ARTIKEL TINJAUAN: ANTIOKSIDAN UNTUK KULIT

Ani Haerani, Anis Yohana Chaerunisa, Anas Subarnas
Program Studi Pascasarjana Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Bandung
Jl. Raya Bandung, Sumedang Km 21 Jatinangor 45363
nie_ermo@yahoo.com

ABSTRAK

Antioksidan adalah molekul yang dapat menghambat oksidasi molekul lain. Antioksidan dapat melindungi kulit dari berbagai kerusakan sel akibat radiasi UV, antipenuaan dan perlindungan dari ROS. Antioksidan banyak digunakan sebagai produk perawatan kulit / kosmetik. Ada 3 jenis kosmetik antioksidan yaitu antioksidan endogen, eksogen dan tanaman. Tanaman adalah antioksidan alami yang banyak digunakan sebagai produk perawatan kulit karena memiliki efek samping yang lebih sedikit dan aman. Dalam formulasi antioksidan perlu diperhatikan mengenai stabilitas, kompatibiliitas dan penetrasi supaya sediaan yang dihasilkan stabil, dan mudah berpenetrasi ke dalam kulit untuk mencapai jaringan target dalam bentuk aktif dan bertahan lama dikulit agar mendapatkan hasil yang diharapkan. *Review* ini bertujuan untuk memberikan informasi mengenai manfaat antioksidan, formulasi terutama pada mekanisme penghantarannya ke dalam kulit dan pengujian aktivitas antioksidan.

Kata Kunci: Antioksidan untuk kulit, manfaat antioksidan, kosmetik antioksidan, formulasi

ABSTRACT

Antioxidants are molecules that can inhibit the oxidation of other molecules. Antioxidants can protect the skin from various cell damage caused by UV radiation, antiaging and protection from ROS. Antioxidants are widely used as skin care / cosmetic products. There are 3 types of antioxidant cosmetics that are endogenous, exogenous and plant antioxidants. Plants are natural antioxidants that are widely used as skin care products because they have fewer side effects and are safe. In the formulation of antioxidants, it is necessary to consider the stability, compatibility and penetration so that the resulting dosage is stable, and easily penetrate into the skin to reach the target tissue in active and durable form of skin to obtain the expected results. This review focuses on the benefits of antioxidants, formulations especially on their delivery mechanisms into the skin and testing of antioxidant activity.

Keywords: *Antioxidant for skin, antioxidant efficacy, antioxidant cosmetic, formulation*

Diserahkan: 28 Juni 2018, Diterima 5 Agustus 2018

PENDAHULUAN

Kulit adalah organ tubuh yang terletak paling luar dan terbesar pada manusia, berfungsi sebagai lapisan penghalang untuk untuk melindungi tubuh terhadap pengaruh lingkungan, serta dapat merupakan cermin bagi kesehatan seseorang (Brodell & Rosenthal, 2008). Perawatan dan pemeliharaan yang baik terhadap kulit menjadikan penampilan kulit seseorang akan

tampak sehat, terawat dan memancarkan kesegaran. Kulit memiliki struktur jaringan epitel yang kompleks, bersifat elastis, sensitif serta mempunyai jenis dan warna yang bervariasi bergantung pada iklim, ras, jenis kelamin dan umur (Lai-Cheong & McGrath, 2017).

Paparan kronis terhadap radiasi UV menimbulkan banyak efek samping pada kulit, seperti penuaan dini, kanker kulit dan penurunan kemampuan respon imun. Masalah kesehatan inisecara langsung berkaitan dengan pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) oleh radiasi UV (Jain, S.K., Jain, 2010).

Mekanisme pertahanan antioksidan pada kulit bisadipengaruhi oleh ROS; ketika mekanisme pertahanan tidak seimbang, stres oksidatif dapat merusak membran sel, protein, karbohidrat dan asam nukleat yang memicu oksidasi (Reis Mansur et al., 2016)(Galvez, 2010).

Pembentukan radikal bebas adalah mekanisme penting yang diterima secara luas yang menyebabkan penuaan kulit. Radikal bebas memiliki molekul reaktif sangat tinggi dengan elektron tak berpasangan yang dapat secara langsung merusak berbagai struktur membran seluler, lipid,protein, dan DNA. Efek merusak dari senyawa oksigen reaktif ini diinduksi secara internal selama metabolisme normal dan eksternal melalui berbagai tekanan oksidatif. Produksi radikal bebas meningkat seiring bertambahnya usia sementara mekanisme pertahanan endogen yang menghambatnya menurun. Ketidakseimbangan ini mengarah pada kerusakan progresif struktur seluler sehingga menghasilkan penuaan yang dipercepat (Allemann & Baumann, 2008).

Antioksidan adalah zat yang bisa memberi perlindungan endogen dan tekanan oksidatif eksogen dengan menangkap radikal bebas (Lai-Cheong & McGrath, 2017; Allemann & Baumann, 2008). Antioksidan merupakan molekul yang mampu menghambat oksidasi molekul lain.

Banyak tanaman yang berkhasiat sebagai antioksidan yaitu tanaman yang mengandung karotenoid dan polifenol terutama flavonoid sehingga banyak diformulasikan sebagai antioksidan alami yang dapat dibuat dalam bentuk sediaan oral sebagai vitamin dan topikal sebagai produk perawatan kulit.

Ekstrak tumbuhan dengan antioksidan membangkitkan minat yang besar dalam bidang fitokosmetik seperti menyajikan molekul yang dapat menonaktifkan ROS memulihkan kulit homeostasis sehingga mencegah eritema dan penuaan dini pada kulit (Calderon-Montano et al., 2011; Mansur et al., 2012).

Vitamin dan antioksidan memiliki popularitas besar sebagai bahan dasar dalam produk sediaan topikal, dimana produk harus

dapat mencegah penuaan dan menjaga kulit dalam kondisi yang menyenangkan. Banyak zat, dengan struktur kimia yang lebih atau kurang kompleks, telah ditemukan memiliki aktivitas antiradikal dan telah diperkenalkan ke pasar sebagai produk anti penuaan (Ratz-Lyko, Arct, & Pytkowska, 2012).

Dalam review ini akan dibahas tentang manfaat antioksidan untuk kulit, jenis – jenis antioksidan endogen dan antioksidan eksogen, antioksidan dari bahan alam, tantangan dan strategi formulasi antioksidan beserta metode pengujian aktivitas antioksidan secara in vitro dan in vivo.

Manfaat Antioksidan Untuk Kulit

Radikal bebas yang dihasilkan senyawa oksigen dan nitrogen merupakan salah satu penyebab utama penuaan akibat gangguan regulasi metabolisme pernafasan sel melibatkan pengurangan oksigen yang tidak lengkap di mitokondria dan produksi anion superoksida, radikal hidroksil. Antioksidan berfungsi untuk menghambat reaksi radikal bebas.

Antioksidan memiliki banyak manfaat untuk kesehatan kulit yaitu sebagai antipenuaan, perlindungan dari ROS akibat stress oksidatif dan perlidungan dari UV.

Antipenuaan

Penuaan adalah proses fisiologis kompleks yang terkenal danselalu disertai dengan terjadinya kehilangan memori progresif, demensia, disfungsi kognitif, skizofrenia, parkinson, penyakit Alzheimer dan sebagainya (Lan et al., 2012). Stres oksidatif memainkan peran pentingdalam proses penuaan. Oksidasi yang tepat sangat penting bagi organisme untuk produksi energi proses metabolisme biologis. Namun, stres oksidatif yang berlebihan, akibat ketidakseimbangan antara sistem pertahanan antioksidan dan produksi radikal bebas tidak terkontrol yang berasal dari oksigen, dalam metabolisme energi dapat menyebabkan mutasi dan pada akhirnya dapat menyebabkan terjadinya banyak penyakit kronis (Zhong et al., 2013).

Asupan antioksidan, baik dari diet atau dari suplementasi bermanfaat untuk mengendalikan tingkat penuaan otak dan memperpanjang rentang hidup. Ada dua kategori dasar antioksidan : sintetis dan alami. Penggunaan antioksidan sintetik dibatasi karena efek sampingnya. Oleh karena itu, banyak perhatian yang diberikan untuk menemukan antioksidan alami dari tanaman yang dapat menghasilkan banyak antioksidan untuk mengendalikan stres oksidatif disebabkan oleh sinar matahari dan oksigen dan dapat menjadi sumber senyawa baru dengan aktivitas antioksidan (Jain &

Agrawal, 2008)dengan sifat yang efektif dan aman untuk menghambat proses penuaan.

Perlindungan dari ROS

Jaringan hidup memiliki mekanisme kontrol untuk menjaga keseimbangan ROS. Saat ROS dihasilkan secara invivo, banyak antioksidan ikut bermain. Kepentingan relatif antioksidan tergantung pada ROS mana yang dihasilkan, bagaimana dan di mana mereka dihasilkandan target kerusakan dianggap (Halliwell, 2007). Tubuh kita bertahan terhadap fenomena ROS melalui antioksidan endogen namun saat antioksidan endogen menjadi tidak mencukupi atau tidak seimbang dalam pertahanan terhadap oksidan, antioksidan eksogen dapat membantu mengembalikan keseimbangan.

Antioksidan menghambat produksi ROS dengan cara membelah langsung, menurunkan jumlah oksidan di dalam dan di sekitar sel, mencegah ROS untuk mencapai target biologisnya, membatasi penyebaran oksidan seperti yang terjadi selama peroksidasi lipid dan menggagalkan stres oksidatif sehingga mencegah penuaan (Pouillot et al., 2011).

Perlindungan dari UV

UV (180-400 nm) menyebabkan kerusakan beberapa sel, menghasilkan $^{1}O2$, $^{\bullet}OH$, H2O2, dan ROS lainnya. Sinar UVB (290-320 nm) diserap oleh kromofor epidermal seperti melanin dan asam urokanik dan timbal untuk mengarahkan kerusakan molekuler sekaligus menghasilkan ROS. Dengan adanya H_2O_2, radiasi UVB mengarah pada pembentukan $^{\bullet}OH$ yang menyebabkan kerusakan DNA.

Sinar UVA (320-400 nm) menembus lebih dalam dermis, meningkatkan produksi ROS, dan berkontribusi pada kerusakan jangka panjang. Baik UVA dan UVB menginduksi aktivasi berbagai faktor transkripsi pada sel kulit, termasuk NF-kB (faktor transkripsi yang terlibat dalam respons stres peradangan dan seluler), yang pada gilirannya dapat meningkatkan produksi matriks metaloproteinase (MMPs), kelompok enzim yang menurunkan kolagen dan elastin. Kulit terus dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan terutama radiasi UV. Di kulit, radikal bebas yang disebabkan oleh radiasi UV dapat menyebabkan kerusakan DNA dan untuk protein dapat mengacaukan membran keratinosit sehingga menyebabkan penuaan sel kulit prematur. Saat terkena radiasi UV, kulit mengalami perubahan yang mengakibatkan radang, *photoaging*, dan berbagai kelainan kulit. *photoaging* kulit disertai kerutan, kehilangan elastisitas, meningkatnya kerapuhan kulit, dan penyembuhan luka yang lebih lambat.

Antioksidan dapat menghalangi pembentukan oksigen reaktif yang diinduksi oleh sinar UVdan selanjutnya

mempotensiasi anti-inflamasi dan aktivitas antipenuaan (Oresajo et al., 2008).

Kategori Antioksidan

Antioksidan Endogen

Antioksidan endogen pada dasarnya adalah enzim yang secara katalitik menghilangkan oksidan. Antioksidan endogen mayor adalah superoksida dismutase, superoksida reduktase, katalase, dan glutation peroksidase. Enzim ini memainkan peran kunci dalam mengurangi kandungan oksidan dan mencegah kerusakan oksidatif. Molekul antioksidan endogen lainnya, seperti hemeoksigenase dapat meminimalkan ketersediaan oksidan.

Enzim ini sangat diinduksi oleh stres oksidatif dan menghilangkan oksidan (heme) sekaligus menghasilkan antioksidan (bilirubin $^{1}O2$) dan prooksidan (zat besi)). Selain itu, tingkat feritin yang tinggi menghasilkankapasitas pemulungan besi yang meningkat yang dapat diberikan oleh peningkatan resistensi terhadap stres oksidatif. Tingkat dan komposisi molekul antioksidan endogen berbeda dari jaringan ke jaringan dan dengan jenis sel. Kedua sel induk embrionik dan dewasa terekspresikan pada tingkat tinggi enzim antioksidan, yang menurun seiring sel yang membedakan. Molekul antioksidan endogen sering meningkat setelah terpapar oksidan.

Antioksidan Eksogen

Vitamin E (tokoferol) adalah salah satu antioksidan yang lebih dikenal digunakan dalam formulasi perawatan kulit. Ada delapan isoform aktif antioksidan lipofilik, yang hadir dalam berbagai makanan, seperti sayuran, biji-bijian, dan daging.

α-Tokoferol adalah isoform yang paling aktif secara biologiyang ditunjukkan oleh efek proteksi setelah aplikasi topikal mampu mengurangi jumlah sel-sel sunburn dan kerusakan imbas UVB dan menghambat fotokarsinogenesis.

Banyak penelitian menunjukkan kemampuan vitamin E secara topikal dan turunannya dapat menghambat peroksidasi lipid yang diinduksi oleh radiasi UV dan beberapa peneliti telah menyarankan efektivitas vitamin E sebagai anti-penuaan.

Investigasi lebih lanjut mengungkapkan bahwa kombinasi dua atau lebih antioksidan dapat meningkatkan efektivitas sehingga memberikan fotoproteksi yang lebih baik seperti yang ditunjukkan untuk kombinasi vitamin E dan C (Montenegro, 2014).

Antioksidan Dari Tanaman

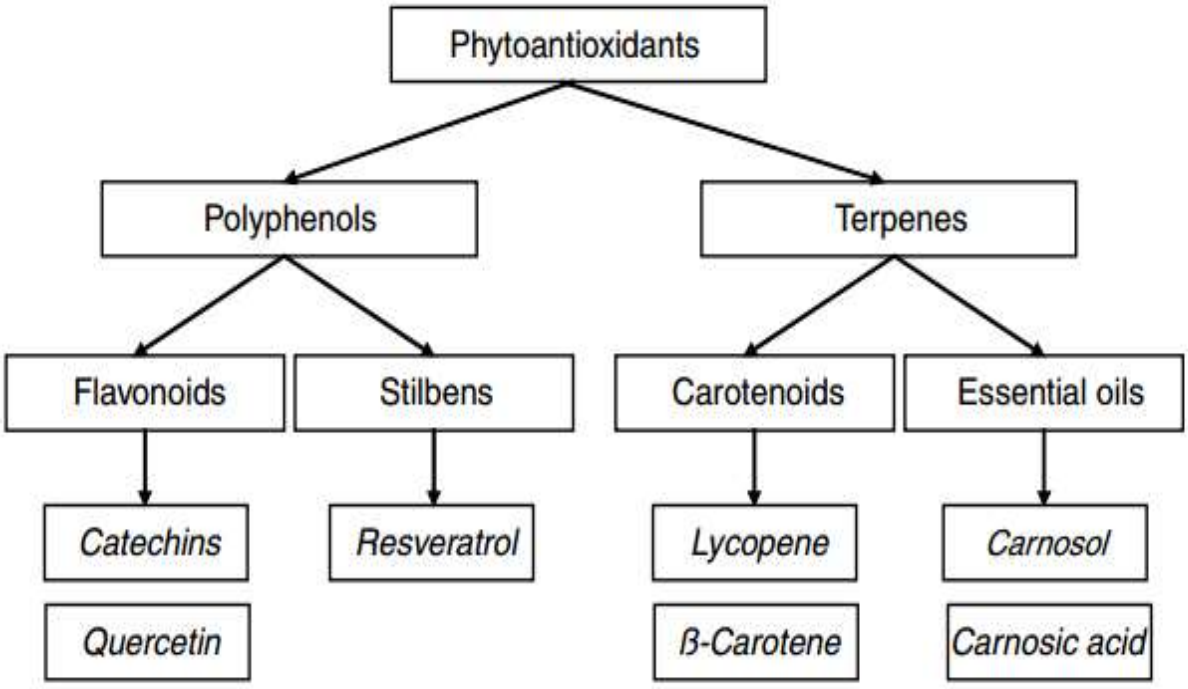
Tanaman menghasilkan banyak antioksidan untuk mengendalikan stres oksidatif disebabkan oleh sinar matahari dan oksigen dan dapat menjadi sumber senyawa

baru dengan aktivitas antioksidan (Jain & Agrawal, 2008).

Asupan antioksidan alami dapat menurunkan risiko kanker, penyakit kardiovaskular, diabetes dan penyakit yang berhubungan dengan penuaan (Jain & Agrawal, 2008).

Sebagian besar fitoantioksidan mengandung senyawa polifenol atau terpen (Gambar 1). Karotenoid dan polifenol adalah kelompok penting dari senyawa antioksidan. Polifenol terbesar adalah flavonoid (flavonol, flavon, flavanon, antosianidin, dan isoflavonoid) banyak digunakan dalam produk perawatan kulit.

Flavonoid, stilben dan terpen (Tabel 1) membantu mencegah stres oksidatif sel ekstraselular sehingga memperlambat penuaan kulit.



Gambar 1. Fitoantioksidan dengan kategori polifenol dan terpen dengan subkategori flavonoid, stilben, karotenoid, dan minyak esensial (Pouillot et al., 2011).

Tabel 1. Tiga *Family* Fitoantioksidan Dengan Sumber Dan Efek Masing-Masing

Flavonoid	Antosianidin	Antosian	*Blueberry* : menghambat radikal bebas dan lipid peroksidasi	(Nakajima, Tanaka, Seo, Yamazaki, & Saito, 2004)
	Flavanol	Katekin	Teh hijau, biji anggur, lengkeng : menghambat produksi H_2O_2 yang diinduksi oleh UV; melindungi sistem antioksidan endogen	(Afaq & Mukhtar, 2006)
	Flavonol	Kuersetin	Teh hijau, *blueberry*, biji anggur, apel : melindungi sistem antioksidan di kulit	(Kahraman A, 2002)
	Isoflavon	Genistein	Gingko biloba : meningkatkan aktivitas antioksidan endogen	(Nakajima et al., 2004; Rigano et al., 2009)
	Flavanon	Silimarin	*Milk thistle* : menghambat peroksidasi lipid, membantu regenerasi sel	(Baliga & Katiyar, 2006)
Stilben	Resveratrol		Anggur, buah beri : menghambat produksi H_2O_2 dan peroksidasi lipid	(Baliga & Katiyar, 2006)
Terpen	Karotenoid	Likopen	Menetralkan $^1O_2$: menangkap radikal bebas dan mengurangi peroksidasi lipid	(Andreassi, Stanghellini, Ettorre, Di Stefano, & Andreassi, 2004)

Tantangan Formulasi Antioksidan

Stabilitas

Stabilitas antioksidan dapat dipengaruhi oleh cahaya, pH, suhu dan oksigen serta dapat bereaksi dengan senyawa lain, maka pada proses manufaktur antioksidan harus secara hati-hati supaya tidak mempengaruhi stabilitas antioksidan (da Silva, Ferreira, Pintado, & Sarmento, 2016;Zhang et al., 2012).

Asam ferulik adalah antioksidan tanaman yang kuat. Penggabungannya ke dalam formulasi topikal dari 15% asam L-askorbatdan 1% α-tocoferol dapat meningkatkan stabilitas kimia vitamin (C dan E)(Lin et al., 2005).

Selain itu, vitamin C (asam askorbat dan turunannya), vitamin E (tokoferol dan turunannya), koenzim Q dan turunannya, GSH dan prekursor seperti derivatif sistein (N-asetil sistein) dan asam lipoik juga dapat dibuat ke dalam formulasi sediaan topikal.

Kompatibilitas

Kompatibilitas adalah perhatian utama dalam formulasi antioksidan, karena kompatibilitas dapat mempengaruhi kelarutan dan viskositas sediaan (Costa & Santos, 2017).

Antioksidan kurang stabil pada pH netral atau alkali; stabilitasnya ditingkatkan pada pH asam (Oresajo, Pillai, Manco, Yatskayer, & Mcdaniel, 2012).

Sebagian besar antioksidan yang larut dalam air asam (misalnya, asam askorbat dan polifenol tanaman) lebih stabil pada pKa asam (Oresajo et al., 2012).

Penetrasi

Sebagai agen proteksi, antioksidan harus mudah menembus stratum korneum untuk mencapai lapisan kulit yang lebih dalam yaitu ke dalam jaringan target dalam bentuk aktif dan bertahan lama di dalam kulit supaya menghasilkan efek optimal (Alonso et al., 2014).

Ada beberapa strategi yang digunakan oleh formulator untuk meningkatkan penetrasi formulasi topikal. Misalnya, larutan vitamin C harus diformulasikan pada pH 3,5 atau lebih rendah sehingga vitamin C lebih mudah terserap ke dalam kulit; pada pH ini, vitamin C terprotonasi, dan molekul tidak bermuatan (9).

Konsentrasi formulasi di maksimalkan untuk penyerapan perkutan. Selama 3 hari, 15 % asam L-askorbat berada di jaringan kulit, kemudian pada hari ke-4 terpenetrasi ke dalam kulit. Begitu berada di dalam kulit, maka tidak bisa dihilangkan dengan mencuci atau menggosok (Pinnell et al., 2001). Vitamin C dan E akan berinteraksi secara sinergis untuk melindungi satu sama lain dan meningkatkan efektivitas aktivitas antioksidan.

Strategi Formulasi Antioksidan

Stabilitas antioksidan menjadi tantangan utama dalam formulasi karena antioksidan mudah teroksidasi. Diperlukan strategi stabilisasi untuk menjaga kestabilan formulasi antioksidan, seperti : kemasan kedap oksigen, enkapsulasi, pH rendah, minimalisasi air, pemasukan elektrolit dan antioksidan lainnya (Stamford, 2012).

Beberapa pendekatan teknologi inovatif telah dilakukandalam beberapa dekade terakhir untuk meningkatkan penghantaran obat dermal dan transdermal (Manosroi, Chankhampan, Manosroi, & Manosroi, 2013; Muzzalupo et al., 2011).

Liposom dan niosom sistem nanocarrier paling banyak untuk meningkatkan kemampuan pengiriman obat melalui kulit, serta untuk menghasilkan obat untuk target terapeutiknya serta mengurangi toksisitas obat.

Liposom dan niosom dapat meningkatkan waktu tinggal obat di stratum korneum dan epidermis, mengurangi penyerapan sistemik obat(Manconi, Sinico, Valenti, Lai, & Fadda, 2006). Selanjutnya, vesikula ini meningkatkan sifat lapisan tanduk baik dengan mengurangi air transepidermal dan mengganti lipid kulit yang hilang, meningkatkan kelembutan kulit(Pando, Caddeo, Manconi, Fadda, & Pazos, 2013).

Niosom memiliki dua keunggulan utama di atas liposom, yaitu stabilitas kimia yang lebih tinggi dan biaya lebih rendah (Pando et al., 2013). Selain itu, surfaktan dalam niosom berkontribusi pada penetrasi keseluruhanpeningkatan senyawa terutama oleh adsorpsi padaantarmuka,berinteraksi dengan membran biologis danmengubah fungsi penghalang stratum korneum, sebagaihasil modifikasi lipid reversibel (Pando et al., 2013). Oleh karena itu, niosomdianggap sebagai alternatif yang baik untuk liposom dan saat ini keduanya memainkan peran penting dalam proses penghantaran obat.

Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan Secara In Vitro

Dalam pengujian antioksidan terdapat beberapa metode pengujian secara in vitro yang dilakukan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan dari suatu sampel. Metode tersebut memiliki berbagai model uji yang bervariasi tergantung kepada jenis sampel dan senyawa target. Karena itu, sulit untuk membandingkan sepenuhnya satu metode dengan yang lainnya (Alam, Bristi, & Rafiquzzaman, 2013).

Dari semua metode uji in vitro, metode pengujian DPPH adalah metode yang paling banyak digunakan karena lebih mudah, akurat, efisien, sederhana dan cepat dalam penentuan aktivitas antioksidan (Alam et al., 2013). Berikut ini merupakan beberapa macam metode penentuan aktivitas antioksidan secara in vitro (Tabel 2).

Tabel 2. Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan Secara In Vitro

Metode	Prinsip	Referensi
Radikal Hidroksil	Berdasarkan kuantifikasi produk degradasi 2-deoksiribose oleh kondensasi dengan TBA.	(Hazra, Biswas, & Mandal, 2008)
Radikal Superoksid	Berdasarkan pengurangan NBT. Adenin fenazin metosulfatenikotinamid non enzimatik sistem dinukleotida (PMS / NADH) menghasilkan radikal superoksida, yang mengurangi nitro blue tetrazolium (NBT) menjadi formazan ungu	(Hazra et al., 2008)
Radikal Oksigen Singlet	Produksi oksigen singlet ($^1O2$) ditentukan dengan memantau N, N-dimethyl-4-nitrosoaniline (RNO), menggunakan metode spektrofotometri.	(Hazra et al., 2008)
Radikal Nitrit Oksid	Pada pH fisiologis, oksida nitrat dihasilkan dari air natrium nitroprusside (SNP) larutan berinteraksi dengan oksigen untuk menghasilkan ion nitrit, yang dapat dikuantifikasi oleh reaksi Griess Illosvoy.	(Hazra et al., 2008)
DPPH	DPPH [1,1-difenil-2-picryl hydrazyl] adalah radikal bebas yang stabil dengan warna ungu, intensitas diukur pada λ = 510 nm secara spektrofotometri.	(Jain & Agrawal, 2008)
Radikal ABTS	Prinsip ABTS (2, 2'-azinobis-3-etilbenzothiozolin-6-sulfonat) berdasarkan penangkapan cahaya oleh ABTS.	(Jain & Agrawal, 2008)

Metode Radikal Hidroksil

Pengujian ini berdasarkan kuantifikasi produk degradasi 2-deoksiribose olehkondensasi dengan TBA. Radikal hidroksil dihasilkanoleh Fe^{3+}-askorbat-EDTA-H_2O_2 (reaksi Fenton). Campuran reaksi yang terkandung, dalam volume akhir 1 ml, 2-deoksi-2-ribosa (2,8 mM); buffer KH2PO4-KOH(20 mM, pH 7.4); $FeCl_3$(100 μM); EDTA (100 μM);H_2O_2(1,0 mM); asam askorbat (100 μM) dan berbagai konsentrasi (0-200 μg / ml) dari sampel uji. Setelah inkubasi selama 1 jam pada 37 °C, 0,5 ml dari campuran reaksi ditambahkan 1 ml TCA 2,8%, kemudian 1 mlTBA 1 % berair ditambahkan dan campuran diinkubasi pada 90 °C selama 15 menit untuk mengembangkan warna. Setelah pendinginan, absorbansi diukur pada 532 nm terhadap suatu larutan blanko yang sesuai.Semua tes dilakukan enamwaktu. Mannitol, digunakan sebagai kontrol positif.

Persentase penghambatan dievaluasi dengan membandingkan larutan uji dan blanko (Hazra et al., 2008).

Metode Radikal Superoksid

Pengujian ini berdasarkan pengurangan NBT. Adenin fenazin methosulfatenikotinamid nonenzimatik sistem dinukleotida (PMS / NADH) menghasilkan radikal superoksida, yang mengurangi nitro blue tetrazolium (NBT) menjadi formazan ungu. Campuran reaksi 1 ml terkandung buffer fosfat (20 mM, pH 7.4), NADH (73 μM), NBT (50 μM), PMS (15 μM) dan berbagai konsentrasi (0–20μg / ml) dari larutan sampel. Setelah inkubasi selama 5 menit disuhu ambien, absorbansi pada 562 nm diukur terhadap larutan blanko yang sesuai untuk menentukankuantitas formazan yang dihasilkan. Semua tes dilakukanenam kali. Quercetin digunakan sebagai kontrol positif (Hazra et al., 2008).

Metode Radikal Oksigen Singlet

Produksi oksigen singlet ($^1O2$) ditentukan dengan memantau N, N-dimethyl-4-nitrosoaniline (RNO), menggunakan metode spektrofotometri. Oksigen singlet dihasilkan dari reaksi antara NaOCl dan H_2O_2, dan pemutihan RNO dipantau pada 440 nm. Campuran reaksi mengandung 45 mM dapar fosfat (pH 7,1), 50 mMNaOCl, 50 mM H_2O_2, 50 mM histidin, 10 μM RNO dan berbagai konsentrasi (0-200 μg / ml) sampel sebanyak 2 ml. Diinkubasi pada 30 °C selama 40 menit dan penurunan absorbansi RNO diukur pada 440 nm. Aktivitas penagkapan sampel dibandingkan dengan asam lipoik, digunakan sebagai standar (Hazra et al., 2008).

Metode Radikal Nitrit Oksid

Pada pH fisiologis, oksida nitrat dihasilkan dari air natrium nitroprusside (SNP) solusi berinteraksi dengan oksigen untuk menghasilkan ion nitrit, yang dapat dikuantifikasi oleh reaksi *Griess Illosvoy*. Campuran reaksi mengandung 10 mM SNP, fosfat buffer salin (pH7,4) dengan berbagai dosis (0–70 μg / ml) larutan uji dalam volume terakhir 3 ml. Setelah inkubasi selama 150 menit pada 25 ° C, 1 ml sulfanilamid (0,33% dalam 20% glasial (asam asetat) ditambahkan ke dalam 0,5 ml larutan yang diinkubasi dandidiamkan selama 5 menit. Kemudian 1 ml naptiletilendiamin dihidroklorid (NED) (0,1% b / v) ditambahkan dan campuran diinkubasi selama 30 menit pada 25 ° C. Kromofor merah muda yang dihasilkan selama diazotisasiion nitrit dengan sulfanilamid dan kopling berikutnya dengan NED diukur secara spektrofotometri pada540 nm terhadap sampel. Semua tes

dilakukanenam kali. Curcumin digunakan sebagai standar (Hazra et al., 2008).

Metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

DPPH [1,1-difenil-2-picryl hydrazyl] adalah radikal bebas yang stabil dengan warna ungu, intensitas diukur pada λ = 510 nm secara spektrofotometri.

200 µl larutan uji ditambah 50 µL DPPH didiamkan pada suhu 25℃ selama 20 menit. Dihitung absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm. Kemudian dihitung IC50 dan persentase penghambatan

$$\% \text{ Inhibition} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$$

Dimana : A0 = Absorbansi kontrol, tanpa ekstrak dan At = Absorbansi dengan adanya ekstrak (Jain & Agrawal, 2008).

Metode Radikal ABTS

Prinsip ABTS (2, 2'-azinobis-3-etilbenzothiozolin-6-sulfonat) berdasarkan penangkapan cahaya oleh ABTS. Antioksidan dengan kemampuan menyumbang atom hidrogen akan menangkap radikal bebas, ABTS stabil ditandai warna hijau Dihitung secara spektrofotometri pada λ = 734 nm.

Kation radikal ABTS bebas yang dihasilkan dari reaksi ABTS dan APS, ditambahkan 20 mL larutan uji PBS 10 µM pH 7,4 ditambah 230 mL larutan radikal ABTS 0,238 mM. Dihitung absorbansi pada panjang gelombang 734 nm. Reaksi kontrol dilakukan tanpa sampel uji. Dibuat grafik konsentrasi linier vs persentase penghambatan kemudian dihitung nilai IC50 (Jain & Agrawal, 2008).

Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan Secara In Vivo

Dalam pengujian antioksidan terdapat beberapa metode pengujian secara in vivo yang dilakukan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan. Metode tersebut memiliki berbagai model uji yang bervariasi tergantung kepada jenis sampel dan aktivitas antioksidan untuk target yang akan diteliti. Karena itu, sulit untuk membandingkan sepenuhnya satu metode dengan yang lainnya. Berikut ini merupakan beberapa macam metode penentuan aktivitas antioksidan secara in vivo (Tabel 3).

Tabel 3. Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan Secara In Vivo

Metode	Prinsip	Referensi
Uji hewan	Pengujian menggunakan hewan supaya mendapatkan serum yang digunakan untuk pengujian antioksidan secara in vivo	(Jin, Saravanakumar, & Wang, 2018)
Tes superoksida dismutase	Pengujian untuk SOD total didasarkan pada kemampuannya untuk menghambat oksidasi oksimin oleh sistem xantin-xantin oksidase.	(Jin et al., 2018)
Pengukur indeks peroksidasi lipid	Tes konten MDA dilakukan dengan menggunakan kit komersial untuk melihat tingkat peroksidasi lipid dalam nanomoles per mililiter serum.	(Jin et al., 2018)
Pengujian total kapasitas antioksidan (T-AOC)	Kapasitas antioksidan total ekstrak tanaman dianalisis berdasarkan kekuatan antioksidan pereduksi besi dengan kapasitas total kapasitas antioksidan (T-AOC) komersial mengikuti prosedur operasional alat	(Jin et al., 2018)

1. Uji Hewan

Tikus jantan (20 ± 2 g) ditempatkan dalam kandang tikus standar dengan akses makanan dan disimpan pada suhu 25 ± 1 ℃ selama 12 jam dalam siklus gelap dan terang. Setelah 1 minggu aklimatisasi ke kandang, tikus-tikus itu secara acak dibagi sebagai berikut: Lima tikus dalam kelompok kontrol (C) dan lima tikus dalam setiap kelompok yang diberi ekstrak air atau metanol berbeda dosis 100 (T1), 300 (T2) dan 500μL / hari (T3). Kelompok kontrol hanya menerima 1 mL air suling, dan kelompok yang diberi perlakuan diberikan dosis yang berbeda dari ekstrak metanol atau air dalam 1 mL air suling dengan gavage sekali sehari selama 15 hari. Pada hari ke 16, tikus dikorbankan oleh *cervical disloted*, dan darah dikumpulkan dan diproses untuk mendapatkan serum yang digunakan untuk pengujian antioksidan secara in vivo (Jin et al., 2018).

2. Tes superoksida dismutase (SOD)

Pengujian untuk SOD total didasarkan pada kemampuannya untuk menghambat oksidasi oksimin oleh sistem xantin-xantin oksidase. Uji aktivitas SOD total dilakukan dengan menggunakan komersial kit mengikuti instrumen yang beroperasi. Nitrit hidroksilamin diproduksi oleh oksidasi oksimin memiliki puncak absorbansi pada 550 nm. Aktivitas SOD

dinyatakan sebagai satuan per mililiter serum (Jin et al., 2018).

3. Pengukur indeks peroksidasi lipid

Tes konten MDA dilakukan dengan menggunakan kit komersial. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 532 nm dengan spektrofotometri dan tingkat peroksida lipid dapat dinyatakan sebagai nanomoles per mililiter serum (Jin et al., 2018).

4. Pengujian total kapasitas antioksidan (T-AOC)

Kapasitas antioksidan total ekstrak tanaman dianalisis berdasarkan kekuatan antioksidan pereduksi besi dengan kapasitas total kapasitas antioksidan (T-AOC) komersial mengikuti prosedur operasional alat (Chen et al., 2014). Warna stabil dari Fe^{2+}-o-fenantrolin kompleks diukur pada panjang gelombang 520 nm. T-AOC diekspresikan dalam satuan per mililiter serum. Satu U didefinisikan sebagai peningkatan absorbansi (A=520) dari 0,01 / menit / mg protein pada 37 ° C (Jin et al., 2018).

KESIMPULAN

Antioksidan memiliki banyak sekali manfaat untuk kulit baik perlindungan dari dalam maupun dari luar. Tanaman yang mengandung karotenoid dan polifenol banyak digunakan sebagai bahan kosmetik.

Dalam formulasi antioksidan perlu diperhatikan mengenai stabilitas, kompatibiliitas dan penetrasi supaya sediaan yang dihasilkan bersifat stabil dan mudah berpenetrasi ke dalam kulit.

Formulasi baru seperti produk antioksidan topikal menggunakan teknologi liposom atau niosom lebih memudahkan antioksidan masuk ke dalam jaringan target dalam bentuk aktif dan bertahan lama di dalam kulit.

DAFTAR PUSTAKA

Afaq, F., & Mukhtar, H. (2006). Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Experimental Dermatology*, *15*(9), 678–684. https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00466.x

Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *21*(2), 143–152. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002

Allemann, I. B., & Baumann, L. (2008). Antioxidants Used in Skin Care Formulations, 1–8.

Alonso, C., Rubio, L., Touriño, S., Martí, M., Barba, C., Fernández-Campos, F., … Luís Parra, J. (2014). Antioxidative effects and percutaneous absorption of five polyphenols. *Free Radical Biology and Medicine*, *75*, 149–155. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.014

Andreassi, M., Stanghellini, E., Ettorre, A., Di Stefano, A., & Andreassi, L. (2004).

Antioxidant activity of topically applied lycopene. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, *18*(1), 52–55. https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2004.00850.x

Baliga, M. S., & Katiyar, S. K. (2006). Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. *Photochemical and Photobiological Sciences*, *5*(2), 243–253. https://doi.org/10.1039/b505311k

Brodell, L., & Rosenthal, K. (2008). Skin Structure and Function: The Body's Primary Defense Against Infection. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, *16*(2), 113–117. https://doi.org/10.1097/IPC.0b013e3181660bf4

Chen, Y., Miao, Y., Huang, L., Li, J., Sun, H., Zhao, Y., … Zhou, W. (2014). Antioxidant activities of saponins extracted from Radix Trichosanthis: An in vivo and in vitro evaluation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *14*, 1–8. https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-86

Costa, R., & Santos, L. (2017). Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. *Powder Technology*, *322*, 402–416. https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.07.086

da Silva, S. B., Ferreira, D., Pintado, M., & Sarmento, B. (2016). Chitosan-based nanoparticles for rosmarinic acid ocular delivery-In vitro tests. *International Journal of Biological Macromolecules*, *84*, 112–120. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.070

Galvez, M. V. (2010). Antioxidants in photoprotection: do they really work? Actas Dermosifiliogr, 101, 197–200.

Halliwell, B. G. J. (2007). No Title. *Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed.*(University Press).

Hazra, B., Biswas, S., & Mandal, N. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of Spondias pinnata. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *8*, 1–10. https://doi.org/10.1186/1472-6882-8-63

Jain, S.K., Jain, N. K. (2010). No Title. *Multiparticulate Carriers for Sun-Screening Agents. Int. J. Cosmet. Sci. Jansen, R., Wang, S.Q., Burn*, 89–98.

Jain, P. K., & Agrawal, R. K. (2008). Antioxidant and Free Radical Scavenging Properties of Developed Mono- and Polyherbal Formulations. *Asian J. Exp. Sci*, *22*(3), 213–220.

Jin, T. Y., Saravanakumar, K., & Wang, M. H. (2018). In vitro and in vivo antioxidant properties of water and methanol extracts of linden bee pollen. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *13*(December 2017), 186–189. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.12.010

Kahraman A, I. M. (2002). Protective effects of quercetin on ultraviolet A light-induced oxidative stress in the blood of rat. *J. Appl. Toxicol*, *22*((5)), 303–309.

Lai-Cheong, J. E., & McGrath, J. A. (2017). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine (United Kingdom)*, *45*(6), 347–351. https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.03.004

Lan, Z., Liu, J., Chen, L., Fu, Q., Luo, J., Qu, R., … Ma, S. (2012). Danggui-Shaoyao-San ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative stress-related neuronal apoptosis in d -galactose-induced senescent mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *141*(1), 386–395. https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.02.050

Lin, F. H., Lin, J. Y., Gupta, R. D., Tournas, J. A., Burch, J. A., Selim, M. A., … Pinnell, S. R. (2005). Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of

skin. *Journal of Investigative Dermatology*, *125*(4), 826–832. https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23768.x

Manconi, M., Sinico, C., Valenti, D., Lai, F., & Fadda, A. M. (2006). Niosomes as carriers for tretinoin: III. A study into the in vitro cutaneous delivery of vesicle-incorporated tretinoin. *International Journal of Pharmaceutics*, *311*(1–2), 11–19. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.11.045

Manosroi, A., Chankhampan, C., Manosroi, W., & Manosroi, J. (2013). Transdermal absorption enhancement of papain loaded in elastic niosomes incorporated in gel for scar treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *48*(3), 474–483. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.12.010

Montenegro, L. (2014). Nanocarriers for skin delivery of cosmetic antioxidants. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, *2*(4), 73–92. Retrieved from http://jppres.com/jppres/pdf/vol2/jppres14.033_2.4.73.pdf

Muzzalupo, R., Tavano, L., Cassano, R., Trombino, S., Ferrarelli, T., & Picci, N. (2011). A new approach for the evaluation of niosomes as effective transdermal drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *79*(1), 28–35. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.01.020

Nakajima, J., Tanaka, I., Seo, S., Yamazaki, M., & Saito, K. (2004). LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocysnins in various berries. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *5*(5), 241–247. https://doi.org/10.1155/S1110724304404045

Oresajo, C., Pillai, S., Manco, M., Yatskayer, M., & Mcdaniel, D. (2012). Antioxidants and the skin : Understanding formulation and efficacy, *25*, 252–259.

Oresajo, C., Stephens, T., Hino, P. D., Law, R. M., Yatskayer, M., Foltis, P., … Pinnell, S. R. (2008). Protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin C. ferulic acid, and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *7*(4), 290–297. https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2008.00408.x

Pando, D., Caddeo, C., Manconi, M., Fadda, A. M., & Pazos, C. (2013). Nanodesign of olein vesicles for the topical delivery of the antioxidant resveratrol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *65*(8), 1158–1167. https://doi.org/10.1111/jphp.12093

Pinnell, S. R., Yang, H., Omar, M., Monteiro-Riviere, N., DeBuys, H. V, Walker, L. C., … Levine, M. (2001). Topical L-ascorbic acid: percutaneous absorption studies. *Dermatologic Surgery : Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery [et Al.]*, *27*, 137–142. https://doi.org/10.1046/j.1524-4725.2001.00264.x

Pouillot, A., Polla, L. L., Tacchini, P., Neequaye, A., Polla, A., & Polla, B. (2011). NATURAL ANTIOXIDANTS AND, 239–257.

Ratz-Lyko, A., Arct, J., & Pytkowska, K. (2012). Methods for evaluation of cosmetic antioxidant capacity. *Skin Research and Technology*, *18*(4), 421–430. https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2011.00588.x

Reis Mansur, M. C. P. P., Leitão, S. G., Cerqueira-Coutinho, C., Vermelho, A. B., Silva, R. S., Presgrave, O. A. F., … Santos, E. P. (2016). In vitro and in vivo evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, *26*(2), 251–258. https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.11.00

6

Rigano, D., Cardile, V., Formisano, C., Maldini, M. T., Piacente, S., Bevilacqua, J., … Senatore, F. (2009). Genista sessilifolia DC. and Genista tinctoria L. inhibit UV light and nitric oxide-induced DNA damage and human melanoma cell growth. *Chemico-Biological Interactions*, *180*(2), 211–219. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.02.010

Stamford, N. P. J. (2012). Stability, transdermal penetration, and cutaneous effects of ascorbic acid and its derivatives. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *11*(4), 310–317. https://doi.org/10.1111/jocd.12006

Zhang, Y., Smuts, J. P., Dodbiba, E., Rangarajan, R., Lang, J. C., & Armstrong, D. W. (2012). Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (rosmarinus officinalis L.) assessed using HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(36), 9305–9314. https://doi.org/10.1021/jf302179c

Zhong, W., Liu, N., Xie, Y., Zhao, Y., Song, X., & Zhong, W. (2013). Antioxidant and anti-aging activities of mycelial polysaccharides from Lepista sordida. *International Journal of Biological Macromolecules*, *60*, 355–359. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.018