

COMPARISON OF METHODS OF PRODUCING BEE PROPOLIS PURIFIED EXTRACT BASED ON TOTAL FLAVONOID CONTENT USING RUTIN AS STANDARD

PERBANDINGAN METODE PEMBUATAN EKSTRAK TERPURIFIKASI BEE PROPOLIS DARI LEBAH MADU (*Apis mellifera*) BERDASARKAN KADAR FLAVONOID TOTAL DIHITUNG SEBAGAI RUTIN

Agustina Dian Puspitasari, Suwijiyo Pramono*)

Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

ABSTRACT

Propolis is a complex mixture of beeswax, sugar, and gum trees collection of honeybees (Apis mellifera). One of the compounds that have a pharmacological effect is flavonoid. Flavonoid can be obtained in large concentration and high purity with purified extraction method. The extraction was done with 96% ethanol, followed by purification with 30% ethanol, chloroform, ethyl acetate (in Method I), or followed with hot water and ethyl acetate (in Method II). The content of flavonoids detected by Thin Layer Chromatography, the stationary phase, silica gel 60F 254, the mobile phase n-butanol- acetic acid- water (3: 1: 1 % v/v). The total flavonoid concentration was measured by UV-Vis spectrophotometer based on Zou method, calculated as routine. Results were analyzed by paired sample t-test. The mean level of total flavonoids from propolis extract before purification was 1.23 ± 0.3698 %w / w. Purification of ethanolic extract of 96% propolis with Method I and II, resulting in a total flavonoid concentration of 9.97 ± 1.5656 (8.1 times) and 11.78 ± 1.2965 % w / w (9.6 times). Paired samples t-test with SPSS 16 showed the effectiveness of purification with significance value 0.048.

Keywords : propolis, flavonoid, purified extract, Zou method

ABSTRAK

Propolis adalah campuran kompleks lilin lebah, gula, dan getah pepohonan kumpulan lebah madu (Apis mellifera). Salah satu kandungan yang memiliki efek farmakologis adalah flavonoidnya. Flavonoid dapat diperoleh dalam kadar dan kemurnian tinggi dengan dibuat ekstrak terpurifikasi. Ekstraksi dilakukan dengan etanol 96%, dilanjutkan purifikasi dengan etanol 30%, kloroform dan etil asetat untuk metode I, serta air panas dan etil asetat untuk metode II. Kandungan flavonoid dideteksi dengan Kromatografi Lapis Tipis, fase diam silika gel 60F 254, fase gerak n-butanol-asam asetat-air (3:1:1 % v/v). Kadar flavonoid total diukur dengan spektrofotometer UV-Vis berdasarkan metode Zou, dihitung sebagai rutin. Hasil dianalisis dengan paired sample t-test. Rerata kadar flavonoid total dari ekstrak propolis belum terpurifikasi yaitu $1,23 \pm 0,37$ %b/b. Metode I dan II dapat digunakan untuk mempurifikasi ekstrak etanol 96% propolis, menghasilkan kadar flavonoid total yaitu $9,97 \pm 1,57$ (8,1 kali) dan $11,78 \pm 1,30$ %b/b (9,6 kali). Uji paired sample t-test dengan SPSS 16.00 menunjukkan efektivitas purifikasi dengan nilai Sig = 0,048.

Kata kunci : propolis, flavonoid, ekstrak terpurifikasi, metode Zou

PENDAHULUAN

Bee propolis merupakan produk lebah yang terdiri dari campuran bahan kompleks antara lilin lebah, sedikit gula, dan getah pepohonan yang dikumpulkan oleh lebah madu. Komponen terbesar yang terkandung dalam propolis adalah flavonoid dan asam fenolat atau esternya yang mencapai 50% dari kandungan kimia dalam

propolis (Krell, 1996). Menurut Scheller *et al.* (1998) propolis juga mengandung asam kafeat, benzil Kumarat, punakembrin, dan pinobangsin yang berkhasiat sebagai antimikotik. Aktivitas flavonoid *bee propolis* berbeda dengan cara kerja dari perlebahan lainnya. Flavonoid secara langsung melakukan suport terhadap sistem kekebalan tubuh (imunitas) dan menghalangi masuknya kuman dan sejenisnya termasuk virus, jamur parasit (infeksi) ke dalam tubuh (Zen, 2000). Flavonoid juga dapat mempengaruhi

Corresponding author : Suwijiyo Pramono
E-mail: suwijiyo_pramono@yahoo.com

sistem imun seluler dengan cara meningkatkan proliferasi dan fungsi sel makrofag dan sel T dan B (Mookerje *et al.*, 1986).

Berdasarkan penelitian sebelumnya mengenai kandungan flavonoid *bee* propolis yang bermanfaat secara farmakologis dan banyak dihasilkan di Indonesia, maka perlu dilakukan inovasi teknologi fitofarmasetik, yaitu pembuatan ekstrak terpurifikasi dari *bee* propolis untuk mendapatkan kandungan (flavonoid) yang lebih besar serta kemurnian yang tinggi.

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Bahan untuk ekstraksi dan pembuatan ekstrak terpurifikasi adalah bahan propolis dari Gringsing, Batang, Jawa Tengah; etanol 96% (teknis); heksan (teknis); akuades; kloroform (teknis); etil asetat (teknis); larutan *n*-butanol-asam asetat-air (3:1:1 % v/v); fase diam lempeng silika gel 60F 254. Bahan untuk pengukuran kadar total flavonoid adalah metanol, AlCl₃ 10%, NaNO₂ 10%, NaOH 10% pembanding rutin 1%. Semua bahan kimia berderajat pro analisis selain akuades atau dinyatakan lain.

Alat untuk pembuatan ekstrak propolis adalah timbangan analitik, corong *Buchner* (Sigma-Aldirch), penangas air, kompor listrik, cawan porselin (Metheson Scientific), gelas ukur (Metheson Scientific), Erlenmeyer tertutup (Metheson Scientific), kertas saring (Sigma-Aldirch), blender (Nasional), bejana pengembang, lampu ultra violet 245 dan 366 nm, mikro pipet (Effendorf), *blue* dan *yellow* tip, spektrofotometer Genesys 10 UV, kuvet.

Jalannya Penelitian

Pengumpulan *bee* propolis

Propolis dikumpulkan dari daerah Gringsing, Batang, Jawa Tengah, pengumpulan dengan memisahkan bagian luar sarang (ciri propolis berwarna coklat tua, kuning kemerah-merahan, hijau tua sampai kehitaman).

Ekstraksi Propolis

Propolis sebanyak 500 gram dihancurkan, kemudian 3750 mL etanol 96% ditambahkan sebagai pelarut. Maserasi dilakukan dengan pengadukan dilanjutkan dengan perendaman selama 120 jam (5 hari), kemudian dilakukan penyaringan dengan corong *Buchner* dan kertas saring untuk memisahkan filtrat dari ampas ke dalam labu Erlenmeyer. Ampas yang diperoleh ditambahkan penyari lagi hingga volume keseluruhan 5000 mL dan dienaptuangkan selama dua hari. Filtrat diuapkan hingga diperoleh

ekstrak kental, kemudian dihitung rendemen yang diperoleh.

Pembuatan ekstrak terpurifikasi

Metode purifikasi I : Ekstrak etanol 96% yang telah dikentalkan ditimbangan 20 gram, kemudian dituang ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan etanol 30% sebanyak 50 mL lalu diaduk hingga ekstrak tersari ke dalam etanol 30%, penambahan penyari dan pengadukan dilakukan secara bertahap hingga diperoleh etanol 30% yang bening. Filtrat yang didapat dimasukkan ke corong pisah dan ditambah kloroform sama banyak. Dilakukan penggojogan selama kurang lebih satu menit dan didiamkan selama 48 jam. Fraksi etanol 30% yang diperoleh kemudian difraksinasi kembali dengan etil asetat sebanyak empat kali fraksinasi hingga diperoleh fraksi etil asetat yang bening. Penambahan etil asetat sebanyak 127,5 mL. Fraksi etil asetat kemudian dipekatkan hingga diperoleh ekstrak kental dan dihitung rendemennya.

Metode purifikasi II : Ekstrak etanol 96% yang kental ditimbang 20 gram, dituangkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambah air panas 400 mL dan diaduk. Suspensi dimasukkan dalam corong pisah dan ditambah etil asetat 400 mL (perbandingan 1:1). Dilakukan penggojogan kurang lebih satu menit, kemudian didiamkan. Penambahan etil asetat dilakukan sebanyak dua kali fraksinasi hingga diperoleh fraksi etil asetat yang bening, kemudian dipekatkan sehingga diperoleh ekstrak kental dan dihitung rendemennya.

Deteksi kandungan flavonoid

Analisis kimia menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam silika gel 60F 254 dan fase gerak larutan *n*-butanol-asam asetat-air (3:1:1 % v/v). Pengamatan dilakukan di bawah sinar tampak, sinar UV 254 dan UV 366. Identifikasi flavonoid dengan KLT dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan flavonoid pada ekstrak terpurifikasi. Selain itu, identifikasi dengan KLT digunakan untuk penentuan baku standar dalam pengukuran kadar flavonoid total, yaitu dengan membandingkan bercak yang dihasilkan antara ekstrak, pembanding rutin dan kuersetin.

Pengukuran kadar flavonoid total (Zou, 2004)

Penetapan *operating time* : Larutan induk (Li) rutin 1% dalam metanol p.a sebanyak 25 µL dimasukkan dalam labu takar 10,1 mL kemudian ditambah 4 mL akuades dan 0,3 mL NaNO₂ 10% didiamkan selama 6 menit, kemudian ditambah AlCl₃ 10% sebanyak 0,3 mL didiamkan selama 5 menit, ditambah 4,0 mL NaOH 10% dan akuades

sampai tanda. Absorbansi diukur pada λ 510 nm, pengamatan dilakukan pada menit ke-0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, dan 50. *Operating time* ditentukan dengan nilai serapan tertinggi dan stabil dari data yang diperoleh.

Penentuan panjang gelombang maksimal : sebanyak 25 μ L Li dimasukkan ke dalam labu takar 10,0 mL kemudian ditambah dengan 4,0 mL akuades dan 0,3 mL NaNO₂ 10% didiamkan selama 6 menit, kemudian ditambah 4,0 mL NaOH 10% dan akuades sampai tanda. Kemudian ditunggu selama waktu hasil penentuan *operating time*, selanjutnya dilakukan *scanning* dari panjang gelombang 200 hingga 550 nm, panjang gelombang maksimal ditunjukkan dengan nilai absorbansi tertinggi.

Pembuatan kurva baku : rutin 1% dalam metanol p.a diambil 25; 40; 50; 60; dan 75 μ L dimasukkan ke labu takar 10,0 mL kemudian ditambahkan 4,0 mL akuades dan 0,3 mL NaNO₂ 10% didiamkan selama 6 menit, kemudian ditambah AlCl₃ 10% sebanyak 0,3 mL didiamkan selama 5 menit, ditambah 4,0 mL NaOH 1% dan akuades sampai tanda. Ditunggu selama waktu *operating time* dan dibaca nilai absorbansinya terhadap blanko pada panjang gelombang maksimal hasil pengukuran.

Pengukuran kadar total flavonoid : dilakukan dengan mengambil sejumlah volume ekstrak terpurifikasi (yang memberikan absorbansi pada kisaran absorbansi dari kurva baku), 400 μ L untuk ekstrak terpurifikasi propolis 1% b/v dan 900 μ L untuk ekstrak propolis belum terpurifikasi 2% b/v. Pengukuran dilanjutkan sebagaimana dilakukan pada pembuatan kurva baku. Kandungan flavonoid total dinyatakan sebagai gram ekivalen tiap 100 gram berat kering ekstrak (%b/b).

Cara analisis

Analisis kadar flavonoid total dilakukan dengan metode spektrofotometri UV-Visibel dan membandingkan kadar flavonoid total dari dua metode pembuatan ekstrak terpurifikasi yang berbeda dengan kadar flavonoid total dari ekstrak propolis yang belum dipurifikasi menggunakan analisis *paired sample t-test*. Analisis statistik digunakan untuk menguji efektivitas proses purifikasi berkaitan dengan kadar flavonoid total sebelum dan sesudah ekstrak dipurifikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak propolis

Ekstraksi terhadap 500 gram propolis dengan etanol 96% menghasilkan ekstrak kenal dengan bobot 258,8 gram dan nilai rendemen

sebesar 51,76%. Konsistensi ekstrak sangat kental, lengket dan berwarna coklat.

Pembuatan ekstrak terpurifikasi

Pada metode I, ekstrak etanol 96% disuspensikan dalam etanol 30% yang cenderung lebih bersifat polar. Diharapkan akan banyak senyawa flavonoid yang tersari karena sebagian besar flavonoid bersifat relatif polar. Ketika ekstrak etanol 96% disuspensikan dalam etanol 30%, ekstrak sama sekali tidak tersuspensi dan banyak residu yang liat tidak terikut. Oleh karena itu dicuci berulang dengan menggunakan etanol 30% hingga etanol 30% berubah warna menjadi bening, sehingga diharapkan semua senyawa yang bersifat relatif polar dapat terlarut dalam etanol 30%.

Tahap berikutnya adalah purifikasi dengan menggunakan pelarut yang lebih bersifat lipofilik untuk menghilangkan zat *ballast* yang masih terkandung dalam fraksi etanol 30%, yaitu kloroform. Fraksi polar yang dihasilkan difraksinasi kembali dengan etil asetat hingga diperoleh fraksi etil asetat yang bening, dalam hal ini dilakukan sebanyak 4 kali. Fraksinasi dengan menggunakan etil asetat bertujuan untuk melarutkan senyawa flavonoid tanpa mengikutkan gula yang banyak terkandung dalam fraksi etanol 30%. Fraksi etil asetat kemudian diuapkan dengan menggunakan penangas air hingga diperoleh ekstrak sebanyak 0,4955 gram (2,48%) dari 20 gram ekstrak propolis etanol 96%.

Pada metode II: ekstrak etanol 96% disuspensikan dalam air panas yang bersifat polar. Air panas berperan seperti etanol 30%, yang diharapkan nantinya banyak senyawa flavonoid yang dapat tersari. Penggunaan air panas tidak akan mengikutkan zat *ballast* yang bersifat nonpolar seperti lilin. Tahap purifikasi menggunakan pelarut yang bersifat nonpolar seperti dalam metode I untuk menghilangkan zat *ballast* tidak dilakukan karena ekstraksi dengan air panas yang polar tidak ikut menyari zat *ballast* seperti lilin.

Fraksi polar (fraksi air) difraksinasi lebih lanjut dengan etilasetat sebanyak 4 kali sehingga fraksi etilasetat terakhir tidak berwarna. Fraksi etil asetat kemudian diuapkan dan diperoleh redemen sebanyak 0,2510 gram (1,26%) dari 20 gram ekstrak propolis dalam etanol 96%.

Deteksi Kandungan Flavonoid

Ekstrak terpurifikasi dalam etanol 96% ditotolkan bersama dengan standar rutin 1% dan kuersetin 1%, kemudian dikembangkan pada bejana yang telah terjenuhi fase gerak. Hasil menunjukkan adanya bercak berwarna kuning

pada Rf 0,56 dan 0,69 sedangkan Rf standar rutin 1% adalah 0,56 dan kuersetin 0,81. Pada pengukuran selanjutnya digunakan rutin sebagai pembanding karena adanya kesamaan bercak. Adanya bercak kedua dengan Rf mendekati rutin dimungkinkan kandungan flavonoid dalam ekstrak adalah glikosida sehingga perhitungan kadar flavonoid total dihitung sebagai rutin. Hasil KLT disajikan pada Gambar 1.



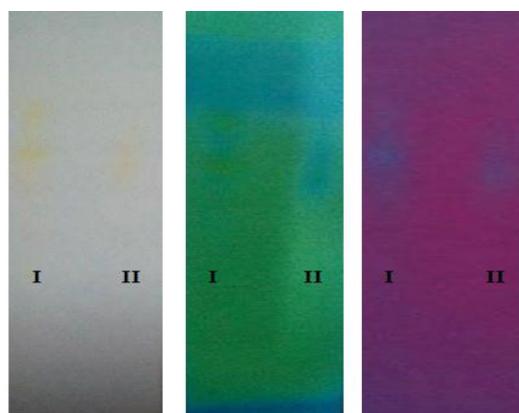
Gambar 1. KLT ekstrak terpurifikasi I, fase diam silika gel 60F 254, fase gerak *n*-butanol: asam asetat: air (3: 1: 1 v/v) deteksi pada sinar tampak. Keterangan: (a) kuersetin, (b) ekstrak terpurifikasi I (c) rutin

Berdasarkan hasil KLT, dengan metode purifikasi yang berbeda pada ekstrak propolis akan menghasilkan kandungan flavonoid yang berbeda pula, dilihat dari nilai Rf, jumlah bercak, dan fluoresensinya. Metode I (Gambar 2, Tabel I) memiliki tiga bercak dengan Rf 0,56; 0,65; dan 0,78, sedangkan metode II (Gambar 2, Tabel I) memperlihatkan dua bercak dengan Rf 0,56 dan 0,62. Nilai Rf 0,56 memiliki nilai yang sama dengan standar rutin, sehingga dapat dimungkinkan bahwa senyawa tersebut adalah rutin, atau senyawa flavonoid yang memiliki sifat dan karakteristik seperti rutin. Terjadinya fluoresensi ungu gelap pada Rf 0,56; 0,62; dan 0,65 memungkinkan flavonoid yang terkandung adalah 5-OH flavon atau flavonol dengan 3-O yang tersubstitusi.

Pada bercak dengan Rf 0,78 dimungkinkan merupakan senyawa flavonoid dalam bentuk glikosida lain dengan kepolaran lebih rendah dibandingkan senyawa flavonoid pertama. Dalam hal ini fase gerak yang digunakan adalah *n*-butanol-asam asetat-air (3 : 1 : 1 % v/v). Fase gerak ini termasuk fase gerak alkoholik, tidak bersifat aqueous seperti asam asetat 15%. Hal ini mengakibatkan senyawa yang relatif kurang polar

akan terelusi lebih cepat dibandingkan senyawa yang lebih polar.

Pada metode II dihasilkan ekstrak terpurifikasi dengan kandungan flavonoid yang relatif bersifat polar dibandingkan dengan metode I. Hal ini disebabkan adanya perbedaan tahap awal purifikasi, yaitu pada metode I menggunakan pelarut etanol 30%, sedangkan metode II menggunakan air panas. Menurut Markham (1988), adanya kecenderungan flavonoid yang terikat dengan gula menyebabkan flavonoid tersebut mudah larut dalam air. Sedangkan campuran antara air dengan pelarut lain seperti etanol 30% akan melarutkan senyawa flavonoid yang lebih luas, meskipun flavonoid tersebut masih relatif polar (Tabel I).



Gambar 2. Hasil KTL ekstrak terpurifikasi bee propolis metode I dan II. Keterangan: (I) metode I, (II) metode II, (a) sinar tampak, (b) UV 254, (c) UV 366

Pengukuran kadar flavonoid total

Pengukuran *operating time*. Serapan konstan terjadi ketika terjadi senyawa kompleks antara $AlCl_3$ dan flavonoid yang menghasilkan warna terjadi dari hasil optimasi, serapan mulai konstan pada menit ke-20.

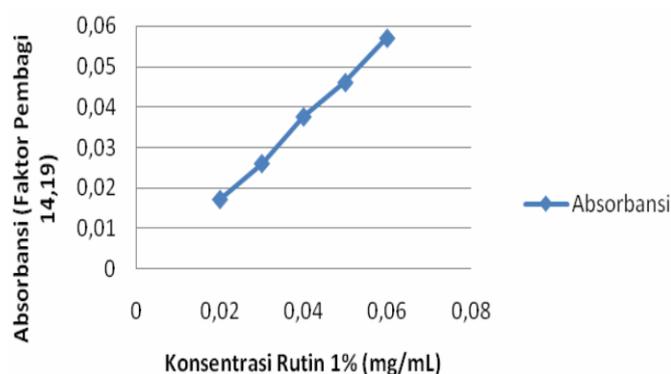
Pada penentuan panjang gelombang maksimum, scanning serapan flavonoid total dalam ekstrak terpurifikasi versus panjang gelombang dilakukan untuk menentukan panjang gelombang maksimum yang digunakan. Suatu pengukuran yang dilakukan tidak pada gelombang maksimumnya akan mengakibatkan nilai yang diperoleh kurang tepat (Markham, 1988). Panjang gelombang 510 nm dipilih sebagai panjang gelombang pembanding rutin. Nilai absorbansi pada panjang gelombang 510 nm masuk dalam rentang yang menunjukkan nilai % *relative error* yang kecil nilai absorbansi berada dalam kisaran 0,2-0,8 (Tabel II).

Tabel I. Hasil deteksi flavonoid ekstrak terpurifikasi bee propolis dengan metode I dan II

Metode	No.	Rf	Sinar Tampak	UV 254	UV 366
Metode I	1.	0,56	Kuning	Kuning	Fluoresensi ungu
	2.	0,65	Kuning	Kuning	Fluoresensi ungu
	3.	0,7	-	Meredam ungu	-
	4.	0,78	Kuning	Kuning	Fluoresensi kekuningan
Metode II	1.	0,56	Kuning	Kuning-hijau	Fluoresensi ungu
	2.	0,62	Kuning	Kuning-hijau	Fluoresensi ungu

Tabel II. Data kadar rutin baku 1% dengan serapan setelah dibagi dengan faktor pembagi 14,19 pada λ 510 nm

No.	Kadar rutin (mg/mL)	Serapan I	Serapan II	Serapan III	Rata-rata
1.	0,02	0,0169	0,0167	0,0178	0,0171
2.	0,03	0,0269	0,0271	0,0240	0,0260
3.	0,04	0,0375	0,0380	0,0374	0,0376
4.	0,05	0,0457	0,0469	0,0456	0,0461
5.	0,06	0,0569	0,0556	0,0588	0,0571



Gambar 3. Kurva baku (faktor pembagi 14,19). Konsentrasi rutin (mg/mL) sebagai fungsi x dan absorbansi sebagai fungsi y ($y = 1,001x - 0,0033$, $r = 0,9990$, $\alpha = 45,03^\circ$).

Pembuatan kurva baku

Berdasarkan data seri kadar rutin pada λ 510 nm didapatkan persamaan kurva baku yaitu $y = 14,19x - 0,0456$ dengan $r = 0,9989$ dan setelah data absorbansi dibagi dengan faktor pembagi 14,19 diperoleh persamaan kurva baku yaitu, $y = 1,001x - 0,0033$, dengan $r = 0,9990$ dan nilai $\alpha = 45,03^\circ$.

Pengukuran kadar flavonoid total

Pengukuran kadar flavonoid total menggunakan metode spektrofotometri sesuai yang dilakukan oleh Zou (2004). Prinsip dari metode ini adalah terbentuknya kompleks $AlCl_3$ dengan flavonoid yang menghasilkan reaksi warna. Pereaksi $AlCl_3$ hanya dapat digunakan untuk mendeteksi flavonoid dengan gugus orto dihidroksi dan hidroksi karbonil atau yang hanya memiliki gugus orto dihidroksi saja. Kadar

flavonoid total yang dihitung dari ekstrak terpurifikasi dihitung sebagai rutin.

Rata-rata kadar flavonoid total dari ekstrak terpurifikasi metode I adalah $9,97 \pm 1,5656$ %b/b dihitung sebagai rutin (Tabel III). Ekstrak yang dipurifikasi dengan metode II menunjukkan data yang tidak jauh berbeda dengan hasil flavonoid total dengan menggunakan metode I yaitu $11,78 \pm 1,2965$ %b/b dihitung sebagai rutin. Data hasil absorbansi dengan standar baku rutin 1% untuk ekstrak terpurifikasi dengan metode I dan II disajikan pada tabel I. Pengukuran flavonoid total dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

Hasil kadar flavonoid total dari kedua metode tersebut tidak berbeda jauh. Namun keunggulan metode II adalah dapat terbebas dari kloroform. Kloroform merupakan pelarut yang dilarang penggunaannya dalam industri farmasi.

Tabel III. Hasil Penetapan Kadar Ekstrak Terpurifikasi Metode I dan II

Metode	Absorbansi	Absorbansi dengan faktor pembagi	Kadar Flavonoid total (mg/ml)	Kadar Flavonoid total (%b/b)	Kadar Flavonoid Total Rata-Rata (%b/b*)
belum terpurifikasi	0,216	0,0152	0,0185	1,03	1,23 ± 0,37
	0,281	0,0198	0,0231	1,28	
	0,306	0,0216	0,0249	1,38	
I	0,574	0,0405	0,0438	10,8	9,97 ± 1,57
	0,514	0,0362	0,0395	9,85	
	0,483	0,0340	0,0373	9,27	
II	0,576	0,0411	0,0444	11,08	11,78 ± 1,30
	0,514	0,0445	0,0478	11,94	
	0,483	0,0461	0,0494	12,33	

*dihitung sebagai rutin. Faktor pembagi 14,19

Kadar flavonoid total dari ekstrak propolis yang belum dipurifikasi lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak yang terpurifikasi. Rata-rata kadar flavonoid total dari ekstrak propolis sebesar 1,23 ± 0,37 % b/b.

Jika dihitung berdasarkan data yang ada kadar flavonoid total dalam ekstrak terpurifikasi dengan metode I lebih besar 8,1 kali dan 9,6 kali pada metode II dibandingkan dengan kadar rata-rata flavonoid total dalam ekstrak etanol 96% yang belum terpurifikasi.

Untuk mengetahui adanya efektivitas proses purifikasi terhadap ekstrak propolis dengan kadar flavonoid total sebagai parameternya dilakukan uji paired sample t-test yaitu membandingkan kadar flavonoid total dalam ekstrak sebelum dan sesudah dilakukan purifikasi.

Hasil uji *paired sample t-test* menunjukkan nilai sig (2-tailed) sebesar 0,048. Hal ini menunjukkan bahwa kadar rata-rata flavonoid total sebelum dan sesudah dilakukan purifikasi terdapat perbedaan signifikan secara statistik. Purifikasi ekstrak *bee propolis* menghasilkan ekstrak terpurifikasi dengan kadar flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan sebelum dipurifikasi. Purifikasi dengan menggunakan metode I dan II memberikan efektivitas dalam menghilangkan zat *ballast* sehingga diperoleh ekstrak dengan kadar flavonoid yang lebih tinggi dan kadar zat *ballast* yang dapat diminimalisir.

KESIMPULAN

Purifikasi ekstrak *bee propolis* dapat diperoleh dengan ekstraksi dengan etanol 96% dilanjutkan fraksinasi dengan etanol 30%, kloroform, dan etil asetat, atau menggunakan air panas dan etil asetat. Purifikasi dengan kloroform

menghasilkan ekstrak terpurifikasi dengan kadar total flavonoid yang lebih rendah dibandingkan metode tanpa menggunakan kloroform. Kadar rata-rata flavonoid total yang dihitung sebagai rutin dari hasil purifikasi dengan kloroform sebesar 9,97±1,57 %b/b sedangkan dari purifikasi air panas sebesar 11,78 ± 1,30 %b/b.

DAFTAR PUSTAKA

- Krell, R., 1996, Value-Added Products from Beekeeping; FAO Agricultural Services Bulletin No. 124. Food and Agriculture Organization of United Nation Rome, www.fao.org/docrep.html, 24 Juli 2009.
- Markham, K.R., 1988, *Cara Identifikasi Flavonoid*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, 1-25, 33-49, Penerbit ITB, Bandung.
- Moonkerjee, B.K., Lee, T.P., Lippes, H.A., Modleton Jr, E., 1986, Some effects of Flavonoid on Lymphocyte proliferative responses, *J Immunopharmacol*, **8** (3) 317-392.
- Scheller, S., Kawalski, Oklek, Dworniazed, S., Matsura, T., Walderna, Klimex, K., Rajek, M., dan Shoni, 1998, Corelation between virulene of virus strain of micobacteria and their susceplibility to ethanolic extract propolis, *Z Nature Naturfolk*, **53** (11) : 1040-1044.
- Zen, Djaya, 2000, Rahasia Kekayaan Alam untuk Kesehatan, Konsultan Medis Harmoni Dinamika Malang, *Billionaires Production* Edisi Desember.
- Zou, Y., Lu, Y., and Wei, D., 2004, Antioksidant activity of flavonoid - rich extract of *Hypericum pervoratum* L in vitro, *J Agric Food Chem*, **52**, 5032-5039.