

Open access article

Eksplorasi Antioksidan Dan Anti-Inflamasi Madu Hutan Pulau Buton Secara In Vitro Dan Efek Inhibisi Edema Telinga Secara In Vivo

Exploring the Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Forest Honey from Buton Island through In Vitro Assays and In Vivo Edema Inhibition Tests

Penulis / Author (s)

Hariana ¹ 	¹ Program Studi Magister Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Halu, Sulawesi Tenggara, Indonesia
Wahyuni ¹ 	² Faculty of Pharmacy, Thammasat University Research Unit in Drug, Health Product Development and Application (DPH-DA), Thammasat University, Klong Luang, Pathum Thani, Thailand.
Loly Subhiaty Idrus ¹ 	
Fadhliyah Malik ¹ 	Koresponden : Adryan Fristiohady ¹ 
La Ode Muhammad Julian Purnama ² 	e-mail korespondensi: adryanfristiohady@uho.ac.id
Adryan Fristiohady ¹ 	Reviewed: 08-10-2025

Accepted: 28-10-2025

DOI: <https://doi.org/10.32382/mf.v21i2.1633>

ARTICLE INFO

ABSTRACT / ABSTRAK

Keywords:

anti-inflammatory;
antioxidant;
honey;
in-vitro;
in-vivo;

Kata Kunci

anti inflamasi;
anti oksidan;
Madu;
in-vitro;
in-vivo;

Forest honey is a natural product derived from the nectar of wild plant species and contains various bioactive constituents, including flavonoids and phenolic compounds, that contribute to its antioxidant and anti-inflammatory activities. Buton Regency in Southeast Sulawesi is known as a producer of high-quality forest honey; however, scientific evidence regarding its biological properties remains scarce. This study aimed to investigate the free radical scavenging capacity and anti-inflammatory effects of forest honey from Buton using both in vitro and in vivo approaches. Antioxidant activity was evaluated through DPPH and ABTS assays, while anti-inflammatory effects were assessed via BSA protein denaturation inhibition and a xylene-induced mouse ear edema model. The honey demonstrated IC₅₀ values of 71.69 ± 2.73 mg/L (DPPH) and 49.23 ± 4.24 mg/L (ABTS), and an IC₅₀ of 14.17 ± 3.18 mg/L for protein denaturation inhibition. In vivo, high-dose administration significantly reduced ear edema, with inhibition levels comparable to diclofenac sodium. Statistical analyses confirmed significant differences across most parameters ($p < 0.05$). These results indicate that Buton forest honey possesses promising antioxidant and anti-inflammatory properties, supporting its potential development as a natural therapeutic agent.

Madu hutan merupakan produk alami yang dihasilkan dari nektar tumbuhan liar dan kaya akan senyawa bioaktif seperti flavonoid dan fenolik, yang diketahui memiliki potensi sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Kabupaten Buton, Sulawesi Tenggara, dikenal sebagai salah satu daerah penghasil madu hutan, namun kajian ilmiah terkait

aktivitas biologisnya masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji aktivitas antioksidan dan efek antiinflamasi madu hutan Buton secara *in vitro* dan *in vivo*. Uji antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH dan ABTS, sedangkan aktivitas antiinflamasi diuji melalui metode inhibisi denaturasi protein BSA serta model edema telinga mencit yang diinduksi oleh *xylene*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa madu hutan Buton memiliki nilai IC_{50} sebesar $71,69 \pm 2,73$ mg/L pada uji DPPH dan $49,23 \pm 4,24$ mg/L pada uji ABTS. Pada uji denaturasi protein, nilai IC_{50} yang diperoleh sebesar $14,17 \pm 3,18$ mg/L. Secara *in vivo*, pemberian madu dosis tinggi mampu menurunkan ketebalan telinga mencit secara signifikan, dengan persentase inhibisi yang mendekati efek dari natrium diklofenak. Uji statistik menunjukkan bahwa sebagian besar parameter menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Dengan demikian, madu hutan Buton berpotensi dikembangkan sebagai agen antioksidan dan antiinflamasi alami.

PENDAHULUAN

Kesehatan masyarakat di Indonesia saat ini masih didominasi oleh tingginya angka kejadian penyakit infeksi dan tidak menular, yang sebagian besar melibatkan mekanisme inflamasi dalam proses patologinya. Berdasarkan Profil Kesehatan Indonesia 2023, sejumlah penyakit seperti asma, stroke, diabetes melitus, kanker, penyakit jantung, dan penyakit sendi tercatat mengalami peningkatan kasus setiap tahunnya. Selain itu, penyakit infeksi seperti infeksi saluran pernapasan akut (ISPA), pneumonia, tuberkulosis, hepatitis, malaria, dan diare juga masih menjadi kontributor utama angka morbiditas di berbagai daerah di Indonesia. Tidak hanya itu, tingginya angka cedera fisik dan trauma di masyarakat turut memperburuk kondisi tersebut, karena dapat memicu inflamasi akut yang bila tidak tertangani dengan baik berpotensi berkembang menjadi inflamasi kronis dan meningkatkan risiko komplikasi penyakit degeneratif seperti kanker, penyakit kardiovaskular, dan gangguan neurodegenerative (1).

Inflamasi sendiri merupakan mekanisme pertahanan alami tubuh terhadap rangsangan berbahaya, baik berupa infeksi, cedera, maupun paparan zat toksik (2). Proses ini ditandai dengan pelepasan berbagai mediator proinflamasi seperti tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), cyclooxygenase-2 (COX-2), dan inducible nitric oxide synthase (iNOS) yang bekerja memediasi reaksi peradangan (3,4). Pada kondisi inflamasi kronis, mediator-mediator ini akan terus diproduksi secara berlebihan dan dapat menyebabkan kerusakan jaringan permanen serta menjadi faktor risiko berbagai penyakit degeneratif (5). Proses inflamasi seringkali diiringi oleh stres oksidatif, yaitu ketidakseimbangan antara

produksi radikal bebas dan sistem antioksidan tubuh (6,7). Akumulasi radikal bebas dapat memicu kerusakan biomolekul penting seperti lipid, protein, dan DNA, yang pada akhirnya memperparah proses inflamasi melalui aktivasi jalur molekuler seperti NF- κ B dan peningkatan ekspresi iNOS dan COX-2 (8). Oleh karena itu, penanganan inflamasi sebaiknya tidak hanya fokus pada inhibisi mediator proinflamasi, tetapi juga melibatkan agen antioksidan yang mampu menetralkan radikal bebas.

Penggunaan antiinflamasi sintetik seperti non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) memang efektif menekan inflamasi, namun pemakaian jangka panjangnya berisiko menimbulkan efek samping serius seperti tukak lambung dan gangguan fungsi ginjal. Upaya pencarian agen antiinflamasi dan antioksidan berbasis bahan alam yang lebih aman dan efektif terus diteliti (9). Salah satu bahan alam yang potensial adalah madu hutan, yang telah lama digunakan secara tradisional untuk berbagai keperluan pengobatan. Madu mengandung beragam senyawa bioaktif, seperti flavonoid (quercetin, kaempferol, chrysin), asam fenolat (gallic acid, caffeic acid), enzim antioksidan, vitamin, dan mineral yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi (10–12). Beberapa penelitian menyebutkan bahwa madu mampu menghambat peroksidasi lipid, menekan produksi mediator inflamasi, serta mempercepat penyembuhan jaringan yang mengalami inflamasi (6,13).

Berdasarkan latar belakang tersebut, hingga saat ini masih terbatas data ilmiah yang membahas potensi madu hutan lokal Indonesia, khususnya madu hutan asal Desa Wakalambe, Kecamatan Kapontori, Kabupaten Buton, dalam aktivitas antioksidan dan antiinflamasi. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk

mengevaluasi aktivitas antioksidan dan antiinflamasi madu hutan. Aktivitas antioksidan diuji secara *in vitro* menggunakan metode DPPH dan ABTS. Sementara itu, aktivitas antiinflamasi diuji secara *in vitro* melalui metode inhibisi denaturasi protein dan secara *in vivo* menggunakan model edema telinga mencit akibat induksi *xylene*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan dasar ilmiah bagi pengembangan produk fitofarmaka atau suplemen kesehatan berbasis madu hutan Sulawesi Tenggara.

METODE

Desain, tempat dan waktu

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian observasi laboratorium eksperimental. Penelitian ini melibatkan preparasi sampel madu hutan. Selanjutnya, dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dan antiinflamasi secara *in vitro* dan *in vivo*. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan secara *in vitro* menggunakan tiga metode yaitu DPPH, dan ABTS, untuk menentukan kapasitas peredaman radikal bebas dan perlindungan terhadap oksidasi. Sementara itu, uji aktivitas antiinflamasi dilakukan secara *in vitro* melalui metode inhibisi denaturasi protein. Selain itu, pengujian aktivitas antiinflamasi secara *in vivo* dilakukan menggunakan model edema telinga mencit yang diinduksi *xylene*, untuk mengevaluasi kemampuan madu dalam menekan respon inflamasi akut. Hasil penelitian dianalisis berdasarkan nilai IC₅₀ (untuk uji DPPH, ABTS, denaturasi protein) dan pengurangan ketebalan telinga pada model mencit. Seluruh rangkaian penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Halu Oleo.

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi sampel madu hutan asal Desa Wakalambe, Kecamatan Kapontori, Kabupaten Buton Provinsi Sulawesi Tenggara. Natrium diklofenak (phapros® Semarang, Indonesia). Asam asetat glasial (CH₃COOH), asam askorbat, dinatrium hidrogen fosfat (Na₂HPO₄), natrium klorida (NaCl), natrium dihidrogen fosfat (NaH₂PO₄), natrium hidroksida. 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). Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini *microplate reader* (Biorad iMark™).

Preparasi sampel

Sampel madu ditimbang sebanyak 1gram, kemudian disonikasi (Elmazonik®, India) dengan 10 ml etanol 70% (Onemed®, Indonesia) selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah homogen, kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat 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 (14).

Uji Aktivitas Antioksidan

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

Kemampuan penangkapan radikal bebas melalui metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dievaluasi menggunakan prosedur kerja dari metode oleh Tongchai *et al*, (2024) dengan beberapa penyesuaian. Larutan DPPH disiapkan dengan cara melarutkan 10 mg serbuk DPPH ke dalam 100 mL metanol hingga terbentuk larutan homogen. Larutan tersebut kemudian disimpan dalam kondisi gelap pada suhu ruang selama 30 menit sebelum digunakan untuk memastikan kestabilan radikal bebasnya. Selanjutnya, pada masing-masing konsentrasi sampel madu (6,25 ppm-100 ppm), sebanyak 50 µL larutan sampel ditambahkan ke dalam 80 µL larutan DPPH yang telah dimasukkan ke dalam microplate 96 sumur. Campuran tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dalam kondisi terlindung dari cahaya. Sebagai kontrol, digunakan aquadest dan larutan DPPH untuk kontrol negatif, sedangkan asam askorbat digunakan sebagai kontrol positif. Nilai absorbansi campuran diukur menggunakan *microplate reader* (Biorad iMark™) pada panjang gelombang 517 nm. Aktivitas antioksidan madu ditentukan berdasarkan nilai IC₅₀, dengan persentase inhibisi diperoleh melalui rumus perhitungan tertentu (15):

$$I(\%) = \left(\frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Keterangan: Absorbansi kontrol merupakan nilai absorbansi larutan DPPH tanpa penambahan sampel (kontrol negatif), sedangkan absorbansi bahan uji diperoleh dari campuran larutan ABTS dengan sampel pada berbagai konsentrasi.

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

Aktivitas penangkap radikal bebas menggunakan metode ABTS (2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) dilakukan berdasarkan prosedur oleh Tongchai *et al*, (2024)

dengan beberapa penyesuaian. Larutan radikal ABTS⁺ dibuat dengan cara melarutkan 36 mg serbuk ABTS dan 7 mg kalium persulfat masing-masing ke dalam 5 mL aquadest, kemudian kedua larutan tersebut dicampur dan diinkubasi selama 12–16 jam dalam kondisi gelap untuk membentuk radikal ABTS stabil. Selanjutnya, sebanyak 50 µL larutan sampel madu pada berbagai konsentrasi (6,25 ppm hingga 100 ppm) dicampurkan dengan 50 µL larutan ABTS dalam microplate 96 sumur. Campuran tersebut diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Aquadest dan larutan ABTS digunakan sebagai kontrol negatif, sedangkan asam askorbat dipakai sebagai kontrol positif. Nilai absorbansi kemudian diukur pada panjang gelombang 734 nm menggunakan *microplate reader* (Biorad iMark™). Aktivitas antioksidan ditentukan berdasarkan nilai IC₅₀. Persentase inhibisi dihitung menggunakan rumus:

$$I(\%) = \left(\frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100$$

(2)

Keterangan: Absorbansi kontrol merupakan nilai absorbansi larutan ABTS tanpa penambahan sampel (kontrol negatif), sedangkan absorbansi bahan uji diperoleh dari campuran larutan ABTS dengan sampel pada berbagai konsentrasi.

Uji Antiinflamasi

Metode Denaturasi Protein

Pengujian aktivitas antiinflamasi melalui mekanisme inhibisi denaturasi protein dilakukan berdasarkan metode Yodha *et al.*, (2024) yang telah dimodifikasi. Larutan uji disiapkan menggunakan Tris Buffer Saline (TBS), larutan bovine serum albumin (BSA) 0,2%, serta larutan kontrol positif natrium diklofenak. Sampel madu diuji pada berbagai konsentrasi (6,25 ppm-100 ppm). Sebanyak 2 mL larutan madu pada masing-masing konsentrasi dicampurkan dengan 2 mL larutan BSA 0,2%, kemudian campuran tersebut diinkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit. Setelah inkubasi awal, larutan dipanaskan pada suhu 72°C selama 5 menit untuk memicu denaturasi protein, lalu didinginkan kembali pada suhu ruang selama 25 menit. Absorbansi campuran kemudian diukur pada panjang gelombang 660 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Thermo Scientific®). Persentase inhibisi denaturasi protein dihitung dengan rumus (6):

% penghambatan aktivitas antiinflamasi (6)

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{(\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{sampel}})}{\text{Abs}_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Hasil persentase inhibisi dari setiap konsentrasi diplot ke dalam kurva regresi linear untuk menentukan nilai IC₅₀ (konsentrasi penghambatan 50%). Sampel yang memiliki penghambatan lebih dari 20% dianggap memiliki aktivitas antiinflamasi (16).

Metode Efek Antiinflamasi Madu Hutan secara *In Vivo* Menggunakan Model Edema Telinga Mencit

Pengujian efek antiinflamasi secara *in vivo* menggunakan model edema telinga mencit yang diinduksi oleh *xylene* mengikuti metode Fristiody *et al.*, (2025) yang telah dimodifikasi. Penelitian ini telah memperoleh persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Hewan Coba Universitas Halu Oleo dengan nomor: 563a/UN29.20.1.2/PG/2025. Sebanyak 18 ekor mencit jantan strain BALB-C berusia 8–10 minggu dengan berat badan antara 20–30 gram. Hewan-hewan tersebut dipelihara dalam kondisi lingkungan terkendali, termasuk siklus terang dan gelap selama 12 jam, suhu ruangan dijaga pada 22 ± 2°C, serta kelembapan relatif berkisar antara 60–70%. Selama masa pemeliharaan, mencit diberikan pakan dan air minum secara teratur. Sebelum dimulainya percobaan, seluruh hewan terlebih dahulu melalui masa aklimatisasi selama minimal tujuh hari. Pada hari kedelapan mencit dibagi secara acak ke dalam enam kelompok perlakuan. Kelompok pertama berfungsi sebagai kontrol normal tanpa perlakuan induksi *xylene*, sementara kelompok kedua sebagai kontrol negatif yang diberikan larutan Na-CMC 0,5% secara per oral. Kelompok ketiga merupakan kontrol positif yang menerima natrium diklofenak dengan dosis 0,2 mg. Adapun tiga kelompok lainnya masing-masing menerima larutan madu hutan dengan konsentrasi 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, dan 100 mg/kg BB secara per oral. seluruh mencit (kecuali kelompok kontrol normal) diinduksi secara topikal menggunakan *xylene* sebanyak 30 µL yang diteteskan pada permukaan telinga kanan bagian anterior untuk memicu reaksi inflamasi lokal, sedangkan telinga kiri dibiarkan tanpa perlakuan sebagai kontrol internal. Ketebalan telinga kanan diukur menggunakan alat pengukur ketebalan digital (*digital thickness gauge*) pada menit ke-0 (sebelum pemberian *xylene*), serta menit ke-15, 30, dan 45 setelah perlakuan. Persentase inflamasi dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{Inflamasi} = [(Dt - D0) / D0] \times 100 \quad (8)$$

di mana Dt adalah ketebalan telinga pada setiap titik waktu dan D0 adalah ketebalan dasar

sebelum induksi. Persentase penghambatan dihitung sebagai:

$$\% \text{ Penghambatan} = [(a - b)/a] \times 100 \quad (9)$$

di mana a adalah % peradangan pada kelompok tanpa perlakuan dan b adalah % peradangan pada kelompok perlakuan (3)

Pengolahan dan analisis data

Analisis statistik dilakukan menggunakan IBM SPSS versi 29. Uji *one-way* ANOVA digunakan untuk membandingkan nilai IC_{50} dari uji antioksidan dan antiinflamasi *in vitro* antar kelompok. Uji dilanjutkan dengan *post hoc Bonferroni* jika data memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas. Untuk data *in vivo*, digunakan *repeated measures* ANOVA diikuti uji *Bonferroni*. Hasil dianggap signifikan jika $p < 0.05$.

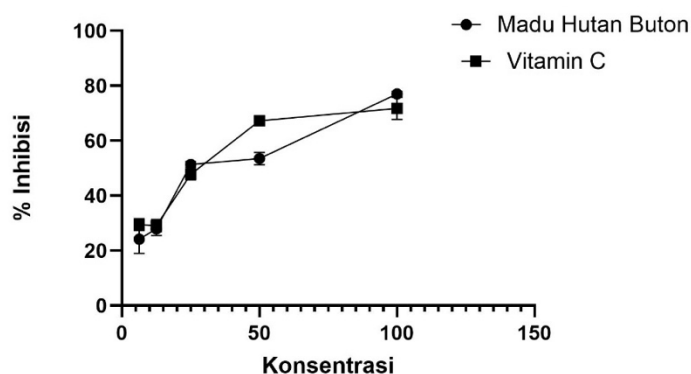
HASIL

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

Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan sampel madu Buton dalam menetralkan radikal bebas. Nilai IC_{50} masing-masing sampel dihitung sebagai indikator potensi antioksidan yang dimilikinya. Data absorbansi pada berbagai konsentrasi sampel disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 1, yang menggambarkan hubungan antara konsentrasi sampel dan persentase inhibisi aktivitas antioksidan. Nilai IC_{50} ditentukan berdasarkan persamaan regresi linier yang diperoleh dari hubungan tersebut.

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

Sampel	IC ₅₀			Mean±SD
	I	II	III	
Madu Buton	46.44	46.86	40.53	44.61 ± 3.54
Vitamin C	39.69	44.22	38.03	40.65 ± 3.20



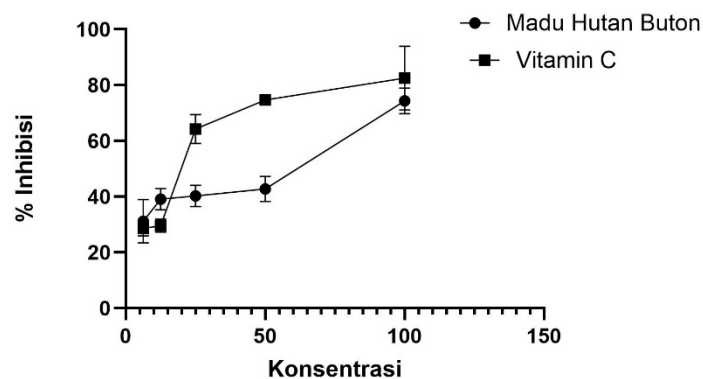
Gambar 1. Aktivitas penangkap radikal bebas dari sampel madu. Nilai ditampilkan sebagai rata-rata ± standar deviasi dari tiga kali pengulangan (n=3).

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

Uji ABTS digunakan untuk mengevaluasi kapasitas penangkapan radikal kation ABTS dari madu Buton. Semakin kecil nilai IC_{50} , menunjukkan aktivitas antioksidan yang semakin tinggi. Hasil pengujian ditampilkan pada Tabel 2 dan Gambar 2.

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

Sampel	IC ₅₀			Mean±SD
	I	II	III	
Madu Buton	50.83	52.42	44.42	49.23 ± 4.24
Vitamin C	35.54	34.51	39.79	36.61 ± 2.80



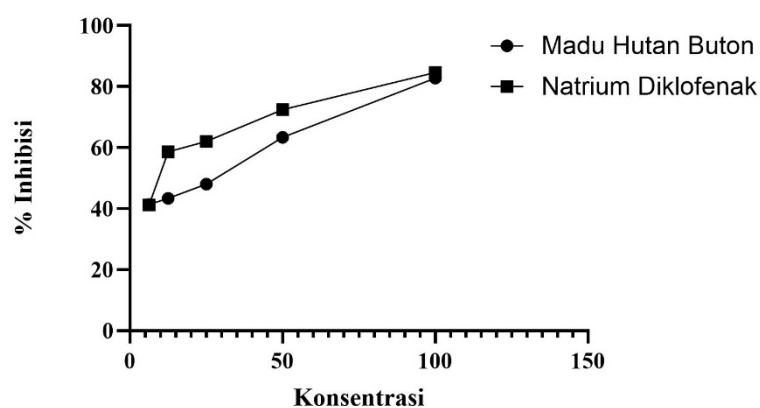
Gambar 2. Aktivitas penangkap radikal bebas dari sampel madu. Nilai ditampilkan sebagai rata-rata $\pm$ standar deviasi dari tiga kali pengulangan ($n = 3$).

Metode Denaturasi Protein

Uji ini dilakukan untuk mengukur kemampuan madu Buton dalam mencegah denaturasi protein akibat pemanasan, yang mencerminkan aktivitas antiinflamasi. Nilai inhibisi dihitung untuk masing-masing konsentrasi, dan disajikan pada Tabel 3 dan Gambar 3.

Tabel 3. Nilai IC_{50} madu berdasarkan uji aktivitas antiinflamasi

Sampel	IC ₅₀			$\bar{x} \pm SD$
	I	II	III	
Madu Buton	19.89	16.77	21.39	14.17 $\pm$ 3.18
Natrium Diklofenak	9.93	5.58	1.97	5.83 $\pm$ 3.99



Gambar 3. Uji aktivitas antiinflamasi madu hutan Buton menggunakan natrium diklofenak sebagai kontrol positif. Hasil disajikan dalam bentuk rata-rata $\pm$ standar deviasi ($n=3$).

Metode Efek Antiinflamasi Madu Hutan secara *In Vivo* Menggunakan Model Edema Telinga Mencit

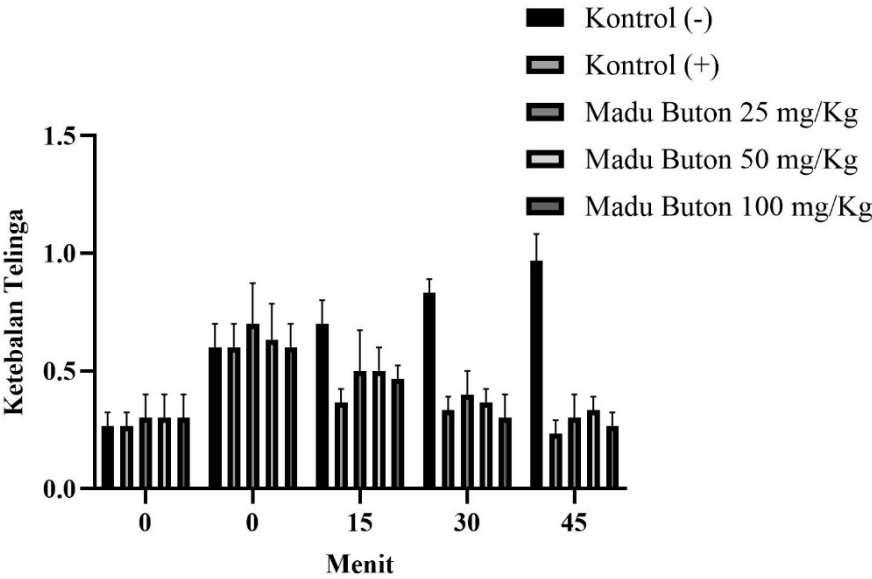
Model edema telinga diinduksi *xylene* digunakan untuk menguji aktivitas antiinflamasi madu Buton secara *in vivo*. Penurunan berat telinga mencerminkan efek penghambatan inflamasi. Data hasil pengujian disajikan pada Tabel 4 dan Gambar 4 dan 5.

Tabel 4. Persentase edema dan persentase inhibisi (penghambatan) oleh madu hutan Buton pada mencit yang diinduksi *xylene* pada telinga kanan. Data disajikan sebagai nilai rata-rata (n=3).

Sample	Sebelum Induksi dengan <i>Xylene</i>	SD	Setelah Induksi dengan <i>Xylene</i>	SD	Setelah perlakuan dengan sampel (menit ke-15)	SD
Kontrol (-)	0.27	0.06	0.60	0.10	0.70	0.10
Kontrol (+)	0.27	0.06	0.60	0.10	0.37	0.06
Madu Buton 25 mg/kg	0.30	0.10	0.70	0.17	0.50	0.17
Madu Buton 50 mg/kg	0.30	0.10	0.63	0.15	0.50	0.10
Madu Buton 100 mg/kg	0.30	0.10	0.60	0.10	0.47	0.06

Lanjutan Tabel 4.

Sample	Setelah perlakuan dengan sampel (menit ke-30)	SD	Setelah perlakuan dengan sampel (menit ke-45)	SD	% Inhibisi	SD
Kontrol (-)	0.83	0.06	0.97	0.12	0.00	0.00
Kontrol (+)	0.33	0.06	0.23	0.06	89.97	14.00
Madu Buton 25 mg/kg	0.40	0.10	0.30	0.10	81.10	20.70
Madu Buton 50 mg/kg	0.37	0.06	0.33	0.06	81.43	19.69
Madu Buton 100 mg/kg	0.30	0.10	0.27	0.06	90.01	21.07



Gambar 4. Ketebalan telinga kanan pada edema yang diinduksi *xylene* pada mencit. Data diukur pada menit ke-15, 30, dan 45. Data disajikan sebagai rata-rata (n=3).

PEMBAHASAN

Madu hutan mengandung berbagai senyawa aktif seperti flavonoid, fenol, vitamin, dan enzim yang berkontribusi terhadap efek farmakologis, termasuk sebagai antioksidan dan antiinflamasi (10,14). Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) bertujuan untuk mengevaluasi kemampuan madu dalam mereduksi radikal bebas stabil (17). Berdasarkan hasil yang diperoleh, madu hutan Buton menunjukkan aktivitas peredaman radikal DPPH dengan nilai IC_{50} sebesar 44.61 ± 3.54 mg/L, mendekati aktivitas pembanding alami vitamin C sebesar 40.65 ± 3.20 mg/L. Semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan semakin tinggi daya antioksidan suatu senyawa (18). Hasil ini mengindikasikan bahwa madu memiliki kapasitas yang signifikan dalam menangkap radikal bebas, diduga karena kandungan senyawa fenolik dan flavonoidnya seperti quercetin, apigenin, dan asam ferulat. Temuan ini sejalan dengan studi oleh Mahani *et al.* (2022), yang melaporkan bahwa madu dengan kandungan fenolik tinggi memperlihatkan aktivitas antioksidan kuat pada pengujian DPPH (19). Hasil tersebut sejalan dengan penelitian Zulfa, dkk (2021) yang menunjukkan madu lebah tanpa sangat memiliki nilai IC_{50} sebesar 80.06 mg/L (20). serta studi oleh Fakhri *et al.* (2024) yang menemukan madu hutan Madu Trigona *sarawakensis* ekstrak memiliki aktivitas antioksidan kuat dengan IC_{50} 6.742 mg/L (21). Perbandingan ini menunjukkan bahwa madu hutan Buton memiliki potensi antioksidan yang sebanding dengan madu dari daerah lain di Indonesia, yang dapat dikaitkan dengan kesamaan kandungan fenolik dan flavonoidnya.

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS dilakukan untuk mengetahui kemampuan sampel dalam menangkap radikal kation $ABTS^+$ (22,23). Metode ini banyak digunakan karena bersifat sederhana, sensitif, dan dapat diaplikasikan pada senyawa bersifat hidrofilik maupun lipofilik. Prinsip kerja uji ABTS didasarkan pada kemampuan senyawa antioksidan mendonorkan elektron atau hidrogen sehingga mengurangi radikal $ABTS^+$ yang berwarna biru kehijauan, menjadi tidak berwarna (23). Penurunan absorbansi diamati pada panjang gelombang 734 nm. Berdasarkan hasil pengujian, madu hutan Buton memiliki nilai IC_{50} sebesar 49.23 ± 4.24 mg/L, yang menunjukkan aktivitas antioksidan lebih lemah dibanding vitamin C dengan IC_{50} 36.61 ± 2.80 mg/L. Nilai IC_{50} madu Buton tergolong antioksidan kuat, karena berada di bawah 50 mg/L. Aktivitas ini berkaitan dengan

kandungan total fenolik dan flavonoid dalam madu yang mampu mereduksi radikal $ABTS^+$ (24). Hasil tersebut sejalan dengan penelitian Lianda, *et al.* (2012) yang menunjukkan madu hutan jenis multiflora memiliki nilai IC_{50} berkisar 46.53 mg/L (26).

Metode *in vitro* yang sering digunakan untuk menilai aktivitas antiinflamasi adalah uji denaturasi protein *Bovine Serum Albumin* (BSA), yang mengukur kemampuan senyawa dalam mempertahankan struktur protein dari kerusakan akibat panas (26). Peradangan sendiri merupakan respons tubuh terhadap stres, cedera, atau infeksi, yang bila berlangsung lama dapat menyebabkan denaturasi protein dan memicu gangguan autoimun (27). Oleh karena itu, perlindungan terhadap denaturasi protein mencerminkan potensi antiinflamasi suatu zat, dalam penelitian ini madu hutan Buton menunjukkan kemampuan menghambat denaturasi protein dengan nilai IC_{50} sebesar 14.17 ± 3.18 mg/L. Meskipun tidak sekuat natrium diklofenak 5.83 ± 3.99 mg/L, hasil ini menunjukkan aktivitas yang tergolong sedang hingga kuat IC_{50} 10–30 mg/L (16). Aktivitas ini diduga berasal dari senyawa fenolik dan flavonoid dalam madu yang berperan dalam menstabilkan protein serta menghambat reaksi oksidatif dan inflamasi (29).

Metode induksi peradangan akut dengan menggunakan *xylene* pada telinga mencit merupakan teknik yang lazim diterapkan untuk mengevaluasi potensi senyawa antiinflamasi, terutama dari golongan steroid. Meskipun demikian, senyawa antiinflamasi nonsteroid (NSAID) juga dapat memberikan respon, meskipun umumnya lebih ringan. Aplikasi *xylene* secara topikal menyebabkan terjadinya vasodilatasi, pembengkakan (edema), serta infiltrasi sel-sel imun sebagai tanda khas dari inflamasi akut (3,29). Pada penelitian ini, madu hutan asal Buton menunjukkan kemampuan untuk mengurangi penebalan telinga mencit secara signifikan pada menit ke-15, 30, dan 45 setelah perlakuan *xylene* (Gambar 4). Penurunan ketebalan ini merupakan indikasi adanya aktivitas antiinflamasi, dengan respons yang semakin kuat seiring bertambahnya dosis madu. Efek yang ditimbulkan bahkan mendekati kontrol positif natrium diklofenak, yang bekerja dengan menghambat sintesis prostaglandin melalui jalur enzim siklooksigenase (COX). Oleh karena itu, diduga madu hutan Buton juga berpotensi bekerja melalui mekanisme serupa atau dengan mengintervensi mediator inflamasi awal. *Xylene* diketahui dapat memicu pelepasan mediator inflamasi seperti substansi P (SP) dari neuron sensorik dan sel-sel imun seperti makrofag, eosinofil, limfosit, serta sel dendritik.

SP akan berinteraksi dengan reseptor neurokinin-1 (NK-1R), memicu peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan migrasi leukosit, yang akhirnya menyebabkan edema lokal. Kemungkinan, madu hutan Buton mampu menghambat jalur ini, sehingga menurunkan pembentukan edema dalam waktu singkat, yakni dalam 30 menit setelah induksi (3). Selain itu, hasil pengamatan menunjukkan bahwa madu dengan dosis tinggi menghasilkan efek penurunan ketebalan telinga yang lebih jelas pada waktu observasi lebih lama. Semakin tinggi nilai persen inhibisi, maka semakin kuat kemampuan antiinflamasinya. Madu hutan Buton dengan dosis tertinggi menunjukkan persen inhibisi yang mendekati kontrol positif, menandakan potensi yang kuat dalam menghambat inflamasi. Aktivitas ini dapat dikaitkan dengan keberadaan flavonoid dan senyawa fenolik yang diketahui berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi (14,30).

Analisis statistik dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan nilai IC_{50} hasil uji DPPH, ABTS, dan inhibisi denaturasi protein BSA antara madu hutan Buton 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 Buton, yang berarti aktivitasnya lebih kuat. Selain itu, pada uji *in vivo* menggunakan model edema telinga mencit, analisis ANOVA satu arah yang diikuti uji lanjut Tukey menunjukkan bahwa madu hutan Buton dosis tinggi tidak berbeda bermakna secara statistik ($p > 0.05$) dengan kontrol positif natrium diklofenak, yang mengindikasikan bahwa efektivitas antiinflamasi madu setara dengan obat standar.

KESIMPULAN

Madu hutan Buton memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi secara *in vitro* dengan cara mereduksi radikal bebas melalui metode DPPH dan ABTS, menghambat denaturasi protein. Selain itu, secara *in vivo* madu ini juga menurunkan ketebalan edema telinga kanan mencit yang diinduksi *xylene*, mendekati efek kontrol positif. Efek tersebut didukung oleh kandungan flavonoid, fenol, dan vitamin dalam madu.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini,

disarankan agar dilakukan eksplorasi lebih lanjut terhadap mekanisme molekuler madu hutan Buton dalam menghambat inflamasi, termasuk uji ekspresi protein proinflamasi seperti iNOS atau TNF- α . Selain itu, identifikasi senyawa bioaktif secara lebih mendalam dan uji toksisitas diperlukan untuk mendukung pengembangan madu ini sebagai kandidat antiinflamasi alami yang aman dan efektif.

UCAPAN TERIMA KASIH

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

1. Kementerian Kesehatan RI. Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2023. Jakarta: Kemenkes RI; 2023.
2. Fristiyohadi A, Wahyuni W, Kalimin WOIL, Permana LOMJ, Saripuddin S, Sahidin I. Anti-inflammatory activity of marine sponge *Aaptos* sp. to the plasma interleukin-1 β level in Wistar male rats. *Pharm Clin Pharm Res*. 2019;4(2):35–41.
3. Fristiohady A, Mahmud T, Nuralifah, Idrus LS, Purnama LOMJ, Haruna LA, et al. Anti-inflammatory activities of lycopene on xylene-induced ear oedema in mice and its in-vitro evaluation towards protein denaturation. *Res J Pharm Technol*. 2025;18(3):1052–7.
4. Fristiohady A, Malaka MH, Safitri ARW, Diha D, Saripuddin S, Purnama LOMJ, et al. Anti-inflammatory activity of ethanol extract of marine sponge *Petrosia* sp. by suppression of tumor necrosis factor-alpha levels. *Res J Pharm Technol*. 2021;14(8):4435–9.
5. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010; 140:771–6.
6. Ahmed S, Sulaiman SA, Baig AA, Ibrahim M, Liaqat S, Fatima S, et al. Honey as a potential natural antioxidant medicine: an insight into its molecular mechanisms of action. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018:8367846.

7. Musdalipah M, Tee SA, Karmilah K, Sahidin S, Fristiohady A, Yodha AWM. Total phenolic and flavonoid content, antioxidant, and toxicity test with BSLT of *Meistera chinensis* fruit fraction from Southeast Sulawesi. *Borneo J Pharm*. 2021;4(1):6–15.
8. Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*. 2015; 5:545–89.
9. Mani RJ, Anand M, Agarwal K, Tiwari A, Hashmi QAR, Singh TV, et al. A systematic review of molecular pathway analysis of drugs for potential use in liver cancer treatment. *Drugs Drug Candidates*. 2023;2(2):210–31.
10. Hariana, Fristiohady A. Tinjauan Farmakologi Madu: In Vitro dan In Vivo. Jakarta: Deepublish; 2025.
11. Edo GI, Onoharigbo FO, Akpogheli PO, Akpogheli EO, Agbo JJ, Agoh E, et al. Natural honey (raw honey): insights on quality, composition, economic and health effects. *Food Sci Eng*. 2023; 3:265–93.
12. Alvarez-Suarez JM, Gasparrini M, Forbes-Hernández TY, Mazzoni L, Giampieri F. The composition and biological activity of honey: a focus on manuka honey. *Foods*. 2014; 3:420–32.
13. Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017:1259510.
14. Hulea A, Obîștioiu D, Cocan I, Alexa E, Negrea M, Neacșu AG, et al. Diversity of monofloral honey based on antimicrobial and antioxidant potential. *Antibiotics*. 2022;11(5):650.
15. Tongchai P, Yadoung S, Sutan K, Kawichai S, Danmek K, Maitip J, et al. Antioxidant capacity, phytochemicals, minerals, and chemical pollutants in worker honeybee (*Apis mellifera* L.) broods from northern Thailand. *Foods*. 2024;13(13):2041.
16. Yodha AWM, Badia E, Musdalipah, Reymon, Fauziah Y, Fusvita A, et al. Secondary metabolite compounds from *Alpinia monopleura* extract and evaluation of anti-inflammatory activity based on in vitro and in silico studies. *Hayati*. 2024;31(6):1154–64.
17. Handayani TH. Aktivitas antioksidan, total fenolik, dan total flavonoid madu *Apis mellifera* dari hutan akasia (*Acacia crassicaarpa*) Riau, Indonesia dengan beberapa perlakuan pengeringan. *J Biol Indones*. 2022;18(2):231–43.
18. Yodha AWM, Badia E, Musdalipah, Setiawan MA, Daud NS, Fusvita A, et al. Essential oils of *Alpinia monopleura* and their antibacterial and antioxidant activity. *Molekul*. 2023;18(1):80–8.
19. Mahani M, Subroto E. Hubungan kadar flavonoid dan aktivitas antioksidan madu dari berbagai provinsi di Indonesia. 2022. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/368308279>
20. Zulfa A, Mohd Isa N, Tufail Anham F, Iskamiah M, Yusof H. Quality characteristics, antioxidant and anticancer potential of stingless bee honey and honeybee honey from similar environmental conditions. *IMJM Volume 20 No.4, October 2021*
21. Fakhri TM, Jamilah L, Dzulhijjah L, Fristiohady A, Sodik JJ, Hidayat AF, et al. Exploring the diverse phytochemicals and potent antioxidant properties in bee honey. *Rasayan J Chem*. 2024;17(3):993–1003.
22. Bereksi-Reguig D, Allali H, Taib N, Aissaoui N, Wlodarczyk-Stasiak M, Kowalski R. Bioactive compounds, antioxidant properties, and antimicrobial profiling of west Algerian honeys: in vitro comparative screening prior to therapeutic purpose. *Foods*. 2024;13(24):3925.
23. Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Compos Anal*. 2011;24(7):1043–8.
24. Yodha AWM, Abdillah M, Indalifiany A, Chahyadi A. Isolasi dan identifikasi senyawa antioksidan dari ekstrak metanol kayu secang (*Caesalpinia sappan*). *JFSP*. 2021;7:. Available from: <http://journal.ummgl.ac.id/index.php/pharmacy>
25. Lianda RLP, D'L, Sant'ana O, Echevarria A, Castro RN. Antioxidant activity and phenolic composition of Brazilian honeys and their extracts. *J Braz Chem Soc*. 2012;23:.
26. Novika DS, Ahsanunnisa R, Yani DF. Uji aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

- terhadap penghambatan denaturasi protein. Stannum J Sains Terap Kim. 2021;3(1):16–22.
27. Fristiohady A, WFMNFMIMB, et al. In vitro anti-inflammatory activity of *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith by HRBC membrane stabilization method. J Ilmu Kefarm Indones. 2020;
 28. Alina C, Florescu G, Stanciulescu EC, Berbecaru-Iovan A, Balasoiu RM, Pisoschi CG. In vitro assessment of free radical scavenging effect and thermal protein denaturation inhibition of bee venom for anti-inflammatory use. Curr Health Sci J. 2024;50(1):45–52.
 29. Jiko PA, Mohammad M, Richi FT, Islam MA, Alam S, Taher MA, et al. Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant effects of *Shirakiopsis indica* (Willd.) fruit extract: a mangrove species. J Inflamm Res. 2024; 17:5821–54.
 30. Lawag IL, Islam MK, Sostaric T, Lim LY, Hammer K, Locher C. Antioxidant activity and phenolic compound identification and quantification in Western Australian honeys. Antioxidants. 2023;12(1):78.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution, and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third-party material in this article are included in the article's Creative Commons license unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.