



## Uji Aktivitas Krim *Anti-Aging* Ekstrak Etanol Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor* L.) pada Kulit Punggung Kelinci *New Zealand* yang dipapar Sinar UV-A

Testing The Activity of The Anti-Aging Cream of Red Spinach Leaf Ethanol Extract (*Amaranthus tricolor* L.) on The Skin of The Back of The New Zealand Rabbit Exposed to UV-A Rays

Ananda Rezky Putri<sup>1\*</sup>, Suhartinah<sup>2</sup>, Meta Kartika Untari<sup>3\*</sup>

<sup>1,2,3</sup>Jurusan S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Kota Surakarta, Indonesia.

\*E-mail: [meta.kartika@yahoo.com](mailto:meta.kartika@yahoo.com)

Received: 17 Desember 2022  
in revised form: 18 Januari  
2023

Accepted: 30 Januari 2023  
Available Online: 1 Februari  
2023

### Keywords:

Red spinach leaf extract;  
Anti-aging activity;  
Cream;  
Skin analyzer

### Corresponding Author:

Meta Kartika Untari  
Jurusan S1 Farmasi  
Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi  
Kota Surakarta, Indonesia.  
E-mail: [meta.kartika@yahoo.com](mailto:meta.kartika@yahoo.com)

### ABSTRACT

The strongest cause of premature aging is sunlight (photoaging), especially UV A rays. Anti-aging creams containing antioxidant compounds can be used in the treatment of aging on the skin of the face. Red spinach leaves (*Amaranthus tricolor* L.) are a natural source of antioxidants that have very strong potential as an anti-aging. Objectives: This study aims to determine the activity of red spinach leaf extract cream as an anti-aging using New Zealand rabbits exposed to UV-A rays. The skin of the rabbit's back is smeared with cream F1, F2, F3, F4, F5 for 30 days. Parameter observation using a skin analyzer is carried out before, after induction, and after cream smearing. Parameters include percent collagen, elasticity, and moisture. The results of the study were analyzed statistically using one way anova. All test creams pass the physical quality test requirements, but the creams that pass the stability test are F1, F2, F4. The primary irritation test F1, F2, F4 is not irritating whereas F3 is very little irritating. Test the ocular irritation of all creams is not irritating. The test results of anti-aging activity show that F2 provides the most effective anti-aging effect because the percent increase in parameters is the greatest.



This open access article is distributed under a Creative Commons Attribution (CC-BY-NC-SA) 4.0 International license.

### How to cite (APA 6<sup>th</sup> Style):

Putri, AR., Suhartinah., Untari, Mk. (2023). Uji Aktivitas Krim *Anti-Aging* Ekstrak Etanol Daun Bayam Merah (*Amaranthus tricolor* L.) pada Kulit Punggung Kelinci *New Zealand* yang dipapar Sinar UV-A. *Indonesian Journal of Pharmaceutical (e-Journal)*, 3(1), 1-15.

## ABSTRAK

Penyebab terkuat penuaan dini adalah sinar matahari (*photoaging*) terutama sinar UV A. Krim anti-aging yang mengandung senyawa antioksidan dapat digunakan dalam perawatan penuaan pada kulit wajah. Daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.) merupakan sumber antioksidan alami yang memiliki potensial sangat kuat sebagai anti-aging. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas krim ekstrak daun bayam merah sebagai anti-aging menggunakan kelinci *New Zealand* yang dipapar sinar UV-A. Ekstrak daun bayam merah diformulasikan menjadi sediaan krim kemudian diuji mutu fisik. Aktivitas anti-aging diuji pada kelinci sebanyak 5 ekor. Punggung kelinci dibebaskan dari bulu, dan diinduksi sinar UV-A. Kulit punggung kelinci diolesi krim F1, F2, F3, F4, F5 selama 30 hari. Pengamatan parameter menggunakan skin analyzer dilakukan sebelum, sesudah induksi, dan setelah pengolesan krim. Parameter meliputi persen kolagen, elastisitas, dan kelembaban. Hasil penelitian dianalisis statistik menggunakan *one way anova*. Semua krim uji lolos syarat uji mutu fisik, namun krim yang lolos uji stabilitas adalah F1, F2, F4. Uji iritasi primer F1, F2, F4 tidak mengiritasi sedangkan F3 sangat sedikit mengiritasi. Uji iritasi okuler semua krim tidak mengiritasi. Hasil pengujian aktivitas anti-aging menunjukkan bahwa F2 memberikan efek anti-aging paling efektif karena peningkatan persen parameter paling besar.

**Kata Kunci:** Ekstrak daun bayam merah; Aktivitas anti-aging; Krim; *Skin analyzer*.

## 1. Pendahuluan

Penuaan adalah proses kompleks yang ditandai dengan penurunan progresif dalam fungsi fisiologi, diikuti oleh disfungsi, dan akhirnya kematian [1]. Penuaan dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti genetik (intrinsik) dan penuaan akibat pengaruh lingkungan (ekstrinsik). Faktor ekstrinsik yang terkuat adalah sinar matahari (*photoaging*) terutama sinar UV-A. Sinar UV-A dapat memicu timbulnya kerutan 10 kali lebih kuat dari UV-B [2].

Sinar UV-A mampu menembus jauh ke dalam dermis menyebabkan peningkatan senyawa ROS (Reactive Oxygen Species). Senyawa ini dapat merusak kolagen dan elastin yang dapat menyebabkan kulit mengendur sehingga keriput muncul lebih dini [3]. Kulit manusia yang sehat memiliki sistem perlindungan alami terhadap paparan sinar ultraviolet dengan pengeluaran keringat, pembentukan melanin pada epidermis, dan penebalan stratum korneum. Kelemahan dari perlindungan tersebut adalah tidak dapat bekerja dengan maksimal jika terpapar sinar ultraviolet secara terus-menerus.

Kosmetik yang dapat digunakan dalam perawatan penuaan pada kulit wajah adalah krim anti-aging yang mengandung senyawa antioksidan. Antioksidan digunakan sebagai anti penuaan karena keterlibatan senyawa radikal bebas dalam proses penuaan kulit. Antioksidan mampu melawan radikal bebas dengan menyumbangkan elektron pada molekul radikal sehingga dapat menjadi molekul yang lebih stabil dan menghentikan reaksi berantai [4].

Salah satu tanaman yang mengandung antioksidan alami dan berpotensi kuat untuk mencegah penuaan yaitu daun bayam merah. Daun bayam merah mengandung alkaloid, tanin dan flavonoid berupa antosianin. Hasil penelitian Syaifuddin (2015) membuktikan bahwa ekstrak etanol daun bayam merah pada konsentrasi 1% mempunyai potensial antioksidan sangat kuat karena menghasilkan nilai IC50 sebesar 4.32 ppm [5]. Senyawa yang dapat dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila nilai IC50  $\leq$  50 ppm dan jika semakin kecil nilainya maka semakin besar aktivitas antioksidan [6].

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti berminat memformulasikan ekstrak daun bayam merah dalam sediaan krim yang kemudian diujikan ke hewan uji kelinci, dimana pada penelitian sebelumnya hanya meneliti mengenai kadar antioksidannya saja. Tujuan penelitian juga untuk mengetahui apakah krim tidak mengiritasi dan dapat memberikan efek anti-aging pada kulit punggung kelinci dengan parameter persen kolagen, kelembaban, dan elastisitas yang diukur menggunakan Skin Analyzer.

## **2. Metode**

Metode penelitian dilakukan secara eksperimental di laboratorium Universitas Setia Budi selama kurang lebih 65 hari. Penelitian eksperimental dilakukan dengan memberikan perlakuan terhadap kelompok eksperimen dengan kondisi-kondisi yang dapat dikontrol.

### **Bahan**

Daun bayam merah (*Amaranthus tricolor* L.), etanol 96%, propilen glikol, dinatrium edetat, TEA, vaselin, setil alkohol, asam stearat, gliseril monostearat, nipagin, nipasol, serbuk magnesium, asam asetat, amil alkohol, asam klorida 2%, pereaksi dragendorff, pereaksi mayer, besi (III) klorida, dan garam krimatin, dan hewan uji kelinci New Zealand.

### **Determinasi bayam merah**

Determinasi tanaman dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

### **Pembuatan serbuk daun bayam merah**

Simplisia daun bayam merah diperoleh dari petani di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Simplisia daun bayam merah sebanyak 5 kg dibersihkan dari kotoran yang melekat dengan air mengalir. Simplisia dikeringkan dibawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam. Simplisia daun bayam merah yang sudah kering kemudian diserbuk dengan mesin penggiling berupa blender. Serbuk kemudian diayak dengan ayakan mesh no.40 sampai serbuk terayak habis. Hasil serbuk disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat.

### **Penetapan susut pengeringan serbuk daun bayam merah**

Penetapan dilakukan dengan cara menimbang 2 gram serbuk daun bayam merah, kemudian dimasukkan ke alat *moisture balance* pada suhu 105°C selama 5 menit, replikasi 3 kali hingga menghasilkan bobot yang konstan. Nilai kadar susut pengeringan dinyatakan dalam satuan persen[7].

### **Pembuatan ekstrak daun bayam merah**

Maserasi serbuk daun bayam merah sebanyak 300 gram dengan cara direndam dengan 3000 ml penyari etanol 96% dalam botol kaca gelap selama 1 hari. Pada 6 jam pertama dilakukan pengadukan sesekali dan kemudian didiamkan selama 18 jam. Setelah 24 jam, hasil maserasi disaring dengan kain flannel steril dan diperas ampasnya hingga diperoleh filtrat. Residu dimaserasi dengan cara yang sama menggunakan etanol 96% sebanyak 1500 ml. Semua filtrat kemudian dilakukan pemekatan dengan *rotary*

evaporator sampai didapat ekstrak kental. Dihitung rendemen dari persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan [7].

### Penetapan organoleptis

Penetapan organoleptis ekstrak daun bayam merah dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, dan bau dari ekstrak daun bayam merah.

### Penetapan susut pengeringan ekstrak

Penetapan susut pengeringan ekstrak daun bayam merah dilakukan dengan menimbang 2 gram ekstrak daun bayam merah, kemudian dimasukkan ke alat *Moisture balance* pada suhu 105°C selama 30 menit, direplikasi sebanyak 3 kali ditandai dengan hasil bobot yang konstan. Nilai susut pengeringan dinyatakan dalam persen [7].

### Identifikasi kandungan kimia ekstrak

#### Identifikasi flavonoid

Sampel dilarutkan dengan air panas sebanyak 100 ml, kemudian dididihkan selama 30 menit. Filtrat dipipet sebanyak 5 ml dan ditambahkan serbuk Mg, 2 ml alkohol:asam asetat (1:1) dan reagen amil alkohol, semua campuran dikocok kuat-kuat. Reaksi positif jika terjadi warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alkohol [8].

#### Identifikasi alkaloid

Sebanyak 2 ml ekstrak diuapkan diatas cawan penguap. Residu dilarutkan dengan 5 ml HCl 2N. Larutan yang diperoleh dibagi menjadi ke dalam 4 tabung reaksi. Tabung pertama ditambah 3 tetes HCl 2N, tabung lainnya ditambah 3 tetes pereaksi dragendroff, 3 tetes pereaksi mayer, dan 3 tetes pereaksi wagner. Hasil positif jika larutan menjadi bewarna oranye pada tabung kedua, terdapat endapan putih pada tabung ketiga, dan warna merah bata pada tabung keempat [8].

#### Identifikasi tanin

Sebanyak 3 ml larutan ekstrak uji dibagi menjadi 3 bagian yaitu tabung A, B, dan C. Tabung A sebagai blanko, tabung B ditambahkan 10% FeCl<sub>3</sub>, tabung C ditambahkan gelatin. Hasil positif tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kehijauan atau biru tua pada tabung B dan terbentuk endapan putih kekuningan pada tabung C [8].

**Tabel 1.** Rancangan formula krim *anti-aging* ekstrak daun bayam merah

Bahan	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)
Ekstrak *	0,5	1,0	2,0	-
Propilen glikol	7,0	7,0	7,0	7,0
Dinatrium Edetat	0,005	0,005	0,005	0,005
TEA	1,0	1,0	1,0	1,0
Vaselin	5,0	5,0	5,0	5,0
Setil alkohol	3,0	3,0	3,0	3,0
Asam stearate	3,0	3,0	3,0	3,0
Gliseril monostearat	0,1	0,1	0,1	0,1
Nipagin	0,1	0,1	0,1	0,1
Nipasol	0,1	0,1	0,1	0,1
Aquadest ad	100 g	100 g	100 g	100g

### **Pembuatan sediaan krim**

Menimbang masing-masing bahan kemudian dikelompokkan menjadi dua berdasarkan fasenya. Fase minyak meliputi vaselin, setil alkohol, asam stearat, dan gliseril monostearat. Fase air yang terdiri dari aquadest, propilen glikol, dinatrium edetat, trietanol amin (TEA). Fase minyak dileburkan pada suhu  $\leq 70^{\circ}\text{C}$  di atas *waterbath*, setelah leleh ditambahkan nipasol. Nipagin dilarutkan dalam aqua panas kemudian dimasukkan dalam fase air. Fase air diaduk dalam beaker glass hingga tercampur dan dimasukkan kedalam mortir panas  $70-75^{\circ}\text{C}$ . Fase minyak dimasukkan perlahan, kemudian diaduk hingga basis krim terbentuk. Penambahan sedikit demi sedikit ekstrak etanol bayam merah.

### **Pengujian sifat fisik krim.**

#### **Uji organoleptis**

Pengamatan bentuk, warna dan bau yang dilihat secara visual. Kualifikasi krim yang harus dipenuhi adalah konsistensi lembut, warna sediaan homogen, dan baunya tidak tengik [9]

#### **Uji homogenitas**

Pengujian dilakukan dengan cara krim dioleskan dalam jumlah tertentu pada sekeping kaca yang sesuai, sediaan harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak ada butiran kasar [10].

#### **Uji viskositas**

Uji viskositas krim dilakukan dengan alat viskometer brookfield. Prinsip dari viskometer Brookfield adalah mengukur torsi yang diperlukan oleh spindel yang direndam dalam fluida untuk memutar. Standar uji viskositas krim menurut SNI 16-4339-1996 adalah memenuhi kisaran 2000-50.000 cP [11].

#### **Uji pH krim**

Pengujian dilakukan dengan mencelupkan pH meter kedalam sediaan krim ekstrak daun bayam merah. Krim ditambahkan aquadest dan dilarutkan dengan perbandingan 1:9. Standar uji pH menurut SNI 16-4399-1996 yaitu berkisar pH 4,5-6,5 [11].

#### **Uji daya lekat krim**

Krim sebanyak 0,25 g diletakkan pada krimas objek dan ditekan selama 5 menit dengan pemberat seberat 1 kg. Krimas objek diletakkan pada alat tes dan pemberat 80 g dipasang pada alat tes. Waktu krim terlepas dari krimas obyek dihitung menggunakan stopwatch. Pengujian ini direplikasi sebanyak 3 kali untuk tiap formula [12]. Menurut SNI 1996, daya lekat yang baik adalah lebih dari 1 detik [11].

#### **Uji daya sebar krim**

Krim sebanyak 0,5 g diletakkan di tengah kaca bulat, dan ditimpa dengan kaca lain yang telah ditimbang beratnya. Krim didiamkan tanpa beban selama 1 menit kemudian diameter sebar krim diukur. Pemberat 50 g diletakkan di atas kaca dan didiamkan 1 menit lalu diukur diameter sebar kembali. Setiap 1 menit diberi pemberat seberat 50 g hingga total keseluruhan pemberat 150 g sehingga diperoleh rata-rata

diameter yang cukup untuk menentukan pengaruh beban terhadap perubahan diameter sebar krim [12]. Standar uji daya sebar menurut SNI 1996 adalah dalam batas interval 5-7 cm [11].

### Uji daya proteksi

Kertas saring pertama (10×30 cm) dibasahi dengan larutan fenofalein untuk indikator kemudian dikeringkan dan diolesi dengan sediaan krim satu lapis. Kertas saring kedua dibuat suatu areal (2,5 ×2,5 cm) dengan paraffin solid yang dilelehkan. Kertas tersebut ditempelkan pada kertas saring pertama kemudian diteteskan KOH 0,1 N. Terbentuknya warna merah pada kertas tersebut diamati dari sebalik kertas pada waktu 15; 30; 45; 60 detik; 3 dan 6 menit.

### Uji tipe krim

Sejumlah sediaan diberi 1 tetes metilen blue dan sudan III. Diamati hasilnya jika tersebar homogen dengan metilen blue maka tipe sediaan krim adalah tipe minyak dalam air, dan sebaliknya. Pengujian daya hantar listrik apabila sediaan dapat menghantarkan arus listrik maka sediaan tipe minyak dalam air, dan sebaliknya. Pengujian pengenceran dengan melarutkan sediaan dengan aquadest dan minyak. Apabila krim terlarut homogen dalam aquades maka krim merupakan tipe minyak dalam air, dan sebaliknya [13].

### Uji stabilitas krim

Metode Cycling Test dilakukan sebanyak 6 siklus. Satu siklus dari uji stabilitas sediaan krim yang dimaksud adalah penyimpanan pada suhu 4°C selama 24 jam lalu dikeluarkan dan dibiarkan pada suhu ±40°C selama 24 jam. Kondisi fisik krim dibandingkan selama pengamatan dengan sediaan sebelumnya [14]. Parameter yang diamati meliputi organoleptis, pH, dan viskositas dari hari ke-0 dan hari ke-12.

### Pengujian keamanan krim

Uji iritasi krim menggunakan metode Draize dilakukan terhadap 3 ekor kelinci. Kriteria kelinci untuk uji keamanan adalah kelinci albino dewasa dan dalam kondisi sehat dengan berat badan ±1,5-2 kg. Kelinci dicukur bulu punggungnya, kemudian dibagi menjadi 5 bagian sebesar 6,5 cm. Sediaan sebanyak 0,5 g dioleskan pada bagian punggung kelinci yang telah ditentukan, lalu dibiarkan selama 24 jam dalam kondisi ditutup dengan kassa steril dan perban. Setelah 24 jam, perban dibuka dan dibiarkan selama 1 jam lalu diamati. Setelah diamati, bagian tersebut ditutup kembali dengan plester yang sama, dan dilakukan pengamatan kembali setelah 48 jam dan 72 jam. Untuk setiap keadaan kulit diberi nilai sesuai metode skoring dari Draize.

### Pengujian aktivitas anti-aging krim

Kelinci sebanyak 5 ekor diadaptasi selama satu minggu dalam kandang. Bulu punggung tiap kelinci kemudian dicukur dengan hati-hati. Kulit punggung kelinci selanjutnya dibagi menjadi 5 bagian, masing-masing bagian berbentuk lingkaran dengan diameter 2 cm. Kemudian tiap kelinci diberi 5 perlakuan sebagai berikut:

- Punggung kelinci bagian I : dioleskan krim ekstrak daun bayam merah 0,5%
- Punggung kelinci bagian II : dioleskan krim ekstrak daun bayam merah 1%
- Punggung kelinci bagian III : dioleskan krim ekstrak daun bayam merah 2%
- Punggung kelinci bagian IV : dioleskan kontrol negatif (basis krim)

Punggung kelinci bagian V : dioleskan kontrol positif (krim Himalaya Herbal)

Sebelumnya bulu punggung kelinci telah dicukur dan diukur persen kolagen, kelembaban, dan elastisitas. Selanjutnya kulit punggung kelinci diinduksi sinar UV-A. Induksi dengan cara penyinaran menggunakan *Exoterra® Daylight Basking Spot* yang mengandung sinar UV-A pada jarak 30 cm dengan dosis 63,69 J.cm<sup>-2</sup>/jam selama 6 jam [15]. Hewan uji kelinci yang telah diinduksi *photoaging* dan diamati parameter *anti-aging*, selanjutnya diolesi krim sesuai perlakuan tiap kelompok sebanyak 1 kali sehari dalam 30 hari [16]. Krim dioleskan sebanyak 0,5 gram pada setiap perlakuan. Parameter *anti-aging* meliputi persen kolagen, kelembaban, dan elastisitas yang diamati sebelum diinduksi sinar UV A, pada hari ke-0 (sesudah induksi dan sebelum dioles krim), dan pada hari ke-30 (setelah krim dioleskan).

### Analisis data

Data stabilitas krim dianalisis statistik dengan menggunakan *Test of Normality* untuk melihat data terdistribusi normal. Uji statistik *Repeated Measures Anova* untuk mengetahui perbedaan secara keseluruhan, dan perbedaan tiap formula dilihat dari tabel *pairwise comparison*. Hasil persen kolagen, elastisitas, dan kelembaban dari masing-masing hewan coba yang diperoleh sebelum, dan sesudah induksi dengan *Skin Analyzer* dianalisa menggunakan *paired T-Test*. Persen parameter yang sesudah induksi dan sesudah dioleskan krim kemudian dilakukan uji *paired T-Test, one way anova* dan *Tukey*.

### 3. Hasil dan Pembahasan

Determinasi tanaman dilakukan untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan simplisia yang akan diteliti. Hasil determinasi menunjukkan bahwa sampel benar merupakan tanaman bayam merah dengan nama spesies *Amaranthus tricolor* L. Hasil rendemen serbuk dihitung dari bobot serbuk halus terhadap bobot daun kering. Daun bayam merah segar seberat 4 kg setelah dikeringkan bobot daun kering sebanyak 755 gram, serbuk kasar sebanyak 413 gram dan serbuk halus sebesar 314 gram sehingga diperoleh rendemen serbuk daun bayam merah sebesar 41,58%.

Ekstraksi menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 2 hari. Metode maserasi memiliki keuntungan berupa mudah, sederhana, dan merupakan metode ekstraksi dingin sehingga tidak merusak zat aktif yang terkandung dalam bayam merah. Dari 300 gram serbuk bayam merah didapatkan ekstrak kental sebanyak 63 gram sehingga diperoleh rendemen ekstrak bayam merah sebesar 21%..

### Pengujian serbuk dan ekstrak daun bayam merah

Hasil uji organoleptis adalah serbuk daun bayam merah memiliki tekstur yang halus sedikit kasar, bewarna coklat dan ada sedikit warna merah. Ekstrak daun bayam merah berbentuk cairan sangat kental, mudah larut air, dan warna coklat sedikit kehijauan. Serbuk dan ekstrak memiliki bau khas yang sama, perbedaannya pada ekstrak bau lebih menyengat.

Hasil persentase rata-rata susut pengeringan serbuk daun bayam merah adalah 8,5% ± 0. Rata-rata susut pengeringan ekstrak daun bayam merah adalah 2,47% ± 0,06. Nilai susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun bayam merah telah memenuhi persyaratan karena nilai susut pengeringan yang baik adalah <10% [17]. Maka dapat diketahui bahwa proses pengeringan simplisia dengan sinar matahari dan pengentalan ekstrak simplisia daun bayam merah dengan rotary evaporator telah optimal.

**Tabel 2.** Kandungan kimia ekstrak daun bayam merah

Kandungan	Reagen	Hasil	Kesimpulan	Pustaka
Flavonoid	Serbuk Mg, 2 ml alkohol:asam asetat (1:1) dan amil alkohol	Warna merah di lapisan amil alkohol.	(+)	(DepKes, 1995)
Alkaloid	Dragendroff Mayer, Wagner.	Endapan oranye Endapan putih, Endapan coklat	(+)	(DepKes, 1995)
Tanin	10% FeCl <sub>3</sub> , Serbuk gelatin.	Hitam kehijauan Endapan putih	(+)	(DepKes, 1995)

### Hasil uji mutu fisik dan stabilitas krim

Organoleptis semua krim uji dapat dinyatakan stabil karena tidak mengalami perubahan warna, bau, dan tekstur dari hari pertama dibuat hingga sesudah di uji stabilitas (*cycling test*) selama 6 siklus atau 12 hari.

**Tabel 3.** Organoleptis krim ekstrak daun bayam merah

Formula	Sebelum uji <i>cycling test</i>			Sesudah uji <i>cycling test</i>		
	Warna	Bau	Tekstur	Warna	Bau	Tekstur
F1	Hijau muda	Vaselin	Semi padat	Hijau muda	Vaselin	Semi padat
F2	Hijau muda	Vaselin	Semi padat	Hijau muda	Vaselin	Semi padat
F3	Hijau	Vaselin	Semi padat	Hijau	Vaselin	Semi padat
F4 (-)	Putih	Vaselin	Semi padat	Putih	Vaselin	Semi padat

Hasil pengamatan terhadap homogenitas krim menunjukkan bahwa semua formula dinyatakan homogen dan stabil karena fase terdispersi terdistribusi merata pada fase pendispersi, dan tidak membentuk partikel yang memisah dari awal dibuat hingga sesudah diuji *cycling test*.



**Gambar 1.** Sediaan krim ekstrak bayam merah

Keterangan:

K (-) : krim kontrol negatif

F1 : krim dengan ekstrak daun bayam merah 0,5%

F2 : krim dengan ekstrak daun bayam merah 1%

F3 : krim dengan ekstrak daun bayam merah 2%

Dari hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi ekstrak bayam merah yang terbilang cukup kecil sehingga tidak mempengaruhi tercampur homogenya ekstrak dengan basis.

**Tabel 4.** Homogenitas krim ekstrak daun bayam merah

Formula	Sebelum uji <i>cycling test</i>	Sesudah uji <i>cycling test</i>
F1	Homogen	Homogen
F2	Homogen	Homogen
F3	Homogen	Homogen
F4	Homogen	Homogen

Nilai pH sediaan krim ekstrak bayam merah telah memenuhi standar. Standar uji pH menurut SNI yaitu berkisar pH 4,5-6,5. Pada tabel 5 juga menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak bayam merah menyebabkan pH krim semakin tidak stabil karena ekstrak dapat teroksidasi [18]. Kestabilan pH krim F1, F2, F4 mempunyai nilai *sig* >0,05 yang berarti tidak ada perbedaan yang signifikan atau dapat dikatakan stabil. Krim F3 mempunyai nilai *sig* 0,014 <0,05 menunjukkan ada perbedaan yang signifikan atau dapat dinyatakan pH tidak stabil.

**Tabel 5.** Hasil rata-rata pH krim ekstrak daun bayam merah

Formula	Sebelum uji <i>cycling test</i>	Sesudah uji <i>cycling test</i>
F1	4,72±0,03	4,65± 0,05
F2	4,85±0,02	4,78± 0,03
F3	5,01±0,01	4,80± 0,03*
F4	5,65±0,01	5,54± 0,05

Nilai viskositas krim ekstrak bayam merah dinyatakan telah memenuhi SNI 16-4339-1996 yaitu sebesar 2.000-50.000 cP [11]. Hasil pengukuran viskositas sediaan krim uji menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin tinggi viskositas krim. Krim yang kental cenderung lengket dan daya menyebarnya rendah. Viskositas dari F1, F2, dan F4 menunjukkan nilai *sig* >0,05 yang berarti tidak ada perubahan yang signifikan. Viskositas krim F1, F2, dan F4 dapat dinyatakan memenuhi standar SNI dan stabil. Viskositas dari F3 menunjukkan nilai *sig* 0,027<0,05 yang berarti terdapat perbedaan signifikan.

**Tabel 6.** Hasil rata-rata viskositas krim ekstrak daun bayam merah

Formula	Sebelum uji <i>cycling test</i> (cP)	Sesudah uji <i>cycling test</i> (cP)
F1	2.253±0,03	2.193± 0,02
F2	2.463±0,02	2.433± 0,02
F3	3.373±0,03	3.300± 0,02*
F4 (-)	2.180±0,03	2.283± 0,02

Hasil pengujian daya sebar krim ekstrak daun bayam merah telah memenuhi standar yaitu sebesar 5-7 cm [11]. Daya sebar krim dapat menentukan daya serap krim di kulit karena semakin besar daya sebar maka semakin tinggi luas permukaan kulit yang menyerap krim. Daya sebar dari F1, F2, dan F4 menunjukkan nilai *sig* >0,05 yang berarti tidak ada perubahan yang signifikan. Viskositas dari F3 menunjukkan nilai *sig* <0,05 yang berarti terdapat perbedaan signifikan.

**Tabel 7.** Hasil rata-rata daya sebar krim ekstrak daun bayam merah

Krim	Sebelum uji <i>cycling test</i> (cm)				Sesudah uji <i>cycling test</i> (cm)			
	Beban (gram)							
	0	50	100	150	0	50	100	150
F1	6,03 ±0,26	6,26 ±0,15	6,37 ±0,14	6,83 ±0,18	5,37± 0,46	5,64± 0,44	6,23± 0,38	6,78± 0,31
F2	5,53 ±0,11	5,63 ±0,09	5,86 ±0,21	6,23 ±0,11	5,03± 0,09	5,90± 0,41	6,20± 0,23	6,47± 0,23
F3	4,70 ±0,41	4,94 ±0,39	5,10 ±0,38	5,47 ±0,32	5,01± 0,14	5,25± 0,10	5,68± 0,46	6,13± 0,35
F4	6,60 ±0,22	6,94 ±0,08	7,38 ±0,16	7,63 ±0,10	5,50± 0,33	5,84± 0,27	6,23± 0,40	6,74± 0,47

Berdasarkan tabel hasil daya lekat, semua formula telah sesuai dengan standar SNI yaitu lebih dari 1 detik [11]. Krim F3 memiliki kemampuan melekat yang paling lama karena viskositasnya yang lebih besar dari F1, F2, dan F4. Krim dengan waktu melekat yang lebih lama akan mengakibatkan penghantaran zat aktif ke kulit lebih efektif karena zat aktif kontak dengan kulit lebih lama [19]. Berdasarkan hasil uji *Repeated Measures Anova* menunjukkan semua krim tidak mengalami penurunan yang signifikan karena nilai *sig* >0,05.

**Tabel 8.** Hasil rata-rata daya lekat krim ekstrak daun bayam merah

Formula	Sebelum uji <i>cycling test</i> (detik)	Sesudah uji <i>cycling test</i> (detik)
F1	2,46±0,06	2,03±0,19
F2	3,06±0,19	2,88±0,11
F3	3,22±0,08	3,03±0,20
F4	1,71±0,15	1,70±0,11

Dari tabel hasil daya proteksi dapat dinyatakan semua formula memenuhi standar SNI yakni lebih dari 4 detik. Berdasarkan hasil uji *Repeated Measures Anova* menunjukkan F1, F2, dan F4 tidak mengalami perubahan yang signifikan karena nilai *sig* >0,05. Formula 3 mengalami perubahan karena nilai *sig* <0,05. Formula krim bayam merah memiliki daya proteksi yang lama sehingga dapat dikatakan mempunyai kemampuan proteksi yang sangat baik. Semakin lama daya proteksi, semakin lama juga krim dapat melindungi kulit dari pengaruh luar seperti polusi dan sinar matahari.

**Tabel 9.** Hasil rata-rata daya proteksi krim ekstrak daun bayam merah

Formula	Sebelum uji <i>cycling test</i> (detik)	Sesudah uji <i>cycling test</i> (detik)
F1	12,33±2,02	9,87±1,44
F2	21,08±3,21	18,28±0,68
F3	26,50±2,14	19,19±1,27*
F4	8,24±1,64	6,17±0,33

Tipe krim diuji dengan melakukan tiga perlakuan, yaitu diberi reagen metilen biru, penghantaran arus listrik, dan dilarutkan dalam minyak dan air. Krim minyak dalam air tidak dapat menghantarkan arus listrik, larut dalam sudan III dan minyak. Sedangkan krim air dalam minyak mampu menghantarkan arus listrik, larut homogen dalam metilen biru dan air.

### Hasil uji keamanan krim ekstrak daun bayam merah

Standar penilaian iritasi menggunakan tes Draize meliputi uji iritasi primer dan iritasi okuler. Tes Draize dilakukan terhadap hewan uji berupa kelinci jantan *New Zealand* untuk memprediksi iritasi mata dan kulit dari produk krim. Hasil pengamatan uji iritasi primer menunjukkan bahwa sediaan krim ekstrak bayam merah 0,5%, 1%, kontrol negatif, dan positif bersifat tidak mengiritasi. Sedangkan untuk krim ekstrak bayam merah konsentrasi 2% menunjukkan krim sangat sedikit mengiritasi. Hasil pengamatan iritasi pada mata kelinci menunjukkan nilai indeks iritasi okuler semua sediaan adalah nol. Berdasarkan hasil tersebut, dapat dinyatakan semua krim uji aman digunakan karena krim tidak menyebabkan eritema dan edema pada kulit serta tidak menimbulkan iritasi pada bagian kornea, iris, konjungtiva, dan kemosi pada mata kelinci.

### Hasil uji aktivitas anti-aging krim ekstrak daun bayam merah

Pengujian aktivitas *anti-aging* diawali dengan melakukan penyinaran kulit punggung kelinci dengan sinar UV-A dari lampu *Exoterra Daylight Basking Spot* selama 2 minggu. Kondisi kulit punggung kelinci yang halus menjadi kering dan keriput akibat disinari UV A. Hal tersebut menunjukkan bahwa kulit kelinci mengalami *photoaging*. *Photoaging* ditandai oleh pigmentasi tidak merata, kulit kering, kasar, pucat, berkerut serta penurunan kekuatan dan elastisitas [20]. Hasil penurunan persen parameter yang diukur menggunakan alat *skin analyzer* dapat dilihat pada tabel 10.

**Tabel 10.** Persen kolagen, kelembaban, dan elastisitas sebelum dan sesudah induksi sinar UV-A selama 14 hari

Krim	persen kolagen		persen elastisitas		persen kelembaban	
	Sebelum	Sesudah	Sebelum	Sesudah	Sebelum	Sesudah
F1	64±1,58*	53±2,65*	53,4±4,22*	39,6±3,21*	17,8±2,86*	4,2±1,79*
F2	61±4,69*	50±4,00*	54,6±3,91*	40,4±4,16*	17,4±2,97*	4±1,00*
F3	62±2,83*	51,4±3,65*	55,4±4,98*	41,2±3,96*	18±4,85*	4,4±2,19*
F4 (-)	64,4±1,14*	53,8±3,03*	55,2±3,90*	41,6±4,93*	18,2±2,28*	4,4±1,67*
F5 (+)	62±1,87*	51,6±3,97*	54,8±3,63*	40,4±4,39*	17,8±4,55*	4,2±1,30*

Data persen parameter selanjutnya dilakukan uji statistika berupa *paired T test*. Hasil dari *paired T-test* menunjukkan nilai *sig* <0,05 yang menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan dari setiap persen kolagen, elastisitas, dan kelembaban sebelum dan sesudah diinduksi sinar UV-A selama 2 minggu. Penurunan persen kolagen terjadi dikarenakan radiasi sinar UV-A dapat membentuk senyawa ROS yang dapat memicu aktifnya *activator protein-1* (AP-1). Protein tersebut mentranskripsi penghambatan terbentuknya kolagen dan meningkatkan enzim MMPs (matrix metalloproteinase) yang dapat mendegradasi kolagen. Peningkatan degradasi kolagen dan penurunan produksi kolagen menyebabkan kulit mengalami tanda-tanda penuaan seperti munculnya garis-garis halus atau keriput [21].

Ketika kulit mengalami *photoaging*, elastin berubah bentuk dan fungsinya menjadi jaringan elastosis. Pada jaringan tersebut, serabut elastin berubah menjadi tebal dan tidak teratur. Jaringan elastosis dapat menimbulkan manifestasi klinis penuaan kulit, yaitu kulit kendur dikarenakan elastisitas menurun [22]. Paparan sinar ultraviolet juga dapat menyebabkan kemampuan kulit mempertahankan kelembaban menurun,

terjadi peningkatan *transepidermal water loss* (TEWL) serta penurunan produksi keringat dan sebum [23]. Penurunan faktor-faktor yang mempertahankan kelembaban kulit tersebut menyebabkan kulit yang mengalami *photoaging* menjadi kering dan kasar. Parameter *anti-aging* sesudah induksi dan setelah pengolesan krim. Parameter persen kolagen, elastisitas, dan kelembaban selanjutnya diamati setelah kulit punggung kelinci dioles krim selama 30 hari. Hasil pada tabel 11 menunjukkan semua kelompok mengalami kenaikan persen kolagen setelah dioles krim. Rata-rata persen kolagen sesudah pengolesan krim dari F1, F2, F3, dan F5 termasuk dalam range kadar kolagen normal yaitu 65-80%.

**Tabel 11.** Persen kolagen, kelembaban, dan elastisitas sesudah induksi UV-A dan sesudah dioles krim selama 30 hari

Krim	persen kolagen		persen elastisitas		persen kelembaban	
	Sesudah induksi	Sesudah dioles	Sesudah induksi	Sesudah dioles	Sesudah induksi	Sesudah dioles
F1	53±2,65*	66,2±1,79*	39,6±3,21*	67±2,12*	4,2±1,79*	44±6,02*
F2	50±4,00*	69,4±3,65*	40,4±4,16*	69,4±2,70*	4±1,00*	57±6,20*
F3	51,4±3,65*	70,6±2,97*	41,2±3,96*	70,4±1,82*	4,4±2,19*	58±6,36*
F4 (-)	53,8±3,03*	57,4±3,21*	41,6±4,93*	44,2±3,83*	4,4±1,67*	25,2±6,26*
F5 (+)	51,6±3,97*	74±3,67*	40,4±4,39*	72±1,73*	4,2±1,30*	59±8,86*

Data persen kolagen selanjutnya dilakukan uji statistika berupa *paired T test*. Hasil dari *paired T-test* menunjukkan nilai *sig* <0,05 yang menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan dari persen kolagen sesudah diinduksi sinar UV-A dan sesudah dioles krim selama 30 hari. Hasil uji one way anova dari persen kolagen menunjukkan setiap formula memiliki nilai *sig* 000<0,05 yang berarti rata-rata kelima krim berbeda signifikan. Selanjutnya hasil uji tukey menunjukkan krim F1 berbeda signifikan dengan semua formula, F2 tidak berbeda signifikan dengan F3. Data tersebut dapat diartikan bahwa peningkatan kolagen F2 dan F3 hampir sama, namun masing-masing dari kedua formula tersebut berbeda signifikan dengan kontrol positif. Pada tabel terlihat persen kolagen yang paling besar setelah kontrol positif adalah krim F2.

Pada krim ekstrak daun bayam merah mengandung senyawa antioksidan berupa flavonoid, alkaloid, dan tanin. Alkaloid dapat memberikan efek antioksidan karena kemampuan gugus hidroksilnya dalam mendonorkan elektron dan hidrogen pada radikal bebas sehingga dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas. Tanin mempunyai peranan besar dalam peroksidasi lipid dalam plasma dan jaringan sehingga mampu meniadakan stress oksidatif [24]. Senyawa-senyawa dalam bayam merah tersebut yang akan menurunkan kadar ROS dan mencegah degradasi kolagen.

Semua krim uji juga dapat meningkatkan persen elastisitas kulit punggung kelinci. Hasil dari *paired T-test* menunjukkan nilai *sig* <0,05 yang menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan dari persen elastisitas sesudah diinduksi sinar UV-A dan sesudah dioles krim selama 30 hari. Rata-rata persen elastisitas sesudah induksi memiliki nilai dibawah normal yang termasuk range elastisitas kulit lemah (*weak*) sebesar 35-50%. Rata-rata persen elastisitas sesudah pengolesan krim dari F1, F2, F3, dan F5 termasuk dalam range *better* yaitu 65-70%. Hasil uji one way anova persen elastisitas menunjukkan rata-rata kelima formula berbeda secara signifikan (*sig* <0,05). Peningkatan persen elastisitas paling besar setelah F5 adalah F3. Pada uji tukey F1, F2,

F3 memiliki kemampuan peningkatan elastisitas yang tidak berbeda signifikan dengan F5. F4 mempunyai perbedaan yang signifikan terhadap semua formula.

Krim ekstrak daun bayam merah dapat meningkatkan elastisitas karena memiliki aktivitas antioksidan. Radikal bebas yang reaktif dapat dihambat oleh senyawa antioksidan sehingga produksi kolagen dan serat elastin meningkat [23]. Kolagen dan serabut elastin yang berada di kulit bagian lapisan dermis akan mempertahankan elastisitas [22]. Elastisitas kulit merupakan faktor utama untuk mencegah kulit kendur dan mengembalikan kerapatan kulit akibat *photoaging*. Parameter terakhir yang diamati adalah persen kelembaban. Pada tabel 10 menunjukkan semua krim uji dapat meningkatkan persen kelembaban kulit punggung kelinci. Hasil dari *paired T-test* menunjukkan nilai *sig* <0,05 yang menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan dari persen kelembaban sesudah diinduksi sinar UV-A dan sesudah dioles krim selama 30 hari. Rata-rata persen kelembaban sesudah induksi memiliki nilai dibawah normal yang termasuk range *ageing* sebesar 4-10%. Rata-rata persen kelembaban sesudah pengolesan krim dari F1, F2, F3, dan F5 termasuk dalam range *shiny moist* yaitu 35-65%. Kadar air tersebut merupakan tingkatan tertinggi atau yang paling baik.

Hasil uji *one way anova* dari kelembaban menunjukkan setiap formula memiliki nilai *sig* 000<0,05 yang berarti rata-rata kelima krim berbeda signifikan. Pada tabel 37 terlihat persen kelembaban yang paling besar setelah krim kontrol positif adalah krim ekstrak bayam merah dengan konsentrasi 2%. Pada uji tukey F2, dan F3, memiliki kemampuan peningkatan elastisitas yang tidak berbeda signifikan dengan F5. F1 dan F4 masing-masing mempunyai perbedaan yang signifikan terhadap semua formula. Krim kontrol negatif dapat meningkatkan kelembaban dikarenakan terdapat kandungan gliserin, vaselin, dan air yang dapat menjaga kelembaban kulit. Gliserin sangat efektif untuk mencegah penguapan air di kulit pada lapisan tanduk (*stratum corneum*) hingga lapisan dalam [5]. Krim yang mengandung ekstrak bayam merah lebih efektif menambahkan kelembaban pada kulit kelinci karena ekstrak bayam merah memiliki sifat higroskopis yang dapat mengikat air sehingga krim mampu melembabkan kulit lebih baik. pH semua krim uji juga mendukung pernyataan tersebut karena telah sesuai dengan pH kulit sehingga tidak membuat kulit kering atau iritasi. Kulit kering cenderung lebih mudah mengkerut sehingga keriput dapat muncul lebih cepat. Kulit yang lembab akan menunjang perbaikan kerutan karena lebih elastis dibandingkan kulit kering.

#### 4. Kesimpulan

Mutu fisik krim F1, F2, F3, dan F4 memenuhi syarat organoleptis, homogenitas, viskositas, pH, daya sebar, daya lekat, dan daya proteksi. Krim F1, F2, dan F4 mempunyai kestabilan yang baik. Sediaan krim ekstrak daun bayam merah memiliki dapat dinyatakan aman digunakan sebagai produk kosmetik. Krim ekstrak daun bayam merah dapat disimpulkan mempunyai aktivitas *anti-aging* karena mampu meningkatkan secara signifikan persen kolagen, kelembaban, dan elastisitas. Krim ekstrak daun bayam merah yang paling efektif memberikan efek anti-aging adalah krim dengan konsentrasi 1%.

#### Referensi

- [1] K. Raj, S. I. Chanu, and S. Sarkar, "Decoding complexity of aging," *Cell Dev Biol*, vol. 1, p. e117, 2012.
- [2] W. E. Cahyono, "URGENSI MENJAGA LAPISAN OZON BAGI PENGHUNI BUMI," *Ber. Dirgant.*, vol. 8, no. 2, 2010.

- [3] Z. Alatas, "Efek radiasi pengion dan non pengion pada manusia," *Bul. Alara*, vol. 5, no. 203, pp. 99–112, 2004.
- [4] S. Winarti, "Makanan fungsional," *Yogyak. Graha Ilmu*, pp. 137–165, 2010.
- [5] S. Syaifuddin, "Uji aktivitas antioksidan bayam merah (*alternanthera amoena* voss.) segar dan rebus dengan metode DPPH," *UIN Walisongo*, 2015.
- [6] A. V. Badarinath, K. M. Rao, C. M. S. Chetty, S. Ramkanth, T. V. S. Rajan, and K. Gnanaprakash, "A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations," *Int. J. PharmTech Res.*, vol. 2, no. 2, pp. 1276–1285, 2010.
- [7] D. K. R. Indonesia, "Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat," *Jkt. Dep. Kesehat. Repub. Indones.*, pp. 9–12, 2000.
- [8] R. I. Depkes, "Materia Medika Indonesia," *Jilid VI Jkt. Dep. Kesehat. RI Hal*, vol. 319325, 1995.
- [9] N. A. Safitri, O. E. Puspita, and V. Yurina, "Optimasi formula sediaan krim ekstrak stroberi (*Fragaria x ananassa*) sebagai krim anti penuaan," *Maj. Kesehat. FKUB*, vol. 1, no. 4, pp. 235–246, 2016.
- [10] Z. Azkiya, H. Ariyani, and T. S. Nugraha, "Evaluasi sifat fisik krim ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc. var. *rubrum*) sebagai anti nyeri," *JCPS J. Curr. Pharm. Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 12–18, 2017.
- [11] "SNI 2016-4399-1996 (TABIR SURYA) - Free Download PDF." [https://kupdf.net/download/sni-2016-4399-1996-tabir-surya\\_5af65742e2b6f52b79ea82cc\\_pdf](https://kupdf.net/download/sni-2016-4399-1996-tabir-surya_5af65742e2b6f52b79ea82cc_pdf) (accessed Aug. 31, 2022).
- [12] N. Widyaningrum, M. Murrukmihadi, and S. K. Ekawati, "Pengaruh konsentrasi ekstrak etanolik Daun Teh Hijau (*Camellia Sinesis* L.) dalam sediaan krim terhadap sifat fisik dan aktivitas antibakteri," *Sains Med. J. Kedokt. Dan Kesehat.*, vol. 4, no. 2, pp. 147–156, 2012.
- [13] D. Satria and M. A. Siahaan, "FORMULASI KRIM ANTI "AGING DARI BUAH MANGGA MANALAGI:(*Mangifera indica* L)," *J. Farmanesia*, vol. 4, no. 1, pp. 12–30, 2017.
- [14] A. Guideline, "ASEAN guideline on stability study of drug product," *ASEAN Consult. Comm. Stand. Qual. Philiphines*, 2005.
- [15] E. D. Cahyani, A. Budiawan, and L. Puradewa, "Sunscreen Activity of Soursop Seeds Extract," *Str. J. Pharm.*, vol. 4, no. 1, pp. 23–26, 2022.
- [16] S. Duraivel, A. Shaheda, S. R. Basha, S. E. Pasha, and S. Jilani, "Formulation and evaluation of anti-wrinkle activity of cream and nanoemulsion of moringaoleifera seed oil," *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.*, vol. 9, no. 4, pp. 58–73, 2014.
- [17] M. Tahir, D. Wadan, and A. Zada, "Genetic variability of different plant and yield characters in rice," *Sarhad J. Agric. Pak.*, 2002.
- [18] E. T. Young, N. Kacherovsky, and K. Van Riper, "Snf1 protein kinase regulates Adr1 binding to chromatin but not transcription activation," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 41, pp. 38095–38103, 2002.
- [19] N. M. Lyons and N. M. O'Brien, "Modulatory effects of an algal extract containing astaxanthin on UVA-irradiated cells in culture," *J. Dermatol. Sci.*, vol. 30, no. 1, pp. 73–84, 2002.
- [20] Y. R. Helfrich, D. L. Sachs, and J. J. Voorhees, "Overview of skin aging and photoaging," *Dermatol. Nurs.*, vol. 20, no. 3, 2008.
- [21] J. Perayil et al., "Influence of vitamin D & calcium supplementation in the management of periodontitis," *J. Clin. Diagn. Res. JCDR*, vol. 9, no. 6, p. ZC35, 2015.

- [22] A. Zahruddin and D. D. P. Kulit, "Patofisiologi dan Manifestasi Klinis," *Berk. Ilmu Kesehatan. Kulit Dan Kelamin*, vol. 30, no. 3, pp. 208–215, 2018.
- [23] H. Winarsi, *Antioksidan alami dan radikal*. Kanisius, 2007.
- [24] L. P. Widiastini, I. G. A. M. Karuniadi, and M. Tangkas, "Senyawa antioksidan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) di Denpasar Selatan Bali," *Media Kesehatan. Politek. Kesehat. Makassar*, vol. 16, no. 1, pp. 135–139, 2021.