerman), DPPH (Sigma Aldrich, Jerman), ABTS (Sigma Aldrich, India), kalium persulfat , Trolox, pelarut pro-analitik (etanol

p.a, metanol p.a), etanol 96%, folin ciocalteau (F9252/F47641), natrium karbonat, aluminium klorida, dan air suling (Brataco Chemika, Indonesia) sebagai pengencer.

### Proses Ekstraksi

Ekstrak kayu bangkal dilakukan dengan sedikit memodifikasi ekstraksi metode Soxhlet, *Microwave-Assisted Extraction* (MAE) dan *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE). Sebanyak 100 gram sampel digunakan, dan etanol 96% digunakan sebagai pelarut, dengan rasio sampel terhadap pelarut 1:10 (Abbas et al., 2021) (Indonesia, 2017). Rumus tersebut digunakan untuk menentukan persentase rendemen ekstrak dari berat kering ekstrak (a) dan berat serbuk simplisia yang ekstraksi (b)

(Sembiring et al., 2018). Hasil ekstraksi dihitung untuk setiap ekstrak dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Rendemen (\%)} = a/b \times 100\%$$

### Skrining fitokimia

Skrining fitokimia secara khusus dilakukan untuk semua ekstrak sesuai dengan metode standar dengan sedikit modifikasi. Skrining fitokimia kualitatif bertujuan untuk mendeteksi senyawa kimia (fenol, flavonoid, tanin, terpenoid, steroid, alkaloid, dan saponin). Pereaksi yang digunakan adalah pereaksi besi (III) klorida, pereaksi Mayer, Dragendorff, dan Bouchardat (uji alkaloid), pereaksi Shinoda (uji flavonoid), gelatin, uji garam-gelatin (tanin), uji buih (uji saponin), dan uji Liebermann- Pereaksi Burchard (uji terpenoid/steroid) (Jamaluddin et al., 2012) (Sembiring et al., 2018).

### Penentuan kadar polifenol total

Metode Folin-Ciocalteu digunakan untuk penentuan fenolik total, dengan asam galat digunakan sebagai standar, dengan sedikit modifikasi (Nur et al., 2021). Pada pengujian sampel, dan standar dilakukan pemipetan sebanyak 200  $\mu$ L larutan uji yang sesuai dan masing-masing seri larutan standar ke dalam wadah yang sesuai. Tambahkan 500  $\mu$ L enceran Folin- Ciocalteu LP (7,5% dalam air). Diamkan selama 8 menit, ditambahkan 1 mL  $\text{NaCO}_3$ , ditambahkan hingga 5 mL  $\text{H}_2\text{O}$  inkubasi selama  $\pm$  1 jam dalam vial coklat pada suhu ruang. Ukur serapan masing-masing larutan pada panjang gelombang serapan maksimum asam galat 671 nm. Lakukan pengukuran blanko dengan cara yang sama, tanpa penambahan larutan uji. Buat kurva kalibrasi dan hitung kadar larutan uji (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017; Wiliantari et al., 2022).

### Penentuan kadar flavonoid total

Metode kolorimetri  $\text{AlCl}_3$  yang digunakan dalam penentuan flavonoid total menggunakan quercetin digunakan sebagai standar dengan sedikit modifikasi

(Anggraini et al., 2020) (Chang Chia-Chi et al., 2002). Pada pengujian sampel dan standar, dilakukan pemipetan 1 mL larutan uji dan masing-masing seri larutan standar ke dalam wadah yang sesuai. Tambahkan pada masing-masing, 0,1 mL aluminium klorida P 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M dan ditambahkan methanol hingga 5 mL. Kocok dan diamkan selama  $\pm$  30 menit pada suhu ruang. Ukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum kuersetin 441 nm. Buat kurva kalibrasi dan hitung kadar larutan uji.

### Uji anti-elastase

Uji anti-elastase menggunakan porcine pancreatic elastase (PPE) dan substrat N-Succ-(Ala)-3-p-nitroanilide (SANA) (Ambarwati et al., 2019). Pembuatan buffer Triz HCl 0,1 M pH 8, pembuatan substrat SANA 1,3 mM, 0,88 U/mL (PPE). Dalam pengujian blanko, 155  $\mu$ L buffer dimasukkan dalam *microplate* 96 *well*, 15  $\mu$ L enzim ditambahkan, dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 25°C sebelum ditambahkan 30  $\mu$ L substrat dan diinkubasi selama 50 menit. Dalam uji kontrol blanko, 170  $\mu$ L buffer ditambahkan ke sumuran *microplate* 96 *well* dan diinkubasi selama 20 menit; kemudian ditambahkan 30  $\mu$ L substrat dan diinkubasi selama 50 menit. Pengujian ekstrak dan quercetin sebagai kontrol positif, 125  $\mu$ L buffer dimasukkan ke dalam *microplate* 96 *well*, ditambahkan 15  $\mu$ L enzim, ditambahkan 30  $\mu$ L ekstrak atau kuersetin, dan campuran diinkubasi selama 20 menit. Kemudian 30  $\mu$ L substrat ditambahkan, dan campuran diinkubasi selama 20 menit. Kemudian, dengan menggunakan *microplate* reader, pada panjang gelombang 405 nm digunakan untuk menghitung absorbansi (Glomax). Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Persentase penghambatan dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Penghambatan (\%)} = ((1 - B)/((A)) \times 100\%$$



di mana A mewakili aktivitas enzim tanpa adanya inhibitor dan B mewakili aktivitas ketika ada inhibitor.

### Evaluasi proliferasi sel normal

Proliferasi sel normal dievaluasi dengan metode MTT (González-Centeno et al., 2014). MTT merupakan metode yang dapat digunakan untuk mengukur persentase viabilitas sel berdasarkan aktivitas mitokondria sel fibroblas (Bernas & Dobrucki, 2002). Dalam penelitian ini, sampel yang digunakan adalah sampel teraktif yaitu sampel dari metode ekstraksi UAE, fibroblas dermal manusia dewasa (HDFa), yang berasal dari sel kulit dewasa normal yang memiliki respons seluler terhadap penuaan pada kulit, digunakan. Sel HDFa diperoleh dari Life Technologies Corporation (GIBCO, California, USA) dikultur pada media DMEM lengkap. Sel yang konfluen sekitar >80% dianggap sebagai sel yang dipanen. Untuk uji proliferasi dengan MTT assay digunakan dengan konsentrasi  $2 \times 10^4$  sel/sumur. Suspensi sel sebanyak 100  $\mu$ L ( $2 \times 10^4$  sel/well), didistribusikan ke dalam 96-well plate, kemudian diinkubasi selama 24 jam agar sel menempel pada well, dan dibuat berbagai seri konsentrasi (31,25–1000  $\mu$ g/mL) pada sampel UAE. Semua sampel yang diuji dilarutkan secara individual dalam DMSO sebelum ditambahkan ke dalam media kultur. Sumur diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% (Thermoscience 8000Dh series, Waltham, Massachusetts, USA) pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi, media dibuang, dan sel dicuci dengan 100  $\mu$ L PBS. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk garam formazan berwarna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan reagen stopper (SDS 10% dalam HCl 0,01 N), kemudian diinkubasi semalaman pada suhu kamar dan di tempat gelap. Keesokan harinya, serapan dibaca dengan microplate reader pada 595 nm (Nur et al., 2021).

### Aktivitas Antioksidan

#### 1. Aktivitas Antioksidan DPPH

Metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) untuk pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan asam askorbat sebagai kontrol positif yang mengacu pada penelitian Nur & Wiliantari dengan sedikit modifikasi (Nur et al., 2021) (Wiliantari et al., 2022). Persentase perubahan warna larutan DPPH dari biru menjadi kuning yang disebabkan oleh kontrol digunakan untuk menghitung efek penghambatan (larutan DPPH saja). Rumus perhitungan nilai IC<sub>50</sub> menggunakan persentase penghambatan radikal DPPH pada setiap seri konsentrasi larutan sampel:

$$\text{Persen penghambatan(\%)} = ((\text{Abs.blanko} - \text{Abs.sample})) / ((\text{Abs.blanko})) \times 100\%$$

dimana Abs. blanko adalah absorbansi larutan yang hanya mengandung larutan radikal DPPH•, dan Abs.Sampel adalah absorbansi larutan sampel yang akan diuji dengan adanya DPPH•. Kemudian dihitung persentase penghambatan dengan menggunakan persamaan regresi linier. Konsentrasi sampel yang dapat menekan radikal DPPH sebesar 50% digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan.

#### 2. Aktivitas Antioksidan ABTS

Metode pengujian kapasitas antioksidan ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-VIS dengan standar asam askorbat dengan sedikit modifikasi (Nur et al., 2021) (Apak et al., 2010). Larutan ABTS (7,0 mM) dan 2,73 mM kalium persulfat (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) dalam 25 mL air suling digunakan untuk membuat radikal ABTS•+. Campuran larutan kation radikal ABTS diinkubasi selama 12 sampai 16 jam pada suhu ruang dan disimpan di tempat gelap. Setelah masa inkubasi, ditambahkan etanol proanalisis ke dalam campuran dengan perbandingan 1:15 (ABTS: etanol proanalisis) untuk mengencerkannya. Pada penyiapan blanko atau kontrol negatif, 1 mL larutan ABTS•+ dipipet ke dalam botol vial, kemudian

diencerkan menjadi 5 mL dengan etanol pro analisis, dan absorbansi dihitung pada panjang gelombang 752 nm dengan Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1900, Perusahaan Shimadzu, Kyoto, Jepang). Seri konsentrasi ekstrak etanol metode UAE dan MAE mulai dari 3–18 µg/mL, ekstrak etanol metode Soxhlet (4–24 µg/mL), dan asam askorbat (0,5–3 µg/mL) sebagai kontrol positif digunakan dalam uji sampel. Campuran diencerkan hingga 5 mL dengan etanol pro analisis, dan didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit dalam ruang gelap. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali.

Persentase warna larutan blanko (larutan ABTS+ saja) yang memudar digunakan untuk menghitung persen penghambatan dengan persamaan berikut:

$$\text{Persen penghambatan (\%)} = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100\%$$

di mana A1 adalah absorbansi sampel, dan A0 adalah absorbansi blanko (hanya larutan ABTS+). Nilai IC<sub>50</sub> suatu aktivitas antioksidan dihitung dengan menggunakan konsentrasi sampel yang dapat mereduksi radikal ABTS sebesar 50% dengan menggunakan grafik regresi linier.

### 3. Aktivitas Antioksidan *Ferric Reduced Antioxidant Power* (FRAP)

Metode *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) untuk pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan asam askorbat sebagai kontrol positif yang mengacu pada penelitian Nur; Wiliantari dengan sedikit modifikasi (Nur et al., 2019)(Wiliantari et al., 2022). Pertama-tama, disiapkan reagen yang terdiri dari larutan besi klorida atau FeCl<sub>3</sub> (20 mM) dalam air suling, larutan standar besi (II) sulfat heptahidrat (1 mM), larutan TPTZ 10 mM dalam 40 mM asam klorida, dan 300 mM larutan buffer asetat pH 3,6. Pada pembuatan kurva kalibrasi, larutan kerja FRAP I dengan komposisi buffer asetat: TPTZ: aquabides (dengan perbandingan

10:1:1) dipipet ke dalam 50 µL larutan standar besi(II) sulfat heptahidrat. Larutan sampel dipipet sebanyak 50 µL, asam askorbat dipipet sebanyak 5 µL sebagai kontrol positif, dan reagen FRAP II dengan komposisi bufer asetat:TPTZ:FeCl<sub>3</sub> (dengan perbandingan 10:1:1) ditambahkan. Selanjutnya, volume campuran sampel, asam askorbat dicukupkan ke dalam 5 mL akuades dan diinkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit pada suhu ruang. Pengujian dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Setelah masa inkubasi, absorbansi dihitung pada panjang gelombang 596 nm dengan Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1900, Perusahaan Shimadzu, Kyoto, Jepang). Kurva kalibrasi dibuat dari plot konsentrasi (x) dalam mM vs. serapan bersih (y) larutan seri standar besi(II) sulfat heptahidrat untuk memperoleh persamaan regresi linier  $y = bx + a$ . Penentuan nilai FRAP dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Nilai FRAP } (\mu\text{mol/g sampel}) = (C \times V \times F_p) / m$$

di mana C adalah konsentrasi larutan baku FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O yang setara dengan sampel (µmol/mL), V adalah volume sampel (mL), F<sub>p</sub> adalah faktor pengenceran, m adalah berat sampel (g). Menurut persamaan berikut, aktivitas antioksidan sampel dihitung dalam gram setara FeSO<sub>4</sub> per 100 gram ekstrak:

$$\text{Aktivitas antioksidan} = \text{nilai FRAP} \times 10^{-6} \times \text{Mr FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \times 100$$

di mana aktivitas antioksidan sampel direpresentasikan sebagai g FeSO<sub>4</sub> ekuivalen per 100 g ekstrak, Mr adalah berat molekul FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (g/mol).

### Analisis statistik

Pengujian bioaktivitas pada setiap sampel dianalisis menggunakan Microsoft Excel 2019 yang dihasilkan dalam bentuk rata-rata ± standar deviasi (SD). Nilai signifikansi pada masing-masing sampel dianalisis melalui uji T independen dan *one*

way ANOVA yang diikuti dengan *Tukey test* menggunakan SPSS Versi 23 dengan perbedaan signifikan  $p < 0,05$ .

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi

Berdasarkan hasil penelitian, metode ekstraksi UAE dari *N. subdita* menghasilkan rendemen tertinggi, dengan nilai 7,12%, seperti ditunjukkan pada Tabel 1. UAE merupakan metode ekstraksi yang efisien dan mudah dilakukan. Jika dibandingkan, dengan metode konvensional seperti Soxhlet, yang memerlukan periode ekstraksi selama 1-2 jam, UAE secara substansial dapat mengurangi waktu ekstraksi. Hal ini pernah dilaporkan pada famili Rubiaceae, dengan metode ekstraksi UAE dapat meningkatkan hasil ekstraksi pada batang dan daun, sekaligus mengurangi durasi dan jumlah pelarut yang digunakan, UAE sangat sesuai untuk ekstraksi senyawa alami bioaktif yang peka terhadap bahan kimia, seperti polifenol (Barrera Vázquez et al., 2014); (Marijan et al., 2023). Dalam hal mengekstraksi bahan kimia

bioaktif, UAE secara signifikan lebih efisien daripada dua metode lainnya (Soxhlet dan MAE). Hal ini dapat dijelaskan karena gelombang ultrasonik berinteraksi dengan dinding dan membran sel untuk memfasilitasi pelepasan kandungan senyawa kimia (Abbas et al., 2021). Selain itu, reproduktifitas yang tinggi, konsumsi pelarut yang rendah, serta tingkat ekstraksi yang cepat.

### Skrining fitokimia

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa kimia yang terdapat pada sampel uji. Berdasarkan Tabel 2, hasil uji penapisan fitokimia dari ketiga metode ekstraksi kayu bangkal (Soxhlet, UAE, dan MAE) mengandung senyawa fenolik, flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya, yang menjelaskan bahwa senyawa fenolik, flavonoid, terpenoid, alkaloid, pitosterol, dan saponin terdapat pada ekstrak metanol *N. subdita* (Jamaluddin et al., 2012). Selain itu, kayu bangkal mengandung tanin yang dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Rahmi et al., 2021).

Tabel 1: Rendemen ekstrak *N. subdita*

No.	Metode Ekstraksi	Rendemen (%)
1	UAE	7.12
2	MAE	4.81
3	Soxhlet	6.87

Tabel 2: Skrining fitokimia ekstrak *N. subdita*

No.	Uji	Reagen	Soxhlet	UAE	MAE
1	Fenol	FeCl <sub>3</sub>	(+)	(+)	(+)
2	Flavonoid	Uji Shinoda	(+)	(+)	(+)
3	Tanin	Uji Gelatin-Garam	(+)	(+)	(+)
		FeCl <sub>3</sub>	(+)	(+)	(+)
4	Terpenoid	Liebermann-Burchard	(-)	(-)	(-)
5	Saponin	Uji Buih	(+)	(+)	(+)
6	Alkaloid	Dragendorff's	(+)	(+)	(+)
		Mayer's	(+)	(+)	(+)

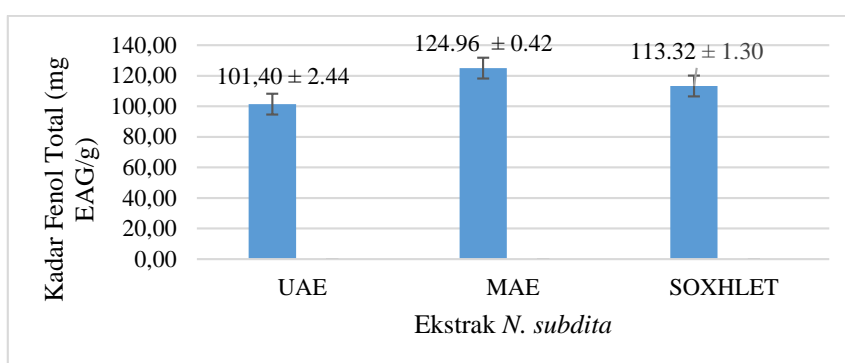
### Kadar Polifenol dan Flavonoid Total

Pengujian kadar polifenol dan flavonoid pada kayu bangkal dilakukan

untuk mengukur kadar polifenol dan flavonoid yang terdapat pada kayu bangkal. Hal didukung dengan penelitian Avanti et al.,

(2021) ekstrak kasar metanol kayu bangkal mengandung senyawa fenolik, dan flavonoid. Pengujian kadar polifenol didasarkan pada reaksi oksidasi-reduksi menggunakan reagen Folin-Ciocalteu. Berdasarkan Gambar 2 menunjukkan bahwa metode ekstraksi MAE memiliki kadar polifenol tertinggi jika dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya, pada konsentrasi sampel 40 µg/mL memiliki kadar polifenol sebesar  $124,96 \pm 0,42$  mg EAG/g ekstrak. Selain itu, hasil kadar total polifenol metode sokletasi adalah  $113,32 \pm 1,30$  mg EAG/g ekstrak, dan metode UAE memiliki

kadar polifenol terendah sebesar  $101,40 \pm 2,44$  mg EAG/g ekstrak. Proses MAE yang efisien meningkatkan total hasil fenol. Selain itu, MAE membutuhkan lebih sedikit pelarut dan membutuhkan suhu yang lebih rendah daripada yang dibutuhkan dalam ekstraksi Soxhlet. Hasil serupa juga dilaporkan dalam membandingkan MAE dengan teknik ekstraksi konvensional dalam mengekstraksi polifenol dari buah *Gordonia axillaris*, *Anoectochilus roxburghii*, dan daun *Pistacia lentiscus* (Zhao et al., 2018).



Gambar 2. Kadar Fenol Total Ekstrak *N. subdita*

Berdasarkan Gambar 3, metode ekstraksi MAE memiliki kadar flavonoid tertinggi jika dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya, pada konsentrasi sampel 200 µg/mL memiliki kadar flavonoid sebesar  $16,62 \pm 0,23$  mg EK/g ekstrak. Selain itu, metode sokletasi menghasilkan kadar flavonoid total  $13,41 \pm 0,21$  mg EK/g ekstrak, dan metode UAE memiliki kadar flavonoid terendah sebesar  $12,86 \pm 0,08$  mg EK/g ekstrak.

Hasil ini serupa dengan beberapa penelitian sebelumnya, ekstrak etanol dengan MAE ( $81,7181 \pm 1,0404$  mg EK/g) memiliki konsentrasi flavonoid total (TFC) yang lebih tinggi daripada ekstrak etanol oleh UAE ( $56,2038 \pm 0,1058$  mg EK/g) (Anuar et al., 2021). Di sisi lain, pengamatan yang sama dilakukan untuk kandungan flavonoid total dari ekstrak carob yang terungkap sangat dipengaruhi oleh proses ekstraksi. MAE ternyata menjadi metode ekstraksi yang paling tepat untuk pemulihan carob flavonoid, menghasilkan nilai tertinggi ( $10,53$  mg EK/g DM) (Mansouri et al., 2022). Di sisi lain, pengamatan yang

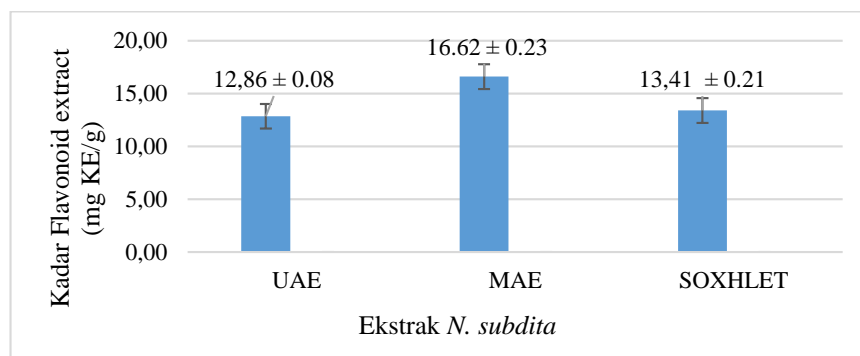
sama dilakukan untuk kandungan flavonoid total dari ekstrak biji carob (*Ceratonia siliqua* L.) dari keluarga Fabaceae (kacang-kacangan), yang terungkap sangat dipengaruhi oleh proses ekstraksi. MAE ternyata menjadi metode ekstraksi yang paling tepat untuk pengukuran kadar flavonoid, menghasilkan nilai tertinggi ( $10,53$  mg EK/g DM) (Mansouri et al., 2022).

Berdasarkan hasil ekstrak pada pengujian total fenol dan total flavonoid, dapat dikaitkan dengan aktivitas antioksidan. Senyawa fenolik berupa flavonoid yaitu flavonol dan flavon memiliki peran sebagai antioksidan. Keterkaitan antara aktivitas flavonoid terhadap jumlah dan lokasi gugus –OH dimana dalam hal ini berperan dalam menetralkan radikal bebas. Flavonoid mampu menekan radikal bebas, berkaitan juga dengan kemampuannya mendonorkan elektron. Hal inilah yang menyebabkan hubungan antara kandungan total fenol dengan aktivitas antioksidan. Semakin tinggi



nilai total fenol dan flavonoid maka semakin tinggi kemampuan antioksidan dalam mendonorkan elektronnya dalam hal menekan perkembangan radikal bebas (Nur

et al., 2019). Jumlah senyawa fenolik dan flavonoid dalam ekstrak *N. subdita* terkait dengan seberapa kuat antioksidannya (Nur et al., 2021).



Gambar 3. Kadar Flavonoid Total Ekstrak *N. subdita*

### Aktivitas anti-elastase

Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 3, dimana hasil IC<sub>50</sub> dari ketiga metode ekstraksi menunjukkan bahwa nilai IC<sub>50</sub> ekstrak metode UAE paling rendah diantara ekstrak MAE dan Soxhlet dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 361,22 µg/mL. Metode ekstraksi UAE menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan metode MAE dan Soxhlet. Jika dibandingkan dengan nilai IC<sub>50</sub> kuersetin, sebagai kontrol positif yaitu 6,18 µg/mL, nilai IC<sub>50</sub> kuersetin lebih kuat dari sampel uji. Kuersetin dipilih dalam penelitian ini sebagai standar. Kuersetin adalah senyawa tunggal yang secara kimiawi diklasifikasikan sebagai flavonoid dari jenis flavonol yang biasa digunakan sebagai standar untuk mengukur penghambatan antioksidan dan elastase (Ambarwati et al., 2019). Aktivitas penghambatan enzim elastase lebih tinggi pada metode UAE, hal ini karena kandungan polifenol (flavonoid) yang berhasil diekstrak semakin meningkat akibat getaran/gelombang ultrasonik pada dinding sel tanaman (Sulistiyowati et al., 2023).

*N. subdita* belum pernah terbukti memiliki aktivitas penghambatan elastase. Meskipun demikian, aktivitas anti-elastase

spesies tanaman dari famili yang sama dengan tanaman yang diperiksa telah ditemukan. Ekstrak etil asetat daun *P. capensis* (Eckl.) Vatke (Rubiaceae) menghambat elastase sebesar 80% (92,84 ± 1,13%), sedangkan ixorapeptide II (70) dari *I. coccinea* L. (Rubiaceae) menghambat pelepasan elastase dengan IC<sub>50</sub> nilai 5,6 µM (Ndlovu et al., 2013 dan Ahmad et al., 2020).

Selain itu, aktivitas penghambatan elastase, juga terkait dengan kandungan total flavonoid pada ekstrak *N. subdita* yang lebih rendah dari kandungan total polifenol sehingga aktivitas penghambatan elastase pada ekstrak memungkinkan hasil yang lemah. Semakin tinggi kandungan flavonoid total, semakin tinggi aktivitas anti-elastase. Menurut Pientaweeratch et al., (2016), fenol dan flavonoid seperti kuersetin secara signifikan dapat mempengaruhi aktivitas enzim elastase. Penelitian sebelumnya menemukan bahwa kandungan flavonoid *N. subdita* secara keseluruhan sebesar 1,83%, yang cukup untuk menjaga kekenyalan kulit atau digunakan sebagai agen anti-penuaan. Sayangnya, kurang ideal bila digunakan untuk menghilangkan kerutan (Charissa et al., 2016).

Tabel 3. Aktivitas anti-elastase ekstrak *N. subdita*

No.	Ekstrak	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )					IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
		93.75	187.5	375	750	1500	
1	UAE	13.52 $\pm$ 1.63	32.12 $\pm$ 2.39	52.81 $\pm$ 1.63	69.32 $\pm$ 1.81	87.22 $\pm$ 1.36	361.22*
2	MAE	5.35 $\pm$ 0.90	18.84 $\pm$ 1.13	34.20 $\pm$ 0.73	45.52 $\pm$ 1.20	65.67 $\pm$ 1.19	820.16
3	SOXHLET	2.16 $\pm$ 1.38	10.37 $\pm$ 1.83	29.90 $\pm$ 0.81	52.51 $\pm$ 3.36	70.77 $\pm$ 1.79	738.39
4	Kontrol positif (kuersetin)	IC <sub>50</sub> = 6.18 ( $\mu\text{g/mL}$ )*					

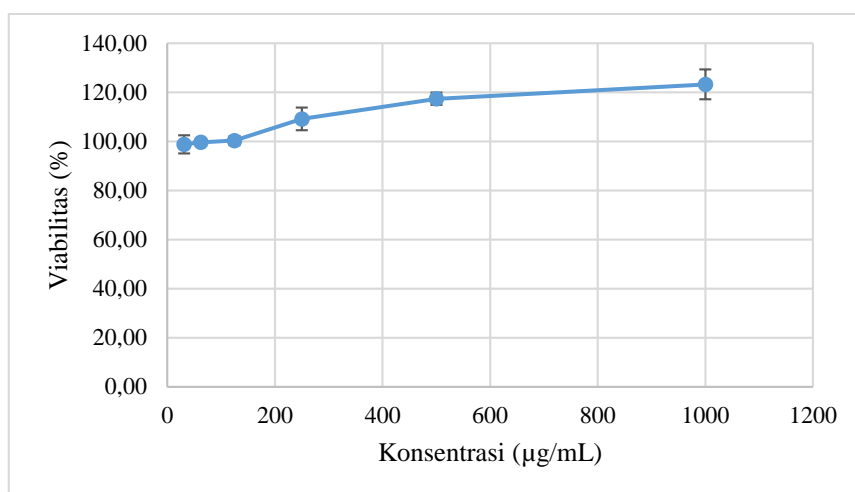
Keterangan: Data dinyatakan sebagai rata-rata  $\pm$  SD dengan rangkap tiga (n = 3);

\*Hasil berbeda nyata pada  $p \leq 0,05$

### Evaluasi proliferasi sel normal

Proliferasi sel normal dievaluasi dengan metode MTT (González et al., 2017). MTT merupakan metode yang dapat digunakan untuk mengukur persentase usia viabilitas sel berdasarkan aktivitas mitokondria sel fibroblas (Bernas & Dobrucki, 2002). Dalam penelitian ini, digunakan HDFa yang berasal dari sel kulit

dewasa normal yang memiliki respons seluler terhadap penuaan pada kulit. Berdasarkan Gambar 4 menunjukkan bahwa, semakin meningkatnya konsentrasi sampel UAE, semakin meningkat pula persentase viabilitas sel hidup, yang dapat menyebabkan banyaknya sel yang hidup (Nur et al., 2021). Hal ini menjelaskan bahwa ekstrak UAE memiliki efek proliferasi terhadap sel kulit.

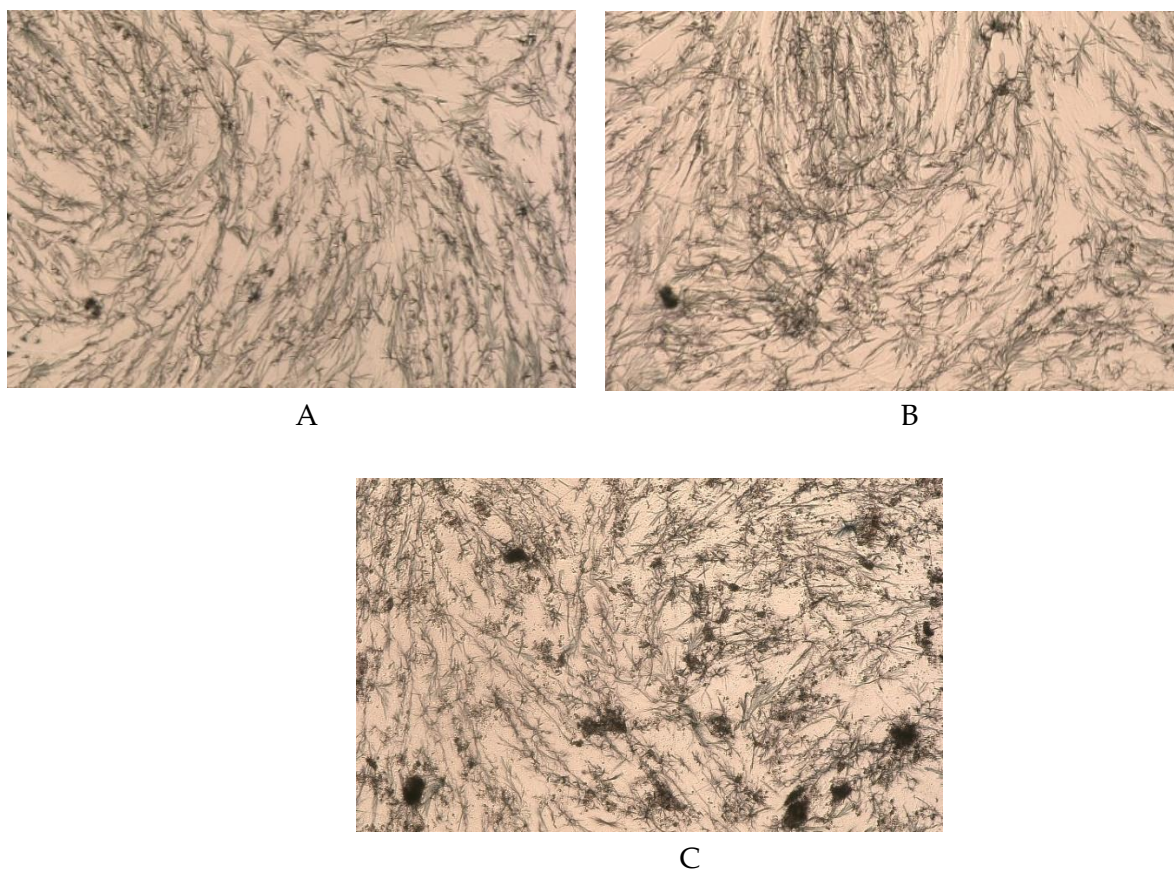


Gambar 4. Persentase viabilitas dan konsentrasi pada ekstrak *N. subdita*

Perubahan morfologi sel merupakan tanda aktivitas viabilitas dan atau sitotoksik yang dihasilkan dari suatu senyawa setelah perlakuan terhadap sel dibandingkan dengan sel kontrol. Hasil pengamatan sel HDFa menunjukkan perbedaan morfologi sel sebelum dan sesudah reagen MTT (Aisyah et al., 2022). Pada Gambar 5C kristal formazan yang terbentuk lebih banyak, sedangkan pada Gambar 4B kristal formazan yang terbentuk

sangat sedikit. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi tingkat konsentrasi sampel uji, semakin banyak kristal formazan yang terbentuk, yang berarti semakin banyak sel yang hidup. Sel hidup memiliki enzim reduktase mitokondria, yang dapat bereaksi dengan reagen MTT untuk menunjukkan pembentukan garam formazan berwarna biru

keunguan (Aisyah et al., 2022).



Gambar 5. Morfologi sel setelah perlakuan dengan reagen MTT (A) Sel Kontrol, (B) Sel setelah perlakuan sampel (konsentrasi rendah 31,25 µg/mL) (C) Sel setelah perlakuan sampel (konsentrasi tinggi 1000 µg/mL). (Nur et al., 2021)

## Aktivitas Antioksidan

### 1. DPPH

Pengujian radikal DPPH didasarkan pada perubahan warna molekul radikal DPPH ungu tua akan menjadi kuning akibat transfer atom hidrogen oleh senyawa pereduksi antioksidan sehingga radikal DPPH menjadi stabil (Nur et al., 2021). Berdasarkan, Tabel 5, aktivitas antioksidan teknik DPPH yang memiliki aktivitas antioksidan sangat poten, yaitu pada metode MAE yang memiliki IC<sub>50</sub> sebesar 14,15±0,04 µg/mL, UAE yang memiliki 19,75±0,06 µg/mL, dan Soxhlet, yang memiliki 36,26 ± 0,10 µg/mL. Perbedaan metode ekstraksi menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan mempunyai nilai yang berbeda nyata antara

UAE, MAE, dan Soxhlet. Metode MAE memiliki nilai IC<sub>50</sub> tertinggi, karena pengaruh energi gelombang mikro ditransfer secara efektif pada bahan tanaman melalui interaksi molekuler dengan adanya medan elektromagnetik dan memungkinkan transfer massa yang cepat terhadap pelarut ekstraksi dan bahan tanaman sehingga memungkinkan komponen senyawa-senyawa polar dapat meredam radikal DPPH (Mansouri et al., 2022). Hal ini berkorelasi dengan semakin tinggi kandungan total polifenol, maka semakin tinggi pula aktivitas antioksidan metode DPPH untuk metode ekstraksi MAE.

Nilai IC<sub>50</sub> dibagi menjadi empat kategori: aktivitas sangat kuat (IC<sub>50</sub> < 50µg/mL), aktivitas kuat (IC<sub>50</sub> 50 -

100µg/mL), aktivitas sedang (IC<sub>50</sub> 101 - 150µg/mL), dan aktivitas lemah (IC<sub>50</sub> > 150µg/mL) (Wijaya et al., 2020). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak *N. subdita* pada metode ekstraksi MAE, UAE, dan soxhlet memiliki peluang tinggi untuk menjadi

antioksidan yang sangat kuat. Namun jika dibandingkan dengan kontrol positif, asam askorbat yang memiliki aktivitas antioksidan IC<sub>50</sub> yang sangat tinggi yaitu 2,66±0,00 µg/mL daripada ketiga metode ekstraksi.

Tabel 5: Aktivitas Antioksidan Metode DPPH Ekstrak *N. subdita*

No.	Uji	IC <sub>50</sub> DPPH (µg/mL)
1	UAE	19.75 ± 0.06*
2	MAE	14.15± 0.04*
3	Soxhlet	36.26± 0.10*
4	Asam askorbat	2.66 ± 0.00*

Keterangan: Data dinyatakan sebagai rata-rata ± SD dengan rangkap tiga (n = 3).

\*Hasil berbeda nyata pada  $p \leq 0,05$ .

## 2. ABTS

Prinsip dasar metode spektrofotometri yang telah digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan ABTS dari larutan sampel yaitu pembentukan kation radikal ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] (Amalia et al., 2023). Aktivitas antioksidan pada metode ABTS, tergolong sangat kuat pada metode soxhlet dengan nilai IC<sub>50</sub> 13,84±0,55 µg/mL, metode UAE dengan nilai IC<sub>50</sub> 15,14±0,03 µg/mL, dan MAE dengan nilai IC<sub>50</sub> 15,95±0,04 µg/mL (Tabel 6). Perbedaan metode ekstraksi menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan mempunyai nilai yang berbeda nyata antara UAE, MAE, dan Soxhlet. Perbedaan aktivitas antioksidan pada ekstrak disebabkan oleh

perbedaan kandungan senyawa seperti polifenol pada masing-masing metode ekstraksi (Nur et al., 2021). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak *N. subdita* melalui metode Soxhlet, UAE, MAE memiliki peluang tinggi untuk menjadi antioksidan yang sangat kuat. Penelitian ini memiliki nilai IC<sub>50</sub> yang lebih kuat dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, percobaan ABTS mengungkapkan bahwa ekstrak kulit batang *N. subdita* menunjukkan aktivitas antioksidan dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 1183,13 µg/mL (Avanti et al., 2021). Asam askorbat yang memiliki aktivitas antioksidan IC<sub>50</sub> yang sangat kuat yaitu 1,92 µg/mL jika dibandingkan dengan ketiga metode ekstraksi.

Tabel 6. Aktivitas Antioksidan Metode ABTS ekstrak *N. subdita*

No.	Uji	IC <sub>50</sub> ABTS (µg/mL)
1.	UAE	15.14 ± 0.03*
2.	MAE	15.95 ± 0.04*
3.	Soxhlet	13.84 ± 0.02*
4.	Asam askorbat	1.92 ± 0.00*

Keterangan: Data dinyatakan sebagai rata-rata ± SD dengan rangkap tiga (n = 3).

\*Hasil berbeda nyata pada  $p \leq 0,05$ .



### 3. FRAP

Berdasarkan Tabel 7, hasil pengujian aktivitas antioksidan dengan metode FRAP menunjukkan bahwa ekstrak MAE memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya, dengan aktivitas antioksidan sebesar  $53,57 \pm 0,63$  g setara  $\text{FeSO}_4/100$  g ekstrak, seperti terlihat pada Tabel 7 dengan konsentrasi sampel  $10 \mu\text{g/mL}$ . Metode ekstraksi UAE menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan metode MAE dan Soxhlet. Aktivitas antioksidan asam askorbat sebagai kontrol positif, pada konsentrasi  $1 \mu\text{g/mL}$  sebesar  $252,42 \pm 0,39$  g  $\text{FeSO}_4$  ekuivalen/100 g ekstrak, tergolong sangat tinggi daripada ketiga metode ekstraksi. Perbedaan aktivitas antioksidan pada ekstrak disebabkan oleh perbedaan kandungan senyawa seperti polifenol pada masing-masing metode ekstraksi. Kehadiran sejumlah besar senyawa polifenol dapat berpengaruh pada kapasitas antioksidan. Kandungan senyawa antioksidan yang besar seperti

polifenol yang berperan dalam mekanisme pengkkelat ion logam dalam ekstrak dan mengurangi kemungkinan terbentuknya radikal hidroksil yang berasal dari radikal anion superoksida sehingga menyebabkan tingginya aktivitas penangkapan radikal bebas (Nur et al., 2021).

Berdasarkan hasil tersebut dapat dilihat bahwa, semakin tinggi nilai FRAP sampel, semakin besar kapasitas antioksidan karena nilai FRAP yang didasarkan pada prinsip reduksi ion besi ( $\text{Fe}^{3+}$ ) menjadi ion besi ( $\text{Fe}^{2+}$ ), yang merupakan senyawa antioksidan sebagai agen pereduksi (Nur et al., 2021). Pada metode FRAP, suatu sampel dapat berpotensi sebagai antioksidan, jika sampel tersebut mampu mengirimkan elektron pada reagen FRAP. Aktivitas antioksidan dengan metode ini dapat dikonfirmasi dengan mengukur pembentukan warna biru pada panjang gelombang 596 nm. Peningkatan absorbansi pada 596 nm menunjukkan bahwa ekstrak uji memiliki daya reduksi yang lebih besar (Amalia et al., 2023).

Tabel 7. Aktivitas Antioksidan Metode FRAP Ekstrak *N. subdita*

No.	Uji	FRAP
		(g $\text{FeSO}_4$ equivalent/ 100 g extract) $\pm$ SD
1	UAE	$44.11 \pm 1.37^*$
2	MAE	$53.57 \pm 0.63$
3	Soxhlet	$53.33 \pm 0.34$
4	Asam askorbat	$252.42 \pm 0.39^*$

Keterangan: Data dinyatakan sebagai rata-rata  $\pm$  SD dengan rangkap tiga (n = 3).

\*Hasil berbeda nyata pada  $p \leq 0,05$

### KESIMPULAN

Metode ekstraksi UAE pada ekstrak *N. subdita* memiliki rendemen tertinggi dan aktivitas anti-elastase tertinggi yaitu 7,12% dan  $361,22 \mu\text{g/mL}$ . Metode ekstraksi MAE memiliki kadar total polifenol dan flavonoid tertinggi yaitu  $124,96 \pm 0,42$  mg EAG/g ekstrak dan  $16,62 \pm 0,23$  mg EK/g ekstrak. Metode

ekstraksi MAE memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  DPPH sebesar  $14,15 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$  dan FRAP  $53,57 \pm 0,63$  g setara dengan  $\text{FeSO}_4/100$  g ekstrak, serta ekstrak metode Soxhlet memperoleh nilai  $\text{IC}_{50}$  ABTS  $13.84 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ . Ekstrak teraktif metode UAE memiliki efek proliferasi terhadap sel HDFa dependent dose. Hasil

penelitian ini menunjukkan bahwa metode ekstraksi UAE dalam menarik senyawa aktif N. subdita berpotensi sebagai anti elastase, antiaging, dan antioksidan dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh yayasan Daewoong.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, M., Ahmed, D., Qamar, M. T., Ihsan, S., & Noor, Z. I. (2021). Optimization of ultrasound-assisted, microwave-assisted and Soxhlet extraction of bioactive compounds from *Lagenaria siceraria*: A comparative analysis. *Bioresource Technology Reports*, 15. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100746>
- Ahmad, S., Saleem, M., Riaz, N., Lee, Y. S., Diri, R., Noor, A., Almasri, D., Bagalagel, A., & Elsebai, M. F. (2020). The Natural Polypeptides as Significant Elastase Inhibitors. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00688>
- Aisyah, A. N., Lukitaningsih, E., Rumiati, Marwati, Sapra, A., Khairi, N., Fadri, A., & Nur, S. (2022). In vitro antioxidant and cytotoxic evaluation of ethyl acetate fraction of *angioteris ferox* copel tuber against htb lung cancer cell. *Egyptian Journal of Chemistry*, 65(11), 41–48. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2022.91843.4364>
- Amalia, A., Nugraha, M. F. I., Sukenda, S., & Elya, B. (2023). *Tropical Journal of Natural Product Research*. 7(May), 2911–2918.
- Ambarwati, N. S. S., Elya, B., & Desmiaty, Y. (2019). Anti-elastase activity of methanolic and ethyl acetate extract from *Garcinia latissima* Miq. *Journal of Physics: Conference Series*, 1402(5). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1402/5/055079>
- Anggraini, N. B., Elya, B., & Iskandarsyah. (2020). Anti-elastase, antioxidant, total phenolic and total flavonoid content of macassar kernels (*Rhus javanica* L) from pananjung pangandaran nature tourism park- Indonesia. *Journal of Natural Remedies*, 20(1), 61–67. <https://doi.org/10.18311/jnr/2020/24240>
- Anggraini, N. B., Elya, B., & Iskandarsyah, I. (2021). Antielastase Activity of Macassar Kernels (*Rhus javanica*) Stem Extract and Skin Elasticity Evaluation of Its Topical Gel Formulation. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6690029>
- Anuar, A., Awang, M. A., & Tan, H. F. (2021). Impact of solvent selection on the extraction of total phenolic content and total flavonoid content from kaffir lime leaves: Ultrasonic assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE). *AIP Conference Proceedings*, 2347. <https://doi.org/10.1063/5.0051934>
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Bektaşoğlu, B., & Bener, M. (2010). Cupric ion reducing antioxidant capacity assay for antioxidants in human serum and for hydroxyl radical scavengers. *Methods in Molecular Biology*, 594, 215–239. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_15)
- Avanti, C., Remanti, E., Yuniarta, T. A., Azminah, A., Yunita, O., & Setiawan, F. (2021). Antioxidant activity of different parts of nauclea subdita. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 5(8), 1365–1370. <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v5i8.7>
- Barrera Vázquez, M. F., Comini, L. R., Martini, R. E., Núñez Montoya, S. C., Bottini, S., & Cabrera, J. L. (2014). Comparisons between conventional, ultrasound-assisted and microwave-assisted methods for extraction of anthraquinones from *Heterophyllaea*

- pustulata Hook f. (Rubiaceae). *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(2), 478–484. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.08.023>
- Bernas, T., & Dobrucki, J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, 47(4), 236–242. <https://doi.org/10.1002/cyto.10080>
- Chang Chia-Chi, Yang Ming-Hua, Wen Hwei-Mei, & Chern Jiing-Chuang. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182.
- Charissa, M., Djajadisastra, J., & Elya, B. (2017). Uji Aktivitas Antioksidan dan Penghambatan Tirosinase serta Uji Manfaat Gel Ekstrak Kulit Batang Taya (Nauclea subdita) terhadap Kulit. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 6(2). <https://doi.org/10.22435/jki.v6i2.6224.98-107>
- Desmiaty, Y., Saputri, F. C., Hanafi, M., Prastiwi, R., & Elya, B. (2020). Anti-elastase, anti-tyrosinase, and anti-oxidant of Rubus fraxinifolius stem methanolic extract. *Pharmacognosy Journal*, 12(2), 271–275. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.42>
- González-Centeno, M. R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C., & Femenia, A. (2014). Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (Vitis vinifera L.) - A response surface approach. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2176–2184. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.01.021>
- Indonesia, K. K. R. (2017). *Farmakope Herbal Indonesia*. Kemenkes RI.
- Jamaluddin, F. R., Wahab, R., Daud, J. M., & Rahman, S. (2012). Total phenolic contents and free-radical scavenging activities from methanolic extracts of Nauclea subdita (Korth) Steud. heartwood. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 6(7), 1116–1124.
- Mansouri, F. El, Silva, J. C. G. E., Cacciola, F., Asraoui, F., Tayeq, H., Ben Amar, Y. M., Lovillo, M. P., Chouaibi, N., & Brigui, J. (2022). Evaluation of Different Extraction Methods on the Phenolic Profile and the Antioxidant Potential of Ceratonia siliqua L. Pods Extracts. *Molecules*, 27(19). <https://doi.org/10.3390/molecules27196163>
- Marijan, M., Tomić, D., Strawa, J. W., Jakupović, L., Inić, S., Jug, M., Tomczyk, M., & Zovko Končić, M. (2023). Optimization of Cyclodextrin-Assisted Extraction of Phenolics from Helichrysum italicum for Preparation of Extracts with Anti-Elastase and Anti-Collagenase Properties. *Metabolites*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/metabo13020257>
- Ndlovu, G., Fouche, G., Tselanyane, M., Cordier, W., & Steenkamp, V. (2013). In vitro determination of the anti-aging potential of four southern African medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-304>
- Nur, S., Angelina, A. A., Aswad, M., Yulianty, R., Burhan, A., & Nursamsiar. (2021). In vitro anti-aging activity of Muntingia calabura L. fruit extract and its fractions. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 9(4), 409–421. [https://doi.org/10.56499/jppres20.979\\_9.4.409](https://doi.org/10.56499/jppres20.979_9.4.409)
- Nur, S., Mubarak, F., Jannah, C., Winarni, D. A., Rahman, D. A., Hamdayani, L. A., & Sami, F. J. (2019). Total phenolic and flavonoid compounds, antioxidant and toxicity profile of extract and fractions of paku atai tuber (Angiopteris ferox Copel). *Food Research*, 3(6), 734–740.

- [https://doi.org/10.26656/fr.2017.3\(6\).135](https://doi.org/10.26656/fr.2017.3(6).135)
- Rahmi, N., Salim, R., Miyono, M., & Rizki, M. I. (2021). Pengaruh Jenis Pelarut Dan Metode Ekstraksi Terhadap Aktivitas Antibakteri Dan Penghambatan Radikal Bebas Ekstrak Kulit Kayu Bangkal (*Nauclea subdita*). *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, 39(1), 13–26. <https://doi.org/10.20886/jphh.2021.39.1.13-26>
- Sembiring, E. N., Elya, B., & Sauriasari, R. (2018). Phytochemical screening, total flavonoid and total phenolic content and antioxidant activity of different parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacognosy Journal*, 10(1), 123–127. <https://doi.org/10.5530/pj.2018.1.22>
- Wijaya, L., Ehrich, I. N., Fachrial, E., & Girsang, E. (2020). Scavenge ABTS and Inhibition of Elastase Enzyme Activity from Ethanol Extract of Pineapple (*Ananas cosmusus* (L.) Merr) Core. 106–113.
- Wiliantari, S., Iswandana, R., & Elya, B. (2022). Total Polyphenols, Total Flavonoids, Antioxidant Activity and Inhibition of Tyrosinase Enzymes from Extract and Fraction of *Passiflora ligularis* Juss. *Pharmacognosy Journal*, 14(3), 660–671. <https://doi.org/10.5530/pj.2022.14.86>
- Zhao, C. N., Zhang, J. J., Li, Y., Meng, X., & Li, H. Bin. (2018). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Melastoma sanguineum* fruit: Optimization and identification. *Molecules*, 23(10), 98. <https://doi.org/10.3390/molecules23102498>