



POTENSI *RADICAL SCAVENGING* DAN AKTIVITAS ANTI-INFLAMASI MELALUI PENGHAMBATAN *NITRIC OXIDE* DARI MADU HUTAN ASAL KABUPATEN KONAWE

[Radical Scavenging Potential and Anti-Inflammatory Activity through Nitric Oxide Inhibition of Forest Honey from Konawe Regency]

Hariana¹, Adryan Fristiohady^{2*}, Wahyuni², La Ode Muhammad Fitrawan², Loly Subhiaty Idrus² Jumriani², Agung Wibawa Mahatva Yodha³

¹Program Studi Magister Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Halu Oleo, Kendari

²Jurusan Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Halu Oleo, Kendari

³Program Studi Diploma III Farmasi, Politeknik Bina Husada, Kendari

*Email: adryanfristiohady@uho.ac.id (Telp: +628114101234)

Diterima tanggal 6 Juli 2025

Disetujui tanggal 18 Juli 2025

ABSTRACT

Forest honey is known as a natural product rich in various bioactive compounds, such as flavonoids and phenolics, which possess antioxidant and anti-inflammatory activities. Konawe Regency, located in Southeast Sulawesi, is one of the potential regions producing forest honey. However, scientific information regarding its biological activities remains limited. This study aimed to evaluate the radical scavenging potential and anti-inflammatory effects of forest honey from Konawe through *in vitro* assays. Antioxidant activity was assessed using the DPPH and ABTS methods, while anti-inflammatory activity was evaluated through human red blood cell (HRBC) membrane stabilization, bovine serum albumin (BSA) protein denaturation inhibition, and nitric oxide (NO) production inhibition assays. The results showed that Konawe forest honey had an IC_{50} value of 71.69 ± 2.73 mg/L in the DPPH assay and 58.90 ± 9.11 mg/L in the ABTS assay, indicating moderate to strong antioxidant activity. In the membrane stabilization test, the honey demonstrated $90.31 \pm 0.03\%$ stabilization at a concentration of 100 mg/L, while the protein denaturation assay resulted in an IC_{50} of 48.37 ± 0.42 mg/L. The NO production inhibition assay showed an IC_{50} value of 6.65 ± 2.38 mg/L, classified as very strong. Statistical analysis using the independent t-test revealed significant differences ($p < 0.05$) between Konawe forest honey and the positive control in all tested parameters. Overall, these findings support the potential of Konawe forest honey as a promising natural source of antioxidant and anti-inflammatory agents.

Keywords: Anti-inflammatory, antioxidant, honey, nitric oxide.

ABSTRAK

Madu hutan dikenal sebagai produk alami yang kaya akan berbagai senyawa bioaktif, seperti flavonoid dan fenolik, yang memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi. Kabupaten Konawe, yang terletak di Sulawesi Tenggara, merupakan salah satu wilayah potensial penghasil madu hutan. Namun, informasi ilmiah mengenai aktivitas biologisnya masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi aktivitas penangkap radikal bebas dan efek antiinflamasi dari madu hutan asal Konawe melalui uji *in vitro*. Aktivitas antioksidan dianalisis menggunakan metode DPPH dan ABTS, sedangkan aktivitas antiinflamasi dievaluasi melalui uji stabilisasi membran eritrosit (HRBC), inhibisi denaturasi protein albumin serum sapi (BSA), dan inhibisi produksi *nitric oxide* (NO). Hasil penelitian menunjukkan bahwa madu hutan Konawe memiliki nilai IC_{50} sebesar $71,69 \pm 2,73$ mg/L pada uji DPPH dan $58,90 \pm 9,11$ mg/L pada uji ABTS, yang mengindikasikan aktivitas antioksidan sedang hingga kuat. Pada uji stabilisasi membran, madu ini menunjukkan tingkat stabilisasi sebesar $90,31 \pm 0,03\%$ pada konsentrasi 100 mg/L, sementara pada uji denaturasi protein menghasilkan nilai IC_{50} sebesar $48,37 \pm 0,42$ mg/L. Uji inhibisi produksi NO menunjukkan nilai IC_{50} sebesar $6,65 \pm 2,38$ mg/L, yang dikategorikan sangat kuat. Analisis statistik menggunakan uji t independen menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara madu hutan Konawe dan kontrol positif pada seluruh parameter yang diuji. Secara keseluruhan, hasil ini mendukung potensi madu hutan Konawe sebagai sumber alami antioksidan dan antiinflamasi yang menjanjikan.

Kata kunci: Anti-inflamasi, antioksidan, madu, *nitric oxide*.



PENDAHULUAN

Madu merupakan produk alamiah hasil produksi berbagai jenis lebah yang telah lama dimanfaatkan karena khasiat kesehatannya, khususnya sebagai antioksidan dan antiinflamasi (Alaerjani *et al.*, 2024; Chirsanova *et al.*, 2021). Salah satu jenis madu yang memiliki potensi tinggi adalah madu hutan, karena mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid dan fenolik yang terbukti memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi signifikan (Handayani, 2022; Hariana *et al.*, 2024). Senyawa ini berperan dalam menetralkan radikal bebas penyebab stres oksidatif serta menekan proses peradangan, dua mekanisme penting yang berkontribusi dalam patogenesis berbagai penyakit kronis. Aktivitas antioksidan madu didominasi oleh kemampuannya menangkap (*scavenge*) radikal bebas yang berlebih di dalam tubuh. Proses scavenging ini sangat penting untuk mencegah terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) yang dapat merusak sel dan jaringan serta memicu stres oksidatif (Aljadi *et al.*, 2004). Selain itu, madu juga menunjukkan aktivitas antiinflamasi melalui beberapa mekanisme, salah satunya dengan menghambat produksi *nitric oxide* (NO), mediator utama dalam respon inflamasi (Kassim *et al.*, 2010).

Inflamasi sendiri merupakan mekanisme imun alami tubuh terhadap berbagai stimulus, baik patogen maupun non-patogen, yang apabila tidak terkontrol dan diiringi stres oksidatif, dapat berkembang menjadi inflamasi kronis. Infeksi bakteri bahkan berpotensi menimbulkan peradangan sistemik hingga menyebabkan sepsis, kondisi klinis serius yang sering kali berujung pada kegagalan multi-organ dan kematian tinggi (Fristiohady A, 2020; Stavropoulou *et al.*, 2022). Dalam hal ini, madu dipandang sebagai alternatif terapi alami yang tidak hanya bersifat imunomodulator, namun juga memiliki efek antioksidan dan antiinflamasi yang menjanjikan. Potensi aktivitas biologis madu ini sangat dipengaruhi oleh kandungan nutrisinya, termasuk gula, vitamin, mineral, enzim, dan polifenol, yang dapat bervariasi tergantung pada sumber botani, spesies lebah, serta kondisi lingkungan di daerah asalnya (Stavropoulou *et al.*, 2022).

Kabupaten Konawe di Sulawesi Tenggara dikenal sebagai salah satu sentra penghasil madu hutan potensial, namun penelitian ilmiah terkait aktivitas antioksidan dan antiinflamasi madu hutan dari daerah ini masih sangat terbatas. Studi dari berbagai wilayah lain di Indonesia menunjukkan bahwa madu hutan mengandung senyawa bioaktif dengan kemampuan sebagai antioksidan dan antiinflamasi, sehingga madu hutan asal Konawe pun diduga memiliki potensi serupa (Sumarlin *et al.*, 2014). Aktivitas antioksidan dari madu umumnya diuji menggunakan metode DPPH dan ABTS untuk mengukur kemampuan menangkap radikal bebas secara *in vitro* (Sumarlin *et al.*, 2014, 2023). Sementara itu, aktivitas antiinflamasi dapat dievaluasi melalui uji denaturasi protein, inhibisi produksi *nitric oxide* secara kimiawi, dan stabilisasi membran eritrosit manusia, yang semuanya



merupakan parameter penting dalam menentukan potensi madu sebagai agen antiinflamasi alami (Fristiohady A, 2020; Suryani *et al.*, 2023; Yodha *et al.*, 2024).

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian mengenai aktivitas antioksidan dan antiinflamasi madu hutan asal Kabupaten Konawe sangat penting untuk dilakukan guna mengungkap potensi biologisnya sebagai agen terapi alami. Mengingat tingginya prevalensi peradangan kronis serta meningkatnya risiko resistansi terhadap terapi konvensional, madu hutan dengan kandungan senyawa bioaktif khas daerah ini memiliki peluang besar untuk dikembangkan sebagai alternatif pengobatan yang aman dan efektif. Selain itu, hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai potensi biologis madu hutan daerah tersebut sebagai agen terapi alternatif alami, sekaligus mendukung pengembangan produk kesehatan berbasis sumber daya alam lokal Sulawesi Tenggara.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini madu hutan asal Desa Asinua Jaya, Kecamatan Asinua, Kabupaten Konawe, Provinsi Sulawesi Tenggara, Indonesia. Natrium diklofenak (phapros® Semarang, Indonesia). Asam asetat glasial (CH_3COOH), asam askorbat, dinatrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4), etil acetat, natrium klorida (NaCl), natrium dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4), natrium hidroksida, dan *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (Merck®, Germany). ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) (Sigma®). DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-hydrate), Bovine serum albumin, tris base, (himedia®, India). Etanol, dan aquadest (Onemed®, Indonesia). Sodium nitroprusside (SNP), asam sulfanilat (teknis).

Tahapan Penelitian

Preparasi Sampel

Madu ditimbang sebanyak 1gram madu disonikasi dengan 10 ml etanol 70% selama 30 menit pada suhu ruang, setelah homogen kemudian disaring menggunakan kertas saring, dimasukkan dalam labu takar 100 ml dan ditambahkan pelarut etanol sampai dengan tanda tera (sampel dengan konsentrasi 10.000 mg/l), disimpan pada suhu 2–4° celcius, untuk uji aktivitas selanjutnya (Hulea *et al.*, 2022).

Aktivitas Antioksidan

Uji DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-hidrat)

Aktivitas penangkap radikal bebas metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) diukur menggunakan prosedur kerja yang dimodifikasi oleh (Tongchai *et al.*, 2024) dengan sedikit penyesuaian. Sebanyak 50 μL larutan sampel madu pada tiap konsentrasi (6.25ppm – 100ppm) dicampurkan dengan 80 μL larutan DPPH dalam plate 96 sumur, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dalam kondisi gelap. Aquadest



dan DPPH digunakan sebagai kontrol negatif, sementara asam askorbat sebagai kontrol positif. Nilai absorbansi diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 517 nm. Aktivitas antioksidan ditentukan berdasarkan nilai IC_{50} . Persentase inhibisi dihitung menggunakan rumus:

$$I\% = \left[\frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi bahan uji})}{\text{absorbansi kontrol}} \right] \times 100$$

Uji ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat))

Aktivitas penangkap radikal bebas ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) diukur menggunakan metode modifikasi (Tongchai *et al.*, 2024) dengan sedikit penyesuaian. Larutan radikal ABTS⁺ disiapkan dengan mencampurkan 36 mg ABTS dan 7 mg kalium persulfat dalam masing-masing 5 mL aquadest, kemudian dicampur dan diinkubasi selama 12–16 jam dalam kondisi gelap. Sebanyak 50 μ L larutan sampel madu pada tiap konsentrasi madu pada tiap konsentrasi (6.25ppm – 100ppm) dicampur dengan 50 μ L larutan ABTS di dalam plate 96 sumur, lalu diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Aquadest dan larutan ABTS digunakan sebagai kontrol negatif, sedangkan asam askorbat sebagai kontrol positif. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 734 nm menggunakan *microplate reader*. Aktivitas antioksidan ditentukan berdasarkan nilai IC_{50} . Persentase inhibisi dihitung menggunakan rumus:

$$I\% = \left[\frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi bahan uji})}{\text{absorbansi kontrol}} \right] \times 100$$

Antiinflamasi

Uji Stabilisi Membran Sel Darah Merah

Aktivitas antiinflamasi stabilisasi membran sel darah merah mengikuti prosedur (Fristiody *et al.*, 2020) dengan sedikit modifikasi, sampel darah segar dari sukarelawan sehat diambil dengan penambahan antikoagulan, kemudian disentrifugasi pada suhu ruangan dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit, sel darah merah yang mengendap dipisahkan. Sel darah merah yang telah dipisahkan dicuci dengan larutan isosalin, lalu dibuat suspensi 10% v/v dengan larutan isosalin. Selanjutnya, suspensi 0,5 mL dicampurkan dengan larutan buffer fosfat salin (PBS) pH 7,4 1 mL, larutan hiposalin 2 mL, serta sampel madu 1 mL dengan konsentrasi (6.25, 12.5, 25, 50, dan 100 μ g/mL), lalu campuran tersebut diinkubasi pada suhu 56°C selama 30 menit. Larutan natrium diklofenak sebagai kontrol positif 1 mL dengan dengan konsentrasi yg sama. Campuran kemudian disentrifugasi pada 5.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm. Persentase hemolisis dan stabilitas HRBC dihitung menggunakan rumus (1) dan (2) berikut:



$$\% \text{ Stabilitas membran} = 100 - \frac{\text{Nilai pengukuran sampel uji}}{\text{Nilai pengukuran dari kontrol}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\% \text{ Hemolisis} = \frac{\text{Nilai pengukuran sampel uji}}{\text{Nilai pengukuran kontrol}} \times 100\% \quad (2)$$

Uji Denaturasi Protein

Uji antiinflamasi dilakukan mengikuti metode (Yodha *et al.*, 2024) dengan sedikit modifikasi menggunakan larutan Tris Buffer Saline (TBS), larutan BSA 0,2%, kontrol positif natrium diklofenak, dan larutan uji madu dibuat dengan beberapa konsentrasi (6.25 – 100ppm). Sebanyak 2 mL larutan sampel dicampur dengan 2 mL BSA 0,2%, diinkubasi pada 25°C selama 30 menit, dipanaskan pada 72°C selama 5 menit, dan didinginkan selama 25 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 660 nm menggunakan spektrofotometer. Persentase inhibisi denaturasi protein dihitung dengan rumus (3):

$$\% \text{ penghambatan aktivitas antiinflamasi} = \frac{\text{Abs Kontrol} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs Kontrol}} \times 100 \quad (3)$$

Hasil persentase inhibisi dari setiap konsentrasi diplot ke dalam kurva regresi linear untuk menentukan nilai IC_{50} (konsentrasi penghambatan 50%). Sampel yang memiliki penghambatan lebih dari 20% dianggap memiliki aktivitas antiinflamasi.

Uji Penghambatan Nitric Oxide

Uji Penghambatan NO dilakukan mengikuti metode (Suryani *et al.*, 2023) dengan sedikit modifikasi menyiapkan larutan sampel pada konsentrasi (31,25 – 1000ppm), sedangkan Vitamin C dengan konsentrasi yang sama sebagai kontrol pembanding. Sebanyak 0,1 mL larutan sampel dicampurkan dengan 0,1 mL larutan sodium nitroprusside (SNP) 10 mM dalam buffer fosfat 20 mM pH 7,4, lalu diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C. Sodium nitroprusside bereaksi dengan oksigen membentuk ion nitrit, yang kemudian ditambahkan 0,1 mL reagen Griess untuk membentuk kromofor berwarna. Absorbansi diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 540 nm. Persentase inhibisi NO dihitung berdasarkan penurunan absorbansi larutan SNP oleh sampel menggunakan rumus (4):

$$\% \text{ penghambatan aktivitas NO} = \frac{\text{Abs Kontrol} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs Kontrol}} \times 100 \quad (4)$$

Analisis Data

Analisis statistik dilakukan menggunakan uji independent t-test pada software IBM SPSS versi 29 untuk membandingkan nilai IC_{50} antara madu hutan Konawe dan kontrol positif vitamin C. Uji normalitas dilakukan terlebih dahulu untuk memastikan distribusi data. Jika data berdistribusi normal, analisis dilanjutkan dengan t-test;



sebaliknya, jika tidak normal, digunakan uji non-parametrik Mann-Whitney U. Hasil uji dianggap signifikan apabila $p < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Antioksidan

Uji DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-hidrat)

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH bertujuan untuk menilai kemampuan sampel dalam menangkap radikal bebas. Metode ini dipilih karena sederhana, cepat, dan hanya memerlukan sedikit bahan (Handayani *et al.*, 2012). Prinsip kerja DPPH didasarkan pada kemampuan senyawa antioksidan mendonorkan elektron atau atom hidrogen ke radikal DPPH yang stabil. DPPH memiliki warna ungu dengan serapan maksimum di kisaran panjang gelombang 516–517 nm, yang akan berkurang saat bereaksi dengan senyawa antioksidan, ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi kuning (Insanu *et al.*, 2022; Upadhyay *et al.*, 2015). Penurunan nilai absorbansi diukur untuk menentukan aktivitas antioksidan sampel, semakin tinggi aktivitas antioksidan suatu bahan, maka nilai IC_{50} -nya semakin rendah, menunjukkan konsentrasi yang dibutuhkan untuk menangkap 50% radikal bebas lebih kecil, sehingga aktivitasnya lebih kuat (Yodha *et al.*, 2021). Dalam uji ini, digunakan seri konsentrasi 100, 50, 25, 12,5, dan 6,25 mg/L, dengan vitamin C sebagai kontrol positif, sementara etanol digunakan sebagai pelarut karena kemampuannya melarutkan berbagai metabolit sekunder seperti flavonoid dan fenolik yang berperan dalam aktivitas antioksidan (Zahra *et al.*, 2021).

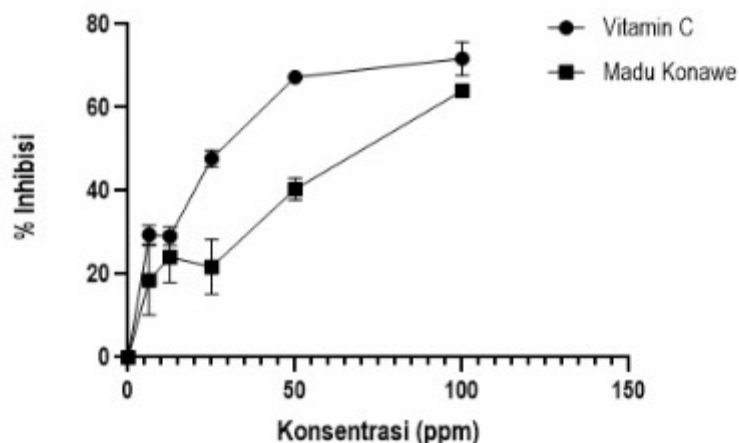
Tabel 1. Nilai IC_{50} madu berdasarkan metode DPPH

NO	Sampel	Mean $\pm$ SD
1	Madu Konawe	71.69 $\pm$ 2.73
2	Vitamin C	40.65 $\pm$ 3.20

Berdasarkan hasil pengujian menggunakan metode DPPH, diperoleh nilai IC_{50} madu hutan Konawe sebesar 71,69 $\pm$ 2,73 mg/L, sedangkan vitamin C sebagai kontrol positif memiliki nilai IC_{50} sebesar 40,65 $\pm$ 3,20 mg/L ($p < 0,05$). Nilai IC_{50} yang lebih rendah menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih kuat karena mampu menetralkan 50% radikal bebas pada konsentrasi lebih rendah. Dengan demikian, vitamin C menunjukkan potensi antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan madu hutan Konawe. Data nilai IC_{50} dari hasil uji DPPH ditampilkan pada Tabel 1, sedangkan grafik perbandingan aktivitas antioksidan kedua sampel disajikan pada Gambar 1. Meskipun demikian, aktivitas antioksidan madu hutan Konawe tetap tergolong baik karena nilai IC_{50} -nya masih di bawah 100 mg/L, kategori yang menunjukkan aktivitas antioksidan sedang hingga kuat (Yodha *et al.*, 2021).



Perbedaan nilai ini diduga disebabkan oleh komposisi senyawa bioaktif dalam masing-masing sampel, di mana vitamin C sebagai antioksidan murni bekerja lebih spesifik dibanding senyawa campuran seperti flavonoid dan fenolik dalam madu hutan Konawe.



Gambar 1. Kemampuan madu dalam menangkap radikal bebas. Data disajikan dalam bentuk rerata $\pm$ simpangan baku ($n=3$).

Uji ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat))

Uji aktivitas antioksidan dengan metode ABTS merupakan salah satu metode yang banyak digunakan karena keunggulannya yang sederhana, sensitivitasnya tinggi, stabil, dan dapat diaplikasikan pada senyawa bersifat hidrofobik maupun hidrofilik dalam berbagai rentang pH (Munteanu *et al.*, 2021). Mekanisme kerja metode ini didasarkan pada kemampuan senyawa antioksidan dalam sampel untuk mereduksi radikal bebas $ABTS^+$ dengan cara mendonorkan proton, sehingga terjadi perubahan warna larutan dari biru kehijauan menjadi tidak berwarna. Penurunan absorbansi diukur pada panjang gelombang λ lalu dihitung persen inhibisi dan nilai IC_{50} sebagai indikator kekuatan aktivitas antioksidan suatu bahan (Billa *et al.*, 2023; Floegel *et al.*, 2011).

Berdasarkan hasil pengujian, diperoleh nilai IC_{50} madu hutan Konawe sebesar $58,90 \pm 9,11$ mg/L, sedangkan vitamin C sebagai kontrol positif menunjukkan nilai IC_{50} sebesar $36,61 \pm 2,88$ mg/L ($p < 0,05$). Vitamin C dipilih karena merupakan antioksidan standar yang telah banyak digunakan untuk membandingkan kemampuan senyawa dalam menangkap radikal bebas ABTS. Vitamin C efektif mendonorkan elektron untuk menetralkan radikal bebas. Data disajikan pada Tabel 2 dan Gambar 2.

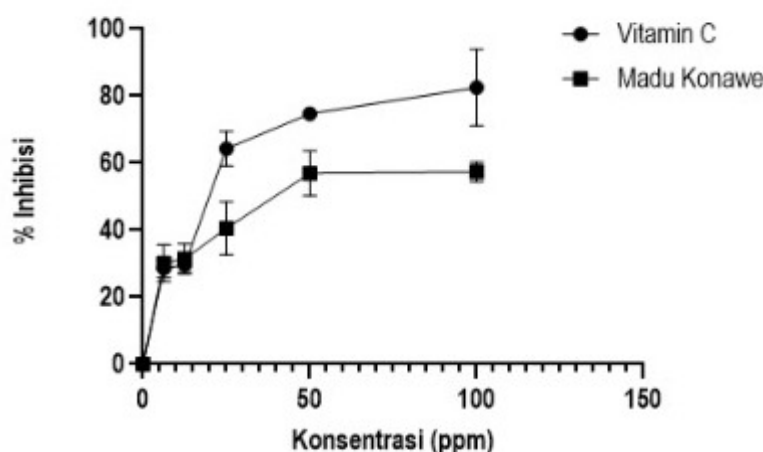
Nilai IC_{50} yang lebih rendah pada vitamin C menunjukkan potensi antioksidan yang lebih kuat dibandingkan madu hutan Konawe. Namun demikian, nilai IC_{50} madu hutan Konawe yang berada di bawah 100 mg/L masih dikategorikan sebagai antioksidan kuat (Musdalipah *et al.*, 2021). Temuan ini mengindikasikan bahwa madu hutan Konawe memiliki kemampuan scavenging radikal bebas yang cukup tinggi, didukung oleh



kandungan bioaktif seperti flavonoid, fenolik, serta senyawa antioksidan lain yang diperoleh dari berbagai sumber nektar tanaman hutan alami di wilayah Konawe, Sulawesi Tenggara.

Tabel 2. Nilai IC_{50} madu berdasarkan metode ABTS

NO	Sampel	Mean $\pm$ SD
1	Madu Konawe	58.90 $\pm$ 9.11
2	Vitamin C	36.61 $\pm$ 2.88



Gambar 2. Kemampuan madu dalam menangkap radikal bebas. Data disajikan dalam bentuk rerata $\pm$ simpangan baku (n=3).

Antiinflamasi

Uji Stabilisi Membran Sel Darah Merah

Persentase stabilitas membran sel darah merah dan tingkat hemolisis yang terjadi akibat pemberian berbagai konsentrasi madu, serta natrium diklofenak sebagai kontrol positif. Aktivitas antiinflamasi *in vitro* dari kedua jenis madu dibandingkan dengan natrium diklofenak ditunjukkan melalui persentase stabilitas membran pada setiap konsentrasi yang diuji, disajikan pada Tabel 3 dan Gambar 3.

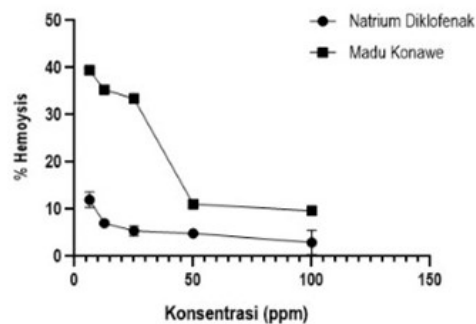
Uji stabilisasi membran sel darah merah (Human Red Blood Cell/HRBC) merupakan metode yang umum digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antiinflamasi secara *in vitro*, karena membran eritrosit memiliki struktur yang mirip dengan membran lisosom. Ketika membran ini mengalami kerusakan, enzim siklooksigenase akan dilepaskan dan mengubah asam arakidonat menjadi prostaglandin, yang merupakan mediator utama proses inflamasi (Karrat *et al.*, 2022). Metode ini digunakan untuk menilai aktivitas antiinflamasi dengan prinsip pengukuran kemampuan suatu senyawa dalam mencegah hemolisis eritrosit akibat paparan larutan hipotonis. Semakin tinggi persentase stabilitas membran yang dihasilkan, semakin baik potensi antiinflamasi senyawa



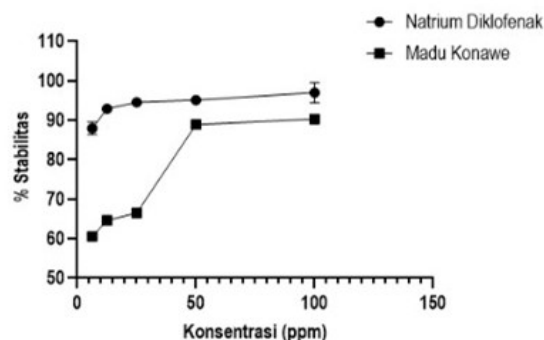
tersebut. Oleh karena itu, kemampuan suatu senyawa untuk mencegah hemolisis dan menjaga stabilitas membran sel dapat menjadi indikator potensial efek antiinflamasi.

Tabel 3. Nilai persentase stabilitas dan hemolisis dari madu hutan konawe dan natrium diklofenak

NO	Sampel	Konsentrasi	Mean $\pm$ SD % Hemolisis	Mean $\pm$ SD % Stabilitas
1	Madu Konawe	6.25	39.42 $\pm$ 0.37	60.58 $\pm$ 0.37
		12.5	35.36 $\pm$ 0.08	64.64 $\pm$ 0.08
		25	33.46 $\pm$ 0.28	66.54 $\pm$ 0.28
		50	11.09 $\pm$ 0.01	88.91 $\pm$ 0.01
		100	9.69 $\pm$ 0.03	90.31 $\pm$ 0.03
2	Natrium Diclofenak	6.25	12.04 $\pm$ 1.63	87.96 $\pm$ 1.63
		12.5	7.07 $\pm$ 0.96	92.93 $\pm$ 0.96
		25	5.43 $\pm$ 1.06	94.57 $\pm$ 1.06
		50	4.90 $\pm$ 0.77	95.90 $\pm$ 0.77
		100	3.00 $\pm$ 2.59	97.00 $\pm$ 2.59



(a) Aktivitas hemolisis madu hutan konawe terhadap sel darah merah manusia (HRBC), dengan natrium diklofenak sebagai kontrol positif. Data disajikan dalam bentuk rerata $\pm$ standar deviasi (n=3)



(b) Aktivitas stabilitas madu hutan konawe terhadap sel darah merah manusia (HRBC), dengan natrium diklofenak sebagai kontrol positif. Data disajikan dalam bentuk rerata $\pm$ standar deviasi (n=3)

Gambar 3. Uji *in vitro* aktivitas antiinflamasi madu hutan konawe dan natrium diklofenak terhadap stabilisasi membran sel darah merah, yang dinyatakan dalam persentase stabilitas pada berbagai konsentrasi (6.25; 12.5; 25; 50; dan 100 mg/L). Data disajikan dalam bentuk rerata $\pm$ simpangan baku (n=3)



Berdasarkan hasil pengujian, madu hutan Konawe menunjukkan aktivitas stabilisasi membran yang meningkat seiring kenaikan konsentrasi. Pada konsentrasi terendah 6.25 mg/L, madu hutan Konawe memberikan stabilitas membran sebesar $60.58 \pm 0.37\%$, yang kemudian meningkat signifikan hingga mencapai $90.31 \pm 0.03\%$ pada konsentrasi 100 mg/L. Sebaliknya, natrium diklofenak sebagai kontrol positif memperlihatkan nilai stabilitas membran yang lebih tinggi di setiap konsentrasi, mulai dari $87.96 \pm 1.63\%$ di konsentrasi 6.25 mg/L hingga $97.00 \pm 2.59\%$ pada konsentrasi 100 mg/L. Hasil ini mengindikasikan bahwa meskipun efektivitas madu hutan Konawe dalam menjaga stabilitas membran sel darah merah masih berada di bawah natrium diklofenak, aktivitasnya tetap tergolong kuat, khususnya pada konsentrasi tinggi. Persentase hemolisis madu hutan Konawe pun menurun seiring peningkatan konsentrasi, dari $39.42 \pm 0.37\%$ di konsentrasi 6.25 mg/L menjadi $9.69 \pm 0.03\%$ di 100 mg/L, yang berarti madu memiliki kemampuan protektif terhadap membran eritrosit dalam kondisi proinflamasi. Natrium diklofenak digunakan karena merupakan obat antiinflamasi nonsteroid (AINS) yang umum digunakan sebagai pembanding dalam uji *in vitro* stabilisasi membran. Diklofenak dapat menjaga integritas membran sel saat kondisi stres inflamasi (Mulyani *et al.*, 2023).

Uji Denaturasi Protein

Madu hutan dikenal sebagai produk alami yang kaya akan senyawa bioaktif, di antaranya flavonoid, fenolik, vitamin, dan enzim, yang berperan penting dalam berbagai efek farmakologis, termasuk sebagai antiinflamasi (Hulea *et al.*, 2022; Lawag *et al.*, 2023). Salah satu metode untuk menilai aktivitas antiinflamasi ini adalah melalui uji denaturasi protein menggunakan Bovine Serum Albumin (BSA), yang mengukur kemampuan senyawa dalam menjaga stabilitas protein saat terpapar kondisi inflamasi. Inflamasi sendiri merupakan respons tubuh terhadap infeksi, cedera, atau iritasi, namun bila berlangsung kronis dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan memicu gangguan autoimun (Fristiohady A, 2020). Salah satu mekanisme utama inflamasi adalah denaturasi protein akibat paparan panas atau mediator inflamasi (Alina *et al.*, 2024; Silva *et al.*, 2020). Dalam penelitian ini, madu hutan Konawe menunjukkan kemampuan menghambat denaturasi protein dengan nilai IC_{50} sebesar 48.37 ± 0.42 mg/L, sementara kontrol positif natrium diklofenak memiliki IC_{50} 5.83 ± 3.99 mg/L. ($p < 0,05$). Berdasarkan klasifikasi aktivitas, madu hutan Konawe termasuk kategori sedang (IC_{50} 31–50 mg/L), sedangkan natrium diklofenak berada dalam kategori sangat kuat ($IC_{50} < 10$ mg/L) (Yodha *et al.*, 2024). Natrium diklofenak digunakan memiliki kemampuan kuat dalam mencegah denaturasi protein akibat peradangan, dan sering digunakan sebagai standar uji antiinflamasi *in vitro* (Mulyani *et al.*, 2023). Data disajikan pada Tabel 4 dan Gambar 4.

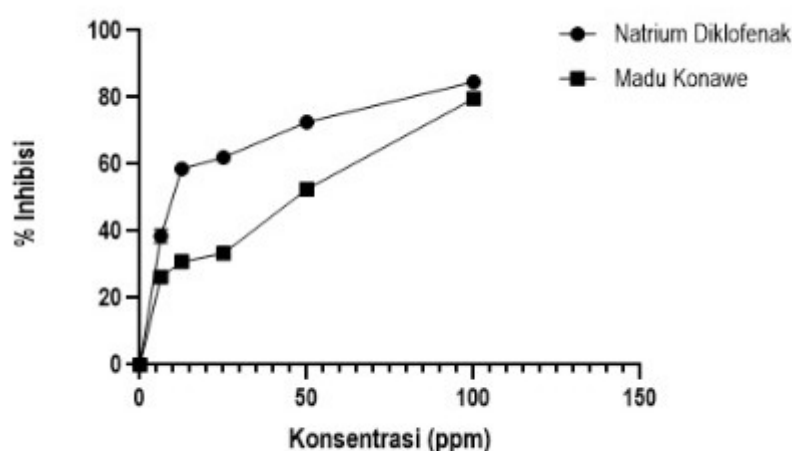
Aktivitas madu hutan Konawe dalam menghambat inflamasi memang belum sekuat natrium diklofenak, namun hasil penelitian ini tetap menunjukkan potensi antiinflamasi yang signifikan. Efek tersebut diperkirakan



berasal dari kandungan flavonoid dan fenolik yang berperan menjaga stabilitas struktur protein selama proses inflamasi. Oleh karena itu, madu hutan Konawe memiliki prospek sebagai agen antiinflamasi alami.

Tabel 4. Nilai IC_{50} madu berdasarkan uji aktivitas antiinflamasi

NO	Sampel	Mean $\pm$ SD
1	Madu Konawe	48.37 $\pm$ 0.42
2	Natrium Diklofenak	5.83 $\pm$ 3.99



Gambar 4. Aktivitas antiinflamasi madu hutan konawe dengan natrium diklofenak sebagai kontrol. Data disajikan dalam bentuk rata-rata $\pm$ simpangan baku ($n=3$).

Uji Penghambatan *Nitric Oxide*

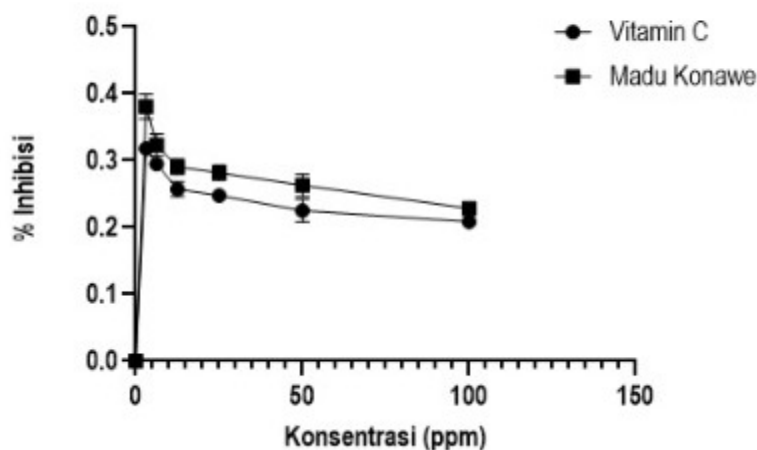
Nitric oxide (NO) merupakan molekul radikal bebas berbentuk gas yang larut dalam air dan dapat melewati membran lipoprotein sel. NO berperan penting dalam berbagai proses fisiologis, namun dalam kondisi peradangan, produksi NO yang berlebihan dapat berbahaya karena akan bereaksi dengan oksigen (O_2) dan ion hidrogen (H^+/H^-) membentuk senyawa radikal berbahaya seperti peroksinitrit. Senyawa ini berpotensi merusak jaringan, mempercepat penuaan sel, dan memicu peradangan akut maupun kronis (Suryani *et al.*, 2023). Dalam penelitian ini, aktivitas madu hutan Konawe dalam menghambat produksi NO diukur menggunakan uji sodium nitroprusside (SNP). Berdasarkan hasil yang diperoleh, madu hutan Konawe memiliki nilai IC_{50} sebesar 6.65 ± 2.38 mg/L, sedangkan kontrol positif vitamin C menunjukkan nilai IC_{50} yang lebih rendah yaitu 1.07 ± 0.39 mg/L ($p < 0,05$). Nilai IC_{50} ini menunjukkan konsentrasi sampel yang diperlukan untuk menghambat 50% produksi NO. Semakin kecil nilai IC_{50} , maka semakin kuat aktivitas penghambatan NO. Data disajikan dalam Tabel 5 dan Gambar 5.



Berdasarkan kategori aktivitas, madu hutan Konawe termasuk dalam kategori sangat kuat ($IC_{50} < 10$ mg/L) dan aktivitasnya signifikan meskipun masih berada di bawah vitamin C yang merupakan antioksidan murni. Vitamin C dipilih karena bersifat antioksidan yang mampu menghambat produksi radikal bebas NO. Natrium diklofenak tidak digunakan karena tidak bekerja langsung melalui mekanisme penangkapan NO, melainkan menghambat enzim COX (Suryani *et al.*, 2023). Temuan ini menegaskan potensi madu hutan Konawe sebagai kandidat agen anti-inflamasi alami yang efektif melalui mekanisme penghambatan NO, yang relevan dalam upaya menangkal peradangan akut maupun kronis.

Tabel 5. Nilai IC_{50} (mg/L) aktivitas penghambatan *Nitric Oxide* oleh madu hutan Konawe dibandingkan vitamin C sebagai kontrol positif.

NO	Sampel	Mean $\pm$ SD
1	Madu Konawe	6.65 $\pm$ 2.38
2	Vitamin C	1.07 $\pm$ 0.39



Gambar 4. Aktivitas penghambatan *Nitric Oxide* (NO) oleh madu hutan Konawe dan vitamin C ditunjukkan melalui nilai IC_{50} (mg/L). Data disajikan dalam bentuk rerata $\pm$ simpangan baku (mean $\pm$ SD, n=3).

Analisis statistik dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan nilai IC_{50} hasil uji DPPH, ABTS, stabilisasi membran sel darah merah (HRBC), inhibisi denaturasi protein BSA, dan inhibisi produksi *nitric oxide* (NO) antara madu hutan Konawe dan kontrol positif yang digunakan. Uji statistik dilakukan menggunakan independent t-test karena hanya terdapat dua kelompok data yang dianalisis. Nilai signifikansi ditetapkan pada $p < 0,05$. Hasil pengujian menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik pada seluruh parameter, dengan kontrol positif menunjukkan nilai IC_{50} yang lebih rendah dibanding madu hutan Konawe, yang berarti aktivitasnya lebih kuat.



KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, madu hutan Konawe menunjukkan aktivitas antioksidan dan antiinflamasi yang signifikan meskipun masih berada di bawah kontrol positif. Pada uji DPPH dan ABTS, madu hutan Konawe memiliki nilai IC_{50} masing-masing sebesar 71.69 ± 2.73 mg/L dan 58.90 ± 9.11 mg/L, yang dikategorikan sebagai antioksidan sedang hingga kuat. Aktivitas antiinflamasi madu hutan Konawe juga terbukti melalui uji stabilisasi membran sel darah merah dengan stabilitas mencapai $90.31 \pm 0.03\%$ di konsentrasi 100 mg/L, uji inhibisi denaturasi protein dengan IC_{50} sebesar 48.37 ± 0.42 mg/L (kategori sedang), serta uji inhibisi produksi *nitric oxide* (NO) dengan IC_{50} 6.65 ± 2.38 mg/L (kategori sangat kuat). Analisis statistik menggunakan independent t-test menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) antara madu hutan Konawe dan kontrol positif pada seluruh parameter, yang menegaskan bahwa meskipun efektivitasnya lebih rendah dibandingkan vitamin C dan natrium diklofenak, madu hutan Konawe tetap memiliki potensi farmakologis sebagai agen antioksidan dan antiinflamasi alami karena kandungan senyawa bioaktif seperti flavonoid, fenolik, dan vitamin di dalamnya.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset dan Teknologi, Kementerian Pendidikan Tinggi, Riset dan Teknologi yang telah membiayai penelitian ini melalui skema Penelitian Pasca Sarjana - Penelitian Tesis Magister (PPS-PTM) Tahun 2025 dengan nomor kontrak induk: 068/C3/DT.05.00/PL/2025 dan nomor kontrak turunan: 07/UN29.20/PG/2025.

DAFTAR PUSTAKA

- Alaerjani, W.M.A. and Mohammed, M.E.A. 2024. Impact of floral and geographical origins on honey quality parameters in Saudi Arabian regions. *Scientific Reports* 14(1): 1-14. doi: <https://10.1038/s41598-024-59359-1>.
- Alina, C., Florescu, G., Stanculescu, E.C., Berbecaru-lovan, A., Balasoiu, R.M. and Pisoschi, C.G. 2024. Original Paper In vitro Assessment of Free Radical Scavenging Effect and Thermal Protein Denaturation Inhibition of Bee Venom for an Anti-Inflammatory Use. *Current Health Sciences Journal* 50(1): 81-86. doi: <https://10.12865/CHSJ.50.01.11>.
- Aljadi, A.M. and Kamaruddin, M.Y. 2004. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry* 85(4): 513–518. doi: [https://10.1016/S0308-8146\(02\)00596-4](https://10.1016/S0308-8146(02)00596-4).
- Billa, Z., Fitriyati, L., Zukhruf, N. and Kiromah, W. 2023. Uji aktivitas antioksidan kitosan dari cangkang yutuk (*Emerita* sp) menggunakan metode abts (2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat) test of chitosan antioxidant activity from yutuk shell (*Emerita* sp) using abts method (2,2 azinobis (3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonic acid). *Usadha: Journal of Pharmacy* 2(4): 507-516. Available at: <https://jsr.lib.ums.ac.id/index.php/uipj>.



- Chirsanova, A., Capcanari, T., Boistean, A. and Khanchel, I. 2021. Bee Honey: History, Characteristics, Properties, Benefits and Adulteration in the Beekeeping Sector. *Journal of Social Sciences* 4(3): 98–114. Available at: https://jss.utm.md/wp-content/uploads/sites/21/2021/09/JSS-3-2021_10.52326jss.utm_2021.43.11.pdf.
- Floegel, A., Kim, D.O., Chung, S.J., Koo, S.I. and Chun, O.K. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 24(7): 1043–1048. doi: <https://10.1016/j.jfca.2011.01.008>.
- Fristiohady, A., Wahyuni., Malik, F., Fariani, N., Ilyas, M., Mentari B., Sahidin. 2020. In Vitro Anti-inflammatory Activity of *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith by Hrbc Membrane Stabilization Method. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 18(2) : 151-158. doi: <https://doi.org/10.35814/jifi.v18i2.731>.
- Handayani, Roskiana Ahmad, A. and Sudir, M. 2012. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bunga dan Daun Patikala (*Etilingera elatior* (Jack) R.M.SM) Menggunakan Metode DPPH. *Pharm Sci Res* 1407-1354: 86-93.
- Handayani, T.H. 2022. Aktivitas Antioksidan, Total Fenolik, dan Total Flavonoid Madu Apis mellifera dari Hutan Akasia (*Accacia crassicarpa*) Riau, Indonesia dengan Beberapa Perlakuan Pengeringan. *Jurnal Biologi Indonesia* 18(2): 231–243. doi: <https://doi.org/10.47349/jbi/18022022/231>.
- Hariana and Fristiohady, A. 2025. Tinjauan Farmakologi Madu: In Vitro dan In Vivo. Deepublish. Hal: 1-98.
- Hulea, A. 2022. Diversity of Monofloral Honey Based on the Antimicrobial and Antioxidant Potential. *Antibiotics* 11(5): 1-26. doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050595>.
- Insanu, M., Zahra, A.A., Sabila, N., Silviani, V., Haniffadli, A., Rizaldy, D. and Fidrianny, I. 2022. Phytochemical and Antioxidant Profile: Cucumber Pulp and Leaves Extracts. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* 10(A): 616–622. doi: <https://doi.org/10.3889/oamjms.2022.8337>.
- Karrat, L., Abajy, M.Y. and Noyal, R. 2022. Investigating the anti-inflammatory and analgesic properties of leaves ethanolic extracts of *Cedrus libani* and *Pinus brutia*. *Heliyon* 8(4): 1-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09254>.
- Kassim, M., Achoui, M., Mansor, M. and Yusoff, K.M. 2010. The inhibitory effects of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E2 in inflammatory tissues. *Fitoterapia* 81(8):1196–1201. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.07.024>.
- Lawag, I.L., Islam, M.K., Sostaric, T., Lim, L.Y., Hammer, K. and Locher, C. 2023. Antioxidant Activity and Phenolic Compound Identification and Quantification in Western Australian Honeys. *Antioxidants* 12(1): 1-33. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox12010189>.
- Mulyani, T. 2023. Uji Aktivitas Antiinflamasi Kombinasi Ekstrak Daun Torbangun (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) dan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dengan Metode Penghambatan Denaturasi Protein. *Pharmacy Jurnal Farmasi Indonesia*. Vol 20 (01) 2023: 26-32.
- Munteanu, I.G. and Apetrei, C. 2021. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences* 22(7): 1-30. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>.
- Musdalipah, M., Tee, S.A., Karmilah, K., Sahidin, S., Fristiohady, A. and Yodha, A.W.M. 2021. Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant, and Toxicity Test with BSLT of *Meistera chinensis* Fruit Fraction from Southeast Sulawesi. *Borneo Journal of Pharmacy* 4(1):6–15. doi: <https://doi.org/10.33084/bjop.v4i1.1686>.



- Silva, L.R., Gonçalves, A.C., Nunes, A.R. and Alves, G. 2020. Authentication of honeys from Caramulo region (Portugal): Pollen spectrum, physicochemical characteristics, mineral content, and phenolic profile. *Journal of Food Science* 85(2): 374–385. doi: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15023>.
- Stavropoulou, E., Ieronymaki, E., Dimitroulia, E., Constantinidis, T.C., Vrioni, G., Tsatsanis, C. and Tsakris, A. 2022. Anti-Inflammatory and Antibacterial Effects and Mode of Action of Greek Arbutus, Chestnut, and Fir Honey in Mouse Models of Inflammation and Sepsis. *Microorganisms* 10(12): 1- 14 doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122374>.
- Sumarlin, L.O., Muawanah, A., Istiqomah, A., Amilia, N., Rudiana, T., Chalid, S.Y. and Hajar, H. 2023. Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) Ekstrak Madu Sebelum dan Sesudah Pemanasan. *JRST (Jurnal Riset Sains dan Teknologi)* 7(2): 191-199. doi: <https://doi.org/10.30595/jrst.v7i2.16855>.
- Sumarlin, L.O., Muawanah, A. and Wardhani, P. 2014. Aktivitas Antikanker dan Antioksidan Madu di Pasaran Lokal Indonesia (Anticancer and Antioxidant Activity of Honey in the Market Local Indonesia). *urnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)*. Vol. 19 (3): 136-144.
- Suryani, S. . 2023. Aktivitas Antioksidan Dan Inhibitor Nitrit Oksida Ekstrak Etanol Kulit Biji Kacang Hijau (*Vigna radiata* L.). *Kartika: Jurnal Ilmiah Farmasi* 8(2): 109–119. doi: <https://doi.org/10.26874/kjif.v8i2.712>.
- Tongchai, P. 2024. Antioxidant Capacity, Phytochemicals, Minerals, and Chemical Pollutants in Worker Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Broods from Northern Thailand: A Safe and Sustainable Food Source. *Foods* 13(13): 1-14. doi: <https://doi.org/10.3390/foods13131998>.
- Upadhyay, S. and Dixit, M. 2015. Role of polyphenols and other phytochemicals on molecular signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015. Hindawi Publishing Corporation. 2015: 2-15 doi: <https://doi.org/10.1155/2015/504253>.
- Yodha, A.W.M.. 2024. Secondary Metabolite Compounds from *Alpinia monopileura* Extract and Evaluation of Anti-Inflammatory Activity based on In Vitro and In Silico Studies. *Hayati Journal of Biosciences* 31(6): 1154–1164. doi: <https://doi.org/10.4308/hjb.31.6.1154-1164>.
- Yodha, A.W.M., Abdillah, M., Indalifany, A. and Chahyadi, A. 2021. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Antioksidan Dari Ekstrak Metanol Kayu Secang (*Caesalpinia sappan*). *Jurnal Farmasi Sains dan Praktis (JFSP)*: 214-223. Available at: <http://journal.ummgl.ac.id/index.php/pharmacy>.
- Zahra, N.N., Muliasari, H., Andayani, Y. and Sudarma, I.M. 2021. Karakteristik fisikokimia ekstrak madu dan propolis trigona sp. Asal lombok utara Article Information. *Jurnal Agrotek Ummat* 8 (1):7-14. Journal Homepage: <http://journal.ummat.ac.id/index.php/agrotek>.