

Formulasi Gel NLC Ekstrak Kalus Daun Murbei Hasil Induksi dengan NAA dan BAP

(Formulation of NLC Gel from Callus Mulberry Leaf Extract Induced by NAA and BAP)

FAIZATUN*, ERLINDHA GANGGA, SARAH ANINDITA, TITIEK MARTATI, NUR MIFTAHURROHMAH

Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila Jalan Raya Lenteng Agung Srengseng Sawah, Jagakarsa, Kota Jakarta Selatan, 12630, Indonesia

Diterima: 14 Januari 2020, Disetujui: 24 April 2020

Abstrak: Daun Murbei (*Morus alba* L.) mengandung oxyresveratrol dan berpotensi sebagai pencerah kulit. Bentuk kalus daun Murbei hasil kultur jaringan belum diketahui aktivitasnya sebagai inhibitor enzim tirosinase. Tujuan penelitian untuk formulasi gel Nanostructured Lipid Carrier (NLC) dan menentukan aktivitas inhibisi enzim tirosinase ekstrak kalus daun Murbei. Kalus akar murbei diperoleh dengan metode kultur jaringan, eksplan daun ditumbuhkan dengan penambahan zat pengatur tumbuh NAA 1,0 ppm dan BAP 2,5 ppm. Kalus daun murbei diekstraksi dengan maserasi-sonikasi. NLC dibuat menggunakan metode evaporasi pelarut, karakterisasi NLC meliputi ukuran partikel, indeks polidispersitas, zeta potensial dan morfologi partikel. NLC terbaik dibuat menjadi gel dan dievaluasi organoleptik, viskositas, sifat alir, pH, dan uji aktivitas inhibisi enzim tirosinase pada ekstrak dan gel NLC. Karakterisasi NLC meliputi ukuran partikel 189,8 nm-632,8 nm; indeks polidispersitas 0,387-0,582. Morfologi NLC bentuk sferis dan zeta potensial -7,37 mV. Gel NLC berupa semi padat, warna kuning kehijauan, homogen, viskositas 530000 cPs, sifat alir tiksotropik plastis, pH 5,26, dan aktivitas inhibisi enzim tirosinase ekstrak kalus daun Murbei dengan nilai IC_{50} sebesar 72,51 $\mu\text{g/ml}$ dan gel NLC ekstrak kalus daun Murbei IC_{50} sebesar 79,69 $\mu\text{g/ml}$. Disimpulkan ekstrak kalus daun Murbei dapat dibuat menjadi *Nanostructured Lipid Carriers* dan gel NLC memiliki potensi aktivitas pencerah kulit.

Kata kunci: Kalus, NAA, BAP, *nanostructured lipid carrier*, daun murbei.

Abstract: Mulberry Leaf (*Morus alba* L.) contains oxyresveratrol has potential as a skin lightener. The activity of mulberry leaf callus from tissue culture is unknown as an inhibitor of the tyrosinase enzyme. The aim of the study was to formulate the Nanostructured Lipid Carrier (NLC) gel and to determine the inhibitory activity of tyrosinase enzymes in mulberry leaf callus extracts. Callus was extracted by maceration-sonication. NLC is made by solvent evaporation method, NLC characterization including particle size, polydispersity index, zeta potential and particle morphology. The best NLC was made into a gel and evaluated organoleptic, viscosity, flow properties, pH, and tyrosinase enzyme inhibitory on extracts and NLC gels. The characterization of NLC includes particle size of 189.8 nm-632.8 nm; polydispersity index, 0.387-0.582. The morphology of NLC were spherical and zeta potential of -7.37 mV. NLC gel was semi-solid, greenish yellow, homogeneous, viscosity 530000 cPs, plastic thixotropic flow properties, pH 5.26, and inhibitory activity of tyrosinase enzymes (IC_{50}) of callus extract and NLC gel has 72.51 $\mu\text{g/ml}$ and 79.69 $\mu\text{g/ml}$, respectively. It can be concluded that callus extract of Mulberry leaf can be prepared into Nanostructured Lipid Carriers, NLC gels are physically and chemically stable and have the potential of lightening activity.

Keywords: Callus, NAA, BAP, *nanostructured lipid carrier*, mulberry leaf.

*Penulis korespondensi
E-mail: faizah2776@gmail.com

PENDAHULUAN

MURBEI (*Morus alba* L.) yang termasuk famili moraceae merupakan sumber senyawa fenol golongan stilben, termasuk turunan resveratrol (3,5,4'-trihidroksi-trans-stilben) dan oxyresveratrol (2,4,3',5'-tetrahidroksi-trans stilben) yang sangat potensial dalam bioindustri kosmetik. Oxyresveratrol telah diselidiki sebagai inhibitor tirosinase untuk menghindari produksi melanin secara berlebihan pada lapisan epidermal, sehingga digunakan dalam kosmetik sebagai pencerah kulit. Telah dilaporkan bahwa daun Murbei (*Morus alba* L.) memiliki kadar oxyresveratrol sebesar 144,5 µg/g. Oxyresveratrol pada ekstrak daun Murbei (*Morus alba* L.) memperlihatkan aktivitas yang tinggi sebagai inhibitor tirosinase^(1,2).

Proses pembentukan melanin pada kulit manusia terjadi dengan bantuan biokatalis (enzim) dan sinar ultraviolet (UV) dari sinar matahari. Tirosinase merupakan enzim yang berperan dalam pembentukan melanin. Enzim ini mengkatalisis dua reaksi utama dalam biosintesis melanin, yaitu hidrosilasi L-tirosin menjadi L-DOPA dan oksidasi L-DOPA menjadi dopakuinon. Senyawa dopakuinon mempunyai kereaktifan yang sangat tinggi sehingga dapat mengalami polimerisasi secara spontan membentuk dopakrom yang kemudian menjadi melanin. Untuk itu, salah satu cara yang dapat digunakan untuk menghambat pembentukan melanin adalah dengan menghambat aktivitas enzim tirosinase⁽³⁾.

Saat ini, bahan alam menjadi pusat perhatian dalam pengembangan produk kosmetik. Semakin berkembangnya zaman kebutuhan akan kosmetik dan obat-obatan semakin tinggi sehingga mengakibatkan eksplorasi tanaman yang di alam secara besar-besaran tanpa terkendali yang dapat mengakibatkan sumber daya alam terganggu. Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder yang sama dengan tanaman asalnya. Salah satu cara untuk mendapatkan metabolit sekunder dengan cara cepat dan mudah yaitu dengan cara teknik kultur jaringan. Dibidang farmasi, teknik kultur jaringan sangat menguntungkan karena dapat menghasilkan metabolit sekunder untuk keperluan obat-obatan dalam jumlah besar dalam waktu yang singkat⁽⁴⁾. Hal ini dilihat pada beberapa industri farmasi, dalam pelaksanaan kultur jaringannya terbukti menghasilkan produk metabolit seperti alkaloid yakni kodein pada tanaman *Papaver somniferum* yang penggunaannya sebagai analgesik⁽⁵⁾.

Salah satu penerapan kultur jaringan tanaman adalah untuk memproduksi metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman. Pada penelitian ini akan dilakukan upaya kultur kalus tanaman dari daun Murbei (*Morus alba* L.). Keberhasilan kultur jaringan tanaman khususnya multiplikasi sangat dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh dari golongan auxin yang sering digunakan adalah NAA (*Napthalane Acetid Acid*) dengan kadar 0,1-50 ppm. Sedangkan zat pengatur tumbuh dari golongan sitokinin yang paling sering

digunakan adalah BAP (*Benzyl Amino Purin*) dengan kisaran konsentrasi 0,01-10 ppm⁽⁶⁾.

Pada penelitian ini digunakan dua media yaitu media MS₀ dan media MS dengan kombinasi zat pengatur tumbuh berupa NAA 1,0 ppm dan BAP 2,5 ppm (media perlakuan). Golongan auksin dan BAP merupakan golongan sitokinin yang memiliki sifat lebih stabil karena tidak mudah terurai oleh reaksi enzim-enzim yang dihasilkan oleh tanaman dan tahan terhadap pemanasan pada proses sterilisasi dengan autoklaf pada tekanan uap 17,5 psi dengan temperatur 121°C (250°F). Proses mulai terjadinya kalus sampai diferensiasi berbeda-beda, tergantung jenis dan bagian tanaman yang dipakai sebagai eksplantat serta metode budidaya *in vitro* yang digunakan. Selain itu, juga zat-zat tanaman yang dibubuhkan pada medium dasar. Biasanya pada pertumbuhan dan organogenesis secara *in vitro* sangat tergantung pada interaksi antara zat pengatur tumbuh. Zat pengatur tumbuh didalam tanaman adalah senyawa organik yang bukan hara, yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat, dan dapat merubah proses fisiologi tumbuhan. Zat pengatur tumbuh didalam tanaman terdiri dari lima kelompok yaitu auxin, gibberellin, cytokinin, ethylene, dan inhibitor dengan ciri khas dan pengaruh yang berlainan terhadap proses fisiologis.

Pada penelitian ini dipilih zat pengatur tumbuh yang dapat menstimulir dan sekaligus menghambat yaitu auksin (NAA) dan sitokinin (BAP). Auksin sendiri merupakan hormon yang diproduksi dipucuk untuk pertumbuhan akar, sedangkan sitokinin merupakan hormon yang diproduksi di akar untuk pertumbuhan tunas.

Pada penelitian ini digunakan hasil ekstrak kalus daun Murbei (*Morus alba* L.) yang akan dibuat dalam bentuk *Nanostructured Lipid Carriers*. *Nanostructured Lipid Carriers* adalah suatu pembawa dengan ukuran nanopartikel berbahan campuran lemak padat dan lemak cair. Terdapat beberapa keuntungan preparasi nanopartikel menggunakan bahan lemak adalah meningkatkan kapasitas muat obat, stabilitas jangka panjang secara kimia dan fisika⁽⁶⁾.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah daun tanaman Murbei (*Morus alba* L.), larutan media MS, agar, gula pasir, myo-inositol, dan zat pengatur tumbuh : sitokinin (BAP) dan auksin (NAA), asam klorida, kalus daun murbei (*Morus alba* L.), baku pembanding asam kojat (Thornhill, Kanada), L-DOPA (SIGMA-Aldrich), tyrosinase from mushroom (SIGMA-Aldrich), larutan dapar fosfat, kalium dihidrogen fosfat, natrium hidroksida, asam oleat, setil alkohol, tween 80, propilenglikol, carbomer 940, TEA, metil paraben, propil paraben, dan air murni.

Alat. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain ELISA reader (490 nm), timbangan

analitik (AND tipe GR 200), *hot plate* dengan magnetik stirrer, lampu alkohol, agar dispenser, microwave oven, botol kultur, rak kultur, *hand sprayer* untuk alkohol, lemari pendingin, *Laminar Air Flow Cabinet*, autoklaf, *Air Conditioner* untuk mengatur temperatur, rotavapor, lumpang dan alu, alat-alat diseksi (scalpel, pinset, spatula, gunting dan jarum), corong gelas, statif, klem corong, alat-alat gelas (Pyrex), alat – alat volumetrik (pipet volume, pipet skala, labu tentukur), *Water Bath*, *Particle Size Analyzer (PSA)*, *Zeta sizer*, *Transmission Electron Microscopy* (JEOL, JEM-1010 Electron Microscope), *Viscometer Brookfield*, stirrer (Eurostar), ultra turrax (IKA Ultra-Turrax, T25, Germany), pH meter (Ultra BASIC), kamera digital, cawan penguap, pipet tetes, aluminium foil, kertas saring, dan tissue.

METODE. Penumbuhan Kultur Kalus Daun Murbei (*Morus alba L.*). Tanaman yang digunakan sebagai sumber eksplan dikarantina. Proses karantina dilakukan setiap hari pada pagi dan sore hari dengan penyemprotan larutan fungisida, bakterisida, pupuk cair, hormon mata tunas, dan air pada tanaman Murbei (*Morus Alba L.*) dengan konsentrasi masing - masing larutan sebesar 1 g/L. Proses karantina ini bertujuan untuk meminimalisir kemungkinan kontaminasi yang mungkin terjadi selama pertumbuhan eksplan menjadi kalus pada tahap inkubasi. Eksplan yang digunakan yaitu daun yang telah melewati tahapan sterilisasi eksplan (bahan tanaman) secara umum baik di luar laminar maupun di dalam laminar. Laminar sudah dalam keadaan steril serta peralatan dan eksplan yang sudah disterilisasi sudah siap didalam laminar, selanjutnya alat diseksi (pinset dan scapel) didaun/digarang diatas api Bunsen, kemudian dimasukkan kedalam air steril. Selanjutnya eksplan yang sudah disterilisasi dimasukkan kedalam cawan petri. Jaringan

eksplan yang jelek atau rusak karena proses sterilisasi dibuang, lalu dipotong sesuai kebutuhan. Eksplan yang sudah dipotong ditanam dalam botol-botol yang berisi media perlakuan. Satu botol media perlakuan berisi satu eksplan. Setelah diisi eksplan, leher botol digarang kembali, dan ditutup dengan menggunakan plastik, serta diikat menggunakan karet gelang, dan dilapisi lagi dengan plastik wrap. Setiap botol kultur yang telah berisi eksplan kemudian diletakkan pada rak kultur yang diberi pencahayaan dengan intensitas 600 lux pada suhu 200 °C.

Penyiapan Ekstrak. Kalus daun murbei dimaserasi-sonikasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 5 kali bobot kalus selama 30 menit. Dilakukan tiga kali remaserasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak cair yang diperoleh dikeringkan dengan menggunakan alat rotavapor.

Pembuatan Nanopartikel Ekstrak Kalus Daun Murbei. NLC ekstrak kalus daun Murbei dibuat dengan metode evaporasi pelarut. Lemak padat (setil alkohol), minyak lemak (asam oleat) dilebur di waterbath pada suhu 70 °C, ekstrak etanol 96% kalus daun Murbei yang telah dilarutkan dengan aseton ditambahkan ke dalam leburan. Air murni dan surfaktan (tween 80) dipanaskan pada suhu 70°C. Fase leburan lemak dimasukkan ke dalam campuran fase air dengan diaduk menggunakan magnetik stirrer pada kecepatan 600 rpm. Emulsi diaduk dengan ultra turrax pada kecepatan 23.000 rpm selama 5 menit, kemudian hasil nanopartikel didinginkan dengan air pada suhu 2-5 °C dan diaduk secara cepat. Pembuatan nanopartikel dengan variasi konsentrasi surfaktan dan ko-surfaktan mengikuti Tabel 1. Karakterisasi nanopartikel pada Tabel 2. meliputi ukuran partikel, indeks polidispersitas, zeta potensial dan morfologi

Tabel 1. Formula NLC ekstrak kalus daun murbei.

Bahan	Jumlah (%)				
	I	II	III	IV	V
Ekstrak	1	1	1	1	1
Campuran lemak (Setil alkohol & Asam oleat)	2	2	2	2	2
Surfaktan (Tween 80)	3	4	5	4	4
Ko-surfaktan (Propilenglikol)	7	7	7	6	8
Aseton	12	12	12	12	12
Air murni	ad 50 mL	ad 50 mL	ad 50 mL	ad 50 mL	ad 50 mL

Tabel 2. Karakterisasi NLC.

Formula	Organoleptik	Ukuran partikel (nm)	Indeks polidispersitas
I	Bentuk : Koloid	248,0	0,462
	Warna : Kuning kehijauan		
	Bau : Tidak berbau		
II	Bentuk : Koloid	189,8	0,578
	Warna : Kuning kehijauan		
	Bau : Tidak berbau		
III	Bentuk : Koloid	202,9	0,582
	Warna : Kuning kehijauan		
	Bau : Tidak berbau		
IV	Bentuk : Koloid	256,3	0,568
	Warna : Kuning kehijauan		
	Bau : Tidak berbau		
V	Bentuk : Koloid	632,8	0,387
	Warna : Kuning kehijauan		
	Bau : Tidak berbau		

Pembuatan Gel Nanostructured Lipid Carrier Ekstrak Kalus Daun Murbei. Karbomer 940 (0,3 g) didispersikan di air murni sebanyak 30 kali dari bobotnya. Trietanolamin dengan bobot yang sama ditambahkan sedikit demi sedikit sambil dihomogenkan dengan pengaduk stirrer sampai terbentuk basis gel. Metil paraben dan propil paraben dimasukkan dalam basis gel. NLC ekstrak kalus daun murbei ditambahkan dalam campuran basis dan diaduk sampai homogen. Propilenglikol dan air murni ditambahkan dan dihomogenkan dengan pengaduk stirrer dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit. Evaluasi sediaan gel meliputi organoleptik, viskositas dan sifat alir, homogenitas, dan pH.

Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Ekstrak dan Gel NLC Ekstrak Kalus Daun Murbei (Morus alba L.) Secara In Vitro. Pada pengujian aktivitas inhibisi enzim, uji penghambatan aktivitas enzim tirosinase dilakukan pada konsentrasi enzim tirosinase 75 U/mL, pH 6,8, waktu inkubasi 30 menit, konsentrasi substrat 10 mM dan suhu 37°C. 4 jenis larutan yang diuji, yaitu larutan blanko sampel, sampel, blanko kontrol dan kontrol. IC_{50} adalah konsentrasi yang memberikan 50% hambatan aktivitas enzim tirosinase. Pengukuran IC_{50} penghambatan tirosinase asam kojat dilakukan pada lima konsentrasi yaitu 50, 20, 10, 5 dan 2,5 ppm. Larutan sampel terdiri dari larutan ekstrak kalus daun Murbei dan larutan gel NLC ekstrak kalus daun Murbei yang telah dilarutkan dengan etanol 96% kemudian dibuat konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 µg/mL. Selama uji aktivitas, larutan uji diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Sejumlah 70 µL larutan sampel, 110 µL larutan L-DOPA, dan 30 µL larutan enzim tirosinase dimasukkan ke dalam 96-well microtiter plate. Masing-masing sampel dibuat blanko (tanpa larutan enzim tirosinase). Diinkubasi selama waktu inkubasi optimum 30 menit pada suhu 37 °C. Campuran diukur absorbansinya menggunakan

microplate reader pada panjang gelombang optimum.

Uji penghambatan enzim tirosinase ditentukan dengan mengukur absorbansi menggunakan microplate reader pada panjang gelombang optimum. Absorbansi yang terukur merupakan absorbansi pembentukan dopakrom. Dari absorbansi pengukuran ini dapat dihitung presentase inhibisi tirosinase menurut metode dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Inhibisi tirosinase} = \frac{(B - S)}{B} \times 100$$

B = absorbansi kontrol dikurangi blanko kontrol ($B_1 - B_0$)

S = absorbansi sampel dikurangi blanko sampel ($S_1 - S_0$)

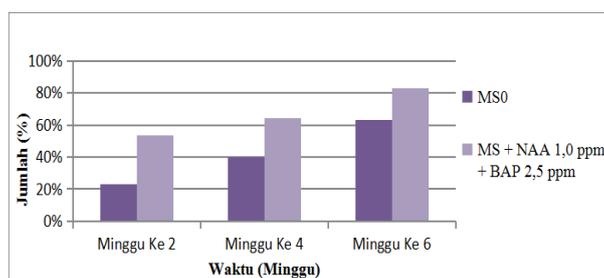
IC_{50} dihitung dengan menggunakan absorbansi persamaan regresi linier, konsentrasi sampel (dalam logaritma) sebagai sumbu x dan persen penghambatan (% inhibisi) sebagai sumbu y. Dari persamaan $y = a + bx$ dapat dihitung nilai IC_{50} . Asam kojat digunakan sebagai kontrol positif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultur Eksplan Daun Murbei. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa munculnya kalus berasal dari perlukaan saat penanaman dan penggunaan jenis media serta zat pengatur tumbuh yang dapat menstimulasi pembentukan kalus yakni ZPT NAA 1,0 ppm dan BAP 2,5 ppm. Pertumbuhan kalus diawali dengan pembengkakan pada eksplan kemudian sayatan eskplan tersebut akan bergelombang (*swelling*), hal ini terjadi dikarenakan adanya rangsangan dan respon terhadap zat pengatur tumbuh pada bagian luka tanaman tersebut. Terbentuknya kalus berasal pula dari suplai hor-

mon alamiah atau buatan dari luar ke dalam eksplan. Prosentase hasil tumbuh kalus didapatkan dengan cara membandingkan jumlah kalus yang muncul pada penanaman pertama kali dengan menggunakan media MS₀ dan media MS + NAA 1,0 ppm + BAP 2,5 ppm, masing-masing sebanyak 65 botol. Media tanpa ZPT (MS₀) digunakan sebagai blangko untuk membandingkan kecepatan induksi kalus dari eksplan daun Murbei dengan media dengan penambahan ZPT (MS + NAA 1,0 ppm + BAP 2,5 ppm). Pada media MS₀ pada ming-

gu ke 2, 4, dan 6 didapatkan hasil eksplan daun Murbei yang tumbuh menjadi kalus secara berturut-turut yaitu 15, 26, 41 botol. Sedangkan pada media MS + NAA 1,0 ppm + BAP 2,5 ppm pada minggu ke 2, 4, dan 6 didapatkan hasil eksplan daun Murbei yang tumbuh menjadi kalus secara berturut-turut yaitu 35, 42, 54 botol, lalu dijadikan dalam bentuk persen. Hasil pertumbuhan eksplan pada media MS₀ dan MS dengan penambahan NAA 1,0 ppm dan BAP 2,5 ppm dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik pengaruh zat pengatur tumbuh pada induksi media inisiasi MS₀ dan MS + NAA 1,0 ppm + BAP 2,5 ppm.

Hasil menunjukkan bahwa prosentase kalus yang terinduksi pada perlakuan NAA 1,0 ppm dan BAP 2,5 ppm mampu menginduksi kalus tercepat yaitu pada hari ke 14 sebesar 53,58% pada seluruh sampel media kultur kalus. Sedangkan prosentase kalus yang terinduksi pada perlakuan media MS₀ dapat dilihat pada hari ke 14 hanya sebesar 23,18%. Prosentase yang sangat kecil dalam pertumbuhan kalus pada media MS₀ disebabkan karena tidak adanya penambahan hormon yang dapat merangsang meningkatnya proses pembelahan sel kalus.

Setiap bagian tanaman tertentu memiliki kadar kandungan auxin dan sitokinin yang berbeda-beda. Namun pada penelitian ini digunakan daun pada mata tunas ketiga dari pucuk karena berdasarkan penelitian Galston (1995) pada sel yang tua, aktivitas oksidasi meningkat, sehingga kandungan NAA dan BAP menurun, dalam waktu lama tidak akan terbentuk kalus, sebab kemampuan membentuk jaringan baru tidak ada. Namun sebaliknya pada bagian tanaman yang masih muda maka selnya akan aktif membelah karena NAA dan BAP masih banyak terkandung pada sel yang masih muda tersebut sehingga hasil kultur yang kita dapat sesuai dengan yang ingin kita dapat.

Prosentase yang besar dalam pertumbuhan kalus pada media MS dengan penambahan NAA 1,0 ppm dan BAP 2,5 ppm dapat disebabkan karena NAA merupakan hormon yang mampu berperan menginduksi terjadinya kalus karena memiliki aktivitas yang kuat untuk memacu proses embryogenesis, dediferensiasi sel, menekan organogenesis, mendorong proses morfogenesis kalus dan menjaga pertumbuhan kalus tanaman. Sedangkan BAP berfungsi untuk pembelahan

sel dan proliferasi kalus. BAP yang ditambahkan pada media kultur akan menaikkan laju sintesis protein sehingga mendorong pembesaran dan pembelahan sel secara cepat. Pada penggunaannya kombinasi konsentrasi media MS dengan penambahan ZPT harus optimal dan memiliki kesetimbangan sehingga dapat menginduksi kalus.

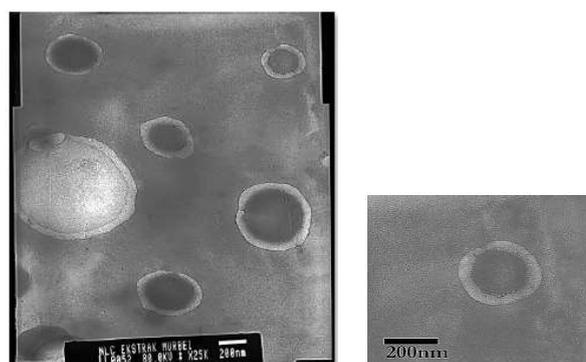
Biomassa yang terbentuk pada kalus menghasilkan pertumbuhan yang berbeda-beda setiap perlakuan. Pada penelitian ini biomassa yang terbentuk pada media MS₀ memiliki biomassa rata-rata sebesar 0,607 gram dan pada media MS dengan penambahan NAA 1,0 ppm dan BAP 2,5 ppm memiliki biomassa rata-rata sebesar 1,084 g. Berdasarkan hasil pengamatan kalus daun Murbei (*Morus alba* L.) memiliki tekstur kalus yang kompak sehingga dapat mengakumulasi banyak metabolit sekunder didalamnya dan hasil pengamatan warna kalus berwarna kehijauan yang mengindikasikan terdapat banyak klorofil didalamnya pada awal pertumbuhan kalus tetapi seiring waktu berubah menjadi warna putih kecokelatan karena disebabkan adanya peningkatan kadar fenol di dalam kalus tersebut.

Pembuatan Nanopartikel Ekstrak Kalus Daun Murbei (*Morus alba* L.). Ukuran partikel NLC pada formula I, II, III, IV, dan V didapatkan ukuran partikel terkecil yaitu pada formula II sebesar 189,8 nm, namun pada formula V terdapat perbedaan ukuran yang jauh lebih besar yaitu sebesar 632,8 nm dibandingkan dengan ukuran partikel yang dihasilkan dari formula I-IV, ukuran partikel formula V memiliki ukuran partikel yang paling besar meskipun pada dasarnya ukuran partikel pada formula V masih memasuki

rat-rata diameter partikel NLC, seperti yang diketahui bahwa rata-rata diameter partikel NLC yaitu sebesar 10-1000 nm, besarnya ukuran partikel pada formula V dapat disebabkan oleh penambahan konsentrasi kosurfaktan yang lebih besar dibandingkan dengan empat formula lainnya. Hal ini dapat dikaitkan dengan besarnya rasio dari campuran surfaktan (tween 80) dengan kosurfaktan (propilenglikol). Pada formula NLC, ketika komponen campuran surfaktan dan kosurfaktan dinaikkan, maka akan menyebabkan ukuran partikel menjadi lebih besar. Sehingga dibutuhkan konsentrasi surfaktan dan kosurfaktan yang tepat agar pada formulasi NLC yang dibuat ukuran partikel yang didapatkan dapat lebih kecil dan lebih seragam dengan formula lainnya⁽⁶⁾.

Indeks polidispersitas merupakan indeks distribusi ukuran nanopartikel. Rentang indeks polidispersitas berada pada 0 – 1, indeks polidispersitas mendekati nilai 0 menunjukkan ukuran nanopartikel terdistribusi homogen, atau tidak terjadi agregasi. Nilai indeks polidispersitas yang mendekati nilai 1 menunjukkan nanopartikel cenderung akan beragregasi karena perbedaan rentang ukuran nanopartikel cukup besar. Nilai indeks polidispersitas pada formula I, II, III, IV, dan V berada pada rentang 0,3-0,5, hal ini menunjukkan bahwa ukuran nanopartikel terdistribusi cukup homogen. Indeks polidispersitas dipengaruhi kecepatan pengadukan.

Foto morfologi nanopartikel formula II menggunakan TEM dapat dilihat pada Gambar 2 berbentuk sferis dan ekstrak terjerap pada NLC sesuai dengan pengukuran ukuran nanopartikel sebesar 189,8 nm menggunakan *particle size analyzer*.



Gambar 2. Foto hasil TEM NLC ekstrak kalus daun murbei formula II pada perbesaran 25000 x.

Didapatkan yield value dari basis gel sebesar 22440,20 dyne/cm³ dan gel NLC ekstrak kalus daun Murbei sebesar 17035,52 dyne/cm³. Angka tersebut menunjukkan bahwa yield value dari basis gel (blanko) lebih besar dibandingkan gel NLC ekstrak kalus daun Murbei. Hal ini dikarenakan pada basis gel (blanko) hanya terdiri dari basis gel saja tanpa adanya tambahan NLC ekstrak kalus daun Murbei, Ini menunjukkan bahwa

Pembuatan Gel Nanostructured Lipid Carrier (NLC) Ekstrak Kalus Daun Murbei (*Morus alba* L.). Hasil menunjukkan bahwa gel berwarna kekuningan, semi padat dan tidak berbau. Gel blanko berwarna bening, semi padat dan tidak berbau. Gel blanko dan gel NLC ekstrak kalus daun Murbei membentuk gel yang homogen, tidak terjadi pemisahan antar basis gel maupun antara basis dengan NLC ekstrak kalus daun Murbei. Evaluasi viskositas dilakukan dengan menggunakan Viscometer Brookfield LV. Pengujian viskositas dilakukan pada basis gel dan gel NLC ekstrak kalus daun Murbei, sebanyak 3 kali pengulangan pada suhu kamar dengan spindle nomor 4. Dengan nilai kv sebesar 673,7 didapatkan rata – rata viskositas dari 3 kali pengulangan dengan menggunakan seri I, seri II, dan seri III sebesar 910000 cPs untuk basis gel dan 530000 cPs untuk gel NLC ekstrak kalus daun Murbei. Perbedaan ini dipengaruhi oleh penambahan *Nanostructured Lipid Carrier* ekstrak akar Murbei yang cair.

Evaluasi sifat alir menunjukkan gel memiliki sifat alir tiksotropik plastis yang ditunjukkan dengan garis kurva menurun terdapat di sebelah kiri kurva menaik. Hal ini menunjukkan bahwa gel memiliki viskositas yang lebih rendah pada harga *rate of shear* yang menurun dibandingkan *rate of shear* pada kurva menaik. Sifat alir tiksotropi didefinisikan sebagai pemulihan isoterm dan lambat pada pendiaman suatu bahan yang kehilangan konsistensinya karena *shearing*. Grafik yang terbentuk pada basis gel dan gel NLC ekstrak kalus daun Murbei, tidak melewati titik sumbu (0,0) melainkan memotong sumbu *shearing stress*.

dengan penambahan NLC ekstrak kalus daun Murbei pada formula gel, dapat menurunkan nilai yield value dari basis gel (blanko) tersebut. Semakin besar nilai yield maka semakin sulit untuk dituang dan menyebar pada penggunaannya. Nilai yield sangat bergantung pada viskositas sehingga bila terjadi perubahan viskositas maka juga akan mempengaruhi nilai yield. Sehingga gel NLC ekstrak kalus daun Murbei lebih

mudah mengalir dari wadahnya dibandingkan basis gel (blanko) tanpa NLC ekstrak kalus daun Murbei.

Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Ekstrak dan Gel NLC Ekstrak Kalus Daun Murbei (*Morus alba* L.) Secara *In Vitro*. Hasil pengujian diperoleh nilai IC_{50} asam kojat 13,26 ppm dan termasuk dalam kriteria aktivitas penghambatan yang tinggi. Untuk pengujian aktivitas penghambatan enzim tirosinase ekstrak dan sediaan gel NLC menunjukkan bahwa kalus daun Murbei yang berumur 4 bulan dengan pemberian zat pengatur tumbuh NAA dan BAP dengan konsentrasi 1,0 ppm dan 2,5 ppm pada media perlakuan mempunyai aktivitas penghambatan enzim tirosinase dengan nilai IC_{50} sebesar 72,51 ppm. Aktifitas tersebut hampir sama dengan aktifitas pada ekstrak etanol 96% akar murbei dengan nilai IC_{50} sebesar 75,37⁽⁵⁾. Hal tersebut menunjukkan potensi kalus daun murbei sama besar dengan akar murbei dalam penghambatan aktifitas enzim tirosinase dan mempunyai potensi dalam pencerahan kulit.

Aktivitas penghambatan enzim tirosinase gel NLC ekstrak kalus daun Murbei memberikan hasil nilai IC_{50} sebesar 79,69 ppm. Terjadi penurunan nilai aktifitas penghambatan enzim tirosinase disebabkan pengaruh formulasi gel dimana komposisi atau polimer yang digunakan pada pembuatan gel mengurangi aktivitas penghambatan enzim.

SIMPULAN

Zat pengatur tumbuh NAA dan BAP menginduksi pertumbuhan kalus daun Murbei (*Morus alba* L.) pada minggu ke-6 sebesar 83,18%. Ekstrak kalus daun Murbei (*Morus alba* L.) dan Gel NLC ekstrak kalus daun Murbei (*Morus alba* L.) dapat memberikan aktivitas inhibisi enzim tirosinase yang kuat IC_{50} 72,51 $\mu\text{g/ml}$ dan 79,69 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak kalus daun Murbei (*Morus alba* L.) dapat dibuat menjadi *Nanostructured Lipid Carriers* dengan karakterisasi ukuran partikel sebesar 189,8 nm, dengan indeks polidispersitas sebesar 0,578, morfologi partikel berbentuk sferis, dan zeta potensial sebesar 7,37 mV. *Nanostructured Lipid Carriers* ekstrak daun Murbei (*Morus alba* L.) dapat dibuat menjadi sediaan gel dengan karakteristik kuning muda, berbentuk semi padat, tidak berbau, homogen, memiliki viskositas 530000 cPs, memiliki sifat alir tiksotropik plastis dan memiliki pH sebesar 5,26.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Universitas Pancasila atas dana hibah penelitian *In house* Universitas Pancasila.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hakim EH, syah YM, juliawati LD, mujahidin D. Aktifitas antioksidan dan inhibitor tirosinase beberapa stilbenoid dari tumbuhan Moraceae dan Dipterocarpaceae yang potensial untuk bahan kosmetik. Bandung: Institut Teknologi Bandung; 2008. 13(2): h.33-40
2. YZhou, J., *et al.* Variations in the Levels of Mulberroside A, Oxyresveratrol, and Resveratrol in Mulberries in Different Seasons and during Growth, *The ScientificWorld Journal*, 2013. Article ID 380692.
3. Hendaryono DPS, Wijayani A. Teknik kultur jaringan; pengenalan dan petunjuk perbanyakan tanaman secara vegetatif-modern. Yogyakarta: Kanisius. 1994. h.26-8, 31, 33,72.
4. Santoso B, Prayudyarningsih R, Rismawati A. Kultur jaringan BAP dan NAA tanaman Murbei (*Morus alba* L.) varietas KI 14 secara *in vitro*. *Jurnal Penelitian Hutan dan Konservasi Alam*. 2006;6(2): h.157-64.
5. Faizatun, Anwar E., Djajadisasa J., Mardliyati E. The study of antioxidant and antityrosinase activity of extract from mulberry root (*Morus alba* L.). *J. Pharm. Sci. & Res.* Vol. 9(10). 2017. p. 2004-8.
6. Faizatun F. and Asto Dayu S. In vitro determination of sun protection factors on ethanol extract and nanostructured lipid carrier-based gel extract of mulberry root (*Morus Alba* L.). *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 11, Special issue 1, 2018. p. 138-40.