



REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

SERTIFIKAT PATEN SEDERHANA

Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia atas nama Negara Republik Indonesia berdasarkan Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten, memberikan hak atas Paten Sederhana kepada:

Nama dan Alamat Pemegang Paten : UNIVERSITAS SURABAYA
Jalan Ngagel Jaya Selatan No. 169
SURABAYA

Untuk Invensi dengan Judul : METODE PENINGKATAN SKALA SINTESIS HIJAU
NANOPARTIKEL PERAK MENGGUNAKAN EKSTRAK
ETANOL DAUN SENDOK

Inventor : Dr. apt. Christina Avanti, M.Si.
apt. Kartini, S.Si., M.Si., Ph.D.
Johan Sukweenadhi, Ph.D.

Tanggal Penerimaan : 22 Februari 2022

Nomor Paten : IDS000005703

Tanggal Pemberian : 15 Maret 2023

Pelindungan Paten Sederhana untuk invensi tersebut diberikan untuk selama 10 tahun terhitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 23 Undang-Undang Nomor 13 Tahun 2016 tentang Paten).

Sertifikat Paten Sederhana ini dilampiri dengan deskripsi, klaim, abstrak dan gambar (jika ada) dari invensi yang tidak terpisahkan dari sertifikat ini.



a.n MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL
u.b.

Direktur Paten, Desain Tata Letak Sirkuit Terpadu dan
Rahasia Dagang



Drs. YASMON, M.L.S.
NIP. 196805201994031002

KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA RI
DIREKTORAT JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL
DIREKTORAT PATEN, DESAIN TATA LETAK SIRKUIT TERPADU DAN RAHASIA DAGANG

Jln. H.R. Rasuna Said, Kav. 8-9 Kuningan Jakarta Selatan 12940
Phone/Facs. (6221) 57905611; Website www.dgip.go.id

INFORMASI BIAYA TAHUNAN

Nomor Paten : IDS000005703 Tanggal diberi : 15 Maret 2023 Jumlah Klaim : 1
Nomor Permohonan : S00202201418 Tanggal Penerimaan : 22 Februari 2022

Berdasarkan Peraturan Pemerintah Nomor 28 tahun 2019 tentang Jenis dan Tarif Atas Jenis Penerimaan negara Bukan Pajak Yang Berlaku Pada Kementerian Hukum dan Hak Asasi Manusia, biaya tahunan yang harus dibayarkan adalah sebagaimana dalam tabel di bawah.

Perhitungan biaya tahunan yang belum dibayarkan adalah :

Biaya Tahunan Ke-	Periode Perlindungan	Batas Akhir Pembayaran	Biaya Dasar	Jml Klaim	Biaya Klaim	Total	Terlambat (Bulan)	Total Denda	Jumlah Pembayaran
1	22/02/2022-21/02/2023	14/09/2023	0	1	0	0	0	0	0
2	22/02/2023-21/02/2024	14/09/2023	0	1	0	0	0	0	0
3	22/02/2024-21/02/2025	14/09/2023	0	1	0	0	0	0	0
4	22/02/2025-21/02/2026	23/01/2025	0	1	0	0	0	0	0
5	22/02/2026-21/02/2027	23/01/2026	0	1	0	0	0	0	0
6	22/02/2027-21/02/2028	23/01/2027	1.650.000	1	50.000	1.700.000	0	0	1.700.000
7	22/02/2028-21/02/2029	23/01/2028	2.200.000	1	50.000	2.250.000	0	0	2.250.000
8	22/02/2029-21/02/2030	23/01/2029	2.750.000	1	50.000	2.800.000	0	0	2.800.000
9	22/02/2030-21/02/2031	23/01/2030	3.300.000	1	50.000	3.350.000	0	0	3.350.000
10	22/02/2031-21/02/2032	23/01/2031	3.850.000	1	50.000	3.900.000	0	0	3.900.000

Biaya yang harus dibayarkan hingga tanggal 14-09-2023 (tahun ke-1 s.d 3) adalah sebesar Rp.0 0

- Pembayaran biaya tahunan untuk pertama kali wajib dilakukan paling lambat 6 (enam) bulan terhitung sejak tanggal diberi paten
- Pembayaran biaya tahunan untuk pertama kali meliputi biaya tahunan untuk tahun pertama sejak tanggal penerimaan sampai dengan tahun diberi Paten ditambah biaya tahunan satu tahun berikutnya.
- Pembayaran biaya tahunan selanjutnya dilakukan paling lambat 1 (satu) bulan sebelum tanggal yang sama dengan Tanggal Penerimaan pada periode perlindungan tahun berikutnya.
- Permohonan penundaan pembayaran biaya tahunan akan diterima apabila diajukan paling lama 7 hari kerja sebelum tanggal jatuh tempo pembayaran biaya tahunan berikutnya, dan bukan merupakan pembayaran biaya tahunan pertama kali.
- Dalam hal biaya tahunan belum dibayarkan sampai dengan jangka waktu yang ditentukan, Paten dinyatakan dihapus



(12) PATEN INDONESIA

(11) IDS000005703 B

(19) DIREKTORAT JENDERAL
KEKAYAAN INTELEKTUAL

(45) 15 Maret 2023

(51) Klasifikasi IPC⁸ : A 61K 36/53, A 61P 31/02, B 22F 1/054
(21) No. Permohonan Paten : S00202201418
(22) Tanggal Penerimaan: 22 Februari 2022
(30) Data Prioritas :
(31) Nomor (32) Tanggal (33) Negara
(43) Tanggal Pengumuman: 30 Mei 2022
(56) Dokumen Perbandingan:
WO2012074355A1
EP3150213B1

(71) Nama dan Alamat yang Mengajukan Permohonan Paten :
UNIVERSITAS SURABAYA
Jalan Ngagel Jaya Selatan No. 169
SURABAYA
(72) Nama Inventor :
Dr. apt. Christina Avanti, M.Si., ID
apt. Kartini, S.Si., M.Si., Ph.D., ID
Johan Sukweenadhi, Ph.D., ID
(74) Nama dan Alamat Konsultan Paten :

Pemeriksa Paten : Ir. Ahmad Fauzi

Jumlah Klaim : 1

(54) Judul Invensi : METODE PENINGKATAN SKALA SINTESIS HIJAU NANOPARTIKEL PERAK MENGGUNAKAN EKSTRAK ETANOL
DAUN SENDOK

(57) Abstrak :
Invensi ini mengenai metode peningkatan skala sintesis hijau nanopartikel perak menggunakan ekstrak etanol daun sendok. Invensi ini dilakukan untuk untuk mendapatkan waktu minimum dalam menghasilkan produk akhir Plantago major nanopartikel perak (Pm-AgNPs) dengan jumlah rendemen nanopartikel perak yang optimal. Hasil tersebut dikarakterisasi dengan beberapa metode spektroskopis, mikroskopis, dan potensi aktivitas antibakterinya. Uji coba peningkatan parameter sintesis dan lama sentrifugasi ekstrak etanol daun sendok atau Plantago major L telah dilakukan dan menghasilkan kondisi optimal. Kondisi optimal sintesis hijau nanopartikel perak dilakukan pada konsentrasi ekstrak daun 0,25%, suhu 70 C, waktu sintesis 60 menit, dan waktu sentrifugasi 30 menit. Uji coba scale-up dilakukan dari volume 100 mL menjadi 1000 mL (10X up-scale) menghasilkan nanopartikel perak berbentuk bulat dengan ukuran rata-rata 12,2±5,11 nm, terbukti dari berbagai spektroskopi (UV-Vis, EDS, FTIR), pengamatan mikroskopis (SEM, FE-TEM), dan pengamatan lainnya (SAED, DLS, XRD). Nanopartikel perak yang disintesis juga menunjukkan aktivitas antibakteri yang menjanjikan terhadap beberapa bakteri yang diuji pada dosis 20 g mL⁻¹. Invensi ini menawarkan rendemen hasil sembilan kali lebih tinggi dari nanopartikel perak yang disintesis (107,2±6,82 mg) pada lama proses yang hampir sama untuk skala yang lebih kecil.



Deskripsi

METODE PENINGKATAN SKALA SINTESIS HIJAU NANOPARTIKEL PERAK MENGUNAKAN EKSTRAK ETANOL DAUN SENDOK

5

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini mengenai metode peningkatan skala sintesis hijau nanopartikel perak menggunakan ekstrak etanol daun sendok (*Plantago major* L) untuk peningkatan potensi antibakterinya. Lebih khusus lagi, invensi ini berhubungan dengan metode peningkatan skala sintesis hijau/sintesis biologis nanopartikel perak dengan menggunakan ekstrak etanol *Plantago major* L. (daun sendok), yang difungsikan untuk mendapatkan waktu minimum dalam menghasilkan produk akhir yang disebut *Plantago major* nanopartikel perak (Pm-AgNPs) dengan jumlah rendemen nanopartikel perak yang optimal. Hasil dikarakterisasi dengan beberapa metode spektroskopis, mikroskopis, dan potensi aktivitas antibakterinya.

Latar Belakang Invensi

Nanoteknologi adalah metode yang umum digunakan dalam bidang kefarmasian untuk meningkatkan beberapa karakteristik bahan aktif obat seperti spesifisitas target, permeabilitas, aktivitas, kelarutan, stabilitas, bioavailabilitas, dan efek farmakologis (Blanco-Fernandez et al., 2020). Nanopartikel memiliki banyak jenis seperti nanopartikel logam, keramik, dan sebagainya. Nanopartikel yang menjadi trend untuk bahan aktif masa kini adalah nanopartikel logam, terutama nanopartikel perak. Nanopartikel perak (AgNPs) banyak digunakan untuk antibakteri, antikanker, antiinflamasi, dan pengobatan luka (P. Singh et al., 2015).

Nanopartikel perak dapat disintesis dengan metode fisika, kimia, dan biologi. Metode fisika saat ini kurang populer karena kebutuhan energinya yang cukup besar. Penelusuran paten Nomor WO2012074355A1 diberikan pada tanggal 7 Juni 2012 telah

9



diungkapkan tentang metode pembuatan nanopartikel perak secara kimia menggunakan pelarut polar pentaerythritol. Residu kimia kurang sesuai untuk bahan aktif obat karena masalah keamanannya dan pengaruhnya pada lingkungan.

5 Metode fisika dan kimia dihindari karena berbagai masalah energi dan lingkungan, sedangkan metode biologis atau disebut sintesis hijau lebih disukai karena lebih ramah lingkungan dan hemat energi. Dalam kondisi saat ini, ketika isu lingkungan menjadi bagian penting dari keseluruhan rangkaian proses di
10 industri, nanopartikel yang dihasilkan dengan metode sintesis hijau lebih berharga daripada yang dihasilkan dengan metode kimia karena lebih sedikit kemungkinan adanya residu toksik organik, produksi yang minim pemborosan, volume produksi yang tinggi, dan hasil pengulangan yang baik (Soshnikova *et al.*,
15 2018). Metode sintesis hijau dapat dilakukan menggunakan tanaman, bakteri, khamir, dan virus. Diketahui bahwa protein, asam amino, asam organik, vitamin, dan metabolit sekunder tumbuhan seperti flavonoid, alkaloid, terpenoid, komponen heterosiklik, dan polisakarida memiliki peran penting dalam
20 sintesis nanopartikel logam, bertindak sebagai agen pereduksi dan *capping agent* (Duan *et al.*, 2015). Penggunaan tanaman untuk sintesis nanopartikel lebih sederhana bila dibandingkan dengan penggunaan mikroba, karena tidak perlu menyiapkan media dan melakukan kultur sel (Gomathi *et al.*, 2020; Ramesh *et al.*,
25 2018). Salah satu tanaman yang digunakan untuk biosintesis nanopartikel perak adalah *Plantago major* L.

Plantago major L. atau daun sendok, merupakan tanaman dari family plantaginaceae yang tumbuh di wilayah Indonesia. Manfaat Plantago major L. telah diakui sebagai obat tradisional secara
30 global selama bertahun-tahun. Tanaman ini memiliki senyawa bioaktif seperti alkaloid, asam lemak, flavonoid, terpenoid, turunan asam fenolik, vitamin dan sebagainya yang mempunyai efek terapeutik spesifik (Adom *et al.*, 2017; Yernazarova *et al.*, 2019; Zubair *et al.*, 2019). Daun sendok telah dikenal luas



khasiatnya dalam penyembuhan luka secara empiris (Amini et al., 2010; Gonçalves and Romano, 2016; Kartini et al., 2018).

5 Dari hasil penelusuran Paten No. EP3150213B1 yang diberikan pada 5 April 2017 telah mempublikasikan penggunaan 10% ekstrak
tanaman *Plantago major* L. dalam komposisi obat yang memiliki
aktivitas antibiotik, anti-inflamasi dan penyembuhan luka. Di
klaim juga bahwa tanaman yang sehari-hari dianggap gulma ini
juga memiliki aktivitas antibakteri (Dewi et al., 2019) dan
aktivitas antioksidan (Kartini et al., 2019). Berdasarkan
10 analisis fitokimia, ditemukan kandungan plantamajoside dan
polifenol yang tinggi dalam ekstrak etanolnya (Nazarizadeh et
al., 2013; Zubair et al., 2016). Kandungan polifenol diduga
sebagai komponen yang bertanggung jawab dalam proses penyembuhan
luka (Zubair et al., 2019), sedangkan plantamajoside, turunan
15 asam kafeat, diketahui memiliki aktivitas biologis sebagai agen
antiinflamasi, antioksidan dan antibakteri (Gonçalves and
Romano, 2016; Zubair et al., 2016).

Sintesis nanopartikel perak menggunakan ekstrak etanol daun
sendok dalam skala kecil telah dilakukan. Peningkatan skala
20 perlu dilakukan karena rendemen nanopartikel yang dihasilkan
dari skala kecil tersebut tidak mencukupi untuk penelitian lebih
lanjut, terutama uji aktivitas dan toksisitas yang memerlukan
rendemen dalam jumlah yang cukup besar. Namun demikian, hingga
kini informasi tentang metode peningkatan skala produksinya
25 masih terbatas.

Dari hasil penelitian telah dilakukan peningkatan skala
produksi untuk memenuhi kebutuhan melakukan uji aktivitas dan
uji toksisitas lebih lanjut. Inovasi metode yang telah
dihasilkan dari penelitian diikuti dengan hasil karakterisasi
30 inovasi ini memiliki keunggulan dalam pemilihan metode yang
ramah lingkungan, serta penggunaan daun sendok yang dianggap
sebagai gulma oleh masyarakat. Metode sintesis hijau juga
menguntungkan dibandingkan metode sintesis yang lain karena
tidak ada residu toksik organik, produksi yang minim pemborosan,
35 volume produksi yang tinggi, dan hasil pengulangan yang baik.

4



Invensi ini menawarkan penggunaan volume yang lebih besar dengan hasil nanopartikel sembilan kali lebih besar dengan cara yang lebih efisien.

5 Dalam invensi ini, AgNPs disintesis menggunakan ekstrak etanol ekstrak daun *P. major* tanpa zat pereduksi toksik. *Up-scaling* dilakukan dengan meningkatkan volume sintesis dan volume sentrifugasi. Tahap awal dari invensi ini adalah melakukan optimasi beberapa parameter sintesis. Tujuannya adalah untuk mendapatkan waktu minimum untuk menghasilkan jumlah rendemen
10 nanopartikel perak yang optimal pada proses *Up-scale*. Produk akhir disebut *Plantago major* L. mediated Silver Nanoparticle (Pm-AgNPs) dicirikan oleh spektra dari metode spektroskopis dan morfologi dengan metode mikroskopis, serta aktivitas antibakterinya terhadap bakteri gram positif dan bakteri gram
15 negative, yang diamati dengan teknik difusi sumur. Invensi ini adalah invensi pertama yang melaporkan sintesis nanopartikel perak skala hijau yang dioptimalkan dari ekstrak etanol daun sendok (*Plantago major* L.). Jumlah nanopartikel yang cukup akan memberikan lebih banyak sumber daya untuk melakukan eksperimen
20 lebih lanjut, seperti uji bioaktivitas dan/atau eksperimen formulasi.

Uraian Singkat Invensi

25 Invensi yang diusulkan merupakan suatu metode sintesis hijau nanopartikel perak yang dilakukan dengan menggunakan ekstrak tanaman *Plantago major* L. (Tanaman daun sendok dalam bahasa Indonesia), khususnya pada bagian daunnya. Pada invensi ini daun sendok diekstraksi dengan menggunakan larutan etanol, menggunakan metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) atau
30 metode ekstraksi ultrasonik. Proses bioreduksi yang menggunakan perak nitrat/ AgNO_3 , ditandai dengan perubahan warna menjadi coklat (yang menunjukkan terbentuknya nanopartikel perak) yang mampu dideteksi menggunakan spektrofotometer sinar ganda lembayung ultra dan sinar tampak, untuk selanjutnya di
35 sentrifugasi untuk mempermudah proses panennya. *Up-scaling* pada



invensi ini dilakukan dengan menaikkan volume sintesis dari 100 mL menjadi 1000 mL (10X *up-scaling*). Pengecekan ukuran dan distribusi nanopartikel dilakukan dengan metode *Dynamic Light Scattering* (DLS). Difraksi sinar-X (XRD) menggunakan spektrofotometer sinar-X dilakukan untuk mengetahui distribusi fasa, kristalinitas, dan kemurnian nanopartikel perak hasil sintesis hijau. Bentuk, morfologi, dan distribusi unsur Pm-AgNPs dianalisis dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM). Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi pada media Muller Hinton Agar (MHA). Uji ini dilakukan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, dan *Escherichia coli* ATCC 25.922. Selanjutnya uji statistik pada invensi ini menggunakan ANOVA dilanjutkan dengan uji Tukey menggunakan *software* statistik GraphPad Prism.

Invensi ini memiliki keunggulan dalam pemilihan metode invensi yang ramah lingkungan, serta penggunaan daun sendok yang dianggap sebagai gulma oleh masyarakat. Penggunaan tanaman untuk sintesis nanopartikel hijau lebih bermanfaat untuk sumber daya mikroorganisme. Metode sintesis hijau juga menguntungkan dibandingkan metode sintesis yang lain karena tidak ada residu toksik organik, produksi yang minim pemborosan, volume produksi yang tinggi, dan hasil pengulangan yang baik. Invensi ini menawarkan penggunaan volume sintesis dari 100 ml ke 1000 ml yang menghasilkan rendemen nanopartikel sembilan kali lebih besar dengan cara yang lebih efisien. Pada proses optimasi waktu kdalam rentang panjang gelombang maksimum yang sama (420-430 nm), terjadi penurunan absorbansi seiring bertambahnya durasi sentrifugasi, tetapi pada menit ke-30 dan 45, tidak ada lagi penurunan nilai absorbansi (mengacu pada gambar tambahan Slc). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa waktu sentrifugasi yang optimum untuk mendapatkan nanopartikel perak yang optimal adalah 30 menit. Hasil nanopartikel yang didapatkan dari uji coba peningkatan skala tersebut adalah $107,2 \pm 6,82$ mg ($4,29 \pm 0,27\%$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa sintesis hijau skala besar

J



dilakukan dengan efisien dalam memberikan rendemen nanopartikel yang lebih banyak. Proses optimasi *up-scaling* ini perlu dilakukan karena peningkatan skala sintesis dapat mengubah laju perpindahan panas per massa, yang dapat menyebabkan perbedaan pembentukan nanopartikel dan proses nukleasi, sehingga dapat mempengaruhi hasil pada sintesis hijau. Efikasi nanopartikel perak hasil sintesis lebih unggul dari yang ditunjukkan oleh larutan AgNO_3 , tetapi setara dibandingkan dengan kloramfenikol dan gentamisin. Hasil tersebut ditunjukkan pada **gambar 4**, yang menunjukkan diameter daerah zona bening mengkonfirmasi Pm-Ag NPs dari 10 g mL^{-1} dan 20 g mL^{-1} memiliki aktivitas antibakteri yang berbeda secara signifikan dengan AgNO_3 dan berbeda tidak signifikan dengan antibiotik yang diuji sebagai kontrol positif.

15 Uraian Singkat Gambar

Untuk memudahkan pemahaman mengenai invensi ini, selanjutnya akan disertakan gambar-gambar terkait, yaitu:

Gambar 1, adalah gambar spektrum UV-Vis larutan Pm-AgNPs diperoleh dari sintesis hijau menggunakan berbagai ekstrak etanol daun sendok (b/v) pada suhu yang berbeda: (a) 60°C , (b) 70°C , dan (c) 80°C .

Gambar 2, adalah gambar (a) Pola SAED, (b) spektrum EDS, (c) pola XRD NP Pm-Ag, dan (d) pemetaan distribusi unsur NP Pm-AgNPs.

Gambar 3, adalah gambar spektrum FT-IR larutan Pm-AgNPs dibandingkan dengan AgNO_3 dan ekstrak etanol daun sendok.

Gambar 4, adalah gambar Hasil representatif uji aktivitas antibiotik Pm-AgNPs terhadap (a) *S. aureus*, (b) *E. coli* dan (c) *P. aeruginosa*. Informasi Labeling sebagai berikut: 1 = Blanko (tidak ada sampel); 2 = Akuades; 3 = 0,25% Ekstrak *P. major*; 4 = AgNO_3 1 mM; 5 = Pm-AgNPs 10 g mL^{-1} ; 6 = Pm-AgNPs 20 g mL^{-1} ; 7 = Kontrol positif (Kloramfenikol 250 g mL^{-1} atau Gentamisin 100 g mL^{-1}).

7



Gambar sla, adalah Gambar larutan percobaan up-scaling menggunakan ekstrak *Plantago major* 0,25% pada suhu 70°C.

Gambar slb, adalah gambar pembentukan nanopartikel menggunakan spektro UV-Vis.

5 Gambar slc, adalah gambar spektro UV-Vis supernatant.

Uraian Lengkap Invensi

Metode sintesis hijau nanopartikel perak menggunakan ekstrak etanol daun sendok dan aktivitas anti bakteri dilakukan dalam beberapa tahapan, yaitu :

Ekstraksi tanaman daun sendok/*Plantago major* L. sebagai bioreduktor dengan cara:

Daun kering *P. major* diperoleh dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Obat dan Obat Tradisional Tanaman ("Balai Besar Penelitian dan Pengembangan tanaman Obat dan Obat Tradisional", Tawangmangu, Jawa Tengah, Indonesia). Daun kering diserbukkan dan disortir dengan menggunakan mixer dan jaring sortir 20 mesh untuk mendapatkan ukuran partikel serbuk yang seragam. Serbuk halus daun diekstraksi menggunakan etanol 50% (10% b/v), dengan menggunakan *Ultrasonic-Assisted Extraction* (UAE) dengan frekuensi 37 kHz selama 20 menit, kemudian ekstrak disaring dengan filter Whatmann dan disimpan di lemari pendingin (4°C) untuk proses lebih lanjut.

Sintesis hijau nanopartikel perak dan optimalisasi skala peningkatannya:

Proses bioreduksi dilakukan dengan menggunakan perak nitrat (AgNO_3) dengan berbagai konsentrasi (b/v). Masing-masing ekstrak daun *P. major* dengan konsentrasi 0,25%, 0,50%, dan 1,00% dicampur dengan larutan AgNO_3 hingga mencapai konsentrasi akhir 1 mM. Untuk mengetahui proses reduksi partikel yang optimal, maka dilakukan proses sintesis pada berbagai temperatur (60°C, 70°C, dan 80°C) selama 60 menit, dengan pengamatan perubahan warna dan nilai absorbansinya pada spektrofotometer UV-Vis (Mengacu pada

4



Gambar 1). Proses pemanasan dan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer hot plate* (Thermo Scientific Cimarec, Barnstead Thermolyne, NH, USA). pH larutan diatur hingga 10 dengan menambahkan NaOH 0,2 M secara perlahan. Semua pengukuran dilakukan dengan tiga ulangan independen.

Tabel 1. Jumlah rendemen Pm-AgNPs pada berbagai suhu inkubasi sintesis pada skala kecil

The yield of Pm-Ag NPs on Small Scale Synthesis.

The concentration of <i>P. major</i> Leaf Extract	Green synthesis Temperature		
	60 °C	70 °C	80 °C
0.25%	11.2 ± 0.87	11.9 ± 0.57	10.8 ± 0.93
	mg ^a	mg ^a	mg ^{ab}
0.50%	4.48 ± 0.35% ^a	4.75 ± 0.23% ^a	4.33 ± 0.37% ^a
	8.5 ± 0.82 mg ^b	8.9 ± 0.85 mg ^b	8.1 ± 0.98 mg ^b
1.00%	3.40 ± 0.33% ^b	3.56 ± 0.34% ^b	3.25 ± 0.39% ^b
	5.9 ± 0.91 mg ^c	6.1 ± 0.97 mg ^c	5.6 ± 0.91 mg ^c
	2.37 ± 0.36% ^c	2.43 ± 0.39% ^c	2.33 ± 0.36% ^c

10

Pengamatan dilakukan dengan melihat perubahan warna menjadi coklat kemerahan yang menandai terbentuknya nanopartikel perak. Resonansi plasmon nanopartikel perak dideteksi menggunakan spektrofotometer sinar ultraviolet tampak ganda (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) dengan merekam absorbansi maksimum pada rentang panjang gelombang antara 300 dan 500 nm. Selanjutnya dilakukan proses pemurnian dan pengumpulan nanopartikel perak hasil sintesis dari ekstrak *P. major* (Pm-Ag NPs) dengan sentrifugasi pada 2000 rpm selama 10 menit (Hettich® Zentrifugen D-78.532, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Jerman) diikuti dengan sentrifugasi pada 11.000 rpm selama 15 menit (Sorvall™ Legend™ Micro 17R Microcentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Uji coba peningkatan skala (*up scaling*) dilakukan dengan meningkatkan volume sintesis dari 100 mL menjadi 1000 mL (10x *up-scale*) dengan kondisi optimal yang telah diperoleh dari proses sintesis skala kecilnya. Pertama, Pm-Ag NPs dikumpulkan dengan sentrifugasi pada 2000 rpm selama 10 menit, untuk

9



menghilangkan kotoran/ substansi yang tidak diinginkan. Supernatan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 300-500 nm dengan spektrofotometer. Untuk pengumpulan nanopartikel perak, langkah sentrifugasi terakhir dilakukan dengan 8 tabung dan masing-masing tabung diisi dengan 35 ml (35x up-scale) supernatan yang telah dimurnikan pada 11.000 rpm (Sorvall™ Biofuge Stratos centrifuge, Thermo Scientific Nalgene, Rochester, NY, USA). Durasi sentrifugasi dioptimalkan dengan melakukan sentrifugasi pada berbagai durasi yaitu 5, 15, 30, dan 45 menit. Pm-Ag NPs diperoleh setelah sentrifugasi 11.000 rpm dicuci menggunakan air de-ionisasi untuk menghilangkan komponen yang tidak diinginkan. Pelet dikeringkan pada suhu kamar hingga mencapai berat konstan dan digunakan untuk karakterisasi lebih lanjut dan uji aktivitas antibakteri. Hasil pengeringan itulah rendemen nanopartikel perak yang dihasilkan dari proses sintesis hijau menggunakan ekstrak etanol daun sendok.

Karakterisasi nanopartikel perak sintesis hijau:

Estimasi ukuran partikel dan distribusinya dilakukan melalui teknik *Dynamic Light Scattering* (DLS; Delsa™ Nano C Particle Analyzer, Beckman-Coulter, USA). Data dianalisis berdasarkan tiga tes ulangan.

Tabel 2. Diameter rata-rata partikel dan indeks polidispersibilitas Pm-AgNPS pada skala kecil

Particle Size Average and Polydispersity Index of Pm-Ag NPs on Small Scale Synthesis.

The concentration of <i>P. major</i> Leaf Extract	Green synthesis Temperature		
	60 °C	70 °C	80 °C
0.25%	8.9 ± 3.56 nm ^d	10.3 ± 3.98 nm ^{cd}	22.1 ± 9.34 nm ^c
	PDI = 0.16	PDI = 0.15	PDI = 0.18
0.50%	49.3 ± 21.56 nm ^{bc}	62.7 ± 28.3 nm ^b	76.8 ± 33.2 nm ^{ab}
	PDI = 0.19	PDI = 0.20	PDI = 0.19
1.00%	74.1 ± 34.2 nm ^{ab}	82.2 ± 44.1 nm ^a	91.8 ± 49.8 nm ^a
	PDI = 0.21	PDI = 0.29	PDI = 0.29

4



Difraksi sinar-X (XRD) dilakukan untuk mengetahui distribusi fasa, kristalinitas, dan kemurnian nanopartikel perak hasil sintesis. Analisis XRD dilakukan dengan menggunakan spektrometer sinar-X (D8-Advance, Bruker, Germany) yang dioperasikan pada 40 kV, 40 mA, dengan radiasi Cu(K α) ($\lambda = 1,54$), kecepatan pengamatan: 4 min, ukuran langkah 0,02, dalam kisaran sudut difraksi (2θ) dari 10° hingga 90° (Lohrasbi et al., 2019). Bentuk, morfologi, dan distribusi unsur NP Pm-Ag dianalisis dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM; JSM-6510, JEOL Co. Ltd., Japan) dengan pelapis (Coater JFC-1600, JEOL Co. Ltd., Jepang) dan Mikroskop Elektron Transmisi Emisi Lapangan (FE-TEM) dengan JEM-2100F (JEOL Co. Ltd., Jepang) untuk memeriksa pemetaan unsurnya. Instrumen dioperasikan pada 200 kV. Selanjutnya, pemetaan unsur, pola difraksi area terpilih (SAED) (Mengacu pada **Gambar 2**), dan spektroskopi sinar-X dispersi energi (EDX) nanopartikel telah dilakukan menggunakan FE-TEM (JEOL, Tokyo, Jepang). Pengujian menggunakan spektroskopi Fourier Transform Infra-Red (FTIR; Jasco FT / IR 4200, Jerman) dilakukan untuk menentukan gugus fungsi tanaman yang ada dalam Pm-AgNPs (Mengacu pada **Gambar 3**).

Uji antibakteri nanopartikel perak yang disintesis:

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan Metode difusi pada media Muller Hinton Agar (MHA). Uji ini dilakukan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, dan *Escherichia coli* ATCC 25.922. Kloramfenikol (250 g mL^{-1}) dan Gentamisin (100 g mL^{-1}) digunakan masing-masing sebagai kontrol positif terhadap bakteri Gram-Positif dan Gram-Negatif. Semua bakteri yang diuji disegarkan dengan subkultur pada Nutrient Broth (NB) dan diinkubasi pada suhu 37°C semalaman. Kultur suspensi bakteri sebanyak 100 μl ditebarkan di atas permukaan media MHA sebelum kertas cakram diberikan pada lokasi tertentu di bagian atas MHA. 20 μl dari beberapa sampel dijatuhkan di bagian atas setiap disk. Kultur diinkubasi selama 48 jam dan kemudian diameter area



bening didokumentasikan (Mengacu pada **Gambar 4**). Setiap perlakuan dilakukan sebagai tiga ulangan individu.

Tabel 3. Aktivitas antibakteri dari Pm-AgNPs

Antibacterial properties of Pm-Ag NPs.

Code	Sample	Clear Zone Diameter (mm) against		
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
1	Blank	0 ^f	0 ^f	0 ^f
2	Aquadest	0 ^f	0 ^f	0 ^f
3	0.25% <i>P. major</i> Extract	0 ^f	0 ^f	0 ^f
4	AgNO ₃ 1mM	5.73±0.164 ^a	6.85±0.393 ^d	9.56±0.351 ^{ab}
5	Pm-Ag NPs 10 µg mL ⁻¹	5.76±0.127 ^e	7.42±0.252 ^{bc}	9.12±0.152 ^b
6	Pm-Ag NPs 20 µg mL ⁻¹	7.31±0.532 ^{bc}	8.59±0.582 ^b	9.91±0.222 ^{ab}
7	Positive control	7.14±0.310 ^c	8.13±0.267 ^{bc}	10.54±1.084 ^a

5

Analisis statistik

Analisis statistik untuk semua nilai disajikan sebagai mean ± SEM atau mean±SD, n = 3. Untuk perbandingan beberapa variabel, data dianalisis dengan ANOVA dilanjutkan dengan uji Tukey menggunakan software statistik GraphPad Prism (GraphPad Software Inc. Windows Version 5.01). Perbedaan signifikan pada P < 0,05.

10

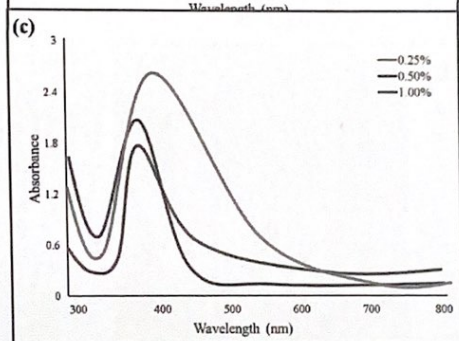
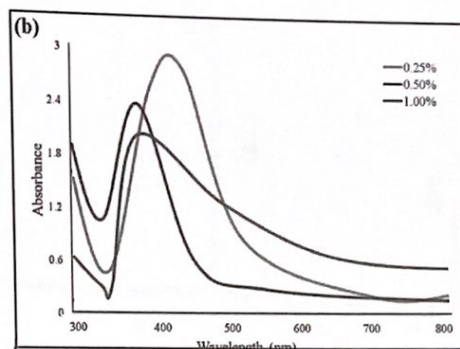
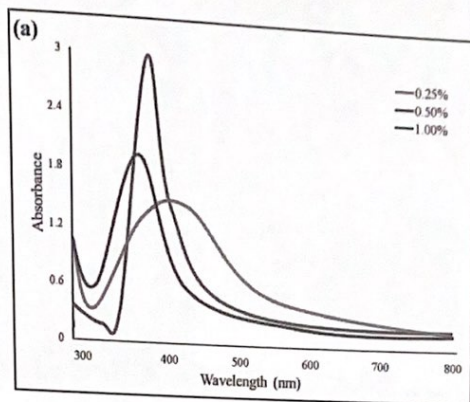
**Klaim**

1. Metode peningkatan skala sintesis hijau nanopartikel perak menggunakan ekstrak etanol daun sendok (*Plantago major* L) dari skala lab 100 mL menjadi 1000 mL (10x *up-scale*), yang difungsikan untuk mendapatkan waktu minimum dalam menghasilkan produk akhir *Plantago major* nanopartikel perak (Pm-AgNPs) dengan jumlah rendemen nanopartikel perak sembilan kali lebih besar dan karakteristik fisik optimal dengan tahapan sebagai berikut:
 - a. mengekstraksi bagian daun dari tanaman daun sendok/*Plantago major* L menggunakan etanol 50% (10% b/v) dan metode Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE), frekuensi 37 kHz selama 20 menit, lalu menyaringnya dengan filter Whatman. Ekstrak yang dihasilkan digunakan untuk proses bioreduksi,
 - b. mensintesis nanopartikel perak hijau dengan bioreduksi menggunakan ekstrak etanol daun sendok dan meningkatkan skala produksinya dari 100 mL menjadi 1000 mL (10x *up-scale*) dengan menggunakan perak nitrat (AgNO_3) konsentrasi 0,25% (b/v) dilakukan pada temperatur 70°C selama 60 menit, serta waktu sentrifugasi 30 menit.

Abstrak**METODE PENINGKATAN SKALA SINTESIS HIJAU NANOPARTIKEL PERAK
MENGUNAKAN EKSTRAK ETANOL DAUN SENDOK**

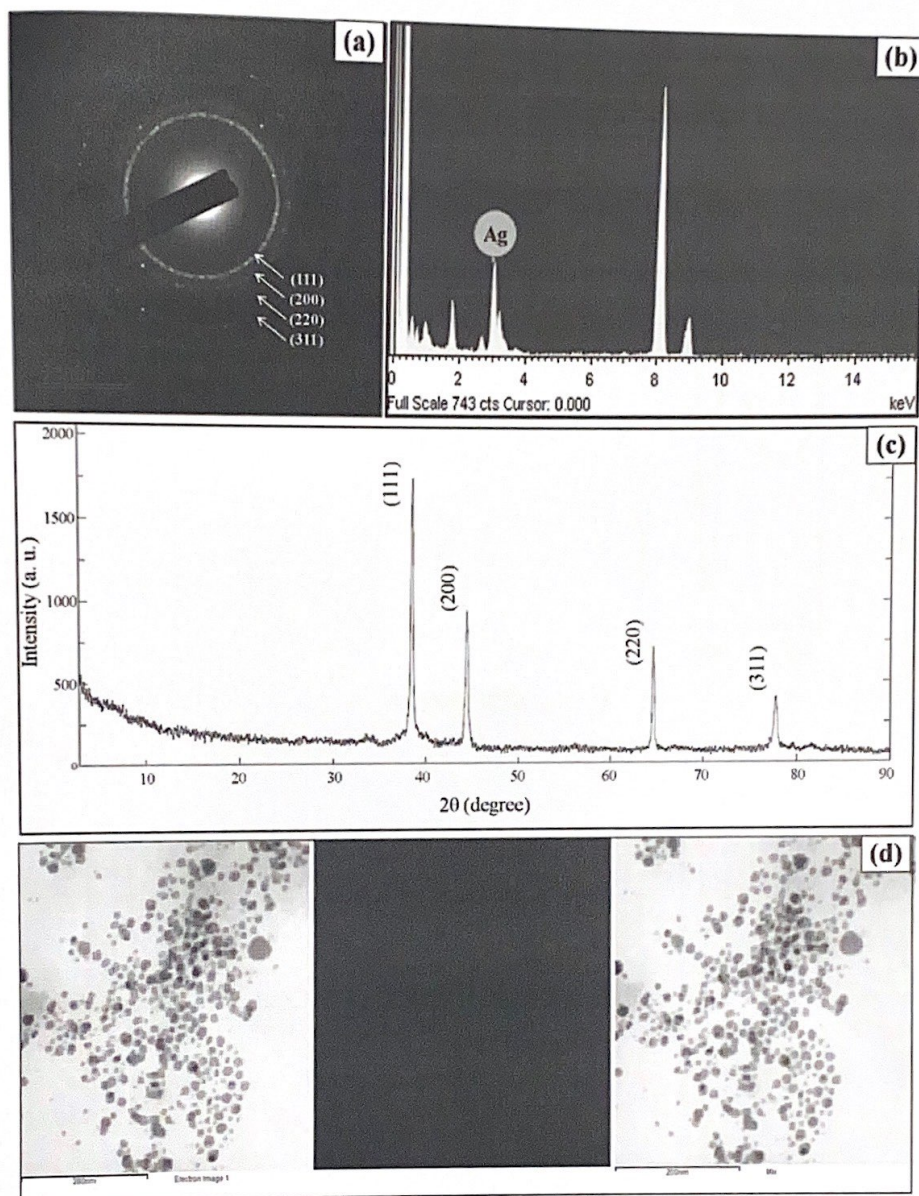
Invensi ini mengenai metode peningkatan skala sintesis hijau nanopartikel perak menggunakan ekstrak etanol daun sendok.

- 5 Invensi ini dilakukan untuk untuk mendapatkan waktu minimum dalam menghasilkan produk akhir *Plantago major* nanopartikel perak (Pm-AgNPs) dengan jumlah rendemen nanopartikel perak yang optimal. Hasil tersebut dikarakterisasi dengan beberapa metode spektroskopis, mikroskopis, dan potensi aktivitas
- 10 antibakterinya. Uji coba peningkatan parameter sintesis dan lama sentrifugasi ekstrak etanol daun sendok atau *Plantago major* L telah dilakukan dan menghasilkan kondisi optimal. Kondisi optimal sintesis hijau nanopartikel perak dilakukan pada konsentrasi ekstrak daun 0,25%, suhu 70 C, waktu sintesis 60
- 15 menit, dan waktu sentrifugasi 30 menit. Uji coba scale-up dilakukan dari volume 100 mL menjadi 1000 mL (10X up-scale) menghasilkan nanopartikel perak berbentuk bulat dengan ukuran rata-rata $12,2 \pm 5,11$ nm, terbukti dari berbagai spektroskopi (UV-Vis, EDS, FTIR), pengamatan mikroskopis (SEM, FE-TEM), dan
- 20 pengamatan lainnya (SAED, DLS, XRD). Nanopartikel perak yang disintesis juga menunjukkan aktivitas antibakteri yang menjanjikan terhadap beberapa bakteri yang diuji pada dosis 20 g mL⁻¹. Invensi ini menawarkan rendemen hasil sembilan kali lebih tinggi dari nanopartikel perak yang disintesis ($107,2 \pm 6,82$ mg)
- 25 pada lama proses yang hampir sama untuk skala yang lebih kecil.



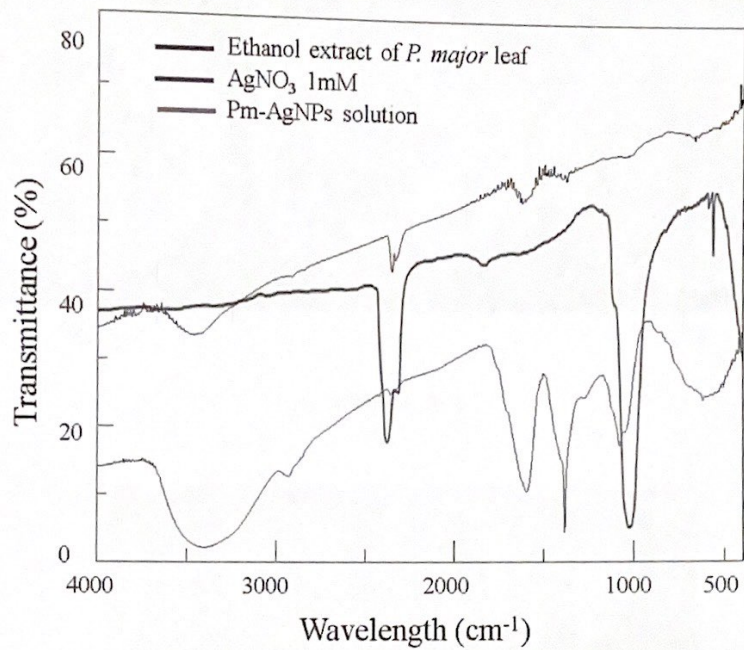
Gambar 1

f



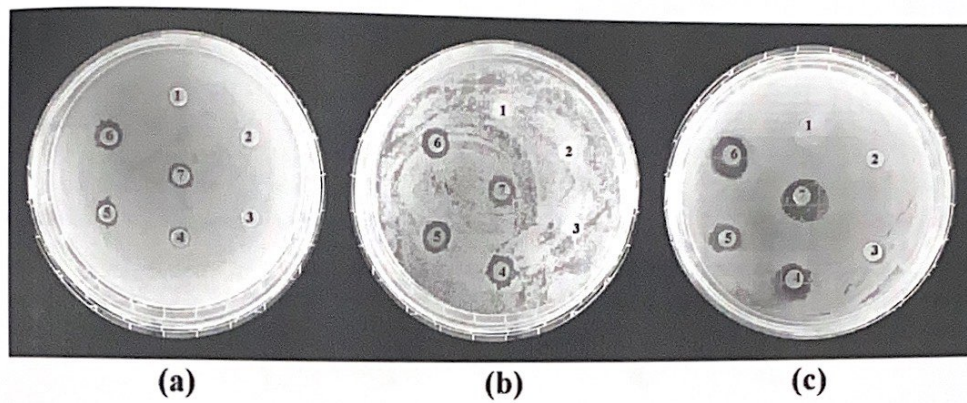
Gambar 2

7

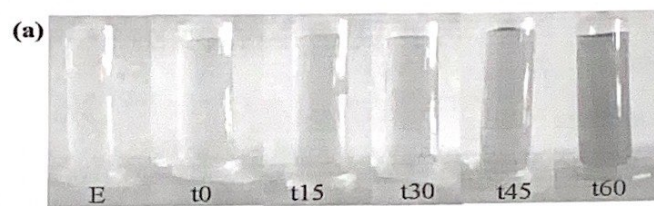


Gambar 3

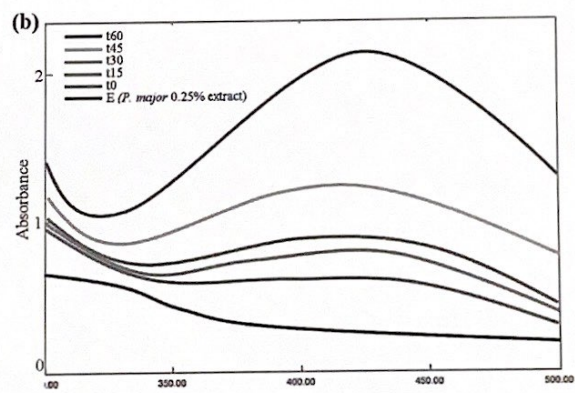
7



Gambar 4

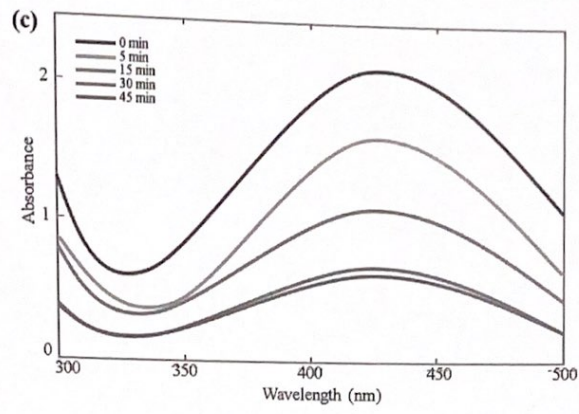


Gambar S1a



Gambar S1b

Handwritten signature or mark.



Gambar S1c

9