

## BAB II

# ANALISIS FINGERPRINTING *Glochidion philippicum* MELALUI KOMBINASI SPEKTROSKOPI *FOURIER TRANSFORM INFRARED* (FTIR) DAN KEMOMETRIK SERTA POTENSINYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN SECARA IN VITRO

### Abstrak

*Glochidion philippicum* telah dilaporkan menunjukkan potensi farmakologis yang cukup besar secara empiris, namun komposisi kimia dan bioaktivitasnya masih belum dieksplorasi secara memadai. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menyelidiki *fingerprinting* ekstrak daun *G. philippicum* menggunakan kombinasi spektroskopi inframerah transformasi Fourier (FTIR) dengan analisis kemometri dan evaluasi in vitro sebagai antioksidan. Empat metode ekstraksi yaitu maserasi, refluks, *ultrasound-assisted extraction* (UAE) and *microwave-assisted extraction* (MAE) yang dioptimalkan menggunakan pelarut berupa air suling, etanol 70%, etil asetat, dan n-heksana. Profil FTIR dianalisis menggunakan analisis komponen utama atau *principal component analysis* (PCA), analisis kluster hierarkis, dan *orthogonal partial least squares discriminant analysis* (OPLS-DA), studi in vitro yang menilai kapasitas pembersihan radikal bebas dilakukan dengan menggunakan 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-asam sulfonat) (ABTS), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), dan *ferric-reducing antioxidant power* (FRAP). Profil FTIR mengidentifikasi gugus fungsi yang berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan. Pengujian in vitro menggunakan metode ABTS dan FRAP mengungkapkan bahwa ekstrak yang diperoleh dengan 70% etanol dan air menunjukkan aktivitas antioksidan tertinggi khususnya ekstrak MAEEO ( $IC_{50}$  38,95  $\mu$ g/ml dan 16,521  $\mu$ g/ml), yang dikaitkan dengan gugus fungsi utama seperti C=C (aromatik), O-H (asam), N=O (nitro), dan C-O (ester).

**Kata kunci :** *Glochidion philippicum*, analisis fingerprinting, antioksidan, FTIR

### 1.1 Pendahuluan

*Glochidion philippicum* (Cav.) C.B. Rob. atau yang secara lokal dengan nama sampare di Indonesia, adalah anggota keluarga *Malvaceae* yang tersebar luas di seluruh wilayah Asia Tenggara, k Indonesia (Sandhya *et al.*, 2010). Tanaman ini biasanya tumbuh



subur di sepanjang jalan berbatu, pinggiran hutan, dan tepi jalan pada ketinggian rendah hingga sedang (Yao *et al.*, 2020). Secara tradisional, *G. philippicum* telah digunakan sebagai etnomedisin untuk mengobati infeksi bakteri dan malaria (Cane *et al.*, 2023, Dinas Kesehatan, 2016). Investigasi fitokimia telah mengidentifikasi senyawa bioaktif seperti flavonoid, tanin, dan fenolik pada daunnya, yang dianggap berkontribusi terhadap sifat farmakologisnya (Linh *et al.*, 2024). Sebuah penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *G. philippicum* menunjukkan aktivitas antimalaria dengan menghambat *Plasmodium falciparum* (Khairuddin *et al.*, 2023). Meskipun mekanisme yang mendasari aktivitas ini dikaitkan dengan senyawa bioaktif tanaman, hal ini mungkin juga melibatkan kapasitas mereka untuk mengurangi spesies oksigen reaktif (ROS), yang memainkan peran penting dalam patogenesis malaria (Vasquez *et al.*, 2021). Namun, penelitian terbatas telah mengeksplorasi hubungan ini, menekankan perlunya penyelidikan lebih lanjut mengenai efek antioksidan *G. philippicum*.

Aktivitas farmakologis *G. philippicum*, termasuk potensi antioksidannya, terkait erat dengan kelarutan senyawa bioaktifnya, yang dipengaruhi oleh kondisi ekstraksi (Vuolo *et al.*, 2019). Variasi jenis pelarut, suhu, pH, dan durasi ekstraksi mempengaruhi efisiensi ekstraksi senyawa-senyawa ini, menyoroti pentingnya memilih dan mengoptimalkan

yang tepat untuk memaksimalkan aktivitas antioksidan (Ikhsan *et al.*, 2023). Setelah diekstraksi, senyawa bioaktif memainkan peran penting



dalam menentukan kemanjuran farmakologis tanaman. Profil mereka dapat secara langsung dikaitkan dengan komposisi kimia terukur mereka, yang dapat dianalisis menggunakan spektroskopi Fourier-transform inframerah (FTIR) (Segers *et al.*, 2019). Teknik seperti analisis kemometrik dan metabolomik sangat efektif dalam mengkarakterisasi profil senyawa-senyawa ini. Pendekatan-pendekatan ini memberikan wawasan yang terperinci dan menyeluruh tentang komposisi metabolit, yang memungkinkan para peneliti untuk mengidentifikasi gugus fungsi senyawa, bahkan yang ada dalam jumlah kecil (Segers *et al.*, 2019). Ketepatan seperti itu sangat penting untuk memahami hubungan antara senyawa yang diekstraksi dan gugus fungsi, termasuk potensi antioksidannya. Dengan mengintegrasikan alat analisis modern ini, para peneliti dapat mengevaluasi kualitas dan kemanjuran ekstrak *G. philippicum* dengan lebih baik, membuka jalan untuk aplikasi yang lebih konsisten dan dapat diandalkan dalam konteks farmakologis.

Untuk mengatasi kesenjangan ini, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan dari ekstrak *G. philippicum* dengan menggunakan pendekatan *in vitro* dan *in vivo*. Dengan mengintegrasikan pengujian *in vitro*, analisis kemometrik berbasis FTIR, dan studi *in vivo*, penelitian ini merupakan strategi yang komprehensif dan praktis untuk memajukan studi produk alami seperti *G. philippicum*.

tan ini juga membentuk kerangka kerja inovatif untuk memenuhi an bahan herbal berkualitas tinggi dalam aplikasi terapeutik.



## 1.2 Metode Penelitian

### 1.2.1 Desain dan Rancangan Penelitian

Aktivitas antioksidan dari ekstrak *G. philippicum* dinilai dengan menggunakan studi in vitro. Pengujian in vitro menilai kapasitas pembersihan radikal bebas dari ekstrak melalui metode 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH), dan ferric-reducing antioksidan power (FRAP). Selain itu, analisis kemometrik berbasis FTIR digunakan untuk membuat profil komposisi kimia ekstrak yang diperoleh dengan menggunakan berbagai metode ekstraksi dan pelarut. Analisis ini mengidentifikasi gugus fungsi yang terkait dengan aktivitas antioksidan dan membedakan ekstrak berdasarkan sifat kimia yang dimiliki.

### 1.2.2 Ekstraksi *Glochidion philippicum*

Daun *G. philippicum* dikoleksi dari Distrik Samofa, Kabupaten Biak Numfor, Provinsi Papua, Indonesia. Spesimen tanaman telah diautentikasi dan disimpan di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Indonesia, dengan nomor voucher spesimen B-705. Hanya daunnya saja yang digunakan dalam penelitian ini. Secara singkat, daun segar *G. philippicum* dikumpulkan, dibersihkan, dan dikeringkan dalam lemari pengering terkontrol pada suhu



Daun kering digiling menjadi bubuk halus dan disaring dengan no. 18. Serbuk daun yang telah dihaluskan kemudian diekstraksi

dengan empat teknik ekstraksi yang berbeda - maserasi, ekstraksi dengan bantuan ultrasonik (ultrasound-assisted extraction/UEA), refluks, dan ekstraksi dengan bantuan gelombang mikro (microwave-assisted extraction/MAE) - dengan menggunakan empat pelarut yaitu n-heksana, etil asetat, etanol 70%, dan air suling, sehingga diperoleh 16 ekstrak yang berbeda. Setiap ekstrak dibuat dengan menimbang 25 gram sampel dan diekstraksi menggunakan salah satu dari empat pelarut yang berbeda. Metode ekstraksi dilakukan dengan durasi dan kondisi tertentu yang disesuaikan dengan masing-masing teknik.

Untuk maserasi, proses berlangsung selama 24 jam, dengan 8 jam pertama melibatkan pengadukan terus menerus menggunakan pengaduk magnetik (Thermo Scientific, Waltham, USA), diikuti dengan 16 jam didiamkan tanpa agitasi (Gori *et al.*, 2021).

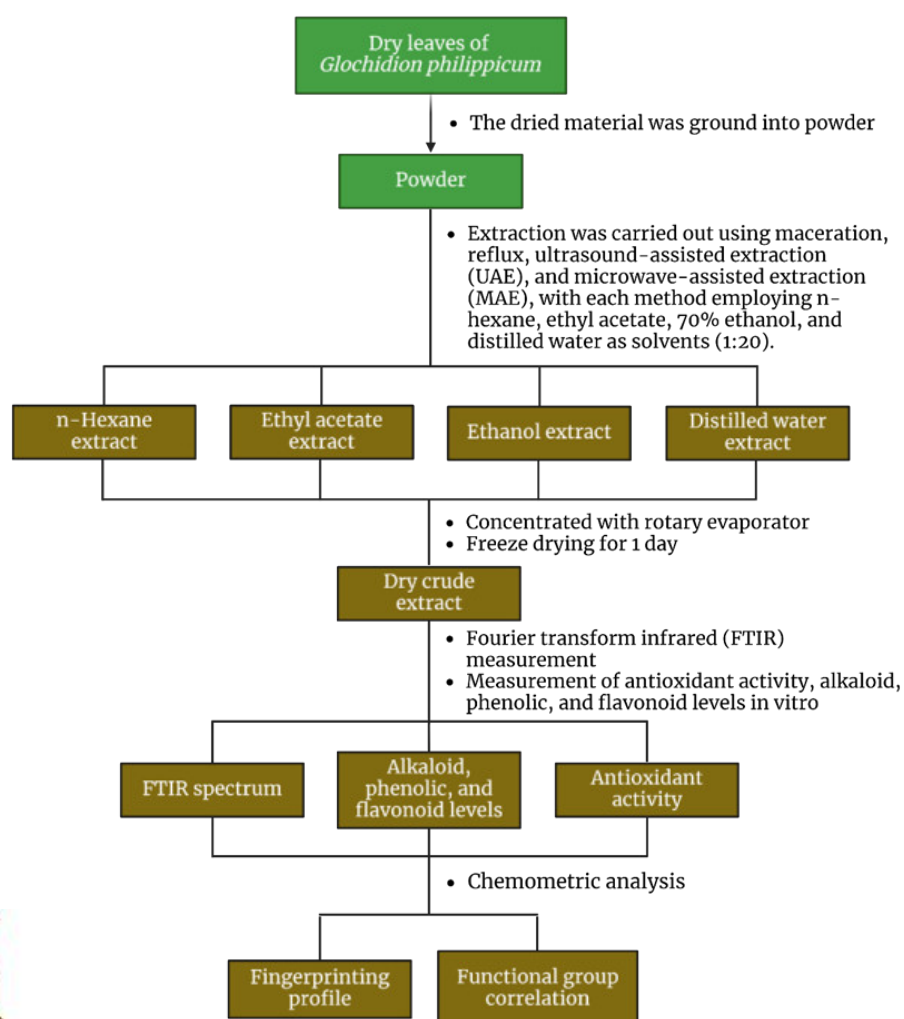
UEA dilakukan dengan mencampurkan sampel dengan pelarut dan menempatkannya dalam penangas ultrasonik (Branson, Brookfield, Amerika Serikat) yang beroperasi pada frekuensi 40 kHz selama 30 menit (Kumar *et al.*, 2023).

Ekstraksi refluks melibatkan penggabungan sampel dan pelarut dengan rasio 1:20 dalam labu alas bulat 1000 mL, memanaskan campuran hingga 65°C di atas mantel pemanas, dan direfluks selama 2 jam sebelum penyaringan (Nguyen *et al.*, 2020).



MAE dilakukan dengan menyinari sampel dengan microwave (MG odena, Italia) pada 450 W selama 10 menit, dengan suhu yang

dipantau menggunakan termometer inframerah. Setelah ekstraksi, campuran disaring, dan filtrat dipekatkan dengan menggunakan rotary vacuum evaporator (Büchi, Flawil, Swiss). Hasil ekstraksi dihitung dan dicatat (Nguyen *et al.*, 2020, Silva *et al.*, 2021). Spektra FTIR dari semua ekstrak diukur, dan analisis kemometrik dilakukan untuk mengelompokkan ekstrak berdasarkan kemiripan spektrum dan untuk memeriksa hubungan antara gugus fungsi dan aktivitas antioksidan. Skema yang menguraikan ekstraksi dan analisis selanjutnya disajikan pada **Gambar 1**.



**Gambar 1.** Representasi skema dari proses penyiapan ekstrak hingga analisis selanjutnya.

### 1.2.3 Penentuan Kandungan Fenolik, Flavonoid dan Alkaloid Total

Untuk penentuan kandungan fenolik, ekstrak dilarutkan dengan konsentrasi 1 mg/ml dan dicampurkan ke dalam sumur mikroplat 96 sumuran. Pada setiap sumur ditambahkan 50  $\mu$ L reagen Folin-Ciocalteu (1:10) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dan 50  $\mu$ L larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5%), kemudian diinkubasi selama 30 menit dalam keadaan gelap. Kandungan fenolik total diukur dengan membaca absorbansi pada 740 nm menggunakan microplate reader (Agilent BioTek Epoch, Winooski, USA), dan hasilnya dihitung berdasarkan kurva standar asam galat, yang dilaporkan dalam miligram ekuivalen asam galat (mgGAE / g) (Vidal-Gutiérrez *et al.*, 2020).

Untuk penentuan flavonoid, 50  $\mu$ L ekstrak (1 mg/mL) atau larutan standar ditambahkan ke dalam 96-well plate, diikuti dengan penambahan 10  $\mu$ L  $\text{AlCl}_3$  10%, 150  $\mu$ L etanol 96%, dan 10  $\mu$ L natrium asetat 1M. Campuran didiamkan selama 40 menit pada suhu kamar dan terlindung dari sinar matahari. Absorbansi diukur pada 440 nm menggunakan alat pembaca lempeng mikro yang sama. Kandungan flavonoid total dihitung dari kurva standar kuersetin dan dinyatakan sebagai miligram ekuivalen kuersetin (mgQE / g) (Lobo *et al.*, 2018).



Untuk penentuan alkaloid, 50 mg ekstrak dilarutkan dalam 5 mL HCl diekstraksi dengan 10 mL kloroform dalam corong pisah. Setelah an fase, fase kloroform dibuang. Ke dalam larutan yang tersisa

ditambahkan 1 mL NaOH 0,1 N, 2 mL larutan bromocresol green (BCG), dan 2 mL buffer fosfat (pH 4,7), diikuti dengan ekstraksi dengan 5 mL kloroform. Proses ini diulangi dua kali. Ekstrak akhir diuapkan, dilarutkan kembali menjadi 5 mL, dan absorbansi diukur pada 273 nm. Kandungan alkaloid total ditentukan dengan menggunakan kurva standar kafein dan dilaporkan dalam miligram ekuivalen kafein (mgCE / g) (Hastuti *et al.*, 2023).

#### 1.2.4 Uji Aktivitas Antioksidan Secara In Vitro

Aktivitas antioksidan in vitro dari ekstrak dinilai dengan menggunakan metode ABTS, dengan validasi lebih lanjut melalui tes tambahan, DPPH dan FRAP, yang dilakukan pada ekstrak yang menunjukkan hasil antioksidan tertinggi. Semua evaluasi antioksidan dilakukan dalam rangkap tiga. Untuk uji ABTS, kation radikal ABTS (ABTS<sup>•+</sup>) dibuat dengan menggabungkan 2 mM ABTS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dengan 2,45 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> dalam rasio volume 1:1, dan campuran tersebut didiamkan dalam gelap selama 16 jam pada suhu kamar. Sebelum digunakan, ABTS<sup>•+</sup> diencerkan dengan etanol untuk mencapai absorbansi 0,70±0,05 pada 734 nm. Pelat 96 sumuran disiapkan dengan menambahkan 20 µL masing-masing sampel dan 180 µL larutan ABTS<sup>•+</sup>, diikuti dengan inkubasi pada suhu kamar selama 6 menit, setelah itu absorbansi diukur pada 734 nm. Aktivitas pembersihan radikal dihitung

konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat 50% radikal (Hastuti *et al.*, 2023). Untuk uji DPPH, 160 µL dari 1.5×10<sup>-4</sup> M Larutan



DPPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dicampur dengan 40  $\mu\text{L}$  larutan sampel dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Absorbansi kemudian diukur pada 540 nm menggunakan microplate reader, dan aktivitas pembersihan radikal dinyatakan sebagai konsentrasi yang menghambat 50% radikal (Eom *et al.*, 2020). Dalam uji FRAP, reagen FRAP dibuat dengan mencampurkan 300 mM buffer asetat (pH 3,6), 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (40 mM dilarutkan dalam 40 mM HCl), dan 20 mM besi klorida encer dengan perbandingan 10:1:1. Ekstrak (20  $\mu\text{L}$ ) dicampur dengan 280  $\mu\text{L}$  reagen FRAP, dan setelah 30 menit inkubasi dalam gelap, absorbansi diukur pada 630 nm. Hasilnya dinyatakan sebagai  $\text{mmol.Fe(II)/g}$  (Vidal-Gutiérrez *et al.*, 2020).

#### 1.2.5 Profil Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Spektrum FTIR diukur dalam spektrofotometer FTIR (Shimadzu Type IRPrestige-21, Kyoto, Jepang). Sampel disiapkan dengan mencampurkan 2 mg ekstrak secara menyeluruh dengan 180 mg kalium bromida (KBr) untuk mencapai campuran yang homogen. Pelet kemudian dibentuk dengan memberikan tekanan delapan ton selama 15 menit menggunakan kompresi manual. Pelet yang dihasilkan ditempatkan dalam kompartemen sampel untuk dianalisis. Pengukuran FTIR dilakukan dalam rentang bilangan gelombang 400-4.000  $\text{cm}^{-1}$ , dengan resolusi 4  $\text{cm}^{-1}$  dan

ndaian/ menit. Spektrum FTIR yang diperoleh disimpan sebagai data untuk analisis selanjutnya (Rohaeti *et al.*, 2021).



### 1.2.6 Analisis Statistik

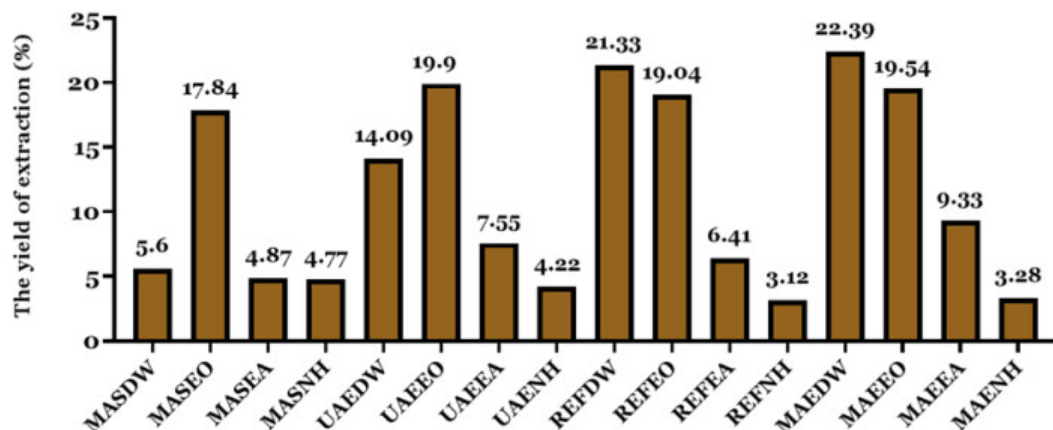
Hasil uji antioksidan, bersama dengan tingkat kandungan fenolik, flavonoid, dan alkaloid, dianalisis menggunakan uji Welch (non-parametrik) untuk perbandingan berpasangan menggunakan Perangkat Lunak R (<https://www.R-project.org/>). Analisis data multivariat (MVDA) dilakukan dengan menggunakan MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) untuk menganalisis data bilangan gelombang FTIR, serta kandungan fenolik, flavonoid, dan alkaloid, dan aktivitas antioksidan (Xia and Wishart, 2016). Pengelompokan dan perbedaan sampel dievaluasi menggunakan analisis komponen utama (PCA). Gugus fungsi potensial yang terkait dengan aktivitas antioksidan juga dianalisis untuk mengidentifikasi korelasi. Data dinyatakan sebagai rata-rata  $\pm$  standar deviasi (SD), dengan signifikansi statistik yang ditetapkan pada  $p < 0,05$ .

## 1.3 Hasil dan Pembahasan

### 1.3.1 Hasil Ekstraksi

Ekstrak yang dihasilkan memiliki warna coklat dan tekstur kental, mencerminkan konsistensinya yang khas. Hasil ekstraksi bervariasi secara signifikan tergantung pada metode dan pelarut yang digunakan (**Gambar 2**). Variasi ini menyoroti pengaruh penting teknik ekstraksi dan pemilihan pelarut efisiensi ekstraksi serta konsentrasi senyawa bioaktif dalam ekstrak.





**Gambar 2.** Perbandingan hasil ekstraksi (%) dari berbagai jenis ekstrak *Glochidion philippicum*. MASDW: maceration with distilled water; MASEO: maceration with ethanol; MASEA: maceration with ethyl acetate; MASNH: maceration with n-hexane; UAEDW: ultrasonic-assisted extraction with distilled water; UAEOO: ultrasonic-assisted extraction with ethanol; UAEEA: ultrasonic-assisted extraction with ethyl acetate; UAENH: ultrasonic-assisted extraction with n-hexane; REFDW: reflux extraction with distilled water; REFEO: reflux extraction with ethanol; REFEA: reflux extraction with ethyl acetate; REFNH: reflux extraction with n-hexane; MAEDW: microwave-assisted extraction with distilled water; MAEOO: microwave-assisted extraction with ethanol; MAEEA: microwave-assisted extraction with ethyl acetate; MAENH: microwave-assisted extraction with n-hexane.

### 1.3.2 Kandungan Fenolik, Flavonoid Dan Alkaloid Total

Penelitian ini secara kuantitatif mengevaluasi kandungan total fenol dan total flavonoid pada 16 ekstrak, dengan seluruh analisis dilakukan secara triplo dan hasilnya disajikan dalam **Tabel 1**. Di antara ekstrak-ekstrak tersebut, ekstrak MAEOO menunjukkan kadar senyawa bioaktif yang secara signifikan tinggi, terutama fenol dan flavonoid.

**Tabel 1.** Kuantifikasi kandungan fenolik, flavonoid, dan alkaloid pada ekstrak daun *Glochidion philippicum*



| Sample* | Total phenolics content (mgGAE/g) | Total flavonoids content (mgQE/g) | Total alkaloid content (mgCE/g) |
|---------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
|         | Mean±SD                           | Mean±SD                           | Mean±SD                         |
|         | 273,306±5,006 <sup>f,g</sup>      | 2,672±0,158 <sup>a,b</sup>        | 0,794±0,072 <sup>d,e</sup>      |
|         | 287,834±5,734 <sup>h</sup>        | 2,858±0,171 <sup>b</sup>          | 0,853±0,061 <sup>e,f</sup>      |
|         | 11,698±0,367 <sup>a,b</sup>       | 7,288±0,621 <sup>c</sup>          | 0,699±0,019 <sup>b,c,d</sup>    |
|         | 6,169±0,025 <sup>a,b</sup>        | 2,739±0,478 <sup>b</sup>          | 0,566±0,083 <sup>a</sup>        |



|        |                              |                            |                              |
|--------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| UAEDW  | 161,122±9,936 <sup>c</sup>   | 2,761±0,026 <sup>b</sup>   | 0,716±0,055 <sup>c,d</sup>   |
| UAEEEO | 271,099±2,722 <sup>f</sup>   | 3,037±0,531 <sup>b</sup>   | 0,551±0,028 <sup>a</sup>     |
| UAEEA  | 9,804±0,110 <sup>a,b</sup>   | 5,963±0,972 <sup>c</sup>   | 0,960±0,005 <sup>f</sup>     |
| UAENH  | 3,428±0,061 <sup>a,b</sup>   | 2,292±0,273 <sup>a,b</sup> | 0,506±0,008 <sup>a</sup>     |
| REFDW  | 201,582±9,813 <sup>d</sup>   | 2,374±0,077 <sup>a,b</sup> | 0,798±0,078 <sup>d,e</sup>   |
| REFEO  | 236,892±5,126 <sup>e</sup>   | 2,754±0,254 <sup>b</sup>   | 1,327±0,025 <sup>g</sup>     |
| REFEA  | 15,855±0,359 <sup>a,b</sup>  | 5,896±0,595 <sup>c</sup>   | 0,932±0,014 <sup>f</sup>     |
| REFNH  | 1,380±0,017 <sup>a</sup>     | 3,044±1,017 <sup>b</sup>   | 0,574±0,018 <sup>a,b</sup>   |
| MAEDW  | 273,674±3,674 <sup>f,g</sup> | 2,449±0,068 <sup>a,b</sup> | 0,535±0,006 <sup>a</sup>     |
| MAEEEO | 261,903±10,526 <sup>f</sup>  | 2,344±0,034 <sup>a,b</sup> | 0,490±0,012 <sup>a</sup>     |
| MAEEA  | 17,878±0,314 <sup>b</sup>    | 6,819±0,542 <sup>c</sup>   | 1,638±0,036 <sup>h</sup>     |
| MAENH  | 15,763±0,221 <sup>a,b</sup>  | 1,272±0,078 <sup>a</sup>   | 0,611±0,008 <sup>a,b,c</sup> |

CE: caffeine equivalents; GAE, gallic acid equivalents; QE, quercetin equivalents.

\* MASDW: maceration with distilled water; MASEO: maceration with ethanol; MASEA: maceration with ethyl acetate; MASNH: maceration with n-hexane; UAEDW: ultrasonic-assisted extraction with distilled water; UAEEEO: ultrasonic-assisted extraction with ethanol; UAEEA: ultrasonic-assisted extraction with ethyl acetate; UAENH: ultrasonic-assisted extraction with n-hexane; REFDFW: reflux extraction with distilled water; REFEO: reflux extraction with ethanol; REFEA: reflux extraction with ethyl acetate; REFNH: reflux extraction with n-hexane; MAEDW: microwave-assisted extraction with distilled water; MAEEEO: microwave-assisted extraction with ethanol; MAEEA: microwave-assisted extraction with ethyl acetate; MAENH: microwave-assisted extraction with n-hexane.

<sup>a-h</sup> Huruf kecil superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan signifikan yang ditentukan menggunakan uji Welch ( $p < 0,05$ ).

### 1.3.3 Aktivitas Antioksidan Secara In Vitro

Aktivitas antioksidan in vitro dari ekstrak daun *G. philippicum* dinilai menggunakan metode ABTS, yang menunjukkan potensi antioksidan yang signifikan. Di antara sampel yang diuji, ekstrak MAEEEO menunjukkan aktivitas paling kuat dengan nilai sebesar  $38,950 \pm 0,302$  (**Tabel 2**). Untuk mendukung temuan ini, uji tambahan dilakukan menggunakan metode DPPH dan FRAP, yang semakin mengonfirmasi kapasitas antioksidan

uji dari ekstrak MAEEEO.



**Tabel 2.** Aktivitas antioksidan ekstrak daun *Glochidion philippicum* menggunakan metode ABTS, DPPH, dan FRAP

| Sample*   | ABTS<br>IC <sub>50</sub> (µg/mL) | DPPH<br>IC <sub>50</sub> (µg/mL) | FRAP<br>(mmol.Fe(II)/g)     |
|-----------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
|           | Mean±SD                          | Mean±SD                          | Mean±SD                     |
| MASDW     | 54,392±1,204 <sup>a,b</sup>      | 8,377±0,538 <sup>a</sup>         | 647,363±18,662 <sup>g</sup> |
| MASEO     | 63,482±1,287 <sup>a,b</sup>      | 15,519±1,454 <sup>a</sup>        | 516±7,512 <sup>f</sup>      |
| MASEA     | 397,142±14,786 <sup>d,e</sup>    | 57,737±5,632 <sup>a</sup>        | 257,761±9,170 <sup>d</sup>  |
| MASNH     | 264,984±13,503 <sup>c</sup>      | 1354,124±22,602 <sup>f</sup>     | 96,940±18,469 <sup>b</sup>  |
| UAEDW     | 80,952±1,882 <sup>b</sup>        | 13,844±0,327 <sup>a</sup>        | 461,791±22,388 <sup>e</sup> |
| UAEO      | 61,981±0,868 <sup>a,b</sup>      | 16,770±4,564 <sup>a</sup>        | 514,030±11,657 <sup>f</sup> |
| UAEEA     | 446,404±17,970 <sup>e,f</sup>    | 391,578±18,833 <sup>c</sup>      | 142,836±10,993 <sup>c</sup> |
| UAENH     | 492,763±25,882 <sup>f</sup>      | 900,144±33,537 <sup>d</sup>      | 41,716±11,044 <sup>a</sup>  |
| REFDW     | 66,010±0,365 <sup>b</sup>        | 5,874±0,749 <sup>a</sup>         | 519,005±15,098 <sup>f</sup> |
| REFEO     | 55,119±1,293 <sup>a,b</sup>      | 7,223±0,204 <sup>a</sup>         | 527,463±6,840 <sup>f</sup>  |
| REFEA     | 354,246±22,446 <sup>d</sup>      | 447,917±38,630 <sup>c</sup>      | 164,478±21,252 <sup>c</sup> |
| REFNH     | 647,954±59,846 <sup>g</sup>      | 1051,616±31,687 <sup>e</sup>     | 21,194±7,898 <sup>a</sup>   |
| MAEDW     | 47,580±0,413 <sup>a,b</sup>      | 8,847±0,099 <sup>a</sup>         | 679,204±16,643 <sup>g</sup> |
| MAEO      | 38,950±0,302 <sup>a,b</sup>      | 16,521±3,211 <sup>a</sup>        | 639,900±8,745 <sup>g</sup>  |
| MAEEA     | 239,863±14,671 <sup>c</sup>      | 54,169±3,488 <sup>a</sup>        | 150,547±13,968 <sup>c</sup> |
| MAENH     | 349,826±4,156 <sup>d</sup>       | 300,162±65,565 <sup>b</sup>      | 45,821±4,222 <sup>a</sup>   |
| Quercetin | 7,674±0,263 <sup>a</sup>         | 3,914±0,317 <sup>a</sup>         | -                           |

ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid; DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; FRAP: ferric reducing antioxidant power; IC<sub>50</sub>: concentration to inhibit the 50% of ABTS or DPPH radical; mmol.Fe(II)/g: mmol of Fe(II) equivalent per gram extract.

\*MASDW: maceration with distilled water; MASEO: maceration with ethanol; MASEA: maceration with ethyl acetate; MASNH: maceration with n-hexane; UAEDW: ultrasonic-assisted extraction with distilled water; UAEO: ultrasonic-assisted extraction with ethanol; UAEEA: ultrasonic-assisted extraction with ethyl acetate; UAENH: ultrasonic-assisted extraction with n-hexane; REF DW: reflux extraction with distilled water; REFEO: reflux extraction with ethanol; REFEA: reflux extraction with ethyl acetate; REFNH: reflux extraction with n-hexane; MAEDW: microwave-assisted extraction with distilled water; MAEO: microwave-assisted extraction with ethanol; MAEEA: microwave-assisted extraction with ethyl acetate; MAENH: microwave-assisted extraction with n-hexane.

<sup>a-g</sup> Huruf kecil superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan signifikan yang ditentukan menggunakan uji Welch (p<0,05).

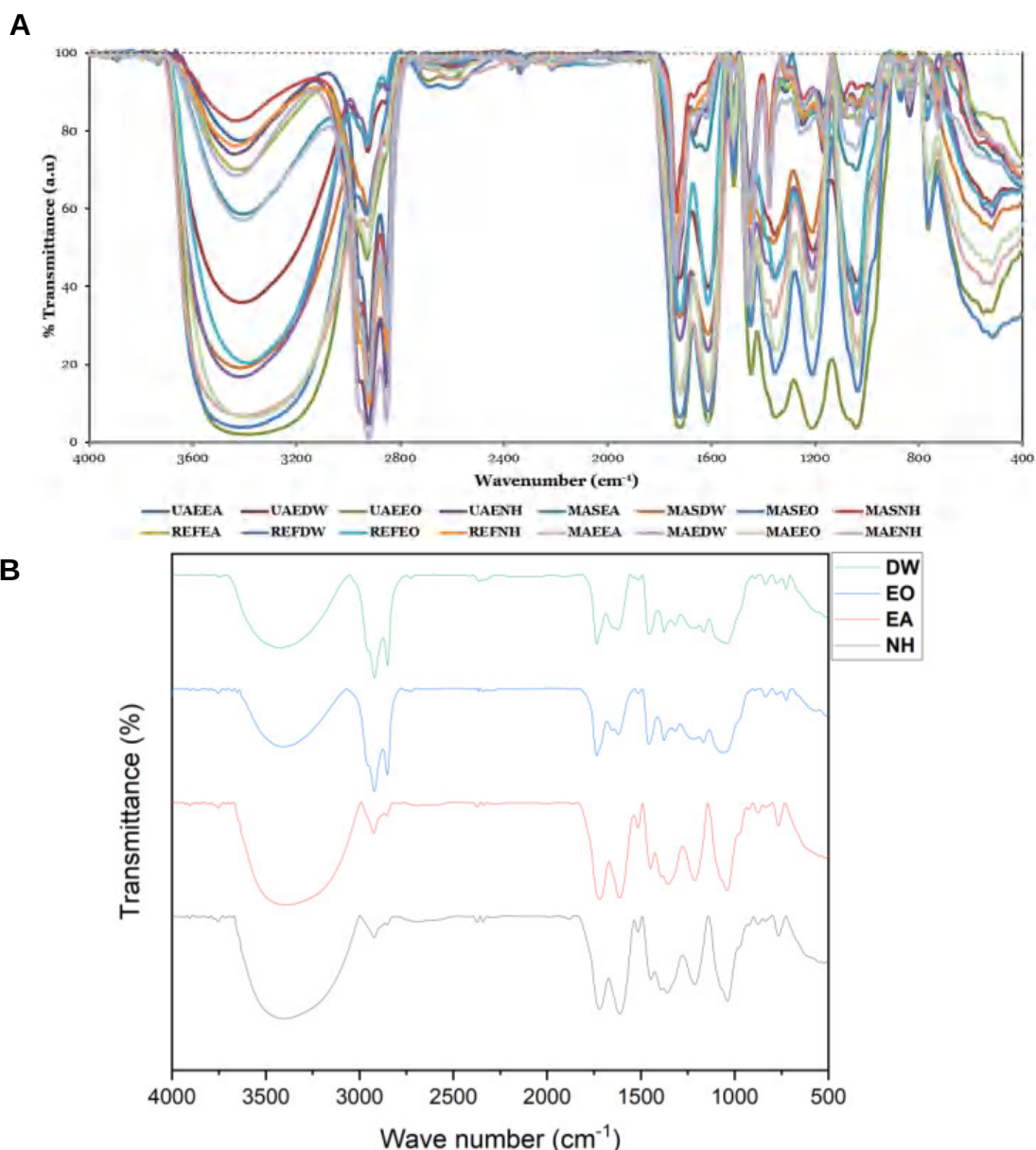


### sil Spektroskopi *Fourier-Transform Infrared* (FTIR)

alam penelitian ini, kami mengevaluasi kemampuan spektroskopi

FTIR (Fourier-transform infrared) yang cepat, nondestruktif, andal, dan kuat, yang dikombinasikan dengan analisis multivariat untuk diskriminasi ekstrak daun *G. philippicum*. Spektra FTIR representatif dari ekstrak daun *G. philippicum* ditampilkan pada **Gambar 3**. Gambar tersebut menunjukkan spektrum inframerah (IR) dengan % transmisi terhadap bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ ) untuk beberapa sampel. Setiap puncak dalam spektrum sesuai dengan gugus fungsional spesifik yang terkait dengan serapan inframerah metabolit dalam *G. philippicum*. Puncak signifikan dalam rentang  $1820\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan serapan kuat gugus  $\text{C}=\text{O}$ , sementara pita serapan lebar antara  $3400\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$  diatributkan pada gugus  $-\text{OH}$ . Serapan sedang hingga kuat pada  $1650\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan keberadaan gugus aromatik  $\text{C}=\text{C}$ , dan serapan dalam rentang  $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  mengindikasikan keberadaan gugus  $\text{C}-\text{O}$  (ester). Daerah sidik jari ( $1000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ) menunjukkan pola yang konsisten, meskipun terdapat variasi intensitas serapan. Persentase transmisi memberikan wawasan tentang bagaimana gugus molekul menyerap radiasi pada panjang gelombang tertentu, yang berkontribusi pada perbedaan pola di antara sampel.





**Gambar 3.** Spektrum *Fourier-transform infrared* (FTIR) ekstrak daun *Glochidion philippicum* pada wilayah 400–4,000  $\text{cm}^{-1}$ . Warna yang berbeda merepresentasikan profil FTIR dari 16 ekstrak (A), dan perbedaan profil FTIR dari representasi pelarut yang digunakan dalam ekstraksi *microwave-assisted extraction* (MAE) (B). MASDW: maceration with distilled water; MASEO: maceration with ethanol; MASEA: maceration with ethyl acetate; MASNH: maceration with n-hexane; UAEDW: ultrasonic-assisted extraction with distilled water; UAEEEO: ultrasonic-assisted extraction with ethanol; UAEEA: ultrasonic-assisted extraction with ethyl acetate; UAENH: ultrasonic-assisted extraction with n-hexane; REFDW: reflux extraction with distilled water; REFEO: reflux extraction with ethanol; REFEA: reflux extraction with ethyl acetate; REFNH: reflux extraction with n-hexane; MAEDW: microwave-assisted extraction with distilled water; MAEEEO: microwave-assisted extraction with ethanol; MAEEA: microwave-assisted extraction with ethyl acetate; MAENH: microwave-assisted extraction with n-hexane; DW: distilled water; EO: ethanol; EA: ethyl acetate; n-hexane.



### 1.3.5 Analisis Kemometrik

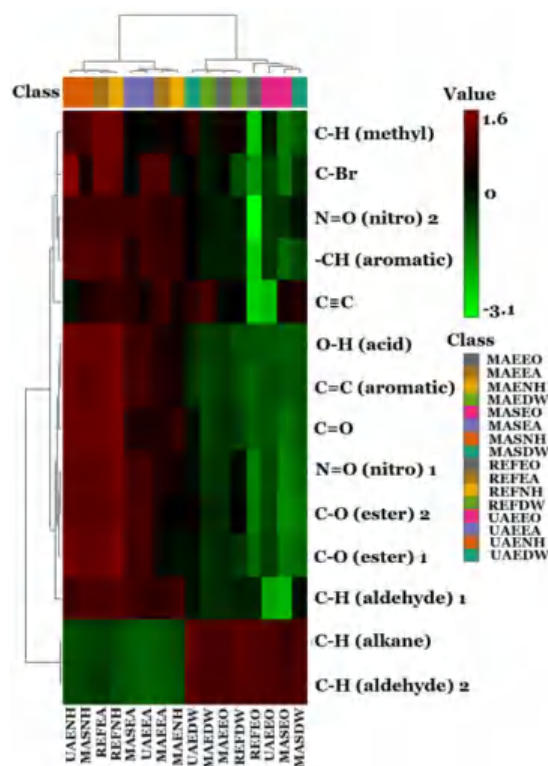
Gugus fungsi dan nilai transmisi terkait dianalisis lebih lanjut menggunakan *hierarchical cluster analysis* (HCA), dan hasilnya ditampilkan dalam bentuk *heatmap* pada **Gambar 4**, yang merangkum kelimpahan gugus fungsi pada setiap sampel dengan pelarut dan metode ekstraksi yang berbeda. Gugus fungsi seperti C–H (metil), C–Br, N=O (nitro) 2, –CH (aromatik), C≡C, O–H (asam), C=C (aromatik), C=O, N=O (nitro) 1, C–O (ester) 2, C–O (ester) 1, dan C–H (aldehida) memiliki kelimpahan tinggi pada sampel UAENH, MASNH, REFEA, REFNH, MASEA, UAEEA, MAEEA, dan MAENH. Sebaliknya, kelompok C–H (alkana) dan C–H (aldehid) 2 lebih melimpah pada sampel UAEDW, MAEDW, MAEEO, REFDFW, REFEO, UAEEEO, MASEO, dan MASDW.

Dua *principal components* (PC), yaitu komponen utama 1 (PC-1) sebesar 86,1% dan komponen utama 2 (PC-2) sebesar 9,7%, menjelaskan 95,8% dari total variasi (data bilangan gelombang), sebagaimana ditunjukkan dalam diagram skor *principal component analysis* (PCA) yang diperoleh dari data spektrum FTIR pada **Gambar 5**. Variansi total maksimum dipertimbangkan oleh PC-1, sedangkan variansi residu maksimum dipertimbangkan oleh PC-2, dan seterusnya. Diagram skor PCA pada **Gambar 5A** menunjukkan pola pengelompokan serta perbedaan dan kesamaan antara spesies tanaman dan komponennya.

yang berada di dekat koordinat pusat (0,0) menunjukkan n, sementara yang berada jauh dari asal (origin) menunjukkan

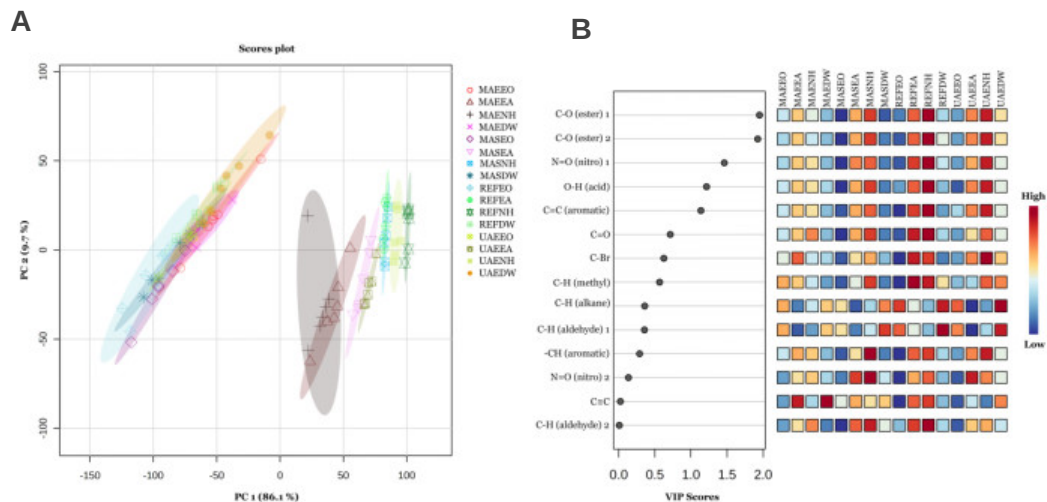


perbedaan yang lebih besar, sebagaimana ditunjukkan oleh nilai *principal component* (PC).



**Gambar 4.** *Heatmap* yang mewakili gugus fungsi dalam ekstrak daun *Glochidion philippicum*. Skala warna menggambarkan kelimpahan relatif dari setiap kelompok fungsional. Baris mewakili gugus fungsi spesifik, sementara kolom mewakili berbagai sampel ekstraksi. MAEEO: microwave-assisted extraction with ethanol; MAEEA: microwave-assisted extraction with ethyl acetate; MAENH: microwave-assisted extraction with n-hexane; MAEDW: microwave-assisted extraction with distillation water; MASEO: maseration with ethanol; MASEA: maseration with ethyl acetate; MASNH: maseration with n-hexane; MASDW: maseration with distillation water; REFEO: reflux with ethanol; REFEA: reflux with ethyl acetate; REFNH: reflux with n-hexane; REFDW: reflux with distillation water; UAEEO: ultrasonic-assisted extraction with ethanol; UAEEA: ultrasonic-assisted extraction with ethyl acetate; UAENH: ultrasonic-assisted extraction with n-hexane; UAEDW: ultrasonic-assisted extraction with distillation water.





**Gambar 5.** Pola pengelompokan dan metabolit bioaktif kunci dari ekstrak daun *Glochidion philippicum*. (A) Diagram skor *principal component analysis* (PCA) untuk komponen utama (PC-1) dan (PC-2) pada semua sampel *G. philippicum* yang dihasilkan oleh analisis FTIR serta pemisahan kluster-kluster. (B) Skor *Variable Importance in Projection* (VIP) dari metabolit bioaktif yang diperoleh melalui analisis *partial least squares discriminant analysis* (PLS-DA), yang menyoroti senyawa dengan nilai pengaruh tinggi terhadap variasi sampel. Skor variabel, yang berkisar dari rendah hingga tinggi, sesuai dengan pentingnya variabel tersebut. Kotak berwarna di sebelah kanan menunjukkan konsentrasi relatif dari metabolit yang sesuai, dengan merah mewakili tingkat tinggi dan biru menunjukkan tingkat rendah. MAEEO: microwave-assisted extraction with ethanol; MAEEA: microwave-assisted extraction with ethyl acetate; MAENH: microwave-assisted extraction with n-hexane; MAEDW: microwave-assisted extraction with distillation water; MASEO: maseration with ethanol; MASEA: maseration with ethyl acetate; MASNH: maseration with n-hexane; MASDW: maseration with distillation water; REFEO: reflux with ethanol; REFEA: reflux with ethyl acetate; REFNH: reflux with n-hexane; REFDFW: reflux with distillation water; UAEEO: ultrasonic-assisted extraction with ethanol; UAEEA: ultrasonic-assisted extraction with ethyl acetate; UAENH: ultrasonic-assisted extraction with n-hexane; UAEDW: ultrasonic-assisted extraction with distillation water.

Korelasi antara gugus fungsi tertentu dan potensi antioksidan mereka yang dinilai melalui uji ABTS, DPPH, dan FRAP disajikan pada

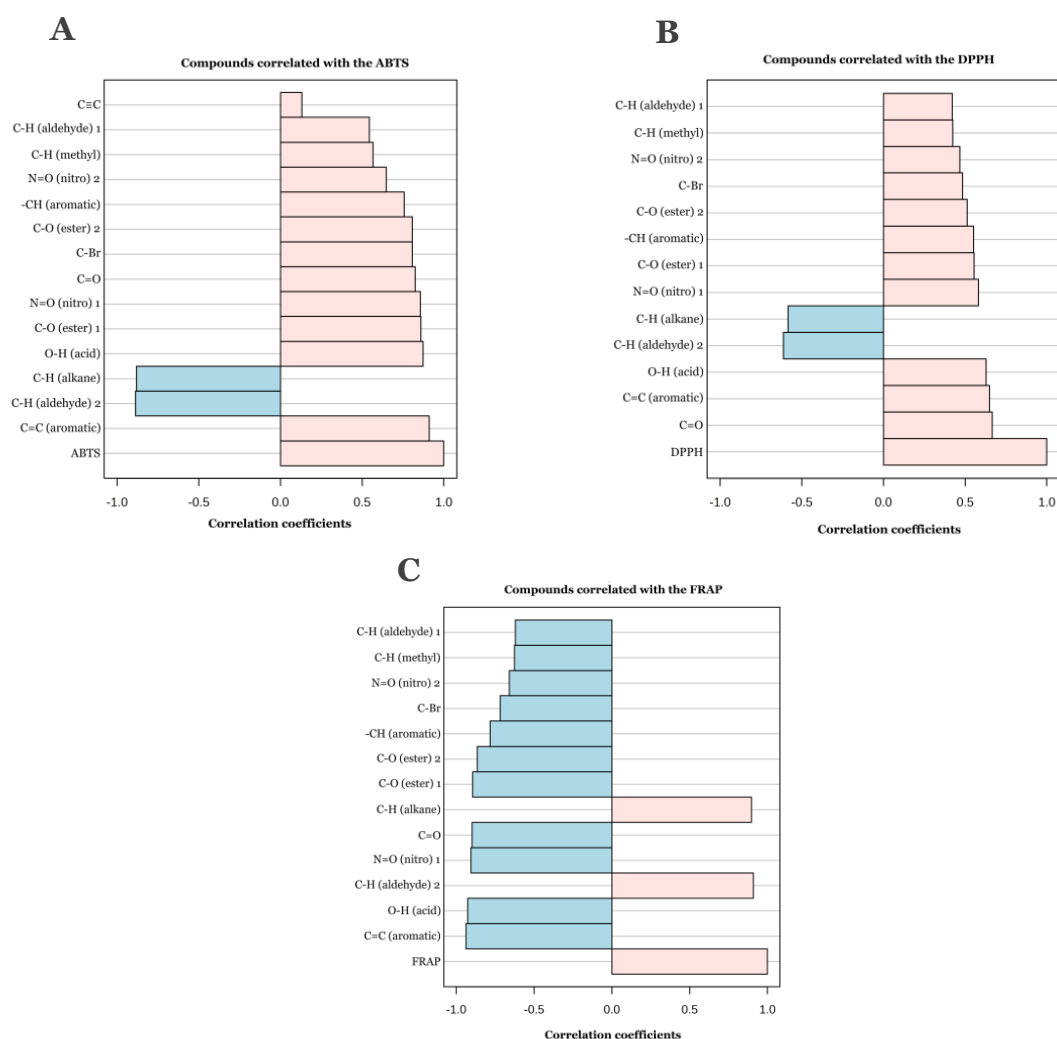
**Gambar 6** menggunakan kombinasi data FTIR dan teknik PLS-DA. Nilai antioksidan dalam metode ABTS dan DPPH merujuk pada nilai IC<sub>50</sub>, di

semakin kecil nilai IC<sub>50</sub>, semakin baik aktivitas antioksidannya.

Sementara itu, FRAP merujuk pada kemampuan reduksi, semakin besar



nilai reduksi, semakin besar kapasitas antioksidannya. Korelasi positif yang kuat dengan aktivitas ABTS diamati pada gugus fungsi C=C (aromatik), O–H (asam), dan C–O (ester). Selain itu, aktivitas peredaman DPPH menunjukkan korelasi positif dengan kelompok C=O, C=C (aromatik), dan O–H (asam). Kelompok C–H, yang ada pada alkana atau aldehid, juga menunjukkan korelasi positif dengan aktivitas FRAP.



**Gambar 6.** Korelasi antara gugus fungsi ekstrak daun *Glochidion philippicum* dan antioksidan. 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid A), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (B), ferric reducing antioxidant RAP) (C).



## 1.4 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan :

1. Profil FTIR mengidentifikasi gugus fungsi yang berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan diantaranya C=C (aromatik), O-H (asam), N=O (nitro), dan C-O (ester)
2. Uji in vitro dengan metode ABTS dan FRAP menunjukkan bahwa ekstrak yang menggunakan etanol 70% dan air memiliki aktivitas antioksidan tertinggi khususnya ekstrak MAEEO (IC<sub>50</sub> 38,95 µg/ml dan 16,521 µg/ml)

## 1.5 Daftar Pustaka

Carocho, M., Ferreira, I. C. F. R., Morales, P. & Soković, M. 2019. Antioxidants and prooxidants: Effects on health and aging 2018. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.

Dinas Kesehatan, P. 2016. *Tumbuhan obat tradisional papua berdasarkan kearifan lokal masyarakat*, Provinsi Papua, Nulis buku Jendela Dunia.

Ikhsan, A. N., Rohman, A., Putri, A. R., Syifa, F., Mustafidah, M. & Martien, R. 2021. Application of FTIR spectroscopy and chemometrics for the prediction of radical scavenging activities of fish oils. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 32, 166-174.

Jufri, N. (2022). Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol buah, batang dan daun sampare (*Glochidion philippicum* (Cav.) C.B.Rob.) dalam meredam radikal nitrit oksida (NO). Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar.

Khairuddin, Utami, Y. P. & Ardi, M. A. Y. 2023. Antimalarial Activity of Ethanol Extract of Sampare Leaves ( *Glochidion* sp var . Biak ) Against Plasmodium falciparum In Vitro. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 10, 10-18.



ni, A., Wilkes, M. A. and Roberts, T. H. 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), pp. 2328–375.

- Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P. & D'alessandro, A. G. 2022. Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *Oxygen*, 2, 48-78.
- Miracle Uwa, L. 2017. The Anti-aging Efficacy of Antioxidants. *Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences*, 7, 66-68.
- Pabisa, S. S. 2022. Profil senyawa ekstrak etanol daun, batang, dan buah sampare (*Glochidion philippicum* (Cav.) C.B.Rob.) menggunakan instrumen LC-MS dan FTIR. Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar.
- Palulun, E. D. (2022) Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan etil asetat daun sampare (*Glochidion* sp. var. Biak.) Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* dan *Streptococcus mutans*.
- Panchal, K. & Tiwari, A. K. 2017. *Drosophila melanogaster* "a potential model organism" for identification of pharmacological properties of plants/plant-derived components. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 89, 1331-1345.
- Peng, C., Wang, X., Chen, J., Jiao, R., Wang, L., Li, Y. M., Zuo, Y., Liu, Y., Lei, L., Ma, K. Y., Huang, Y. & Chen, Z. Y. 2014. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *BioMed Research International*, 2014.
- Pratami, D. K., Mun'im, A., Sundowo, A. & Sahlan, M. 2018. Phytochemical profile and antioxidant activity of propolis ethanolic extract from tetragonula bee. *Pharmacognosy Journal*, 10, 128-135.
- Rohaeti, E., Karunina, F. & Rafi, M. 2021. Ftir-based fingerprinting and chemometrics for rapid investigation of antioxidant activity from *Syzygium polyanthum* extracts. *Indonesian Journal of Chemistry*, 21, 128-136.
- Segers, K., Declerck, S., Mangelings, D., Heyden, Y. V. & Eeckhaut, A. V. 2019. Analytical techniques for metabolomic studies: A review. *Bioanalysis*, 11, 2297-2318.



## BAB II

### EFEK EKSTRAK MAEEO DAUN SAMPARE (*Glochidion philippicum* (Cav.) C.B.Rob.) TERHADAP KADAR ROS DAN EKSPRESI GEN *sod1*, *sod2*, DAN *cat* PADA *Drosophila melanogaster*

#### Abstrak

*Glochidion philippicum* (Cav.) C.B.Rob, anggota famili Phyllanthaceae, menunjukkan potensi antioksidan yang kuat. Penelitian ini menyelidiki efek antioksidan ekstrak daun *G. philippicum* secara in vivo menggunakan larva *Drosophila melanogaster* mutan *PGRP-LB<sup>Δ</sup>*. Ekstrak yang digunakan merupakan ekstrak yang diperoleh dari ekstraksi metode microwave-assisted extraction (MAEEO) menggunakan pelarut etanol, yang secara in vitro tergolong antioksidan kuat. Pengujian in vivo pada ekstrak MAEEO terhadap larva *D. melanogaster* meliputi pengukuran kadar ROS serta ekspresi gen *sod1*, *sod2*, dan *cat*. Larva mutan *PGRP-LB<sup>Δ</sup>* yang terpapar *heat-killed Escherichia coli* menunjukkan peningkatan kelangsungan hidup (*survival*) pada model lalat autoinflamasi, yang mengindikasikan efek imunomodulator. Studi in vivo menunjukkan bahwa ekstrak MAE yang diekstraksi dengan etanol (MAEEO) secara signifikan meningkatkan kelangsungan hidup larva mutan *PGRP-LB<sup>Δ</sup>* yang mengalami autoinflamasi dan terpapar *E. coli* yang telah dinaktivasi dengan panas. Analisis *Real-time quantitative PCR* menunjukkan bahwa efek ini bergantung pada aktivasi gen antioksidan endogen (*so1*, *sod2*, dan *cat*). Temuan ini menyoroti ekstrak daun *G. philippicum* sebagai sumber alami senyawa bioaktif dengan sifat antioksidan eksogen yang berpotensi untuk aplikasi terapeutik

**Kata kunci:** MAEEO, antioksidan, model autoinflamasi, *Drosophila melanogaster*

#### 2.1 Pendahuluan

Berbagai proses sel endogen dan eksogen normal menghasilkan radikal bebas. Mitokondria adalah sumber utama ROS seluler endogen, yang, pada konsentrasi tinggi, dapat merusak makromolekul seperti DNA,



dan lipid. Akibatnya, radikal bebas berlebih yang terakumulasi tubuh manusia dapat memicu kondisi yang dikenal sebagai stres oksidatif, yang merupakan ketidakseimbangan antara produksi radikal

bebas dan kemampuan tubuh untuk menetralkannya melalui mekanisme pertahanan antioksidan. Stres oksidatif ini memiliki dampak yang luas dan kompleks, sering kali berkontribusi pada munculnya atau memperburuk berbagai gangguan patologis yang parah, termasuk peradangan, kanker, diabetes, dan penyakit pernapasan, kardiovaskular, artritis reumatoid, neurodegeneratif, dan gastrointestinal (Martemucci *et al.*, 2022, Carocho *et al.*, 2019). Tubuh memiliki pertahanan antioksidan bawaan terhadap radikal bebas. Namun, jumlah yang berlebihan tidak dapat ditangani oleh antioksidan bawaan saja. Pola makan yang kaya buah-buahan, sayur-sayuran, dan biji-bijian utuh sebagai antioksidan dianggap bermanfaat dalam mencegah dan mengobati beberapa penyakit (Martemucci *et al.*, 2022).

Akhir-akhir ini, banyak penelitian yang membahas tentang efek antioksidan terhadap penuaan. Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa antioksidan dari bahan alami dapat memperpanjang umur hewan uji dengan meningkatkan pertahanan antioksidan tubuh atau mengurangi stres oksidatif (Peng *et al.*, 2014). Ekstrak dari beberapa jenis beri dan teh hijau terbukti dapat memperpanjang umur pada model hewan seperti *Caenorhabditis elegans* dan *Drosophila melanogaster* dengan memengaruhi jalur yang terkait dengan autofagi dan pensinyalan redoks, yang penting dalam respons tubuh terhadap stres oksidatif (Park *et al.*,



Giorgio and Rigobello, 2024). Selain itu, beberapa antioksidan vitamin C, E, dan karotenoid juga menunjukkan efek positif pada

umur hewan uji. Namun, hasilnya bervariasi tergantung pada dosis dan kondisi lingkungan (Badwan *et al.*, 2023), vitamin D3 memengaruhi ekspresi gen antioksidan, yang menunjukkan peningkatan resistensi terhadap stres oksidatif dan peningkatan kelangsungan hidup lalat (Hardiyanti *et al.*, 2024). Ada kesepakatan ilmiah yang berkembang bahwa antioksidan, khususnya bentuk polifenol, dapat membantu mengurangi kejadian penyakit, seperti kanker tertentu, penyakit kardiovaskular dan neurodegeneratif, kerusakan DNA, atau bahkan memiliki sifat anti-penuaan. Eksplorasi penuaan yang sehat telah mengarah pada penggunaan antioksidan sebagai sarana untuk menghambat penurunan fungsi fisiologis terkait usia, disregulasi proses metabolisme, atau pencegahan banyak penyakit terkait usia (Pratami *et al.*, 2018). Karena potensi bahan alam Indonesia yang luas dan beragam, eksplorasi lebih lanjut diperlukan untuk membuka peluang baru dalam penemuan senyawa antioksidan. Dalam penelitian ini, salah satu tanaman yang kami pilih adalah *Glochidion philippicum* (Cav.) C.B.Rob. *G. philippicum* merupakan tanaman dari famili Phyllanthaceae dan dilaporkan memiliki beberapa potensi, antara lain sebagai antioksidan, antimalaria, dan antibakteri. Tanaman ini sudah tidak asing lagi bagi masyarakat Papua karena secara tradisional masyarakat, khususnya di daerah Biak, memanfaatkan tanaman tersebut sebagai obat antimalaria.



senyawa antioksidan memiliki efek antiinflamasi dan nagenik yang lebih besar serta efek antipenuaan yang dihasilkan

ketika dikonsumsi dalam bentuk tanaman dibandingkan dengan unsur antioksidan secara individu. Tanaman mengandung banyak antioksidan dan fitokimia lain yang tidak terdapat dalam pil suplemen tunggal. Selain itu, kombinasi berbagai antioksidan memiliki efek sinergis dan dapat diperoleh secara alami pada tanaman (Miracle Uwa, 2017). Untuk pengujian *in vivo*, *D. melanogaster* dapat digunakan sebagai model hewan percobaan dengan beberapa keuntungan, termasuk 75% kesamaan dengan gen yang terkait dengan penyakit manusia, siklus hidup yang pendek, dan penanganan yang mudah. Uji biokimia seperti superoksida dismutase (SOD) dan katalase (CAT) mirip dengan vertebrata; *D. melanogaster* adalah invertebrata yang memiliki enzim antioksidan ini, sehingga mudah untuk memeriksa sifat antioksidan tanaman menggunakan alat buah (Panchal and Tiwari, 2017).

Dalam penelitian ini, uji antioksidan dilakukan menggunakan metode *in vivo* dengan model lalat *Drosophila* galur PGPR-LBA, yang melibatkan pengukuran kadar ROS serta ekspresi gen *sod1*, *sod2*, dan *cat*. Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap potensi *G. philippicum* terhadap kadar ROS dan ekspresi gen terkait antioksidan untuk mendukung pengembangannya sebagai bahan alami potensial untuk mendukung penuaan yang sehat.

## 2.2 Metode Penelitian



### Model *Drosophila*

Dalam penelitian ini, digunakan garis mutan *D. melanogaster* yang

kekurangan protein *peptidoglycan recognition protein* (PGRP)-LB, yang disebut lalat *PGRP-LB<sup>A</sup>*. Garis mutan ini awalnya diperoleh dari *Host Defense and Responses Laboratory*, Kanazawa University, Jepang. Garis mutan tersebut telah dipelihara selama lebih dari 20 generasi di bawah kondisi laboratorium standar di Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Indonesia. Lalat dipelihara pada diet berbasis tepung jagung standar pada suhu 25°C. Lalat dewasa *D. melanogaster* berumur 3–5 hari digunakan dalam penelitian. Makanan *Drosophila* disiapkan dengan mencampurkan jagung, ragi, gula, dan agar, yang kemudian ditambahkan dengan *E. coli* yang telah dipanaskan (*heat-killed*). Campuran ini dipanaskan hingga 100°C sambil diaduk secara konstan hingga mencapai konsistensi yang kental.

### 2.2.2 Preparasi *Heat-Killed E. coli*

Strain *Escherichia coli* FNCC 0091 dikulturkan dalam medium LB broth pada suhu 37°C selama 24 jam dengan pengadukan. Setelah inkubasi, kultur tersebut disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 30 menit untuk menghilangkan viabilitas bakteri.

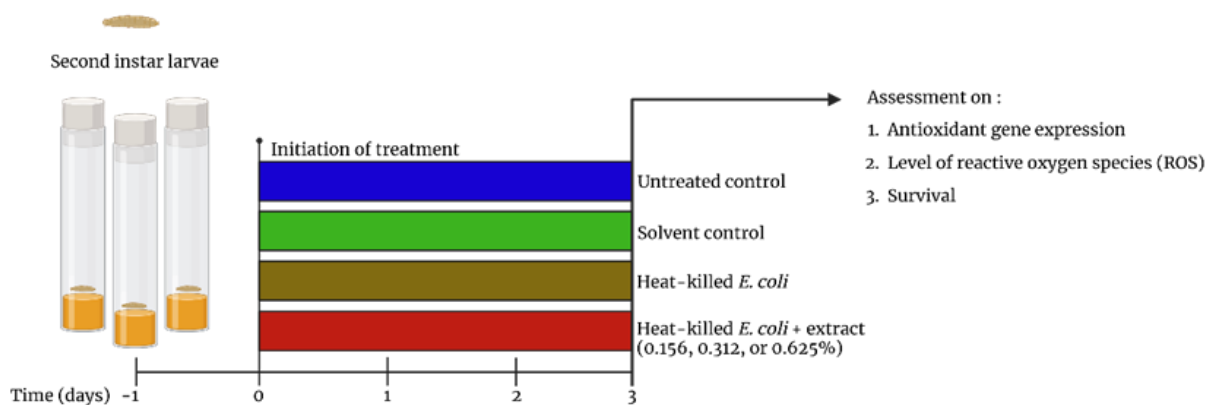
### 2.2.3 Desain dan Rancangan Penelitian

Larutan ekstrak disiapkan menggunakan etanol 70% sebagai pelarut, mengingat aktivitas antioksidan in vitro dikaitkan dengan fraksi nol yang diperoleh melalui ekstraksi berbantu gelombang mikro ). Untuk menguji efeknya secara in vivo, MAEEO pada



konsentrasi 0,625%, 0,312%, dan 0,156% disiapkan dengan memipet volume ekstrak yang telah dihitung ke dalam makanan lalat, kemudian dihomogenisasi secara menyeluruh. Campuran tersebut kemudian dipindahkan dengan hati-hati ke dalam vial untuk menciptakan lingkungan yang terkontrol untuk eksperimen selanjutnya.

Uji kelangsungan hidup dilakukan menggunakan larva instar kedua berumur 3 hari, dan efek MAEEO pada gen-gen terkait antioksidan endogen—*sod1* (mengkode superoxide dismutase 1), *sod2* (mengkode superoxide dismutase 2), dan *cat* (mengkode katalase)—serta tingkat *reactive oxygen species* (ROS), dianalisis. Rancangan percobaan untuk uji in vivo ini digambarkan pada **Gambar 7**.



**Gambar 7.** Representasi skematik uji in vivo yang digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan dan imunomodulator dari ekstrak *Glochidion philippicum* pada *Drosophila melanogaster*.

#### 2.2.4 Survival Analysis

Uji kelangsungan hidup dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan *rosophila melanogaster* bertahan hidup di bawah perlakuan Larva instar kedua *D. melanogaster* dipaparkan pada berbagai



perlakuan yang dimasukkan ke dalam makanan lalat untuk mengevaluasi efek ekstrak. Perlakuan yang diberikan meliputi: makanan lalat normal sebagai kontrol, makanan lalat yang ditambahkan dengan *heat-killed E. coli* dan etanol 70%, makanan lalat yang ditambahkan dengan *heat-killed E. coli* dan ekstrak MAEEO 0,625%, makanan lalat yang ditambahkan dengan *heat-killed E. coli* dan ekstrak MAEEO 0,312%, serta makanan lalat yang ditambahkan dengan *heat-killed E. coli* dan ekstrak MAEEO 0,156%. Jumlah larva yang bertahan hidup atau mati dicatat setiap hari, dengan pengamatan dilakukan hingga siklus selesai. Perkembangan lalat buah dari larva menjadi pupa, serta dari pupa menjadi lalat dewasa, diamati pada setiap kelompok perlakuan.

### 2.2.5 Nitroblue Tetrazolium Reduction Assay

Mengacu pada protokol yang telah ditetapkan (Hardiyanti *et al.*, 2024), uji reduksi nitroblue tetrazolium (NBT) dilakukan untuk mengukur kadar *reactive oxygen species* (ROS) pada hemolimfa larva *D. melanogaster*. Konsentrasi ROS ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 595 nm. Untuk validitas statistik, digunakan ukuran sampel sebanyak 100 lalat dewasa. Lalat dikumpulkan dan dibilas dengan larutan *phosphate-buffered saline* (PBS) untuk menghilangkan sisa makanan. Hemolimfa kemudian diekstraksi di atas es untuk mencegah melanisasi. Ke dalam hemolimfa, ditambahkan 200  $\mu$ L PBS 1×

volume yang sama dari larutan NBT (Himedia by Laboratories, Square, USA), sehingga volume akhir mencapai 300  $\mu$ L.



Campuran tersebut diinkubasi dalam kondisi gelap pada suhu ruang selama satu jam, diikuti dengan penambahan 300  $\mu$ L asam asetat glasial 100% untuk menghentikan reaksi. Setelah itu, campuran disentrifugasi dengan kecepatan penuh (16.000 rpm) selama satu menit. Absorbansi pada panjang gelombang 595 nm diukur menggunakan spektrofotometer (Shimadzu UV-Vis 1800, Kyoto, Jepang) setelah penambahan asam asetat 50% (Hardiyanti *et al.*, 2024).

### 2.2.6 Analisis Ekspresi Gen

Sebanyak lima ekor larva *D. melanogaster* yang sebelumnya menerima berbagai perlakuan melalui makanan (**Gambar 2**) dimasukkan ke dalam tabung Treff untuk isolasi RNA total menggunakan PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA) sesuai dengan protokol pabrikan. *Reverse transcriptase quantitative* PCR (RT-qPCR) kemudian dilakukan menggunakan GoTaq 1-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, USA) untuk mengevaluasi tingkat ekspresi gen target. Reaksi RT-qPCR dilakukan dalam volume 10  $\mu$ L, dimulai dengan siklus awal pada 37°C selama 15 menit, diikuti dengan 95°C selama 10 menit. Kemudian dilanjutkan dengan 40 siklus denaturasi pada 95°C selama 10 detik, penempelan (annealing) pada 60°C selama 30 detik, dan ekstensi pada 72°C selama 30 detik. Setiap run RT-qPCR mencakup analisis kurva pelelehan (melt curve analysis) standar untuk

kan amplifikasi yang akurat dari produk yang diharapkan. Gen al protein (*rp49*) digunakan sebagai kontrol internal. Urutan primer



yang digunakan dalam uji ini tercantum pada **Tabel 3**.

**Tabel 3.** Primer yang digunakan dalam uji RT-qPCR untuk menilai ekspresi gen terkait antioksidan endogen

| Genes       | Forward primer                | Reverse primer               |
|-------------|-------------------------------|------------------------------|
| <i>sod1</i> | 5'-AGGTCAACAT CACCGACTCC-3'   | 5'-GTTGACTTGCTCAGCTCGTG-3'   |
| <i>sod2</i> | 5'-TGGCCACAT CAACCACAC-3'     | 5'-TTCCACTGCGACTCGATG-3'     |
| <i>cat</i>  | 5'-TTCCTGGATGAGATGTCGCACT-3'  | 5'-TTCTGGGTGTGAATGAAGGTGG-3' |
| <i>rp49</i> | 5'-GACGCTTCAAGGGACAGTATCTG-3' | 5'-AAACGCGGTTCTGCAT GAG-3'   |

### 2.2.7 Analisis Statistik

Data uji kelangsungan hidup disajikan dalam bentuk grafik batang, dengan signifikansi statistik ditentukan menggunakan uji Log Rank. Tingkat mRNA untuk semua kelompok perlakuan dikuantifikasi dan ditampilkan dalam grafik batang. Analisis statistik data ekspresi gen dilakukan menggunakan ANOVA satu arah diikuti dengan uji post-hoc Dunnett. Semua dataset dari studi kelangsungan hidup dan ekspresi gen diproses menggunakan GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Boston, USA). Data dinyatakan sebagai rata-rata  $\pm$  simpangan baku (SD), dengan signifikansi statistik ditetapkan pada  $p < 0,05$ .

## 2.3 Hasil dan Pembahasan

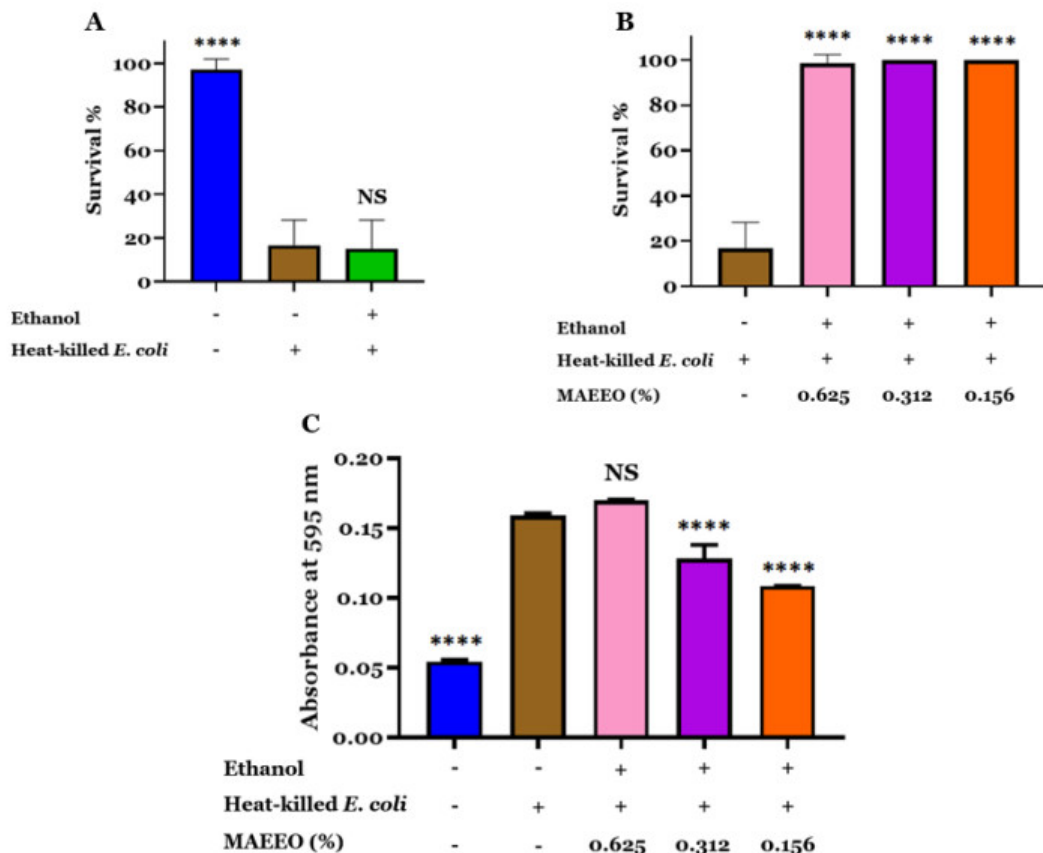
### 2.3.1 Efek Ekstrak *Glochidion philippicum* Terhadap Tingkat Kelangsungan Hidup dan Level ROS Pada *Drosophila* Model Autoimun

Kami menggunakan mutan *PGRP-LB<sup>A</sup>* pada *D. melanogaster* dalam uji kelangsungan hidup untuk mengevaluasi keamanan ekstrak MAEEO dan menyelidiki kemungkinan efek fenotipik pada model lalat autoimun. Perbandingan antara kelompok yang tidak diobati dan kelompok kontrol dengan *heat-killed E. coli* menunjukkan penurunan kelangsungan hidup selama tiga hari pada larva instar kedua dari



mutan *PGRP-LB<sup>Δ</sup>* (**Gambar 8A**). Secara khusus, tidak ada perbedaan signifikan yang diamati antara kontrol pelarut (etanol 70%) dan *heat-killed E. coli*. Produksi ROS yang meningkat pada lalat *PGRP-LB<sup>Δ</sup>* dikaitkan dengan aktivasi berlebih sinyal imun dalam merespons *heat-killed E. coli*. Namun, perlakuan dengan ekstrak *G. philippicum* pada semua konsentrasi secara signifikan meningkatkan tingkat kelangsungan hidup lalat autoimun, yang digunakan sebagai model stres oksidatif kronis (**Gambar 8B**). Perlakuan larva mutan *PGRP-LB<sup>Δ</sup>* dengan *heat-killed E. coli* diikuti dengan suplementasi ekstrak MAEEO menghasilkan pengurangan signifikan dalam level ROS, bahkan pada konsentrasi ekstrak yang lebih rendah (**Gambar 8C**). Konsentrasi 0,312% dan 0,156% ekstrak secara signifikan menurunkan level ROS, yang merupakan penanda utama kerusakan sel oksidatif (**Gambar 8**).





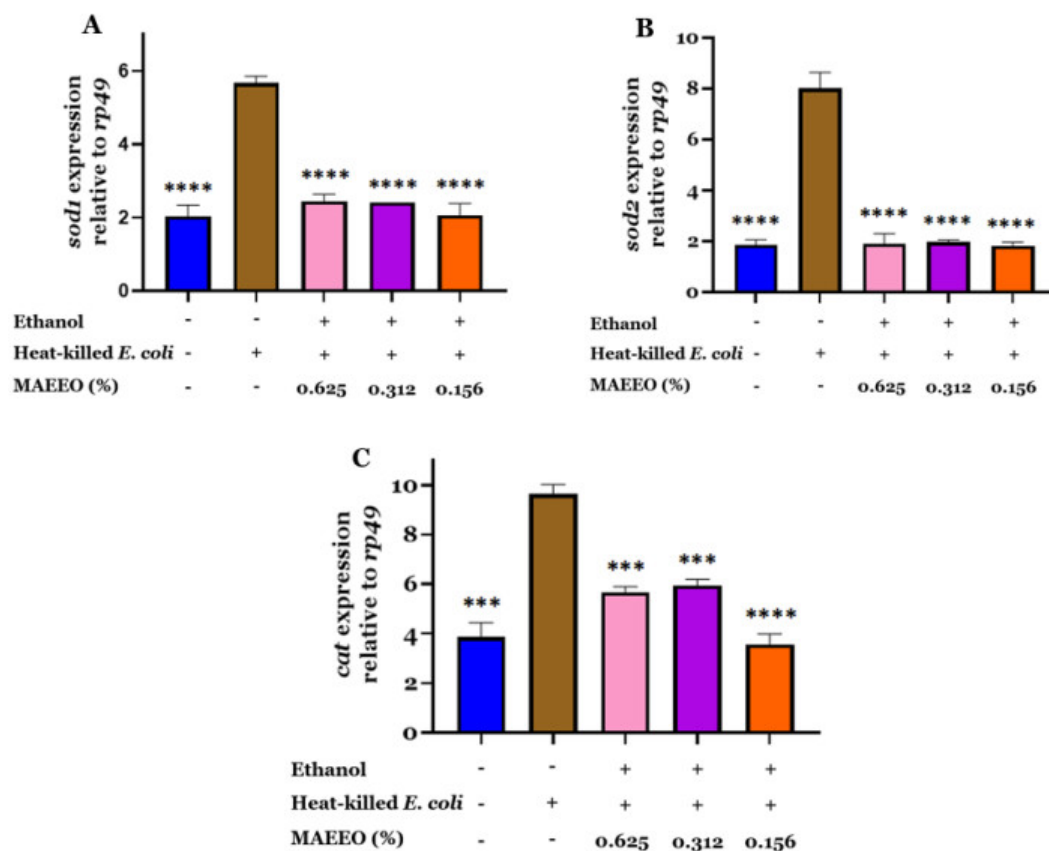
**Gambar 8.** Efek *pro-survival* dari ekstrak MAEEO dari *Glochidion philippicum* terhadap *lifespan Drosophila melanogaster PGRP-LB<sup>A</sup>* yang diberi perlakuan dengan *heat-killed E. coli*. Kelangsungan hidup larva *D. melanogaster PGRP-LB<sup>A</sup>* menurun setelah perlakuan dengan *heat-killed E. coli* (A). Kelangsungan hidup larva *D. melanogaster PGRP-LB<sup>A</sup>* yang diberi perlakuan dengan ekstrak MAEEO pada semua konsentrasi lebih lama setelah terpapar *heat-killed E. coli* (B). Perlakuan larva *PGRP-LB<sup>A</sup>* dengan *heat-killed E. coli* meningkatkan level spesies oksigen reaktif (ROS), sementara suplementasi dengan ekstrak MAEEO pada konsentrasi 0,312% dan 0,156% secara signifikan mengurangi level ROS (C). Level ROS diukur menggunakan uji reduksi nitroblue tetrazolium (NBT) yang dikombinasikan dengan analisis spektrofotometri. Data yang diperoleh dari setiap kelompok dibandingkan dengan kelompok kontrol *heat-killed E. coli*. NS: tidak signifikan; \*\*\*signifikan pada  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* signifikan pada  $p < 0,0001$ .

### 2.3.2 Efek Ekstrak *Glochidion philippicum* Terhadap Ekspresi Gen Terkait Antioksidan Pada *Drosophila* Model Autoinflamasi

Pemberian ekstrak MAEEO menghasilkan penurunan signifikan tingkat ROS. Selain itu, analisis ekspresi gen antioksidan endogen, *sod1*, *sod2*, dan *cat*, menunjukkan perubahan yang signifikan tingkat ekspresi gen-gen tersebut setelah perlakuan MAEEO pada



model autoinflamasi *Drosophila* (**Gambar 9**). Temuan ini mengindikasikan bahwa penurunan tingkat ROS yang diinduksi oleh ekstrak tersebut dapat disebabkan oleh aktivitas antioksidannya, yang mungkin berasal dari potensi antioksidan inheren ekstrak tersebut atau dari modulasi jalur genetik yang terlibat dalam sistem antioksidan endogen.



**Gambar 9.** Ekspresi gen antioksidan endogen *sod1* (A), *sod2* (B), dan *cat* (C) pada larva mutan *PGRP-LB<sup>Δ</sup>* yang diobati dengan ekstrak hasil ekstraksi menggunakan microwave dengan etanol (MAEEO). Larva *PGRP-LB<sup>Δ</sup>* diberikan perlakuan awal dengan *heat-killed E. coli* sebelum menerima ekstrak MAEEO dan dianalisis secara molekuler menggunakan RT-qPCR. Data dari setiap kelompok dibandingkan dengan kelompok kontrol *heat-killed E. coli*. NS: tidak signifikan; \*\*\*signifikan pada  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* signifikan pada  $p < 0,0001$ .



## mpulan

rkan penelitian yang telah dilakukan, studi in vivo menunjukkan ekstrak MAE yang diekstraksi dengan etanol (MAEEO) memiliki

efek antioksidan dengan menurunkan level ROS dan meningkatkan kelangsungan hidup pada larva mutan *PGRP-LB<sup>A</sup>* yang mengalami autoinflamasi dan terpapar *heat-killed E. coli*. Analisis *Real-time quantitative PCR* menunjukkan bahwa efek antioksidan bergantung pada aktivasi gen antioksidan endogen (*sod1*, *sod2*, dan *cat*).

## 2.5 Daftar Pustaka

- Andrés, C. M. C., Pérez De La Lastra, J. M., Juan, C. A., Plou, F. J. & Pérez-Lebeña, E. 2023. Polyphenols As Antioxidant/Pro-Oxidant Compounds And Donors Of Reducing Species: Relationship With Human Antioxidant Metabolism. *Processes*, 11.
- Badwan, S., Bailey, E. & Harper, J. M. 2023. Do Antioxidants Extend Longevity In Invertebrate And Vertebrate Animals? *Obm Geriatrics*, 07, 1-17.
- Bâldea, I. 2024. Antioxidant Activity Via Free Radical Scavenging Of Pitavastatin And Its Hydroxylated Derivatives: A Quantum Chemical Attempt Aiming To Assist Drug Development. *Advanced Theory And Simulations*, 7.
- Barthwal, R. & Mahar, R. 2024. Exploring The Significance, Extraction, And Characterization Of Plant-Derived Secondary Metabolites In Complex Mixtures. *Metabolites*, 14.
- Batsukh, Z., Toume, K., Javzan, B., Kazuma, K., Cai, S. Q., Hayashi, S., Kawahara, N., Maruyama, T. & Komatsu, K. 2020. Metabolomic Profiling Of Saposchnikovia Radix From Mongolia By Lc–It–Tof–Ms/Ms And Multivariate Statistical Analysis. *Journal Of Natural Medicines*, 74, 170-188.
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G. & Mahomoodally, M. F. 2020. The Versatility Of Antioxidant Assays In Food Science And Safety-Chemistry, Applications, Strengths, And Limitations. *Antioxidants (Basel)*, 9.



urt, M. L. F., Ribeiro, P. R., Franco, R. L. P., Hilhorst, H. W. M., De astro, R. D. & Fernandez, L. G. 2015. Metabolite Profiling, Antioxidant And Antibacterial Activities Of Brazilian Propolis: Use Of Correlation And Multivariate Analyses To Identify Potential

Bioactive Compounds. *Food Research International*, 76, 449-457.

Cane, H. P. C. A., Musman, M., Yahya, M., Saidi, N., Darusman, D., Nanda, M., Rizki, D. R. & Puspita, K. 2023. Phytochemical Screening And Antibacterial Activity Of Ethnomedicinal Plants From Gayo Lues Highland, Indonesia. *Journal Of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 11, 117-128.

Carocho, M., Ferreira, I. C. F. R., Morales, P. & Soković, M. 2019. Antioxidants And Prooxidants: Effects On Health And Aging 2018. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2019.

Charlton, N. C., Mastugin, M., Torok, B. & Torok, M. 2023. Structural Features Of Small Molecule Antioxidants And Strategic Modifications To Improve Potential Bioactivity. *Molecules*, 28.

Chen, Z., Swislocka, R., Choinska, R., Marszalek, K., Dabrowska, A., Lewandowski, W. & Lewandowska, H. 2024. Exploring The Correlation Between The Molecular Structure And Biological Activities Of Metal-Phenolic Compound Complexes: Research And Description Of The Role Of Metal Ions In Improving The Antioxidant Activities Of Phenolic Compounds. *Int J Mol Sci*, 25.

Dinas Kesehatan, P. 2016. Tumbuhan Obat Tradisional Papua Berdasarkan Kearifan Lokal Masyarakat, Provinsi Papua, Nulis Buku Jendela Dunia.

Eom, T., Kim, E. & Kim, J. S. 2020. In Vitro Antioxidant, Antiinflammation, And Anticancer Activities And Anthraquinone Content From Rumex Crispus Root Extract And Fractions. *Antioxidants*, 9, 1-13.

Giordani, S., Kassouf, N., Zappi, A., Zattoni, A., Roda, B., Melucci, D. & Marassi, V. 2024. Rapid And Green Discrimination Of Bovine Milk According To Fat Content, Thermal Treatment, Brand And Manufacturer Via Colloidal Fingerprinting. *Food Chem*, 440, 138206.

Giorgio, M. & Rigobello, M. P. 2024. The Role Of Antioxidant Foods And Nutraceuticals In Ageing. *Antioxidants (Basel)*, 13.

Gori, A., Boucherle, B., Rey, A., Rome, M., Fuzzati, N. & Peuchmaur, M. 2021. Development Of An Innovative Maceration Technique To Optimize Extraction And Phase Partition Of Natural Products. *Fitoterapia*, 148.



Putri, W., Djabir, Y. Y., Fatiah, D., Pratama, M. R., Putri, T. Z. A. D.,

Chaeratunnisa, R., Latada, N. P., Mudjahid, M., Asri, R. M. & Nainu, F. 2024. Evaluating The Impact Of Vitamin D3 On Nf-Kb And Jak/Stat Signaling Pathways In *Drosophila Melanogaster*. *Acs Omega*, 9, 20135-20141.

Hastuti, E. D., Izzati, M. & Darmanti, S. R. I. 2023. Usability Of Planted Mangroves In The Coastal Area Of Semarang, Indonesia, As The Source Of Secondary Metabolite Extracts. *Biodiversitas Journal Of Biological Diversity*, 24.

Ikhsan, A. N., Rohman, A., Putri, A. R., Syifa, F., Mustafidah, M. & Martien, R. 2021. Application Of Ftir Spectroscopy And Chemometrics For The Prediction Of Radical Scavenging Activities Of Fish Oils. *Indonesian Journal Of Pharmacy*, 32, 166-174.

Khairuddin, Utami, Y. P. & Ardi, M. A. Y. 2023. Antimalarial Activity Of Ethanol Extract Of Sampare Leaves (*Glochidion* Sp. Var. Biak) Against *Plasmodium Falciparum* In Vitro. *Indonesian Journal Of Pharmaceutical Science And Technology*, 10, 10-18.

Kumar, A., Nirmal, P., Kumar, M., Jose, A., Tomer, V., Oz, E., Proestos, C., Zeng, M., Elobeid, T., Sneha, V. & Oz, F. 2023. Major Phytochemicals: Recent Advances In Health Benefits And Extraction Method. *Molecules*, 28, 1-41.

Linh, N. N., Hop, N. Q., Nhung, P. T. T., Dao, P. T. B., Manh, V. Q., Pham, T. V. & Son, N. T. 2024. Glochidion Species: A Review On Phytochemistry And Pharmacology. *Natural Product Communications*, 19.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. & Chandra, N. 2018. Phytochemical Screening, Total Flavonoid And Total Phenolic Content And Antioxidant Activity Of Different Parts Of *Caesalpinia Bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacognosy Reviews*, 4, 118-126.

Loganayaki, N., Siddhuraju, P. & Manian, S. 2013. Antioxidant Activity And Free Radical Scavenging Capacity Of Phenolic Extracts From *Helicteres Isora* L. And *Ceiba Pentandra* L. *Journal Of Food Science And Technology*, 50, 687-695.

Macakova, K., Afonso, R., Saso, L. & Mladenka, P. 2019. The Influence Of Alkaloids On Oxidative Stress And Related Signaling Pathways. *Free Radic Biol Med*, 134, 429-444.



icci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P. D'alessandro, A. G. 2022. Free Radical Properties, Source And

Targets, Antioxidant Consumption And Health. *Oxygen*, 2, 48-78.

Maslahat, M., Mardinata, D., Surur, S. M., Lioe, H. N., Syafitri, U. D., Rafi, M. & Rohaeti, E. Untargeted Metabolomics Analysis Using Ftir And Lc-Hrms For Differentiating *Sonchus Arvensis* Plant Parts And Evaluating Their Biological Activity. *Chemistry & Biodiversity*, N/A, E202401537.

Miracle Uwa, L. 2017. The Anti-Aging Efficacy Of Antioxidants. *Current Trends In Biomedical Engineering & Biosciences*, 7, 66-68.

Nainu, F., Bahar, M. A., Sartini, S., Rosa, R. A., Rahmah, N., Kamri, R. A., Rumata, N. R., Yulianty, R. & Wahyudin, E. 2022. Proof-Of-Concept Preclinical Use Of *Drosophila Melanogaster* In The Initial Screening Of Immunomodulators. *Scientia Pharmaceutica*, 90.

Nguyen, N., Nguyen, M., Nguyen, V., Le, V., Trieu, L., Le, X., Khang, T., Giang, N., Thach, N. & Hung, T. 2020. The Effects Of Different Extraction Conditions On The Polyphenol, Flavonoids Components And Antioxidant Activity Of *Polyscias Fruticosa* Roots. *Iop Conference Series: Materials Science And Engineering*, 736.

Palaiogiannis, D., Chatzimitakos, T., Athanasiadis, V., Bozinou, E., Makris, D. P. & Lalas, S. I. 2023. Successive Solvent Extraction Of Polyphenols And Flavonoids From *Cistus Creticus* L. Leaves. *Oxygen*, 3, 274-286.

Panchal, K. & Tiwari, A. K. 2017. *Drosophila Melanogaster* "A Potential Model Organism" For Identification Of Pharmacological Properties Of Plants/Plant-Derived Components. *Biomedicine And Pharmacotherapy*, 89, 1331-1345.

Park, S. H., Lee, D. H., Lee, D. H. & Jung, C. H. 2024. Scientific Evidence Of Foods That Improve The Lifespan And Healthspan Of Different Organisms. *Nutr Res Rev*, 37, 169-178.

Peng, C., Wang, X., Chen, J., Jiao, R., Wang, L., Li, Y. M., Zuo, Y., Liu, Y., Lei, L., Ma, K. Y., Huang, Y. & Chen, Z. Y. 2014. Biology Of Ageing And Role Of Dietary Antioxidants. *Biomed Research International*, 2014.

D. K., Mun'im, A., Sundowo, A. & Sahlan, M. 2018. Phytochemical Profile And Antioxidant Activity Of Propolis Ethanolic Extract From Tetragonula Bee. *Pharmacognosy Journal*, 10, 128-135.



- Rafi, M., Hayati, F., Umar, A. H., Septaningsih, D. A. & Rachmatiah, T. 2023. Lc-Hrms-Based Metabolomics To Evaluate The Phytochemical Profile And Antioxidant Capacity Of *Cosmos Caudatus* With Different Extraction Methods And Solvents. *Arabian Journal Of Chemistry*, 16.
- Rohaeti, E., Karunina, F. & Rafi, M. 2021. Ftir-Based Fingerprinting And Chemometrics For Rapid Investigation Of Antioxidant Activity From *Syzygium Polyanthum* Extracts. *Indonesian Journal Of Chemistry*, 21, 128-136.
- Royet, J., Gupta, D. & Dziarski, R. 2011. Peptidoglycan Recognition Proteins: Modulators Of The Microbiome And Inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 11, 837-851.
- Sandhya, S., Chaintanya, R. S. N. A. K. K., R., V. K., K. N. V, R., David, B., Sudhakar, K. & Swetha, R. 2010. An Updated Review On The Genus *Glochidion* Plant. *Archives Of Applied Science Research*, 2, 309-322.
- Sanpinit, S., Wetchakul, P., Chonsut, P., Prommee, N., Punsawad, C., Han, J. & Net-Anong, S. 2023. Evaluation Of Chemical Compositions And The Antioxidant And Cytotoxic Properties Of The Aqueous Extract Of Tri-Yannarose Recipe (*Areca Catechu*, *Azadirachta Indica*, And *Tinospora Crispa*). *Antioxidants*, 12.
- Segers, K., Declerck, S., Mangelings, D., Heyden, Y. V. & Eeckhaut, A. V. 2019. Analytical Techniques For Metabolomic Studies: A Review. *Bioanalysis*, 11, 2297-2318.
- Sies, H. 2017. Hydrogen Peroxide As A Central Redox Signaling Molecule In Physiological Oxidative Stress: Oxidative Eustress. *Redox Biology*, 11, 613-619.
- Silva, A. M., Pinto, D., Fernandes, I., Freitas, V., Cadiz-Gurrea, M. L., Costa, P., Delerue-Matos, C. & Rodrigues, F. 2021. An Insight Into Kiwiberry Leaf Valorization: Phenolic Composition, Bioactivity And Health Benefits. *Molecules*, 26.
- Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., Emwas, A. H. & Jaremko, M. 2020. Important Flavonoids And Their Role As A Therapeutic Agent. *Molecules*, 25.
- Zuniga, M., Zuniga, M. & Rodriguez, A. 2021. Oxidative Stress And Pathogenesis In Malaria. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 768182.



- Vidal-Gutiérrez, M., Robles-Zepeda, R. E., Vilegas, W., Gonzalez-Aguilar, G. A., Torres-Moreno, H. & López-Romero, J. C. 2020. Phenolic Composition And Antioxidant Activity Of *Bursera Microphylla* A. Gray. *Industrial Crops And Products*, 152, 112412-112412.
- Vuolo, M. M., Lima, V. S. & Maróstica Junior, M. R. 2019. *Phenolic Compounds*, Elsevier Inc.
- Xia, J. & Wishart, D. S. 2016. Using Metaboanalyst 3.0 For Comprehensive Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols In Bioinformatics*, 2016, 14.10.1-14.10.91.
- Yao, G., Song, Z. Q., Xue, B. E., Shi, S., Li, Y. L. & Luo, S. X. 2020. Taxonomic Revision Of The Genus *Glochidion* (Phyllanthaceae) In Taiwan, China. *Phytokeys*, 159, 137-159.
- Yiğit, Ü. & Turabi Yolaçaner, E. 2024. Enhanced Extraction Of Phenolic Compounds From Red Cabbage Utilizing Microwave-Assisted Method: A Box-Behnken Approach For Optimization. *Food Materials Research*, 4, 0-0.

