

UJI AKTIFITAS SERUM EKSTRAK TERPURNIFIKASI DAUN APUH- APUHAN (*AZOLLA MICROPHYLLA*) SEBAGAI ANTIAGING

Ajeng Puspo Aji^{a,b*}, Nunuk Aries Nurulita^b, Diniatik^b

^aFakultas Farmasi, Universitas Bhamada Slawi. Jl. Cut Nyak Dien No.16 Kalisapu-Tegal

^bFakultas Farmasi, Universtas Muhammadiyah Purwokerto, Jl. KH. Ahmad Dahlan,
Kembaran-Banyumas 53182. Telp: (0281) 636751.

*email: ajengpuspoaji@gmail.com

ABSTRAK

Penuaan merupakan proses menghilangnya kemampuan jaringan secara perlahan-lahan untuk memperbaiki dan mempertahankan struktur serta fungsi normalnya. Penyebab penuaan kulit dini yang paling banyak terjadi dikarenakan oleh paparan sinar matahari yang terinduksi. Penelitian ini dilakukan menggunakan ekstrak terpurifikasi daun apuh-apuhan sebagai zat aktif dalam sediaan serum dan pengujian sebagai anti-kolagenase, anti-elastase dan anti-tirosinase sebagai *antiaging*. Penentuan kadar flavonoid dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan hasil yang didapatkan kadar total flavonoid sebesar $8,222\pm 0,03$ mgQE/g. Kombinasi bahan yang digunakan dalam pembuatan serum yaitu: karbopol, trietanolamin, propilen glikol, metil paraben, propil paraben dan aquades. Hasil dari formula sediaan serum ekstrak terpurifikasi daun apuh-apuhan memiliki warna hijau jernih, teksture semi kental, memiliki pH 5,5 dan viskositas 1310 cP hasil yang diperoleh cukup baik. Pada pengujian terhadap enzim kolagenase pada konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm memiliki persen penghambatan 38,91%, 45,15% dan 53,61%. Konsentrasi yang digunakan pada aktivitas enzim tirosinase, mendapatkan persentase penghambatan 42,45%, 45,68% dan 45,80%. Konsentrasi tersebut digunakan pada pengujian terhadap enzim elastase, mendapatkan hasil 62,83%, 84, 71% dan 89,24%. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak terpurifikasi daun apuh-apuhan mempunyai aktifitas sebagai *antiaging*.

Kata kunci: apuh-apuhan, serum, *antiaging*

ABSTRACT

Aging is the gradual loss of tissue's ability to repair and maintain its normal structure and function. The most common cause of premature skin aging is due to induced sun exposure. This research was conducted using purified extract of apuh-apuhan leaf as an active substance in serum preparations and testing as anti-collagenase, anti-elastase, and anti-tyrosinase as *antiaging*. Determination of flavonoid levels was carried out using UV-Vis spectrophotometry and the results obtained were total flavonoid levels of 8.222 ± 0.03 mgQE/g. The combination of ingredients used in the manufacture of serum are carbopol, triethanolamine, propylene glycol, methylparaben, propylparaben, and aquades. The results of the serum preparation formula for the purified extract of apuh-apuhan leaf have a clear green color, semi-viscous texture, have a pH of 5.5 and a viscosity of 1310 cP, the results obtained are quite good. In testing the collagenase enzyme at concentrations of 500 ppm, 1000 ppm and 2000 ppm had inhibition percentages of 38.91%, 45.15% and 53.61%. The concentration used on the activity of the tyrosinase enzyme obtained the percentage of inhibition of 42.45%, 45.68% and 45.80%. These concentrations were used in testing the

elastase enzyme, getting results of 62.83%, 84, 71% and 89.24%. So it can be concluded that purified extract of apuh-apuhan leaves has antiaging activity.

Keywords: apuh-apuhan, serum, antiaging

PENDAHULUAN

Penuaan adalah akumulasi perubahan progresif seiring waktu yang berhubungan dengan peningkatan kerentanan terhadap penyakit dan kematian seiring pertambahan usia dan jumlah kerusakan akibat reaksi radikal bebas yang terus-menerus terhadap sel dan jaringan. Dengan kata lain, kerusakan struktur dan fungsi mencirikan penuaan. Kerusakan ini menyebabkan kondisi patologis dan dapat berakhir pada kematian¹. Pada kondisi normal, kulit pada dasarnya memproduksi enzim seperti elastase dan kolagenase. Faktor *reactive oxygen species (ROS)* ataupun paparan sinar UV yang berlebihan akan mempercepat proses aktivasi enzim *elastase* yang merupakan satu-satunya enzim yang mampu mendegradasi elastin. Elastin tersebut adalah suatu komponen utama dari serat elastis dari jaringan ikat dan tendon. Serat elastis pada kulit, bersama-sama dengan serat kolagen, membentuk jaringan bawah epidermis. Oleh karena adanya aktivasi dari enzim tersebut maka akan menyerang semua protein matriks jaringan ikat utama, termasuk elastin, kolagen, proteoglikan, dan keratin dimana hal ini akan memicu terjadinya pengkerutan pada kulit². Selain itu, pada paparan sinar UV juga akan menginduksi pembentukan melanin pada lapisan kulit. Hal ini dipengaruhi oleh adanya enzim tyrosinase yang bertanggung jawab pada inisiasi pigmentasi kulit³.

Salah satu dari bentuk sediaan kosmetik yang telah berkembang akhir – akhir ini adalah serum. Serum merupakan sediaan dengan zat aktif terkonsentrasi tinggi yang memiliki kemampuan menembus kulit lebih dalam untuk mengirimkan zat aktif ke dalam kulit, memiliki viskositas rendah dan zat aktif dihantarkan dengan membentuk film tipis pada permukaan kulit⁴. Salah satu keuntungan menggunakan sediaan serum yaitu zat aktif yang terkandung didalam serum lebih banyak dibandingkan sediaan kosmetik lainnya sehingga serum lebih cepat dan lebih efektif mengatasi masalah kulit. Dalam dunia kosmetik, penggunaan serum dapat memberikan efek *lifting up, revitalizing, moisturizing, nourishing, anti inflammatory, antiaging* dan anti stress. Serum dapat diaplikasikan secara topikal pada bagian wajah, leher, dan kelopak mata⁵.

Dengan peningkatan efek insiden kerusakan suatu kulit oleh faktor pemicu terjadinya penuaan, maka perlu dilakukan strategi kemoprevensi dan pengembangan terapi. Salah satu cara pengembangan yang dilakukan adalah dengan memanfaatkan ekstrak bahan alam.

Mekanisme ekstrak bahan alam dalam melindungi kulit terdapat beberapa cara seperti reduksi reaktivitas dari ROS, menghambat proses oksidasi, menyerap sinar UV, menekan aktivitas enzim, mereduksi pembentukan kerutan pada kulit serta melindungi kulit dari aging. Mekanisme ini terjadi karena dugaan adanya senyawa fenolik, flavonoid dan triterpenoid yang bertanggung jawab dalam melindungi kulit. Fenolik maupun flavonoid memiliki cincin fenol dengan adanya substituen hidroksil yang mampu menghambat ROS, mereduksi ion logam, memodulasi fosforilasi protein yang berhubungan penghambatan aktivitas enzim dan penghambatan peroksidasi lipid⁶. Pada beberapa penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa tanaman apuh-apuhan memiliki kandungan flavonoid, fenol, tannin, saponin, alkaloid^{7,8}. Pada penelitian ini dilakukan pengembangan tanaman apuh-apuhan untuk dijadikan zat aktif dalam formulasi serum *antiaging*.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah bahan dengan derajat pro analisis seperti: Kojic Acid (p.a., sigma-aldrich), *Quercetine* (p.a., sigma-aldrich), Mushroom Tyrosinase (p.a sigma-aldrich), L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine methyl ester hydrochloride (L-DOPA, p.a., sigmaaldrich), dimethylsulfoxide (DMSO, p.a., Merck., Germany), ethyl acetate (p.a., JTBaker), methanol dan etanol (p.a., JT-Baker); n-hexane (p.a.,Merck., Germany), enzim elastase (EnzoLife Science, USA), enzim collagenase (Enzo LifeScience, USA), colorimetric drug discovery kit and Neutrophil elastase colorimetric drug discovery kit) purchased from Enzo Life Sciences, Inc. Carbopol, TEA, propil paraben, metil paraben, metil paraben, aquadest.

Penyiapan Sampel

Tanaman segar apuh-apuhan diperoleh dari pembudidaya di Banyumas. Setelah dicuci di angina-anginkan dan dikeringkan di oven pada suhu 50°C selama 2 hari hingga diperoleh bobot yang konstan. Sampel dihaluskan dan diambil 250 gram sampel diekstraksi menggunakan etanol 70% dengan metode maserasi didiamkan selama 2 x 24 jam dan dievaporasi pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak etanol kental, proses ini dilakukan sebanyak 2 kali untuk mendapatkan hasil yang maksimal. Setelah ekstrak etanol diperoleh dilakukan proses purifikasi dengan pelarut n-heksane. Selanjutnya dievaporasi pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak terpurifikasi.

Penetapan Kadar Flavonoid Total

Penentuan kadar flavonoid total dilakukan berdasarkan metode kolorimetri menggunakan aluminium klorida ($AlCl_3$) yang dimodifikasi⁹ Masing-masing sampel dan larutan standar (Kuersetin) dipipet sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL dan ditambahkan 1,5 mL metanol. Selanjutnya ditambahkan 100 μ L larutan aluminium klorida ($AlCl_3$ 10 %) dan 100 μ L natrium asetat (1 M) selanjutnya dicukupkan dengan aquades. Campuran diinkubasi selama 30 menit. Diukur absorbansinya sebanyak tiga replikasi dengan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 422 nm.

Pembuatan Serum

Ekstrak terpurifikasi daun apuh-apuhan diformulasikan dalam bentuk sediaan serum yang mengacu pada hasil penelitian sebelumnya yang sudah dimodifikasi. Formulasi serum dapat diligat pada tabel berikut:

Tabel 1. Formulasi Serum

Material	Konsentrasi (%)
EFDA	200 μ L
Karbopol	0,75
TEA	0,25
Propilen Glikol	10
Metil Paraben	0,18
Propil Paraben	0,02
Air suling	Add 100

Ditimbang campuran A yang terdiri dari karbopol kemudian dilarutkan kedalam air suling, didiamkan 24 jam sampai mengembang. Setelah mengembang campuran A ditambah dengan TEA. Ditimbang campuran B yang terdiri dari metil paraben dan propil paraben, kemudian dilarutkan kedalam propilen glikol. Dicampur antara campuran A dan campuran B hingga homogen. Setelah basis serum jadi, dimasukkan ekstrak terpurifikasi daun apuh-apuhan kedalam basis serum, diaduk hingga homogen dibawah homogeizer.

Evaluasi Sediaan Serum

Pengujian dilakukan secara kasap mata dengan menganalisis warna, aroma dan melihat homogenitas, pH pengukuran dilakukan menggunakan alat pH-Meter Hanna H1 5211. Uji pH dilakukan terhadap formula serum dengan menggunakan pH meter semi padat yang telah dikalibrasi dengan larutan dapar pH 4, pH 7, dan pH 10¹². Nilai pH pada sediaan gel harus berkisar pada pH yang netral atau sesuai untuk kulit yaitu 4,5-6,5¹³. Dan uji

viskositas dilakukan dengan menggunakan alat viskosimeter Brookfield DV-I Prime dengan spindle nomor 20. Serum diambil sejumlah 100 gram dan dituangkan ke dalam wadah untuk diamati viskositasnya dengan menggunakan alat viskosimeter *Brookfield*. Spindle yang digunakan disesuaikan dengan viskositas serum nantinya berdasarkan hasil nilai *torque* yang didapat pada viskosimeter. Viskosimeter dijalankan sehingga viskosimeter *Brookfield* dapat menunjukkan besarnya viskositas¹³.

Penghambatan Elastase

Pengujian penghambatan pada enzim elastase menggunakan spektrovotometer florometri ini diukur dengan Sigma Aldrich dan Thring *et al* dengan sedikit modifikasi¹⁰. Sediaan serum 0,001 gram diencerkan dengan 65 μ L buffer dan dibuat variasi konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm diambil 5 μ L dimasukkan kedalam sumuran microplate 96 ditambahkan 50 μ L enzim elastase serta ditambahkan 45 μ L buffer (100 mM, pH 8, Phamacia Biotech 17-1321-01). Kemudian diencerkan sebanyak 1000 kali. Selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan dilihat absorbansinya pada panjang gelombang 405 nm. Aktivitas penghambatan diukur menggunakan rumus sebagai berikut¹¹:

$$\% \text{ inhibisi elastase} = \frac{C-S}{C} \times 100\%$$

Keterangan:

C = *intensity* blanko

S = *intensity* larutan uji

Penghambatan Enzim Kolagenase

Untuk pengujian penghambatan kolagenase (Manual, MMP-1 Colorimetric Drug Discovery Kit), metode mengikuti protocol dari distributor. Sediaan serum 0,001 gram dibuat variasi konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm masing-masing diambil 10 μ L Dimasukkan 10 μ L inhibitor (1,10-*Phenantroline*) sebagai kontrol positif. Ditambahkan 20 μ L enzim kolagenase ke dalam sumur yang berisi sampel juga untuk kontrol positif serta kontrol¹⁰. Ditambahkan larutan *buffer* ke semua sumur sampai volume 100 μ L termasuk blanko. Kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Kemudian ditambahkan substrat masing-masing 10 μ L ke dalam semua sumur. Dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 410 nm dengan *microplate raider*. Aktivitas penghambatan diukur menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi kolagenase} = \frac{Y}{Y_1} \times 98\%$$

Keterangan:

- Y = absorbansi sampel
Y₁ = absorbansi kontrol positif
98 % = % inhibitor 1-10 *phenanthroline*

Penghambatan Enzim Tirosinase

Pengujian aktivitas penghambatan terhadap enzim tirosinase dilakukan dengan metode¹⁰ dimana menggunakan L-DOPA sebagai substrak dan asam kojik sebagai control positif. Sediaan serum 0,001 gram dibuat variasi konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm masing-masing diambil 10µl lalu dimasukkan dalam sumuran microplate 96, ditambah 9 ml dapar fosfat. Sejumlah 80 µL larutan buffer fosfat, 40 µL larutan uji, 40 µL larutan enzim tirosinase dan 40 µL larutan L-dopa dimasukan kedalam *well-microtiter plate*. Masing masing sampel dibuat kontrol dimana tidak ditambahkan larutan L-dopa. Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Campuran diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 410 nm. Aktivitas penghambatan diukur menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi tirosinase} = \frac{(B_1 - B_0) - (S_1 - S_0)}{(B_1 - B_0)} \times 100 \%$$

Keterangan:

- B₁ = absorbansi blanko
B₀ = absorbansi kontrol blanko
S₁ = absorbansi larutan uji
S₀ = absorbansi kontrol larutan uji

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Kandungan Flavonoid Total

Kandungan flavonoid total dari ekstrak daging buah dan kulit buah *L.domesticum* ditentukan berdasarkan metode kolorimetri dengan AlCl₃ yang dibandingkan dengan standar kuarsetin yang direpresentasikan sebagai %b/b ekivalen kuarsetin. Dan mendapatkan hasil rata-rata dari 3 replikasi yaitu sebesar 8,222±0,03 mgQE/g. Hasil tersebut masih menunjukkan bahwa terdapat senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid ini senyawa metabolit sekunder yang memiliki potensi sebagai *anti aging*, sehingga selain itu flavonoid memiliki potensi sebagai antioksidan, antimikroba, antiinflamsi, antikarsinogen

Pembuatan Serum

Hasil dari pembuatan serum yang telah diformulasikan menggunakan karbopol yang dapat memberikan viskositas yang tinggi dan memberikan efektivitas sebagai *gelling agent*

dan TEA digunakan sebagai *emulsifying agent*. Pemilihan propilen glikol dalam formula ini karena dapat digunakan sebagai humektan, yang dapat memperbaiki sifat fisik karbopol, jika mengikat bahan aktif terlalu kuat dengan menambahkan kelarutan bahan aktifnya. Penambahan ini tidak akan berpengaruh signifikan pada sifat fisik secara organoleptik¹⁴. Dan diperoleh sediaan serum yang memiliki tekstur semi kental.

Evaluasi Sediaan Serum

Evaluasi dilakukan pada semua replikasi sediaan yang di dapat. Terdapat perbedaan dalam viskositas karena penggunaan karbopol yang bersifat sifat asam sehingga dinetralkan dengan TEA sebagai basa anorganik sehingga mengakibatkan gel semakin mengental dan terjadi peningkatan viskositas. Penggunaan TEA yang berpengaruh pada perubahan pH karena TEA juga bersifat sebagai *alkalizing agent*. Hasil dari formula sediaan serum ekstrak terpurifikasi daun apuh-apuhan memiliki warna hijau jernih, memiliki pH 5,5 dimana masuk dalam range yaitu 4,5-6,5 sudah baik karena masuk ke rentang pH kulit sehingga sediaan akan aman jika diaplikasikan di kulit⁵ dan viskositas 1310 cP hasil yang diperoleh cukup baik karena viskositas sediaan serum berbasis gel berada pada rentang 800 – 3000 cPs¹⁵ Hasil evaluasi pada sediaan serum ditampilkan pada tabel berikut:

Tabel 2. Evaluasi Sediaan Serum

Uji	Replikasi			Rata-rata
	R1	R2	R3	
Organoleptis	Hijau semi transparan	Hijau semi transparan	Hijau semi transparan	Hijau semi transparan
Homogenitas	Homogen	Homogen	Homogen	Homogen
pH	5,51	5,48	5,53	5,51
Viskositas	1307	1311	1313	1310
Tekstur	Semi kental	Semi kental	Semi kental	Semi kental

Aktivitas Penghambatan Enzim Elastase

Pada pengujian ini digunakan serum ekstrak terpurifikasi daun apuh-apuhan pada konsentrasi 200 µg/mL pada berbagai variasi konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm. Dan hasil penghambatan aktivitasnya pada tabel dibawah ini:

Tabel 3. Pengujian pada Enzim Elastase

Konsentrasi (ppm)	<i>intensity</i>	Inhibitor (%)
500	391,7	62,83
1000	161,1	84,71
2000	113,3	89,24

Kulit pada dasarnya menghasilkan enzim pengurai matriks seperti elastase. Elastase adalah protease kimotripsin yang berperan dalam degradasi elastin. ROS atau paparan sinar matahari yang berlebihan dapat mempercepat aktivasi enzim elastase yang menyebabkan enzim untuk menyerang semua protein matriks jaringan ikat utama termasuk elastin dan kolagen yang memicu pembentukan kerutan pada kulit¹⁶.

Aktivitas Penghambatan Enzim Kolagenase

Hasil pengujian aktivitas *anti aging* serum ekstrak terpurifikasi daun apuh-apuhan pada konsentrasi 200 µg/mL pada berbagai variasi konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 4. Pengujian pada Enzim Kolagenase

Konsentrasi (ppm)	Abs	Inhibitor (%)
500	0,384	38,91
1000	0,446	45,15
2000	0,529	53,61

Aktivitas penghambatan enzim kolagenase pada daun apuh-apuhan diduga dipengaruhi kandungan senyawa flavonoid yang berkhasiat sebagai antioksidan dan memberikan efek sinergis terhadap penghambatan enzim kolagenase dalam proses penuan kulit. Kolagenase merupakan enzim golongan *metalloproteinase* (MMP) yang memecah kolagen dan membantu dalam degradasi dari matriks ekstraseluler. Karena MMP merupakan inisiator terjadinya degradasi kolagen, enzim tersebut menjadi indikator proses penuaan kulit karena paparan UV¹⁷.

Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase

Pengujian aktivitas penghambatan tirosinase ditujukan untuk mengetahui potensi dari sampel ekstrak terpurifikasi daun apuh-apuhan pada konsentrasi 200 µg/mL pada berbagai variasi konsentrasi 500 ppm, 1000 ppm dan 2000 ppm dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 5. Pengujian pada Enzim Tirosinase

Konsentrasi (ppm)	Abs	Inhibitor (%)
500	0,423	42,45
1000	0,543	45,68
2000	0,513	45,80

Dalam kemampuannya menghambat tyrosinase pada mekanisme pembentukan eumelanin, sehingga dapat digunakan sebagai bahan pemutih kosmetik. Penentuan penghambatan tyrosinase dilakukan dengan menggunakan mushroom tirosinase sebagai enzim dan L-dopa

sebagai substrat serta asam kojat sebagai kontrol positif¹⁸. Adanya senyawa fenolik maupun flavonoid yang telah dilaporkan seperti flavonol, stilben, asam fenolik, dan kuarsetin memberikan kontribusi dalam menghambat aktivitas tirosinase sehingga mencegah terjadinya depigmentasi kulit¹⁹.

KESIMPULAN

Sediaan serum dari bahan aktif ekstrak terpurifikasi daun apuh-apuhan (*Azolla microphylla*) memberikan hasil yang memuaskan pada pengujian enzim elastase, enzim kolagenase dan enzim tirosinase sehingga serum dapat dikategorikan mampu memberikan aktivitas *antiaging*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih atas bantuan dan bimbingan ibu Dr. apt. Nunuk Aries Nurulita, M. Si, ibu Dr. apt. Diniatik, M.Sc, bapak Dr. apt. Agus Siswanto, M.Si dan ibu apt. Endang Istriningsih M.Clin Pham. serta berbagai pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu untuk penyusunan dan penyelesaian penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

1. Liochev SI. Which is the most significant cause of aging. 2015;4:793-810
2. Kim, Y.H., Chung, C.B., Kim, J.G., Ko, K.I., Park, S.H., Kim, J.-H., Eom, S.Y., Kim, Y.S., Hwang, Y.-I., Kim, K.H., 2008. Anti-wrinkle activity of ziyuglycoside I isolated from a *Sanguisorba officinalis* root extract and its application as a cosmeceutical ingredient. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 303–311.
3. Lin, J.-W., Chiang, H.-M., Lin, Y.-C., Wen, K., 2008. Natural products with skin-whitening effects. *J. Food Drug Anal.* 16.
4. Granmayeh Rad, A., Abbasi, H., Afzali, M.H., 2011. Gold Nanoparticles: Synthesising, Characterizing and Reviewing Novel Application in Recent Years. *Physics Procedia* 22, 203–208.
5. Thakre, A.D., 2017. Formulation and Development of De Pigment Serum Incorporating Fruits Extract 2, 53.
6. Karim, A.A., Azlan, A., Ismail, A., Hashim, P., Gani, S. salwa abd, Zainudin, B.H., Abdullah, N.A., 2014. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. *BMCComplement. Altern. Med.* 14, 381.
7. Bhaskaran, S. K. *et al.* (2016) „Quantitative phytochemical analysis, In vitro antioxidant potential and gas chromatography-mass spectrometry studies in ethanolic extract of *Azolla microphylla*“, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(2), pp. 318–323.
8. Selvaraj, Kunjiappan. Ranjana, Chowdhury, Chiranjib, Bhattacharjee. 2013. *A green chemistry approach for the synthesis and characterization of bioactive gold nanoparticles using Azolla microhylla methanol extract.* *Research Article.* *Front. Mater. Sci.* 2014, 8 (2): 123-125.

9. Hossain, M.A., Shah, M.D., 2011. A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arab. J. Chem. Prod. Hosting Elsevier BV* 8, 66–71.
10. Thring, T. S. A., Hili, P., & Naughton, D. P. (2009). Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9, 1–11.
11. Girsang, E., Lister, I. N. E., Ginting, C. N., Sholihah, I. A., Raif, M. A., Kunardi, S., Million, H., & Widowati, W. (2020). Antioxidant and antiaging activity of rutin and caffeic acid. *Pharmaciana*, 10(2), 147.
12. Guci, Y., 2015. *Indonesia Productivity And Quality Institute*. [Online] Tersedia di: <https://ipqi.org/kalibrasi-ph-meter/> [Diakses 6 07 2021]
13. Zulkarnain, A. K., Marchaban, Wahyuono, S., & Susidarti, R. A. (2015). Pengaruh Konsentrasi Mahkota Dewa Terhadap Stabilitas Lotion-Krim Serta Uji Tabir Surya Secara Spektrofotometri . *Majalah Farmaseutik*, 11(3), 328-335.
14. Tsabitah, Amira Fawwas. *et all. Optimasi Carbomer, Proplen Glikol dan Trietanolamin dalam Formulasi Sediaan Gel Ekstrak Etanol Daun Kembang Bulan*. 2019. *Majalah Farmaseutik*. Vol. 16 No: 2:111-118.
15. Kamishita, T., Miyazaki, T., Okuno, Y., 1992. PREPARATION USING THEREOF 8.
16. Wilkerson, S. (2018). Reactive oxygen species (ROS): Mechanisms and role in health and disease. *Reactive Oxygen Species (ROS): Mechanisms and Role in Health and Disease*, October, 1–334.
17. Nurulita, Nunuk Aries, Elza Sundhani, Irma Amalia, Fifi Rahmawati, Nina Nurhayati Dian Utami. 2018. Uji Aktivitas Antioksidan dan *Anti-aging Body Butter* dengan Bahan Aktif Ekstrak Daun Kelor. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, April 2019. Hal 1-8. E-ISSN: 2614-6495
18. Lukitaningsih, E. and Holzgrabe, U., 2014. Bioactive compounds in bengkoang (*Pachyrhizus erosus*) as antioxidant and tyrosinase inhibition agents. *Indonesia J. Pharm.* 25(2), 68-75
19. Chen, Q.-X., Kubo, I., 2002. Kinetics of Mushroom Tyrosinase Inhibition by Quercetin. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4108–4112.
20. Wong, S.K., Lim, Y.Y., Chan, E.W.C., 2010. Evaluation of antioxidant, antityrosinase and antibacterial activities of selected *Hibiscus* species. *Ethnobot. Leafl.* 2010, 9.