



9 772686 250000

e-ISSN : 2686-2506

Majalah Farmasetika, 7 (5) 2022, 407-423  
<https://doi.org/10.24198/mfarmasetika.v7i5.39510>

Artikel Review



## Review: Potensi Minyak Biji Sacha Inchi (*Plukenetia Volubilis*) Sebagai *Anti-Aging* Dalam Formula Kosmetik

Ira Maya, Sriwidodo\*

<sup>1</sup>Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran,

<sup>2</sup>Departemen Farmasetika dan Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran

\*E-mail: [ira16001@mail.unpad.ac.id](mailto:ira16001@mail.unpad.ac.id)

(Submit 23/05/2022, Revisi 16/06/2022, Diterima 22/06/2022, Terbit 21/07/2022)

### Abstrak

Kulit merupakan lapisan pelindung tubuh dari pengaruh luar seperti polusi, paparan sinar matahari dan radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan kulit. Proses perusakan kulit oleh radikal bebas ini mengakibatkan kerusakan struktur maupun lapisan kulit pada lapisan dermis sehingga mengakibatkan kulit menjadi kehilangan elastisitas dan akhirnya menjadi keriput, sehingga untuk menahan efek buruk dari radikal bebas tersebut, salah satu cara yang dapat dilakukan adalah merawat kulit dengan menggunakan antioksidan. Antioksidan dapat menghambat terjadinya reaksi oksidasi sel sehingga dapat mengurangi kerusakan sel, dan terdapat dalam beberapa bentuk yaitu vitamin, mineral, dan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan. Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai bahan aktif antioksidan adalah minyak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*). Tujuan penulisan review artikel ini adalah memberikan informasi dan gambaran mengenai potensi minyak biji sacha inchi sebagai *anti-aging* dalam formula kosmetik. Review artikel ini menggunakan metode penelitian komparatif dengan mengumpulkan berbagai sumber pustaka primer dari 29 jurnal penelitian dengan kriteria inklusi yaitu jurnal yang membahas tentang potensi minyak biji sacha inchi sebagai kosmetik dengan rentang tahun dari tahun 2012 hingga 2022 dan kriteria eksklusinya adalah jurnal yang membahas tentang minyak biji sacha inchi dengan potensi selain kosmetik. Hasil review mengindikasikan bahwa minyak biji sacha inchi memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan kandungan senyawa kimia yaitu omega-3, omega 6, omega 9, vitamin E, vitamin A, tanin, fitosterol, terpenoid, senyawa fenolik, dan terpenoid. Dengan demikian berdasarkan hasil telaah pustaka yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa minyak sacha inchi memiliki potensi untuk digunakan sebagai *anti-aging* dalam formula kosmetik.

**Kata kunci:** Kulit, Sacha Inchi, Kosmetik, Anti-aging

## Pendahuluan

Kulit merupakan lapisan pelindung tubuh dari pengaruh luar seperti debu, paparan sinar matahari dan radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan kulit. Proses perusakan kulit oleh radikal bebas ini mengakibatkan kerusakan struktur maupun lapisan kulit pada lapisan dermis yaitu fibroblast dan matriks ekstraseluler seperti kolagen, elastin dan substansi dasar yang mengalami penurunan fungsi sehingga mengakibatkan kulit menjadi kehilangan elastisitas dan akhirnya menjadi keriput [1]. Sebagai upaya untuk menahan efek buruk dari radikal bebas tersebut, salah satu cara yang dapat dilakukan adalah merawat kulit dengan menggunakan antioksidan [2].

Antioksidan ialah senyawa yang dapat memberikan satu atau dua elektron terhadap radikal bebas, sehingga dapat menghambat terjadinya reaksi oksidasi pada sel dan mengurangi kerusakan sel. Antioksidan terdapat dalam beberapa bentuk, diantaranya vitamin, mineral, dan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan [3].

Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai bahan aktif antioksidan adalah minyak biji sacha inchi (*Plukenetia volubilis*). Secara tradisional, minyak biji sacha inchi digunakan sebagai minyak perawatan kulit yang dioleskan secara teratur untuk menjaga kelembutan dan kesehatan kulit di negara Peru [4]. Di dukung oleh penelitian Puangpronpitag *et al.* (2021) menyatakan bahwa minyak biji sacha inchi memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  yaitu DPPH=  $0,007\pm 0,001$  (mg/mL), ABTS =  $1,4065\pm 0,0505$  (mg/mL), serta FRAP =  $74.4960\pm 2,6067$  (mg=TE/gExt) dan termasuk kategori kuat. Hadzich *et al.* (2020) dan Chirinos *et al.* (2016) juga menyatakan bahwa senyawa bioaktif yang terdapat pada minyak biji sacha inchi adalah senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan diantaranya omega-3, omega 6, omega 9, vitamin E, vitamin A, tanin, fitosterol, terpenoid, senyawa fenolik, dan terpenoid [5, 6, 7].

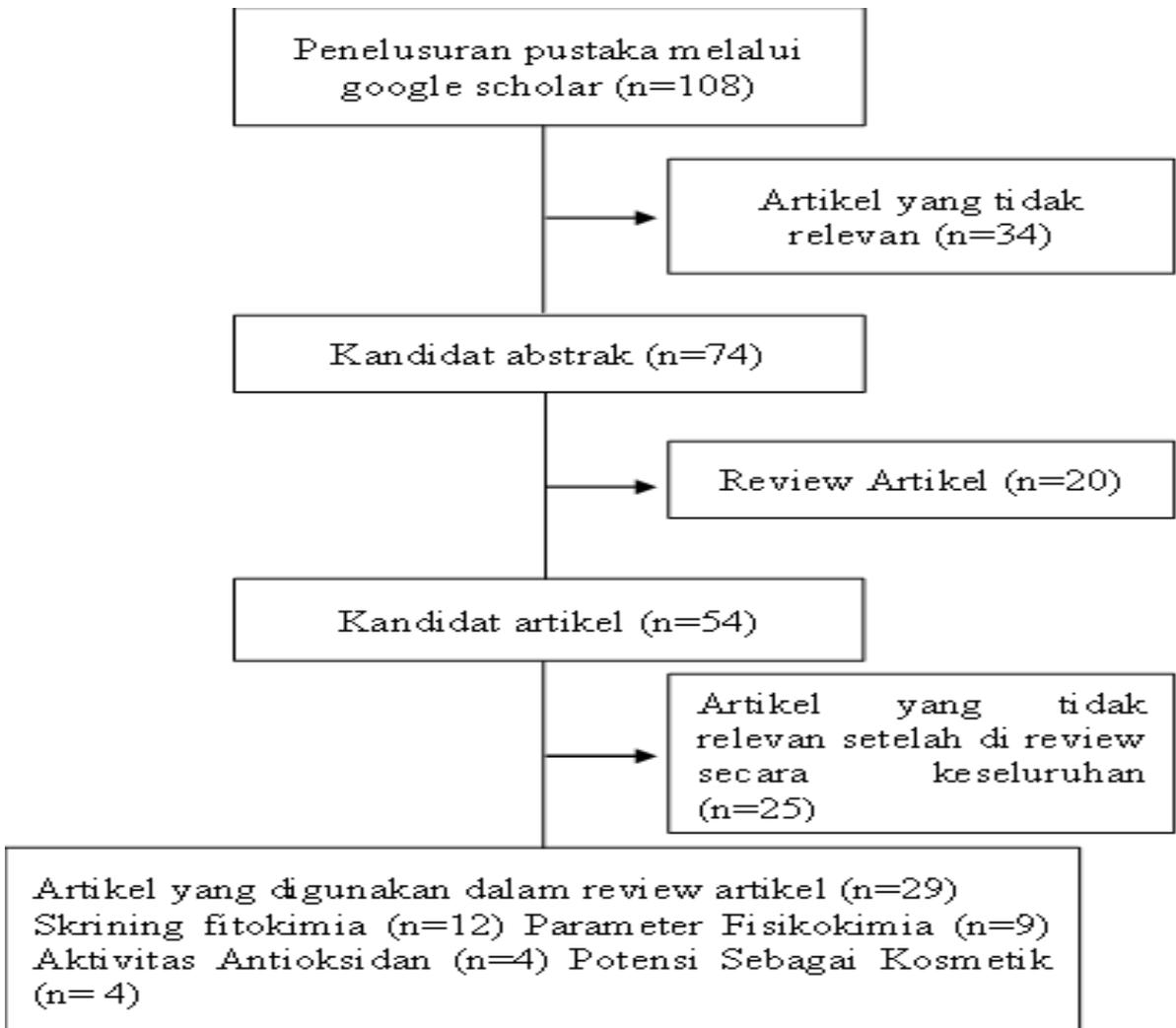
Saat ini pasar kosmetik natural telah berkembang dalam beberapa tahun terakhir, dikarenakan transisi pasar dalam penggunaan kosmetik dari bahan sintesis ke bahan alam [8]. Salah satu bahan alami yang diprediksi akan menjadi tren dalam beberapa tahun ke depan adalah minyak biji sacha inchi karena memiliki keunggulan pada kandungan omega-3 nya yang tinggi yaitu sebesar 48% dari total asam lemak yang terdapat pada minyak biji sacha inchi. Omega-3 ini diketahui efektif dalam regenerasi kulit melalui pengendalian peradangan dan sintesis kolagen sehingga banyak digunakan dalam produk perawatan kulit (terutama sebagai *anti-aging*) [9]

Sebelum minyak biji sacha inchi digunakan dalam produk perawatan kulit (terutama sebagai *anti-aging*), harus diketahui terlebih dahulu komponen senyawa kimia, parameter fisikokimia maupun aktivitas biologi pada minyak biji sacha inchi. Hingga saat ini, informasi mengenai komponen senyawa kimia, parameter fisikokimia, aktivitas biologi, serta potensi minyak biji sacha inchi sebagai kosmetik masih sangat terbatas dan belum ada artikel review yang diterbitkan mengenai hal tersebut. Oleh karena itu,

penulisan artikel review ini bertujuan untuk memberikan informasi dan gambaran mengenai potensi minyak biji sacha inchi sebagai *anti-aging* dalam formula kosmetik dan diharapkan dapat menjadi referensi dalam menentukan formulasi kosmetik yang akan dibuat.

## Metode

Metode penulisan yang digunakan dalam pembuatan review artikel ini adalah metode penulisan komparatif dengan mengumpulkan berbagai sumber yang didapat dari beberapa jurnal penelitian. Studi literatur dilakukan secara online yang dimulai pada 07 Maret 2022 dengan menggunakan google scholar dan elsevier. Kriteria inklusi yaitu jurnal yang membahas tentang potensi minyak biji sacha inchi sebagai kosmetik dengan rentang tahun dari tahun 2012 hingga 2022 dan kriteria eksklusinya yaitu jurnal yang membahas tentang minyak biji sacha inchi dengan potensi selain kosmetik. Studi literatur selengkapnya dapat dilihat pada gambar berikut:



**Gambar 1.** Bagan Alir Metode Penulisan Review

## Hasil

Berikut ini adalah hasil telaah pustaka dari sumber data review yaitu diketahui kandungan senyawa kimia, parameter fisikokimia, aktivitas biologi serta potensi dari tanaman sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) sebagai kosmetik, selengkapnya dapat dilihat pada tabel 1 – 4.

**Tabel 1.** Kandungan Senyawa Kimia Minyak Sacha Inchi

Bagian Tanaman	Senyawa Kimia	Referensi
Biji	Asam lemak tak jenuh ganda seperti omega-3 (asam $\alpha$ -linolenat), omega- 6 (asam linoleat), asam lemak tak jenuh tunggal seperti omega-9 (asam oleat), vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol dan $\delta$ -tokoferol), vitamin A (karotenoid), flavonoid, tanin, senyawa fenolik dan $\beta$ -sitosterol.	[5]
Biji	Asam lemak (omega-3, omega-6, dan omega-9), fitosterol, tokoferol, senyawa fenolik, karotenoid total.	[10]
Biji	Asam lemak ( $\alpha$ -linolenat, linoleat, oleat, stearate, dan palmitat), tokoferol ( $\alpha$ -tokoferol, $\beta$ -tokoferol, $\gamma$ -tokoferol, $\delta$ -tokoferol), fitosterol (campesterol, stigmasterol, $\beta$ -sitosterol).	[11]
Biji	Asam lemak ( $\alpha$ -linolenat, linoleate, oleat, stearate, dan palmitat).	[4, 12]
Biji	Asam lemak (omega-3), senyawa fenolik, tanin, saponin.	[13]
Biji	Asam lemak ( $\alpha$ -linolenat, linoleate), polifenol, tokoferol ( $\beta$ -tokoferol, $\gamma$ -tokoferol, $\delta$ -tokoferol), senyawa fenolik (flavonoid, seicoridoid, dan lignan).	[14]
Biji	Asam lemak tak jenuh ganda (asam $\alpha$ -linolenat, asam inoleate), $\beta$ -karoten, vitamin E.	[6, 15, 16]
Biji	Asam lemak ( $\alpha$ -linolenat, linoleate, oleat, palmitat), tokoferol ( $\gamma$ -tokoferol, $\delta$ -tokoferol), sterol (stigmasterol, campesterol, $\beta$ -sitosterol, alcohol triterpene, lanosterol, sikloartenol).	[17]
Biji	Terpenoid: $\alpha$ -pinene, sabinene, limonene, aristolene, cycloartenol, 24-methylene cycloartenol, lanosterol, $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, campesterol and phytol.	[18]

**Tabel 2.** Karakteristik Fisikokimia Minyak Biji Sacha Inchi

Parameter Fisikokimia	Negara	Nilai	Nilai Rujukan	Referensi
Rendemen (%)	Columbia	18.80		[19]
	Peru	35.40	-	[11]
Indeks Refraksi	Peru	1.480 - 1.481, 1.481 - 1.482		[20]
	Peru	1.475 (20°C)	1.478-1.482	[21]
	Peru	1.475 (20°C)		[22]
	Colombia	1.4810		[23]
	Cina	1.475		[24]
Nilai Saponifikasi (mg KOH/g)	Peru	190.50		[22]
	Colombia	251.72		[23]
	Myanmar	190.85		[25]
	Cina	183.78		[24]
Indeks Peroksida (meq O <sub>2</sub> /kg)	Peru	2.90		[11]
	Peru	3.40		[26]
	Peru	1.50 - 19.10, 2.10 - 5.60		[20]
	Colombia	14.77	-	[23]
	Myanmar	2.00		[25]
	Ecuador	5.81		[27]
	Cina	1.85		[24]
Nilai Iodin (g I <sub>2</sub> /100g)	Peru	192.50		[22]
	Colombia	195.05		[23]
	Myanmar	183.69	182.199	[25]
	Ecuador	192.50		[27]
	Cina	187.40		[24]
Nilai Asam (mg/g)	Peru	2.40		[22]
	Peru	0.50 - 4.70, 0.50 - 4.70		[20]
	Peru	0.37	-	[11]
	Myanmar	0.59		[25]
	Ecuador	0.38		[27]
Asam (%)	Cina	1.79		[24]
	Peru	1.08		[21]
	Peru	1.19	0-2	[22]
Colombia	1.31	[23]		
Asam lemak bebas (% Asam Oleat)	Peru	0.19		[11]
	Peru	0.36		[27]
Densitas (gr/cm <sup>3</sup> , 25°C)	Peru	0.920 - 0.930		[20]
	Peru	0.928	0.92-0.93	[21]
	Ecuador	0.9100		[27]
Viskositas (mm <sup>2</sup> /s, 20°C)	Peru	38.90-44.00		[20]
	Myanmar	0.416 cP	-	[25]

**Tabel 3.** Aktivitas Antioksidan Minyak Sacha Inchi

Bagian Tanaman	Aktivitas Biologis	Metode Pengujian	Hasil Pengujian	Referensi
Biji	Antioksidan	Pengujian antioksidan terhadap minyak biji sachu inchi dilakukan menggunakan metode DPPH, ABTS dan FRAP.	aktivitas terhadap minyak biji sachu inchi dengan metode DPPH, ABTS dan FRAP. Hasil menunjukkan bahwa minyak biji sachu inchi memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan nilai IC <sub>50</sub> yaitu DPPH= 0,007±0,001 (mg/mL), ABTS=1,4065±0,0505 (mg/mL), serta FRAP= 74.4960±2,6067 (mg=TE/gExt).	[5]
Biji	Antioksidan	Pengujian antioksidan terhadap minyak biji sachu inchi yang sebelumnya bijinya telah mengalami proses pemanggangan pada suhu 160-220°C dengan menggunakan metode DPPH.	aktivitas dilakukan terhadap minyak biji sachu inchi yang sebelumnya bijinya telah mengalami proses pemanggangan pada suhu 160-220°C dengan menggunakan metode DPPH. Hasil menunjukkan bahwa pemanggangan memiliki efek penting dalam meningkatkan perlindungan terhadap oksidasi selama penyimpanan, namun hasil ini tidak berpengaruh pada profil asam lemak. Nilai IC <sub>50</sub> secara berturut-turut biji yang tidak dipanggang, dipanggang sedikit, dipanggang sedang, dipanggang lama dan dipanggang secara komersial yaitu 18.2 ± 1.3; 23.8 ± 1.4; 47.6 ± 1.5; 95.0 ± 2.8 dan 17.5 ± 1.7 (µg TE/g minyak).	[16]
Biji	Antioksidan	Pengujian terhadap 16 minyak sachu inchi yang berbeda untuk melihat kapasitas antioksidan dengan menggunakan metode <i>Oxygen radical absorbance capacity</i> (ORAC).	dilakukan terhadap 16 minyak sachu inchi yang berbeda untuk melihat kapasitas antioksidan dengan metode <i>Oxygen radical absorbance capacity</i> (ORAC). Hasil menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang cukup signifikan pada kapasitas antioksidan hidrofilik, lipofilik dan antioksidan total dengan nilai IC <sub>50</sub> secara berturut turut yaitu pada kisaran 4,3-7,3; 1,0-2,8 dan 6,598 (µmol TE/g biji).	[10]

Biji	Antioksidan	Pengujian antioksidan minyak sachcha inchi dilakukan dengan metode DPPH.	aktivitas minyak biji sachcha inchi dilakukan dengan metode ABTS dan DPPH.	Hasil menunjukkan bahwa minyak biji sachcha inchi yang diproses dengan pemanggangan pada suhu 160°C memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dari pada kontrol dan yang diproses pada suhu 80°C atau 120°C. Nilai IC <sub>50</sub> yang diperoleh pada pengujian dengan metode ABTS secara berturut-turut untuk kontrol, suhu pemanggangan 120°C dan 160°C yaitu 0,49; 0,37 dan 0,61 (µmol TE/g biji), sedangkan nilai IC <sub>50</sub> dengan pengujian metode DPPH yaitu yaitu 0,44 (µmol TE/g biji) pada suhu pemanggangan 160°C.	[13]
------	-------------	--	--	--	------

**Tabel 4.** Potensi Minyak Biji Sachcha Inchi Sebagai Kosmetik

Manfaat	Metode Pengujian	Hasil Pengujian	Referensi
Anti-aging	Pengujian aktivitas antioksidan terhadap minyak biji sachcha inchi dilakukan dengan menggunakan metode DPPH, ABTS dan FRAP.	Hasil menunjukkan bahwa minyak biji sachcha inchi memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan nilai IC <sub>50</sub> yaitu DPPH= 0,007±0,001 (mg/mL), ABTS=1,4065±0,0505 (mg/mL), serta FRAP= 74.4960±2,6067 (mg=TE/gExt). Hal ini mengindikasikan bahwa minyak biji sachcha inchi dapat diformulasikan dalam sediaan kosmetik yang memiliki klaim anti-aging berdasarkan aktivitasnya sebagai antioksidan yang dapat melakukan penghambatan terhadap radikal bebas. Minyak biji sachcha inchi memiliki manfaat untuk menjaga elastisitas dan kelembaban kulit, secara efektif melindungi kulit dari kerusakan akibat sinar ultraviolet, radiasi, memperbaiki kulit yang kasar, gelap dan tidak bercahaya serta sebagai anti-aging.	[9]

---

Antioksidan	Penguji-an antioksidan minyak biji sacha inchi yang digunakan sebagai bahan aktif pada sediaan lipstik dilakukan dengan menggunakan metode DPPH dan pengukuran kandungan $\gamma$ -tokoferol.	Hasil pengujian aktivitas antioksidan minyak biji sacha inchi dengan metode DPPH yaitu diperoleh nilai IC50 sebesar $14.23 \pm 0.54$ (mg/ml), nilai IC50 tersebut lebih tinggi dari nilai dihasilkan oleh trolox yaitu sebesar $31.97 \pm 1.47$ (mg/ml), selain itu hasil pengukuran $\gamma$ -tokoferol yang didapatkan yaitu sebesar $79.42 \pm 0.69$ (mg/100 g minyak). Hal ini mengindikasikan bahwa minyak biji sacha inchi dapat memberikan kapasitas antioksidan pada sediaan lipstick yang dibuat melalui kandungan $\gamma$ -tokoferol yang dimilikinya.	[28]
<i>Moiturizer</i> humektan, dan emolien	Fungsi minyak biji sacha inchi sebagai peningkat penetrasi, moisturizer, humektan dan emolien dilakukan dengan pengujian secara ex vivo dan klinis. Pengujian dilakukan dengan melakukan penilaian terhadap ekspresi keratin 1, pelepasan TNF- $\alpha$ dan IL-1 $\alpha$ pada jaringan kulit, hidrasi stratum korneum, nilai <i>Transepidermal Water Loss</i> (TEWL) dan iritasi kulit. Pengujian ini berlangsung selama 14 hari dan 2 hari tambahan dengan mengaplikasikan 0,5 ml sediaan pada kaki kiri atau kanan dua kali sehari, selanjutnya dilakukan pengamatan yang dilakukan yaitu dengan melihat tanda-tanda eritema, <i>scaling</i> dan edema ditempat pengolesan sampel, untuk skor penilaian disesuaikan dengan skala <i>overall dry skin scor</i> (ODS).	Hasil pengujian secara ex vivo pada kultur jaringan kulit dan studi klinis mengungkapkan bahwa minyak sacha inchi dinyatakan aman dan tidak mengiritasi kulit), selanjutnya didapatkan hasil pengukuran kadar air sebagai penilaian hidrasi stratum korneum menunjukkan kenaikan nilai dari sebelum pengujian dan setelah pengujian, nilai kadar air sebelum pengujian yaitu $36,7 \pm 3,0$ AU (relawan sacha inchi) dan $36,7 \pm 2,7$ AU (relawan minyak zaitun) berada dalam kisaran 30-40 AU, menunjukkan dengan kulit kering dan setelah pengujian didapatkan nilai kadar air yaitu $44,9 \pm 1,7$ AU (relawan sacha inchi) dan $45,6 \pm 1,7$ AU (relawan minyak zaitun). Kemudian untuk hasil penilaian TEWL didapatkan pada hari ke-14 setelah pengaplikasian yaitu $8,4 \pm 1,0$ g/m <sup>2</sup> /jam (relawan sacha inchi) dan $8,9 \pm 0,7$ g/m <sup>2</sup> /jam (relawan minyak zaitun). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kapasitas pelembab minyak sacha inchi setara dengan minyak zaitun, hal ini menunjukkan bahwa minyak biji sacha inchi memberikan bukti yang mendukung sebagai peningkat penetrasi, moisturizer, humektan dan emolien yang bekerja dengan cara menjaga penampilan kulit (kelembutan kulit) dengan tetap berada di permukaan kulit atau stratum korneum.	[4, 9, 29]

---

---

Peningkat penetrasi	Fungsi minyak biji sacha inchi sebagai peningkat penetrasi telah dilakukan sampai studi klinis dengan menilai parameter seperti TEWL dan hidrasi stratum korneum kulit.	Hasil pengujian terhadap fungsi minyak biji sacha inchi sebagai peningkat penetrasi berdasarkan parameter TEWL dan efek hidrasi yaitu terjadi penurunan kadar TEWL dan peningkatan hidrasi stratum korneum. Hidrasi meningkat setelah aplikasi 30 menit dan berlangsung selama penelitian dari hari ke-1 sampai hari ke-60. Efek hidrasi yang dihasilkan sebanding dengan kontrol (minyak mineral) dan dikonfirmasi dengan studi klinis dengan minyak kelas pada kulit xerotik. Minyak biji sacha inchi berperan sebagai peningkat penetrasi dikarenakan kandungan asam lemaknya yang bekerja dengan cara meningkatkan permeabilitas kulit melalui fluidisasi atau delipidasi lapisan ganda lipid stratum korneum sehingga meningkatkan permeabilitas kulit dan memudahkan penetrasi dan permeasi zat ke dalam kulit.	[30]
---------------------	---	---	------

---

## Pembahasan

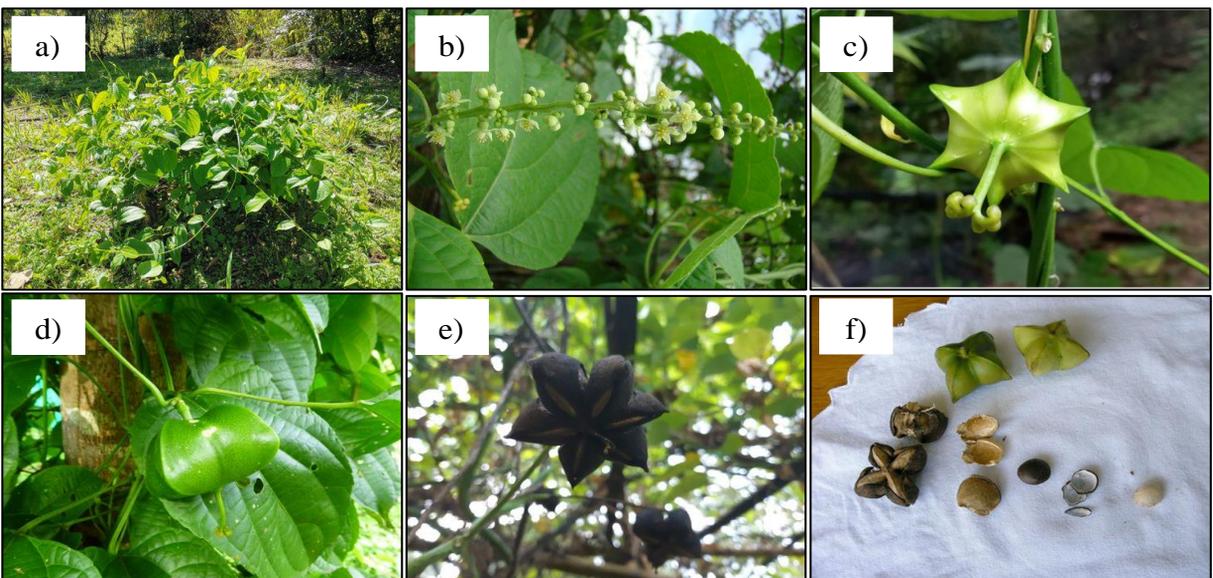
### *Sacha Inchi (Plukenetia volubilis L.)*

Tanaman sacha inchi memiliki nama ilmiah (*Plukenetia volubilis L.*) Tanaman ini termasuk divisi Tracheophyta, kelas Magnoliopsida, ordo Malpighiales, familia Euphorbiaceae, dan genus Plukenetia L. Tanaman sacha inchi berasal dari Peru dan telah dibudidayakan selama berabad-abad oleh penduduk Peru. Sacha inchi umumnya dikenal dengan nama kacang Inca, kacang liar atau kacang sacha yang termasuk dalam keluarga Euphorbiaceae. Tanaman ini tumbuh luas di hutan dan menghasilkan buah yang berbentuk bintang. Saat matang, biji di dalam buah akan berubah menjadi coklat tua, kemudian dari bijinya diolah sedemikian rupa hingga akhirnya diperoleh minyak biji sacha inchi yang merupakan sumber lipid dan protein. Mengenai kandungan kimia yang terdapat pada biji sacha inchi ini bervariasi tergantung pada biji, kondisi pertumbuhan dan pengolahan biji [10].

Saat ini tanaman sacha inchi juga banyak dibudidayakan secara komersial di Asia Tenggara, terutama di negara Thailand [5]. Secara empiris, biji sacha inchi dikonsumsi oleh masyarakat Peru setelah bijinya dipanggang hal ini bertujuan untuk mengurangi rasa pahit dan mencegah terjadinya gangguan pencernaan [16]. Bagian tanaman lainnya yaitu minyaknya digunakan secara tradisional sebagai minyak perawatan kulit untuk menjaga kelembutan dan kesehatan kulit. Minyak ini diperoleh dari biji sacha inchi yang digiling menjadi tepung kemudian diambil minyaknya, dan dioleskan pada

kulit untuk peremajaan kulit [4]. Namun, untuk tujuan komersial cara memperoleh minyak biji sacha inchi adalah dengan mengekstraksi biji dengan metode pengepresan dingin, ekstraksi soxhlet, metode karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) superkritis dan metode enzimatik[31].

Hasil minyak yang diperoleh dengan metode pengepresan dingin adalah minyak mentah, sehingga diperlukan proses pemurnian lebih lanjut yaitu dengan pengendapan kotoran dan filtrasi. Namun, karena pada metode ini dilakukan pemurnian maka minyak yang dihasilkan jauh lebih sedikit daripada dengan proses ekstraksi soxhlet [31]. Kemudian, jika metode yang digunakan adalah ekstraksi dengan menggunakan soxhlet maka hasil minyak yang diperoleh jauh lebih tinggi daripada metode pengepresan dingin, namun kualitas minyak yang dihasilkan lebih rendah karena terpapar suhu tinggi selama proses ekstraksi pelarut. Selanjutnya, terdapat metode ekstraksi karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) superkritis, metode ini merupakan metode yang paling baik untuk mengekstraksi minyak esensial karena dengan metode ini dapat memisahkan zat yang dibutuhkan secara selektif dengan memvariasikan tekanan dan suhu yang mengubah densitas CO<sub>2</sub> dan kelarutan zat terlarut dalam CO<sub>2</sub>. Dibandingkan dengan ekstraksi tradisional, ekstraksi CO<sub>2</sub> superkritis adalah teknologi bebas pelarut yang bersih karena tidak perlu memisahkan pelarut organik dari produk akhir. Suhu yang digunakan juga rendah sampai sedang dengan tujuan untuk mencegah reaksi yang tidak diinginkan dan kerusakan pada produk [31]. Waktu ekstraksi optimum yang dengan metode CO<sub>2</sub> superkritis adalah 3 jam, sedangkan untuk ekstraksi dengan soxhlet adalah 9 jam sehingga dapat dikatakan bahwa CO<sub>2</sub> superkritis membutuhkan waktu ekstraksi yang lebih singkat daripada ekstraksi pelarut dengan soxhlet. Meskipun metode CO<sub>2</sub> superkritis menggunakan suhu dan tekanan pada proses ekstraksinya dan dapat mempengaruhi laju ekstraksi serta hasil minyak yang diperoleh, namun hal tersebut tidak mempengaruhi pada komposisi minyak. Sehingga metode CO<sub>2</sub> superkritis ini dapat menjadi pilihan utama untuk mengekstraksi minyak biji sacha inchi [32].



**Gambar 2.** Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.); a) Tanaman sacha inchi; b) Bunga sacha inchi; c) Buah sacha inchi muda; d) Buah sacha inchi tua; e) Buah sacha inchi matang; f) Buah sacha inchi utuh dan yang sudah dikupas [33, 34, 35, 36, 37, 38]

### *Kandungan Senyawa Kimia Minyak Biji Sacha Inchi*

Secara tradisional, minyak biji sachu inchi digunakan di Peru sebagai minyak perawatan kulit untuk menjaga kelembutan dan kesehatan kulit, serta untuk peremajaan kulit [4]. Hal ini dikarenakan kandungan esensial yang dimiliki oleh biji sachu inchi antara lain asam lemak tak jenuh ganda seperti omega-3 (asam  $\alpha$ -linolenat), omega-6 (asam linoleat), asam lemak tak jenuh tunggal seperti omega-9 (asam oleat), vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol dan  $\delta$ -tokoferol), vitamin A (karotenoid), flavonoid, tanin, senyawa fenolik dan  $\beta$ -sitosterol [5]. Menariknya, kandungan asam lemak tak jenuh pada minyak sachu inchi memiliki persentase yang sangat besar yaitu omega-3 (40%-50%) dan omega-6 (30%-40%), hal ini yang membedakan antara minyak sachu inchi dengan minyak dari tanaman lain seperti minyak zaitun yang memiliki kandungan asam lemak tak jenuh lebih rendah yaitu omega-3 (1%) dan omega-6 (9%) [39]. Selengkapnya mengenai senyawa bioaktif yang terdapat pada tanaman sachu inchi dapat dilihat pada **tabel 1**.

### *Karakteristik Fisikokimia Minyak Biji Sacha Inchi*

Karakteristik fisikokimia dari suatu senyawa atau bahan baku dapat digunakan untuk menilai kualitas senyawa atau bahan baku tersebut, dalam kajian ini secara khusus dapat digunakan untuk menilai kualitas minyak biji sachu inchi, dan sebagai referensi untuk menentukan formula sediaan yang dibuat [22]. Hasil telaah pustaka pada **tabel 2** menunjukkan bahwa nilai indeks refraksi berada pada rentang 1.475-1.482, nilai saponifikasi pada rentang 185.20-251.72, indeks peroksida pada rentang 1.50-14.77, nilai iodin pada rentang 192.50-195.05, nilai asam pada rentang 0.37-2.40, nilai asam lemak bebas pada rentang 0.19-0.36, nilai densitas pada rentang 0.9187-0.930, dan nilai viskositas pada rentang 34.50-44.00. Hasil telaah pustaka karakteristik fisikokimia yang dimiliki oleh minyak biji sachu inchi memiliki rentang nilai yang berdekatan pada setiap parameter meskipun sampel yang diuji merupakan sampel dari negara yang berbeda. Dalam hal ini karakteristik fisikokimia yang telah jelaskan sebelumnya dapat menunjukkan kualitas atau mutu dari minyak biji sachu inchi. Kualitas minyak biji sachu inchi dapat dikatakan baik dikarenakan nilai pada masing-masing parameter memiliki nilai yang tidak berbeda jauh dengan nilai rujukannya yang ditunjukkan pada **tabel 2** [40].

### *Aktivitas Antioksidan Minyak Biji Sacha Inchi*

Hasil telaah pustaka mengenai aktivitas antioksidan minyak biji sachu inchi dapat dilihat pada **tabel 3**. Salah satu yang menarik adalah hasil penelitian yang dilakukan oleh Puangpronpitag *et al.* (2021). Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH, ABTS dan FRAP. Metode DPPH bekerja dengan cara mengukur kemampuan suatu senyawa yang bereaksi dengan DPPH, pada pengujiannya larutan DPPH akan berubah menjadi *diphenylpicrylhydrazine* karena bereaksi dengan antioksidan. Perubahan ini dapat dideteksi dengan turunnya absorbansi larutan DPPH ketika senyawa antioksidan ditambahkan. Semakin besar penurunan absorbansi maka akan semakin besar aktivitas antioksidannya. Metode ABTS adalah salah satu pemeriksaan antioksidan yang melihat kemampuan suatu zat untuk menyumbangkan atom elektron dan hidrogen ke spesies radikal ABTS yang tidak

aktif. Metode FRAP adalah metode analisis yang digunakan untuk mengukur kekuatan antioksidan dalam mereduksi Fe(III)-TPTZ menjadi Fe(II)-TPTZ dan terjadi perubahan warna dari kuning ke biru. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa minyak biji sacha inchi memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  yaitu DPPH=  $0,007 \pm 0,001$  (mg/mL), ABTS=  $1,4065 \pm 0,0505$  (mg/mL), serta FRAP=  $74.4960 \pm 2,6067$  (mg=TE/gExt) dengan kategori kuat [5].

Minyak biji sacha inchi menghasilkan nilai  $IC_{50}$  yang tergolong sangat kuat hal ini disebabkan oleh kandungan kimia yang dimiliki oleh minyak sacha inchi yaitu asam lemak tak jenuh ganda dan tunggal, polifenol, flavonoid, tanin, serta vitamin E yang dibuktikan oleh penelitian Cardenas *et al.*, (2021) [41]. Selain itu, potensi antioksidan dari flavonoid dan tanin pada minyak sacha inchi ini berperan dalam mencegah pembentukan dan penghapusan radikal bebas dengan penghambatan terhadap hidrogen peroksida dan pengurangan aktivitas ion besi menjadi besi, serta vitamin E juga menunjukkan aktivitas antioksidannya dalam sistem biologis dengan melindungi asam lemak tak jenuh dari oksidasi [5, 42]. Selain memiliki aktivitas antioksidan, minyak biji sacha inchi juga memiliki aktivitas antibakteri dibuktikan oleh penelitian yang dilakukan Gonzalez-Aspajoa, *et al.*, (2015) menunjukkan bahwa minyak sacha inchi memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* [4]. Keamanan dari minyak biji sacha inchi juga telah dilaporkan oleh Herrera-Calderon, *et al.*, (2019), dengan dilakukan pengujian toksisitas subkronik pada ikan mas dan genotoksitas pada tikus. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa minyak sacha inchi aman, tidak beracun serta tidak menyebabkan genotoksik pada ikan mas maupun pada tikus [10]. Selain itu, pada penelitian yang dilakukan Arroyo-Acevedo, *et al.*, (2018) juga melaporkan hasil pengujian keamanan dari minyak biji sacha inchi menunjukkan bahwa minyak sacha inchi memiliki efek antimutagenik tikus albino BALB/c [43].

Berdasarkan telaah pustaka mengenai aktivitas antioksidan pada minyak biji inchi yang menunjukkan bahwa minyak sacha inchi memiliki efek penghambatan terhadap radikal bebas dan dinyatakan aman berdasarkan hasil pengujian toksisitas dan genotoksitas. Hal ini mengindikasikan bahwa minyak biji sacha inchi dapat diformulasikan dalam sediaan kosmetik yang memiliki klaim sebagai *anti-aging* berdasarkan aktivitasnya sebagai antioksidan yang dapat melakukan penghambatan terhadap radikal bebas. Radikal bebas merupakan penyebab paling sering yang menyebabkan kerusakan pada kulit. Kerusakan struktur maupun lapisan kulit yang disebabkan oleh radikal bebas dapat terlihat secara jelas pada lapisan dermis yaitu pada fibroblast dan matriks ekstraseluler seperti kolagen, elastin dan substansi dasar yang mengalami penurunan fungsi sehingga mengakibatkan penuaan kulit, hilangnya elastisitas kulit dan akhirnya menjadi keriput, sehingga untuk menahan efek buruk dari radikal bebas tersebut, salah satu cara yang dapat dilakukan adalah merawat kulit dengan menggunakan antioksidan [1, 2, 44].

## *Potensi Minyak Biji Sacha Inchi Sebagai Kosmetik*

Sacha inchi pada mulanya merupakan tanaman yang berasal dari Peru, Ekuador dan Kolombia tetapi karena popularitas internasionalnya sebagai *anti-aging* dan kini telah masuk ke dalam daftar proyeksi bahan kosmetik yang menjanjikan di masa depan, akhirnya negara di luar Amerika Selatan pun telah mulai membudidayakan tanaman sachu inchi secara komersial terutama di wilayah Asia Tenggara dan salah satunya adalah negara Indonesia, namun sumber utama budidaya komersial di wilayah Asia Tenggara masih berasal dari negara Thailand.

Berdasarkan hasil pengujian skrining fitokimia, parameter fisikokimia, dan aktivitas biologi dari minyak biji sachu inchi yang telah dijelaskan sebelumnya dapat dikatakan bahwa minyak biji sachu inchi memiliki potensi untuk digunakan sebagai bahan baku kosmetik sebagai bahan aktif maupun bahan tambahan sehingga untuk memaksimalkan potensi tersebut perlu dilakukan pengembangan dan inovasi terhadap minyak biji sachu inchi agar dapat dikemas menjadi produk perawatan kulit khususnya sebagai *anti-aging*. Pada **tabel 4.** dapat dilihat bahwa minyak biji sachu inchi memiliki potensi untuk digunakan sebagai zat aktif (*anti-aging*, antioksidan), emolien (melembutkan dan menghaluskan kulit), humektan dan peningkat penetrasi.

Dengan melihat perkembangan pasar kosmetik saat ini, kosmetik dengan bahan natural telah berkembang dalam beberapa tahun terakhir, dikarenakan perubahan transisi pasar dari bahan sintesis ke bahan alami. Berdasarkan data yang dipaparkan oleh CBI terdapat beberapa bahan alami yang saat ini banyak dikembangkan dan digunakan dalam produk perawatan kulit yaitu minyak zaitun, minyak bunga matahari, minyak kelapa, shea butter, kakao butter dan minyak biji sachu inchi.

Salah satu bahan alami yang diprediksi akan menjadi tren dalam beberapa tahun ke depan adalah minyak biji sachu inchi. Minyak biji sachu inchi memiliki keunggulan pada kandungan omega-3 yang tinggi yaitu sebesar 48% dari total asam lemak yang terdapat pada minyak biji sachu inchi. Omega-3 merupakan asam lemak tak jenuh ganda yang memiliki banyak manfaat dalam perawatan kulit diantaranya berperan dalam penanganan dermatitis atopik, sebagai fotoprotektif, anti jerawat, anti inflamasi, dan *anti-aging* [44]. Sehingga untuk memaksimalkan potensi yang dimiliki oleh minyak biji sachu inchi maka perlu dilakukan pengembangan dan inovasi agar dapat dikemas menjadi produk perawatan kulit khususnya sebagai *anti-aging* yang memiliki nilai ekonomi yang tinggi.

## Kesimpulan

Hasil review mengindikasikan bahwa minyak sacha inchi memiliki potensi untuk digunakan sebagai *anti-aging* dengan senyawa aktif yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan yaitu omega-3, omega 6, omega 9, vitamin E, vitamin A, tanin, fitosterol, terpenoid, senyawa fenolik, dan terpenoid. Selain itu, mengenai nilai parameter fisikokimia juga telah diketahui sehingga dapat memberikan informasi mengenai kualitas atau mutu minyak biji sacha inchi dan terkait uji keamanan juga telah dilakukan dengan uji toksisitas dan genotoksitas. Selain memiliki potensi untuk digunakan sebagai *anti-aging*, minyak biji sacha inchi juga dapat digunakan emolien, *moisturizer*, humektan dan peningkat penetrasi.

## Daftar Pustaka

1. Barel A, Paye M, Maibach H. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. Third ed. New York: Informa Healthcare USA Inc; 2009.
2. Purwaningsih S, Ella S, Tika A. Formula Skin Lotion dengan Penambahan Karagenan dan Antioksidan Alami Dari *Rhizopora mucronata* Lamk. *Journal Akuatika*. 2014; 5(1): 55-62.
3. Hernani, Raharjo M. *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*. Jakarta: Penebar Swadaya; 2005.
4. Gonzalez-Aspajo G, Belkhelfa H, Haddioui-Hbabi L, Bourdy G, Deharo E. Sacha Inchi Oil (*Plukenetia volubilis* L.), effect on adherence of *Staphylococcus aureus* to human skin explant and keratinocytes in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;171:330-334.
5. Puangpronpitag D, Tankitjanon P, Sumalee A, Konsue A. Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of the Seedling Extracts from Inca Peanut *Plukenetia volubilis*. *Pharmacognosy Journal*. 2021;13(1):52-58.
6. Hadzich A, Gross G, Leimbach M, Ispas A, Bund A, Flores S. Characterization of *Plukenetia volubilis* L. fatty acid-based alkyd resins. *Polymer Testing*; 2020.
7. Chirinos R, Necochea O, Pedreschi R, Campos D. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) shell: an alternative source of phenolic compounds and antioxidants. *International Journal of Food Science and Technology*. 2016; 51(4): 986-993.
8. Murargo, Y. *Potensi Kosmetik Natural Indonesia dan Persyaratan Berkelanjutan Sebagai Referensi Pasar di Uni Eropa*. Belgia: Atase Keuangan KBRI Brussel; 2021.
9. Brinckmann J. *Market Analysis For Three Peruvian Natural Ingredients*. Geneva: International Trade Center; 2013.
10. Chirinos R, Zuloeta G, Pedreschi R, Mignolet E, Larondelle Y, Campos D. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 2013;141(3):1732-1739.
11. Chirinos R, Pedreschi R, Domínguez G, Campos D. Comparison of the physico-chemical and phytochemical characteristics of the oil of two *Plukenetia* species. *Food Chemistry*. 2015;173:1203-1206.

12. Herrera-Calderon O, Arroyo-Acevedo J, Chavez-Asmat R, Rojas-Armas J, Enciso-Roca E, Cerrate V *et al.* Effect of Sacha Inchi Oil (*Plukenetia volubilis* L.) on Genotoxicity in Mice (*Mus musculus*) and Subchronic Toxicity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Pharmacognosy Journal*. 2019;11(6s):1549-1557.
13. Bueno-Borges L, Sartim M, Gil C, Sampaio S, Rodrigues P, Regitano-d'Arce M. Sacha inchi seeds from sub-tropical cultivation: effects of roasting on antinutrients, antioxidant capacity and oxidative stability. *Journal of Food Science and Technology*. 2018;55(10):4159-4166.
14. Mai H, Nguyen D, Thuong Nhan N, Bach L. Physico-Chemical Properties of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Seed Oil from Vietnam. *Asian Journal of Chemistry*. 2019;32(2):335-338.
15. Benitez R, Coronell C, Martin J. Chemical Characterization Sacha Inchi (*Plukenetia Volubilis*) Seed: Oleaginosa Promising From the Colombian Amazon. *International Journal of Current Science Research and Review*. 2018; 1(1): 11-22.
16. Cisneros F, Paredes D, Arana A, Cisneros-Zevallos L. Chemical Composition, Oxidative Stability and Antioxidant Capacity of Oil Extracted from Roasted Seeds of Sacha-Inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014; 62(22): 5191-5197.
17. Ramos-Escudero F, Muñoz A, Ramos Escudero M, Viñas-Ospino A, Morales M, Asuero A. Characterization of commercial Sacha inchi oil according to its composition: tocopherols, fatty acids, sterols, triterpene and aliphatic alcohols. *Journal of Food Science and Technology*. 2019;56(10):4503-4515.
18. Valencia A, Romero-Oregon F, Vinas-Ospino A, Barriga-Rodriguez D, Munoz A, Ramos-Escudero F. Sacha Inchi Seed (*Plukenetia volubilis* L.) Oil: Terpenoids. Peru: IntechOpen; 2020.
19. Zanqui A, da Silva C, de Morais D, Santos J, Ribeiro S, Eberlin M *et al.* Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil composition varies with changes in temperature and pressure in subcritical extraction with n-propane. *Industrial Crops and Products*. 2016;87:64-70.
20. Chasquibol N, del Aguila C, Yacono J, Guinda A, Moreda W, Gomez-Coca R, i Characterization of glyceridic and unsaponifiable compounds of Sacha inchi (*Plukenetia huayllabambana* L.) oils. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 2014; 62(41): 10162-10169.
21. Paucar-Menacho L, Salvador-Reyes R, Guillén-Sánchez J, Capa-Robles J, Moreno-Rojo C. Comparative study of physical-chemical features of sacha inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.), olive oil (*Olea europaea*) and fish oil. *Scientia agropecuaria*. 2015;:279-290.
22. Vicente J, de Carvalho M, Garcia-Rojas E. Fatty acids profile of Sacha Inchi oil and blends by <sup>1</sup>H NMR and GC-FID. *Food Chemistry*. 2015;181:215-221.
23. Penagos-Calvete D, Duque V, Marimon C, Parra D, Restrepo-Arango S, Scherf-Clavel O *et al.* Glycerolipid Composition and Advanced Physicochemical Considerations of Sacha Inchi Oil toward Cosmetic Products Formulation. *Cosmetics*. 2019;6(4):70.
24. Liu Q, Xu Y, Zhang P, Na T, Tang T, Shi Y. Chemical composition and oxidative evolution of Sacha Inchi (*Plukentia volubilis* L.) oil from Xishuangbanna (China). *Grasas Y Aceites*. 2014; 65(1).

25. Kyaw T, New T, Khaing M, San P, Kyaing K, Thet T, Htun E. Studies on Nutritional Compositions of Sacha Inchi Seed and Physicochemical Characteristics of Sacha Inchi Oil. *International European Extended Enablement in Science, Engineering & Management (IEEESEM)*. 2019; 7(8).
26. Maurer N, Hatta-Sakoda B, Pascual-Chagman G, Rodriguez-Saona L. Characterization and authentication of a novel vegetable source of omega-3 fatty acids, sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Food Chemistry*. 2012;134(2):1173-1180.
27. Hidalgo L, Rogel C, Bermeo S. Characterization of Sacha Inchi Seed Oil (*Plukenetia Volubilis*) From Canton San Vicente, Manabi, Ecuador Obtained By Non-thermal Extrusion Processes. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*. 2019; 30(2): 70-79. (Belum).
28. Poomanee W, Kongin K, Sriputorn K, Leelapornpisid P. Application of factorial experimental design for optimization and development of color lipstick containing antioxidant-rich Sacha inchi oil. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021; 34(4): 1437-1444. (Belum)
29. Soimee W, Nakyai W, Charoensit P, Grandmottet F, Worasakwutiphong S, Phimnuan P *et al.* Evaluation of moisturizing and irritation potential of sachá inchi oil. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2019;19(4):915-924
30. Banov D, A S. Permeation Enhancers For topical Formulation. s.l., WIPO Patent Application WO2012109151; 2012.
31. Triana-Maldonado D, Torijano-Gutiérrez S, Giraldo-Estrada C. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oil and omega-3 concentrate from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) from Antioquia, Colombia. *Grasas y Aceites*. 2017; 68(1).
32. Jitpinit S, Siraworakun C, Sookklay Y, Nuithitikul K. Enhancement of omega-3 content in sachá inchi seed oil extracted with supercritical carbon dioxide in semi-continuous process. *Heliyon*. 2022; 8(1).
33. GBIF. *Plukenetia volubilis* L.[diunduh 30 Mei 2022]. Tersedia dari: <https://www.gbif.org/occurrence/3325514677>
34. Solomon J, Stimmel H (2021). Tropicos Specimen Data. Missouri Botanical Garden. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/hja69f> accessed via GBIF.org on 2022-05-30. <https://www.gbif.org/occurrence/1257622032>
35. GBIF. *Plukenetia volubilis* L.[diunduh 30 Mei 2022]. Tersedia dari: <https://www.gbif.org/occurrence/3321061411>
36. GBIF. *Plukenetia volubilis* L.[diunduh 30 Mei 2022]. Tersedia dari: <https://www.gbif.org/occurrence/2596327877>
37. GBIF. *Plukenetia volubilis* L.[diunduh 30 Mei 2022]. Tersedia dari: <https://www.gbif.org/occurrence/1949981386>
38. GBIF. *Plukenetia volubilis* L.[diunduh 30 Mei 2022]. Tersedia dari: <https://www.gbif.org/occurrence/1949980106>
39. Goyal A, Tanwar B, Kumar Sihag M, Sharma V. Sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.): An emerging source of nutrients, omega-3 fatty acid and phytochemicals. *Food Chemistry*. 2022; 373:131459.
40. WHO. Codex Alimentarius Commission: Part II- Amandement/Revision to the Codex Standard for Named Vegetable Oils (CXS 210-1999) - Inclusion Of Sachá Inchi Oil. WHO: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2021.

41. Cárdenas Sierra D, Gómez Rave L, Soto J. Biological Activity of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo) and Potential Uses in Human Health: A Review. *Food Technology and Biotechnology*. 2021;59(3):253-266.
42. Wang S, Zhu F, Kakuda Y. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.): Nutritional composition, biological activity, and uses. *Food Chemistry*. 2018;265:316-328.
43. Arroyo-Acevedo J, Herrera-Calderon O, Cisneros-Hilario C, Chávez-Asmat R, Anampa-Guzmán A, Enciso-Roca E *et al.* Antimutagenic Effect of *Plukenetia volubilis* (Sacha inchi) Oil in BALB/c Mice. *Annual Research & Review in Biology*. 2018;24(3):1-8.
44. Baumann L, Shagari S, Weisberg E. *Dermatology*. New York: McGraw Hill; 2009.
45. Jung J, Kwon H, Hong J, Yoon J, Park M, Jang M *et al.* Effect of Dietary Supplementation with Omega-3 Fatty Acid and Gamma-linolenic Acid on Acne Vulgaris: A Randomised, Double-blind, Controlled Trial. *Acta Dermato Venereologica*. 2014;94(5):521-525.

