



UNIVERSITAS INDONESIA

**PRODUKSI NANOPROPOLIS MENGGUNAKAN *HIGH
PRESSURE BALL MILL HOMOGENIZER***

SKRIPSI

**DARUL HAMDI
0806460433**

**FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES
DEPOK
JUNI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PRODUKSI NANOPROPOLIS MENGGUNAKAN *HIGH
PRESSURE BALL MILL HOMOGENIZER***

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Teknik**

DARUL HAMDI

0806460433

**FAKULTAS TEKNIK
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES
DEPOK
JUNI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Darul Hamdi
NPM : 0806460433
Tanda Tangan : 
Tanggal : 25 Juni 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Darul Hamdi
NPM : 0806460433
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul Skripsi : Produksi Nanopropolis Menggunakan *High Pressure Ball Mill Homogenizer*

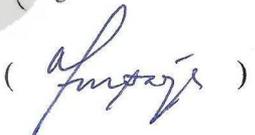
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik pada Program Studi Teknologi Bioproses, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing 1 : Dr. Eng Muhamad Sahlan S.Si, M.Eng ()

Penguji 1 : Dr. Ing. Ir. Misri Gozan, M.Tech ()

Penguji 2 : Prof. Dr. Ir. Anondho Wijanarko, M.Eng ()

Penguji 3 : Ir. Pujoyuwono Martosuyono, M.Sc ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 25 Juni 2012

KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kehadiran Allah SWT atas nikmat-Nya dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi tepat waktu seperti yang diharapkan. Hal ini dilakukan sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknik Jurusan Teknologi Bioproses pada Departemen Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangat sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Eng. Muhamad Sahlan, S. Si., M. Eng., sebagai dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan dalam menyelesaikan penulisan ini.
2. Kedua orang tua penulis yang selalu memberikan bantuan dukungan material, moral dan mendoakan kelancaran penulis di setiap waktu juga kakak-kakakku Dhaniel Ilyas, Dina Meiliana, Debby Arisanty dan Dodi Salim yang memberikan motivasi pada penulis.
3. Prof. Dr. Ir. Widodo Wahyu Purwanto, DEA selaku Ketua Departemen Teknik Kimia FTUI dan Ir. Yuliusman, M. Eng selaku koordinator mata kuliah spesial.
4. Para dosen Departemen Teknik Kimia FTUI yang memberikan ilmu dan wawasannya.
5. Rekan satu grup riset dan teman-teman: Khotib Sarbini, Yongki Suharya, Anggia Fardianti, Soraya Zahra, Desi Anggarawati, Pauline Leon, Radit Immamul, Ibonk, Harnadiemas, Nirwanto, Andhika yang telah menjadi teman diskusi, membantu dalam penelitian dan saling bertukar wawasan.
6. Semua pihak yang telah membantu penyusunan skripsi ini secara langsung maupun tidak langsung.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Depok, 25 Juni 2012

Darul Hamdi

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Darul Hamdi
NPM : 0806460433
Program Studi : Teknologi Bioproses
Departemen : Teknik Kimia
Fakultas : Teknik
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-Exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

PRODUKSI NANOPROPOLIS MENGGUNAKAN *HIGH PRESSURE BALL MILL HOMOGENIZER*

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 25 Juni 2012

Yang Menyatakan



(Darul Hamdi)

ABSTRAK

Nama : Darul Hamdi
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul : Produksi Nanopropolis Menggunakan *High Pressure Ball Mill Homogenizer*

Propolis merupakan salah satu produk lebah. Pemanfaatan propolis paling banyak digunakan sebagai suplemen karena propolis memiliki banyak kandungan bioaktif. Propolis bersifat hidrofobik, hal ini menyebabkan tidak optimalnya diserap oleh tubuh, maka dibutuhkan teknologi. Encapsulasi merupakan salah satu jawaban teknologi yang dibutuhkan karena bersifat “*drug-delivery systems*”. Tujuan penelitian ini untuk melihat efisiensi penyalutan, ukuran partikel nanopropolis dan aktivitas antibakteri. Hasil penelitian ini efisiensi penyalutan propolis untuk senyawa flavonoid sebesar 94,71%. Hasil analisa ukuran partikel menggunakan PSA (*Particle Size Analyzer*), nanopropolis memiliki diameter rata-rata 75,7 nm dan 83,9 nm. Untuk hasil aktivitas antibakteri propolis memiliki daya hambat terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* namun nanopropolis tidak.

Kata Kunci :

Encapsulation, nanopropolis, casein micelle

ABSTRACT

Nama : Darul Hamdi
Study Program : Bioprocess Engineering
Title : Production of Nanopropolis Using High Pressure Ball Mill Homogenizer

Propolis is one of the product that produce by bees. Propolis commonly used as a supplement because it has bioactive compound. Propolis is hydrophobic, so it is not absorbed by the body very well, that's why it needs other technologies to solve this problem. Encapsulation is one of answer because this technology has "drug delivery systems". The purpose of this study is to look at efficiency of coating, particle size of nanopropolis and antibacterial activity. The result of this research show that the efficiency of propolis coatings by flavonoids is 94,71%. Particle Size Analyzer (PSA) is used to measure the particle size. The result is nanopropolis has an average diameter 75,7 nm and 83,9 nm. The antibacterial activity of propolis against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* was detected but not in nanopropolis.

Keyword :

Encapsulation, nanopropolis, casein micelle

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	v
ABSTRAK	vi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Batasan Masalah	3
1.5 Sistematika Penulisan	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Propolis	5
2.1.1 Komposisi Propolis	6
2.2 Potensi Propolis	7
2.2.1 Aktivitas <i>Photoprotection</i>	7
2.2.2 Antimikroba	8
2.3 <i>Casein</i>	11
2.3.1 <i>Casein</i> sebagai <i>Nanocarrier</i>	12
2.4 Nanoenkapsulasi	13
2.5 Analisa Sampel	14
2.5.1 Spektrofotometri UV-Visible	14
2.5.2 Pengukuran Kadar Polifenol Dengan Metode Follin-Ciocalteau	14
2.5.3 Pengukuran Total Flavonoid dengan Metode $AlCl_3$	15
2.5.4 Pembuatan Partikel Nano	16
2.5.5 Pengukuran Partikel Nano	17
2.5.6 Pengujian Aktivitas Antibakteri	18
2.6 <i>State of The Art</i>	18
3. METODOLOGI PENELITIAN	21
3.1 Rancangan Penelitian	21
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	22
3.3 Sampel Penelitian	22
3.4 Alat dan Bahan Penelitian	22
3.4.1 Alat Penelitian	23
3.4.2 Bahan Penelitian	24
3.5 Variabel Penelitian	25
3.6 Prosedur Penelitian	25
3.6.1 Isolasi <i>Casein</i> dari Susu Sapi	25

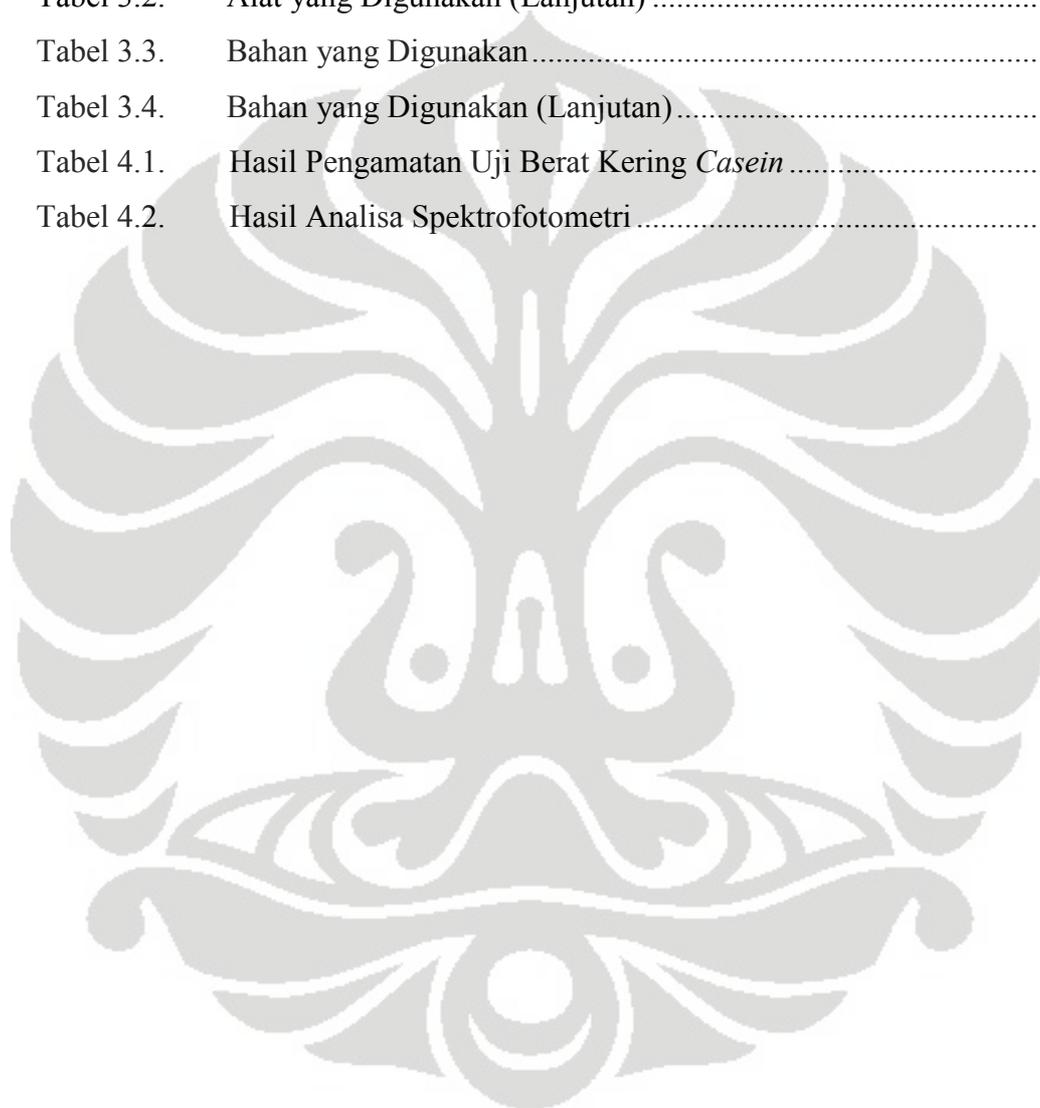
3.6.2 Ekstraksi Propolis	28
3.6.3 Pembuatan Nanopropolis Menggunakan <i>High Pressure Ball Mill Homogenizer</i>	30
3.6.4 Metode Analisa	32
3.6.4.1 Analisa Total Flavonoid	32
3.6.4.2 Analisa Total Polifenol.....	32
3.6.4.3 Analisa Ukuran Partikel	32
3.6.5 Persiapan dan Pengujian Aktivitas Antibakteri	33
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1 Ekstraksi Propolis dari <i>Raw Material</i> Propolis	35
4.2 Isolasi <i>Casein</i> Dari Susu Sapi	37
4.3 Pembuatan Nanopropolis Menggunakan <i>High Pressure Ball Mill Homogenizer</i>	39
4.3.1 Efisiensi Penyalutan Propolis	40
4.4 Analisai Ukuran partikel	41
4.5 Analisa Aktivitas Antibakteri.....	42
5. KESIMPULAN DAN SARAN	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN A	
LAMPIRAN B	
LAMPIRAN C	
LAMPIRAN D	
LAMPIRAN E	

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Propolis	6
Gambar 2.2.	Struktur senyawa flavonoid yang dipisahkan dan diidentifikasi	7
Gambar 2.3.	Struktur <i>casein micelle</i> dalam mode <i>submicelle</i>	12
Gambar 2.4.	Alat <i>Particle Size Analyzer</i> (PSA) Delsa™ Nano C	17
Gambar 3.1.	Diagram Alir Penelitian.....	21
Gambar 3.2.	Diagram Alir Proses Isolasi <i>Casein</i> Dari Susu Sapi.....	27
Gambar 3.3.	Diagram Alir Proses Ekstraksi Propolis Dari Sarang Lebah	29
Gambar 3.4.	Proses Pembuatan Nanopropolis Menggunakan <i>Casein Micelle</i> ..	31
Gambar 4.1.	Ekstrak Etanol Propolis 96% dan <i>Raw Material</i> Propolis	36
Gambar 4.2.	Alat Distilasi.....	36
Gambar 4.3.	Rennet dan <i>Casein</i>	38
Gambar 4.4.	Enkapsulasi propolis dan Nanopropolis dengan <i>Casein Micelle</i> ..	39
Gambar 4.5.	Hasil pengukuran partikel penelitian Supardi (2011) menggunakan <i>Particle Size Analyzer</i> (PSA) pada sampel nanopropolis.....	43
Gambar 4.6.	Uji Aktivitas Antibakteri Propolis, <i>Casein</i> , nanopropolis dengan metode difusi cakram	44
Gambar 4.7.	Uji Aktivitas Antibakteri Propolis, <i>Casein</i> , nanopropolis dengan metode lubang/sumuran	45

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	<i>State of The Art</i>	20
Tabel 3.1.	Alat yang Digunakan	23
Tabel 3.2.	Alat yang Digunakan (Lanjutan)	24
Tabel 3.3.	Bahan yang Digunakan	24
Tabel 3.4.	Bahan yang Digunakan (Lanjutan)	25
Tabel 4.1.	Hasil Pengamatan Uji Berat Kering <i>Casein</i>	38
Tabel 4.2.	Hasil Analisa Spektrofotometri	41



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Keanekaragaman hayati di Indonesia merupakan terbesar kedua di dunia setelah Brazil. Keanekaragaman tersebut merupakan potensi untuk mendapatkan produk-produk yang beragam pula. Produk yang dihasilkan oleh lebah sangat dipengaruhi oleh kehidupan hayati disekitarnya. Salah satunya ialah propolis. Selain propolis lebah menghasilkan madu, *royal jelly*, tepung sari. Propolis adalah produk dari resin lebah yang kompleks yang memiliki sifat fisik bermacam-macam, bergantung pada banyak faktor (Salatino *et al.* 2005). Kata propolis diambil dari bahasa Yunani yang terdiri atas pro yang berarti penjaga dari dan polis yang berarti kota. Secara umum propolis berfungsi untuk menjaga koloni lebah dan produknya dari serangan mikroorganisme (Salatino *et al.* 2005).

Propolis sering dikonsumsi masyarakat karena khasiatnya yang bermacam-macam karena merupakan produk alami dengan antiseptik, antimikotik, bakteriostatik, *astringent*, spasmolitik, antiinflamasi, anestesi, bersifat antioksidan (Marcucci, 1995; Burdock, 1998; Banskota *et al.*, 2001). Propolis juga telah digunakan sebagai obat antiinflamasi dan antibakteri tradisional selama berabad-abad (Sabir *et al.* 2005).

Propolis mengandung berbagai macam senyawa dengan komponen bioaktif. Senyawa utama propolis ialah senyawa flavonoid dan polifenol. Terdapat pula senyawa lain seperti terpena (Gonzalez *et al.*, 2003). Saat ini banyak produsen yang menggunakan ethanol sebagai pelarut untuk ekstraksi propolis karena pelarut ini lebih ekonomis dan mudah. Saat ini penelitian yang dilakukan terkait dengan propolis sangat banyak, mulai dari kandungan propolis, sumber tanaman dan manfaat propolis. Propolis mempunyai aktivitas antioksidan, komponen ini dapat dijadikan formulasi tabir surya (*sunscreen*). Hal ini merupakan satu pengembangan propolis yang dapat dijadikan produk.

Suplemen juga merupakan produk olahan propolis lainnya, baik bersifat cairan atau padatan. Sifat propolis yang cenderung sulit larut dalam air (hidrofob) menyebabkan kandungan bioaktif yang memiliki sifat hidrofob tidak optimal

dicerna oleh tubuh karena bersifat seperti minyak (Chen *et al*, 2006) maka dibutuhkan penyelesaian dalam masalah ini. Dalam pengolahan propolis diharapkan teknologi yang dapat menyebabkan senyawa bioaktif yang di dalam tubuh dapat optimal diserap oleh tubuh. Salah satu teknologi yang telah ada ialah enkapsulasi dengan penyalut *casein micelle*. Teknologi ini menerapkan teknik enkapsulasi atau penyalutan menggunakan *casein micelle* kemudian partikel akan dijadikan nano agar lebih optimal lagi dalam diserap tubuh sehingga disebut *nanoencapsulation*. Enkapsulasi adalah teknik dimana satu bahan atau campuran bahan dilapisi atau terperangkap dalam bahan lain atau sistem (Madene *et al*. 2006). Bahan yang dilapisi disebut bahan aktif atau inti dan bahan pelapis disebut *shell*, dinding material, *carrier* atau *encapsulant* (Madene *et al*. 2006). Maka dari teknik ini akan dibuat nanopropolis yang disalut dengan *casein micelle* menggunakan *high pressure ball mill homogenizer* untuk membuat partikel jadi berukuran nano.

Melihat dari banyak potensi nanopropolis, peneliti akan melakukan produksi nanopropolis. Pada penelitian sebelumnya yakni oleh Supardi (2011), produk nanopropolis yang dihasilkan memiliki diameter sebesar 316,1 nm. Kemudian efisiensi penyalutan terhadap kadar senyawa flavonoid yang ada di dalam propolis sebesar 93,9%. Peneliti juga akan melihat hasil dari penelitian kali ini dan melihat perbandingan dari peneliti sebelumnya.

Tujuan utama dibuat produksi nanopropolis menggunakan *high pressure ball mill homogenizer* adalah mendapatkan metode pembuatan dan dapat menghasilkan potensi yang bermanfaat sehingga dapat dijadikan sebagai bahan aktif untuk desain produk kedepannya, seperti tabir surya, suplemen dan lain-lain. Berdasarkan alasan-alasan tersebut maka kajian terhadap nanopropolis perlu dikembangkan dalam skala yang lebih besar di Indonesia untuk dapat memberikan nilai lebih terhadap propolis.

1.2. Perumusan Masalah

Masalah yang dikaji dalam penelitian kali ini adalah

- Bagaimana menyiapkan produksi nanopropolis.
- Bagaimana efisiensi penyalutan nanopropolis menggunakan *high pressure ball mill homogenizer*.
- Apakah propolis dan nanopropolis memiliki aktivitas antibakteri.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

- Mendapatkan metode produksi nanopropolis.
- Mengukur efisiensi penyalutan zat aktif propolis yaitu total flavonoid.
- Mengukur aktivitas antibakteri pada propolis dan nanopropolis.

1.4. Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah :

- Bahan baku propolis yang digunakan berasal dari “Madu Pramuka”.
- Penyalut yang digunakan adalah *casein micelle*.
- *Casein* yang digunakan dari susu sapi.
- Metode analisa kandungan bioaktif propolis yang digunakan adalah metode aluminium klorida ($AlCl_3$) untuk analisa total flavonoid, dan metode Follin-Ciocalteau untuk analisa total polifenol.
- Metode pengukuran partikel nano menggunakan alat *Particel Size Analyzer (PSA)* dan untuk analisa uji antibakteri dilakukan di LIPI-Cibinong.
- Propolis diekstraksi dengan menggunakan metode Sahlan.
- Enkapsulasi dibuat dengan metode Supardi.

1.5 Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan dalam skripsi ini dilakukan dengan membagi tulisan menjadi lima bab, yaitu :

- **BAB 1 PENDAHULUAN**
Bab ini berisi latar belakang penelitian, perumusan masalah yang dibahas, tujuan dilakukannya penelitian, batasan masalah, dan sistematika penulisan
- **BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA**
Bab ini berisi tentang propolis, komposisi propolis, potensi propolis, *casein*, nanoenkapsulasi, metode analisa, *state of the arts* dari penelitian ini.
- **BAB 3 METODE PENELITIAN**
Bab ini berisi tentang metode pelaksanaan penelitian, model penelitian, peralatan dan bahan yang digunakan dalam penelitian, prosedur penelitian.
- **BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN**
Bab ini berisi tentang pembahasan hasil ekstraksi propolis, isolasi *casein* dari susu sapi, efisiensi penyalutan propolis menggunakan *casein micelle* (total flavonoid), analisa ukuran partikel dan aktivitas antibakteri.
- **BAB 5 KESIMPULAN**
Mendapatkan produk nanopropolis menggunakan *casein micelle* yang memiliki total flavonoid tinggi. Efisiensi penyalutan propolis menggunakan *casein micelle*. Mengetahui ukuran partikel dan aktivitas antibakteri propolis dan nanopropolis.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Propolis

Kata propolis diambil dari bahasa Yunani yang terdiri atas *pro* yang berarti penjaga dari dan *polis* yang berarti kota. Secara umum propolis berfungsi sebagai penjaga koloni lebah dan produknya dari serangan mikroorganisme (Salatino *et al.* 2005). Propolis merupakan campuran resin yang dikumpulkan oleh lebah dari tunas pohon, getah tanaman, dan sumber botani lainnya, kemudian dicampur dengan air liurnya, yang digunakan untuk melindungi sarangnya. Propolis bersifat disinfektan (antibakteri) yang membunuh semua kuman yang masuk ke sarang. Lebah meliputi sarangnya yakni propolis dapat melindungi semua yang ada di dalam sarang tersebut dari serbuan kuman, virus, atau bakteri, misal: ratu lebah, telur, bayi lebah dan madu. Sifat disinfektan alami yang terkandung dalam propolis sangat ampuh dalam membunuh kuman..

Menurut Suranto (2007) warna dari propolis sangat bervariasi tergantung pada jenis tanaman yang dikonsumsi lebah, pada umumnya warna propolis adalah kuning, coklat dan coklat tua. Suranto (2007) juga menambahkan, pada suhu 25-45° C, propolis bersifat sangat lengket, lentur, dan tidak keras. Di atas suhu tersebut, propolis menjadi semakin lengket dan seperti permen karet. Sedangkan pada suhu rendah, propolis mengeras dan rapuh.

Propolis juga berguna untuk menjaga suhu dalam sarang, yaitu suhu 35° C (Salatino *et al.* 2005). Dinding heksagonal sarang lebah terbuat dari campuran lilin lebah dan propolis, selain berfungsi menguatkan dinding sel, juga dipercaya memberikan perlindungan dari mikroorganisme (Salatino *et al.* 2005).

Propolis didapatkan dari sarang lebah dengan cara diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut ethanol. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi untuk bahan-bahan yang tidak tahan panas, yaitu dengan merendam bahan dengan pelarut tertentu dan dalam jangka waktu tertentu (Suranto, 2007). Hasil ekstraksi dari sarang lebah, bukan hanya propolis yang terekstrak, tapi *wax* pun ikut terekstrak, sehingga propolis perlu dimurnikan. *Wax*

dianggap sebagai pengotor karena memberikan warna gelap, dan rasa pahit pada propolis.



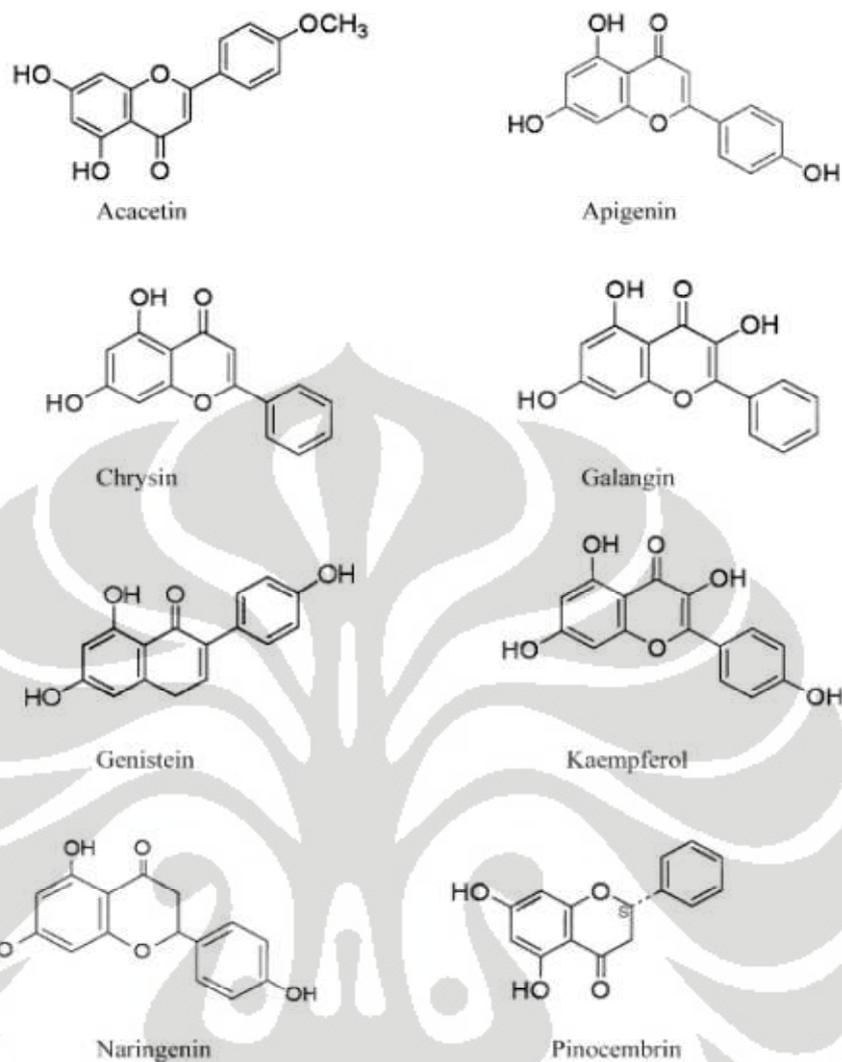
Gambar 2.1. Propolis

2.1.1. Komposisi Propolis

Propolis merupakan produk alami yang memiliki potensi besar dalam pengobatan manusia. Propolis memiliki komposisi yang sangat bervariasi, hal ini dipengaruhi oleh perbedaan geografi, jenis makanan dari lebah, suhu, bahkan hari ketika propolis dikumpulkan (Salatino *et al.* 2005). Secara umum, propolis merupakan salah satu sumber tanaman yang kaya akan flavonoid dan asam fenolat, yang secara luas diakui sebagai *chemopreventive* (Szliszka *et al.* 2009).

Flavonoid merupakan senyawa golongan polifenol yang kebanyakan terdapat dalam tumbuhan, biji, kulit buah atau kulit, termasuk juga dalam propolis. Flavonoid telah banyak digunakan dalam produk farmasi, kosmetik, dan makanan, baik senyawa murni maupun sediaan herbal (misalnya ekstrak) dengan aktivitas biologis tertentu.

Ada berbagai macam senyawa flavonoid yang terkandung di dalam propolis diantaranya yaitu: acacetin, chrysin, apigenin, genistein, naringenin, kaempferol, dan pinocembrin (Volpi and Bergonzini 2006).



Gambar 2.2. Struktur senyawa flavonoid yang dipisahkan dan diidentifikasi dengan HPLC/ESI-MS. (Volpi and Bergonzini 2006).

2.2. Potensi Propolis

Propolis memiliki potensi yang besar dalam hal ini. Banyak penelitian yang menyatakan propolis memiliki banyak aktivitas diantaranya ialah: *photoprotector*, antimikroba, antiinflamasi, antikanker, dan antioksidan.

2.2.1. Aktivitas *Photoprotection*

Photoprotection adalah sekelompok mekanisme alami yang bertujuan untuk meminimalisir kerusakan dari tubuh manusia yang disebabkan oleh paparan sinar UV. Sinar UV merupakan sinar ultraviolet (UV) yang bertanggung jawab terhadap berbagai penyakit kulit termasuk penuaan dini pada kulit (kerutan,

scaling, kekeringan, dilatasi pembuluh darah dan hilangnya kolagen) dan melanoma dan non-melanoma kanker kulit dan penginduksi penyakit lupus (Nichols dan Katiyar, 2010). Berdasarkan panjang gelombangnya, klasifikasi sinar UV, dapat dibedakan menjadi tiga golongan yakni UV-A (320-400 nm), UV-B (290-320 nm) dan UV-C (200-290 nm) (Edlich *et al.* 2004). Propolis merupakan produk alami dengan antiseptik, antimikotik, bakteriostatik, astringent, spasmolitik, antiinflamasi, anestesi, bersifat antioksidan (Marcucci, 1995; Burdock, 1998; Banskota *et al.*, 2001) komponen ini dapat berpotensi dijadikan formula tabir surya (sunscreen), komponen utama dari propolis adalah senyawa flavonoid dan asam fenolat, termasuk *caffeic acid phenylethylester* (Khalil 2006) karena komponen inilah propolis dapat memiliki kemampuan untuk mereduksi sinar UV-B dan UV-A yang terkandung di dalam sinar matahari.

2.2.2. Antimikroba

Antimikroba merupakan obat pembasmi mikroba khususnya mikroba yang dapat merugikan manusia. Dengan adanya propolis yang memiliki senyawa bioaktif flavonoid maka memiliki aktivitas antibiotik alami yang kuat untuk menangkal infeksi yang disebabkan oleh jamur, bakteri, dan virus sehingga efektif untuk mengobati penyakit-penyakit akibat mikroba tersebut (Lotfy, 2006).

2.2.2.1. Aktivitas Antibakteri

Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa propolis dapat berfungsi sebagai antibakteri alami dengan aktivitas yang tinggi. Beberapa penelitian ilmiah menunjukkan bahwa propolis memiliki aktivitas penghambatan terhadap beberapa spesies *Streptococcus* yang dapat menyebabkan karies gigi (Lasmayanty, 2007). Mekanisme antibakteri dalam mengendalikan bakteri ada beberapa macam, yaitu memecah dinding sel, mendenaturasi protein sel, menghambat kerja enzim, dan menghambat sintesis protein asam nukleat. Kandungan bioaktif propolis yang banyak, ekstrak propolis memiliki aktivitas antibakteri terhadap gram-positif, tetapi mempunyai aktivitas terbatas terhadap strain gram-negatif (Lotfy, 2006). Bakteri yang berhasil di inhibisi oleh ekstrak propolis yaitu *Staphylococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *S. sonnei* (Hudnal, 2007).

2.2.2.2. Aktivitas Antivirus

Virus ialah suatu agen yang kecil yang dapat menginfeksi dan hanya dapat berkembang diri di dalam sel-sel yang hidup dari suatu organisme. Virus sangat banyak dan beragam. Virus dapat menginfeksi mulai dari hewan dan tumbuhan hingga bakteri dan arkae. Pada salah satu penelitian yang dilakukan aktivitas antivirus dilakukan percobaan melalui aktivitas in vitro 3-methyl-but-2-enyl cafeate yang diisolasi dari tunas poplar yang telah diteliti dapat melawan virus Herpes simplex tipe-1 (Huleihel and Isanu 2002). Penelitian juga menunjukkan isopentyl ferulated adalah senyawa kandungan minor dari propolis. Senyawa ini efektif untuk mereduksi sintesis DNA virus dan virus titer. Penelitian menghasilkan bahwa isopentyl ferulated (diisolasi dari propolis) dapat menghambat secara signifikan aktivitas virus yang mudah menular dan menginfeksi, seperti virus influenza A1 Honey Kong (H3N2) secara in vitro (Serkedjieva *et al.* 1997). Masih banyak lagi penelitian yang dilakukan dalam pengembangan propolis yang memiliki aktivitas antivirus.

2.2.2.3. Aktivitas Antifungi

Fungi adalah nama kerajaan dari sekelompok makhluk hidup eukariotik heterotrof yang mencerna makanannya di luar tubuh lalu menyerap molekul nutrisi ke dalam sel-selnya. Fungi memiliki bermacam-macam bentuk. Sebagian besar anggota fungi sebagai jamur, kapang, khamir, atau ragi, meskipun seringkali yang dimaksud adalah penampilan luar yang tampak, bukan spesiesnya sendiri. Dalam penelitian tentang propolis, aktivitas yang dimiliki sebagai antifungi juga terbukti. Aktivitas antifungi propolis banyak dilakukan oleh peneliti, diantaranya dengan mencobakan pada *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *A.ochraceus*, *Penicillium notatum viridicatum*, hasilnya adalah ekstrak propolis memiliki aktivitas penghambatan terhadap fungi tersebut (Hudnal, 2007).

2.2.2.4. Antiinflamasi

Inflamasi adalah bagian dari respon biologi jaringan pembuluh darah terhadap rangsangan berbahaya, seperti patogen, sel yang rusak (luka), atau iritasi. Senyawa flavonoid yang terdapat di dalam propolis dapat menghambat *Cyclooxygenase* (COX) dan aktivitas *lipo-oxygenase*, serta membatasi aktivitas *polygalacturonase* (Borrelli *et al.* 2002, Raso *et al.* 2001). Senyawa lainnya yaitu *Caffeic Acid Phenethyl Ester* (CAPE), juga mempunyai aktivitas antiinflamasi pengeluaran asam arakidonat pada membran sel telah di hambat, hal ini menyebabkan penekanan aktivasi *Cyclooxygenase-1*(COX-1) dan *Cyclooxygenase-2* (COX-2), dan menghambat ekspresi gen dari COX-2 (Mirzoeva and Calder 1996). CAPE yang terdapat dalam propolis juga mempunyai sifat antiinflamasi, salah satunya dicobakan pada T-sel (Lotfy, 2006).

2.2.2.5. Aktivitas Antikanker

Kanker seperti yang kita ketahui selama ini, merupakan salah satu penyakit yang paling mematikan. Kanker ialah penyakit ganas yang ditandai dengan kelainan siklus sel tertentu sehingga dapat menimbulkan kemampuan sel untuk membelah diri tidak terkendali (pembelahan sel melebihi batas normal, menyerang jaringan biologis terdekatnya dan dapat menyebar ke tempat lain di dalam tubuh melalui sirkulasi darah disebut metastasis.

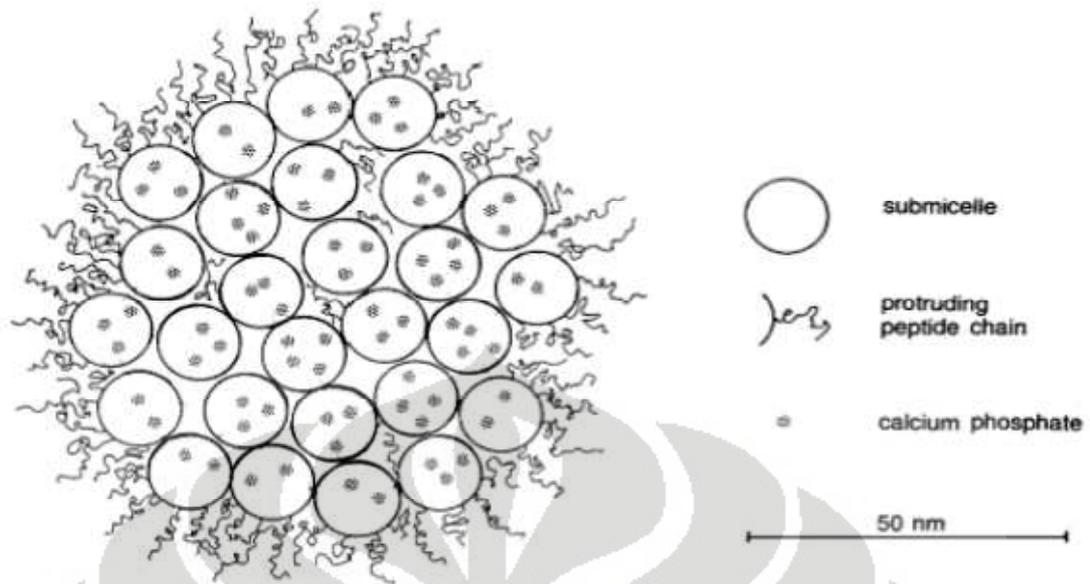
Aktivitas antikanker dari propolis diteliti dapat menghambat sel kanker HeLa (sel kanker serviks), Siha (sel kanker uterus), serta T47D dan MCF7 (sel kanker payudara). Riset ilmiah itu membuktikan bahwa nilai LC_{50} 15,625-62,5 $\mu\text{g/ml}$. Artinya, propolis dosis 15,625-62,5 $\mu\text{g/ml}$ dapat menghambat aktivitas 50% sel kanker dalam kultur (Yuliati, 2009). Kandungan bioaktif propolis yang dapat mencegah kanker yaitu senyawa *caffeic acid phenethyl ester* (CAPE) (Demestre *et al.* 2009)

2.2.2.6. Aktivitas Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang mampu untuk menghambat dan mencegah proses oksidasi, akan tetapi tidak dapat meningkatkan kualitas produk yang sudah teroksidasi. Flavonoid yang terdapat di dalam propolis dapat menghambat *Cyclooxygenase* (COX) dan aktivitas *lipo-oxygenase*, serta membatasi aktivitas *polygalacturonase* (Borrelli *et al.* 2002, Raso *et al.* 2001). Kandungan propolis yang banyak mengandung senyawa polifenol bermanfaat sebagai antioksidan yang melindungi sel tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas dengan cara mengikat zat radikal bebas. Senyawa bioaktif propolis yang memiliki aktivitas antioksidan adalah pinocembrin, chrysin, galangin, dan caffeates (Gregoris and Stevanato 2010).

2.3 Casein

Casein dalam sejarahnya di dalam bahasa latin ialah *caseus* yang bermakna keju. *Casein* dikatakan sebagai keju di dalam bahasa latin karena salah satu kegunaan *casein* untuk membuat keju. Keju terdiri dari protein dan lemak dari susu, biasanya dari susu sapi, kambing, kerbau atau domba. *Casein* ialah nama sebuah keluarga yang berhubungan dengan *phosphoprotein*. Protein ini biasanya ditemukan pada hewan mamalia bersusu. Untuk susu sapi protein *casein* yang dihasilkan bisa mencapai 80% dan untuk protein *casein* di dalam manusia antara 20% hingga 40% (Kunz and Lonnerdal 1990). *Casein* bersifat hidrofobik, sehingga kurang larut dalam air. Hal ini ditemukan dalam susu sebagai suspensi partikel yang disebut "*Casein Micelle*". *Casein-casein* yang di dalam *micelle* bergabung karena ion kalsium dan interaksi hidrofobik. Salah satu dari inti *micelle* ialah dibentuk oleh beberapa *submicelle*, pinggirannya terdiri dari *microvellosities* atau *k-casein* (Walstra, 1979; Lucey, 2002). Berikut adalah Gambar 2.3



Gambar 2.3. Struktur *casein micelle* dalam model *submicelle*. (Walstra, 1999)

2.3.1 *Casein sebagai nano-carrier*

Susu sapi mengandung 30-35% protein. *Casein* yang merupakan komposisi terbesar dari susu sapi (sekitar 80%), tersusun membentuk *Micelle*. *Casein* dalam bentuk *micelle* didesain oleh alam untuk mengkonsentrasikan, menstabilkan dan mengirimkan nutrisi seperti kalsium dan protein. Secara natural *casein* didesain sebagai *nano-delivery system* (Shapira *et al.* 2012).

Casein micelle mempunyai ukuran antara 50 hingga 500 nm dengan diameter rata-rata sekitar 150 nm. Susunan *casein* berbentuk *micelle* sangat penting untuk kestabilan koloid susu sehingga mudah untuk disimpan dan mudah untuk dicerna (Semo *et al.* 2007).

Selama ini penggunaan *casein* sebagai *nano-delivery system* jarang dilakukan, hingga pada tahun 2007 para peneliti dari israel berhasil mendesain sistem *nano-delivery* dengan menggunakan *casein micelle*. Mereka berhasil membuat partikel nano *casein micelle* dengan ukuran 100 – 500 nm, dengan populasi tertinggi berukuran sekitar 200 nm (Semo *et al.* 2007). Penemuan terbaru Kanazawa (2010) dengan menggunakan *casein* sebagai *nanocarrier* mendapatkan hasil bahwa nanopartikel dapat dibentuk tanpa menggunakan surfaktan atau polimer buatan, ukuran partikel yang terbentuk dapat dikontrol, stabil pada keadaan asam, dan tentu saja mengandung senyawa bioaktif didalamnya. *Casein*

yang terbentuk nanopartikel juga memiliki ukuran yang berkisar 10-300 nm (Kanazawa, 2010).

2.4. Nanoenkapsulasi

Enkapsulasi adalah teknik dimana satu bahan atau campuran bahan dilapisi dengan atau terperangkap dalam bahan lain atau sistem. Bahan yang dilapisi disebut bahan aktif atau inti, dan bahan pelapis disebut *shell* atau pelindung, dinding material, pembawa (*carrier*) atau *encapsulant* (Madene *et al.* 2006).

Nanoenkapsulasi dapat melakukan perlindungan terhadap bioaktif bahan baku makanan yang sensitif karena kondisi lingkungan kurang baik, kelarutan, atau menyembunyikan dari rasa atau bau yang tidak menyenangkan (Fathi *et al.* 2012). Banyak hal yang dapat dikembangkan dari teknologi nano, khususnya tulisan yang membahas tentang kondisi sekarang berbasis lemak sebagai pembawa (*carrier*) termasuk nanoemulsions, nanoliposomes, *solid lipid nanoparticles* (SLNs) dan generasi sistem enkapsulasi yaitu *nanostructure lipid carriers* (NLCs) tentang metode produksi, sifat fisiokimia, fungsi, teknik stabilisasi, potensi keuntungan dan keterbatasan serta mekanisme pengiriman (Fathi *et al.* 2012).

Nanoenkapsulasi untuk propolis pun kini sudah dikembangkan oleh berbagai peneliti di dunia. Bioaktif yang dimiliki propolis dapat disalut dengan berbagai bahan pembawa (*carrier*) namun saat ini banyak yang menggunakan protein *casein* karena sifat propolis yang hidrofobik. Dari proses nanoenkapsulasi ini diharapkan bioaktif yang tersalut memiliki efisiensi tinggi dengan jumlah *casein* yang ada. Memiliki efisiensi enkapsulasi tinggi memang selalu menguntungkan, meskipun beban enkapsulasi lebih dari 50% tidak didapatkan akibat kenaikan risiko kebocoran bioaktif dalam kasusnya karena permukaan cacat yang berlebih (Madene *et al.* 2006).

2.5. Analisa sampel

2.5.1. Spektrofotometri UV-Visible

Spektrofotometri adalah metode analisa zat berdasarkan interaksi materi dengan radiasi ultramagnetik (Fessenden & Fessenden, 1982). Dasar dari spektrofotometri UV-VIS adalah absorpsi. Absorpsi dalam daerah ultraviolet dapat menyebabkan eksitasi elektron yang meliputi transisi electron π, σ, n, d, f , dan transfer muatan. Panjang gelombang serapan merupakan perbedaan ukuran tingkat-tingkat energi dari elektron yang tereksitasi. Oleh karena itu puncak absorpsi (λ_{maks}) dapat dihubungkan dengan jenis-jenis ikatan yang ada dalam spesies. Sumber radiasi yang dipancarkan dan seberapa besar radiasi yang diserap oleh larutan harus memenuhi hukum Lambert Beer. Hukum Lambert Beer menyatakan bahwa fraksi penyerapan sinar tidak bergantung pada intensitas sumber cahaya, tetapi bergantung dengan banyaknya molekul yang menyerap (Fessenden & Fessenden, 1982).

2.5.2. Pengukuran Total Flavonoid dengan Metode Kolorimetri $AlCl_3$

Pengukuran total flavonoid pada propolis yang telah dilakukan menggunakan metode $AlCl_3$ (Ghasemi *et al.* 2009). Prinsip dari metode pewarnaan ini adalah $AlCl_3$ membentuk kompleks asam yang stabil dengan C-4 gugus keto, lalu dengan C-3 atau C-5 gugus hidroksil dari flavon dan flavonol. Selain itu $AlCl_3$ juga membentuk kompleks asam yang labil dengan gugus ortodihidroksil pada cincin A atau cincin B dari flavonoid (Chang *et al.* 2000) sehingga akan mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang 415 nm (Supardi, 2011). Pengukuran total flavonoid menggunakan standar uji senyawa quercetin. Perhitungan kadar total flavonoid sampel didapatkan dengan cara memasukan nilai absorbansi larutan sampel ke dalam persamaan linearitas kurva standar flavonoid yang telah dibuat.

Persamaannya yaitu : $y = ax + b$

Keterangan y = Absorbansi sampel

x = Kadar total flavonoid sampel ($\mu\text{g/mL}$)

a = Slope dari kurva standar

b = Intersep dari kurva standar

Kandungan total flavonoid sampel diekspresikan dengan microgram (μg) quercetin.

$$\text{KadarTotalFlavonoid}(\mu\text{g}) = V(\text{mL}) \times C \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right)$$

V = Volume akhir sampel

C = Konsentrasi sampel

2.5.3. Pengukuran Kadar Polifenol Dengan Metode Follin-Ciocalteu

Pada uji kadar polifenol memiliki prinsip reaksi oksidasi-reduksi dengan menggunakan metode Follin-Ciocalteu. Reagen Follin-Ciocalteu merupakan campuran asam fosfomolibdat dan asam fosfotungstat. Antioksidan dapat mereduksi reagen sehingga terbentuk kompleks warna biru (kromatogen) dengan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 745-750 nm. Asam fosfotungstat ($\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}^{-7}$) tereduksi menjadi $\text{H}_2\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}^{-8}$ dan asam fosfomolibdat ($\text{H}_2\text{P}_2\text{Mo}_{18}\text{O}_{62}^{-6}$) tereduksi menjadi $\text{H}_6\text{P}_2\text{Mo}_{18}\text{O}_{62}^{-6}$ (Wuisan, 2007)

Uji kadar polifenol memiliki kelebihan, yaitu dapat menghitung secara kuantitatif semua grup fenolik seperti antosianin, dan fenolik. Namun demikian, uji kadar polifenol juga memiliki kelemahan, antara lain tidak mampu membedakan tipe-tipe fenol yang terkandung (monomer/dimer/trimer). Selain itu, keberadaan protein, asam nukleat, dan asam askorbat dapat mempengaruhi uji polifenol (Häkkinen, 2000)

Pengukuran kadar polifenol menggunakan standar uji pada analisa yang dilakukan adalah asam galat, perhitungan kadar total polifenol dari sampel didapatkan dengan cara memasukan nilai absorbansi larutan sampel ke dalam persamaan kurva standar polifenol yang telah dibuat (Wuisan, 2007). Kadar total polifenol sampel berbanding lurus dengan absorbansi.

Persamaannya yaitu : $y = ax + b$

Keterangan y = Absorbansi sampel

x = Kadar total polifenol sampel($\mu\text{g}/\text{mL}$)

a = Slope dari kurva standar

b = Intersep dari kurva standar

Kandungan total polifenol sampel diekspresikan dengan microgram (μg) asam

$$\text{galat Kadar Total Polifenol } (\mu\text{g}) = V(\text{mL}) \times C \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right)$$

V = Volume akhir sampel (mL)

C = Konsentrasi sampel $\left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right)$

2.5.4. Pembuatan Partikel Nano

Pada pembuatan partikel nano menggunakan alat “*High Pressure Ball Mill Homogenizer*”. Prinsip dari alat ini pertama partikel yang ingin di jadikan nano, akan di haluskan menggunakan *ball mill*. *Ball mill* terutama digunakan untuk menghancurkan atau menggerus partikel menjadi halus. *Ball mill* adalah alat yang efisien untuk menggiling bahan banyak menjadi bubuk yang sangat baik.. Ball Mill banyak digunakan dalam bubuk pembuatan jalur produksi termasuk semen, silikat, bahan bangunan, bahan tahan api, pupuk, bijih logam besi dan keramik kaca. Setelah partikel propolis yang disalut oleh *casein* dihancurkan menggunakan alat *ball mill*, propolis akan dimasukkan kedalam alat *high pressure homogenizer* dengan alat ini. Setiap alat ini memiliki satu atau lebih dari piston pendorong yang dapat maju dan mundur. Ketika piston maju mundur, partikel yang diinginkan akan masuk ke dalam celah kosong kemudian piston akan mendorong dengan menghasilkan tekanan yang tinggi. Setelah melewati celah sempit itu, partikel akan keluar dengan kecepatan yang sangat tinggi 1000-1500 meter/detik karena tiba-tiba kehilangan tekanan dan partikel menabrak cincin. Hal ini akan mengakibatkan tiga hal yakni, efek kekosongan, efek tumbukan dan efek pergeseran. Setelah tiga efek itu terjadi ukuran partikel dapat berkurang dibawah 100 nm. Efek dari tekanan sangat besar karen tekanan sebagai variabel termodinamika penting dapat mempengaruhi luas berbagai struktur biologis dan proses (Yaldagard *et al*, 2008).

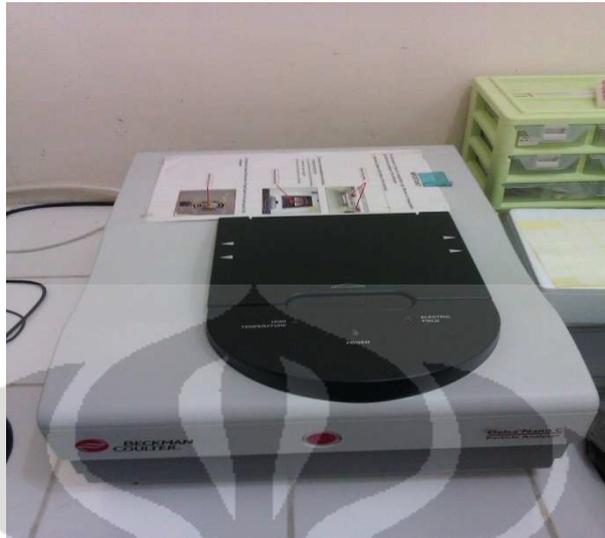
2.5.5. Pengukuran Partikel Nano

Pengukuran partikel nano menggunakan Particle Size Analyzer (PSA), Delsa™ Nano C, Beckman Coulter. Alat ini digunakan untuk menganalisa pengukuran zeta potensial dan ukuran partikel dengan tingkat kearutan yang tinggi. Alat ini memiliki resolusi dan sensitivitas, tanpa memperhatikan

konduktivitas atau konsentrasi sampelnya. Rentang pengukuran unuk alat ini yaitu dari 0,6 nm – 7 μ m. PSA Delsa™ Nano C menggunakan prinsip *Photon Correlation Spectroscopy* dan *Electrophoretic Light Scattering*. Untuk pengukuran distribusi partikel menggunakan prinsip *Photon Correlation Spectroscopy* yang merupakan teknik untuk menentukan koefisien difusi partikel kecil dalam larutan dengan mengukur intensitas penyebaran sinar dari partikel sebagai fungsi waktu. Proses yang terjadi selama pengukuran antara lain partikel terdifusi melewati sel sampel dikarenakan gerak Brown, kemudian sinar laser menyinari partikel. Penyebaran sinar partikel, menciptakan fluktuasi dalam intensitas penyebaran dan dikumpulkan pada sudut yang dipilih selanjutnya diukur dengan detektor sensitif. Laju difusi partikel ditentukan oleh ukuran partikel, informasi mengenai ukuran terdapat di dalam laju fluktuasi dari penyebaran sinarnya sehingga dari laju penyebaran sinar dapat ditentukan distribusi partikel dari populasi sampel yang diukur (Beckman Coulter, 2008). Penerapan dari alat ini bisa digunakan untuk:

- Farmasi
- Bioteknologi
- Makanan dan Minuman
- Sel-Sel Hidup
- Stabilitas Emulsi
- Tekstil
- Stabilitas Formulasi
- Semikonduktor

Dapat dilihat pada Gambar 2.4 yang merupakan alat PSA Delsa™ Nano C:



Gambar 2.4. Alat *Particle Size Analyzer* (PSA) Delsa™ Nano C.

2.5.6. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran. *Disc diffusion test* atau uji difusi disk dilakukan dengan mengukur diameter zona bening (*clear zone*) yang merupakan petunjuk adanya respon penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam ekstrak.

Metode difusi merupakan salah satu metode yang ada. Metode difusi memiliki tipe cara melakukannya yaitu metode silinder, metode lubang/sumuran dan metode cakram kertas. Metode lubang yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diinjeksikan dengan ekstrak yang akan diuji. Setelah dilakukan inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling lubang (Kusmayati dan Agustini, 2007).

Pada metode silinder, silinder steril dengan diameter 8 mm, ditetesi larutan uji (antibakteri), dan ditempatkan pada permukaan agar yang telah ditanami bakteri uji. Daerah hambat yang terbentuk, terlihat sebagai daerah bening di sekitar silinder.

Difusi cakram merupakan cara yang paling banyak digunakan di antara kedua cara lain di atas. Sejumlah bakteri uji diinokulasi pada media agar, dan

cakram yang mengandung larutan uji (larutan zat antibakteri) diletakkan pada permukaan media agar yang telah memadat. Setelah diinkubasi akan tampak daerah bening di sekeliling cakram, yang menandakan bahwa bakteri tidak dapat tumbuh (hidup) di sekitar daerah yang ditempati zat antibakteri.

2.6. *State of The Arts*

Enkapsulasi adalah teknologi berkembang pesat dengan banyak potensi di berbagai wilayah termasuk farmasi dan industri makanan. Enkapsulasi adalah suatu proses dimana partikel kecil dari inti materi dikemas dalam bahan yang menyelimuti dan memiliki dinding untuk membentuk mikrokapsul (Gouin 2004).

Teknologi nano berkembang pesat di dunia, contohnya pada makanan atau obat-obatan, diantaranya adalah membuat penyimpanan makanan lebih lama, dan tidak mudah rusak, rasa yang tidak berubah, tidak terlalu mahal, mudah diserap oleh tubuh dan aman untuk di konsumsi (Sjaikhurrizal, 2010).

Teknik enkapsulasi dan nano partikel sangat berkembang saat ini. Penelitian tentang nanoenkapsulasi banyak seperti menggunakan penyalut protein, lipid, polymer dan lain-lain.

Protein memiliki fungsi unik, selain proteinnya bermanfaat bagi tubuh, protein pun dapat digunakan untuk menyalut senyawa bioaktif tertentu. Salah satunya ialah protein *casein* yang berfungsi juga sebagai pembawa makanan (*carier*) dan menyalut senyawa yang hidrofob.

Propolis yang memiliki banyak zat bioaktif didalamnya memiliki sifat yang hidrofob sehingga tidak optimal diserap oleh tubuh (Hamada *et al*, 1996). Oleh karena itu perlu ada perlakuan terhadap propolis sebelum dikonsumsi agar dapat diserap optimal oleh tubuh, salah satunya adalah dengan membuat produk berukuran nano (Chen *et al*, 2006).

Banyak cara untuk membuat partikel menjadi berukuran nano, salah satunya pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Supardi (2011). Cara untuk membuat partikel nano Supardi (2011) menggunakan proses sonikasi dengan alat sonikator. Alat ini bekerja menghancurkan partikel hingga berukuran nano menggunakan gelombang ultrasonik. Hasil pengukuran partikel yang didapatkan oleh Supardi (2011) pada nanopropolis sebesar 316,1 nm. Supardi (2011) juga melakukan penyalutan dengan *casein*, didapatkan efisiensi penyalutan dari kadar

senyawa flavonoid sebesar 93,9%. Disini peneliti akan melakukan metode pembuatan nanopropolis dengan penyalut *casein micelle* menggunakan *high pressure ball mill homogenizer* untuk mendapatkan partikel yang berukuran nano, kemudian akan dianalisis hasilnya. Diharapkan pada masa yang akan datang produk nanopropolis ini akan menjadi salah satu komponen bermanfaat yang dapat dibentuk menjadi produk lain. Berikut adalah Gambar 2.1 yang merupakan *state of the art* dari penelitian ini.

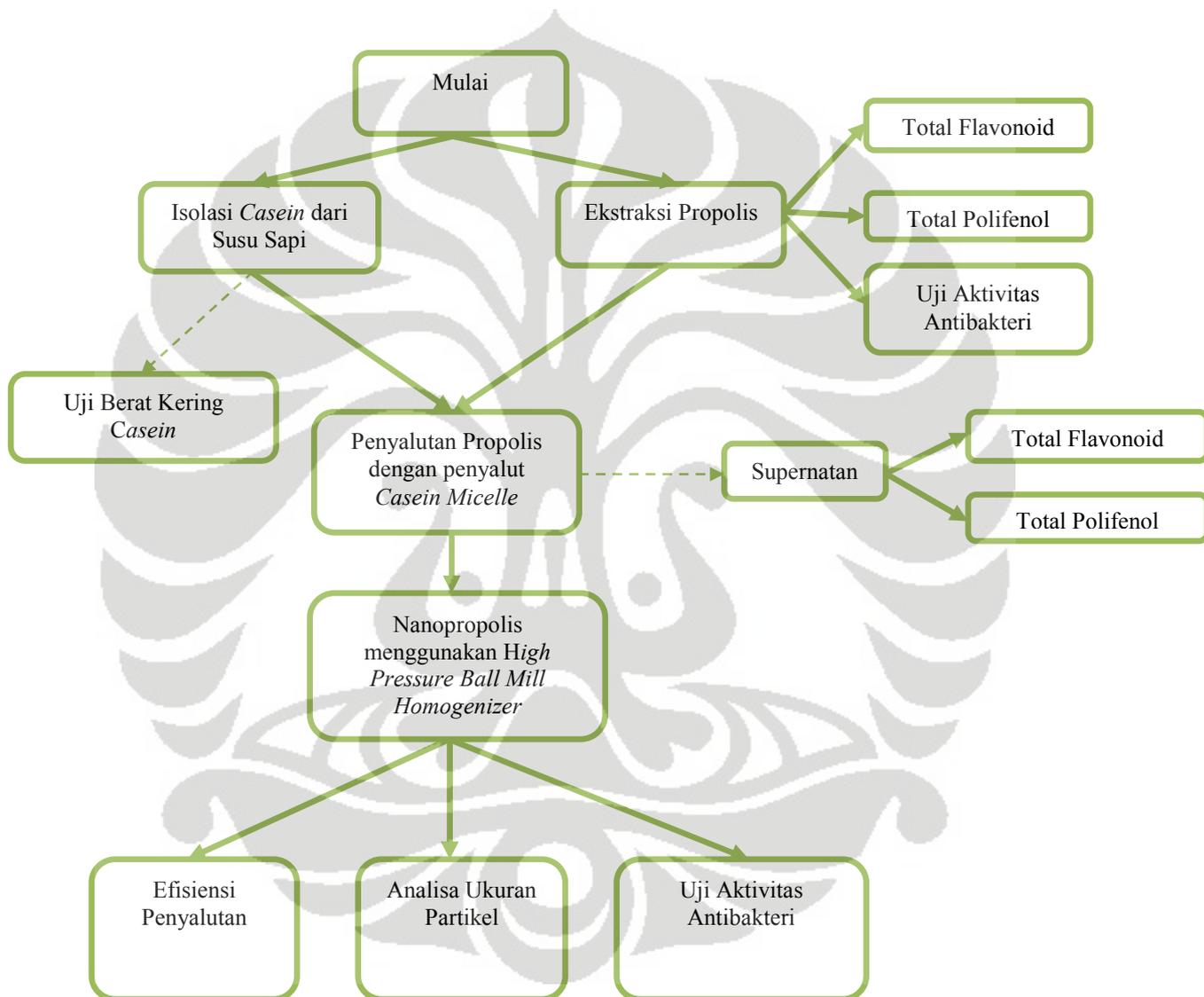
Tabel 2.1. *State of The Art*

		<i>Microencapsulation</i>	Alat Pembuat <i>Nanoencapsulation</i>		
			<i>Non Casein</i>	<i>Casein</i>	
				<i>High Pressure Homogenizer</i>	<i>Sonication</i>
Bahan Inti	Pyrrolnitrin	(Yu and Lee, 1997)			
	Mahkota Dewa				(Pramadewi, 2011)
	Fish Oil		(Jafari <i>et al</i> , 2008)		
	Paclitaxel			(Shapira, 2011)	
	Eudragit polymer		(Wang <i>et al</i> , 2004)		
	Vitamin D			(Semo <i>et al</i> , 2007)	
	Polymeric <i>Nanoparticle</i> (Nisopropylacrylamide)		(Bishst <i>et al</i> , 2007)		
	Propolis	Pramuka			
Cibubur					(Supardi, 2011)

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Diagram alir penelitian ini, ditunjukkan Gambar 3.1



Gambar 3.1. Diagram alir penelitian pembuatan nanopropolis menggunakan *high pressure ball mill homogenizer*.

Tahap awal pada penelitian ini ialah isolasi *casein* dari susu sapi dengan menggunakan rennet kemudian ekstraksi propolis menggunakan pelarut ethanol 96%, kemudian hasil ekstrak ethanol propolis (EEP) dipisahkan dengan lilinnya,

propolis yang didapatkan dianalisa dengan menghitung total kadar flavonoid dan total kadar polifenol. Setelah mendapatkan *casein* dan propolis yang diinginkan, langkah selanjutnya ialah penyalutan propolis dengan *casein*. Pada saat penyalutan menghasilkan supernatan yang akan dianalisa kadar total flavonoid dan kadar total polifenol sehingga bisa didapatkan efisiensi penyalutan. Tahap selanjutnya propolis yang disalut oleh *casein* akan dihancurkan menggunakan alat *High Pressure Ball Mill Homogenizer* sehingga partikel akan berukuran nano. Setelah itu *nanoencapsulated* propolis ini akan dianalisa yakni ukuran partikel dengan menggunakan *Particle Size Analyzer (PSA)*, uji aktivitas antibakteri dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong dan efisiensi penyalutan.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari sampai Juni. Untuk lokasi penelitian dibagi beberapa tempat. Pertama melakukan ekstraksi propolis dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar, Departemen Teknik Kimia, UI. Bagian kedua isolasi *casein*, proses penyalutan propolis menggunakan *casein* dan analisa kadar total flavonoid serta polifenol dilakukan di Laboratorium Bioproses, Lantai 7, Gedung S. Bagian ketiga ialah pembentukan partikel nano, analisa ukuran partikel nano di Laboratorium Nanotech di Serpong. Bagian keempat untuk analisa aktivitas antibakteri dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong.

3.3. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini ialah susu dan propolis. Sampel susu yang digunakan dari toko makanan dan minuman yang sudah dipasteurisasi. Sampel propolis yang digunakan diambil dari “Madu Pramuka” yang merupakan produk isolat lokal dari Indonesia.

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

Pada penelitian pembuatan nanopropolis digunakan alat dan bahan sebagai berikut :

3.4.1. Alat

Alat yang digunakan dalam pengujian ini dapat dilihat pada tabel 3.1.

Tabel 3.1. Alat yang digunakan.

No.	Alat	Kegunaan
1	Kaca arloji	Wadah untuk menimbang
2	<i>Vacuum Filters</i>	Untuk menyaring ekstrak propolis
3	Corong	Alat bantu memasukkan cairan
4	Batang pengaduk	Mengaduk larutan
5	<i>Sentrifuge</i>	Mengendapkan
6	Timbangan	Menimbang propolis dan <i>casein</i>
7	Pipet tetes	Untuk menera labu ukur dan menambahkan pereaksi
8	Pipet volumeterik	Menambahkan suatu larutan dengan volume tertentu
9	Alat distilasi	Pemisahan antara ethanol dan propolis
10	Spektrofotometer UV-Vis	Membaca absorbansi sampel
11	Cawan Petri	Untuk menimbang berat kering <i>casein</i>
12	<i>High Pressure Ball Mill Homogenizer</i>	Untuk membuat partikel berukuran nano
13	Mikropipet	Memindahkan larutan secara kuantitatif
14	<i>Particle Size Analyzer (PSA)</i>	Mengukur Distribusi Ukuran Partikel
15	<i>Cuvette</i>	Sebagai wadah saat dilakukan absorbansi di dalam spektrofotometer
16	Botol Kaca 1000 mL	Untuk wadah ekstraksi propolis
17	Hotplate	Untuk menjaga suhu reaksi
18	Jerigen 2 L	Wadah untuk menampung sampel
19	Labu ukur 50 mL	Wadah untuk membuat larutan
20	Labu ukur 25 mL	Wadah untuk membuat larutan
21	Mortar	Untuk menghancurkan rennet menjadi serbuk
22	Agitator	Untuk mengaduk bahan yang diinginkan

Tabel 3.2. Alat yang digunakan (lanjutan).

No.	Alat	Kegunaan
23	<i>Freezer</i>	Tempat penyimpanan bahan baku propolis
24	Corong Buchner	Menyaring propolis
25	Kulkas	Untuk pendinginan EEP 70% dan menyimpan sampel
26	Saringan Kasa Plastik	Untuk menyaring <i>casein</i>

3.4.2. Bahan

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel 3.3:

Tabel 3.3. Bahan yang digunakan

No	Bahan	Kegunaan
1	Sarang Lebah atau Material Propolis	Sebagai bahan baku propolis
2	Etanol 96%	Digunakan untuk mengekstraksi propolis
5	Buffer Fosfat	Digunakan untuk pereaksi pembuatan nanopropolis
6	Kalsium Klorida (CaCl_2)	Digunakan untuk pereaksi pembuatan nanopropolis
7	Asam Klorida (HCl)	Digunakan untuk mempertahankan pH
8	Natrium Hidroksida (NaOH)	Digunakan untuk menaikkan pH
9	Pereaksi Follin-Ciocalteu	Digunakan untuk analisa total polifenol
10	Natrium Karbonat (Na_2CO_3)	Digunakan untuk pereaksi pada analisa total polifenol dan menaikkan pH ekstrak propolis
11	Asam Galat	Standar Untuk analisa total polifenol
12	Alumunium Klorida (AlCl_3)	Digunakan untuk pereaksi total flavonoid
13	Kalium Asetat (CH_3COOK)	Untuk hidrolisis analisa total flavonoid

Tabel 3.4. Bahan yang digunakan (lanjutan).

No	Bahan	Kegunaan
14	Quercetin	Standar uji untuk analisa total flavonoid
15	Rennet	Untuk pembuatan isolasi <i>casein</i>
16	Susu sapi	Untuk bahan pembuatan <i>casein</i>
17	Aquades	Untuk melarutkan atau mengencerkan sampel
18	Kalium Hidroksida (KOH)	Untuk mengatur pH
19	Methanol	Sebagai pereaksi pada analisa flavonoid

3.5. Variabel Penelitian

3.5.1. Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang dibuat bervariasi dengan besar nilai tertentu. Variabel bebas dalam penelitian ini antara lain jumlah rennet dan konsentrasi.

3.5.2. Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang terjadi akibat adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini antara lain nanopropolis yang terbentuk dan aktivitas antibakteri.

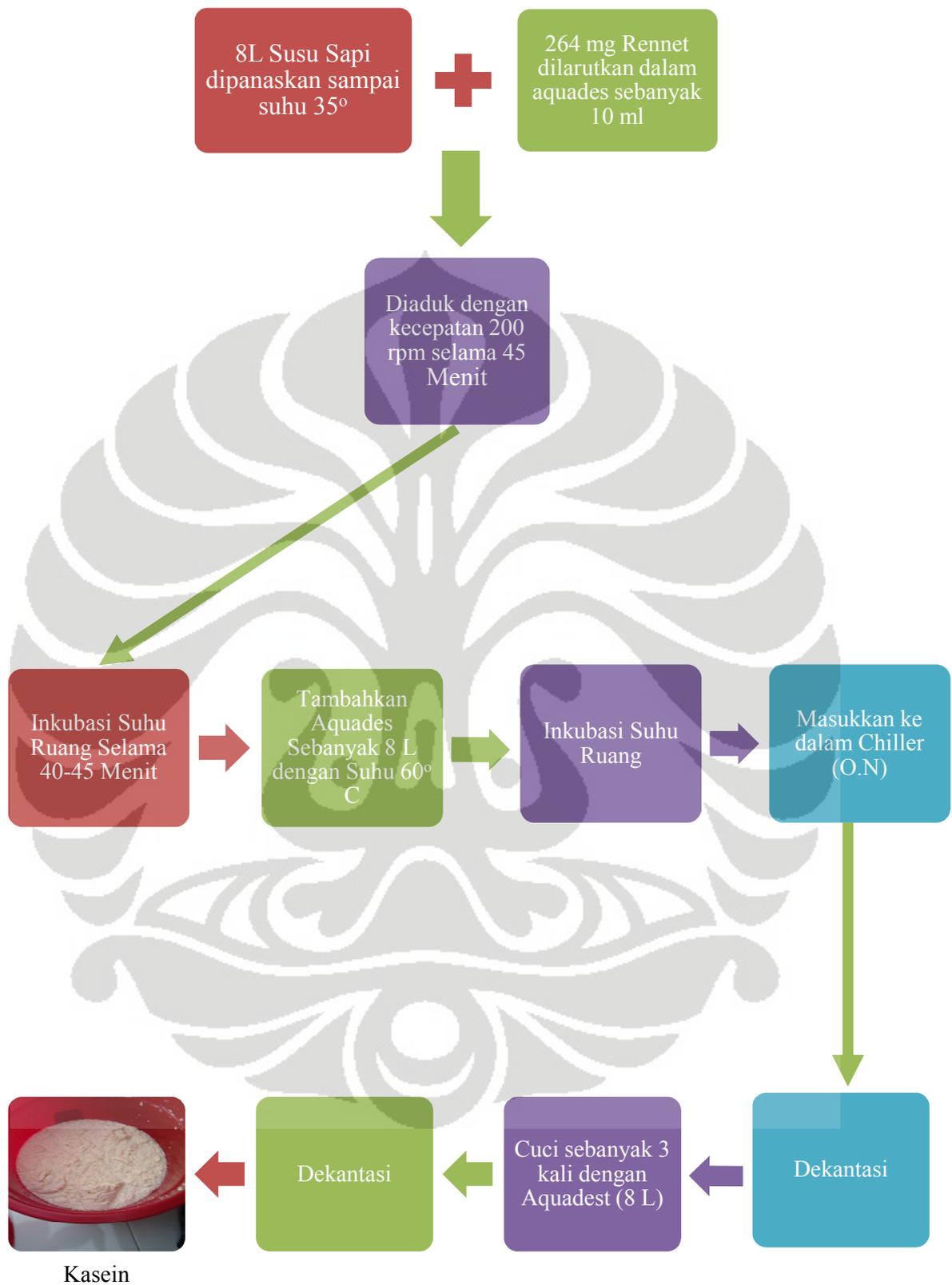
3.5.3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol merupakan variabel yang dikendalikan atau dibuat dalam keadaan konstan. Variabel kontrol dari penelitian ini adalah suhu dan pH.

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Isolasi *Casein* Dari Susu Sapi

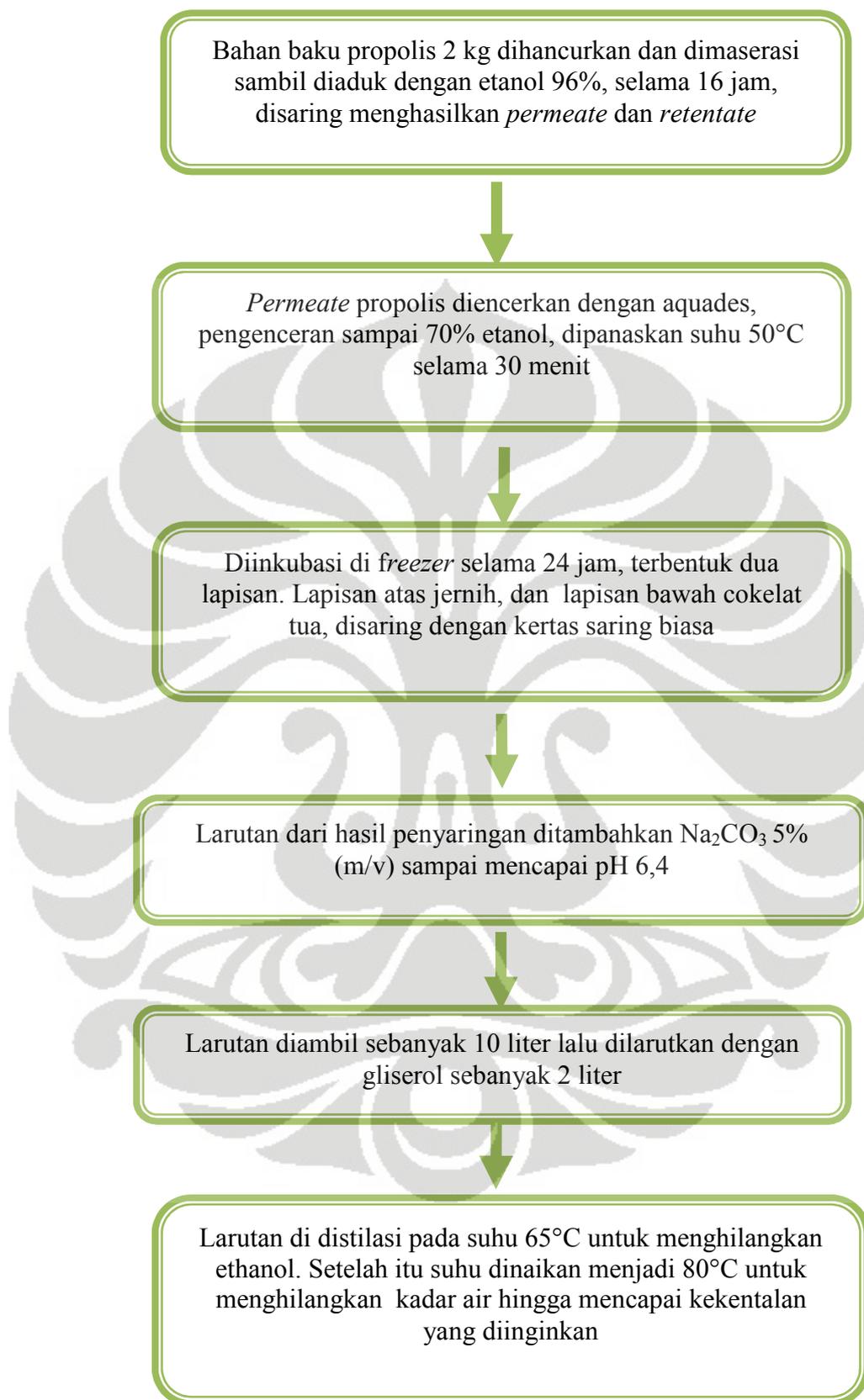
Pada tahap ini bertujuan mendapatkan *casein* dari susu sapi. Sebanyak 8 liter susu sapi yang telah mengalami pasteurisasi dipanaskan hingga suhu 35°C. Ketika susu dipanaskan, rennet ditimbang seberat 264 mg namun rennet harus dihancurkan terlebih dahulu menjadi lebih halus karena awalnya berbentuk tablet. Rennet dilarutkan di dalam aquades sebanyak 10 ml dan tunggu selama 20 menit. Rennet ini berfungsi dapat menggumpalkan *casein* dalam susu. Setelah susu mencapai suhu 35°C, rennet dicampurkan ke dalam susu. Untuk menghasilkan endapan yang maksimal dilakukan pengadukan dengan kecepatan 200 rpm/menit selama 45 menit. Kemudian setelah selesai susu ditambahkan aquades dengan suhu 60°C untuk menonaktifkan *chymosin* (enzim yang dihasilkan rennet) lalu didiamkan selama 30-45 menit, kira-kira mencapai suhu ruangan. Setelah itu susu dimasukkan ke dalam kulkas selama satu malam. Setelah satu malam, susu beserta endapannya yakni *casein* di dekantasi kemudian di cuci dengan aquades sebanyak 3 kali, setiap pencucian digunakan 8 liter aquades lalu di dekantasi lagi sambil disaring. Setelah itu akan didapatkan endapannya yakni *casein*. *Casein* yang didapatkan akan dihitung berat keringnya. *Casein* ditimbang sebesar 1 gram, kemudian dipanaskan di dalam oven dengan suhu 110° C. Setiap 1 jam berat *casein* ditimbang sampai mendapatkan berat yang stabil, maka didapatkan berat kering *casein*.



Gambar 3.2. Diagram Alir Proses Isolasi *Casein* Dari Susu Sapi.

3.6.2. Ekstraksi Propolis

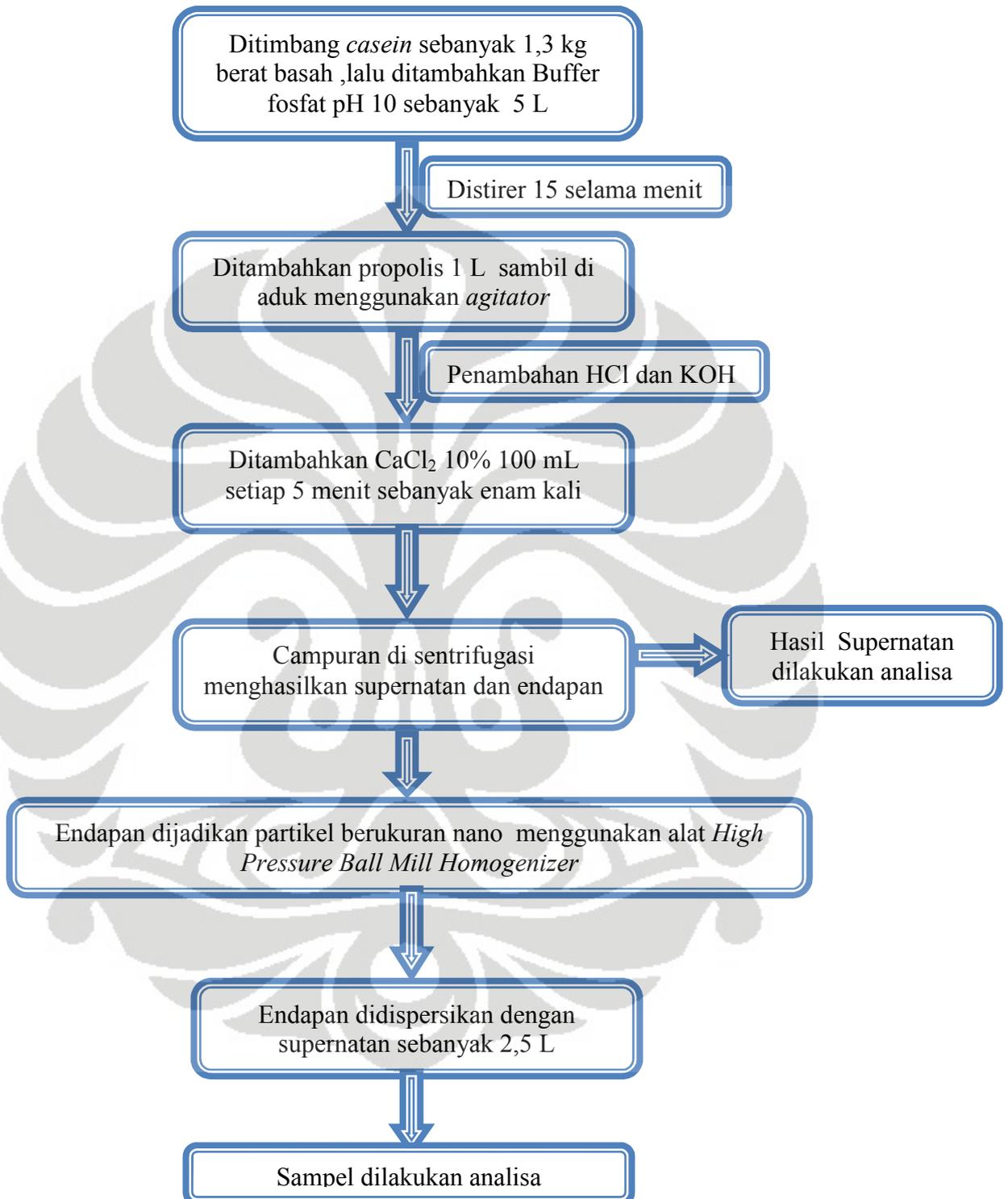
Proses ekstraksi propolis dilakukan pada tahap ini. Sebanyak 2 kg bahan baku propolis ditimbang, kemudian dihancurkan dan ditambah 10 liter etanol 96%. Setelah itu di maserasi sambil di aduk menggunakan *agitator* selama 16 jam. *Permeate* Ekstrak Etanol Propolis 96% (EEP 96%) dan resin yang dihasilkan disaring menggunakan *Vacuum Filters* dengan kertas saring biasa (diameter pori 10 μm). *Permeate* EEP 96% diencerkan hingga 70% dengan cara menambahkan aquades, ketika penambahan terbentuk endapan *wax* propolis. Kemudian EEP 70% dipanaskan pada suhu 50°C selama 30 menit, lalu dibiarkan pada suhu ruang selama 15 menit, kemudian disimpan di dalam *freezer* selama satu malam. Setelah satu malam endapan *wax* diinkubasi pada suhu ruang, sampai larutan menjadi jernih dan terbentuk dua lapisan, lapisan atas yang jernih dan lapisan bawah yang kental (Sahlan & Budiman, 2010). Setelah itu larutan disaring menggunakan *vacuum filter*, lalu pH EEP 70% dinaikkan menjadi 6,4 dengan penambahan Na_2CO_3 . Kemudian diambil sebanyak 10 liter larutan EEP 70% yang telah dinaikkan pH nya lalu dicampurkan 2 liter gliserol, setelah itu larutannya di distilasi pada suhu 65° C hingga diperoleh etanol sebanyak 5 liter. Setelah mendapatkan etanol sebanyak 5 liter suhu dinaikkan menjadi 80° C untuk menghilangkan kandungan air hingga 1-2 liter hingga mencapai kekentalan yang diinginkan.



Gambar 3.3. Diagram alir proses ekstraksi propolis dari bahan baku propolis.

3.6.3. Pembuatan Nanopropolis Menggunakan *High Pressure Ball Mill Homogenizer*

Pada tahap pembuatan nanopropolis ini, pertama-tama yaitu *casein* sebanyak 1,3 kg berat basah ditambahkan larutan buffer posfat pH 10 sebanyak 5 liter, lalu distirer selama 15 menit, kemudian ditambahkan propolis 1 liter, lalu ditambahkan 100 ml CaCl_2 10% setiap 5 menit sebanyak enam kali, selama proses penambahan CaCl_2 pH campuran dijaga pada pH 7 menggunakan HCl 0,1 N atau KOH 0,1 N. Kemudian campuran larutan disentrifugasi menghasilkan supernatan dan endapan, proses ini pada tahap enkapsulasi sebelum dijadikan partikel berukuran nano bisa disebut enkapsulasi dengan *casein micelle* (ePCM). Endapan enkapsulasi propolis yang dihasilkan akan dibuat menjadi partikel berukuran nano dengan cara di hancurkan menggunakan alat *High Pressure Ball Mill Homogenizer* yang dilakukan di Laboratorium Nanotech, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Serpong. Lalu endapan yang sudah jadi merupakan nanopropolis dengan *casein micelle* (NePCM). NePCM kembali didispersikan dengan supernatan yang tadi dihasilkan sebanyak 2,5 liter. Akhirnya pada sampel nanopropolis dan supernatan enkapsulasi dilakukan analisa total polifenol, total flavonoid, ukuran partikel, dan uji aktivitas antibakteri.



Gambar 3.4. Proses Pembuatan Nanopropolis Menggunakan *High Pressure Ball Mill Homogenizer*.

3.6.4. Metode Analisa

Analisa yang akan dilakukan adalah analisa kandungan total flavonoid menggunakan metode aluminium klorida, analisa total polifenol menggunakan metode Follin-Ciocalteu, analisa ukuran partikel menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA), analisa uji aktivitas antibakteri.

3.6.4.1. Analisa Total Flavonoid

Metode aluminium klorida (AlCl_3) (Ghasemi *et al.*, 2009) digunakan untuk penentuan kadar total flavonoid dalam propolis maupun supernatan nanopropolis. Standar yang digunakan adalah quercetin, pertama dibuat kurva kalibrasi untuk quercetin (pada konsentrasi 12,5 ; 25,0 ; 50,0 ; 80,0; dan 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dalam methanol). Sampel EEP dan supernatan nanopropolis dipipet sebanyak 0,5 mL, lalu ditambahkan methanol 1,5 mL, 0,1 mL 10% AlCl_3 (m/v), 0,1 mL 1 M CH_3COOK dan 2,8 mL aquades. Setelah di inkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan, lalu absorbansi sampel dapat di ukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 415 nm.

3.6.4.2. Analisa Total Polifenol

Penentuan kadar total polifenol menggunakan metode Follin-Ciocalteu (McDonald *et al.* 2001). Standar yang digunakan adalah asam galat dengan konsentrasi 0 ; 50 ; 100 ; 150 ; 200; 250 ; $\mu\text{g mL}^{-1}$ dilarutkan dengan methanol : aquades (50:50, v/v). Untuk pengukuran sampel 0,5 mL sampel ditambahkan pereaksi follin sebanyak 5 mL (1:10 dilarutkan dengan aquades) dan 4 mL 1 M Na_2CO_3 , lalu diaduk dan didiamkan selama 15 menit pada suhu ruangan, selanjutnya absorbansinya diukur dengan menggunakan Spektrofotometer pada panjang gelombang 765 nm.

3.6.4.3. Analisa Ukuran Partikel

Pengukuran partikel nano menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA), sampel yang ada didispersikan menggunakan pelarut yang sesuai, lalu akan dilewatkan sinar photon yang berfungsi berinteraksi dengan partikel yang ada, dari intensitas interaksi tersebut akan diterjemahkan kedalam diameter ukuran partikel di dalam display data. Dengan prinsip *Photon Correlation Spectroscopy*,

selama pengukuran partikel terdifusi melewati sel sampel dikarenakan gerak Brown, kemudian sinar laser menyinari partikel. Penyebaran sinar partikel, menciptakan fluktuasi dalam intensitas penyebaran dan dikumpulkan pada sudut yang dipilih selanjutnya diukur dengan detektor sensitif. Alat yang digunakan ialah Delsa™ Nano C. Pengukuran partikel nano ini dilakukan di Laboratorium Nanotech, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Serpong.

3.6.5. Persiapan dan Pengujian Aktivitas Antibakteri

Tahap ini telah dilakukan di Laboratorium LIPI, Cibinong. Sebelum dapat dilakukan pengujian antibakteri propolis dan nanopropolis perlu dilakukan tahap preparasi bakteri uji, media, dan alat-alat steril yang akan digunakan. Sebelumnya semua peralatan dilakukan sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, 1,5 atm selama 15 menit.

3.6.5.1. Pembuatan *Nutrient* Agar dan Cair

Nutrient agar yang digunakan terdiri atas agar 2% dan agar 1%. *Nutrient* agar 2% dibuat dengan komposisi bahan *peptone bacteriological* 2.5 g, *beef extract* 1.5 g, *agar bacteriological* 10 g yang selanjutnya ditambahkan akuades sebanyak 500 ml. *Nutrient* agar 1% dibuat dengan komposisi bahan yang serupa namun dengan jumlah *agar bacteriological* sebanyak 5 g. Sedangkan *nutrient* cair dibuat dengan tidak sama sekali menambahkan *agar bacteriological* ke dalamnya. Semua larutan kemudian dipanaskan hingga mendidih dan terlihat bening yang artinya semua bahan telah terlarut sempurna. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Bibir Erlenmeyer disumbat dengan kapas sumbat lalu ditutup dengan kertas dan plastik dan diikat untuk disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, 1,5 atm selama 15 menit.

3.6.5.2. Penanaman Mikroba Uji ke dalam Cawan Petri

Strain bakteri yang digunakan ialah *Escheria coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*. Strain bakteri yang telah tumbuh di *nutrient* cair diambil sebanyak volume tertentu untuk dipindahkan ke dalam 20 ml *nutrient* agar 1% yang masih berwujud cair dan suhunya sudah tidak terlalu tinggi. Untuk *B. subtilis* diambil sebanyak 0.1 ml volume untuk 100 ml *nutrient* agar 1%, *E. coli* 0.5 ml volume, *S. aureus* 0.1 ml volume. *Nutrient* cair berisikan strain tertentu

yang telah diambil digoyang perlahan untuk meratakan konsentrasi mikroba di dalam media. Ambil sebanyak 4 ml campuran *nutrient* tersebut dengan tip yang steril lalu masukan dalam cawan petri yang sebelumnya telah diisi *nutrient* agar 2%. Cawan Petri digoyang perlahan-lahan agar suspensi bakteri tersebar merata dan didiamkan sampai memadat sehingga menciptakan lapisan agar kedua.

3.6.5.3. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Setelah agar memadat dilakukan pengujian. Ada dua metode yang dilakukan yakni metode difusi cakram dan metode lubang/sumuran. Metode sumuran membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri kemudian lubang diinjeksikan dengan sampel yang akan diuji. Metode difusi cakram dengan menyiapkan kertas cakram berukuran kecil untuk menampung sampel sejumlah 40 μ l. Masing-masing kertas cakram ataupun lubang/sumuran diisi dengan sampel propolis dan nanopropolis. Nanopropolis sebelumnya telah didispersikan dengan supernatan ePCM. Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik *cloramphenicol* 30 μ g/cakram (Samy *et al*, 2006). Cawan Petri didiamkan dalam inkubator selama 24 jam pada temperatur 37° C. Setelah inkubasi, aktivitas antibakteri dapat diamati dengan terbentuknya zona bening di sekeliling kertas cakram sampel.

BAB IV PEMBAHASAN

4.1. Ekstraksi Propolis Dari *Raw Material Propolis*

Pada tahap ekstraksi propolis metode yang digunakan untuk mengekstrak propolis ini adalah metode maserasi. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang digunakan untuk bahan-bahan yang tidak tahan panas. Metode ini merendam bahan dengan pelarut tertentu dan jangka waktu tertentu pada suhu ruangan. Pada penelitian ini pelarut yang digunakan adalah etanol 96% yang bersifat semi polar, sehingga senyawa-senyawa aktif dengan kepolaran berbeda diharapkan dapat terekstrak dengan sempurna. Metode maserasi ini digunakan sambil dilakukan pengadukan (*mixing*) agar senyawa-senyawa aktif terekstrak lebih cepat dan banyak. Setelah dilakukan maserasi, ekstrak etanol propolis 96% (EEP 96%) yang terlihat di Gambar 4.1, menghasilkan *resin* dan lilin (*wax*) juga yang ikut terekstrak yang dianggap masih banyak pengotor dalam ekstrak propolis sehingga perlu dilakukan pemisahan agar didapatkan propolis yang lebih murni tanpa pengotor. Pada pemisahan lilin yang ikut terekstrak dibutuhkan pemisahan yang optimal agar kandungan bioaktif propolis tinggi.

Dalam pemisahan yang optimal antara propolis dengan pengotornya, dilakukan dengan pengenceran menggunakan aquades. Pengenceran yang dilakukan menggunakan aquades sampai konsentrasi etanol 70 % (EEP 70%). Etanol 70% ialah kondisi optimum untuk mengekstrak bioaktif propolis (Sahlan & Budiman, 2010). Tujuan pemisahan ini adalah agar kelarutan *wax* terhadap etanol semakin berkurang sehingga *wax* yang terkandung dalam propolis akan mengendap lalu dipisahkan dengan cara disaring. Setelah itu lapisan bawah yang kental berwarna putih yakni lilin, dipisahkan menggunakan *vacuum filter*. Propolis yang sudah dipisahkan dari *wax* dan *resin* akan dilarutkan dengan gliserol (*food grade*) sebagai pelarut yang aman untuk dikonsumsi manusia. Kemudian propolis mengalami tahap evaporasi untuk menghilangkan kadar etanol dan air. Propolis akan terlihat kental setelah mengalami proses evaporasi karena terdapat gliserol yang menjadi pelarut propolis. Etanol dihilangkan agar aman dikonsumsi oleh manusia. Untuk kadar air sendiri dihilangkan agar propolis lebih

murni dan meningkatkan kualitasnya. Dari proses yang dilakukan, propolis berhasil didapatkan 2 liter dari 2 kg bahan baku yang telah diekstrak. Berikut adalah gambar alat distilasi dan bahan baku propolis yang digunakan:



Gambar 4.1. (a) Ekstrak Etanol Propolis 96% (EEP 96%) dan (b) *Raw Material* Propolis.



Gambar 4.2. Alat Distilasi

4.2. Isolasi *Casein* dari Susu Sapi

Casein yang digunakan berasal dari susu sapi karena menurut Park *et al.* (2007) kandungan *casein* dalam susu sapi lebih besar dibandingkan dengan susu kambing. Kandungan *casein* yang lebih tinggi (2,6%) dibandingkan dengan kandungan dari susu kambing (2,4%) dan manusia (0,4%) selain itu susu sapi lebih mudah didapatkan. Isolasi *casein* diawali dengan mencampurkan susu dan rennet pada suhu 35° C. Hal ini karena enzim bekerja optimal pada suhu 35° - 40° C. Rennet yang dicampurkan sebelumnya dilarutkan terlebih dahulu dengan aquades. Hal ini agar proses pencampuran dapat berlangsung cepat, rennet akan bekerja secara merata sehingga terbentuk endapan. Dalam rennet terdapat enzim *protease* yang bertugas memutuskan ikatan yang ada pada *casein*. Enzim ini ialah enzim *chymosin* yang menghidrolisis ikatan spesifik pada kappa-*casein* susu, sehingga terjadi pemutusan ikatan, pada susu, kappa-*casein* bertindak sebagai stabilizer (Sahu, 2008). Setelah aktivitas ini dirusak oleh *chymosin*, akan terjadi koagulasi sehingga *casein* dapat mengendap dan dapat dipisahkan dengan cara dekantasi dan disaring. Endapan yang dihasilkan disimpan di kulkas dan ditutup rapat, karena mudah diserang bakteri.

Metode ini dilakukan lebih sederhana dalam mengisolasi *casein* sehingga dalam produksi skala yang lebih besar lebih cepat dalam menghasilkan *casein*. *Casein* yang didapat akan diuji berat keringnya. *Casein* yang didapat masih dalam berat basah karena proses tahap akhir yakni dekantasi sambil disaring. Ditimbang 1 gram berat basah kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 110° C. Dilakukan penimbangan setiap 1 jam sekali hingga mendapatkan 3 data berat yang konstan. Maka akan didapatkan berat kering dari *casein* seperti yang dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Hasil pengamatan uji berat kering *casein*.

No	Nama	Massa (gram)	Keterangan
1	Cawan Petri	24,1077	
2	Cawan Petri + <i>Casein</i> (sebelum masuk oven)	25,1097	
3	Cawan Petri + <i>Casein</i> (setelah masuk oven)	24,3713	Pengambilan Data Setiap 1 Jam
		24,3609	
		24,3733	
		24,3722	
		24,3733	
	Rata-Rata (3 Data Terakhir)	24,37293333	

Maka setelah dihitung didapatkan berat kering dari *casein* ialah 0,265 gram. *Casein* seberat 1 gram berat basah = 0,265 gram berat kering. Hal ini berarti berat kering *casein* sebesar 26,5% dari berat basah.

Proses isolasi *casein* didapatkan 1950 gram (berat basah) *casein* dari total 8 liter susu sapi. Banyak total *casein* yang dihasilkan selama proses isolasi juga bergantung pada kualitas rennet yang digunakan, apabila kualitas rennet telah menurun kualitas enzim akan menurun maka *casein* yang dapat dihasilkan menjadi sedikit jumlahnya. Berikut adalah Gambar 4.3 merupakan *casein* dan rennet yang telah digunakan:



(a)



(b)

Gambar 4.3. (a) Rennet dan (b) *Casein*.

4.3. Pembuatan Nanopropolis menggunakan *High Pressure Ball Mill Homogenizer*

Pada proses ini larutan yang digunakan untuk proses penyalutan adalah buffer fosfat, Buffer posfat berfungsi mempertahankan pH dan untuk membentuk kembali jembatan kalsium fosfat, dengan penambahan CaCl_2 secara bertahap agar *casein* dapat menyalut propolis. Pada saat penambahan CaCl_2 pH juga dijaga dengan menambahkan larutan HCl 0,1 M, KOH 0,1 M. Propolis yang digunakan dalam proses penyalutan adalah propolis dengan pelarut gliserol (*food grade*). Setelah proses penyalutan antara *casein* dengan propolis, selanjutnya untuk memperkecil ukuran menjadi partikel nano digunakan alat *High Pressure Ball Mill Homogenizer*. Sampel akan hancur dengan cara digiling terlebih dahulu, kemudian dengan tekanan yang tinggi partikel di dorong dan menabrak cincin yang ada di alat itu, sehingga partikel menjadi berukuran nano dan terdistribusi merata. Dalam pembuatan skala besar alat ini cocok digunakan karena dalam 1 kali penggunaannya mencapai 1 kg sampel yang dapat dijadikan nano partikel.



Gambar 4.4. Hasil Penyalutan: (a) Sampel Enkapsulasi Propolis menggunakan *Casein Micelle* (ePCM), (b) Sampel Nanopropolis dengan *Casein Micelle* (NePCM)

Pada penelitian yang dilakukan Semo *et al.* (2007), proses membentuk ukuran nano yang digunakan adalah proses sentrifugasi bertekanan tinggi. Pada penelitian kali ini, dilakukan menggunakan *High Pressure Ball Mill Homogenizer* dan hasilnya tidak mempengaruhi aktivitas dari produk yang dihasilkan.

4.3.1. Efisiensi Penyalutan Propolis

Analisa pertama yang dilakukan adalah analisa spektrofotometri dengan mengetahui kandungan zat aktif (total polifenol & total flavonoid) pada propolis dan produk penyalutan. Pada proses penyalutan hingga menjadi partikel yang berukuran nano, produk yang didapatkan memiliki ukuran partikel yang berbeda-beda (Supardi, 2011). Pada saat ingin dijadikan partikel yang berukuran nano, ePCM terlebih dahulu dipisahkan antara endapan dengan *supernatant*. Hal inilah yang dapat kita bandingkan hasil analisa propolis dan *supernatant*, untuk mengetahui efisiensi penyalutan.

4.3.1.1. Hasil Uji Spektrofotometri

Pengujian spektrofotometri yang dilakukan menggunakan dua parameter analisa, yaitu kadar polifenol dan kadar flavonoid. Metode yang digunakan untuk mengukur polifenol adalah metode follin-ciocalteau, dimana sampel bila ada senyawa polifenol akan memberikan warna biru setelah penambahan pereaksi follin, lalu absorbansinya diukur dengan spektrofotometer, hasil yang didapat dibandingkan dengan standar uji yang digunakan, yaitu asam galat.

Untuk analisa flavonoid menggunakan metode aluminium klorida (AlCl_3), dimana sampel bila ada senyawa flavonoid akan memberikan warna kuning kehijauan setelah penambahan AlCl_3 , hasil yang didapat dibandingkan dengan standar ujinya yaitu quercetin

Tabel 4.2. Hasil Analisa Spektrofotometri.

No	Sampel	Kadar Flavonoid (μg)	Kadar Polifenol (μg)
1	Propolis	2.028.571,4	1.406.667
2	<i>Supernatant</i> ePCM	107.142,8	10.633.333
Efisiensi Penyalutan		94,71%	0%

Dari tabel 4.2, bisa dilihat kadar total flavonoid dari propolis sebesar 2.028.571,4 μg dan kadar total flavonoid *supernatant* ePCM sebesar 107.142,8 μg . Dari hasil ini dapat dihitung efisiensinya.

Perhitungan efisiensi penyalutan propolis dihitung dari sebelum penyalutan dengan sesudah penyalutan, dengan cara membagi kadar zat aktif pada propolis kemudian dikurang kadar zat aktif pada *supernatant* ePCM kemudian hasil dari pengurangan dibagi lagi dengan kadar zat aktif pada propolis, sehingga didapat persentase penyalutan propolis oleh *casein micelle*. Dari hasil percobaan, efisiensi penyalutan terhadap senyawa flavonoid sebesar 94,71%. Untuk senyawa polifenol tidak terjadi penyalutan dikarenakan *casein* sudah menyalut atau menyelimuti senyawa flavonoid secara maksimal sehingga senyawa polifenol tidak lagi ada ruang untuk disalut *casein*.

Menurut Chen *et al.* (2006), efisiensi penyalutan yang baik minimal 80%, karena menunjukkan proses yang dilakukan tidak menghilangkan zat aktif yang ada. Pada penelitian Semo *et al.* (2007) didapatkan efisiensi 85% dengan penyalut *casein micelle* untuk menyalut senyawa tunggal yaitu vitamin D2. Pada penelitian sebelumnya yakni Supardi (2011) didapatkan efisiensi 93,9% menggunakan penyalut *casein micelle* dengan bahan aktifnya propolis cibubur. Supardi (2011) juga mendapatkan kadar senyawa flavonoid dari propolis cibubur sebesar 1846,15 ppm sedangkan hasil penelitian saya kadar senyawa flavonoid dari propolis yang bahan bakunya berasal dari “Madu Pramuka” memiliki kadar sebesar 2028,57 ppm. Penelitian ini sangat baik karena mendapatkan kadar senyawa flavonoid dan efisiensi penyalutan bioaktif flavonoid yang tinggi melebihi penelitian sebelumnya.

4.4 Analisa Ukuran Partikel

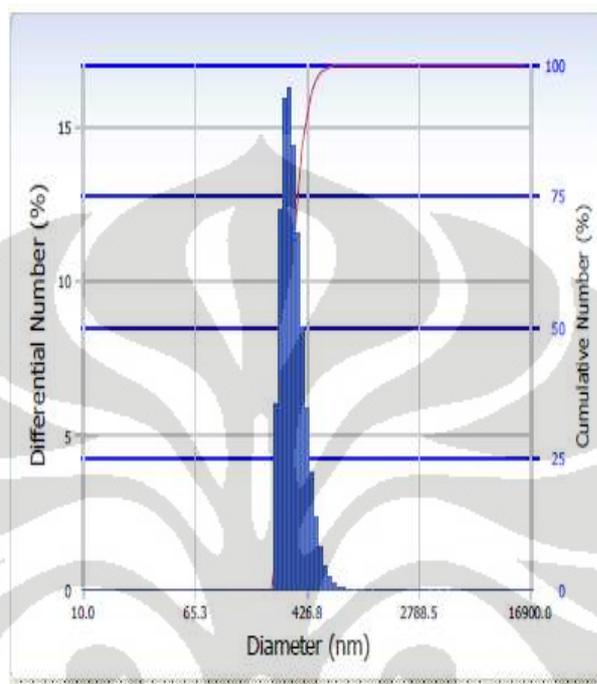
Pengukuran partikel nano menggunakan alat *particle size analyzer (PSA)*. Pengukuran partikel dilakukan untuk melihat ukuran partikel dari nanopropolis dengan penyalut *casein micelle*. Pengukuran dilakukan pada larutan produk akhir yaitu nanopropolis atau *nanoencapsulated* propolis yang merupakan endapan hasil sentrifugasi yang kemudian dibuat ukuran partikelnya menjadi ukuran nano menggunakan *high pressure ball mill homogenizer*. Pada pengujian distribusi partikel ini diharapkan hasil partikel yang terbentuk berukuran nano. Pentingnya didapatkan hasil berupa partikel nano dikarenakan dengan produk berukuran nano, proses pengantaran obat menjadi lebih maksimal dan selektif pada area spesifik dalam tubuh serta meminimalisasikan terjadinya efek samping (Chen et al., 2006).

Dari hasil pengukuran partikel menggunakan PSA, pada sampel nanopropolis dilakukan dua kali pengukuran. Pada pengukuran pertama sampel memiliki diameter rata-rata 75,7 nm, terbesar 86,3 nm dan terkecil 68,9 nm sedangkan untuk pengukuran yang kedua memiliki diameter rata-rata 83,9 nm, terbesar 94,1 nm dan terkecil 72 nm. Berdasarkan hasil tersebut, untuk menghasilkan produk nanopartikel (<1000 nm) (Mohanraj & Chen, 2006). Ukuran partikel nano juga berpengaruh untuk *delivery-system* bila NePCM dapat dikembangkan untuk desain produk seperti suplemen dan lainnya yang dikonsumsi oleh tubuh, hal ini sangat menguntungkan karena mudah diserap.

Untuk meyakinkan lagi bahwa partikel ini berukuran nano sebaiknya dilakukan analisa SEM (*Scanning Electron Microscope*) atau TEM (*Transmission electron microscopy*) namun karena masih terkendala dengan alatnya yang belum terdapat di Indonesia, analisa ini tidak dapat dilakukan.

Pada penelitian sebelumnya Supardi (2011) ukuran partikel yang di dapat 316,1 nm. Partikel untuk ukuran ini masih cukup besar dibandingkan dengan hasil yang saya dapatkan. Proses pembuatan partikel pada penelitian Supardi (2011) ialah sonikasi. Teknik ini menggunakan alat *sonicator* yang membuat partikel berukuran nano karena gelombang ultrasonik. Penelitian saya jauh lebih kecil dalam ukuran partikel nano sehingga menurut Sjaikhurrisal (2010) suatu bahan partikel yang memiliki ukuran semakin kecil (nanometer) akan semakin mudah

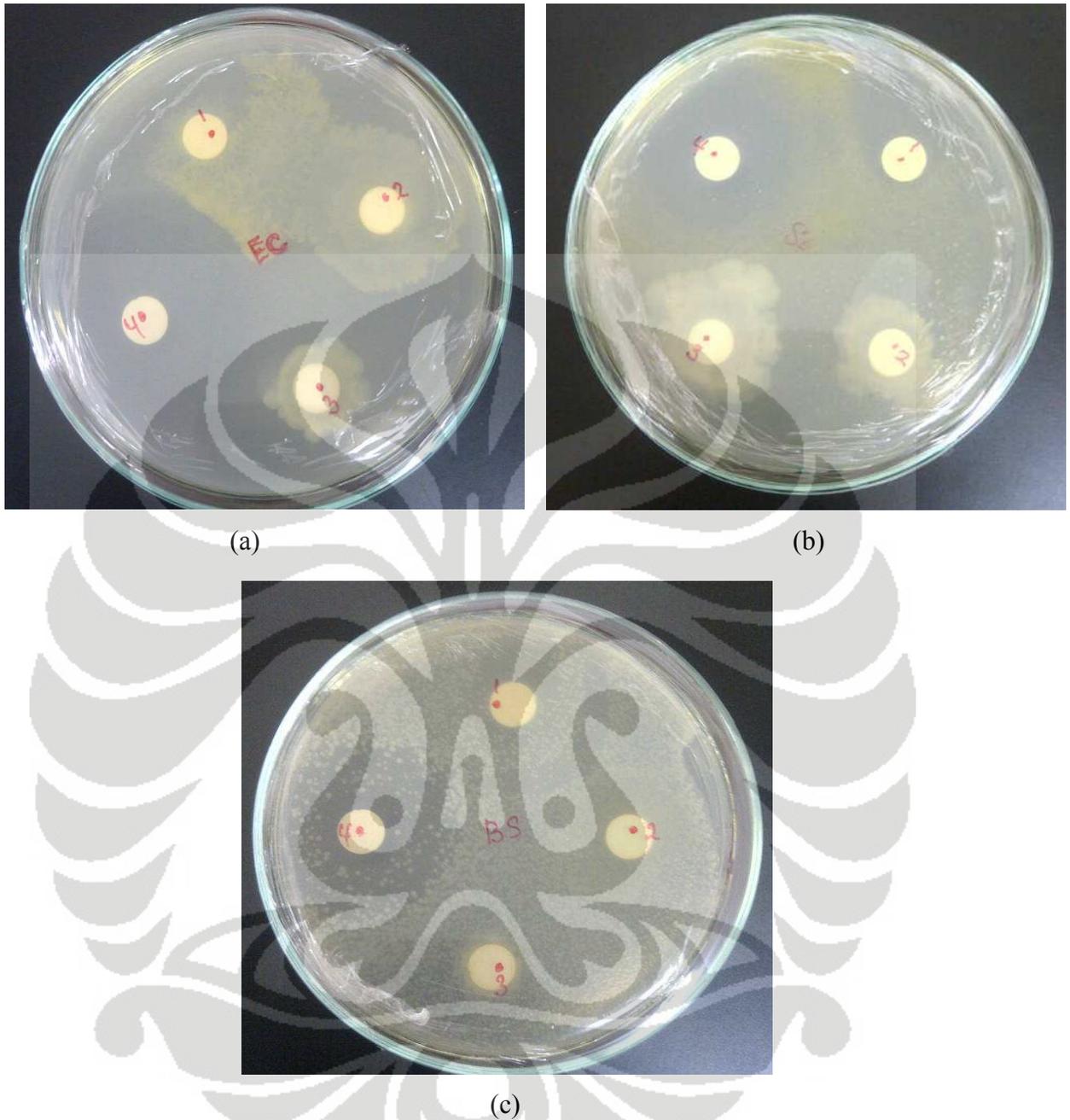
diserap oleh tubuh. Alat *high pressure ball mill homogenizer* membuktikan ukuran partikel yang dihasilkan lebih kecil. Berikut adalah Gambar 4.5 dari hasil *Particle Size Analyzer* pada penelitian Supardi (2011):



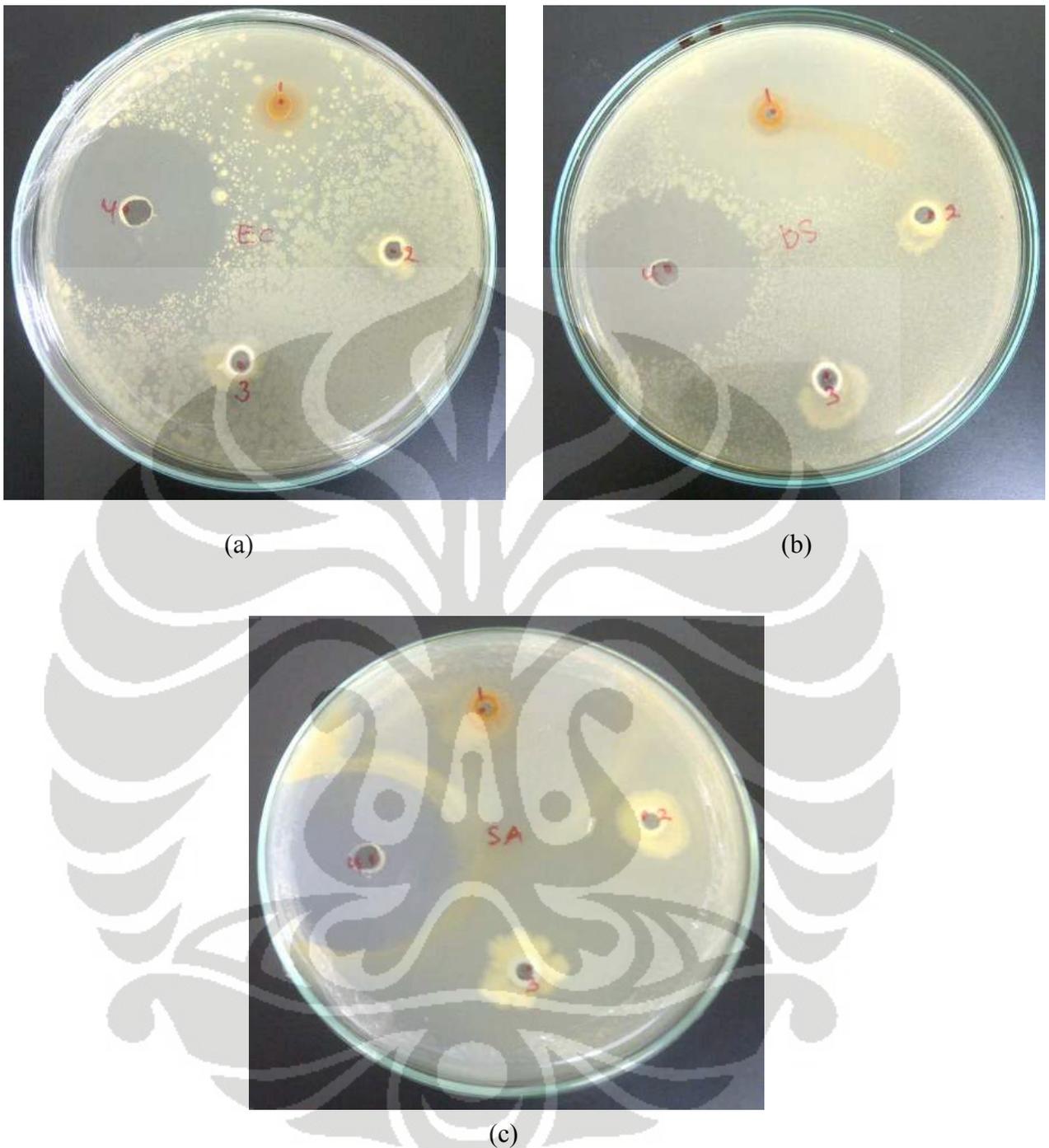
Gambar 4.5. Hasil pengukuran partikel menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) pada sampel nanopropolis. (Supardi, 2011)

4.5 Analisa Aktivitas Antibakteri

Penentuan sifat antibakterial sampel propolis dan nanopropolis dilakukan dengan metode difusi cakram dan metode lubang/sumuran terhadap bakteri gram positif *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Konsentrasi sampel disesuaikan dengan konsentrasi propolis yang diperoleh untuk kapasitas cakram 40 μ l. Sebagai kontrol positif digunakan antibiotik *chloramphenicol* dengan dosis 30 μ g/cakram atau lubang. Pengujian yang dilakukan adalah sebatas uji kualitatif terbentuk tidaknya zona hambat di sekeliling kertas cakram atau sumuran yang telah ditetesi sampel setelah itu diinkubasi selama 24 jam. Pengujian ini dilakukan sebanyak triplo (n=3) untuk masing-masing jenis bakteri uji. Berikut adalah hasilnya:



Gambar 4.6. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Propolis, *casein* dan nanopropolis dengan metode difusi cakram. Propolis (1), *Casein* (2), Nanopropolis (3) Kontrol Positif (4) *Chloramphenicol* 30 μ g/cakram. (a) *Escherichia coli*, (b) *Staphylococcus aureus*. (c) *Bacillus subtilis*.



Gambar 4.7. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Propolis, *casein* dan nanopropolis dengan metode lubang/sumuran. Propolis (1), *Casein* (2), Nanopropolis (3) Kontrol Positif (4) *Chloramphenicol* 30 μ g/lubang. (a) *Escherichia coli*, (b) *Bacillus subtilis* (c) *Staphylococcus aureus*.

Pada uji antibakteri menggunakan metode lubang/sumuran ini diketahui bahwa pada sampel propolis terjadi hambatan terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* maupun bakteri *Staphylococcus aureus* walaupun zona hambat yang terlihat masih kecil. Hal ini menunjukkan propolis yang bahan bakunya berasal dari “Madu Pramuka” memiliki aktivitas antibakteri terhadap ketiga bakteri ini. Pada metode difusi cakram sampel propolis pun terjadi hambatan dari ketiga bakteri tersebut, walaupun zona hambat yang terlihat masih kecil pula sedangkan untuk *casein* dan nanopropolis pada kedua metode tidak terlihat aktivitas antibakteri dari bakteri gram positif yang diujikan. Pada sampel *casein* sendiri terlihat tidak ada zona hambat hal ini menunjukkan *casein* tidak ada aktivitas antibakteri. Pada nanopropolis pun juga seperti itu tidak terjadi hambatan, dikarenakan zat aktif yang terdapat di dalamnya masih terselubungi/terjebak dengan *casein micelle* sehingga bahan aktif propolis tidak memiliki aktivitas dalam menghambat bakteri yang diujikan. Melihat hasil nanopropolis dapat disimpulkan bahwa nanopropolis baik ketika di konsumsi. *Casein* yang bersifat sebagai *carrier* atau pembawa dapat melindungi hingga mencapai usus halus. Nanopropolis yang tersalut oleh *casein* akan mencapai usus halus terlebih dahulu. Zat aktif yang terkandung di dalam propolis tidak menyebar dalam perjalanan menuju ke usus halus sehingga zat aktif propolis akan terserap ketika mencapai disana.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

- Propolis dapat dibuat menjadi Nanopropolis dengan penyalut *casein micelle*.
- Efisiensi penyalutan propolis oleh *casein micelle* untuk senyawa flavonoid 94,71 %.
- Kapasitas senyawa flavonoid yang tersalut di dalam *casein* sebesar 5576,95 µg per 1 gram berat kering *casein*.
- Propolis menunjukkan indikasi adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus*.
- Pengukuran partikel nanopropolis memiliki diameter rata-rata 75,7 nm, dan pengukuran partikel yang kedua memiliki diameter rata-rata 83,9 nm.

Saran

- Dibutuhkan pengujian lanjutan untuk meyakinkan kualitas nanopropolis yang dihasilkan yaitu pengujian persentase *release* zat aktif di dalam tubuh.

DAFTAR PUSTAKA

- Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother. Res.* 15, 561–571.
- Beckman Coulter I. 2008. Delsa Nano Series. Retrieved Juni 22, 2012, from <http://www.dafratec.com/pdf/catalogo_DelsaNano.pdf>
- Bisht S, Feldmann G, Soni S, Ravi R, Karikar C, Maitra A. 2007. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *J Nanobiotechnology* 5: 3.
- Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, Ialenti A. 2002. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* 73 Suppl 1: S53-63.
- Burdock GA. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem. Toxicol.* 36, 347–363.
- Chang TMS, D'Agnillo F, Yu WP, Razack S. 2000. Two future generations of blood substitutes based on polyhemoglobin–SOD–catalase and nanoencapsulation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 40: 213-218.
- Chen L, Remondetto GE and Subirade M. 2006. Food Protein-based materials as nutraceutical delivery system. *Trends in food Science & technology* 17. Pp. 272-283.
- Demestre M, Messerli SM, Celli N, Shahhossini M, Kluwe L, Mautner V, Maruta H. 2009. CAPE (caffeic acid phenethyl ester)-based propolis extract (Bio 30) suppresses the growth of human neurofibromatosis (NF) tumor xenografts in mice. *Phytother Res* 23: 226-230.
- Edlich R, Winters KL, Lim HW, Cox MJ, Becker DG, Horowitz JH, Nichter LS, Britt LD, Long III WB. 2004. Photoprotection by Sunscreens with Topical Antioxidants and Systemic Antioxidants to Reduce Sun Exposure. 14: 24
- Fathi M, Mozafari MR, Mohebbi M. 2012. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology* 23: 13-27.
- Fessenden & Fessenden. 1982. *Kimia Organik edisi ketiga* terjemahan Aloysius Hadyana Pudjaatmaka. Erlangga. Hal 436-438
- Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA. 2009. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak J Pharm Sci* 22: 277-281.

Gonzalez M, Bernardo G, Roxana R, Elida R, Maria M. Spectrophotometric Determination of Phenolic Compounds in Propolis. *Argentine. Lat. Am. J. Pharm* 22(3) (2003) Pp 243-247.

Gouin S. 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology* 15: 330-347.

Gregoris E, Stevanato R. 2010. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. *Food Chem Toxicol* 48: 76-82.

Häkkinen S. 2000. Flavonols and phenolic acids in berries and berry products. *Kuopio University Publications D. Medical Sciences* 221. 90 p.

Hamada S. Iratani S. Miyake T. 1996. Purified propolis-extract, and its preparation and uses. Patent No. 5,529,779, CUS class 424539

Hudnall M. 2007. Compositition Containing Fractionated Bee Propolis. *United State Patens* 7.294.351 B2.

Huleihel M, Isanu V. 2002. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. *Isr Med Assoc J* 4: 923-927.

Jafari SM, Assadpoor E, Bhandari B, He Y. 2008. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Research International* 41: 172-183.

Kanazawa K. 2010. Casein nanoparticles. Patent No. 20100143424, USPC class 424401.

Khalil ML. 2006. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev* 7: 22-31.

Kunz C, Lonnerdal B. 1990. Human-milk proteins: analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods. *Am J Clin Nutr* 51: 37-46.

Kusmayati dan Agustini, NWR. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga (*Porphyridium cruentum*). *Biodiversitas*. 8(1) : 48-53.

Lasmayanty M. 2007. Biological activity of bee propolis in health and disease. (Skripsi). Program Studi Biokimia FMIPA IPB.

Lotfy M. 2006. Biological Activity of Bee propolis in Health and Disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 7 .Pp 22-31

Lucey JA. 2002. ADSA Foundation Scholar Award Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. *J. Dairy Sci.* 85:281-294

Madene A, Jacquot M, Scher J, Desobry S. 2006. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science & Technology* 41: 1-21.

Marcucci MC. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26, 83–99.

Mc Donald S, Prenzler PD, Antolovich M, Robards K. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry* 73: 73-84.

Mirzoeva OK, Calder PC. 1996. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 55: 441-449.

Mohanraj VJ and Chen Y. 2006. Nanoparticle-A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5 .Pp 561-573.

Nichols JA, Katiyar SK. 2010. Skin photoprotection by natural polyphenols: antiinflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch. Dermatol. Res.* 302, 71–83, *Nutr. Rev.* 56, 317–333.

Park YW, Juarez M, Ramos M & Haenlein GFW. 2007. Physicochemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, Vol. 68, pp. 88-113.

Pramadewi I. 2012. Pembuatan Nanofood Mahkota Dewa Menggunakan Penyalut Casein Micelle. Depok: Universitas Indonesia., pp. 1-42.

Raso GM, Meli R, Di Carlo G, Pacilio M, Di Carlo R. 2001. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sciences* 68: 921-931.

Sabir A, Tabbu CR, Agustiono P, Sosroseno W. 2005. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. *J Oral Sci* 47: 135-138.

Sahlan M & Budiman AW. 2010. Simple Extraction Method of Bioactive Indonesian Propolis for Functional Cosmetics. Proceeding 25-26 November 2010. International Seminar on Cosmetics, Recent Development in Cosmetics.

Sahu A, Kasoju N and Bora U. 2008. Fluorescence Study of the Curcumin – Casein Micelle Complexation and Its Application as a Drug Nanocarrier to Cancer Cells. *Biomacromolecules* Vol.9. Pp 2905-2912

Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. 2005. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2: 33-38.

Samy RP, Pachiappan A, Gopalakrishnakone P, Thwin MM, Hian YE, Chow VT. 2006. In Vitro Antimicrobial Activity of Natural Toxins and Animal Venoms. *BMC Infectious Diseases*. 6:100.

Semo, Efrat, Ellina Kesselman, Dganit Danino, Yoav D. Livney. 2007. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals, *Food Hydrocolloids* 21, pp. 936-942.

Serkedjieva J, Manolova N, Bankova V. 1997. Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acid). *J Nat Prod*, **55**, 294-302.

Shapira A, Davidson I, Avni N, Assaraf YG, Livney YD. 2012. beta-Casein nanoparticle-based oral drug delivery system for potential treatment of gastric carcinoma: stability, target-activated release and cytotoxicity. *Eur J Pharm Biopharm* 80: 298-305.

Sjaikhurrizal, Agustus 2010. *Manfaat Dampak Positif Teknologi Nano Bagi Dunia Kedokteran Farmasi dan Obat*. Peneliti Pusat Teknologi Farmasi dan Media, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. Pameran Ritech Expo 2010, Jakarta Convention Center.

Supardi, Tony. 2011. Pembuatan Nanofood Propolis Menggunakan Penyalut Casein Micelle. Depok: Universitas Indonesia., pp. 15-45.

Suranto A. 2007. *Terapi Madu*. Penerbit Penebar Swadaya, Jakarta.

Szliszka E, Czuba ZP, Domino M, Mazur B, Zydowicz G, Krol W. 2009. Ethanolic extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in cancer cells. *Molecules* 14: 738-754.

Volpi N, Bergonzini G. 2006. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 42: 354-361.

Walstra P. 1979. The voluminosity of bovine casein micelles and some of its implications. *J. Dairy Res.* 46:317-322.

Walstra P. 1999. Casein sub-micelles: do they exist? *Int. Dairy J.*, 9: 189-192.

Wang Y, Dave RN, Pfeffer R. 2004. Polymer coating/encapsulation of nanoparticles using a supercritical anti-solvent process. *The Journal of Supercritical Fluids* 28: 85-99.

Wuisan C. 2007. Penentuan Aktivitas Antioksidan dan Rimpang Segar dan Rimpang Bubuk Dengan Uji Kadar Polifenol dan Active Oxygen Method (AOM). FTP IPB. Hal 12-13

Yaldagard M, Mortazavi SA and Tabatabaie F. 2008. The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review

of microbiological and quality aspects, *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (16), pp. 2739–2767.

Yu JY, Lee WC. 1997. Microencapsulation of pyrrolnitrin from *Pseudomonas cepacia* using gluten and casein. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84: 444-448.

Yuliati T. 2009. Uji Sitotoksik Serbuk Propolis dan Madu Propolis terhadap Sel Kanker Rahim dan Payudara. *Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu*. Yogyakarta. Universitas gajah Mada.



LAMPIRAN A

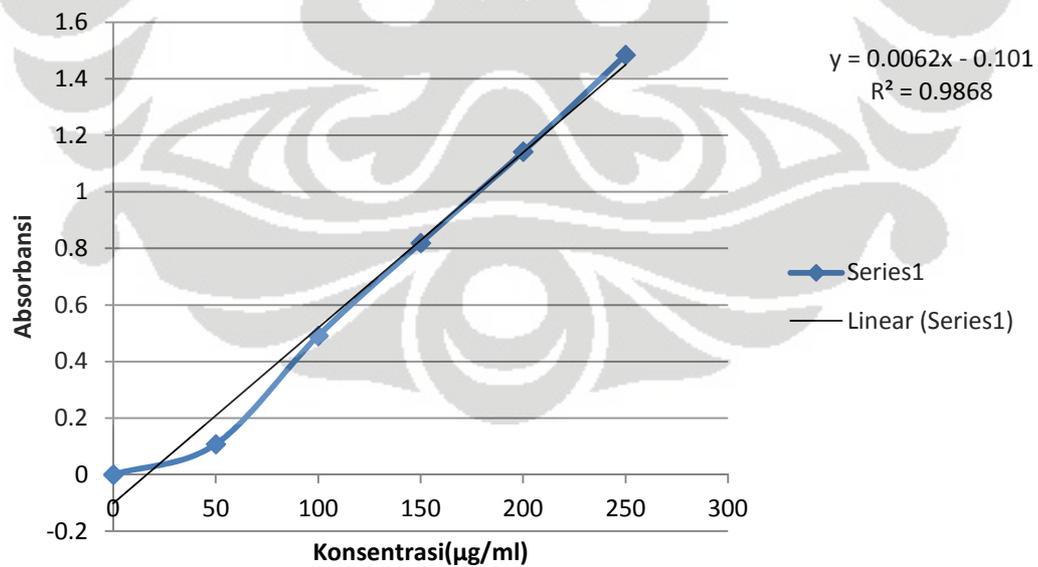
Penentuan Kadar Polifenol

Standar uji yang digunakan adalah Asam Galat

Tabel absorbansi standar uji

Konsentrasi Standar ($\mu\text{g/mL}$)	Abs _{765 nm}
0	0
25	0,108
50	0,491
100	0,819
150	1,142
200	1,484

Kurva Standar Polifenol



Nama Sampel	Abs_{765nm}	Konsentrasi Total Polifenol (µg/mL)	Volume akhir larutan (ml)	Kadar Total Polifenol (µg)
Propolis	0,743	1406,67	1000	1.406.000
<i>Supernatant</i> ePCM	0,537	1063,33	10.000	38.157.800

Perhitungan konsentrasi total polifenol : $y = 0,006x - 0,101$

y = Absorbansi Sampel

x = Konsentrasi Sampel

Dengan memasukkan nilai absorbansi sampel pada persamaan linier yang didapat dari standar uji, maka didapatkan konsentrasi sampel. Untuk mengetahui kadar polifenol suatu larutan, maka konsentrasi dikalikan dengan volume akhir larutan

LAMPIRAN B

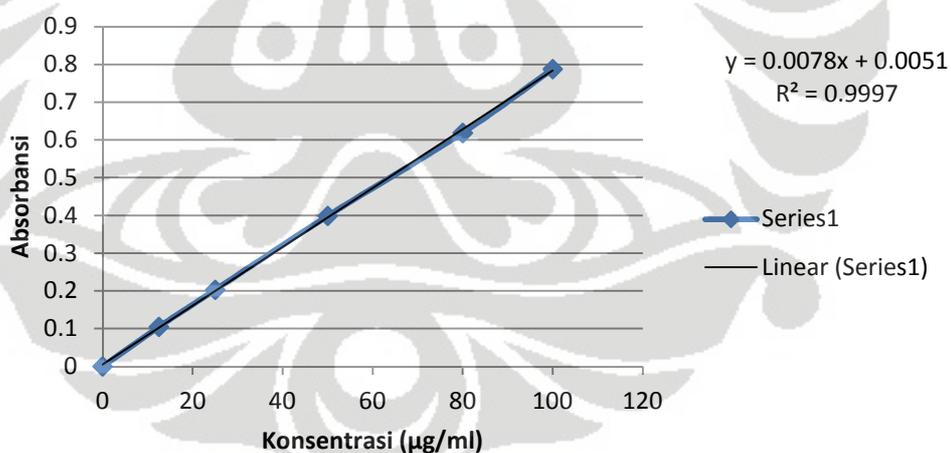
Penentuan Kadar Flavonoid

Standar uji yang digunakan adalah Quercetin

Tabel absorbansi standar uji

Konsentrasi Standar ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi _{415nm}
0	0
25	0,105
50	0,203
100	0,399
150	0,619
200	0,788

Kurva Standar Flavonoid



Sampel	Abs _{415nm}	Konsentrasi Total Flavonoid ($\mu\text{g/mL}$)	Vol Akhir Larutan (mL)	Kadar Total Flavonoid (μg)
Propolis	0,289	2028,57	1000	2.028.570
Casein	0.021	10,714	10.000	107.140

Contoh Perhitungan konsentrasi total flavonoid :

$$y = 0,007 x + 0,005$$

y = Absorbansi Sampel

x = Konsentrasi Sampel

Dengan memasukkan nilai absorbansi sampel pada persamaan linier yang didapat dari standar uji, maka didapatkan konsentrasi sampel. Untuk mengetahui kadar total flavonoid suatu larutan, maka konsentrasi dikalikan dengan volume akhir larutan.



LAMPIRAN C
Perhitungan Berat Kering *Casein*

No	Nama	Massa (gram)	Keterangan
1	Cawan Petri	24,1077	
2	Cawan Petri + <i>Casein</i> (sebelum masuk oven)	25,1097	
3	Cawan Petri + <i>Casein</i> (setelah masuk oven)	24,3713	Pengambilan Data Setiap 1 Jam
		24,3609	
		24,3733	
		24,3722	
		24,3733	
	Rata-Rata (3 Data Terakhir)	24,37293333	

Berat kering *casein* = $24,1077 - 24,373 = 0,2653 \sim 0,265$ gram

LAMPIRAN D

Hasil Pengukuran Partikel Menggunakan Alat *Particle Size Analyzer* (PSA)Sampel Nanopropolis dengan penyalut *casein micelle***REPORT OF ANALYSIS**

Report No. : 004/KRT-NTIV/2012 Date: 04/05/2012
 Client : Mr. Dr. Muhammad Sahlan/Darul
 Institution : University of Indonesia
 Name of sample : Nano Encapsulation Propolis
 Description of sample : Type : Emulsion
 Colour : White Milk
 Sample received on : 02/05/2012
 Date of Analysis : 04/05/2012
 Type of Analysis : Particle Size Analyzer

RESULT

No.	Sample	Run	Polydispersity Index	Size average (nm)	Method
1.	Propolis I	1	0.401	68.9 ± 19.2	PCS
		2	0.357	86.3 ± 24.3	
		3	0.399	71.9 ± 19.5	
2.	Propolis II	1	0.399	94.1 ± 26.1	PCS
		2	0.398	72.0 ± 19.4	
		3	0.377	85.7 ± 24.0	

Chief Inspector :

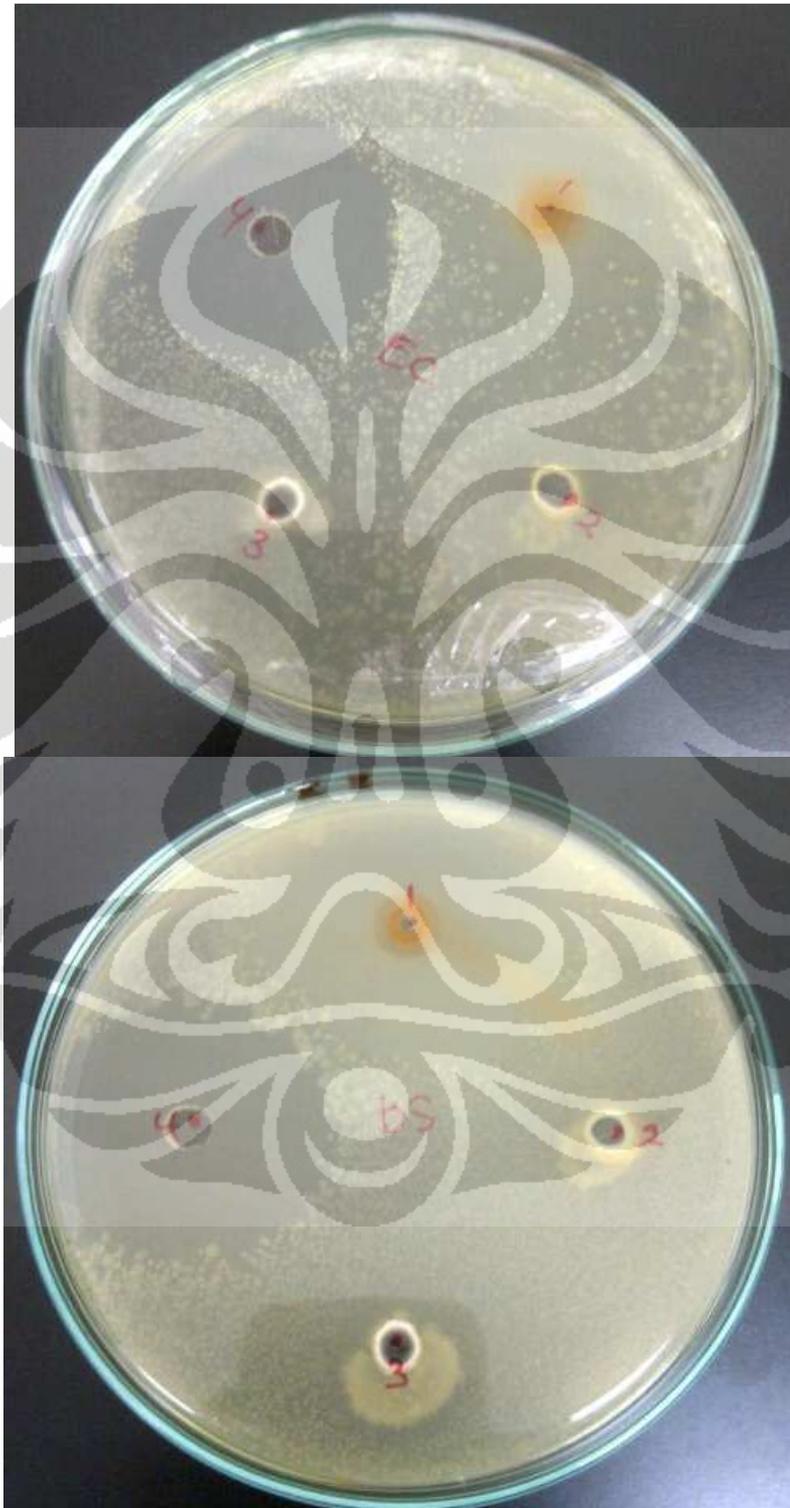
**Notes:**

1. These analysis results are only valid for the tested samples.
2. This report will be invalid if deficient or partly duplicated.
3. This report is valid if it signed by authorized inspector and with a special stamp for inspection.

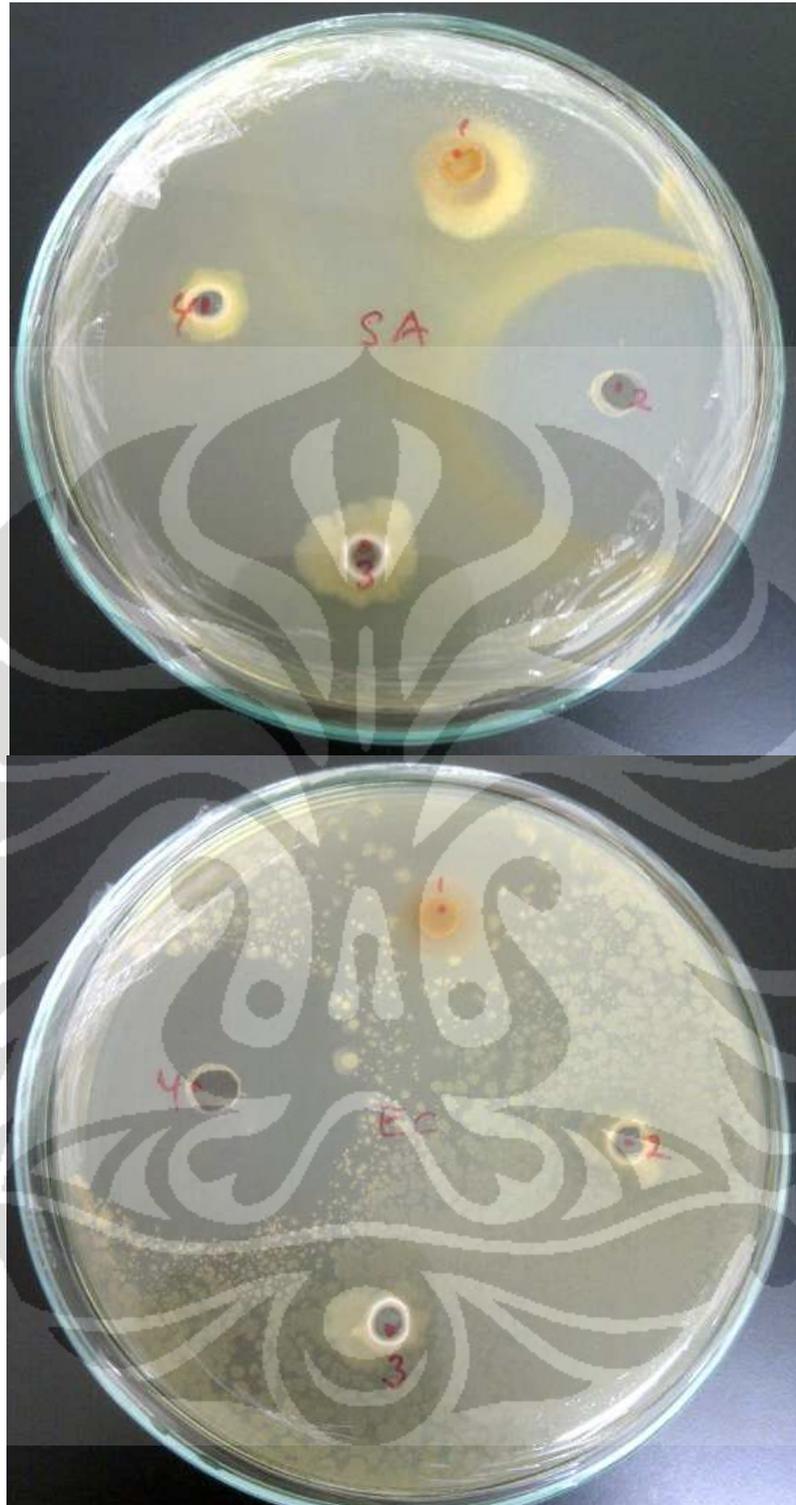
Training - Nano Laboratory Testing - Technology & Management Consultant
 Kawasan PUSPIPTEK Serpong Gd. 410 Balai Inkubator Teknologi BPPT, 15310, Serpong- Tangerang Banten
 Telp/ fax: 021- 7587 0479 | www.nanotech.co.id

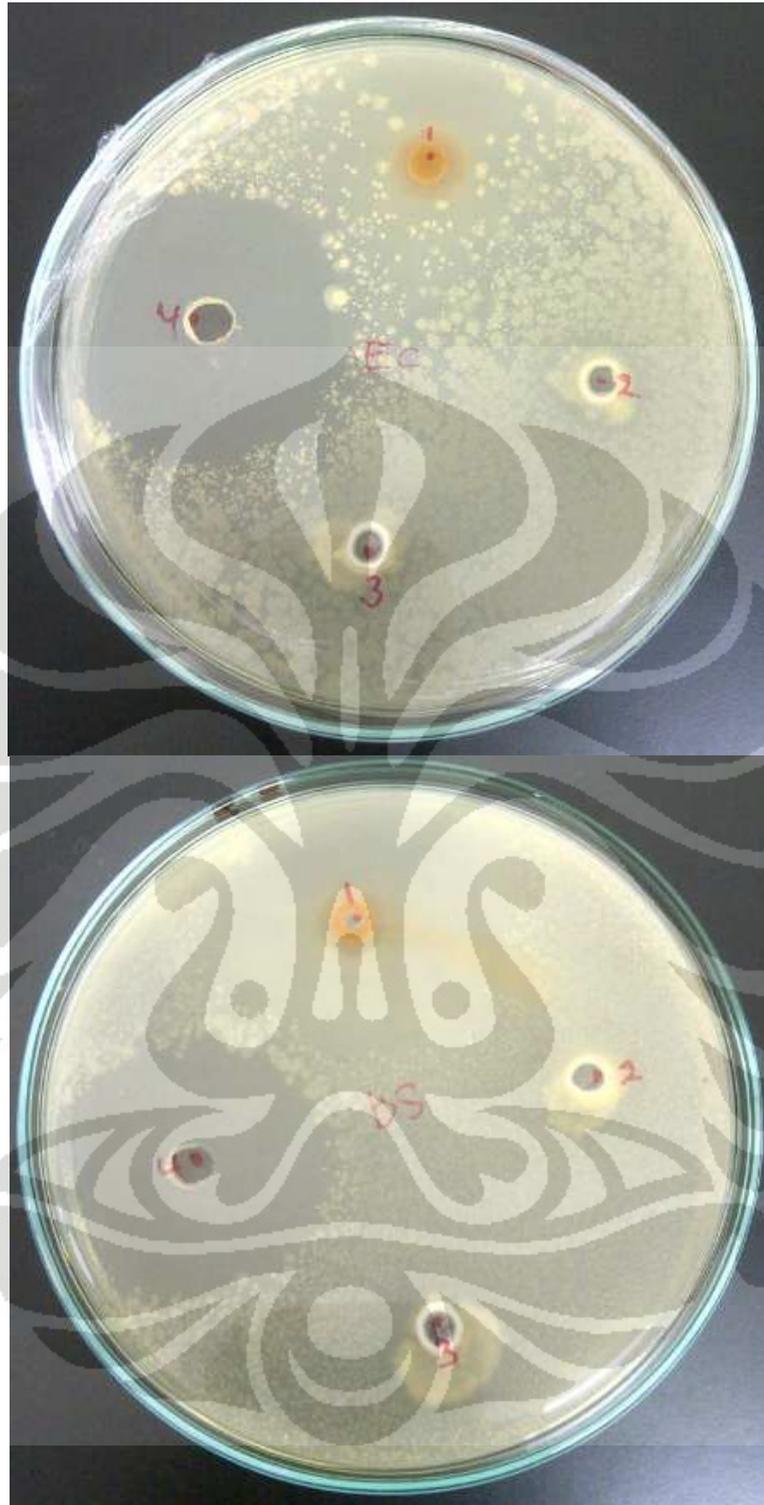
LAMPIRAN E**Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Propolis dan Nanopropolis.**

Pengujian dilakukan Triplo (n=3).

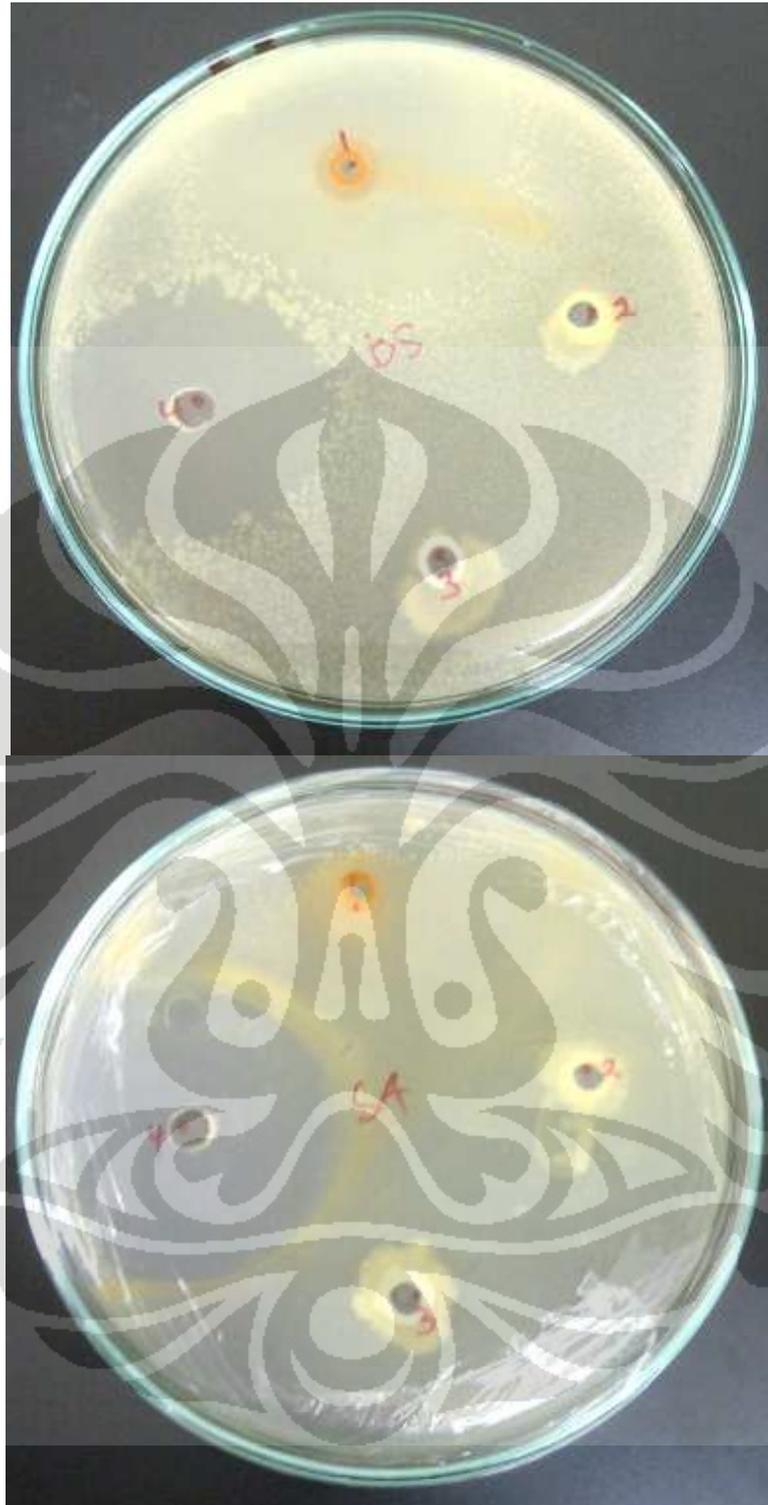


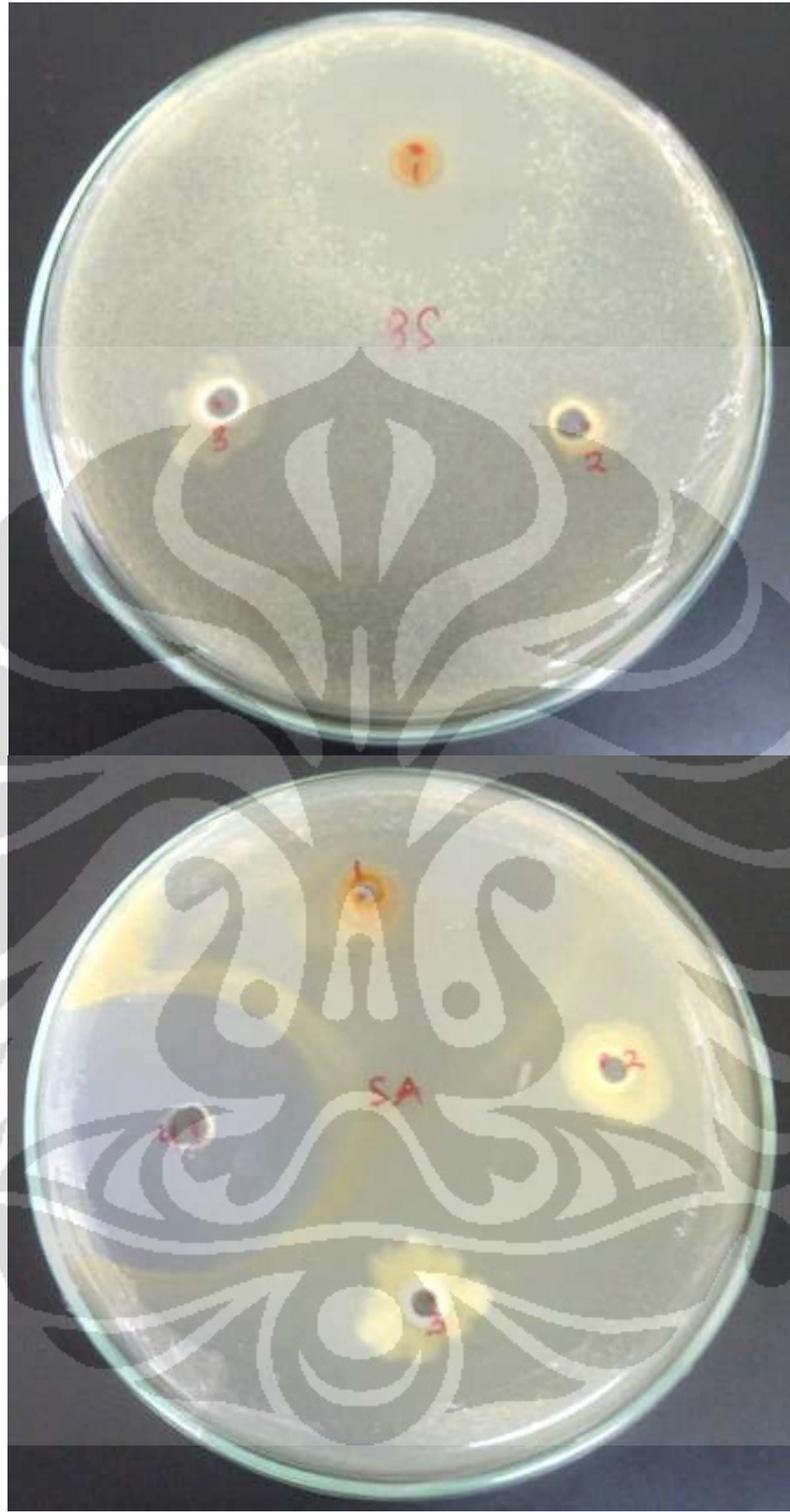
9

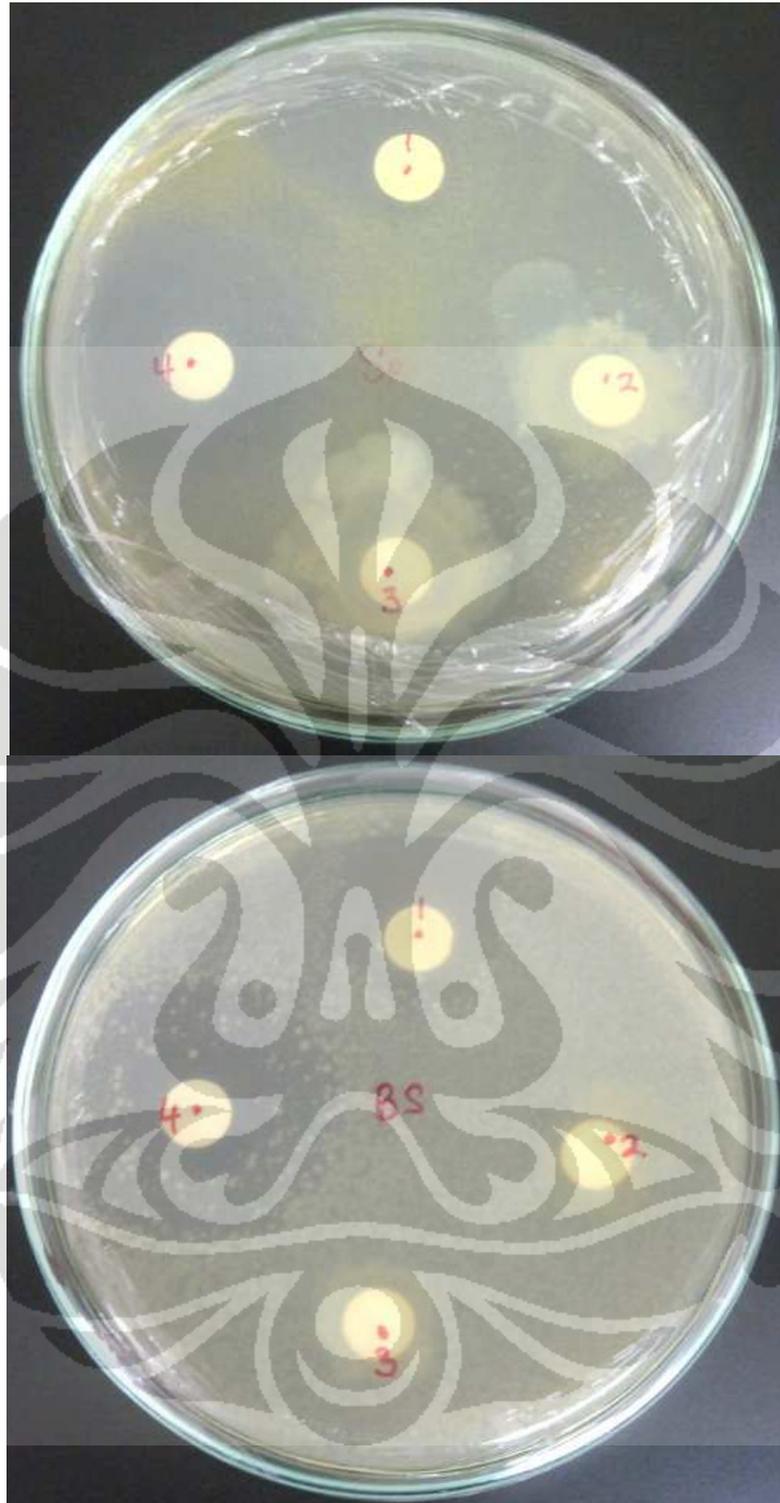


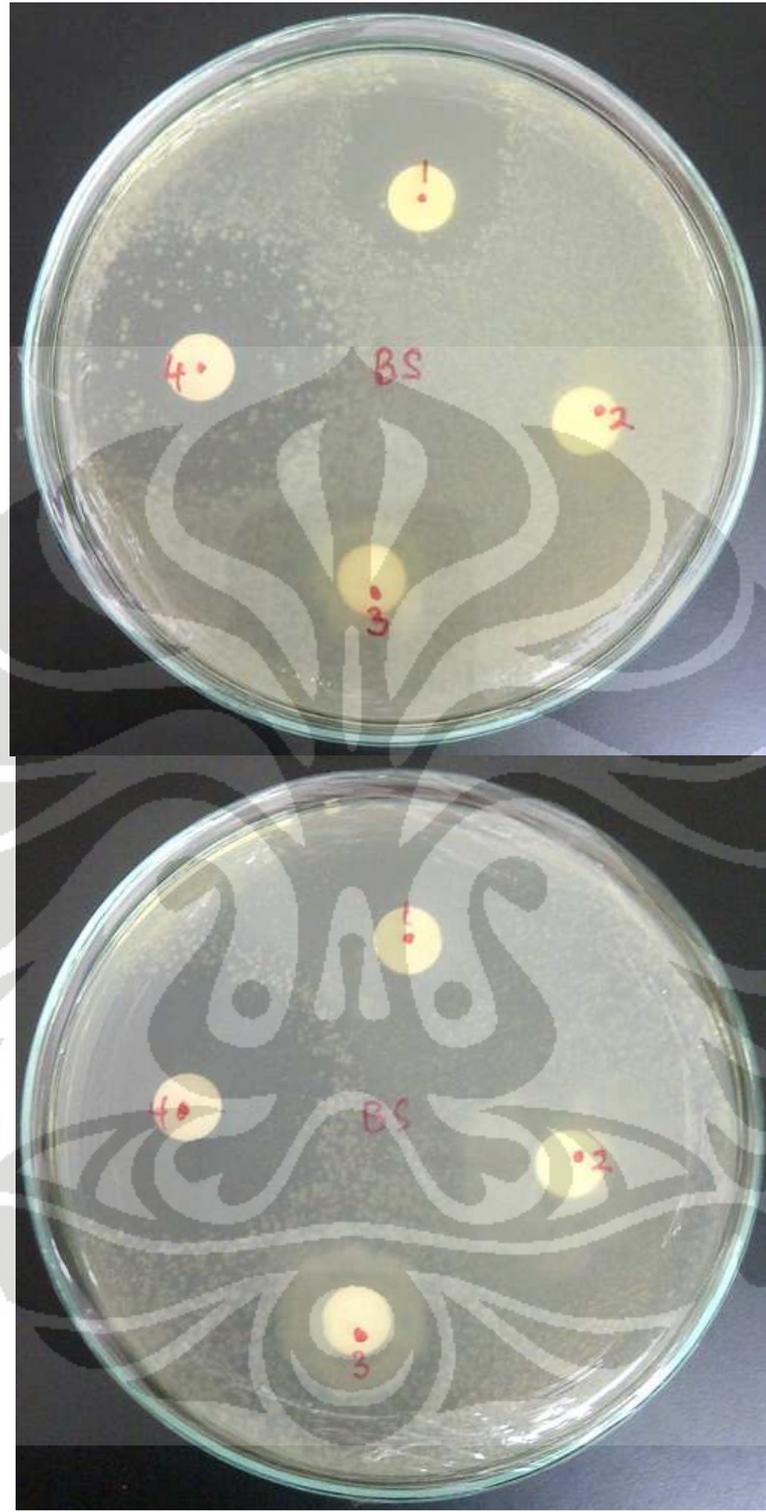


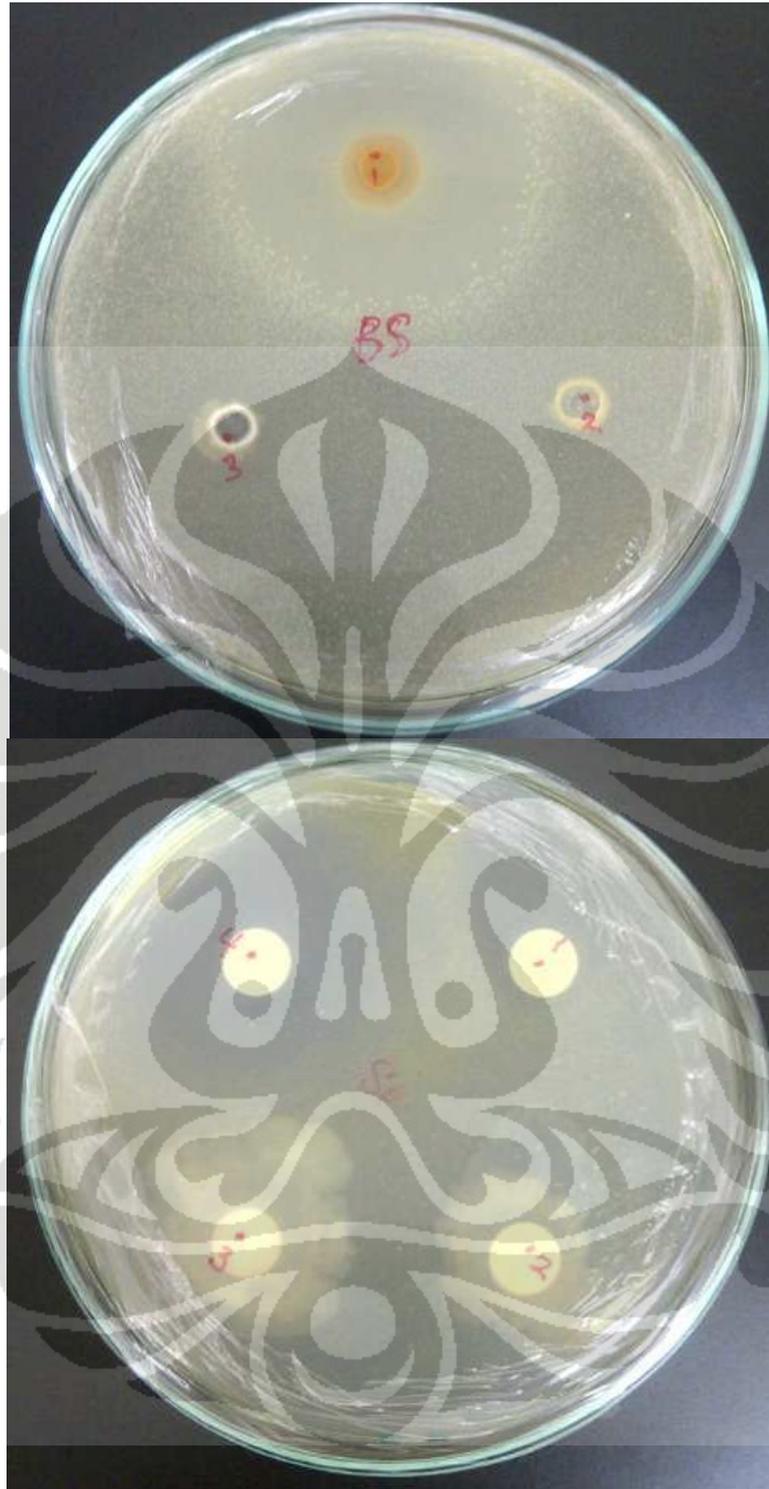












Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Propolis. Casein dan Nanopropolis. Propolis (1), Casein (2), Nanopropolis (3). Kontrol Positif (4) *Chloramphenicol*. Dengan Bakteri (a) *Escherichia coli*, (b) *Staphylococcus aureus*. (c) *Bacillus subtilis*.