

## Standardisasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bahan Alam Propolis untuk Terapi Infeksi SARS-CoV2 (Standardization and Antioxidant Activity of Propolis Extract for SARS-CoV2 Infection Therapy)

DIAH KARTIKA PRATAMI<sup>1\*</sup>, YESI DESMIATY<sup>1</sup>, EVITA MARIA SIMORANGKIR<sup>1</sup>,  
DEBY FARAHDILA<sup>1</sup>

Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta Selatan, 12640, Indonesia

Diterima 21 Januari 2021, Disetujui 19 September 2021

**Abstrak:** Bahan alam dengan aktivitas imunomodulator, antiinflamasi, dan antioksidan dapat digunakan sebagai terapi suportif infeksi SARS-CoV2. Tujuan penelitian standardisasi mutu dan keamanan propolis sebagai bahan baku obat terapi suportif Covid-19 serta uji aktivitas propolis sebagai antioksidan. Sampel serbuk propolis terdiri dari dua jenis: serbuk mikroenkapsulasi propolis mengandung wax (SMPW) dan non wax (SMP). Standardisasi meliputi parameter spesifik dan non spesifik. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode FRAP dan ABTS. Kadar total flavonoid SMPW dan SMP sebesar 0,31% dan 1,59%. Kadar total fenolik SMPW dan SMP sebesar 83,9082 dan 98,0821 mg GAE/g. Susut pengeringan SMPW dan SMP sebesar 3,65% dan 3,88%. Kadar air SMPW dan SMP sebesar 5,12% dan 5,11%. Kadar abu total SMPW dan SMP sebesar 0,80% dan 0,65%. Logam berat serbuk propolis negatif. Nilai ALT dan AKK < 10 CFU/g, cemaran *E. Coli*, *S. aureus*, *Salmonella spp* dan *P. aeruginosa* negatif. Aktivitas antioksidan SMPW dengan IC<sub>50</sub> ABTS 2,4177 bpj dan EC<sub>50</sub> FRAP 26,41 µg/mL. Sedangkan, aktivitas antioksidan SMP dengan IC<sub>50</sub> ABTS 2,213 bpj dan EC<sub>50</sub> FRAP 32,10 µg/mL. Disimpulkan ekstrak bahan alam propolis memenuhi persyaratan standard ekstrak bahan alam dan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Serbuk EBA propolis dapat dikembangkan menjadi bahan baku untuk OHT terapi suportif infeksi SARS-CoV2.

**Kata kunci:** Covid-19, enkapsulasi, mikro kapsul propolis serbuk, terapi suportif.

**Abstract:** Natural ingredients with immunomodulatory, anti-inflammatory, and antioxidant activities can be used as supportive therapy for SARS-CoV2 infection. The aims were standardized the quality and safety of propolis and determined the antioxidant activity of propolis. There are two types of propolis powder samples: microencapsulated propolis powder containing wax (SMPW) and non-waxed (SMP). Standardization includes specific and non-specific parameters. Antioxidant activity test using FRAP and ABTS methods. The total flavonoids of SMPW and SMP were 0.31% and 1.59%. The total phenolic of SMPW and SMP were 83.9082 and 98.0821 mg GAE/g. The losses on drying of SMPW and SMP were 3.65% and 3.88%. The water content of SMPW and SMP were 5.12% and 5.11%. The total ash content of SMPW and SMP were 0.80% and 0.65%. Heavy metal propolis powder negative. ALT and AKK values < 10 CFU/g, microbiology contamination was negative. Antioxidant activity of SMPW with IC<sub>50</sub> ABTS 2.4177 ppm and EC<sub>50</sub> FRAP 26.41 g/mL. Meanwhile, the antioxidant activity of SMP with IC<sub>50</sub> ABTS 2.213 ppm and EC<sub>50</sub> FRAP 32.10 g/mL. It was concluded that the extract of propolis met the requirements of the standard for extracts of natural ingredients and had strong antioxidant activity. Propolis powder can be developed for supportive therapy for SARS-CoV2 infection.

**Keywords:** Covid-19, encapsulation, powdered propolis microcapsules, supportive therapy.

---

\*Penulis korespondensi  
e-mail: d.kartika@univpancasila.ac.id

## PENDAHULUAN

OBAT herbal yang memiliki efek imunomodulator, antiinflamasi, dan antioksidan dapat digunakan sebagai terapi suportif terapi infeksi SARS-CoV2. Pada pasien yang terinfeksi SARS-CoV-2, antiinflamasi dapat berguna dalam hal mengatasi lonjakan kadar sitokin proinflamasi (IL-6, IL-10 dan TNF- $\alpha$ <sup>(1-4)</sup>). Bahan imunomodulator berguna untuk meningkatkan sistem daya tahan tubuh, secara spesifik maupun non-spesifik pada pasien Covid-19 yang merupakan *self-limiting disease*. Bahan antioksidan dapat menurunkan peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) yang terjadi pada infeksi virus<sup>(5-8)</sup>.

Propolis adalah bahan perekat resin yang dikumpulkan oleh lebah dari tunas, kulit kayu dan bagian tanaman lainnya<sup>(9)</sup>. Propolis memiliki berbagai aktivitas biologi, seperti antimikroba, antivirus, anti-inflamasi, antitumor, dan antioksidan<sup>(10)</sup>. Penelitian mengenai propolis untuk mendukung terapi suportif pada infeksi SARS-CoV-2 yaitu aktivitas antioksidan<sup>(11,12)</sup>, anti-inflamasi<sup>(13)</sup>, imunomodulator<sup>(14)</sup>, dan memiliki aktivitas antioksidan pada bentuk mikrokapsul<sup>(15,16)</sup>. Dengan demikian, propolis memiliki potensi yang besar dalam pemanfaatan dan pengembangannya sebagai terapi suportif pada pasien yang terinfeksi SAR-CoV-2.

Metode mikroenkapsulasi propolis dengan metode *spray drying* yang dilakukan dengan maltodextrin dan gum arab telah dilakukan untuk mengatasi permasalahan sifat fisik propolis dengan tetap mempertahankan kandungan substansi aktif kimia. Pada penelitian ini dilakukan produksi ekstrak bahan alam (EBA) propolis untuk pengembangan obat herbal terstandar (OHT).

Untuk pengembangan OHT propolis, perlu dilakukan penetapan standard mutu dan keamanan sesuai persyaratan obat bahan alam Perka BPOM No. 32 Tahun 2019. Pada riset ini dilakukan uji parameter mutu untuk standardisasi propolis agar memiliki spesifikasi dan memenuhi standar bahan baku ekstrak bahan alam dan uji aktivitas antioksidan. Target *output* riset diperoleh produk EBA propolis serbuk yang dipersiapkan yang memenuhi standard mutu dan keamanan sesuai syarat obat bahan alam, dan siap dikomersialisasi untuk sediaan OHT untuk imunomodulator dan antiinflamasi pada terapi Covid-19.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Ekstrak etanol propolis yang berasal dari Lebah *Tetragonula sapiens* didapatkan dari

PT. RIN Biotek Indonesia (Tangerang Selatan, Banten, Indonesia). Serbuk mikrokapsul propolis diperoleh dari PT. Phytochemindo Reksa (Bogor, Jawa Barat, Indonesia). Maltodekstrin, gom arab, alkohol, asam galat, kuersetin, NaOH, NH<sub>4</sub>OH, natrium asetat, kloroform, HCl, amilalkohol, besi (III) klorida, eter, asam asetat anhidrat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, lempeng Mg, aquadest, propilenglikol, dibeli dari PT. Brataco Chemical Indonesia. Pereaksi mayer, pereaksi dragendorff, pereaksi stiasny, petroleum eter, larutan heksametilentetramin, aluminium klorida, pereaksi Folin-Ciocalteu, natrium karbonat, TPTZ (2,4,6-tripiryridyl-s-triazine), FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, Trolox diperoleh dari Q-Lab Fakultas Farmasi Universitas Pancasila.

**ALAT.** Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain spektrofotometer ultraviolet – cahaya tampak (Shimadzu UV 1800), *rotary vacuum evaporator* (BUCHI R-220), timbangan analitik, maserator (IKA), kertas saring, lumpang alu, pengayak No.14, pengayak No.18, *magnetic stirrer* (IKA C-MAG HS7), alat-alat gelas (Pyrex), *spraydyer*, pemanas air (water bath),

**METODE. Ekstraksi propolis.** Proses ekstraksi propolis menggunakan invensi yang dikembangkan oleh Muhammad Sahlan (2013)<sup>(17)</sup>. Sebanyak 2 kg sarang lebah dimaserasi kinetik dengan 10 liter etanol 96% selama 8 jam. Kemudian disaring menggunakan vakum filter untuk memisahkan lumpur propolis. Selanjutnya ditambah aquadest hingga konsentrasi alkohol menjadi 70%. Pada tahap ini terbentuk endapan berupa wax propolis. Larutan ekstrak etanol propolis 70% didiamkan pada suhu 50°C selama 30 menit, lalu dibiarkan pada suhu ruang selama 15 menit, kemudian disimpan ke dalam lemari pendingin selama 24 jam. Pada filtrat dibagi menjadi dua. Filtrat pertama dilakukan pemisahan endapan berupa wax yang timbul dengan filtrasi pada suhu ruang, sehingga diperoleh filtrat ekstrak etanol propolis *free wax*. Sedangkan bagian yang kedua tidak dilakukan perlakuan sehingga diperoleh ekstrak etanol propolis mengandung wax.

**Enkapsulasi Propolis.** Metode enkapsulasi propolis sesuai dengan metode yang dilakukan oleh Pratami 2018<sup>(15,16)</sup>. Disiapkan 30 gram maltodekstrin dan 3 gram gom arab, perbandingan 1:10. Kedua enkapsulator dicampur dalam 300 ml aquadest. Selanjutnya, campuran dihomogenisasi menggunakan homogenizer selama sekitar 15.000 rpm dalam 2 menit. Kemudian, sebanyak 900 ml propolis dalam bentuk ekstrak etanol propolis (EEP). Campuran bahan penyalut dengan propolis dihomogenisasi dengan *homogenizer*, kemudian dimasukkan ke *spray drying*. Kondisi operasional *spray drying* dengan suhu

inlet 110 °C, flow rate 10 mL / menit, suhu outlet adalah 65-75 °C. Serbuk propolis yang kemudian disimpan dalam wadah aluminium foil.

#### Penetapan Parameter Mutu Spesifik Ekstrak.

Metode yang dilakukan sesuai yang ditetapkan Kementerian Kesehatan RI (2000) mengenai parameter standar ekstrak tumbuhan obat<sup>(22)</sup>. Pemeriksaan organoleptik dilakukan dengan pengamatan terhadap konsistensi, warna, bau dan rasa dari serbuk propolis. Kemudian dilakukan penetapan senyawa terlarut dalam air. Kadar sari yang larut dalam air dihitung dalam persen senyawa yang larut dalam air, dihitung terhadap ekstrak awal. Untuk penetapan kada sari larut dalam etanol dihitung dalam persen senyawa yang larut dalam etanol, dihitung terhadap berat ekstrak awal.

#### Pemeriksaan Parameter Non-Spesifik.

Parameter yang dikur meliputi penetapan susut pengeringan, kadar air, kadar abu total, abu tak larut asam, abu tak larut air, dan sisa pelarut ekstrak<sup>(22)</sup>. Susut pengeringan ditetapkan berdasarkan prinsip gravimetri. Penetapan kadar air dilakukan dengan metode Karl Fischer. Penetapan kadar abu total dengan menggunakan 2 gram ekstrak yang dipijarkan pada suhu 450°C. Sedangkan kadar abu tidak larut asam dilakukan dengan menghitung kadar abu yang tidak larut dalam 25 mL asam klorida encer P yang dididihkan selama 5 menit. Untuk kadar abu tidak larut air berdasarkan kadar abu yang tidak larut dalam 25 mL air mendidih selama 5 menit. Sisa pelarut ekstrak ditetapkan menggunakan kromatografi gas Shimadzu 17A (Shimadzu, Kyoto Prefecture, Japan). Kondisi operasional menggunakan kolom kaca 30 cm x 0,32 mm berisi fase diam dialirkan TR-WAX dengan ukuran partikel 100 - 200 mesh, nitrogen P sebagai gas pembawa, laju alir gas pembawa 20 mL/menit, suhu injektor 200°C dan suhu detektor 160°C.

**Uji Cemar Logam Berat.** Kandungan logam berat di dalam ekstrak dianalisis menggunakan spektrofotometri serapan atom Shimadzu AA-6300 (Shimadzu, Kyoto Prefecture, Japan). Penetapan logam berat yang diperiksa meliputi kadar timbal dan cadmium<sup>(23)</sup>.

**Uji Cemar Mikroba.** Analisis cemar mikroba pada ekstrak dilakukan dengan metode Angka Lempeng Total (ALT) dan Angka Kapang Khamir (AKK)<sup>(23)</sup>. Untuk menentukan ALT sejumlah 1,0 g ekstrak ditambahkan dapar fosfat (pH 7,2) hingga 10 mL. Kemudian dilakukan pengenceran hingga 10<sup>-6</sup>. Dari setiap pengenceran dipipet 1 mL ke dalam cawan petri steril dan dibuat triplo. Ke dalam tiap cawan petri dituangkan 15-20 mL media perbenihan NA (45±10C). ALT dinyatakan berdasarkan jumlah koloni yang tumbuh pada inkubasi cawan petri

dengan posisi terbalik selama 24 jam suhu 35-37°C. Untuk penentuan AKK dilakukan prosedur yang sama dengan pengerjaan ALT dengan menggunakan media perbenihan *Potato Dextrose Agar* (PDA).

**Penapisan Fitokimia.** Identifikasi golongan senyawa kimia dari simplisia dan ekstrak buah okra dilakukan menurut metode *Phytochemical Screening* Farnsworth, meliputi identifikasi alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, kuinon, steroid/terpenoid, kumarin dan minyak atsiri<sup>(20,21)</sup>.

**Penetapan Kadar Flavonoid Total Secara Spektrofotometri UV-Vis.** Penetapan kadar flavonoid menggunakan metode yang dilakukan oleh Djamil 2017<sup>(22)</sup>. Sejumlah 50 mg sampel dimasukkan kedalam labu alas bulat, ditambahkan berturut-turut 1 mL HMT, 20 mL aseton P dan 2 mL larutan asam klorida P, refluks selama 30 menit. Saring menggunakan kapas, filtrat dimasukkan kedalam labu tentukur 100 mL. Residu direfluks kembali dengan 20 mL aseton P selama 30 menit, saring dan campur filtrat ke dalam labu tentukur 100 mL. Ditambahkan aseton P sampai tanda. Dipipet 20 mL ke dalam corong pisah, ditambahkan 20 mL air dan ekstraksi 3 kali, tiap kali menggunakan 15 mL etil asetat P. Masukkan fase etil asetat ke dalam labu tentukur 50 mL, ditambahkan etil asetat P sampai tanda.

Dipipet 10 mL larutan uji ke dalam labu tentukur 25 mL, ditambahkan larutan asam asetat glasial 5% v/v dalam metanol P sampai tanda. Dipipet 10 mL larutan uji kedalam labu tentukur 25 mL, ditambahkan 1 mL larutan aluminium klorida dan larutan asam asetat glasial 5% v/v dalam metanol P sampai tanda. Pengukuran dilakukan 30 menit setelah penambahan larutan aluminium klorida menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh yaitu 427 nm. Hitung kadar flavonoid total sebagai flavonoid pembanding dengan rumus:

$$\% = \frac{C_p (\text{Au-Abu})}{(A_p - A_{bp})} \times 1,25 \times \frac{100}{\text{Berat sampel}} \quad (1)$$

% = Kadar flavonoid total dihitung sebagai flavonoid pembanding

C<sub>p</sub> = Konsentrasi larutan pembanding

Au = Serapan larutan uji dengan AlCl<sub>3</sub>

Abu = Serapan larutan uji tanpa AlCl<sub>3</sub>

A<sub>p</sub> = Serapan lar pembanding dengan AlCl<sub>3</sub>

A<sub>bp</sub> = Serapan lar pembanding tanpa AlCl<sub>3</sub>

1,25 = Faktor konstanta

**Penetapan Kadar Polifenol Total Secara Spektrofotometri UV-Vis.** Penetapan kadar polifenol menggunakan metode yang dilakukan oleh Pratami

2018 dengan sedikit modifikasi<sup>(12)</sup>. Penentuan kadar polifenol total menggunakan metode Folin-Ciocalteu dengan menggunakan asam galat sebagai standar. Larutan baku asam galat atau sampel dibuat dalam konsentrasi 100 bpj. Sebanyak 0,5 mL larutan induk ditambahkan 0,4 mL pereaksi Folin Ciocalteu, diamkan selama 8 menit, ditambahkan 4 mL natrium karbonat 7,5% lalu dicukupkan volume sampai 10,0 mL dengan aquadest. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali (triplo). Inkubasi selama 85 menit pada suhu kamar. Serapan diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 758,5 nm. Kadar fenolik total dari sampel propolis hingga diperoleh hasil yang dinyatakan kesetaraannya terhadap asam galat yaitu dengan nilai mg *Galic Acid Equivalent*/gram ekstrak (mg GAE/g) dengan rumus berikut:

$$\text{Kadar fenol} = \frac{C \text{ ekstrak}}{C \text{ awal}} \times \text{FP} \quad (2)$$

C ekstrak = Konsentrasi ekstrak  
C awal = Konsentrasi awal  
FP = Faktor pengenceran

**Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode ABTS.** Uji aktivitas antioksidan ABTS menggunakan metode yang digunakan oleh Djamil 2021<sup>(23)</sup>. Larutan stok ABTS dibuat dari campuran 40 mg ABTS dalam 5 mL aquadest. Dengan 33 mg K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, dilarutkan dalam 25 mL aquadest. Pencampuran di dalam botol gelap selama 16 jam, dan dalam ruang gelap. Larutan baku kuersetin dibuat dalam konsentrasi 1,2; 1,6; 2; 2,4; dan 2,8 bpj. Diinkubasi selama 6 menit. Kemudian diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 670,5 nm.

Larutan sampel mikroenkapsul propolis dibuat seri konsentrasi 0,5; 0,8; 1; 1,5; 2 dan 3 bpj kemudian ditambah 1 mL larutan ABTS dan ditambah sampai etanol 5 mL. Diinkubasi selama 6 menit. Kemudian diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 670,5 nm.

Cara perhitungan persentase inhibisi dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Hambatan (inhibisi)} = \frac{Ab-Au}{Ab} \times 100\% \quad (3)$$

Ab = Absorbansi blanko

Au = Absorbansi larutan uji

Kemudian dihitung nilai IC<sub>50</sub> (*Inhibition Concentration* 50) yang merupakan konsentrasi antioksidan (bpj) yang mampu menghambat 50% aktivitas radikal bebas.

**Uji Aktivitas Antioksidan metode FRAP.** Uji aktivitas antioksidan FRAP menggunakan metode

yang digunakan oleh Djamil 2021<sup>(23)</sup>. Pereaksi FRAP dibuat dengan campuran 300 mmol/iter dapar asetat pH 3,6; 10 mmol/iter TPTZ (2,4,6-trypyridyl-s-triazine) dalam 40 mmol/liter HCl; dan 20 mmol/iter FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O dengan perbandingan 10:1:1. Larutan blanko dibuat dengan campuran 100 uL etanol, 300 uL aquadest ditambahkan hingga 3 mL pereaksi FRAP diinkubasi 25 menit pada suhu kamar (25°C-30°C).

Larutan trolox dibuat seri konsentrasi 4, 8, 16, 32, 64 mg/L. Larutan mikrokapsul propolis dibuat seri konsentrasi 50, 100, 150 mg/L. Sebanyak 100 µL dari masing-masing konsentrasi larutan baku maupun sampel ditambahkan 300 µL aquadest kemudian ditambahkan hingga 3 mL pereaksi FRAP dihomogenkan. Diinkubasi selama 25 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 595 nm. Lalu dibuat kurva kalibrasinya hubungan antara konsentrasi sampel (mg/L) dengan absorbansi. Kandungan antioksidan dari ekstrak propolis dinyatakan dalam kesetaraan mg trolox/g ekstrak (mg TE/g ekstrak).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Pemeriksaan Organoleptik.** Hasil pemeriksaan organoleptik EBA propolis dapat dilihat pada Tabel 1. Penetapan organoleptik termasuk ke dalam parameter spesifik yang dapat ditentukan dengan menggunakan panca indera untuk mendeskripsikan bentuk, warna, bau dan rasa. Penetapan ini bertujuan untuk pengenalan awal terhadap ekstrak yang bersifat subjektif dan menandakan ciri khas terhadap EBA propolis. Hasil pemeriksaan organoleptik menunjukkan bahwa EBA propolis berbentuk serbuk coklat muda dengan bau dan rasa yang khas propolis.

**Penetapan Kadar Sari Larut Air dan Larut Etanol.** Nilai penetapan kadar sari larut air dan larut etanol seperti pada Tabel 1 dan persyaratannya. Penentuan kadar sari larut air dan etanol adalah metode kuantitatif untuk jumlah kandungan senyawa dalam ekstrak yang mampu tertarik oleh pelarut. Kedua cara yang hampir sama tersebut didasarkan ada kelarutan senyawa yang terkandung dalam ekstrak.

**Persentase Susut Pengerinan dan Kadar Air.** Hasil persentase Susut pengerinan dan Kadar air EBA propolis dapat dilihat pada Tabel 1 dan persyaratannya. Susut pengerinan dilakukan untuk mengetahui senyawa yang menguap dalam ekstrak setelah dilakukan proses pengerinan didalam oven pada suhu 105°C dengan menggunakan metode gravimetri, adapun senyawa-senyawa yang dimaksud yaitu senyawa volatil, senyawa termolabil dan senyawa air. Sedangkan kadar air dilakukan untuk mengetahui besarnya jumlah kandungan air di dalam ekstrak

**Tabel 1. Hasil Penetapan Parameter Spesifik dan Non Spesifik.**

Pemeriksaan	Hasil Pengamatan		Standard
	EBA propolis mengandung wax	EBA propolis non wax	
<b>Penetapan Parameter Mutu Spesifik</b>			
Bentuk	Serbuk	Serbuk	Serbuk
Warna	Coklat muda	Coklat muda	Coklat muda
Bau	Bau khas propolis	Bau khas propolis	Bau khas propolis
Rasa	Rasa khas propolis	Rasa khas propolis	Rasa khas propolis
Kadar sari larut etanol (%)	78.76 ± 0,04	63,99 ± 0,03	≥ 16
Kadar sari larut air (%)	88.52 ± 0,07	71,92 ± 0,05	≥ 4
<b>Penetapan Parameter Mutu Non Spesifik</b>			
Susut pengeringan (%)	3,65 ± 0,03	3,88 ± 0,02	≤ 10
Kadar air (%)	5,12 ± 0,02	5,11 ± 0,01	≤ 10
Kadar abu total (%)	0,80	0,65	≤ 10
Kadar abu larut dalam air (%)	0,74	0,59	≤ 4
Kadar abu tidak larut asam (%)	0,0	0,06	≤ 0,1
Sisa pelarut (%)	Negatif	Negatif	≤ 0,1

setelah dilakukan uji kadar air dengan metode Karl Fischer, hal ini dilakukan untuk menjamin kestabilan ekstrak dalam jangka waktu panjang, semakin besar kadar air maka kemungkinan tumbuhnya mikroba dalam ekstrak akan semakin besar karena air merupakan media terbaik tumbuhnya mikroba.

Pada penetapan susut pengeringan dan kadar air didapat hasil yang memenuhi persyaratan yang tertera pada standar mutu bahan alam obat tradisional BPOM RI bahwa ekstrak bahan alam propolis mengandung sedikit air dan senyawa-senyawa volatil serta senyawa termolabil. Nilai susut pengeringan ekstrak lebih besar dibanding kadar air yang menyatakan dalam ekstrak selain terdapat air yang dapat menguap kemungkinan juga terdapat senyawa volatil lain atau senyawa termolabil yang mudah menguap.

**Persentase Kadar Abu.** Hasil persentase kadar abu total, abu larut air dan tidak larut asam dapat dilihat pada Tabel 1. Kadar Abu Total dilakukan untuk menunjukkan jumlah abu fisiologis dan abu nonfisiologis setelah dilakukan proses pemijaran selama 1 jam pada suhu 450°C hingga didapat bobot tetap dengan metode gravimetri. Kadar abu larut dalam air merupakan abu fisiologis, yaitu abu yang berasal dari bagian tanaman atau jaringan tumbuhan seperti kalsium oksalat, logam-logam golongan alkali

dan alkali tanah. Sedangkan, abu tak larut asam adalah abu nonfisiologis merupakan abu yang berasal dari luar tanaman seperti silika dan logam-logam berat.

**Jumlah Cemaran Logam Berat.** Hasil Cemaran Logam EBA propolis dapat dilihat pada Tabel 2. Cemaran Logam dilakukan untuk menunjukkan jumlah logam berat yang terdapat pada ekstrak, adapun logam berat yang ditetapkan adalah Pb dan Cd, penetapan cemaran logam berat ini dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri serapan atom. Pada penetapan cemaran logam didapat kadar logam berat Pb, Cd, As dan Hg negatif. Hal tersebut memenuhi persyaratan ekstrak bahan alam sehingga dapat digunakan sebagai bahan sediaan karena aman bagi tubuh.

**Analisis Jumlah Cemaran Mikroba.** Hasil Cemaran Mikroba ekstrak bahan alam propolis dapat dilihat pada Tabel 3. Uji cemaran mikroba dilakukan untuk menunjukkan berapa banyak mikroba yang terdapat pada EBA propolis. Pada penetapan cemaran mikroba didapat hasil Angka Lempeng Total ≤ 1 x 10 CFU/g dimana persyaratan suatu cawan pada ALT yang dapat dihitung yaitu 30-300 koloni. Sedangkan, hasil Angka Kapang Khamir yaitu ≤ 1 x 10 CFU/g dimana persyaratan suatu cawan pada AKK yang dapat dihitung yaitu 25-250 koloni. Hasil tersebut

**Tabel 2. Hasil Cemaran Logam.**

Jenis Penetapan	Mikrokapsul propolis tanpa wax	Mikrokapsul propolis mengandung wax	Persyaratan (BPOM)
Cemaran Logam Pb	Negatif	Negatif	≤ 10 mg/kg
Cemaran Logam Cd	Negatif	Negatif	≤ 0,3 mg/kg
Cemaran Logam As	Negatif	Negatif	≤ 5 mg/kg
Cemaran Logam Hg	Negatif	Negatif	≤ 0,5 mg/kg

**Tabel 3. Hasil Cemaran Mikroba.**

Jenis Penetapan	EBA propolis tanpa wax	EBA propolis mengandung wax	Persyaratan (BPOM)
Angka Lempeng Total	$\leq 1 \times 10^4$ CFU/g	$\leq 1 \times 10^4$ CFU/g	$\leq 1 \times 10^4$ CFU/g
Angka Kapang Khamir	$\leq 1 \times 10^4$ CFU/g	$\leq 1 \times 10^4$ CFU/g	$\leq 1 \times 10^3$ CFU/g
<i>E. Coli</i>	$\leq 1 \times 10^4$ CFU/g	$\leq 1 \times 10^4$ CFU/g	$\leq 1 \times 10^4$ CFU/g
<i>S. aureus</i>	Negatif	Negatif	Negatif
<i>Salmonella spp</i>	Negatif	Negatif	Negatif
<i>P. aeruginosa</i>	Negatif	Negatif	Negatif

**Tabel 4. Hasil Penapisan Fitokimia.**

Nama senyawa	Hasil pengamatan	
	SMPW	SMP
Polifenol	+	+
Alkaloid	-	-
Flavonoid	+	+
Saponin	+	+
Tanin	-	-
Kuinon	+	+
Steroid/Triterpenoid	+/+	+/+
Kumarin	+	+
Minyak Atsiri	+	+

**Tabel 5. Kadar Flavonoid Total.**

Sampel	Kadar flavonoid total (%)
Serbuk propolis dengan wax	$0,31 \pm 0,0058$
Serbuk propolis tanpa wax	$1,59 \pm 0,0058$

memenuhi persyaratan yang terdapat pada monografi sehingga ekstrak yang digunakan dapat digunakan untuk bahan sediaan karena EBA propolis tersebut bukan media pertumbuhan mikroba yang baik. Ekstrak propolis juga negative tidak terdapat *E. Coli*, *S. aureus*, *Salmonella spp* dan *P. aeruginosa*.

**Penapisan Fitokimia.** Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit yang terkandung dalam serbuk mikroenkapsulasi propolis pada Tabel 4. Dari penapisan fitokimia yang telah dilakukan diketahui bahwa serbuk mikroenkapsulasi propolis dengan wax dan tanpa wax mengandung senyawa polifenol, flavonoid, saponin, kuinon, steroid, triterpenoid, minyak atsiri dan kumarin. Hal ini sama dengan enelitian terdahulu pada skrining fitokimia yang dilakukan pada propolis<sup>(12)</sup>.

**Penetapan Kadar Flavonoid Total.** Nilai kadar flavonoid dapat dilihat pada Tabel 5. Hasil penetapan kadar flavonoid total dari serbuk mikroenkapsulasi propolis dengan wax sebesar  $0,31 \pm 0,0058\%$  dan tanpa wax sebesar  $1,59 \pm 0,0058\%$ . Berdasarkan hasil tersebut dapat dilihat bahwa kadar flavonoid total terbesar yaitu pada sampel serbuk mikroenkapsulasi propolis tanpa wax.

Penetapan kadar flavonoid total menggunakan spektrofotometri UV-Vis karena flavonoid

mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi sehingga menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum sinar ultraviolet dan spektrum sinar tampak.

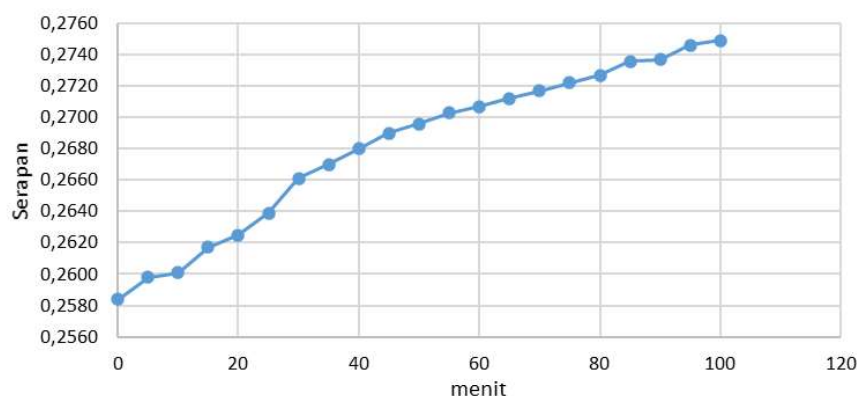
Pengukuran serapan panjang gelombang maksimum dilakukan dari panjang gelombang 200-600 nm. Hasil menunjukkan panjang gelombang maksimum standar baku kuersetin berada pada panjang gelombang 427 nm. Panjang gelombang maksimum tersebut digunakan untuk mengukur serapan dari sampel serbuk mikroenkapsulasi propolis dengan wax dan tanpa wax.

Baku pembandingan yang digunakan dalam penetapan kadar flavonoid total yaitu kuersetin yang merupakan flavonoid golongan flavon dan flavonol, dimana akan terjadi pembentukan kompleks antara  $AlCl_3$  dengan gugus keto pada atom C-4 dan gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 dari golongan flavon dan flavonol.

Digunakan  $AlCl_3$  untuk melihat pergeseran panjang gelombang ke arah visible (tampak). Perlakuan inkubasi selama 30 menit sebelum pengukuran bertujuan agar reaksi berjalan sempurna. Larutan heksametilentetramin (HMT) digunakan sebagai pereduksi flavonoid menjadi aglikon atau glikon.

**Penetapan Kadar Polifenol Total.** Penetapan kadar fenol total dilakukan untuk mengetahui kadar polifenol yang terkandung didalam serbuk mikroenkapsulasi propolis dengan wax dan tanpa wax. Senyawa fenolik diketahui memiliki berbagai aktivitas sebagai antioksidan, melindungi struktur sel, antiinflamasi dan sebagai antiseptik.

Baku pembandingan yang digunakan adalah asam galat, karena merupakan senyawa fenolik turunan asam hidroksibenzoat yang tergolong asam fenol sederhana, stabil, murni dan relatif murah. Penetapan kadar polifenol total menggunakan reagen Folin Ciocalteu yang akan mengoksidasi fenolat (garam alkali) dan gugus fenolik-hidroksi mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) menjadi suatu kompleks molibdenum-tungsten yang berwarna biru. Reaksi ini membutuhkan suasana basa, maka ditambahkan larutan  $Na_2CO_3$  agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat,



Gambar 1. Grafik penentuan waktu stabil larutan baku asam galat.

tetapi pereaksi ini dan produknya tidak stabil pada kondisi basa. Semakin besar senyawa fenolik maka semakin banyak ion fenolat yang akan mereduksi asam heteropoli sehingga warna biru yang dihasilkan akan semakin pekat.

Pengukuran panjang gelombang serapan maksimum dilakukan untuk mengetahui panjang gelombang yang memiliki serapan tertinggi. Larutan baku asam galat 100 bpj dilakukan pengukuran panjang gelombang serapan maksimum pada rentang panjang gelombang 400-850 nm menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dan diperoleh hasil serapan maksimum pada panjang gelombang 758,5 nm yaitu 0,2562.

Pengukuran waktu inkubasi bertujuan untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan suatu senyawa bereaksi dengan senyawa lainnya sampai terbentuk produk yang stabil. Larutan baku asam galat memberikan nilai serapan yang stabil yaitu pada waktu 85 menit (Gambar 1).

Kurva baku asam galat diukur dengan variasi konsentrasi berbeda. Nilai absorbansi yang diperoleh pada masing-masing konsentrasi digunakan untuk mendapatkan persamaan garis linear yang nantinya digunakan untuk penetapan kadar polifenol total pada sampel.

Persamaan regresi linear yang diperoleh  $y=0,0780+0,0069x$  dan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) sebesar 0,9981 menunjukkan hubungan yang linear

antara absorbansi dengan konsentrasi. Hubungan linear yang ideal dicapai jika nilai  $b = 0$  dan nilai  $r = 1$  atau mendekati 1.

Kadar polifenol total dalam sampel serbuk mikroenkapsulasi propolis dengan wax dan tanpa wax dihitung berdasarkan persamaan regresi kurva baku asam galat. Hasil dapat dilihat pada Tabel 6.

Pada pengukuran senyawa fenol dilakukan tiga kali berturut-turut untuk keperluan akurasi data. Sehingga dari hasil penelitian diperoleh kadar fenolik total serbuk mikroenkapsulasi propolis dengan wax sebesar  $83,9082 + 0,0442$  mg GAE/g dan tanpa wax sebesar  $98,0821 + \pm 0,0465$  mg GAE/g, berdasarkan hasil tersebut dapat dilihat bahwa kadar fenol total terbesar yaitu pada sampel serbuk mikroenkapsulasi propolis tanpa wax.

#### Uji Aktivitas Antioksidan Metode ABTS.

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode peredaman radikal bebas ABTS secara spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang 670,5 nm dengan waktu inkubasi yaitu 6 menit. Aktivitas antioksidan diketahui dari nilai serapan beberapa konsentrasi sampel setelah direaksikan dengan larutan radikal bebas ABTS, kemudian dihitung nilai inhibisi untuk mengetahui kekuatan sampel dalam meredam radikal bebas ABTS. Nilai IC50 hasil pengujian aktivitas antioksidan BP kuersetin dan serbuk mikroenkapsulasi propolis dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 6. Hasil penetapan kadar polifenol total serbuk mikroenkapsulasi propolis.

Larutan	Sampel	Serapan (A)	Konsentrasi (mg/L)	Kadar fenol (mg GAE/g)	Rata-rata kadar (mg GAE/g)
Serbuk mikroenkapsulasi propolis dengan wax	1	0,6573	83,9565	83,9565	$83,9082 \pm 0,0442$
	2	0,6569	83,8986	83,8986	
	3	0,6567	83,8696	83,8696	
Serbuk mikroenkapsulasi propolis tanpa wax	1	0,7550	98,1159	98,1159	$98,0821 \pm 0,0465$
	2	0,7549	98,1014	98,1014	
	3	0,7544	98,0290	98,0290	

Data disajikan dalam kadar  $\pm$  SD, n=3

**Tabel 7. Hasil nilai IC<sub>50</sub> uji aktivitas antioksidan ABTS.**

Sampel	Nilai IC <sub>50</sub> (bpj) ± SD
BP Kuersetin	2,1322 ± 0,0343
Serbuk mikroenkapsulasi propolis dengan wax	2,4177 ± 0,0136
Serbuk mikroenkapsulasi propolis tanpa wax	2,213 ± 0,0389

Semakin kecil serapan sampel berarti semakin kuat aktivitas antioksidannya. Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam IC<sub>50</sub> yang menunjukkan konsentrasi sampel (bpj) yang dapat menghambat 50% aktivitas radikal bebas. Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> maka akan semakin kuat aktivitas antioksidan dari sampel. Dari hasil nilai IC<sub>50</sub> yang didapat serbuk mikroenkapsulasi propolis dengan wax dan tanpa wax memiliki nilai IC<sub>50</sub> dibawah 50 bpj yang berarti masuk kategori antioksidan sangat kuat.

**Uji Aktivitas Antioksidan Metode FRAP.** Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode FRAP dipilih karena mudah dilakukan, efisiensi biaya, dan membutuhkan waktu yang relatif cepat dibandingkan metode lainnya. Potensi antioksidan kapasitas reduksi FRAP dinyatakan dalam nilai EC<sub>50</sub> (µg/mL). Uji aktivitas antioksidan EBA propolis dilakukan pada dua sampel. Nilai EC<sub>50</sub> Kapasitas FRAP sampel EBA propolis dengan wax memiliki nilai sebesar 26,41 µg/mL. Sedangkan pada serbuk mikroenkapsulasi propolis tanpa wax memiliki nilai FRAP EC<sub>50</sub> sebesar 32,10 µg/mL.

Kekuatan reduksi kapasitas FRAP dinyatakan dalam nilai EC<sub>50</sub>. Semakin rendah nilai konsentrasi yang dapat direduksi oleh reagen FRAP maka semakin kuat aktivitas antioksidannya. Nilai kapasitas kekuatan reduksi FRAP yang paling rendah terdapat pada propolis karang, dibandingkan dengan kedua sampel propolis lainnya. Propolis padatan memperlihatkan kapasitas kekuatan reduksi FRAP yang paling baik ditunjukkan dengan nilai EC<sub>50</sub> paling rendah dibanding kedua sampel lainnya. Nilai EC<sub>50</sub> FRAP EBA propolis yang dianalisis dari EEP lebih rendah daripada ekstrak *Garcinia porrecta* Laness yang dilaporkan oleh Shinta Marlin dengan nilai antara 1,33 s.d. 19,96 µg/mL<sup>(24)</sup>.

Pengujian antioksidan dari EBA propolis dengan metode FRAP, berdasarkan kemampuan senyawa antioksidan dalam mereduksi senyawa besi(III)-tripiridil-triazin menjadi besi(II)-tripiridil triazin. Reduksi ion Fe<sup>+3</sup> menjadi ion Fe<sup>+2</sup>, karena terjadi kelat antara ion Fe<sup>+3</sup> dengan cincin aromatis nukleofilik yang terdapat pada senyawa polifenol. Peningkatan nilai absorbansi pada panjang gelombang 593 nm menandakan tingginya kapasitas kekuatan reduksi FRAP<sup>(25)</sup>.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan untuk Laboratorium Penelitian Dosen Fakultas Farmasi Universitas Pancasila dan dukungan dana hibah internal dari Fakultas Farmasi Universitas Pancasila (No. 001/FF-UP/NPJ/PPI/VII/2020).

## SIMPULAN

Serbuk mikroenkapsulasi propolis dari lebah *Tetragonula sapiens* memenuhi persyaratan standard ekstrak bahan alam menurut PERKA BPOM No 32. Tahun 2019 dan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Serbuk EBA propolis dapat dikembangkan menjadi bahan baku untuk OHT terapi suportif terapi infeksi SARS-CoV2.

## DAFTAR PUSTAKA

- Sahlan M, Mahira KF, Pratami DK, Rizal R, Ansari MJ, Al-Anazi KM, et al. The cytotoxic and anti-inflammatory potential of *Tetragonula sapiens* propolis from Sulawesi on raw 264.7 cell lines. *J King Saud Univ - Sci.* 2021;33(2):101314.
- Sahlan M, Irdiani R, Flamandita D, Aditama R, Alfarraj S, Ansari MJ, et al. Molecular interaction analysis of Sulawesi propolis compounds with SARS-CoV-2 main protease as preliminary study for COVID-19 drug discovery. *J King Saud Univ.* 2021;33(1):101234.
- Flamandita D, Lischer K, Pratami DK, Aditama R, Sahlan M. Molecular docking analysis of podophyllotoxin derivatives in Sulawesi propolis as potent inhibitors of protein kinases. In: *AIP Conference Proceedings*. AIP Publishing LLC; 2020. p. 20010.
- Flamandita D, Sahlan M, Lischer K, Pratami DK. Molecular Docking Study of Anti-Inflammatory Biomarkers in Sulawesi Propolis as Potent Inhibitors of Cyclooxygenase-2. In: *2019 IEEE International Conference on Innovative Research and Development (ICIRD)*. IEEE; 2019. p. 1–4.
- Ripari N, Sartori AA, da Silva Honorio M, Conte FL, Tasca KI, Santiago KB, et al. Propolis antiviral and immunomodulatory activity: a review and perspectives for COVID-19 treatment. *J Pharm Pharmacol.* 2021;73(3):281–99.
- Yosri N, El-Wahed A, Aida A, Ghonaim R, Khattab OM, Sabry A, et al. Anti-Viral and Immunomodulatory Properties of Propolis: Chemical Diversity, Pharmacological Properties, Preclinical and Clinical Applications, and In Silico Potential against SARS-CoV-2. *Foods.* 2021;10(8):1776.
- Maaroufi H. LxxIxE-like motif in spike protein of SARS-CoV-2 that is known to recruit the host



- PP2A-B56 phosphatase mimics *Artepillin C*, an immunomodulator, of Brazilian green propolis. bioRxiv. 2020;
8. Santos LA, Rosalen PL, Dias NA, Grisolia JC, Gomes BJN, Blossfeld-Lopes L, et al. Brazilian Red Propolis shows antifungal and immunomodulatory activities against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Ethnopharmacol*. 2021;277:114181.
  9. Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W. Historical aspects of propolis research in modern times. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:964149.
  10. Toreti VC, Sato HH, Pastore GM, Park YK. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2013;2013.
  11. Hasan AEZ, Mangunwidjaja D, Sunarti TC, Suparno O, Setiyono A. Investigating the antioxidant and anticytotoxic activities of propolis collected from five regions of Indonesia and their abilities to induce apoptosis. *Emirates J Food Agric*. 2014;26(5):390–8.
  12. Pratami DK, Mun A, Sundowo A, Sahlan M, Pratami DK, Mun A. Phytochemical Profile and Antioxidant Activity of Propolis Ethanolic Extract from *Tetragonula* Bee. *Pharmacogn J*. 2018;10(1):73–80.
  13. Sahlan M, Devina A, Pratami DK, Situmorang H, Farida S, Munim A, et al. Anti-inflammatory activity of *Tetragonula* species from Indonesia. *Saudi J Biol Sci*. 2019;26(7).
  14. Kalsum N, Sulaeman A, Setiawan B, Wibawan IWT. Preliminary studies of the immunomodulator effect of the propolis *Trigona* spp. extract in a mouse model. *IOSR J Agric Vet Sci*. 2017;10:75–80.
  15. Pratami DK, Mun'im A, Hermansyah H, Gozan M, Sahlan M. Microencapsulation optimization of propolis ethanolic extract from *Tetragonula* spp using response surface methodology. *Int J App Pharm*. 2020;12(1).
  16. Pratami DK, Mun'im A, Yohda M, Hermansyah H, Gozan M, Putri YRP, et al. Total phenolic content and antioxidant activity of spray-dried microcapsules propolis from *Tetragonula* species. In: *AIP Conference Proceedings*. 2019.
  17. Sahlan M, Supardi T. Encapsulation of Indonesian propolis by Casein micelle. *Int J Pharma Bio Sci*. 2013;4(1):297–305.
  18. Djoko W, Taurhesia S, Djamil R, Simanjuntak P. Standardisasi Ekstrak Etanol Herba Pegagan (*Centella asiatica*). *Sainstech Farma*. 2020;13(2):118–23.
  19. Wulandari A, Farida Y, Taurhesia S. Perbandingan Aktivitas Ekstrak Daun Kelor Dan Teh Hijau Serta Kombinasi Sebagai Antibakteri Penyebab Jerawat. *J Fitofarmaka Indones*. 2020;7(2):23–9.
  20. Djamil R, Anelia T. Penapisan fitokimia, uji BSLT, dan uji antioksidan ekstrak metanol beberapa spesies Papilionaceae. *J Ilmu Kefarmasian Indones*. 2009;7(2):65–71.
  21. Farnsworth NR. Biological and phytochemical screening of plants. *J Pharm Sci*. 1966;55(3):225–76.
  22. Djamil R, Zaidan S. Isolasi Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Metanol Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr), Euphorbiaceae. *J Ilmu Kefarmasian Indones*. 2017;14(1):57–61.
  23. Djamil R, Pratami DK, Putri FA, Octavia TB. Determination of Quality Parameters and Test Antioxidant Activities of 70% Ethanol Extract of Seroja Leaves (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). *Int J Appl Pharm*. 2021 Feb;13(2 SE-):30–3.
  24. Marlin S, Elya B. Antioxidant Activity and Lipoxygenase Enzyme Inhibition Assay with Total Flavonoid Content from *Garcinia hombroniana* Pierre Leaves. *Pharmacogn J*. 2017;9(2):257–66.
  25. Mouhoubi-Tafinine Z, Ouchemoukh S, Tamendjari A. Antioxidant activity of some Algerian honey and propolis. *Ind Crops Prod*. 2016;88:85–90.