

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN KERJASAMA LUAR NEGERI**



**SINTESIS NANOHERBAL EKSTRAK TUMBUHAN PAKU
INDONESIA CAKAR AYAM (*Selaginella plana* Hieron) SEBAGAI
BAHAN ANTIBAKTERI**

Tim Peneliti:

Prof. Dr. Suyatno, M.Si.(NIDN: 0020076504)
Dr. Amaria, M.Si. (NIDN: 0029066401)
Dr. I Gusti Made Sanjaya (NIDN: 0004126505)
Rusly Hidayah, S.Si., M.Pd. (NIDN: 0025098105)
Asst. Prof. Dr. Nurrulhidayah Ahmad Fadzlillah
(International Islamic University Malaysia)

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS NEGERI SURABAYA
2021**

**HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR
PENELITIAN KERJASAMA LUAR NEGERI**

Judul : Sintesis Nanoherbal dari Ekstrak Tumbuhan Paku Indonesia Cakar Ayam (*Selaginella plana* Hieron) sebagai Agen Antibakteri

Kode/ Rumpun Ilmu : 112/ Kimia

Bidang Fokus Ilmu : Pengembangan Obat Tradisional Berbasis IPTEK untuk Penyakit Tropis

Ketua Peneliti

Nama Lengkap : Prof. Dr. Suyatno, M.Si.

NIDN : 0020076504

Jabatan Fungsional : Guru Besar

Program Studi : Kimia

Nomor HP : 085645385502

Alamat Surel (E-mail) : suyatno@unesa.ac.id

Anggota Peneliti

1. Nama Lengkap : Dr. Amaria, M.Si.

NIDN : 0029066401

Perguruan Tinggi : Universitas Negeri Surabaya

2. Nama Lengkap : Dr. I Gusti Made Sainjaya, M.Si.

NIDN : 0004126505

Perguruan Tinggi : Universitas Negeri Surabaya

3. Nama Lengkap : Rusly Hidayah, S.Si., M.Pd.

NIDN : 0025098105

Perguruan Tinggi : Universitas Negeri Surabaya

4. Nama Lengkap : Asst. Prof. Dr. Nurulhidayah Ahmad Fadzillillah

NIDN : -

Perguruan Tinggi : International Islamic University Malaysia (IIUM)

Lama Penelitian Keseluruhan : 1 (satu) tahun

Biaya Penelitian yang disusulkan ke LPPM Unesa : 75.000.000 (Tujuh puluh lima juta rupiah)

Mengetahui,
Dekan FMIPA
Universitas Negeri Surabaya



Dr. Madlazim, M.Si.
NIP 1965110519910310122

Surabaya, 8 Desember 2021
Ketua Peneliti,

Prof. Dr. Suyatno, M.Si.
NIP 196507201991011001

Menyetujui,
Ketua LPPM Unesa



Prof. Dr. Darni, M.Hum.
NIP 196509261990022001

RINGKASAN

Sintesis Nanoherbal Ekstrak Tumbuhan Paku Indonesia Cakar Ayam (*Selaginella plana*) sebagai Bahan Antibakteri

Tumbuhan paku cakar ayam (*Selaginella plana*) merupakan salah satu tumbuhan paku yang banyak tumbuh di Indonesia. Tumbuhan ini banyak mengandung senyawa golongan flavonoid, khususnya biflavonoid, disamping golongan steroid, saponin, alkaloid, dan tanin. Senyawa biflavonoid memiliki beragam sifat bioaktif termasuk aktivitas antibakteri. Untuk meningkatkan kelarutan, absorpsi, bioavailabilitas, stabilitas dan efikasi senyawa aktif dalam ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* maka dilakukan sintesis menjadi nanopartikel herbal. Pada penelitian ini sintesis nanoherbal dilakukan dengan metode gelasi ionik menggunakan biopolimer kitosan dan natrium tripoliposfat. Nanoherbal yang dihasilkan dikarakterisasi menggunakan spektroskopi IR, Zetasizer nano, SEM, dan efisiensi penjerapan senyawa fenolik. Aktivitas antibakteri ditentukan dengan metode difusi cakram menggunakan bakteri uji *E. coli*, *S. dysenteriae*, *S. aureus*, dan *B. subtilis*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* memiliki kandungan fenolik total sebesar 36,36 mg GAE/gram ekstrak. Nanoherbal formula F-1 memiliki ukuran partikel yang memenuhi persyaratan sebagai nanopartikel yakni 701,54 nm dengan harga potensial zeta sebanyak +449,3 mV. Nanoherbal F-1 memiliki efisiensi penjerapan senyawa fenolik sebesar 72,60%. Nanoherbal F-1 memiliki aktivitas antibakteri yang sangat kuat terhadap bakteri *E.coli*, *S. dysenteriae*, dan *S. aureus* serta aktivitas antibakteri yang kuat terhadap bakteri *B. subtilis*. Aktivitas antibakteri nanoherbal F-1 lebih kuat dibandingkan ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana*.

Kata-kata kunci: Nanoherbal, cakar ayam (*S. plana*), antibakteri

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah s.w.t. atas rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan laporan akhir penelitian kerjasama luar negeri yang berjudul “Sintesis Nanoherbal Ekstrak Tumbuhan Paku Indonesia Cakar Ayam (*Selaginella plana* Hieron) eebagai Agen Antibakteri”

Kegiatan penelitian ini akan dilaksanakan dengan menggunakan dana PNBPN Universitas Negeri Surabaya Tahun Anggaran 2021. Pada kesempatan ini kami menyampaikan ucapan terimakasih yang tak terhingga kepada yang terhormat:

1. Prof. Dr. Nurhasan, M.Kes., selaku Rektor Universitas Negeri Surabaya yang telah berkenan mengalokasikan dana kegiatan penelitian ini melalui skim Penelitian Kerjasama Luar Negeri.
2. Prof. Dr. Madlazim, M.Si., selaku Dekan FMIPA Universitas Negeri Surabaya yang telah memberikan motivasi dan memfasilitasi kegiatan penelitian ini.
3. Prof. Dr. Darni, M.Hum., selaku Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Unesa atas ijin dan bantuan yang telah diberikan dalam penyusunan laporan akhir penelitian ini.
4. Dr. Nuniek Herdyastuti, M.Si. dan Dr. Yuliani, M.Si., selaku reviewer yang telah memberikan kritik dan saran yang telah diberikan untuk penyempurnaan laporan akhir penelitian ini.
5. Dr. Amaria, M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya, yang telah memfasilitasi kegiatan penelitian ini.
6. Prof Dr. Nita Kusumawati, M.Sc., selaku Ketua laboratorium Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya, yang telah memberikan ijin penggunaan fasilitas laboratorium untuk kegiatan penelitian ini.
7. Semua pihak yang secara langsung atau tidak langsung telah banyak membantu kami dalam penyusunan laporan akhir kegiatan penelitian ini.

Kami menyadari bahwa masih terdapat kekurangan dalam penyusunan laporan akhir penelitian ini sehingga kritik dan saran yang membangun dari berbagai pihak sangat diperlukan untuk penyempurnaanya. Besar harapan kami agar kegiatan penelitian yang telah dilaksanakan ini memberikan manfaat yang sebesar-besarnya, khususnya dalam upaya pengembangan ilmu kimia organik bahan alam dan ilmu farmasi serta meningkatkan kerjasama internasional dari Jurusan Kimia, FMIPA dan Universitas Negeri Surabaya.

Surabaya, 18 Nopember 2021

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
RINGKASAN.....	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
BAB I. LATAR BELAKANG.....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	13
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	14
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	28
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	31
DAFTAR PUSTAKA.....	32
LAMPIRAN.....	36

DAFTAR TABEL

Tabel:	Halaman
5.1. Hasil pengukuran absorbansi larutan standart asam galat.....	20
5.2. Ukuran partikel nanoherbal ekstrak etanol tumbuhan paku <i>S. plana</i>	23
5.3. Harga potensial zeta nanoherbal ekstrak etanol tumbuhan paku <i>S. plana</i>	24
5.4. Hasil pengukuran absorbansi, kadar fenolik total dan efisiensi penjeraban senyawa fenolik nanoherbal ekstrak etanol <i>S. plana</i>	27
5.5. Hasil uji aktivitas antibakteri nanoherbal F-1 dan ekstrak etanol <i>S. plana</i>	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar:	Halaman
5.1. Reaksi antara senyawa fenolik dengan reagen Folin-Ciocalteu.....	20
5.2. Kurva baku larutan asam galat.....	21
5.3. Nanopartikel herbal ekstrak etanol tumbuhan paku <i>S. plana</i> bentuk cairan koloidal	22
5.4. Spektrum inframerah ekstrak etanol tumbuhan paku <i>S. plana</i>	25
5.5. Spektrum inframerah kitosan.....	25
5.6. Spektrum nanoherbal formula F-1.....	25
5.7. Spektrum nanoherbal formula F-2.....	26
5.8. Spektrum nanoherbal formula F-2.....	26

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran:	Halaman
1. Publikasi di Seminar Internasional Mathematics, Informatics, Science, and Education, International Conference (MISEIC).....	34
2. Publikasi di Jurnal Internasional Tropical Journal of Natural Product Research	37
3. Paten Sederhana	38
4. Buku Ajar	39

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Tumbuhan paku cakar ayam (*Selaginella plana*) merupakan salah satu jenis tumbuhan paku yang menjadi kekayaan alam hayati Indonesia (Heyne, 1987). Tumbuhan tersebut telah dikenal dan dimanfaatkan masyarakat sebagai bahan pangan (sayuran), tanaman hias, dan obat tradisional. Cakar ayam telah digunakan untuk perawatan pasca persalinan, mengobati luka, mengobati pendarahan, gangguan menstruasi, meningkatkan daya tahan tubuh, serta tonik pasca melahirkan (Uluk, dkk., 2001; Harada, dkk., 2002, Setiawan & Darusma, 2008). Secara tradisional cakar ayam telah digunakan dalam pengobatan beberapa penyakit seperti kanker, infeksi saluran pernafasan, gangguan hati, infeksi saluran kencing, patah tulang dan rematik (Wijayakusuma, 2004; Bensky, dkk., 2004).

Menurut Setyawan dan Darusman (2008) dari spesies *Selaginella* di pulau Jawa telah ditemukan senyawa metabolit sekunder golongan steroid, saponin, alkaloid, tanin, dan flavonoid. Namun demikian flavonoid, khususnya biflavonoid, merupakan kandungan yang terbanyak. Senyawa biflavonoid dari tumbuhan paku genus *Selaginella* memiliki sifat bioaktif yang beragam, salah satu diantaranya sebagai antibakteri (Sannomiya, *et al.*, 2007; Lin, 2004).

Senyawa aktif herbal dalam bentuk sediaan ekstrak memiliki kelemahan di antaranya yaitu rendahnya kelarutan dalam air sehingga bioavailabilitasnya rendah serta mampu mengalami penurunan sifat fungsional selama pengolahan maupun penyimpanan. Pembuatan ekstrak herbal menjadi berukuran nano atau yang disebut nanoherbal mampu mengatasi kelarutan zat aktif yang sukar larut, memperbaiki bioavailabilitas yang buruk, memodifikasi sistem penghantaran obat sehingga obat dapat langsung menuju daerah yang spesifik, meningkatkan stabilitas zat aktif dari degradasi lingkungan (penguraian enzimatis, oksidasi, hidrolisis), memperbaiki absorpsi suatu senyawa makromolekul, serta mengurangi efek iritasi zat aktif pada saluran cerna (Mohanraj & Chen, 2006). Bentuk dan ukuran partikel merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi efektifitas obat, karena ukuran partikel sangat berpengaruh dalam proses kelarutan, absorpsi dan distribusi obat. Dalam ukuran nano, luas kontak permukaan partikel menjadi lebih besar

yang dapat meningkatkan jumlah zat aktif yang berinteraksi sehingga aktivitas biologisnya semakin kuat (Kammona & Costas, 2012).

Nanopartikel merupakan partikel koloid padat dengan diameter 1-1000 nm (Tiyaboonchai, 2003). Polimer yang dapat digunakan untuk pembentukan nanopartikel salah satunya adalah kitosan dan natrium tripolifosfat (Na-TPP). Muatan positif gugus amina kitosan berinteraksi dengan muatan negatif TPP untuk membentuk kompleks dengan ukuran dalam rentang nanopartikel (Bhumkar & Varsha, 2006; Kafshgari, *et al.*, 2011). Kitosan mempunyai sifat spesifik yaitu adanya sifat bioaktif, biokompatibel, pengkelat, antibakteri dan dapat terbiodegradasi. Dalam bentuk mikro atau nanopartikel, kitosan mempunyai banyak keunggulan yakni stabil selama penggunaan, luas permukaan yang tinggi, dapat dijadikan matriks untuk berbagai jenis obat (Agnihotri, *et al.*, 2004). Salah satu metode yang digunakan untuk pembuatan nanopartikel adalah gelasi ionik, yang dapat diinduksi dalam sistem yang mempunyai dua dispersi koloid hidrofilik yang mempunyai muatan yang berlawanan. Prinsip pembentukan nanopartikel dalam metode ini adalah terjadinya interaksi elektrostatik antara gugus amino kitosan yang bermuatan positif dengan polianion Na-TPP yang bermuatan negatif membentuk struktur intramolekuler tiga dimensi (Tiyaboonchai, 2003)

Penelitian terkait sintesis nanopartikel herbal dari ekstrak tumbuhan paku cakar ayam (*S. plana*) serta aktivitasnya sebagai antibakteri belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu peneliti tertarik melakukan penelitian tentang sintesis nanopartikel herbal ekstrak etanol tumbuhan paku cakar ayam sebagai agen antibakteri menggunakan metode gelasi ionik.

Kegiatan penelitian ini sangat penting dilakukan untuk mendukung rencana strategis Universitas Negeri Surabaya yakni meningkatkan jumlah penelitian dosen, publikasi internasional serta kerjasama internasional (Tim, 2016). Penelitian ini juga mendukung salah satu penelitian unggulan Universitas Negeri Surabaya yakni fokus riset unggulan bidang ilmu keolahragaan dan kesehatan dengan tema riset teknologi kemandirian bahan baku obat serta topik riset prioritas pengembangan obat tradisional berbasis IPTEK untuk penyakit tropis (Tim, 2021).

B. Rumusan Masalah

Penelitian ini dilaksanakan untuk menjawab permasalahan berikut:

1. Bagaimanakah karakteristik nanopartikel herbal ekstrak etanol tumbuhan paku cakar ayam (*S. plana*)?
2. Bagaimanakah aktivitas antibakteri nanopartikel nanopartikel herbal ekstrak etanol tumbuhan paku cakar ayam (*S. plana*).

C. Urgensi (Keutamaan) Penelitian

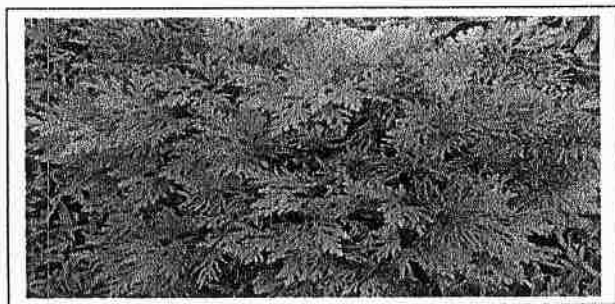
Tumbuhan paku cakar ayam (*S. plana*) merupakan salah satu tumbuhan paku yang banyak tumbuh dan menjadi salah satu kekayaan hayati Indonesia. Cakar ayam telah dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional yang terkait aktivitasnya sebagai antibakteri, misalnya untuk perawatan pasca persalinan, mengobati luka, mengobati pendarahan, infeksi saluran pernafasan, dan infeksi saluran kencing. Tumbuhan paku cakar ayam mengandung senyawa aktif berupa senyawa biflavonoid yang memiliki beragam sifat bioaktif, termasuk antibakteri. Dalam upaya meningkatkan penyerapan dan bioavailabilitasnya sebagai agen antibakteri maka sangat penting dilakukan perubahan ukuran partikel dari ekstrak etanol tumbuhan paku cakar ayam menjadi nanopartikel atau nanoherbal. Sintesis nanoherbal dari ekstrak etanol cakar ayam dan uji aktivitas antibakterinya belum pernah dilaporkan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan tentang Tumbuhan Paku Cakar Ayam (*Selaginella plana* Hieron)

Cakar ayam (*Selaginella plana*) merupakan salah satu jenis tumbuhan paku famili Selaginellaceae yang banyak tumbuh di wilayah Indonesia. Menurut Heyne (1987), tumbuhan *S. plana* memiliki nama daerah : Sikili batu, lingonai (Minangkabau), paku rane (Sunda), tapak doro, cakar ayam (Jawa), sindapor (Bugis) dan usia (Ambon). Tumbuhan ini tersebar di Asia Tenggara, di Jawa tumbuh hingga ketinggian ± 750 di atas permukaan laut, pada umumnya di pinggir sungai yang lembab dan terlindungi serta di lereng-lereng jurang. Profil tumbuhan paku *N. radicans* disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Profil tumbuhan paku *Selaginella plana*

Bentuk tumbuhan terna ini mudah berubah, tumbuh tegak atau mula-mula bagian bawah batang merayap kemudian tumbuh ke atas, panjang batang 0,10-1,2 m, bercabang melebar pada permukaan yang sama dan berkayu.

Cakar ayam telah dikenal dan dimanfaatkan masyarakat untuk bahan pangan (sayuran), tanaman hias, dan obat tradisional. Masyarakat Indonesia menggunakan tumbuhan ini untuk perawatan pasca persalinan, mengobati luka, mengobati pendarahan, gangguan menstruasi, serta meningkatkan daya tahan tubuh. Rebusan daun *S. plana* digunakan sebagai tonik pasca melahirkan, Tunas muda *S. plana* dimanfaatkan sebagai lalapan dan pengobatan, pengobatan obat luka kecil dilakukan dengan cara dikunyah lalu diikatkan pada luka (Uluk, dkk., 2001; Harada, dkk., 2002, Setiawan & Darusma, 2008).

Secara tradisional *S. plana* digunakan dalam pengobatan penyakit seperti: kanker, infeksi saluran pernafasan, luka, gangguan hati, infeksi saluran kencing, patah tulang dan rematik. Bagian yang digunakan adalah seluruh bagian tumbuhan, meskipun kadang-

kadang hanya disebut daun (herba). Tumbuhan ini berasa manis dan memberi efek hangat (Wijayakusuma, 2004: Bensky dkk., 2004).

B. Kandungan Senyawa Senyawa Metabolit Sekunder dalam Tumbuhan Paku Famili Selaginellaceae dan Bioaktivitasnya.

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa dari tumbuhan paku spesies *Selaginella* di pulau Jawa telah ditemukan senyawa metabolit sekunder golongan steroid, saponin, alkaloid, tanin, dan flavonoid. Namun demikian flavonoid, khususnya biflavonoid, merupakan kandungan yang terbanyak. kandungan yang terbanyak dalam spesies tumbuhan paku *Selaginella* (Setyawan & Darusman, 2008; Chikmawati, *et al*, 2012). Miftahudin, dkk. (2015) melaporkan bahwa tumbuhan paku *S. plana* dan *S. willdenovii* mengandung senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid, tanin dan saponin, yang kadarnya dipengaruhi jenis media tanamnya.

Senyawa biflavonoid yang telah berhasil dipisahkan dari *Selaginella* antara lain amentoflavon, 2',8"-biapigenin, ginkgetin, heveaflavon, hinokiflavon, isokriptomerin, kayaflavon, podocarpusflavon A, robustaflavon, sumaflavon, dan taiwaniaflavon. Beberapa senyawa biflavonoid dengan mudah ditemukan pada berbagai spesies *Selaginella*, sementara itu beberapa senyawa biflavonoid lainnya hanya ditemukan pada spesies tertentu. Amentoflavon dan ginkgetin merupakan senyawa biflavonoid yang terkandung dalam spesies *Selaginella* yang paling melimpah, paling luas sebarannya, dan paling mudah ditemukan. Sekurang- urangnya 11 spesies *Selaginella* telah diuji kandungan amentoflavonnya (Sun, dkk., 2006). Adapun sumaflavon baru dilaporkan dari *S. tamariscina* (Yang, *et al.*, 2006; Lee, *et al.*, 2008). Terdapat pula biflavonoid yang jarang ditemukan pada *Selaginella* namun dapat ditemukan pada tumbuhan lain. Pada *Selaginella* keberadaan taiwaniaflavon baru dilaporkan dari *S. tamariscina* (Pokharel, *et al.*, 2006.).

Bioaktivitas dari senyawa biflavonoid dari tumbuhan paku spesies *Selaginella* telah dilaporkan, yaitu sebagai antioksidan, antiinflamasi, antikanker, antimikroba, neuroprotektif, vasorelaksan, antiradiasi UV, antispasmodik, antialergi, antidiabet, antihemoragik, dan antinosiseptif (Setyawan & Darusman, 2008).

Aktivitas antimikroba dari senyawa biflavonoid yang telah dilaporkan meliputi antivirus, antibakteri, antifungi dan antiprotozoa. Senyawa amentoflavon hasil isolasi dari

S. doederleinii dan *S. tamariscina* menunjukkan aktivitas terhadap virus influenza A dan B (Lin, *et al.*, 2000). Sementara itu senyawa hinokiflavon mampu menghambat virus influenza sialidase serta virus HIV-1 secara *in vivo* (Miki, *et al.*, 2008; Lin, *et al.*, 1997). Sannomiya, *et al.* (2007) melaporkan bahwa amentoflavon memiliki aktivitas mutagenik terhadap bakteri *Samonella typhimurium*. Sementara itu Lin (2004) telah mematenkan beberapa biflavonoid anti-*Mycobacterium*.

Amentoflavon dari ekstrak etil asetat *S. tamariscina* menunjukkan potensi antifungi melawan beberapa fungi patogen, tanpa menyebabkan hemolisis pada sel eritrosit (Woo, *et al.*, 2005; Jung, *et al.*, 2007). Amentoflavon pada kadar 5 dan 10 µg/mL mampu menghambat pembentukan aflatoxin B1 dan B2 dari *Aspergillus flavus*, sehingga dapat dikembangkan untuk menghasilkan agen pengontrol produksi aflatoxin (Gonçalez, *et al.*, 2001). Menurut Jung, *et al.* (2006, 2007), amentoflavon mampu menginduksi akumulasi trehalosa pada *Candida albicans* dan mengganggu transisi dimorfismenya. Amentoflavon menahan siklus pembelahan sel *C. albicans* pada fase-S, sehingga fungsi ini tidak berkembang. Dengan demikian senyawa flavonoid tersebut berpotensi menjadi kandidat antifungi, khususnya candidiasis.

Terkait dengan aktivitas antiprotozoa, Rayne & Mazza (2007) melaporkan bahwa turunan amentoflavon memiliki aktivitas anti malaria sedang terhadap *Plasmodium falciparum* strain W2 (IC₅₀ = 0,98 µg/mL), namun aktivitasnya lemah terhadap strain D6 (IC₅₀ = 2,8 µg/mL). Amentoflavon dan podocarpusflavon A tidak menunjukkan penghambatan terhadap *Trypanosoma cruzi* (Abe, *et al.*, 2004), sedangkan ginkgetin menunjukkan penghambatan pada IC₅₀ = 11 µM (Weniger, *et al.*, 2006).

Penelitian terkait aktivitas antimikroba dari isolat atau ekstrak tumbuhan paku cakar ayam (*S. plana*) belum pernah dilaporkan. Namun demikian ekstrak diklorometana dan ekstrak etil asetat tumbuhan paku *S. plana* telah dilaporkan memiliki aktivitas antikanker terhadap sel kanker payudara T47D masing-masing dengan IC₅₀ sebesar 4 µg/mL dan 6 4 µg/mL. Kedua ekstrak memiliki kemampuan menginduksi apoptosis sel kanker payudara T47D (Handayani, *et al.*, 2012).

C. Tinjauan tentang Nanoherbal

Nanopartikel adalah partikel dalam ukuran nanometer yaitu sekitar 1-100 nm. Namun demikian untuk material nano yang digunakan dalam sistem penghantar obat

memiliki ukuran yang lebih besar yakni 1-1000 nm, agar memiliki kandungan bahan aktif obat yang mencukupi untuk keperluan terapi (Tiyaboonchai, 2003; Buzea, *et al.*, 2007). Nanopartikel merupakan salah satu produk dari nanoteknologi, suatu ilmu dan rekayasa dalam menciptakan material, struktur fungsional, maupun piranti dalam skala nanometer. Beberapa kelebihan nanopartikel adalah kemampuan untuk menembus ruang-ruang antar sel yang hanya dapat ditembus oleh ukuran partikel koloidal, kemampuan untuk menembus dinding sel yang lebih tinggi, dan fleksibilitasnya untuk dikombinasi dengan berbagai teknologi lain sehingga membuka potensi yang luas untuk dikembangkan pada berbagai keperluan dan target. Kelebihan lain dari nanopartikel adalah karena peningkatan luas permukaan kontak pada jumlah yang sama (Buzea, *et al.*, 2007).

Pembuatan material dalam ukuran nanopartikel mampu mengatasi kelarutan zat aktif yang sukar larut, memperbaiki bioavailabilitas yang buruk, memodifikasi sistem penghantaran bahan aktif obat sehingga dapat langsung menuju daerah yang spesifik, meningkatkan stabilitas zat aktif dari degradasi lingkungan (penguraian enzimatis, oksidasi, hidrolisis), memperbaiki absorpsi suatu senyawa makromolekul, dan mengurangi efek iritasi zat aktif pada saluran cerna (Mohanraj & Chen, 2006).

Sebagian besar senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman herbal memiliki sifat kelarutan yang buruk dalam air karena bersifat hidrofobik. Sifat tersebut menyebabkan turunnya bioavailabilitas, sehingga memerlukan peningkatan dosis dan membatasi penggunaan klinis obat-obatan herbal. Oleh karena itu, pembuatan nanoherbal bermanfaat untuk meningkatkan kelarutan obat herbal dan membantu melokalisasi obat di situs tertentu sehingga menghasilkan efikasi yang lebih baik. Formulasi nanopartikel seperti nanopartikel polimerik, liposom, proliposom, nanopartikel lipid padat, dan mikroemulsi berpotensi untuk memberikan obat herbal secara efektif. Sistem nanopartikel yang ideal adalah harus mampu beredar dalam aliran darah dan harus cukup kecil untuk mencapai sel dan jaringan target. Obat-obatan herbal dapat ditargetkan ke berbagai organ seperti otak, paru-paru, hati, ginjal, saluran pencernaan, dan lain-lain (Abirami, dkk., 2014).

D. Tinjauan tentang Nanoherbal Berbasis Biopolimer

Bhatia (2011) mengklasifikasikan nanosistem menjadi 7 macam tipe yaitu *carbon nanotubes*, *dendrimer*, *liposom*, *metallic nanoparticles*, *nanocrystal quantum*

dots, polymeric micelles, polymeric nanoparticles. Dalam dunia farmasi, nanopartikel berbasis polimer khususnya biopolimer paling banyak dikembangkan karena memiliki beberapa kelebihan seperti bersifat inert terhadap bahan aktif namun kompatibel untuk dilakukan kombinasi, mampu membentuk jaringan sehingga dapat dikembangkan menjadi sistem pembawa berupa matriks partikel, manik (*beads*), atau *patch*, selain itu juga memiliki gugus fungsi yang melimpah sehingga mampu mengikat molekul obat dalam jumlah memadai (Martien, dkk., 2012).

Kitosan merupakan polisakarida biodegradable yang banyak digunakan dalam formulasi nanoherbal. Kitosan yang berasal dari deasetilasi kitin yang terkandung dalam cangkang krustasea seperti kepiting, udang, dan lobster. Kitin memiliki unit utama 2-glukosadeoksi-2-asetilamino yang berpolimer melalui ikatan glikosidik β -(1,4), dan membentuk polimer linear rantai panjang. Meskipun kitin tidak larut dalam sebagian besar pelarut, kitosan larut dalam sebagian besar larutan asam organik pada pH kurang dari 6,5 termasuk asam format, asetat, tartarat, dan asam sitrat (Tiyaboonchai, 2003). Kitosan merupakan polimer yang sering digunakan dalam sistem nanopartikel. Kitosan bersifat kationik, tidak toksik dan imunogenik serta bersifat mukoadhesif. Kitosan memiliki permeabilitas yang besar di permukaan biologis dan mampu meningkatkan penyerapan zat aktif melalui ruang antar sel (Martien, dkk., 2012).

E. Tinjauan tentang Sintesis Nanoherbal dengan Metode Gelasi ionik

Metode gelasi ionik merupakan salah satu metode pembuatan nanopartikel yang melibatkan proses ikatan silang (*crosslinking*) antara polielektrolit dengan adanya pasangan ion multivalennya. Gelasi ionik diikuti dengan kompleksasi polielektrolit dengan polielektrolit yang muatan listriknya berlawanan. Pembentukan ikatan silang akan memperbesar kekuatan mekanis dari partikel yang terbentuk (Park & Yeo, 2007). Kitosan yang merupakan polimer kationik dapat bereaksi dengan anion multivalen seperti tripolifosfat (TPP). Pembentukan mikropartikel dengan metode gelasi ionik dapat dilakukan dengan pengerasan tetesan cair yang didispersikan pada fase minyak atau organik. Prosedur meliputi pencampuran dua fase cair, fase yang satu mengandung kitosan dan fase yang satu mengandung anion multivalen (Mohanraj & Chen, 2006).

Gelasi ionik merupakan salah satu metode sederhana dalam pembuatan nanoherbal tersalut kitosan. Kitosan dilarutkan dalam larutan dengan pH asam untuk

mengubah gugus amino ($-NH_2$) pada kitosan menjadi kation (NH_3^+). Gugus yang bermuatan positif tersebut selanjutnya mampu melakukan interaksi ionik dengan bahan aktif obat yang bermuatan negatif. Sistem yang terbentuk cenderung menyisakan gugus ammonium bebas yang akan saling tolak-menolak. Hal ini dapat melemahkan kompleks nanopartikel yang telah terbentuk, sehingga perlu ditambahkan suatu pengikat silang (*crosslinker*) yang mampu menstabilkan muatan positif yang tersisa. Pengikat silang yang digunakan harus berupa polianion, salah satunya adalah anion tripolifosfat (TPP) (Martien dkk., 2012).

F. Karakterisasi Nanoherbal

1. Spektroskopi Inframerah (FTIR)

Karakterisasi dengan menggunakan FTIR bertujuan untuk mengetahui jenis-jenis vibrasi ikatan antar atom dalam gugus fungsional tertentu. FTIR dapat digunakan untuk menganalisa senyawa organik dan anorganik serta analisa kualitatif dan analisa kuantitatif dengan melihat kekuatan absorpsi senyawa pada bilangan gelombang tertentu (Hindrayawati & Alimudin, 2010).

Hampir setiap senyawa yang memiliki ikatan kovalen, baik senyawa organik atau anorganik, akan menyerap berbagai frekwensi radiasi elektromagnetik dengan panjang gelombang (λ) 0,5–1000 μm . Dalam kimia organik, fungsi utama dari spektrometri inframerah adalah mengenal gugus fungsional seperti O-H, N-H, C-H, C=O, C-O, C=C, $C\equiv C$, dan C=N. Daerah yang paling berguna untuk mengenal struktur suatu senyawa adalah 4.000–400 cm^{-1} . Serapan setiap tipe ikatan hanya diperoleh dalam bagian-bagian kecil tertentu dari daerah vibrasi inframerah (Silverstein, *et al.*, 2005).

Pada penelitian ini, spektroskopi FTIR digunakan untuk mengetahui gugus fungsional yang terdapat dalam nanopartikel herbal hasil sintesis dari ekstrak etanol tumbuhan paku *Selaginella plana*, lalu dibandingkan dengan gugus fungsional ekstrak etanol sebelum digunakan dilakukan sintesis nanopartikel herbal, serta gugus fungsional dari kitosan yang digunakan dalam sintesis nanopartikel herbal (Wardana, *et al.*, 2020).

2. Ukuran dan Distribusi Ukuran Nanopartikel

Ukuran dan distribusi nanopartikel diukur menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA). Metode *laser diffraction* (LAS) digunakan dalam penentuan ukuran dan distribusi ukuran nanopartikel dalam PSA. Metode ini dinilai lebih akurat bila dibandingkan

dengan metode analisa gambar (mikrografi) maupun metode ayakan (*Sieve analyses*), terutama untuk sampel-sampel dalam orde nanometer maupun submikron.

Prinsip dari LAS adalah partikel melewati berkas sinar laser dan cahaya yang dihamburkan oleh partikel-partikel tersebut dikumpulkan melebihi rentang sudut yang berhadapan langsung. Distribusi dari intensitas yang dihamburkan ini akan dianalisis oleh komputer sebagai hasil distribusi ukuran partikel.

PSA dapat dilakukan dengan metode basah dan metode kering. Dalam metode basah digunakan media pendispersi untuk mendispersikan material uji. Sementara itu metode kering memanfaatkan udara atau aliran udara untuk melarutkan partikel dan membawanya ke *sensing zone*. Metode ini baik digunakan untuk ukuran yang kasar, dimana hubungan antar partikel lemah dan kemungkinan untuk beraglomerasi kecil.

Keunggulan penggunaan PSA untuk mengetahui ukuran partikel adalah :

- a. Lebih akurat dan mudah digunakan, pengukuran partikel dengan menggunakan PSA lebih akurat jika dibandingkan dengan pengukuran partikel dengan alat lain seperti TEM ataupun SEM. Hal ini dikarenakan partikel dari sampel yang akan diuji didispersikan ke dalam sebuah media sehingga ukuran partikel yang terukur merupakan ukuran partikel tunggal.
- b. Hasil pengukuran dalam bentuk distribusi, sehingga dapat menggambarkan keseluruhan kondisi sampel, dalam artian penyebaran ukuran rata-rata partikel dalam suatu sampel.
- c. Rentang pengukuran dari 0,6 nanometer hingga 7 mikrometer (Rusly, 2011).

3. Morfologi Nanopartikel

Bentuk dan keadaan permukaan nanopartikel dapat memberi informasi tentang sifat pelepasan bahan aktif obat. Morfologi nanopartikel dapat ditentukan menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM), *Transmission Electron Microscopy* (TEM), dan mikroskop daya atom (Haskell, 2006).

4. Potensial Zeta

Potensial zeta biasanya digunakan untuk mengkarakterisasi sifat muatan permukaan nanopartikel, berkaitan dengan interaksi elektrostatik nanopartikel. Interaksi tersebut mempengaruhi kecenderungan agregasi dan tolak menolak. Potensial zeta

merupakan ukuran muatan permukaan partikel yang tersebar dalam medium pendispersi. Idealnya, muatan potensial zeta partikel harus lebih tinggi daripada medium pendispersi untuk mencegah agregasi. Nilai potensial zeta dihasilkan dari adanya beda potensial antara muatan listrik pada Stern layer dengan diffuse layer dari partikel koloid (Vaughn & Williams, 2007).

Nanopartikel yang stabil memiliki potensial zeta ± 30 mV. Nanopartikel dengan nilai potensial zeta lebih kecil dari -30 mV dan lebih besar dari +30 mV memiliki stabilitas lebih tinggi, karena memiliki gaya untuk mencegah terjadinya aglomerasi partikel. Sistem dispersi dengan nilai zeta potensial yang rendah lebih mudah membentuk agregat seiring dengan gaya Van der Waals dalam interaksi partikel (Murdock, *et al.*, 2008).

G. Tinjauan Aktivitas Antibakteri

Menurut Fazier dan Westhoff (1988), bakteri dapat menyebabkan penyakit melalui makanan dengan cara intoksikasi dan infeksi. *Bacterial food intoxication* menyatakan terjadinya sakit akibat mengkonsumsi makanan yang mengandung toksin yang dihasilkan bakteri, sedangkan *bacterial food infection* menyatakan terjadinya sakit yang disebabkan oleh masuknya bakteri ke dalam tubuh melalui makanan yang terkontaminasi dan di dalam tubuh, bakteri tersebut dapat menghasilkan toksin yang dapat menimbulkan gangguan. Bakteri yang dapat menimbulkan intoksikasi misalnya *Clostridium botulinum* dan *Staphylococcus aureus* yang masing-masing menghasilkan neurotoksin dan enterotoksin, sedangkan contoh bakteri yang menyebabkan infeksi adalah *Salmonella sp.*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enteropathogenic Eschericia coli (EEC)*, *Shigella dysenteriae* dan *Vibrio cholerae*.

Dalam upaya mengatasi penyakit akibat gangguan bakteri telah ditemukan ribuan senyawa kimia yang mampu menghambat atau mematikan aktivitas bakteri patogen. Menurut Jawetz, *et al* (2019), aktivitas antibakteri dari suatu bahan antimikroba dapat ditentukan dengan metode dilusi (pengenceran) dan metode difusi. Metode dilusi ini didasarkan pada pengenceran larutan uji dalam medium pertumbuhan bakteri, dimulai dari konsentrasi rendah sampai tinggi. Selanjutnya bakteri diinokulasi dan setelah diinkubasi akan tampak hambatan pertumbuhan bakteri berdasarkan kekeruhan media. Metode ini dapat menentukan konsentrasi hambat minimal (KHM) dan konsentrasi bunuh

minimal (KBM). Berdasarkan wujud mediannya, metode difusi dibedakan menjadi dua yaitu metode difusi cair, yang menggunakan media cair dan metode difusi padat, yang menggunakan media agar.

Metode difusi didasarkan pada difusi larutan uji dalam pencadangan ke medium yang ditanami bakteri. Setelah diinkubasi akan tampak daerah jernih yang menyatakan daerah (zona) terjadinya hambatan pertumbuhan bakteri. Diameter daerah hambatan sebanding dengan konsentrasi dan kekuatan aktivitas antibakteri larutan uji. Berdasarkan jenis pencadangnya, metode difusi dibedakan menjadi tiga macam yaitu metode difusi cakram, yang menggunakan kertas cakram (*paper disk*), metode difusi silinder, yang menggunakan silinder logam atau gelas dan metode difusi cetak lubang, yang pencadangnya dibuat dengan cara melubangi medium dengan diameter 4-6 mm. Metode difusi cakram paling banyak dilakukan karena mudah pelaksanaan dan standarisasinya, murah, satu cawan petri dapat digunakan untuk 5-6 sampel sekaligus, jumlah sampel yang digunakan sedikit, dapat digunakan untuk melihat sensitivitas berbagai jenis mikroba pada konsentrasi tertentu dan sering digunakan dalam uji kepekaan antibiotik dalam program pengendalian mutu. Menurut Davis & Stout (1971), diameter zona bening 5 mm atau kurang dikategorikan lemah, zona bening 5-10 mm dikategorikan sedang, zona bening 10-20 mm dikategorikan kuat dan zona bening 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

A. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan tujuan:

1. Mendeskripsikan karakteristik nanopartikel herbal ekstrak etanol tumbuhan paku *Selaginella plana*.
2. Menentukan aktivitas antibakteri nanopartikel herbal ekstrak etanol tumbuhan paku *Selaginella plana*.

B. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan bermanfaat untuk:

1. Memberikan data baru tentang metode sintesis nanopartikel herbal dari ekstrak etanol tumbuhan paku *Selaginella plana*.
2. Memberikan informasi tentang aktivitas antibakteri nanopartikel herbal ekstrak etanol tumbuhan paku *Selaginella plana*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

1. Alat yang digunakan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini yaitu seperangkat alat maserasi, rotavapor (Buchi R-300), pompa vakum (Gast DOA-P-504-BN), oven (Heraeus ST-5042), neraca analitik (Advanturer Ohaus), sentrifuge, *magnetic stirrer* (Heidolph), *freeze dryer* (Martin Christ Alpha 1-2 Ldplus), corong Buchner, homogenizer, inkubator, *Laminar air flow*, autoklaf, lemari pendingin, cawan petri, jangka sorong, mikropipet, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800), *Dynamic Light Scattering* Zetasizer Nano (Malvern), spektrofotometer inframerah (Shimadzu FTIR-8400S), dan peralatan gelas yang biasa digunakan di laboratorium kimia organik.

2. Bahan yang digunakan

Bahan yang digunakan meliputi: bagian *aerial* tumbuhan paku *S. plana*, etanol teknis dan p.a., kitosan (Sigma), natrium tripoliposfat (Na-TPP), natrium karbonat, asam asetat glasial, tween-80 (Merck), reagen Folin Ciocalteu (Merck), asam galat (Merck), *nutrient broth*, *nutrient agar*, DMSO, kertas saring whatman No. 1, bakteri uji, aquades dan aquabides.

B. Prosedur Penelitian

1. Preparasi sampel tumbuhan paku *S. plana*

Dalam penelitian ini sampel penelitian yang berupa bagian *aerial* tumbuhan paku *S. plana* sebanyak dikumpulkan dari kawasan hutan Kletak, Nongkojajar, Pasuruan, Jawa Timur. Sebelum diteliti lebih lanjut, sampel diidentifikasi di LIPI Kebun Raya Purwodadi. Selanjutnya sampel dibersihkan dari kotoran yang melekat, lalu dikeringkan pada suhu kamar. Sampel yang telah kering digiling menjadi serbuk halus yang siap untuk diekstraksi.

2. Tahap Ekstraksi

Sebanyak 1,000 gram serbuk kering bagian *aerial* tumbuhan paku *S. plana* dimaserasi dengan 1,5 L etanol teknis (80%) selama 24 jam pada suhu kamar. Hasil

maserasi disaring dengan corong Buchner. Ekstrak etanol yang diperoleh dipekatkan dengan rotavapor, dilanjutkan pengeringan dengan *freeze dryer* sehingga diperoleh ekstrak etanol kering tumbuhan paku *S. plana*.

3. Penentuan Kadar Fenolik Total dalam Ekstrak Etanol Tumbuhan *S. plana*

a. Pembuatan Larutan Stok Asam Galat

Ditimbang asam galat sebanyak 10 mg, dilarutkan dengan aquabides hingga 10 mL sehingga dihasilkan larutan asam galat berkonsentrasi 1000 ppm. Sebanyak 1 mL larutan tersebut diencerkan dalam labu ukur 10 mL dengan aquabides sehingga dihasilkan larutan berkonsentrasi 100 ppm.

a. Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum Asam Galat

Sebanyak 0,25 mL larutan asam galat 100 ppm dimasukkan dalam labu ukur 5 mL. Kemudian ditambahkan 0,1 mL pereaksi Folin-Ciocalteu dan 0,1 mL Na_2CO_3 7,5%, dihomogenkan lalu dicukupkan volumenya hingga 5 mL dengan aquabides. Campuran tersebut dibiarkan selama 30 menit, lalu serapannya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm. Berdasarkan spektrum UV-Vis yang dihasilkan, ditentukan panjang gelombang serapan maksimum (λ_{maks}).

b. Pembuatan Kurva Baku Asam Galat

Dibuat satu seri larutan asam galat dengan konsentrasi 1,2, 3, 4, 5, 6 dan 7 ppm, dengan cara dipipet larutan stok masing-masing sebanyak 50, 100, 150, 200, 250, 300 dan 350 μL , dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, lalu dicukupkan volumenya dengan etanol pa. Sebanyak 0,5 mL masing-masing larutan standar dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1,5 mL pereaksi Folin Ciocalteu (10% = 1 : 10). Setelah didiamkan 3 menit, ditambahkan 1,2 mL Na_2CO_3 7,5%, divorteks selama 3 detik. Campuran tersebut didiamkan selama 30 menit, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang serapan maksimum, kemudian dibuat kurva baku hubungan antara konsentrasi asam galat dengan serapan.

c. Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Etanol Tumbuhan Paku *S. plana*

Ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* ditimbang sebanyak 10 mg, kemudian dilarutkan dengan 1 mL etanol 96 % dan dicukupkan volumenya hingga 10 mL dalam labu ukur sehingga diperoleh larutan stok 1000 ppm.

d. Penentuan Kadar Fenolik Total

Sebanyak 0,5 mL larutan ekstrak dipipet dari larutan stok (1000 ppm) dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1,5 mL pereaksi Folin Ciocalteu (10% = 1 : 10). Setelah didiamkan 3 menit, ditambahkan 1,2 mL Na₂CO₃ 7,5%, divorteks selama 3 detik. Campuran tersebut didiamkan selama 30 menit, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang serapan maksimum 763 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Berdasarkan kurva baku asam galat yang telah diperoleh, dihitung kadar fenolik total dari sampel. Kadar fenolik total dinyatakan sebagai sejumlah mg ekivalen asam galat (EAG)/g sampel

4. Sintesis Nanoherbal Ekstrak Etanol Tumbuhan Paku *S.plana*

a. Pembuatan Larutan Kitosan

Kitosan ditimbang masing-masing sebanyak 0,5 gram, 0,75 gram, dan 1,0 gram dengan menggunakan kaca arloji. Selanjutnya kitosan dilarutkan dengan larutan asam asetat 5 % (v/v) hingga 100 mL dan diaduk dengan pengaduk magnetik hingga larut (Pakki, dkk., 2016).

b. Pembuatan Larutan Natrium Tripolifosfat

Natrium tripolifosfat (Na-TPP) ditimbang masing-masing sebanyak 0,1 gram, 0,15 gram, dan 0,2 gram. Selanjutnya masing-masing dilarutkan dengan aquades hingga 20 mL, 30 mL, dan 40 mL kemudian diaduk dengan pengaduk magnetik hingga larut (Pakki, dkk., 2016).

c. Pembuatan Larutan Ekstrak Etanol *S. plana*

Sebanyak 0,1 gram ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* dilarutkan dalam 10 mL etanol dan disonikasi selama 10 menit ((Pakki, dkk., 2016).

d. Sintesis Nanoherbal Ekstrak Etanol Tumbuhan Paku *S. plana* dengan Metode Gelasi Ionik

Dalam penelitian dibuat 3 formulasi nanoherbal yaitu F-1, F-2, dan F-3. Masing-masing larutan kitosan 0,5%, 0,75% dan 1% dimasukkan ke dalam gelas kimia sebanyak 100 mL. Ke dalam masing-masing konsentrasi larutan ditambahkan tween-80 sebanyak 1 mL dan diaduk menggunakan homogenizer dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit. Setelah itu, pada larutan kitosan 0,5%, 0,75% dan 1% dimasukkan masing-masing 10 mL larutan ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* dan diaduk menggunakan homogenizer dengan kecepatan 1400 rpm selama 120 menit. Ke dalam larutan kitosan 0,5 %, 0,75% dan 1% masing-masing ditambahkan larutan Na-TPP 0,5 % sebanyak 20

mL, 30 mL, dan 40 mL, lalu dihomogenizer dengan kecepatan 1400 rpm selama 150 menit. Campuran yang diperoleh didiamkan selama 24 jam dan kemudian diliofilisasi (*freeze-drying*) untuk mendapatkan nanopartikel kering. Penentuan ukuran partikel cairan nanopartikel herbal dilakukan menggunakan Zetasizer, sementara itu karakterisasinya dengan FTIR dan SEM dilakukan terhadap nanopartikel herbal yang kering (Pakki, dkk., 2016).

5. Karakterisasi Nanopartikel Herbal Hasil Sintesis

a. Spektrofotometer Inframerah

Sebanyak 10 mg serbuk nanoherbal hasil sintesis dicampur dengan KBr, dicetak dalam bentuk pellet, lalu diukur spektrum inframerahnya dengan rentang bilangan gelombang $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Prosedur yang sama juga dilakukan terhadap ekstrak etanol tumbuhan *S. plana* dan kitosan (Markus, *et al.*, 2017).

b. Zetasizer Nano

Cairan sampel nanoherbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* hasil sintesis dimasukkan dalam instrumen Zetasizer nano, kemudian dianalisis ukuran partikel dan nilai potensial Zetanya (Markus, *et al.*, 2017; Wardana, *et al.*, 2020).

c. SEM

Sampel nanopartikel herbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* dicoating dengan logam emas menggunakan *fine coater* di bawah vakum. Selajutnya sampel diuji dan diamati bentuk partikel dan permukaannya (Pakki, dkk., 2016).

d. Efisiensi Penjerapan

Nanoherbal yang diperoleh juga dianalisis secara kuantitatif kandungan total fenolnya untuk menentukan efisiensi penjerapannya. Nanoherbal dari ketiga formula, masing-masing ditimbang setara dengan sebanyak 10 mg ekstrak, lalu masing-masing dilarutkan dengan 1 mL etanol 96 % dan dicukupkan volumenya hingga 10 mL dengan aquabides sehingga dihasilkan larutan berkonsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya masing-masing diambil sebanyak 0,5 mL dari larutan stok (1000 ppm) dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1,5 mL pereaksi Folin Ciocalteau ($10\% = 1 : 10$). Setelah didiamkan 3 menit, ditambahkan 1,2 mL Na_2CO_3 7,5%, divorteks selama 3 detik. Campuran tersebut didiamkan selama 30 menit, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang serapan maksimum 763 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Efisiensi penjerapan (E_p) nanopartikel dihitung dengan menggunakan persamaan:

$$Ep(\%) = \frac{\text{Kadar fenolik nanoherbal}}{\text{kadar fenolik ekstrak etanol}} \times 100\%$$

6. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Pembuatan Media Cair BI

Nutrient broth 0,26 g dan akuades sebanyak 20 mL diaduk sampai rata kemudian dibuat homogen menggunakan *magnetic stirrer* lalu diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Dipipet 1 mL media cair, masukkan dalam tabung reaksi dan tutup dengan *aluminium foil*. Media cair BI siap digunakan sebagai media kultur bakteri (Ortez, 2005)

b. Pembuatan Media Uji

Nutrien agar 2,8 g dan akuades sebanyak 100 mL diaduk sampai rata kemudian disterilkan diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian didinginkan sampai suhu 40°C. Selanjutnya setelah dingin dipindahkan pada cawan petri (Ortez, 2005).

c. Pembuatan Inokulum Bakteri

Bakteri yang akan diuji adalah bakteri *E.coli*, *S. dysenteriae*, *B. subtilis* dan *S. aureus*. Bakteri yang akan dikultur diambil dari lemari pendingin kemudian dipipet sebanyak 100 µL dimasukkan ke masing-masing tabung reaksi yang berisi media cair sebanyak 1 mL, kemudian ditutup dengan *aluminium foil* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Ortez, 2005).

a. Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji yang digunakan berupa cairan nanoherbal, larutan ekstrak ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* dalam DMSO, serta larutan tetrasiklin 500 ppm dalam aquades sebagai kontrol positif (Ortez, 2005).

e. Penentuan Diameter Zona Hambatan

Larutan uji sebanyak 50 µL ditotolkan pada kertas cakram berdiameter 6 mm dengan menggunakan mikropipet. Untuk media agar yang sudah diautoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, kemudian dinginkan sampai suhu 40 °C. Sebanyak 100 µL bakteri uji yang telah di kultur dalam tabung reaksi, dipipet dan diinokulasi pada media agar lalu dituangkan ke cawan petri, dan ditunggu sampai media agar mengeras. Kertas cakram yang mengandung larutan uji diambil dengan pinset lalu diletakkan ke dalam cawan petri, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Diameter daerah hambatan ditentukan dengan mengukur diameter daerah jernih di sekeliling kertas cakram

menggunakan jangka sorong (Alves, *et al*, 2000; Orteiz, 2005). Diameter zona hambat tersebut dikategorikan kekuatan daya antibakterinya berdasarkan penggolongan David & Stout (1971).

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Penyiapan Sampel Bagian Aerial Tumbuhan Paku *Selaginella plana*

Sampel bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* sebanyak 5 kg dikumpulkan dari kawasan hutan Kletak, Nongko Jajar, Pasuruan. Sebelum dilakukan penelitian lebih lanjut, sampel diidentifikasi di LIPI Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan. Setelah dibersihkan dari kotoran yang melekat, sampel dipotong-potong berukuran kecil dan dikeringkan pada suhu kamar selama 12 hari. Selanjutnya sampel yang sudah kering digiling menjadi serbuk halus yang siap untuk diekstraksi sebanyak 1.154 g.

B. Ekstraksi bagian aerial tumbuhan paku *Selaginella plana*

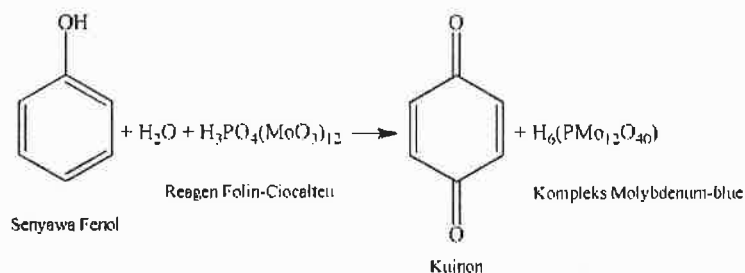
Serbuk kering bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* sebanyak 1.000 g dimaserasi menggunakan pelarut etanol 80% selama 24 jam pada suhu kamar dan diulang tiga kali. Setelah dilakukan penyaringan menggunakan corong Buchner dihasilkan filtrat dari ekstrak etanol. Penguapan pelarut dalam ekstrak menggunakan rotavapor dilanjutkan dengan pengeringan dalam *freeze dryer* selama 16 jam dihasilkan ekstrak etanol kering berwarna hijau gelap sebanyak 49,14 gram.

C. Penentuan Kadar Fenolik Total dalam Ekstrak Etanol Tumbuhan Paku *S. plana*

Penentuan kadar fenolik total pada ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* dilakukan dengan metode Folin-Ciocalteu. Prinsip metode ini adalah oksidasi gugus hidroksil fenolik yang terdapat dalam senyawa fenolik yang terkandung dalam ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana*. Pereaksi ini mengoksidasi fenolat (garam alkali), mereduksi asam heteropoli menjadi suatu kompleks molibdenum-tungsten (Mo-W). Fenolat hanya terdapat pada larutan basa, tetapi pereaksi ini dan produknya tidak stabil pada kondisi basa sehingga diperlukan penambahan natrium karbonat untuk membuat lingkungannya menjadi basa. Suasana basa ini dapat mendisosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat (Ukieyanna, 2012).

Selama reaksi berlangsung, gugus hidroksil fenolik bereaksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu, membentuk kompleks fosfotungstat-fosfomolibdat berwarna biru dengan struktur yang belum diketahui dan dapat dideteksi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 765 nm (Kusbandari, 2018). Warna biru yang

terbentuk akan semakin pekat setara dengan konsentrasi ion fenolat yang terbentuk, artinya semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka semakin banyak ion fenolat yang akan mereduksi asam heteropoli sehingga warna biru yang dihasilkan semakin pekat (Singleton & Rossi, 1965).



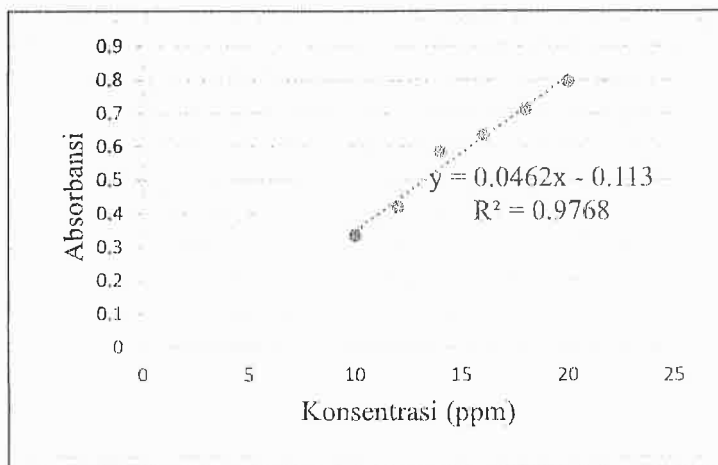
Gambar 5.1. Reaksi antara senyawa fenolik dengan reagen Folin-Ciocalteu

Pada penentuan kadar fenolik total dalam penelitian ini digunakan larutan standar asam galat. Asam galat merupakan senyawa fenolik yang mampu mereduksi reagen Folin-Ciocalteu menjadi kompleks fosfotungstat-fosfomolibdat yang berwarna biru. Dari hasil pengukuran absorbansi larutan asam galat dengan konsentrasi 10, 12, 14, 16, 18, dan 20 ppm pada panjang gelombang serapan maksimum 763 nm diperoleh data Tabel 5.1.

Tabel 5.1. Hasil pengukuran absorbansi larutan baku asam galat

Konsentrasi asam galat (ppm)	Absorbansi			
	1	2	3	Rata-rata
10	0,334	0,336	0,332	0,334
12	0,420	0,422	0,418	0,420
14	0,584	0,584	0,584	0,584
16	0,635	0,633	0,634	0,634
18	0,713	0,713	0,713	0,713
20	0,795	0,794	0,799	0,796

Berdasarkan data Tabel 5.1. diperoleh kurva baku hubungan antara konsentrasi asam galat dengan absorbansi yang disajikan pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2. Kurva baku asam galat

Dari pengukuran kurva baku asam galat, diperoleh persamaan regresi linier $y = 0.0462x - 0.113$ dengan nilai $R^2 = 0.9768$. Persamaan regresi linier ini kemudian digunakan untuk menghitung kadar fenolik total pada sampel ekstrak. Hasil penentuan kadar fenolik total ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* 1000 ppm dengan metode Folin-Ciocalteu dari tiga kali pengukuran diperoleh nilai absorbansi 0,558; 0,562 dan 0,557, dengan nilai rata-rata 0,559. Berdasarkan kurva baku asam galat dan memperhitungkan faktor pengenceran diperoleh kadar fenolik total dalam ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* sebesar 3,636% atau 36,36 mg GAE/ g ekstrak kering.

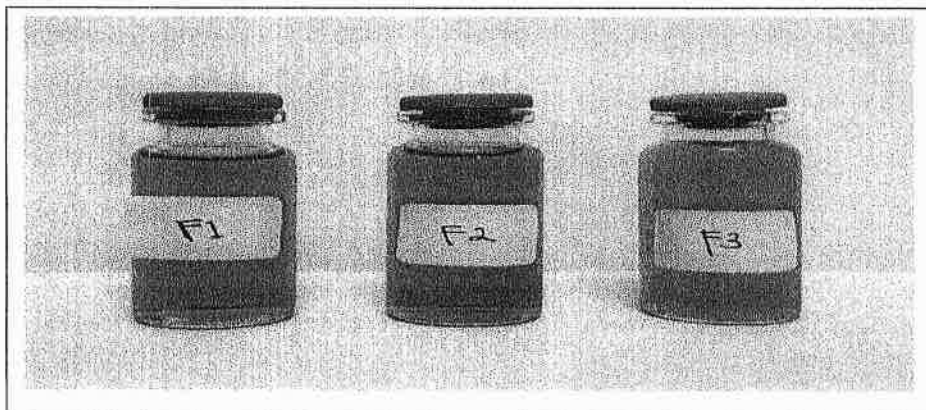
Kandungan senyawa fenolik tersebut didukung oleh penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa dalam tumbuhan cakar ayam (*S. plana*) terkandung senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid dan tanin (Setyawan & Darusman, 2008; Chikmawati, *et al*, 2012; Miftahudin, dkk., 2015).

D. Sintesis Nanopartikel Herbal Ekstrak Etanol Tumbuhan Paku *S. plana*

Dalam penelitian ini nanopartikel herbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* disintesis dengan metode gelasi ionik. Dalam metode gelasi ionik nanopartikel disintesis dengan melibatkan proses ikatan silang (*crosslinking*) antara polielektrolit dengan adanya pasangan ion multivalennya. Pembentukan ikatan silang akan memperbesar kekuatan mekanis dari partikel yang terbentuk (Park & Yeo, 2007). Dalam penelitian ini sebagai kitosan digunakan bahan polimer kationik multivalen sedangkan pasangan anion multivalen pasangannya adalah natrium tripoliposfat (Na-TPP). Pembentukan

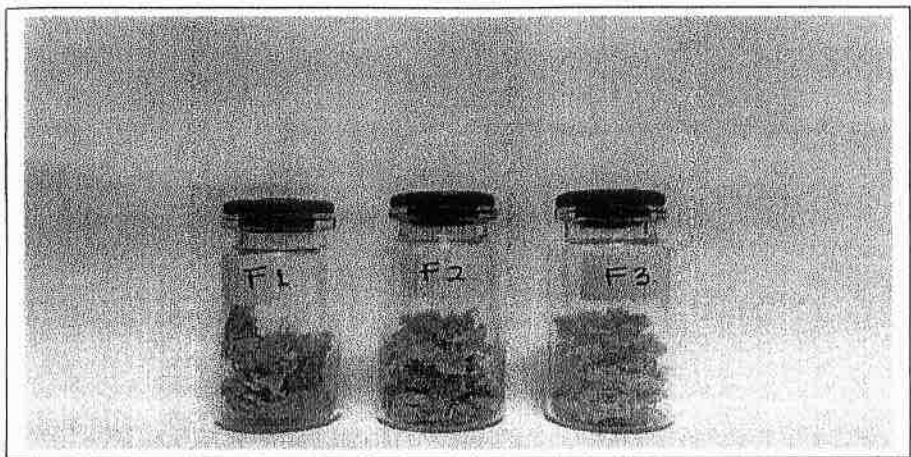
mikropartikel dengan metode gelasi ionik dilakukan dengan proses pencampuran dua fase cair, fase yang satu mengandung kitosan dan fase yang satu mengandung anion multivalen. Kitosan dilarutkan dalam larutan dengan pH asam yakni larutan asam asetat 5% untuk mengubah gugus amino ($-NH_2$) pada kitosan menjadi kation (NH_3^+). Gugus yang bermuatan positif tersebut selanjutnya mampu melakukan interaksi ionik dengan bahan aktif dalam ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* yang bermuatan negatif. Sistem yang terbentuk cenderung menyisakan gugus ammonium bebas yang akan saling tolak-menolak. Hal ini dapat melemahkan kompleks nanopartikel yang telah terbentuk, sehingga perlu ditambahkan suatu pengikat silang (*crosslinker*) yang mampu menstabilkan muatan positif yang tersisa yakni berupa anion tripolifosfat (TPP) (Mohanraj & Chen, 2006; Martien, dkk., 2012).

Dalam penelitian ini disintesis tiga formula nanopartikel herbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana*, dengan variasi massa kitosan yakni 0,5%; 0,75% dan 1,0 %. Sementara itu natrium tripolifosfat yang digunakan sebagai pengikat silang berkonsentrasi 0,5%. Hasil sintesis menunjukkan bahwa ketiga formula nanopartikel herbal berupa cairan koloidal berwarna kuning (Gambar 5.3).



Gambar 5.3. Nanopartikel herbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* bentuk cairan koloidal

Selanjutnya masing-masing formula nanopartikel herbal dikeringkan dengan *freezedryer* selama 28 jam menghasilkan nanopartikel padat berwarna putih kehijauan (Gambar 5.4).



Gambar 5.3. Nanopartikel herbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* bentuk serbuk

E. Karakteristik Nanopartikel Herbal Ekstrak Etanol Tumbuhan Paku *S. plana*

1. Ukuran Partikel Nanopartikel Herbal Ekstrak Etanol Tumbuhan Paku *S. plana*

Dalam penelitian ini ukuran nanopartikel herbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* hasil sintesis ditentukan menggunakan metode DLS (*Dynamic Light Scattering*) menggunakan instrumen Zetasizer Nano (Malvern). Penentuan ukuran partikel dilakukan sebanyak 5 kali untuk masing-masing formula dan hasilnya disajikan pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Ukuran partikel nanoherbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana*

Formula Nanoherbal	Ukuran partikel nanoherbal (nm)					
	1	2	3	4	5	Rata-rata
F-1	780,7	702,0	640,4	628,4	756,2	701,54
F-2	1302,0	1488,0	1411,0	1250,0	1008,0	1.291,8
F-3	1351,0	1406,0	1421,0	1382,0	1413,0	1.394,6

Dari Tabel 5.2 dapat dinyatakan bahwa nanopartikel herbal formula F-1 memiliki ukuran partikel kurang dari 1000 nm yakni 701,54 nm. Sementara itu nanopartikel herbal formula F-2 dan F-3 memiliki ukuran partikel lebih dari 1000 nm yakni masing-masing 1.291,8 dan 1.394,6 nm. Menurut Tiyafoonchai (2003) dan Buzea, *et al* (2007), nanopartikel yang digunakan sebagai material penghantar obat (*drug carrier*) memiliki diameter antara 1-1000 nm. Dengan demikian di antara ketiga formula nanopartikel herbal hasil sintesis yang memenuhi persyaratan sebagai nanopartikel adalah F-1 karena memiliki ukuran partikelnya kurang dari 1000 nm. Ukuran partikel dalam bentuk

nanopartikel mempengaruhi kemudahan masuknya material tersebut ke dalam sel. Semakin kecil ukuran partikelnya maka semakin mudah masuk ke dalam sel dan semakin meningkat absorpsinya di dalam tubuh (Martien, dkk., 2012).

2. Potensial Zeta Nanoherbal Ekstrak Etanol Tumbuhan Paku *S. plana*

Potensial zeta merupakan parameter muatan listrik antara partikel koloid. Nilai potensial zeta dihasilkan dari adanya beda potensial antara muatan listrik pada Stern layer dengan diffuse layer dari partikel koloid. Harga potensial zeta nanopartikel herbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* hasil sintesis ditentukan menggunakan instrumen Zetasizer Nano (Malvern). Penentuan potensial zeta dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing formula dan hasilnya disajikan pada Tabel 5.3.

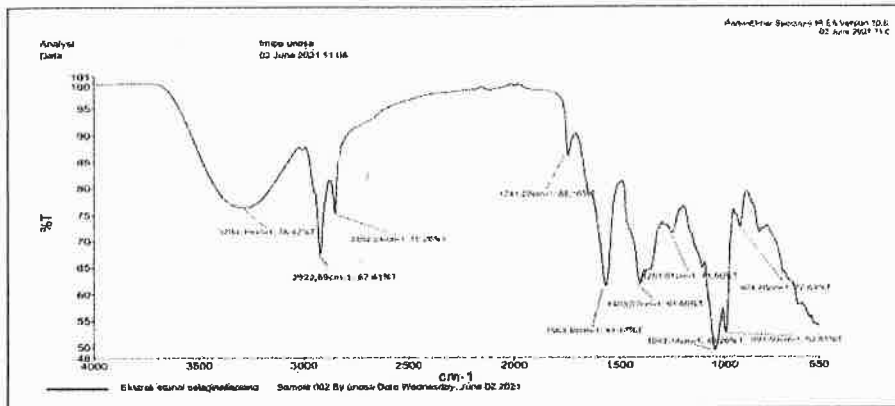
Tabel 5.3. Harga potensial zeta nanoherbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana*

Formula Nanoherbal	Potensial Zeta (mV)			
	1	2	3	Rata-rata
F-1	+421	+500	+577	+499,3
F-2	+409	+440	+491	+446,7
F-3	+375	+403	+368	+382,0

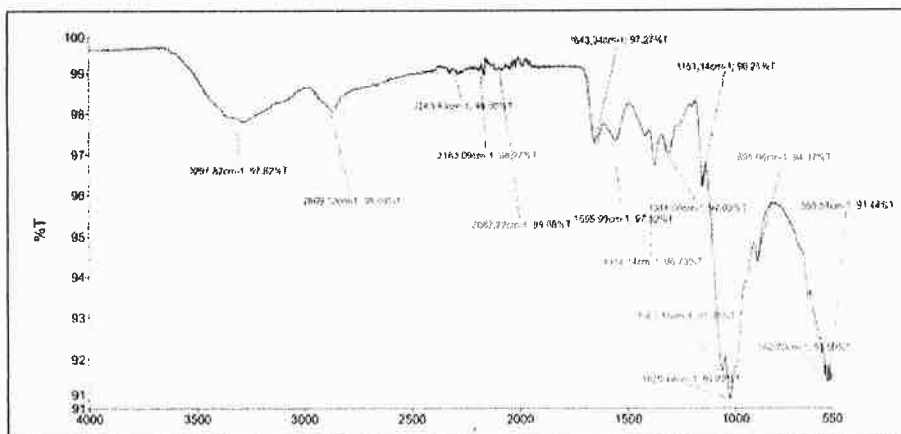
Dari Tabel 5.3 dapat dinyatakan bahwa ketiga formula nanopartikel herbal hasil sintesis memiliki nilai potensial zeta lebih besar dari + 30 mV. Nanopartikel dengan nilai potensial zeta lebih kecil dari -30 mV dan lebih besar dari +30 mV memiliki stabilitas lebih tinggi, karena memiliki gaya untuk mencegah terjadinya aglomerasi partikel. Dengan demikian maka ketiga formula nanopartikel herbal hasil sintesis memiliki sifat yang stabil atau tidak mudah mengalami aglomerasi atau flokulasi sehingga tidak mudah mengendap (Murdock, et al., 2008). Berdasarkan nilai potensial zetanya, nanopartikel herbal formula F-1 yang memenuhi persyaratan sebagai nanopartikel memiliki harga potensial zeta lebih dari + 30 mV yakni +446,7 mV sehingga memiliki sifat yang stabil.

3. Spektrum Inframerah Nanopartikel Herbal Ekstrak Etanol Tumbuhan Paku *S. plana*

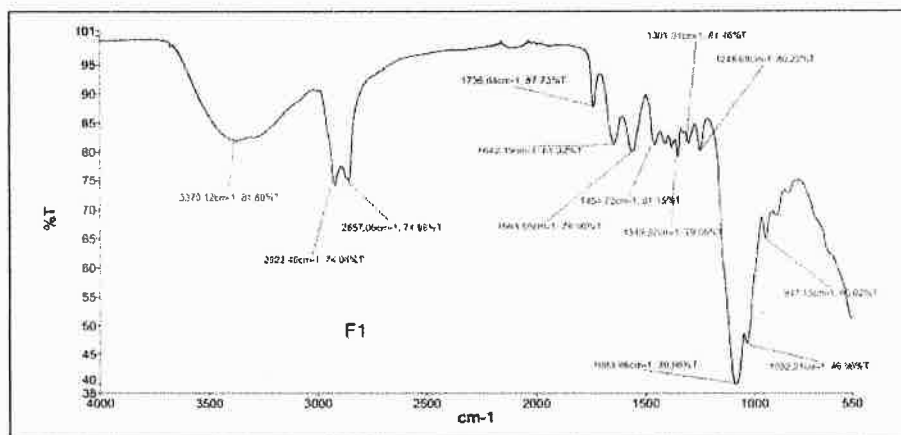
Pengukuran spektrum inframerah dilakukan untuk mengidenfikasi jenis gugus fungsi serta perubahan yang terjadi pada bilangan gelombang gugus fungsi tersebut. Puncak serapan dari gugus hidroksil (3.284,2 cm⁻¹), karbonil (1.741,2 cm⁻¹), dan ikatan rangkap C=C aromatik (1.563,92 cm⁻¹) mendukung keberadaan senyawa fenolik dalam ekstrak etanol *S. plana*.



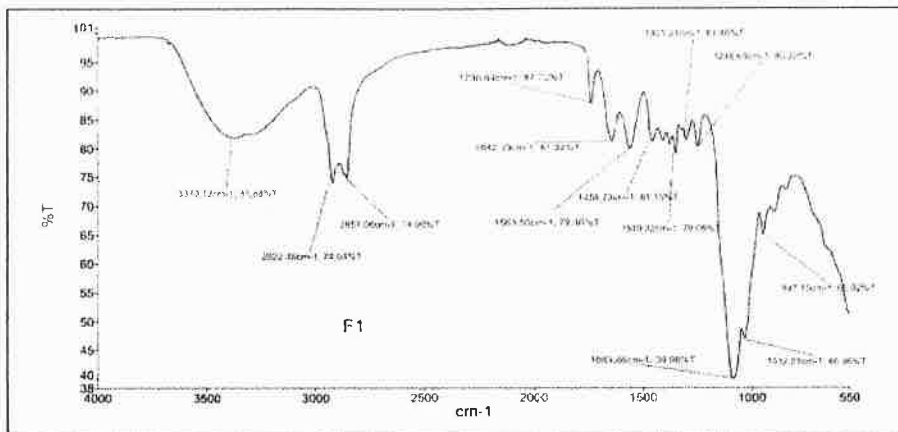
Gambar 5.4. Spektrum inframerah ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana*



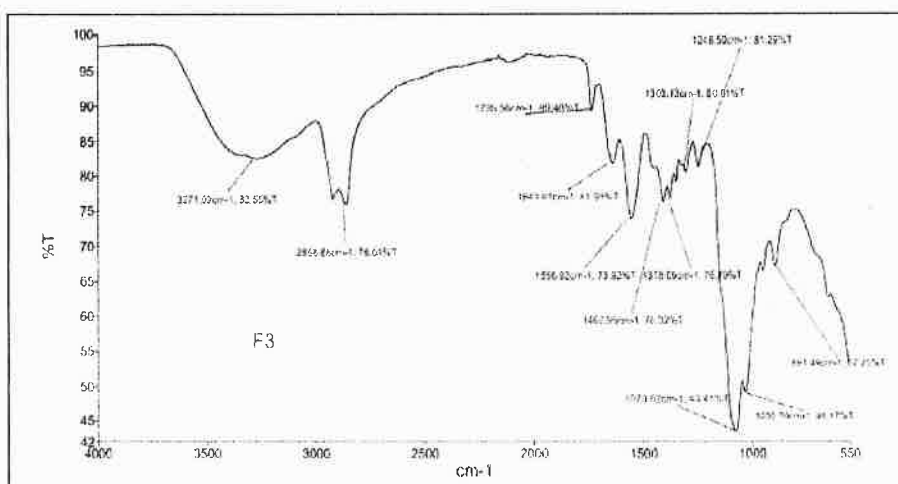
Gambar 5.5. Spektrum inframerah kitosan



Gambar 5.6. Spektrum nanoherbal formula F-1



Gambar 5.6. Spektrum nanoherbal formula F-2



Gambar 5.6. Spektrum nanoherbal formula F-3

Hasil karakterisasi dengan FTIR menunjukkan bahwa telah terbentuk nanoherbal ekstrak etanol kayu secang yang disintesis menggunakan metode gelasi ionik. Hal ini ditunjukkan oleh terjadinya pergeseran bilangan gelombang vibrasi ulur gugus O-H, gugus N-H, serta munculnya puncak baru dari vibrasi gugus fosfat (P=O). Vibrasi ulur gugus O-H dalam kitosan mengalami pergeseran dari $3296,87\text{ cm}^{-1}$ menjadi $3370,12\text{ cm}^{-1}$ (F-1), $3267,89\text{ cm}^{-1}$ (F-2), dan $3271,99\text{ cm}^{-1}$ (F-3) dalam nanoherbal ekstrak etanol *S. plana*. Hal tersebut disebabkan oleh terjadinya interaksi antara gugus -OH dalam kitosan dengan gugus -OH fenolik dari senyawa fenolik dalam ekstrak etanol *S. plana*. Vibrasi tekuk gugus N-H dalam kitosan mengalami pergeseran dari $1582,34\text{ cm}^{-1}$ menjadi $1563,55\text{ cm}^{-1}$ (F-1), $1552,75\text{ cm}^{-1}$ (F-2), dan $1556,92\text{ cm}^{-1}$ (F-3) dalam nanoherbal ekstrak etanol *S. plana*. Hal tersebut disebabkan oleh terjadinya ikatan silang antara gugus NH_2 kitosan dengan

gugus posfat dalam Na-TPP serta interaksi dengan gugus –OH fenolik dari senyawa fenolik dalam ekstrak etanol *S. plana* . Munculnya puncak vibrasi gugus fosfat pada bilangan gelombang 1083,86 cm⁻¹ (F-1), 1073,63 cm⁻¹ (F-2), 1073,92 cm⁻¹ (F-3) dalam dalam nanoherbal ekstrak etanol *S. plana* menunjukkan telah terjadi ikatan silang antara kitosan dengan gugus fosfat dalam Na-TPP (Putri dkk., 2018).

F. Hasil Penentuan Efisiensi Penjerapan Senyawa Fenolik

Dalam penelitian ini dilakukan sintesis nanoherbal menggunakan 3 formula F-1, F-2 dan F-3 yang masing-masing mengandung kitosan dengan kadar 0,5%, 0,75% dan 1%. Ke dalam masing-masing formula nanoherbal tersebut terkandung 0,1 gram ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* yang ditambahkan dalam bentuk larutan dalam pelarut etanol. Sebelum disintesis menjadi nanoherbal, ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* memiliki kandungan fenolik total sebesar 36,36 mg GAE/ g ekstrak kering. Kandungan fenolik total dari ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* yang terjerap dalam nanoherbal digunakan untuk menentukan efisiensi penjerapan senyawa fenolik.

Berdasarkan hasil penentuan kadar fenolik total nanoherbal dengan reagen Folin-Ciocalteu menggunakan spektrofotometer UV-Vis diperoleh data seperti disajikan dalam Tabel 5.4.

Tabel 5.4. Hasil pengukuran absorbansi, kadar fenolik total dan efisiensi penjerapan senyawa fenolik nanoherbal ekstrak etanol *S. plana*

Nanoherbal	Absorbansi				Kadar fenolik total (mg GAE/g nanoherbal kering)	Efisiensi penjerapan (%)
	1	2	3	Rata-rata		
F-1	0,375	0,375	0,376	0,375	26,399	72,60
F-2	0,389	0,387	0,390	0,389	27,200	74,80
F-3	0,398	0,397	0,398	0,398	27,670	76,09

Kadar fenolik total dari ketiga formula nanoherbal, ditentukan berdasarkan persamaan regresi linier kurva baku asam galat yakni $y = 0.0462x - 0,113$ serta mempertimbangkan faktor pengenceran. Dari hasil perhitungan diperoleh kadar fenolik total dalam nanoherbal formula F-1, F-2, dan F-3 masing-masing sebesar 26,399; 27,200; dan 27,670 mg GAE/ g nanoherbal kering. Besarnya efisiensi penjerapan senyawa fenolik ditentukan melalui perbandingan antara kadar fenolik total masing-masing nanoherbal dengan ekstrak etanol *S. plana* (36,363 mg GAE/ g ekstrak kering). Dari hasil perhitungan

diperoleh nilai efisiensi penyerapan untuk nanoherbal F-1, F-2, dan F-3 masing-masing sebesar 72,60%; 74,80% dan 76,09%. Efisiensi penyerapan senyawa fenolik dalam nanoherbal formula F-3 lebih tinggi dibanding F-2 dan F-2 lebih tinggi dibanding F-1. Semakin tinggi kadar kitosan yang digunakan dalam pembuatan nanoherbal, efisiensi penyerapannya juga semakin besar (Pakky, dkk., 2016).

G. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Nanopartikel Herbal Ekstrak Etanol Tumbuhan Paku *S. plana*

Berdasarkan hasil pengukuran ukuran partikel dengan zetasizer nano diketahui bahwa di antara ketiga formula nanoherbal yang memenuhi persyaratan sebagai nanopartikel adalah nanoherbal formula F-1 dengan ukuran partikel 701,54 nm. Selanjutnya nanoherbal F-1 ditentukan aktivitas antibakterinya menggunakan metode difusi cakram terhadap 4 jenis bakteri terdiri dari 2 jenis bakteri gram negatif yakni *E. coli* dan *S. dysenteriae*, serta 2 jenis bakteri gram positif yakni *S. aureus* dan *B. subtilis*. Sampel yang diuji aktivitas antibakterinya yakni cairan nanoherbal F-1 dan larutan ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana*. Dalam uji aktivitas antibakteri ini digunakan antibiotik tetrasiklin sebagai kontrol positif serta pelarut aquades dan dimetil sulfoxida (DMSO) sebagai kontrol negatif. Hasil uji aktivitas antibakteri nanoherbal F-1 dan ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* disajikan pada Tabel 5.5.

Tabel 5.5. Hasil uji aktivitas antibakteri nanoherbal F-1 dan ekstrak etanol *S. plana*

Sampel uji	Diameter rata-rata zona hambat (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
Nanoherbal F-1	20,43	23,1	20,33	18,96
Ekstrak etanol <i>S. plana</i>	10,26	10,26	9,90	9,26
Kitosan	14,04	14,11	14,85	13,45
Tetrasiklin	10,25	19,87	28,85	19,60
Aquades	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0

Menurut Davis & Stout (1971), pada uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram, kekuatan aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan diameter zona hambatan atau zona bening. Jika diameter zona bening 5 mm atau kurang dikategorikan lemah, zona bening 5-10 mm dikategorikan sedang, zona bening 10-20 mm dikategorikan kuat dan zona bening 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat. Berdasarkan data Tabel 5.4, nanoherbal F-1 memiliki aktivitas antibakteri yang sangat kuat terhadap bakteri *E. coli*, *S.*

dysentriae, dan *S. aureus* serta aktivitas antibakteri yang kuat terhadap bakteri *B. subtilis*. Sementara itu ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat terhadap bakteri *E. coli* dan *S. dysentriae*, dan aktivitas antibakteri yang sedang terhadap bakteri *S. aureus* dan *B. subtilis*. Antibiotik tetrasiklin menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat terhadap bakteri *E. coli*, *S. dysentriae*, dan *B. subtilis*, serta aktivitas antibakteri yang sangat kuat terhadap *S. aureus*.

Aktivitas antibakteri nanoherbal F-1 terhadap bakteri *E. coli* dan *S. dysentriae* lebih tinggi dibandingkan kontrol positif tetrasiklin. Sementara itu aktivitas antibakteri nanoherbal F-1 terhadap bakteri *S. aureus* dan *B. subtilis* lebih rendah dibandingkan tetrasiklin. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol *S. plana* terhadap bakteri *S. dysentriae*, *S. aureus* dan *B. subtilis* lebih rendah dibandingkan tetrasiklin, sementara itu aktivitasnya sebagai antibakteri terhadap *E. coli* setara dengan tetrasiklin.

Kandungan senyawa fenolik, khususnya flavonoid dalam ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* mendukung aktivitas antibakterinya (Lin, *et al.*, 2000; Setyawan & Darusman, 2008). Senyawa flavonoid menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara merusak dinding sel, menonaktifkan kerja enzim, berikatan dengan adhesin, dan merusak membran sel. Gugus hidroksil dalam flavonoid diduga bertanggungjawab terhadap aktivitas antibakteri (Cowan, 1999; Bylka, *et al.*, 2004; Nugraha, dkk., 2017).

Ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* yang dibuat sediaan nanoherbal F-1 menunjukkan peningkatan aktivitas antibakteri baik bakteri *E. coli*, *S. dysentriae*, *B. subtilis*, maupun *B. subtilis*. Dalam ukuran nano, luas kontak permukaan partikel menjadi lebih besar yang dapat meningkatkan jumlah zat aktif yang terisolasi lebih banyak sehingga aktivitas antibakteri semakin kuat (Kammona & Costas, 2012). Partikel dalam ukuran nano memiliki kemampuan dalam menembus ruang-ruang antar sel, baik melalui difusi maupun opsonifikasi (Buzea, *et al.*, 2007; Martien, dkk., 2012). Keberadaan polimer kitosan dalam nanoherbal F-1 juga mendukung aktivitas antibakterinya karena memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri. Menurut Zhang, *et al.* (2004), kitosan memiliki aktivitas antibakteri dengan dua kemungkinan mekanisme yakni kitosan menempel pada permukaan sel bakteri membentuk membran polimer yang dapat mencegah masuknya nutrisi masuk ke dalam sel sehingga sel akan mati. Yang kedua kitosan dengan bobot molekul yang rendah dapat masuk ke dalam sel dan meliputi sel.

Karena kitosan dapat mengadsorpsi substansi elektronegatif dalam sel maka akan mengganggu aktivitas bakteri.

H. Luaran Hasil Penelitian

Kegiatan penelitian ini dilaksanakan untuk mendukung rencana strategis Universitas Negeri Surabaya yakni meningkatkan jumlah penelitian dosen, publikasi internasional serta kerjasama internasional (Tim, 2016). Penelitian ini juga mendukung salah satu penelitian unggulan Universitas Negeri Surabaya yakni fokus riset unggulan bidang ilmu keolahragaan dan kesehatan dengan tema riset teknologi kemandirian bahan baku obat serta topik riset prioritas pengembangan obat tradisional berbasis IPTEK untuk penyakit tropis (Tim, 2021). Luaran yang sudah dicapai melalui kegiatan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Publikasi di seminar internasional Mathematics, Informatics, Science, and Education, International Conference (MISEIC) yang diselenggarakan oleh FMIPA Universitas Negeri Surabaya pada tanggal 4 September 2021 dengan judul: Phytochemical screening, total flavonoid content, and total phenolic content of ethanol extract of the Indonesian fern *Selaginella plana*. Artikel ini diusulkan untuk dimuat dalam Journal of Physic Conference Series yang dipublikasikan oleh IOP publishing terindeks scopus.
2. Publikasi di jurnal internasional terindeks scopus (Q4) Tropical Journal of Natural Product Research dengan judul: Synthesis of Nanoherbs from Ethanolic Extract of Indonesian Fern *Selaginella plana* and Antibacterial Activity Assay. Artikel tersebut telah disubmit tanggal 1 Desember 2021.
3. Paten sederhana dengan judul : Proses Pembuatan Nanoherbal Dari Ekstrak Etanol Tumbuhan Paku *Selaginella Plana*. Pendaftaran paten masih diproses di LPPM Universitas Negeri Surabaya.
4. Buku ajar dengan judul : Sintesis Nanoherbal dengan Metode Gelasi Ionik, dalam proses pengurusan ISBN di Unesa University Press.

BAB VII

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan :

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan:

1. Nanopartikel herbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* formula F-1, F-2 dan F-3 memiliki ukuran partikel masing-masing 701,54; 1.291,8 dan 1.394,6 nm. Nanoherbal formula F-1 memenuhi persyaratan sebagai nanopartikel karena memiliki ukuran partikel kurang dari 1000 nm. Nanopartikel herbal formula F-1, F-2 dan F-3 memiliki harga potensial zeta masing-masing +499,3 ; +446,7 dan +382,0 mV. Ketiga formula nanopartikel herbal memiliki sifat yang sangat stabil. Terjadinya pergeseran bilangan gelombang vibrasi ulur gugus O-H, gugus N-H, serta munculnya puncak baru dari vibrasi gugus fosfat (P=O) dalam spektrum inframerah mendukung telah terbentuknya nanoherbal pada ketiga formula nanoherbal. Besarnya efisiensi penjeraban pada nanoherbal F-1, F-2 dan F-3 masing-masing sebesar 72,60%; 74,80% dan 77,30%.
2. Nanoherbal F-1 memiliki aktivitas antibakteri yang sangat kuat terhadap bakteri *E.coli*, *S. dysenteriae*, dan *S. aureus* serta aktivitas antibakteri yang kuat terhadap bakteri *B. subtilis*. Nanoherbal F-1 menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih kuat dibandingkan ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana*.

B. Saran

Penelitian lanjutna sangat diperlukan untuk mendukung kelayakan nanopartikel herbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* sebagai bahan antibakteri sehingga mendukung aspek komersialisasi dari produk tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Abirami, A, Halith, SM, Pillai, KK, Anbalagan, C. (2014) Herbal Nanoparticle for Anticancer Potential-A Review. *J of Pharm and Pharmaceu Sci.* 3(8):2123-2132.
- Agnihotri, SA, Nadagounda, NM, Tejraj, MA. (2004). Recent Advances on Chitosan Based Micro and Nanoparticles in Drug Delivery. *Journal of Control Release.* 22(100): 5-28
- Alves, TMA, Silfa, AF, Brandao, M, Grandi, TS, Smania, E, junior, AS, Zani, CL (2000). Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 95(3):367-373.
- Bhatia, A, Shard, P, Chopra, D, Mishra, T (2011). Chitosan Nanoparticles As Carrier of Immunorestoratory Plant Extract: Synthesis, Characterization and Immunorestoratory Efficacy, *International Journal of Drug Delivery*, 3: 381-385.
- Bhumkar, DR & Varsha, BP. (2006). Studies on Effect of pH on Crosslinking of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note. *AAPS Pharm Sci Tech.* 7 (2): 1-6.
- Buzea, C., Blandino, IIP, Robbie, K (2007) Nanomaterial and nanoparticles: sources and toxicity, *Biointerphases*, 2: MR170– MR172.
- Bylka, W, Matlawska, I, Pilewski, NA (2004). Natural Flavonoid as Antimicrobial Agents. *JANA.* 7 (2): 24-31.
- Chikmawati, T, Setyawan, AD, Miftahudin. (2012). Phytochemical Composition of *Selaginella* spp from Java Island Indonesia. *Jurnal Makara Seri Sains* 16 (2): 129-133.
- Cowan, MM. (1999). Plant Product as Antimicrobial Agent. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 564-582
- Davis, WW & Stout, TR (1971). Disc Plate Method of Microbiological Assay. *Journal of Microbiology*, 22, 659-665
- Frazier, WC & Westhoff, DC. (1988). *Food Microbiology*. 4-th Edition. New York : Mc Graw- Hill Book, Inc.
- Gonçalez, E., Felicio, JD, Pinto, MM (2001). Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34: 1453-1456.
- Handayani, S, Risdian, C, Meiyanto, E, Udin, Z, Andriyani, R, Angelina, M (2012). *Selaginella* Active Fractions Induce Apoptosis on T47D Breast Cancer Cell. *Indonesian J. Pharm.* 23 (1): 48-53.
- Harada, K., Rahayu, M., Muzakkir, A. (2002). *Medicinal Plants of Gunung Halimun National Park, West Java, Indonesia*. Bogor: Biodiversity Conservation Project - JICA, PHPA & LIPI.
- Haskell, RJ. (2006) *Physical Characterization of Nanoparticles*, in : *Nanoparticles* London: Pharmaceutical Press.
- Hindrayawati & Alimuddin (2010). Sintesis dan karakterisasi silika gel dari abu sekam padi dengan menggunakan natrium hidroksida (NaOH). *Jurnal Kimia Mulawarman.* 7 (2): 75-77.
- Heyne, K (1987). *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jilid 1. Jakarta: Departemen Kehutanan.
- Jawetz, E, Melnick, JL & Adelberg, EA. (2019). *Medical Microbiology*. 28th Ed, New Jersey : Prentice Hall International Inc.

- Jung, HJ., Park, K, Lee, LS, Kim, HS, Yeo, SH, Woo, ER, Lee, DG (2007). S-Phase accumulation of *Candida albicans* by anticandidal effect of amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30 (10): 1969-1971.
- Jung, HJ., Sung, WS, Yeo, SH, Kim, HS, Lee, LS, Woo, ER, Lee, DG (2006). Antifungal effect of amentoflavone derived from *Selaginella tamariscina*. *Archives of Pharmacal Research* 29 (9): 746-751.
- Kafshgari, MH, Mohammad, K, Mobina, K, Sahar, K (2011). Reinforcement of Chitosan Nanoparticles Obtained by an Ionic Crosslinking Process. *Iranian Polymer Journal*. 20(5): 445- 456
- Kammona, O & Costas, K. (2012). A Review Recent Advances in Nanocarrier-based Mucosal Delivery of Biomolecules. *Journal of Controlled Release*. 161 (3): 781-794.
- Kusbandari, A & Susanti, H. 2017. Determination of Total Flavonoid and Antioxidant Activity of Methanol Extract of *Maranta arundinacea* L Fresh Leaf and Tuber. *Journal of Physic Conference Series*. 259.012010.
- Lee, CW, Choi, HJ, Kim, HS, Kim, DH, Chang, LS, Moon, HT, Lee, SY, Oh, WK, Woo, ER (2008). Biflavonoids isolated from *Selaginella tamariscina* regulate the expression of matrix metalloproteinase in human skin fibroblasts. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 16 (2): 732-738.
- Lin, YM. (2004). Beta-fluoroethyl thiourea compounds and use. *United States Patent* 6677350.
- Lin, YM., Anderson, H, Flavin, MT., Y.S.H. Pai. YSH. (1997). *In vitro* anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. *Journal of Natural Products* 60: 884-888.
- Lin, LC., Kuo, YC., Chou, CJ (2000). Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. *Journal of Natural Products* 63 (5): 627-630.
- Markus, J, Wang, D, Kim, YJ, Ahn, S, Mathiyalagan, R, Wang, C, Yang, DC. (2017). Biosynthesis, Characterization, and Bioactivities Evaluation of Silver and Gold Nanoparticles Mediated by the Roots of Chinese Herbal *Angelica pubescens* maxim. *Nanoscale Research Letters*, 12(1) 46
- Martien, R. Adhyatmika, Irianto, IDK, Farida, V, Sari, DP (2012). Perkembangan Teknologi Nanopartikel Sebagai Sistem Penghantaran Obat. *Majalah Farmaseutik*. 8 (1): 133-144.
- Miftahudin, Setyaningsih, DS, Chikmawati, T. (2015). Pertumbuhan dan Kandungan Bahan Bioaktif *Selaginella plana* dan *Selaginella willdenovii* pada Beberapa Media Tanam. *Jurnal Sumberdaya HAYATI*, 1 (1): 1-6.
- Miki, K., Nagai, T, Nakamura, T, Tuji, M, Koyama, K, Kinoshita, K, Furuhashi, K, Yamada, H, Takahashi, K (2008). Synthesis and evaluation of influenza virus sialidase inhibitory activity of hinokiflavonesialic acid conjugates. *Heterocycles* 75 (4).
- Mohanraj, VJ & Chen, Y (2006). Nanoparticles-A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 5 (1): 561-573.
- Murdock, RC, Stolle, LB, Schrand, AM, Schlager, JJ, Hussain, SB (2008). Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to in Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. *Toxicol Sci*. 101(2):239-53.

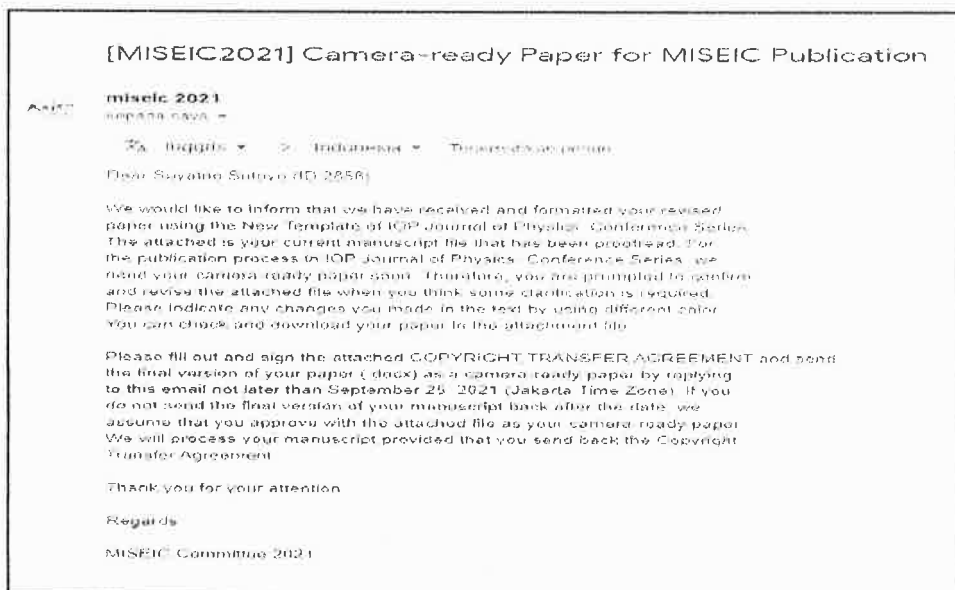
- Nugaraha, AC, Prasetya, AT, Mursiti, S (2017). Isolasi, Identifikasi, Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid sebagai Antibakteri dari Daun Mangga. *Indo. J. Chem. Sci.* 6 (2):91-96.
- Ortez, JH (2005). Disk Diffusion Testing in Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. Marie B. Coyle (Coord. Ed). *American society for Microbiology, America.*
- Pakki, E, Sumarheni, Aisyah, F, Ismail, Safirahizdni, S. (2016). Formulasi nanopartikel Ekstrak Bawang Dayak (*Eleutherine americana* (Aubl) Merr) dengan Variasi Konsentrasi Kitosan Tripolifosfat (TPP). *J. Trop. Pharm. Chem.* 3 (4): 251-263.
- Park, K & Yeo, Y. (2007). Microencapsulation Technology. In: Swabrick, J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 3rd ed, Vol 4. New York: Informa Healthcare USA.
- Pokharel, YR., Yang, JW., Kim, JY., Ohb, HW., Jeong, HG., Woo, ER, Kang, KW. (2006). Potent inhibition of the inductions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by taiwaniaflavone. *Nitric Oxide* 15 (3): 217-225.
- Putri, IA, Sundaryono, A, Candra, IN (2018). Karakterisasi nanopartikel kitosan ekstrak daun ubijalar (*Ipomoea Batatas* L.) menggunakan metode gelasi ionik. *Alloptrop.* 2 (2): 203-207.
- Rusli, PR. (2011). *Pembuatan dan karakterisasi nanopartikel titanium dioksida fasa anatase dengan metode sol-gel.* FMIPA Universitas Negeri Medan.
- Sannomiya, M., Cardoso, CRP, Figueiredo, ME, Rodrigues, CM, dos Santos, LC, dos Santos, FV, Serpeloni, JM, Colus, LMS, Vilegas, W, Eliana, Varanda. A (2007). Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 112: 319-326.
- Silverstein, RM, Webster, FX, Kiemle, DJ (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compound.* 7th Ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Selphina Kumowal, S, Fatimawali, Jayanto, I. (2019). Uji Aktivitas Ntibakteri anopartikel Ekstrak Lengkuas Putih (*Alpinia Galanga* (L.) Willd) terhadap Bakteri *Klebsiella pneumoniae* . *Pharmacon.* 8 (4): 781-790.
- Setyawan, AD. & Darusman, LK. (2008). Review: Senyawa Biflavonoid pada Selaginella Pal. Beau dan Pemanfaatannya. *Biodiversitas.* 9 (1): 64-81.
- Sun, DM., Luo,WH, Li, ZY. (2006). Determination of amentoflavone in 11 species of *Selaginella* medicinal material by HPLC. *Zhong-Yao-Cai.* 29 (1): 26-28.
- Tim (2016). *Rencana Strategis Universitas Negeri Surabaya 2016-2020.* Surabaya: Unesa.
- Tim (2021). *Panduan Penelitian Dana PNBPU Universitas Negeri Surabaya tahun 2021.* Surabaya: LPPM Unesa.
- Tiyaboochai, W (2003). Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery. *Naresuan University Journal*, 11(3): 51-66.
- Uluk, A., Sudana, M., Wollenberg, E. (2001). *Ketergantungan Masyarakat Dayak terhadap Hutan di Sekitar Taman Nasional Kayan Mentarang.* Bogor: Cifor.
- Vaughn, JM & Williams, RO (2007). *Nanoparticle Engineering.* 3rd Ed, Vol 1, New York: Informa Healthcare USA.
- Wardana, AP, Aminah, NS, Fahmi, MZ, Kristanti, AN, Zahrah, HI, Takaya, Y, Choudhary, MI (2020). Nanoencapsulation of *Syzygium polycephalum* Extract

- Using Folate Modified κ -Carrageenan as Vehicles for Pronounced Anticancer Activity. *Tropical Journal of Natural Product Reseach*. 4(11):945-952.
- Woo, ER., Lee, JY., Cho, IJ., Kim, SG., Kang, KW (2005). Amentoflavone inhibits the induction of nitric oxide synthase by inhibiting NF- κ B activation in macrophages. *Pharmacological Research* 51 (6): 539-546.
- Yang, JW., Pokharel, YR., Kim, MR., Woo, ER, Choi, HK., Kang, KW. (2006). Inhibition of inducible nitric oxide synthase by sumaflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. *Journal of Ethnopharmacology* 105 (1-2): 107-113.
- Zhang, YQ, Tao, ML, Shen, WD, Zhou, YZ, Ding, Y, Ma, Y, Zhou, WL. (2004). Immobilization of Lasparaginase on the Microparticles of the Natural Silk Sericin Protein and its Characters. *Biomaterials*. 25 (4): 3751-3759.

LAMPIRAN

Lampiran 1 . Publikasi di Seminar Internasional Mathematics, Informatics, Science, and Education, International Conference (MISEIC)

Artikel hasil penelitian telah dipublikasikan melalui Mathematics, Informatics, Science, and Education, International Conference (MISEIC) yang diselenggarakan oleh FMIPA Universitas Negeri Surabaya pada tanggal 4 September 2021 dengan judul: Phytochemical screening, total flavonoid content, and total phenolic content of ethanol extract of the Indonesian fern *Selaginella plana*. Artikel ini diusulkan untuk dimuat dalam Journal of Physics Conference Series yang dipublikasikan oleh IOP publishing terindeks scopus.



Phytochemical Screening, Total Flavonoid Content, and Total Phenolic Content of Ethanol Extract of the Indonesian Fern *Selaginella plana*

Suyatno Sutoyo^{*1}, Amaria¹, I Gusti Made Sanjaya¹, Rusly Hidayah¹, Devy Puspita Sari¹, Nurruhdayah Ahmad Fadzlillah²

¹ Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Surabaya, Indonesia

² The Training and International Audit, International Islamic University Malaysia

* Corresponding author: suyatno@unesa.ac.id

Abstract. *Selaginella plana* (Cakar ayam) is one of the ferns that grow widely in Indonesia and has been used by the community as food, ornamental plants and traditional medicines to treat wounds, respiratory infections, liver disorders, urinary tract infections, fractures, rheumatism, cancer and increase the body immunity. Research on the chemical constituents of this plant has not been widely reported. This study aims to describe the content of secondary metabolites in the ethanol extract of the fern *S. plana* and to determine the total flavonoid content and total phenolic content. The content of secondary metabolites was determined using phytochemical tests, total phenolic content and total flavonoid content were determined by UV-Vis spectroscopy. The results showed that the ethanol extract of *S. plana* contained secondary metabolites of steroids, saponins, phenolics, flavonoids, alkaloids, and tannins. Based on the results of determination using the UV-Vis spectroscopy, it is known that the ethanol extract of *S. plana* has a total flavonoid content and a total phenolic content of 35.723 mg QE/ g sample mass and 36.363 mg GAE/ g dried extract, respectively.

1. Introduction

Selaginella plana (cakar ayam) is one of the fern which becomes Indonesia's biological wealth [1]. This plant is spread in Southeast Asia, in Java it grows to a height of approximately 750 above sea level, generally on the moist and protected riverbank and on the slopes of ravines. *S. plana* has been known and used by society as food (vegetables), ornamental plants, and traditional medicines. It has been used for postpartum care, treating wounds, treating bleeding, menstrual disorders, increasing the body immunity, as well as a postnatal tonic [2,3,4]. Traditionally, *S. plana* has been used in the treatment of several diseases such as cancer, respiratory infections, liver disorders, urinary tract infections, fractures and rheumatism [5].

Chikmawati, *et al* reported that the *Selaginella* species on the island of Java had found secondary metabolites of the flavonoid group, with the highest content of biflavonoid compounds [6]. Biflavonoid compounds from ferns of the *Selaginella* genus have various bioactive properties, including antioxidants, anticancer, antibacterial, antiviral, antifungal, antimalarial, and anti-inflammatory properties [7,8,9,10].

As a phenolic compound, biflavonoid had been separated from several species of ferns in the Selaginellaceae family. Amentoflavone had been separated from *S. tamariscina* and *S. bryopteris*, [11,12]. From *S. lepydophylla*, robustataflavone, ginkgetin, kayaflavone and podocarpus flavone A had been separated [13]. Meanwhile, hinokiflavone had been reported from *S. crysocaules* and *S. bryopteris* [12,14].

Research on the content of phenolic compounds and flavonoid content in the fern *S. plana* has never been reported. This paper will report on the results of the phytochemical screening of the ethanol extract of the fern *S. plana* and the results of determining the total flavonoid content and total phenolic content.

2. Materials and methods

2.1. Material

The dried powder of *S. plana*'s aerial parts, ethanol (80%, p.a.), methanol, acetic anhydride, concentrated sulfuric acid, hydrochloric acid (1 M, 2 M, concentrated), magnesium ribbon, FeCl_3 (1%, 5%), Mayer reagent, Dragendorff reagent, Wagner reagent, gallic acid (Merck), Folin-Ciocalteu reagent (Merck), Na_2CO_3 7.5%, quercetin (Sigma), AlCl_3 10%, ammonia, sodium acetate 1 M.

2.2. Instruments

Spectrophotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800), magnetic stirrer (Heidolph), rotary vacuum evaporator (Buchi R-300), oven (Heraeus ST-5042), analytical balance (Advanturer Ohaus), vacuum pump (Gast DOA-P-504-BN), water bath (Mettler), freeze dryer (Martin Christ Alpha 1-2), vortex mixer, volumetric flask, beaker glass, Buchner funnel, micropipette, test tube, drip plate, spatula, maceration vessel.

2.3. Research procedures

2.3.1. Collection and preparation of sample

Samples of *S. plana* were collected from the Kletak forest, Nongkojajar, Pasuruan, East Java. Before the further investigation, the sample was identified at LIPI Botanical Garden, Purwodadi, East Java. Furthermore, the sample is cleaned of attached dirt, then dried at room temperature for 12 days. The dried sample was grinded into a fine powder that was ready for extraction [15].

2.3.2. Extraction

The dried powder of *S. plana*'s aerial part (1000 g) were macerated with ethanol 80% for 3 x 24 hours. Then filtered using a Buchner funnel. The ethanol extract obtained was evaporated in vacuo using rotary vacuum evaporator, resulted the concentrated extract. It was dried in freeze dryer to produce the dried extract [15].

2.3.3. Phytochemical screening

2.3.3.1. Triterpenoid and steroid test (Liebermann-Burchard test)

About one mg of the ethanol extract was placed on a drip plate, added 3 drops of acetic anhydride and stirred with a spatula until dissolved. Then one drop of concentrated sulfuric acid was added to the mixture [16].

2.3.3.2. Phenolic test

About one mg of the ethanol extract was placed on a drip plate, added 5 drops of methanol, then stirred with a spatula until dissolved. Then into the mixture added 3 drops of 5% FeCl_3 solution in ethanol [16].

2.3.3.3. Flavonoid test (Shinoda test)

About one mg of the ethanol extract was placed on a drip plate, added 5 drops of methanol, then 3-4 small pieces of Mg ribbon and 2 drops of concentrated HCl are added to the mixture [17].

2.3.3.4. Alkaloids test

A total of 4 mg of the etanolic extract was dissolved with 3 mL of methanol and 5 mL of ammonia to pH 8-9, then the mixture was filtered. The filtrate was added with 2 mL of 2 M HCl solution. After the mixture was shaken, 5 drops of the top layer were added into 4 test tubes. The solution in tube 1 was used as a blank, the solution in tubes 2, 3, and 4 was added one drop of Mayer, Wagner, and Dragendorff reagents, respectively [16].

2.3.3.5. Saponins test

About of one mg of the etanolic extract was put into a test tube, then added 5 mL of distilled water, then shaken for 1 minute. If foam appears, added 2 drops of 1 M HCl solution. If the foam with a height of 1-3 cm did not disappear or lasts for 10 minutes, the sample contained saponins [16].

2.3.3.6. Tannins test

About of one mg of the etanolic extract was placed on a drip plate, added 5 drops of methanol, stirred with a spatula until dissolved. Then 2-3 drops of 1% FeCl₃ solution were added. The formation of blue, green, or brownish-green color indicates the presence of tannins [17].

2.3.4. Determination of total phenolic contents

A total of 1.0 mL of the extract solution was pipetted from the stock solution (1000 ppm) was put in a test tube, then added 1.5 mL of Folin Ciocalteu reagent (10% = 1 : 10). After being allowed to stand for 3 minutes, 1.2 mL of 7.5% Na₂CO₃ was added, mixed for 3 seconds using a vortex mixer. The mixture was allowed to stand for 30 minutes, then its absorbance was measured by UV-Vis spectroscopy at a maximum absorption wavelength of 763 nm. The concentration of phenolic compounds in the extract was determined using a standard gallic acid curve with various concentrations of 10, 12, 14, 16, 18, and 20 ppm. The content of phenolic compounds was expressed as milligrams of gallic acid equivalent (GAE)/gram dried extract [18].

2.3.5. Determination of total flavonoid contents

A total of 0.5 mL of 2000 ppm extract solution was put in a test tube, then 0.1 mL of 10% aluminum (III) chloride, 0.1 mL of 1 M sodium acetate and 2.8 mL of distilled water were added. After being incubated for 30 minutes. The absorbance was measured using a UV-Vis spectrophotometer at a maximum wavelength of 433 nm. The total flavonoid content of the ethanol extract of the fern *S. plana* was determined based on the standard curve of quercetin with various concentrations of 20, 30, 40, 50, and 60 ppm. The total flavonoid content was expressed as milligrams of quercetin equivalent (QE)/gram of dried extract [19].

3. Results and discussion

3.1. Extraction of the *S. plana*'s aerial part

The dried powder of *S. plana*'s aerial part (1000 g) was macerated using ethanol 80% as a solvent for 24 hours and repeated three times. Evaporation of the solvent in vacuo, followed by drying at freeze drier for 16 hours, yielded the dark green solid (49.14 g).

3.2. Phytochemical screening

Phytochemical screening was carried out to determine the group of secondary metabolites contained in the ethanol extract of the fern *S. plana*. The tests carried out included steroids-triterpenoids test, phenolic test, flavonoids test, alkaloid test, saponin test, and tannin test.

The steroids-triterpenoids test was carried out using Liebermann-Burchard reagent. The ethanol extract of *S. plana* after being dissolved with acetic anhydride and dripped with concentrated sulfuric acid produced a bluish-green solution. According to Tiwari, *et al.*, the appearance of blue color in the test with the Liebermann-Burchard reaction indicated that the sample contained steroid compounds [16].

The phenolic test was carried out using ferric chloride reagent with a concentration of 5% in

ethanol. The ethanol extract of *S. plana* after being dissolved in methanol, then dripped with 5% ferric chloride solution turned out to be a purple solution. The appearance of green, blue, or purple color indicates that the sample contains phenolic compounds. The color occurs as a result of the formation of colored complex ions between ferric ions (Fe^{3+}) and phenolic ions in phenolic compounds [16,20].

In this study, the flavonoid test was conducted using the shinoda test. After being dissolved in methanol, 3-4 pieces of magnesium ribbon were added to the ethanol extract of *S. plana*. After adding 1 M hydrochloric acid solution, yielded the orange color solution. The formation of a yellow, orange, blue, or red colored solution indicated the presence of flavonoid compounds in the ethanol extract of *S. plana*. The color occurred as a result of the formation of colored complex ions between magnesium ions (Mg^{2+}) and phenolic ions in phenolic compounds [17].

In this study, the alkaloid test was carried out using Mayer, Wagner and Dragendorff reagents. The ethanol extract of *S. plana* after being tested using the three reagents showed positive results because it showed white, brown and orange precipitates after being added with Mayer, Wagner and Dragendorff reagents, respectively [16,20].

The test for the presence of saponin compounds in the ethanol extract was conducted by the Forth test. A number of *S. plana* ethanol extract was dissolved in water and then heated. It turns out that a persistent foam was formed. These results indicated that the extract contained secondary metabolites of the saponin group [16,20].

In this study, the tannin test was carried out with 1% ferric chloride reagent in ethanol. Ethanol extract solution of *S. plana* after being reacted with 1% ferric chloride solution formed a greenish-blue solution. According to Edeoga, *et al* the formation of blue, green, or brownish-green color indicated the presence of tannin compounds in the sample. Thus, the ethanol extract of *S. plana* contained compounds belonging to the tannin group. The color was produced due to the formation of a complex between ferric ions and phenolic ions from tannin compounds [17].

The results of the phytochemical tests above are briefly presented in the Table 1.

Table 1. Phytochemical test of ethanol extract of *S.plana*

No.	Phytochemicals	Test methods	Results (Indicating positive test)	
1	Steroids and triterpenoids	Liebermann-Burchard test	A bluish-green color	+
2	Phenolic	Ferric chloride test	A purple color	+
3	Flavonoids	Shinoda test	A orange color	+
4	Alkaloid	- Mayer test	- A white precipitate	+
		- Dragendorff test	- A orange precipitate	
		- Wagner test	- A chocolate precipitate	
5	Saponins	Forth test	Persistent foam	+
6	Tannins	Ferric chloride test	A greenish-blue color	+

Phytochemical test showed that the ethanol extract of *S. plana* contained secondary metabolites of steroids, phenolics, flavonoids, alkaloids, saponins, and tannins. The presence of phenolics and flavonoids compounds supports the results of previous studies which stated that the ferns of the genus *Selaginella* from Java contain flavonoid compounds, especially biflavonoids [6]. Beside that it also supports the potensial use of *S. plana* as an Indonesian medicinal plat.

3.2. Total phenolic content

The total phenolic content in the ethanol extract of the fern *S. plana* was determined by the spectroscopic method using Folin-Ciocalteu reagent. The reagent will be reduced by phenolic compounds to produce a blue phosphotungstate-phosphomolybdate complex [18]. The total phenolic content was determined based on the standard gallic acid curve determined by UV-Vis spectroscopy at a maximum wavelength of 763 nm. Based on measurement of the absorbance of the standard solution of gallic acid, it was obtained the standard curve presented in Figure 1.

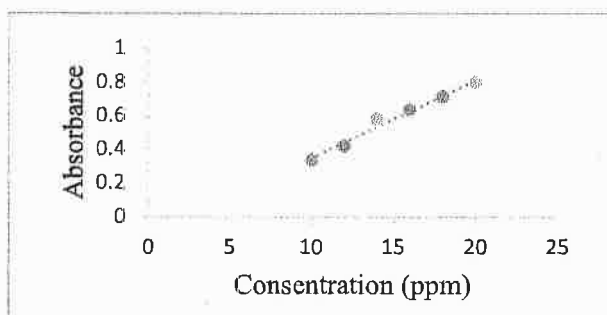


Figure 1. Standard curve of gallic acid solution

From the standart curve (**Fig 1**), it was obtained the regression equation $Y = 0.462X - 0.113$ with $R^2 = 0.9768$. The results of determining the total phenolic content of the ethanol extract of the fern *S. plana* 1000 ppm using the spectroscopic method from three measurements obtained an absorbance value of 0.558; 0.562 and 0.557, with an average value of 0.559 ± 0.003 . Based on the gallic acid standart curve and taking into account the dilution factor, the total phenolic content in the ethanol extract of the fern *S. plana* was 36.363 mg gallic acid equivalent (GAE)/gram dried extract.

3.3. Total flavonoid content

The total phenolic content in the ethanol extract of the fern *S. plana* was determined by an aluminum chloride reagent. These reagents will form yellow complexes with the carbonyl and hydroxyl groups of flavonoid compounds at the C-3 (flavonols) or C-5 (flavonols and flavone) positions and provide specific absorption in UV-Vis spectroscopy [19,21]. The total flavonoid content was determined based on the standard curve of quercetin as measured by UV-Vis spectroscopy at a maximum wavelength of 433 nm. Based on the measurement results of the absorbance of the standard solution of quercetin, the standard curve was obtained which was presented in Figure 2..

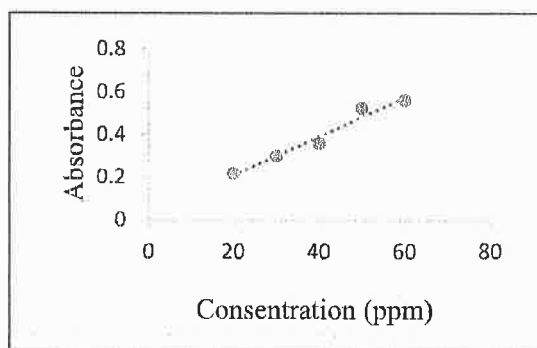


Figure 2. Standard curve of quercetin solution

The linear regression equation obtained from the standard curve was $Y = 0.0091X + 0.0298$ with $R^2 = 0.9649$. The results of the determination of the total flavonoid content of the ethanol extract of the fern *S. plana* 1000 ppm using the spectroscopic method from three measurements obtained an absorbance value of 0.678; 0.680 and 0.682, with an average value of 0.680 ± 0.002 . Based on the standard curve

of quercetin, the total phenolic content in the ethanol extract of the fern *S. plana* was 35.726 mg of quercetin equivalent (QE)/gram dried extract.

The total phenolic content and total flavonoid content of *S. plana* correspond with the results of phytochemical tests that it contains phenolics, flavonoids and tannins. The plant containing phenolics and flavonoids compounds such as *S. plana* has the potential to be used as antioxidants [18,19,20].

4. Conclusion

The study concludes that the ethanol extract of *S. plana* contains secondary metabolites of steroids, saponins, phenolics, flavonoids, alkaloids, and tannins. It has a total flavonoid content and a total phenolic content of 35.723 mg QE/ g dried extract and 36.363 mg GAE/ g dried extract, respectively.

Acknowledgment

We thank the Universitas Negeri Surabaya for financial support through the foreign collaboration research grant 2021 and Mr. Sugiono from LIPI Purwodadi Botanical Garden for help in collecting and identifying the fern *Selaginella plana*.

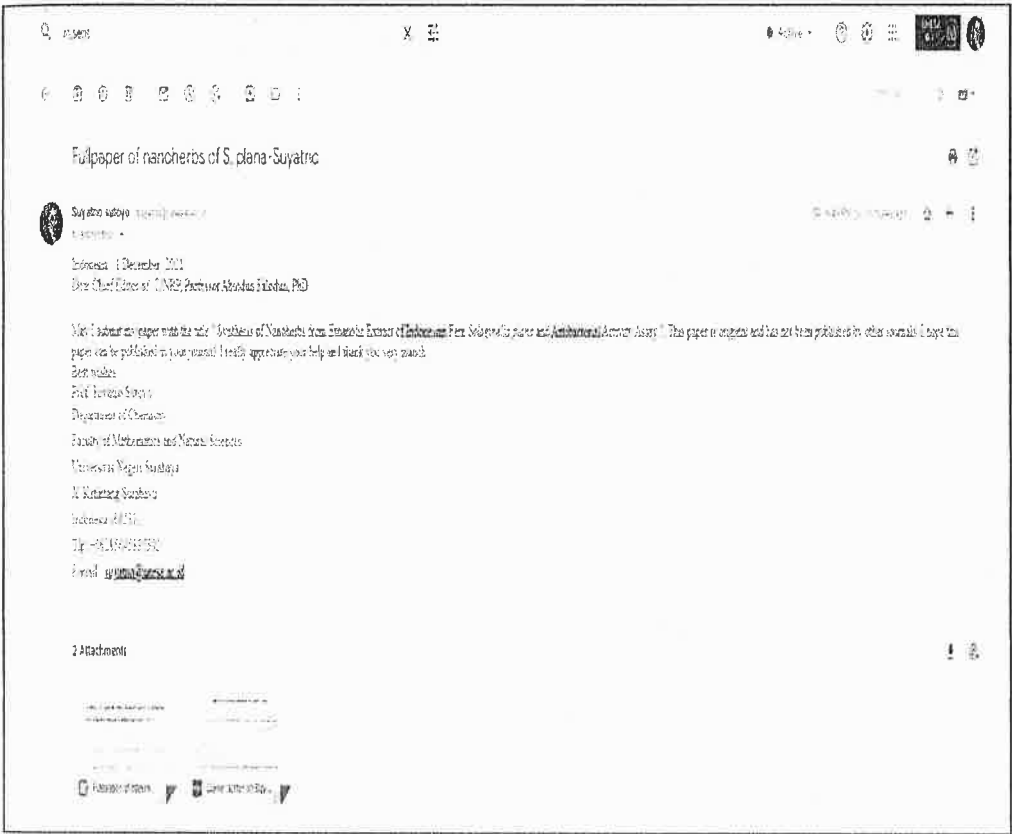
References

- [1] Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jilid 1. Jakarta: Departemen Kehutanan
- [2] Uluk, A, Sudana, M, Wollenberg, E. 2001. *Ketergantungan Masyarakat Dayak terhadap Hutan di Sekitar Taman Nasional Kayan Mentarang*. Bogor: Cifor.
- [3] Harada, K, Rahayu, M, Muzakkir, A. 2002. *Medicinal Plants of Gunung Halimun National Park, West Java, Indonesia*. Bogor: Biodiversity Conservation Project -JICA, PHPA & LIPI.
- [4] Setyawan, AD. & Darusman, LK. 2008. *Biodiversitas*. 9 (1): 64-81. DOI: 10.13057/biodiv/d120209
- [5] Bensky, D., Clavey, S., Stöger, E. 2004. *Chinese Herbal Medicine/Materia Medica*. 3rd ed. Seattle, W.A.: Eastland Press.
- [6] Chikmawati, T, Setyawan, AD, Miftahudin. 2012. *Jurnal Makara Seri Sains* 16 (2): 129-133. DOI: 10.7454/mss.v16i2.1408
- [7] Sannomiya, M, Cardoso, CRP, Figueiredo, ME, Rodrigues, CM, dos Santos, LC, dos Santos, FV, Serpeloni, JM, Colus, LMS, Vilegas, W, Eliana, Varanda. A. 2007. *Journal of Ethnopharmacology*. 112 (2): 319-326. DOI: 10.1016/j.jep.2007.03.014.
- [8] Lin, YM. 2004. *Beta-fluoroethyl thiourea compounds and use*. United States Patent 6677350
- [9] Chen, J-J., Duh, C-Y, Chen, J-F. 2005. *Planta Medica*. 71 (7): 659-665. DOI: 10.1055/s-2005-871273
- [10] Ahmad, AR., Juwita, Ratulangi, SAD., Malik, A., 2015, *Pharm Sci Res*, 2 (1): 1-10. DOI: 10.7454/psr.v2i1.3481.
- [11] Yang, JW., Pokharel, YR., Kim, MR., Woo, ER, Choi, HK., Kang, KW. 2006. *Journal of Ethnopharmacology* 105 (1-2): 107-113. DOI: 10.1016/j.jep.2005.10.001.
- [12] Sah, NK., Singh, SNP, Sahdev, S, Banerji, S, Jha, V, Khan, Z, Hasnain, SE. 2005.. *Journal of Bioscience* 30 (4): 499-505. DOI: 10.1007/BF02703724.
- [13] Su, Y, Sun, CM, Chuang, HH, Chang, PT. 2000. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 362 (1): 82-90. DOI: 10.1007/s002100000240.
- [14] Swamy, RC, Kunert, Schuhly, OW, Bucar, F, Ferreira, D, Rani, VS, Kumar, BR, Rao, AVNA. 2006. *Chemistry and Biodiversity* 3 (4): 405-414. DOI: 10.1002/cbdv.200690044.
- [15] Sutoyo, S, Tukiran, Khotijah, S. 2021. *Journal of Physics: Conference Series*. 1747. 012038. DOI: doi:10.1088/1742-6596/1747/1/012038
- [16] Tiwari, P, Kumar, B, Kaur, M, Kaur, G, Kaur, H. 2011. *International Pharmaceutica Scientia*, 1(1) 98-106. <http://docshare01.docshare.tips/files/9403/94036813.pdf>.

- [17] Edeoga, HO, Okwu, DE, Mbaebie, BO. 2005. *African Journal of Biotechnology*, 4 (7) 685-688. DOI: 10.5897/AJB2005.000-3127
- [18] Kusbandari, A & Susanti, H. 2017. *Journal of Physics: Conference Series*. 259.012010. DOI: 10.1088/1757-899X/259/1/012010
- [19] Surana, AR, Kumbare, MR, Wagh, RD. 2016. *Research Journal of Phytochemistry*. 10 (2): 67-74. DOI: 10.3923/rjphyto.2016.67.74.
- [20] Shaikh, J.R. & Patil, MK. 2020. *International of Chemical Studies*. 8(2): 603-608. DOI: 10.22271/chemi.2020.v8.i2i.8834.
- [21] Sembiring, EN, Elya, B, Sauriasari, R. 2018. *Pharmacogn J*. 10 (1): 123-127. DOI : 10.5530/pj.2018.1.22.

**Lampiran 2 . Publikasi di Jurnal Internasional Tropical Journal of Natural
Product Research**

Publikasi di jurnal internasional terindeks scopus (Q4) Tropical Journal of Natural Product Research dengan judul: Synthesis of Nanoherbs from Ethanolic Extract of Indonesian Fern *Selaginella plana* and Antibacterial Activity Assay. Artikel tersebut telah disubmit tanggal 1 Desember 2021.



Synthesis of Nanoherbs from Ethanol Extract of Indonesian Fern

Selaginella plana and Antibacterial Activity Assay

Suyatno Sutoyo^{*1}, Amaria¹, I Gusti Made Sanjaya¹, Rusly Hidayah¹, Devy Puspita Sari¹,
Nabela Dwitarani¹, Farida Dwi Oktavia¹, Nurrulhidayah Ahmad Fadzlillah²

¹ Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri
Surabaya, 60231, Indonesia

² International Institute for Halal Research and Training (INHART), International Islamic
University Malaysia (IIUM), Gombak 53100, Kuala Lumpur

* Corresponding author: suyatno@unesa.ac.id

Abstract

Selaginella plana is one of the ferns that grows widely in Indonesia and has been used by the people as food, ornamental plants and traditional medicines. The preparation of *S. plana* extract in the form of nanoparticles can overcome the weaknesses of the extract, namely the low solubility in water, bioavailability, stability, and absorption so it can increase its efficacy as an herbal medicine. Research related to the synthesis of nanoherbs from *S. plana* as an antibacterial had never been reported. This study aim to synthesize nanoherbs from the ethanolic extract of *S. plana* and testing its antibacterial activity. Extraction was carried out by maceration method, synthesis of nanoherbs by ionic gelation method using chitosan and sodium tripolyphosphate, and antibacterial assay by disc diffusion method. The synthesized nanoherbs were characterized by infrared spectrophotometer and zetasizer nano to determine particle size and zeta potential. The results showed that nanoherb of formula-1 (F-1) had a particle size in nanoparticle category (701.54 ± 67.72 nm) and had a zeta potential of $+499.3 \pm 78.00$ mV. The shift in wave number in the stretching vibration of the O-H group

(3370.12 cm^{-1}), the bending vibration of the N-H (1563.55 cm^{-1}), and the appearance of the vibration of the phosphate group (1083.86 cm^{-1}) supported the formation of nanoherbs in F-1. Nanoherbal F-1 has very strong antibacterial activity against *E. coli*, *S. dysenteriae*, and *S. aureus* as well as strong antibacterial activity against *B. subtilis*. Nanoherbal F-1 showed stronger antibacterial activity than the ethanol extract of the fern *S. plana*.

Keywords: Antibacterial activity, Ethanol extract, Ionic gelation, Nanoherbs, *S. plana*

Introduction

Selaginella plana is one of the fern which becomes Indonesia's biological wealth. This plant is spread in Southeast Asia, in Java it grows to a height of approximately 750 above sea level, generally on the moist and protected riverbank and on the slopes of ravines. *S. plana* has been known and used by people as food (vegetables), ornamental plants, and traditional medicines. It has been used for postpartum care, treating wounds and bleeding, menstrual disorders, increasing the body immunity, as well as a postnatal tonic.^{1,2,3} Traditionally, *S. plana* has been used in the treatment of several diseases such as cancer, respiratory infections, liver disorders, urinary tract infections, fractures and rheumatism.⁴

The *Selaginella* species on the island of Java had found secondary metabolites of the flavonoid group, with the highest content of biflavonoid compounds.⁵ Biflavonoid compounds from ferns of the *Selaginella* genus have various bioactive properties, including antioxidants, anticancer, antibacterial, antiviral, antifungal, antimalarial, and anti-inflammatory properties.^{6,7,8,9} As a phenolic compound, biflavonoid had been separated from several species of ferns in the Selaginellaceae family, namely amentoflavone, robustataflavone, ginkgetin, kayaflavone, podocarpus flavone, and hinokiflavone.^{10,11,12,13}

The herbal active compounds in the form of extracts have weaknesses, including low water solubility so that their bioavailability is low and functional properties decrease during

processing and storage. Preparation of herbal extracts into nano size or so called nanoherbs is able to overcome the solubility of active substances that are difficult to dissolve, improve poor bioavailability, modify drug delivery systems so that drugs can go directly to specific areas, increase the stability of active substances from environmental degradation (enzymatic decomposition, oxidation, hydrolysis), improve absorption of a macromolecular compound, and reduce the irritating effect of active substances on the gastrointestinal tract.¹⁴ The shape and size of the particles is one of the factors that affect the effectiveness of the drug, because the particle size is very influential in the process of solubility, absorption and distribution of drugs. In the nano size, the surface contact area of the particles becomes larger which can increase the number of active substances that interact so that the biological activity is stronger.¹⁵

In this study, nanoherbs were synthesized by ionic gelation method using chitosan and sodium tripolyphosphate (Na-TPP) as crosslinking reagents. The positively charged amine group of chitosan interacts with the negative charge of Na-TPP to form complexes with sizes in the nanoparticle range.^{16,17} Chitosan has specific properties, namely the presence of bioactive, biocompatible, chelating, antibacterial and biodegradable properties. In the form of micro or nanoparticles, chitosan has many advantages, namely stability during use, high surface area, and can be used as a matrix for various types of drugs.¹⁸ The principle of nanoparticle formation in the ionic gelation method is the occurrence of electrostatic interactions between positively charged chitosan amino groups and negatively charged Na-TPP polyanions to form a three-dimensional intramolecular structure.¹⁹

Research related to the synthesis of herbal nanoparticles from fern extract of *S. plana* as an antibacterial has never been reported. In this paper, we will report on the synthesis of nanoherbs from the ethanolic extract of the fern *S. plana* using the ionic gelation method and the evaluation of its antibacterial activity.

Materials and Methods

Materials

The dried powder of *S. plana*'s aerial parts, ethanol (80%, p.a.), acetic acid (Merck), sodium tripolyphosphate (Merck), tween-80 (Merck), chitosan (Sigma-Aldrich), dimethyl sulfoxide (Merck), nutrient broth, nutrient agar, *E.coli*, *S. dysenteriae*, *B. subtilis*, and *S. aureus*.

Preparation of plant extract

Samples of *S. plana* (5 kg) were collected from the Kletak forest, Nongkojajar, Pasuruan, East Java, Indonesia. Before the further investigation, the sample was identified at LIPI Botanical Garden, Purwodadi, East Java. Furthermore, the sample is cleaned of attached dirt, then dried at room temperature for 12 days. The dried sample was grinded into a fine powder that was ready for extraction (1,154 g).

The dried powder of *S. plana*'s aerial part (1000 g) were macerated with ethanol 80% for 24 hours, then filtered using a Buchner funnel. The ethanol extract obtained was evaporated in vacuo using rotary vacuum evaporator (Buchi R-300), resulted the concentrated extract. It was dried in freeze dryer (Martin Christ Alpha 1-2 Ldplus) for 16 hours, yielded the dark green solid (49.14 g).²⁰

Synthesis of nanoherbs from ethanol extract of S. plana

Chitosan solutions of 0.5%, 0.75%, 1.0% were prepared by weighing 0.5 g, 0.75 g, and 1.0 g, respectively, then dissolved with 5% acetic acid solution (v/v) to 100 mL and stirred with a magnetic stirrer until dissolved. While a 0.5% sodium tripolyphosphate (Na-TPP) solution was prepared by weighing 0.1 g, 0.15 g, and 0.2 g, respectively. Then it was dissolved with distilled water up to 20 mL, 30 mL, and 40 mL, respectively, then stirred with a magnetic stirrer (Heidolph) until dissolved.

In this study, three formula of nanoherbs were prepared, namely F-1, F-2, and F-3. The composition of each formula was presented in Table 1.

Tabel 1: Composition of nanoherbs formula F-1, F-2, and F-3

Materials	F1	F2	F3
Ethanol extract of <i>S. plana</i>	0.1 g	0.1 g	0.1 g
Chitosan solution 0.50%	100 mL	-	-
Chitosan solution 0.75%	-	100 mL	-
Chitosan solution 1.00%	-	-	100 mL
Na-TPP solution 0.5%	20 mL	30 mL	40 mL
Tween-80	1 mL	1 mL	1 mL

A total of 100 mL of 0.5% (F-1), 0.75% (F-2) and 1.0% (F-3) chitosan solution were put into an Erlenmeyer, respectively. The Tween-80 (1 mL) was added to each chitosan solution and stirred using a homogenizer (Heidolph) at 1000 rpm for 15 minutes. After that, to each chitosan solution was added 10 mL of solution containing 0.1 g of *S. plana*'s ethanol extract in ethanol and stirred using a homogenizer (Heidolph) at 1400 rpm for 120 minutes. Into the 0.5%, 0.75% and 1% chitosan solutions, 20 mL, 30 mL, and 40 mL of 0.5% Na-TPP were added, respectively, and then homogenized at 1400 rpm for 150 minutes. The obtained mixture was allowed to stand for 24 hours and then dried in freeze-dryer (Martin Christ Alpha 1-2 Ldplus) for 28 hours to obtain dry nanoherbs. The nanoherbs resulted were determined the functional groups using FTIR spectrophotometer (Shimadzu FTIR-8400S), particle size and zeta potential using dynamic light scattering, Zetasizer Nano ZS (Malvern)²¹.

Antibacterial activity assay of nanoherbs from ethanol extract of S. plana

In the study the materials tested for antibacterial activity were nanoherbs from ethanol extract of *S. plana*, ethanol extract of *S. plana* (763 ppm), chitosan, tetracycline (500 ppm) as positive control, aquadest and dimethyl sulfoxide (DMSO) as negative control. Meanwhile, the bacteria

used consisted of gram-negative bacteria (*E.coli*, *S. dysenteriae*) and gram-positive bacteria (*B. subtilis*, *S. aureus*).

The agar media that has been autoclaved at 121 °C for 15 minutes is cooled to 40 °C. A total of 100 µL of test bacteria that have been cultured in a test tube, pipetted and inoculated on agar media then poured into petri dishes, and waited for the media to harden. Paper discs with a diameter of 6 mm after being immersed in the test solution were taken with tweezers and then placed into a petri dish, then incubated for 24 hours at 37 °C. The diameter of the inhibition zone was determined by measuring the diameter of the clear area around the paper disc using a caliper.^{22,23}

Results and discussion

Synthesis of nanoherbs from ethanol extract of S. plana

Three nanoherbs formulas were synthesized from the ethanolic extract of the fern *S. plana*, with variations in the mass of chitosan, namely 0.5% (F-1), 0.75% (F-2) and 1.0% (F-3). . Meanwhile, sodium tripolyphosphate of 0.5% was used as a crosslinker. The results of the synthesis showed that the three nanoherbs formulas were golden yellow colloidal liquids (Figure 1).



Figure 1: The colloidal liquids of nanoherbs formulas from ethanol extract of *S. plana*. Furthermore, each nanoherbs formula was dried in a freeze dryer for 28 hours to produce greenish-white solid nanoherbs (Figure 2).



Figure 2: The solid of nanoherbs formulas from ethanol extract of *S. plana*

Infrared spectra of nanoherbs from ethanol extract of S. plana

Infrared spectrum measurements were carried out to identify the type of functional group and the changes that occurred in the wave number of the functional group. The absorption peaks of the hydroxyl group ($3,284.2\text{ cm}^{-1}$), carbonyl ($1,741.2\text{ cm}^{-1}$), and aromatic C=C double bond ($1,563.92\text{ cm}^{-1}$) in the infrared spectrum of the ethanol extract of *S. plana* support the presence of the phenolic compound in the extract.

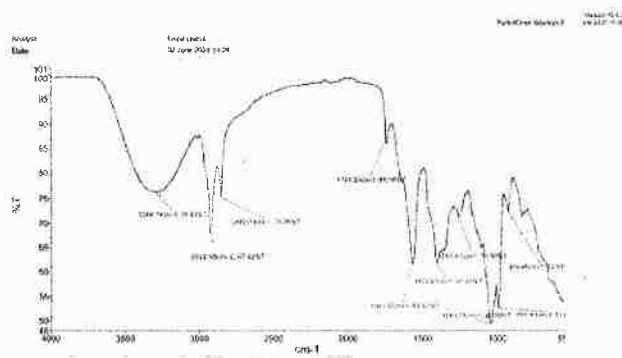


Figure 3: Infrared spectrum of *S. plana*'s ethanol extract

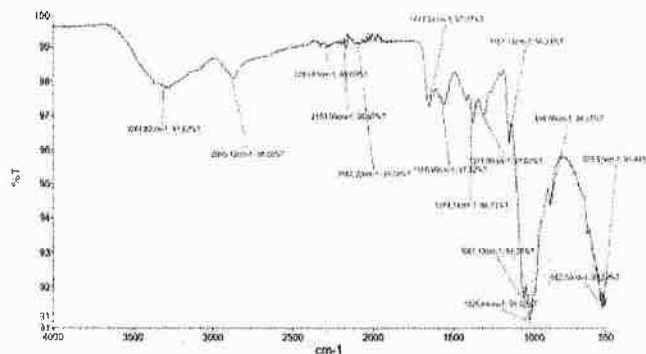


Figure 4: Infrared spectrum of chitosan

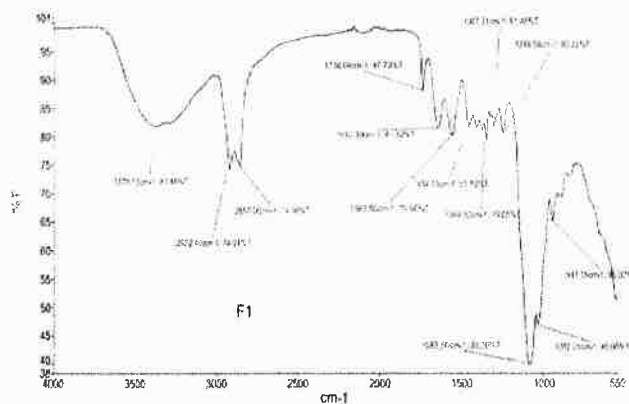


Figure 5: Infrared spectrum of nanoherbs F-1

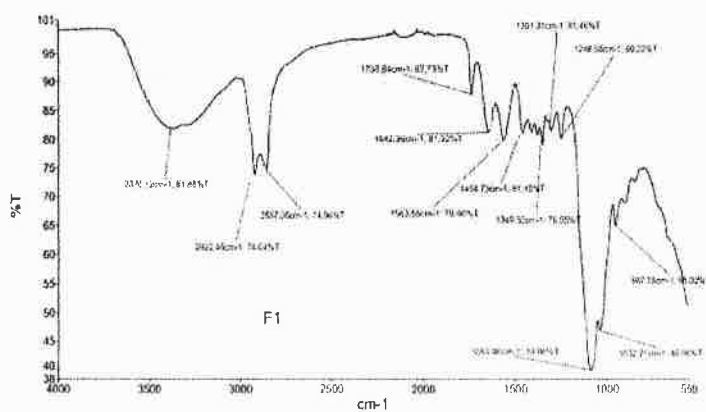


Figure 6: Infrared spectrum of nanoherbs F-2

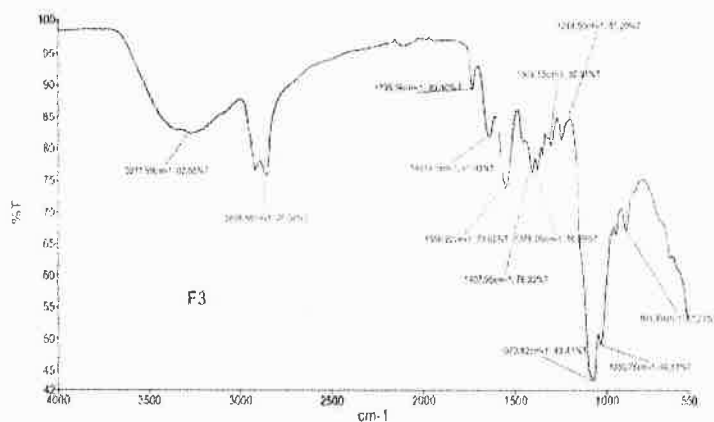


Figure 7: Infrared spectrum of nanoherbs F-3

The infrared spectra of the three nanoherbal formulas indicated that the nanoherbs from ethanol extract of *S. plana* was synthesized using the ionic gelation method. This is indicated by a shift in the wave number of the stretching vibration of the hydroxyl group, the bending vibration of the N-H group, and the emergence of new peaks from the vibration of the phosphate group (P=O). The stretching vibration of the hydroxyl group in chitosan shifted from 3296.87 cm⁻¹ to 3370.12 cm⁻¹ (F-1), 3267.89 cm⁻¹ (F-2), and 3271.99 cm⁻¹ (F-3) in nanoherbs from ethanol extract of *S. plana*. This was caused by the interaction between the hydroxyl group in chitosan and the hydroxyl group of the phenolic compounds in the ethanol extract of *S. plana*. The bending vibration of the NH group in chitosan shifted from 1582.34 cm⁻¹ to 1563.55 cm⁻¹ (F-1), 1552.75 cm⁻¹ (F-2), and 1556.92 cm⁻¹ (F-3) in nanoherbs from ethanolic extract of *S. plana*. This is caused by the occurrence of cross-linking between the NH₂ group of chitosan and the phosphate group in Na-TPP and the interaction with the hydroxyl group of phenolic compounds in the ethanol extract of *S. plana*. The appearance of the vibrational peak of the phosphate group at wave numbers 1083.86 cm⁻¹ (F-1), 1073.63 cm⁻¹ (F-2), 1073.92 cm⁻¹ (F-3) in the nanoherbs from ethanol extract of *S. plana* showed that there had been a cross-linking between chitosan and phosphate groups in Na-TPP.²⁴

Particle size of nanoherb from ethanol extract of S. plana

The three nanoherbs formulas from ethanol extract of *S. plana* was determined its particle size using the dynamic light scattering method by the Zetasizer Nano ZS (Malvern). Determination of particle size was carried out 5 times for each formula and the results are presented in Table 2.

Tabel 2: Particle size of nanoherbs from ethanol extract of *S. plana*

Nanoherbs formulas	Particle size of nanoherbs (nm)					Average
	1	2	3	4	5	

F-1	780.7	702.0	640.4	628.4	756.2	701.54±67.72
F-3	1302.0	1488.0	1411.0	1250.0	1008.0	1291.8±183.78
F-2	1351.0	1406.0	1421.0	1382.0	1413.0	1394.6±28.40

Table 2 showed that the herbal nanoparticles of formula F-1 had a particle size of less than 1000 nm, namely 701.54±67.72 nm. Meanwhile, the herbal nanoparticles of the formula F-2 and F-3 had a particle size of more than 1000 nm, namely 1291.8±183.78 nm and 1394.6±28.40 nm, respectively. Nanoparticles used as drug carriers have diameters between 1-1000 nm.^{19,25} Thus, among the three synthetic nanoherbs formulas that fulfilled the requirements as nanoparticles was F-1 because it had a particle size of less than 1000 nm. Particle size in the form of nanoparticles affect the ease of entry of these materials into cells. The smaller the particle size, the easier it is to enter the cell and the higher its absorption in the body.²⁶

Zeta potential of nanoherb from ethanol extract of S. plana

Zeta potential is a parameter of electric charge between colloidal particles. The zeta potential value is generated from the potential difference between the electric charge on the Stern layer and the diffuse layer of colloidal particles. The zeta potential value of nanoherbs from ethanol extract of *S. plana* was determined using the Zetasizer Nano (Malvern). The determination of the zeta potential was carried out three times for each formula and the results were presented in Table 3.

Tabel 3: Zeta potential of nanoherbs from ethanol extract of *S. plana*

Nanoherbs formulas	Zeta potential (mV)			
	1	2	3	Average
F-1	+421	+500	+577	+499.3±78.00
F-2	+409	+440	+491	+446.7±41,40
F-3	+375	+403	+368	+382.0±18.52

From Table 3 it could be stated that the three nanoherbs formulas had a zeta potential value greater than + 30 mV. Nanoparticles with a zeta potential value less than -30 mV and greater than +30 mV had higher stability, because they had a force to prevent particle agglomeration. Thus, the three nanoherbs formulas had stable properties or were not easy to agglomerate or flocculate so that they were not easy to settle.²⁷ Based on the zeta potential value, herbal nanoparticles of formula F-1 that fulfilled the requirements as nanoparticles had a zeta potential value of more than + 30 mV, namely $+499.3\pm78.00$ mV so that it had stable properties.²⁸

Antibacterial activity of nanoherbs from ethanol extract of S. plana.

Based on the results of particle size measurements using azetasizer nano, it was known that among the three nanoherbs formulas that fulfilled the requirements as nanoparticles was the nanohebs formula F-1 with a particle size of 701.54 ± 67.72 nm. Furthermore, the antibacterial activity of nanoherbs F-1 was determined using the disc diffusion method against 4 types of bacteria consisting of 2 types of gram-negative bacteria, namely *E. coli* and *S. dysentriae*, and 2 types of gram-negative bacteria, namely *S. aureus* and *B. substilis*. The samples tested for antibacterial activity were the liquid of nanoherbs F-1, ethanol extract solution of the fern *S. plana* (763 ppm), tetracycline (500 ppm) as a positive control, chitosan solution, aquades and dimethyl sulfoxide (DMSO) as a negative control. The results of the antibacterial activity assay are presented in Table 4.

Tabel 4. Antibacterial activity assay of nanoherbs F-1 and ethanol extract of *S. plana*

Sample	Average diameter of the inhibition zone (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. dysentriae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
Nanoherbs F-1	20.43±2.28	23.10±2.50	20.33±3.61	18.96±2.57

Ethanol extract of <i>S. plana</i>	10.26±2.05	10.26±1.80	9.90±2.16	9.26±0.91
Chitosan	14.03±3.59	14.11±1.04	14.85±1.78	13.45±1.88
Tetracycline	10.25±1.07	19.87±1.37	28.85±2.60	19.60±1.19
Aquadest	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
DMSO	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00

In the antibacterial activity test using the disc diffusion method, the strength of the antibacterial activity is indicated by the diameter of the inhibition zone or the clear zone. If the diameter of the clear zone of 5 mm or less is categorized as weak, the clear zone of 5-10 mm is categorized as moderate, the clear zone of 10-20 mm is categorized as strong and the clear zone of 20 mm or more is categorized as very strong.²⁹ Based on Tabel 3, nanoherbal F-1 had very strong antibacterial activity against *E.coli*, *S. dysenteriae*, and *S. aureus* as well as strong antibacterial activity against *B. subtilis*. Meanwhile, the ethanolic extract of the fern *S. plana* showed strong antibacterial activity. against *E. coli* and *S. dysenteriae*, and moderate antibacterial activity against *S. aureus* and *B. subtilis*.Tetracycline showed strong antibacterial activity against *E. coli*, *S. dysenteriae*, and *B. subtilis*, as well as antibacterial activity which was very strong against *S. aureus*.

The antibacterial activity of nanoherbs F-1 against *E. coli* and *S. dysenteriae* was higher than that of the tetracycline. Meanwhile, the antibacterial activity of nanoherbs F-1 against *S. aureus* and *B. subtilis* was lower than that of tetracycline. The antibacterial activity of the ethanolic extract of *S. plana* against *S. dysenteriae*, *S. aureus* and *B. subtilis* was lower than that of tetracycline, while its antibacterial activity against *E.coli* was equivalent to that of tetracycline.

The content of phenolic compounds, especially flavonoids in the ethanol extract of the fern *S. plana* supports its antibacterial activity.^{30,3} Flavonoid compounds inhibit bacterial growth by

damaging cell walls, inactivating enzymes, binding to adhesins, and damaging cell membranes. The hydroxyl group in flavonoids is thought to be responsible for the antibacterial activity.^{31,32,33}

The ethanolic extract of *S. plana* made from the nanoherbs F-1 showed an increase in the antibacterial activity of *E. coli*, *S. dysenteriae*, *B. subtilis*, and *B. subtilis*. In the nano size, the surface contact area of the particles becomes larger which can increase the number of isolated active substances so that the antibacterial activity is stronger.¹⁵ Particles in nano size have the ability to penetrate the intercellular spaces, either through diffusion or opsonification.^{25,26} The presence of chitosan polymer in the nanoherbs F-1 also supported its antibacterial activity because it had the ability to inhibit bacterial growth. Chitosan has antibacterial activity because it attaches to the surface of bacterial cells to form a polymer membrane that can prevent the entry of nutrients into the cell so that the cell will die. Besides that chitosan with low molecular weight can enter the cell and cover the cell. Because chitosan can adsorb electronegative substances in cells, it will interfere with bacterial activity.³⁴

3. Conclusion

The study concludes that nanoherbs from ethanol extract of *S. plana* with formula of F-1 had particle sizes that fulfill the requirements as nanoparticles because it has a particle size of less than 1000 nm, namely 701.54 ± 67.72 nm. It had the zeta potential value of $+499.3 \pm 78.00$ mV. The occurrence of a shift in the wave number of stretching vibrations of the O-H group, bending vibration of the N-H group, as well as the emergence of a new peak of the vibration of the phosphate group (P=O) in the infrared spectrum supported the formation of nanoherbs in F-1 formula. Nanoherbal F-1 has very strong antibacterial activity against *E. coli*, *S. dysenteriae*, and *S. aureus* as well as strong antibacterial activity against *B. subtilis*. Nanoherbs F-1 showed stronger antibacterial activity than the ethanol extract of *S. plana*.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Authors' Declaration

The authors hereby declare that the work presented in this article is original and that any liability for claims relating to the content of this article will be borne by them.

Acknowledgement

We thank the Universitas Negeri Surabaya for financial support through the foreign collaboration research grant 2021 and Mr. Sugiono from LIPI Purwodadi Botanical Garden for help in collecting and identifying the fern *Selaginella plana*.

References

1. Uluk A, Sudana M, Wollenberg E. The dependence of the Dayak community on the forest around the Kayan Mentarang national park. Bogor: Cifor; 2001.
2. Harada K, Rahayu M, Muzakkir A. Medicinal plants of Gunung Halimun National Park, West Java, Indonesia. Bogor: Biodiversity Conservation Project -JICA, PHPA & LIPI. 2002.
3. Setyawan AD, Darusman LK. Review: Biflavonoid compounds in *Selaginella Pal. Beau* and its utilization. Biodiversitas. 2008; 9 (1): 64-81.
4. Bensky D, Clavey S, Stöger E. Chinese herbal medicine materia medica. (3rd ed). Seattle, W.A.: Eastland Press. 2004.
5. Chikmawati T, Setyawan AD, Miftahudin. Phytochemical composition of *Selaginella spp* from Java Island Indonesia. Jurnal Makara Seri Sains. 2012; 16 (2): 129-133.
6. Sannomiya M, Cardoso CRP, Figueiredo ME, Rodrigues CM, dos Santos LC, dos Santos FV, Serpeloni JM, Colus LMS, Vilegas W, Eliana, Varanda A. Mutagenic evaluation

- and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. J. Ethnopharmacol. 2007; 112 (2): 319-326.
7. Lin YM. Beta-fluoroethyl thiourea compounds and use. United States Patent 6677350. 2004.
 8. Chen JJ, Duh CY, Chen JF. New cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. Planta Med. 2005; 71 (7): 659-665.
 9. Ahmad AR, Juwita, Ratulangi SAD., Malik A. Determination of total phenolic and flavonoid levels of patikala fruit and leaf methanol extract (*Etlingera elatior* (Jack) R.M.SM). Pharm. Sci. Res. 2015; 2 (1): 1-10.
 10. Yang JW, Pokharel YR, Kim MR, Woo ER, Choi HK, Kang KW. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by sumaflavone isolated from *Selaginella tamariscina*. J. Ethnopharmacol. 2006; 105 (1-2): 107-113.
 11. Sah NK, Singh SNP, Sahdev S, Banerji S, Jha V, Khan Z, Hasnain SE. Indian herb 'Sanjeevani' (*Selaginella bryopteris*) can promote growth and protect against heat shock and apoptotic activities of ultra violet and oxidative stress. Journal of Bioscience. 2005; 30 (4): 499-505.
 12. Su Y, Sun CM, Chuang HH, Chang PT. Studies on the cytotoxic mechanisms of ginkgetin in a human ovarian adenocarcinoma cell line. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2000; 362 (1): 82-90.
 13. Swamy RC, Kunert, Schuhly, OW, Bucar F, Ferreira D, Rani VS, Kumar BR, Rao AVNA.. Structurally unique biflavonoids from *Selaginella chrysocaulos* and *Selaginella bryopteris*. Chem. Biodivers. 2006; 3 (4): 405-414.
 14. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles-A Review. Trop. J. Pharm. Res. 2006; 5 (1): 561-573.

15. Kammona O, Costas K. A review recent advances in nanocarrier-based mucosal delivery of biomolecules. *J. Control Release*. 2012; 161 (3): 781-794.
16. Bhumkar DR, Varsha BP. Studies on effect of ph on crosslinking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. *AAPS Pharm. Sci. Tech*. 2006; 7 (2): 1-6.
17. Kafshgari MH, Mohammad K, Mobina K, Sahar K. Reinforcement of chitosan nanoparticles obtained by an ionic crosslinking process. *IRAN POLYM J*. 2011; 20 (5): 445- 456
18. Agnihotri SA, Nadagounda NM, Tejraj MA. Recent advances on chitosan based micro and nanoparticles in drug delivery. *J. Control Release*. 2004; 22(100): 5-28
19. Tiyaaboochai W. Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery. *Naresuan Univ. J*. 2003; 11(3): 51-66.
20. Sutoyo S, Tukiran, Khotijah,S. Antioxydant activity of the silver nanoparticles (AgNPs) synthesized using *Nephrolepis radicans* extract as bioreductor. *J. Phys. Conf. Ser*. 2021; 1747. 012038.
21. Pakki E, Sumarheni, Aisyah F, Ismail, Safirahizdni S. Nanoparticle formulation of bawang dayak (*Eleutherine americana* (Aubl) Merr) extract with variation of chitosan tripoliphosphate (TPP) consentration. *J. Trop. Pharm. Chem*. 2016; 3 (4): 251-263.
22. Alves TMA, Silfa AF, Brandao M, Grandi TS, Smania E, Junior AS, Zani CL. Biological screening of brazilian medicinal plants. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000; 95(3): 367-373
23. Ortiz JH. Disk diffusion testing in manual of antimicrobial susceptibility testing. Marie B. Coyle (Coord. Ed). American society for microbiology, America. 2005.
24. Putri IA, Sundaryono A, Candra IN. Characterization of chitosan nanoparticles from sweet potato leaf extract (*Ipomoea Batatas* L.) using ionic gelation method. *Alloptrop*. 2018; 2 (2): 203-207.

25. Buzea C., Blandino IIP, Robbie K. Nanomaterial and nanoparticles: sources and toxicity, *Biointerphases*. 2007; 2: MR170– MR172.
26. Martien R, Adhyatmika, Irianto IDK, Farida V, Sari DP. The development of nanoparticle technology as a drug delivery system. *Majalah Farmaseutik*. 2012; 8 (1): 133-144.
27. Murdock RC, Stolle LB, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SB. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol. Sci*. 2008; 101(2):239-53.
28. Wardana AP, Aminah NS, Fahmi MZ, Kristanti AN, Zahrah HI, Takaya Y, Choudhary MI. Nanoencapsulation of *Syzygium polycephalum* extract using folate modified κ -carrageenan as vehicles for pronounced anticancer activity. *Trop. J. Nat. Prod. Res.* 2020; 4(11):945-952.
29. Davis WW, Stout TR. Disc plate method of microbiological assay. *J. Microbiol*. 1971; 22, 659-665
30. Lin LC, Kuo YC, Chou CJ. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. *J. Nat. Prod.* 2000; 63 (5): 627-630.
31. Cowan, MM. Plant Product as Antimicrobial Agent. *Clinic. Microbiol. Rev.* 1999; 12(4): 564-582
32. Bylka W, Matlawska I, Pilewski NA. Natural flavonoid as antimicrobial agents. *JANA*. 2004; 7 (2): 24-31.
33. Nugaraha AC, Prasetya AT, Mursiti S. Isolation, identification, activity test of flavonoid compounds as antibacterial from mango leaves. *Indo. J. Chem. Sci.* 2017; 6 (2):91-96.
34. Zhang YQ, Tao M, Shen WD, Zhou YZ, Ding Y, Ma Y, Zhou WL. Immobilization of lasparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. *Biomaterials*. 2004; 25 (4): 3751-3759.

Lampiran 3 . Paten Sederhana

Hasil penelitian ini telah didaftarkan paten sederhana dengan judul : Proses Pembuatan Nanoherbal Dari Ekstrak Etanol Tumbuhan Paku *Selaginella Plana*. Pendaftaran paten masih proses di LPPM Universitas Negeri Surabaya.



KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA R.I.
DIREKTORAT JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

Formulir permohonan 2

Formulir Permohonan
Salinan Dokumen Paten

Disi oleh petugas

Tanggal pengajuan

Dengan ini saya/kami^{*)} :

(71) Nama : Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Negeri Surabaya (Unesa)

Alamat : Gedung Rektorat Lantai 6 Kampus Unesa Lidah Wetan

Warga Negara : Indonesia

Email : lppm@unesa.ac.id

Telepon/HP : (031) 8280768

Mengajukan permohonan salinan dokumen paten sendiri/melalui Konsultan KI^{*)}:

(74) Nama Konsultan KI : []

Nomor Konsultan KI : []

Email : []

dengan :

(11) Nomor Paten : []

(21) Nomor Permohonan Paten : []

(22) Tanggal Penerimaan Permohonan Paten : []

(54) Judul Inovasi : []

PROSES PEMBUATAN NANOHERBAL DARI EKSTRAK ETANOL TUMBUHAN PAKU *SELAGINELLA PLANA*

Salinan dokumen :

[] Frontpage []

[] Deskripsi []

Jumlah halaman : []

Bersama ini, saya/kami sampaikan:

[] Biaya salinan dokumen paten halaman @ Rp. 20.000,-

sejumlah Rp. (.....)

*) Cetak yang tidak perlu

UNIVERSITAS NEGERI SURABAYA

UNESA

Prof. Dr. Darmi M.Hum

Form No. 006/P/KI/2019

36

Deskripsi

**PROSES PEMBUATAN NANOHERBAL DARI EKSTRAK ETANOL TUMBUHAN PAKU
SELAGINELLA PLANA**

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan proses pembuatan nanopartikel herbal, lebih khusus lagi invensi ini berhubungan dengan penggunaan metode gelasi ionik untuk mengubah ekstrak etanol tumbuhan paku *Selaginella plana* (*S. plana*) menjadi sediaan nanopartikel yang mampu meningkatkan kelarutan dalam air, bioavailabilitas, stabilitas zat aktif dari degradasi lingkungan, memperbaiki absorpsi, dan mengurangi efek iritasi zat aktif pada saluran cerna.

Latar Belakang Invensi

Senyawa aktif herbal dalam bentuk sediaan ekstrak memiliki kelemahan di antaranya yaitu rendahnya kelarutan dalam air sehingga bioavailabilitasnya rendah serta mampu mengalami penurunan sifat fungsional selama pengolahan maupun penyimpanan. Pembuatan ekstrak herbal menjadi berukuran nano atau yang disebut nanoherbal mampu mengatasi kelarutan zat aktif yang sukar larut, memperbaiki bioavailabilitas yang buruk, memodifikasi sistem penghantaran obat sehingga obat dapat langsung menuju daerah yang spesifik, meningkatkan stabilitas zat aktif dari degradasi lingkungan (penguraian enzimatis, oksidasi, hidrolisis), memperbaiki absorpsi suatu senyawa makromolekul, serta mengurangi efek iritasi zat aktif pada saluran cerna. Bentuk dan ukuran partikel merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi efektifitas obat, karena ukuran

partikel sangat berpengaruh dalam proses kelarutan, absorpsi dan distribusi obat. Dalam ukuran nano, luas kontak permukaan partikel menjadi lebih besar yang dapat meningkatkan jumlah zat aktif yang berinteraksi sehingga aktivitas biologisnya semakin kuat.

Polimer yang dapat digunakan untuk pembentukan nanopartikel salah satunya adalah kitosan dan natrium tripolifosfat (Na-TPP). Muatan positif gugus amina kitosan berinteraksi dengan muatan negatif TPP untuk membentuk kompleks dengan ukuran dalam rentang nanopartikel. Kitosan mempunyai sifat spesifik yaitu adanya sifat bioaktif, biokompatibel, pengkelat, antibakteri dan dapat terbiodegradasi. Dalam bentuk mikro atau nanopartikel, kitosan mempunyai banyak keunggulan yakni stabil selama penggunaan, luas permukaan yang tinggi, dapat dijadikan matriks untuk berbagai jenis obat. Salah satu metode yang digunakan untuk pembuatan nanopartikel adalah gelasi ionik. Prinsip pembentukan nanopartikel dalam metode ini adalah terjadinya interaksi elektrostatik antara gugus amino kitosan yang bermuatan positif dengan polianion Na-TPP yang bermuatan negatif membentuk struktur intramolekuler tiga dimensi.

Tumbuhan paku cakar ayam (*Selaginella plana*) merupakan salah satu jenis tumbuhan paku yang menjadi kekayaan alam hayati Indonesia. Tumbuhan tersebut telah dikenal dan dimanfaatkan masyarakat sebagai bahan pangan (sayuran), tanaman hias, dan obat tradisional. Cakar ayam telah digunakan untuk perawatan pasca persalinan, mengobati luka, mengobati pendarahan, gangguan menstruasi, meningkatkan daya tahan tubuh, serta tonik pasca melahirkan. Secara tradisional tumbuhan paku *S. plana* telah digunakan dalam pengobatan beberapa penyakit seperti kanker, infeksi saluran pernafasan, gangguan hati, infeksi saluran kencing, patah tulang dan rematik (Uluk, dkk., 2001; Harada,

dkk., 2002, Setiawan & Darusma, 2008). Dari spesies *S. plana* di pulau Jawa telah ditemukan senyawa metabolit sekunder golongan steroid, saponin, alkaloid, tanin, dan flavonoid. Namun demikian flavonoid, khususnya biflavonoid, merupakan kandungan yang terbanyak. Senyawa biflavonoid dari tumbuhan paku genus *Selaginella* memiliki sifat bioaktif yang beragam, salah satu diantaranya sebagai antibakteri (Setiawan & Darusma, 2008; Sannomiya, et al., 2007; Lin, 2004).

Pembuatan sediaan ekstrak tumbuhan paku *S. plana* dalam bentuk nanoherbal sangat penting untuk mendukung pemanfaatan tumbuhan paku tersebut sebagai obat tradisional karena dapat meningkatkan kelarutan dalam air, bioavailabilitas, stabilitas zat aktif dari degradasi lingkungan, memperbaiki absorpsi, dan mengurangi efek iritasi zat aktif pada saluran cerna.

Berdasarkan penelusuran paten, diperoleh paten penggunaan kitosan untuk proses enkapsulasi dengan nomor IDP000048611 yang terbit pada tanggal 5 Desember 2017. Paten tersebut mengungkapkan penggunaan polimer kitosan, kalsium alginat, zat pengemulsi tween-80 serta zat pengikat silang kalsium klorida untuk pembuatan enkapsulasi isoniazid untuk obat penyakit TBC. Paten yang kedua dengan nomor IDS000002837 yang terbit pada tanggal 20 Januari 2020 tentang kandungan nanoherbal buah andaliman. Nano-herbal andaliman memiliki rata-rata distribusi diameter $783,9 \pm 173,4$ nm. Nano-herbal andaliman positif mengandung flavonoid, alkaloid, glikosida jantung dan memenuhi persyaratan karakteristik emulsi dengan memiliki kadar air 9,9%, larut dalam air 14,30%, larut dalam etanol 17,67% serta memiliki kadar abu total 6,34% dan kadar abu yang tidak larut dalam asam 1,22%. Nano-herbal andaliman juga memiliki antioksidan dengan nilai IC50 yaitu 48,5 µg/mL serta

memiliki nilai toksisitas LC50 1737,80 ppm dan nilai LD50 9,807g/KgBB $\pm$ 0,075.

Invensi ini memanfaatkan ekstrak etanol bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* sebagai bahan untuk pembuatan nanoherbal menggunakan metode gelasi ionik. Pembuatan sediaan ekstrak tumbuhan paku *S. plana* dalam bentuk nanoherbal sangat penting untuk mendukung pemanfaatan tumbuhan paku tersebut sebagai obat tradisional karena dapat meningkatkan kelarutan dalam air, bioavailabilitas, stabilitas zat aktif dari degradasi lingkungan, memperbaiki absorpsi, dan mengurangi efek iritasi zat aktif pada saluran cerna.

Uraian Singkat Invensi

Invensi ini berhubungan dengan Proses pembuatan nanoherbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* meliputi langkah-langkah sebagai berikut; mengeringkan bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* segar sebanyak 3 kg yang telah dipotong kecil (panjang 1-2 cm) di atas tampah pada suhu kamar selama 12 hari; menggiling bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* kering dengan alat penghancur (blender) sehingga diperoleh serbuk halus sebanyak 1 Kg; melakukan maserasi serbuk kering bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* sebanyak 1 kg dengan pelarut etanol teknis 3 liter selama 24 jam dan diulang 2 (dua) kali; menyaring hasil maserasi serbuk kering bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* menggunakan corong Buchner sehingga diperoleh ekstrak etanol; menguapkan pelarut dalam ekstrak etanol bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* dengan rotavapor, dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan freeze dryer pada suhu -54°C dan tekanan 10^{-3} Pa selama 16 jam sehingga diperoleh ekstrak padat berwarna hijau gelap sebanyak 49 gram [rendemen 4,9% (b/b)]; melarutkan 0,5 gram kitosan dalam larutan asam asetat 5% (v/v) sampai volumenya

100 mL dengan bantuan pengaduk magnet sehingga diperoleh larutan kitosan 0,5% (b/v); memasukkan 100 mL larutan kitosan 0,5% (b/v) ke dalam Erlenmeyer, kemudian ditambahkan satu mililiter tween-80, lalu campuran diaduk dengan homogenizer dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit; menambahkan 10 mL larutan yang mengandung 0,1 gram ekstrak etanol bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* dalam pelarut etanol p.a, kemudian campuran diaduk dengan homogenizer berkecepatan 1400 rpm selama 120 menit; menambahkan larutan natrium tripoliposfat 0,5% (b/v) sebanyak 20 mL, kemudian campuran diaduk dengan homogenizer berkecepatan 1400 rpm selama 150 menit. Campuran yang dihasilkan merupakan nanoherbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* yang berupa cairan koloidal berwarna kuning keemasan, memiliki ukuran partikel 701,54 nm dan potensial zeta +446,7 mV. Etanol teknis yang digunakan dalam proses maserasi memiliki kadar 70 - 90% (v/v).

Tujuan invensi ini adalah menghasilkan nanoherbal dari ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana*.

Uraian Lengkap Invensi

Bahan baku yang digunakan dalam untuk pembuatan nanoherbal ini adalah bagian aerial tumbuhan paku *S. plana*. Sebelum dilakukan ekstraksi, sebanyak 3 kg bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* segar yang telah dipotong kecil (panjang 1-2 cm) dikeringkan di atas tampah pada suhu kamar selama 12 hari. Pengeringan pada suhu kamar ditujukan agar senyawa aktif, khususnya senyawa flavonoid tidak mengalami kerusakan akibat pengaruh panas atau cahaya. Proses pengeringan juga ditujukan untuk mengurangi kadar air dalam sampel sehingga proses ekstraksi dengan pelarut organik dapat berlangsung optimal.

Sampel bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* yang sudah kering digiling dengan alat penghancur (blender) sehingga diperoleh serbuk halus sebanyak 1 Kg. Serbuk kering bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* diekstraksi dengan pelarut etanol teknis 3 liter selama 24 jam dan diulang 2 (dua) kali. Etanol teknis yang digunakan dalam proses maserasi memiliki kadar 70 - 90% (v/v). Pelarut etanol bersifat polar sehingga akan mengekstraksi senyawa fenolik, termasuk flavonoid dari tumbuhan paku *S. plana*. Campuran maserasi disaring menggunakan corong Buchner sehingga diperoleh ekstrak etanol. Penguapan pelarut dalam ekstrak etanol bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* dengan rotavapor, dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan freeze dryer pada suhu -54°C dan tekanan 10^{-3} Pa selama 16 jam menghasilkan ekstrak padat berwarna hijau gelap sebanyak 49 gram.

Dalam proses pembuatan nanoherbal dengan metode gelasi ionik digunakan bahan polimer kitosan dan natrium tripoliposfat sebagai bahan pembentuk ikatan silang. Kitosan merupakan biopolimer yang sering digunakan dalam sistem nanoopartikel bersifat kationik, tidak menyebabkan ketoksikan, imunogenik, serta bersifat mukoadhesif. Kitosan juga memiliki permeabilitas yang besar di permukaan biologis dan kemampuan dalam meningkatkan penyerapan zat aktif melalui ruang antar sel.

Sebanyak 0,5 gram kitosan dilarutkan dalam larutan asam asetat 5% (v/v) sampai volumenya 100 mL. Proses pelarutan dibantu dengan pengaduk magnet sehingga diperoleh larutan kitosan 0,5% (b/v). Larutan kitosan sebanyak 100 mL dituangkan ke dalam Erlenmeyer, kemudian ditambahkan tween-80 sebanyak satu mililiter. Campuran diaduk dengan homogenizer dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit. Tween-80 merupakan zat pengemulsi yang berperan untuk meningkatkan kelarutan. Ke dalam campuran

ditambahkan 10 mL larutan yang mengandung 0,1 gram ekstrak etanol bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* dalam pelarut etanol p.a, kemudian campuran diaduk dengan homogenizer berkecepatan 1400 rpm selama 120 menit.

larutan natrium tripoliposfat 0,5% (b/v) sebanyak 20 mL ditambahkan ke dalam campuran, kemudian campuran diaduk dengan homogenizer berkecepatan 1400 rpm selama 150 menit. Penambahan natrium tripoliposfat ditujukan untuk memperkuat struktur nanoherbal melalui pembentukan ikatan silang antar molekul polimer kitosan. Campuran yang dihasilkan merupakan nanoherbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* yang berupa cairan koloidal berwarna kuning keemasan, memiliki ukuran partikel 701,54 nm dan potensial zeta +446,7 mV.

Bentuk sediaan nanoherbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* yang dihasilkan memiliki karakteristik yang lebih baik terkait dengan kelarutan dalam air, bioavailabilitas, stabilitas zat aktif, absorpsi, dan efek iritasi zat aktif pada saluran cerna. Dengan demikian nanoherbal tersebut mampu melepaskan zat aktif pada tempat yang spesifik di dalam tubuh sebagai sasaran.

Klaim

1. Proses pembuatan nanoherbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* meliputi langkah-langkah sebagai berikut:

- a. mengeringkan bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* segar sebanyak 3 kg yang telah dipotong kecil (panjang 1-2 cm) di atas tampah pada suhu kamar selama 12 hari;
- b. menggiling bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* kering dengan alat penghancur (blender) sehingga diperoleh serbuk halus sebanyak 1 Kg;

- c. melakukan maserasi serbuk kering bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* sebanyak 1 kg dengan pelarut etanol teknis 3 liter selama 24 jam dan diulang 2 (dua) kali;
- d. menyaring hasil maserasi serbuk kering bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* menggunakan corong Buchner sehingga diperoleh ekstrak etanol;
- e. menguapkan pelarut dalam ekstrak etanol bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* dengan rotavapor, dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan freeze dryer pada suhu - 54 °C dan tekanan 10^{-3} Pa selama 16 jam sehingga diperoleh ekstrak padat berwarna hijau gelap sebanyak 49 gram [rendemen 4,9% (b/b)];
- f. melarutkan 0,5 gram kitosan dalam larutan asam asetat 5% (v/v) sampai volumenya 100 mL dengan bantuan pengaduk magnet sehingga diperoleh larutan kitosan 0,5% (b/v);
- g. memasukkan 100 mL larutan kitosan 0,5% (b/v) ke dalam Erlenmeyer, kemudian ditambahkan satu mililiter tween-80, lalu campuran diaduk dengan homogenizer dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit;
- h. menambahkan 10 mL larutan yang mengandung 0,1 gram ekstrak etanol bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* dalam pelarut etanol p.a, kemudian campuran diaduk dengan homogenizer berkecepatan 1400 rpm selama 120 menit;
- i. menambahkan larutan natrium tripoliposfat 0,5% (b/v) sebanyak 20 mL, kemudian campuran diaduk dengan homogenizer berkecepatan 1400 rpm selama 150 menit. Campuran yang dihasilkan merupakan nanoherbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* yang berupa cairan koloidal

berwarna kuning keemasan, memiliki ukuran partikel 701,54 nm dan potensial zeta +446,7 mV.

2. Proses pembuatan ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* sesuai klaim 1, dimana pelarut etanol teknis yang digunakan pada proses maserasi memiliki kadar 70 - 90% (v/v).

Abstrak

METODE PEMBUATAN NANOHERBAL DARI EKSTRAK ETANOL KULIT BATANG SECANG

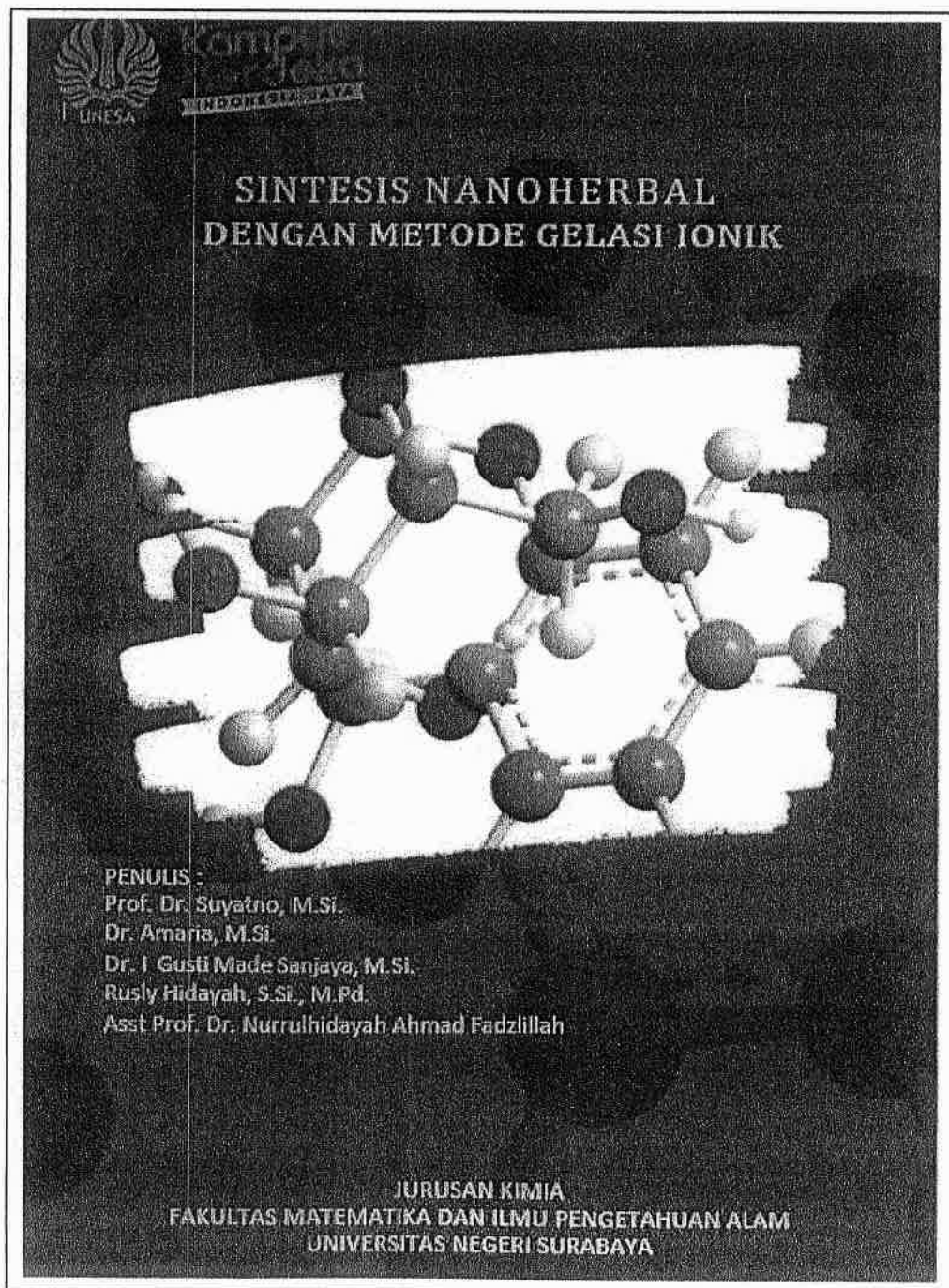
Invensi ini berhubungan dengan proses pembuatan nanoherbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* meliputi langkah-langkah sebagai berikut; mengeringkan bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* segar sebanyak 3 kg yang telah dipotong kecil (panjang 1-2 cm) di atas tampah pada suhu kamar selama 12 hari; menggiling bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* kering dengan alat penghancur (blender) sehingga diperoleh serbuk halus sebanyak 1 Kg; melakukan maserasi serbuk kering bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* sebanyak 1 kg dengan pelarut etanol teknis 3 liter selama 24 jam dan diulang 2 (dua) kali; menyaring hasil maserasi serbuk kering bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* menggunakan corong Buchner sehingga diperoleh ekstrak etanol; menguapkan pelarut dalam ekstrak etanol bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* dengan rotavapor, dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan freeze dryer pada suhu -54°C dan tekanan 10^{-3} Pa selama 16 jam sehingga diperoleh ekstrak padat berwarna hijau gelap sebanyak 49 gram [rendemen 4,9% (b/b)]; melarutkan 0,5 gram kitosan dalam larutan asam asetat 5% (v/v) sampai volumenya 100 mL dengan bantuan pengaduk magnet sehingga diperoleh larutan kitosan 0,5% (b/v); memasukkan 100 mL larutan kitosan 0,5% (b/v) ke dalam Erlenmeyer, kemudian ditambahkan satu mililiter tween-80, lalu campuran diaduk dengan homogenizer dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit; menambahkan 10 mL larutan yang mengandung 0,1 gram ekstrak etanol bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* dalam pelarut etanol p.a, kemudian campuran diaduk dengan homogenizer berkecepatan 1400 rpm selama 120 menit; menambahkan larutan natrium tripoliposfat 0,5% (b/v) sebanyak 20 mL, kemudian campuran diaduk dengan homogenizer berkecepatan

1400 rpm selama 150 menit. Campuran yang dihasilkan merupakan nanoherbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* yang berupa cairan koloidal berwarna kuning keemasan, memiliki ukuran partikel 701,54 nm dan potensial zeta +446,7 mV. Pelarut etanol teknis yang digunakan pada proses maserasi memiliki kadar 70 - 90% (v/v). Tujuan invensi ini adalah menghasilkan nanoherbal dari ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana*. Dengan proses perwujudan invensi ini, nanoherbal ekstrak etanol bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* yang dibuat dengan mencampurkan larutan kitosan 0,5% (b/v) dan larutan natrium tripoliposfat 0,5% (b/v) dapat menghasilkan nanoherbal yang optimum.

1400 rpm selama 150 menit. Campuran yang dihasilkan merupakan nanoherbal ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana* yang berupa cairan koloidal berwarna kuning keemasan, memiliki ukuran partikel 701,54 nm dan potensial zeta +446,7 mV. Pelarut etanol teknis yang digunakan pada proses maserasi memiliki kadar 70 - 90% (v/v). Tujuan invensi ini adalah menghasilkan nanoherbal dari ekstrak etanol tumbuhan paku *S. plana*. Dengan proses perwujudan invensi ini, nanoherbal ekstrak etanol bagian aerial tumbuhan paku *S. plana* yang dibuat dengan mencampurkan larutan kitosan 0,5% (b/v) dan larutan natrium tripoliposfat 0,5% (b/v) dapat menghasilkan nanoherbal yang optimum.

Lampiran 4. Buku Ajar

Hasil penelitian ini telah menghasilkan buku ajar dengan judul : Sintesis Nanoherbal dengan Metode Gelasi Ionik. Buku ini sedang proses pengurusan ISBN di Unesa University Press.



LEMBAR PEMBAHASAN

Laporan akhir penelitian yang berjudul:

Sintesis Nanoherbal dari Ekstrak Tumbuhan Paku Indonesia Cakar Ayam (*Selaginella pluna Hieron*) sebagai Agen Antibakteri Dengan pelaksana berikut

1. Prof. Dr. Suyatno, M.Si.
2. Dr. Amaria, M.Si.
3. Dr. I Gusti Made Sanjaya, M.Si.
4. Rusly Hidayah, S.Si., M.Pd.
5. Asst. Prof. Dr. Nurrulhidayah Ahmad Fadzlillah

Telah dipaparkan pada tanggal 3 Desember 2021 di LPPM Universitas Negeri Surabaya

Catatan:

1. Luaran hasil penelitian diupload di SimLPPM
2. Luaran hasil penelitian dilampirkan di laporan penelitian
3. Luaran penelitian ditambahkan di bagian akhir dari BAB 5 Hasil dan Pembahasan
4. Di bagian akhir BAB 5 juga ditambahkan dukungan terhadap RENSTRA Unesa dan penelitian unggulan Unesa

Surabaya, 3 Desember 2021

Reviewer,



Dr. Nuniek Herdyastuti, M.Si.

NIP 197011101998022001

LEMBAR PEMBAHASAN

Laporan akhir penelitian yang berjudul:

Sintesis Nanoherbal dari Ekstrak Tumbuhan Paku Indonesia Cakar Ayam (*Selaginella plana Hieron*) sebagai Agen Antibakteri Dengan pelaksana berikut

1. Prof. Dr. Suyatno, M.Si.
2. Dr. Amaria, M.Si.
3. Dr. I Gusti Made Sanjaya, M.Si.
4. Rusly Hidayah, S.Si., M.Pd.
5. Asst. Prof. Dr. Nurulhidayah Ahmad Fadzillillah

Telah dipaparkan pada tanggal 3 Desember 2021 di LPPM Universitas Negeri Surabaya

Catatan:

1. Luaran hasil penelitian diupload di SimLPPM
2. Luaran hasil penelitian dilampirkan di laporan penelitian
3. Luaran penelitian ditambahkan di bagian akhir dari BAB 5 Hasil dan Pembahasan
4. Di bagian akhir BAB 5 juga ditambahkan dukungan terhadap RENSTRA Unesa dan penelitian unggulan Unesa

Surabaya, 3 Desember 2021

Reviewer,



Dr. Yuliani, M.Si.

NIP 196807211993032002

LEMBAR PENGESAHAN PEMBAHAS

Laporan akhir penelitian yang berjudul:

Sintesis Nanoherbal dari Ekstrak Tumbuhan Paku Indonesia Cakar Ayam (*Selaginella plana* Hieron) sebagai Agen Antibakteri Dengan pelaksana berikut

1. Prof. Dr. Suyatno, M.Si.
2. Dr. Amaria, M.Si.
3. Dr. I Gusti Made Sanjaya, M.Si.
4. Rusly Hidayah, S.Si., M.Pd.
5. Asst. Prof. Dr. Nurulhidayah Ahmad Fadzlillah

Telah direvisi sesuai masukan pembahas.

Surabaya, 8 Desember 2021
Reviewer,



Dr. Nuniek Herdyastuti, M.Si.
NIP 197011101998022001

LEMBAR PENGESAHAN PEMBAHAS

Laporan akhir penelitian yang berjudul:

Sintesis Nanoherbal dari Ekstrak Tumbuhan Paku Indonesia Cakar Ayam (*Selaginella plana* Hieron) sebagai Agen Antibakteri Dengan pelaksana berikut

1. Prof. Dr. Suyatno, M.Si.
2. Dr. Amaria, M.Si.
3. Dr. I Gusti Made Sanjaya, M.Si.
4. Rusly Hidayah, S.Si., M.Pd.
5. Asst. Prof. Dr. Nurrulhidayah Ahmad Fadzlillah

Telah direvisi sesuai masukan pembahas.

Surabaya, 8 Desember 2021
Reviewer,



Dr. Yuliani, M.Si.
NIP 196807211993032002