

LAMPIRAN

Lampiran 1. Penentuan Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan ditentukan berdasarkan prosedur uji Parwata (2010) yaitu:

a. Penentuan aktivitas antioksidan

1. Sampel sebanyak 1 g ditambahkan 25 mL etanol
2. Ditambahkan 2 mL DPPH 0,004 %, dikocok
3. Diinkubasi didalam ruang gelap selama 1 jam
4. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm
5. Diukur DPPH sebagai kontrol negatif pada panjang gelombang 517 nm
6. Dihitung % peredaman radikal bebas dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ peredaman} = \frac{\text{absorbansi DPPH} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi DPPH}} \times 100\%$$

7. Dihitung nilai IC₅₀ dengan cara memplotkan nilai % peredaman ($y = 0,5 \times \text{absorbansi blanko}$) kedalam persamaan regresi linear aktivitas antioksidan

b. Analisis Aktivitas Peredaman Radikal Bebas (DPPH) Madu Kaliandra Yang Dihasilkan Dari Tiga Jenis Lebah Yang Berbeda

Persentase aktivitas peredaman radikal bebas (DPPH) madu kaliandra yang dihasilkan oleh *Apis mellifera* (P1)

Perlakuan	Konsentrasi	Absorbansi	%Peredaman
P1U1	0	0,319	
	5	0,291	8,78
	10	0,275	13,79
	15	0,245	23,20
	20	0,224	29,78
P1U2	0	0,322	
	5	0,297	7,76
	10	0,275	14,60
	15	0,239	25,78
	20	0,221	31,37
P1U3	0	0,322	
	5	0,292	9,32
	10	0,276	14,29
	15	0,252	21,74
	20	0,222	31,06

Persentase aktivitas peredaman radikal bebas (DPPH) madu kaliandra yang dihasilkan oleh *Apis cerana* (P2)

Perlakuan	Konsentrasi	Absorbansi	% Peredaman
P2U1	0	0,240	
	5	0,211	12,08
	10	0,187	22,08
	15	0,171	28,75
	20	0,134	44,17
P2U2	0	0,324	
	5	0,295	8,33
	10	0,270	15,12
	15	0,236	26,23
	20	0,221	31,79
P2U3	0	0,380	
	5	0,330	13,16
	10	0,260	31,58
	15	0,230	39,47
	20	0,201	47,11

Persentase aktivitas peredaman radikal bebas (DPPH) madu kaliandra yang dihasilkan oleh *Trigona* sp. (P3)

Perlakuan	Konsentrasi	Absorbansi	% Peredaman
P3U1	0	0,319	
	10	0,287	10,03
	20	0,253	20,69
	30	0,244	23,51
	40	0,208	34,80
P3U2	0	0,322	
	10	0,296	8,07
	20	0,245	23,91
	30	0,228	29,19
P3U3	0	0,428	
	10	0,363	15,19
	20	0,324	24,30
	30	0,282	34,11
	40	0,254	40,65

Hasil perhitungan IC₅₀ madu kaliandra yang dihasilkan dari tiga jenis lebah berbeda

Jenis Lebah	Ulangan	Persamaan Regresi	IC ₅₀ (mg/mL)	Rerata IC ₅₀ ± SD (mg/mL)
<i>Apis mellifera</i>	1	$y = -0,00472x + 0,3180$	33,5805	32,6633 ± 1,098
	2	$y = -0,00520x + 0,3228$	31,1153	
	3	$y = -0,00480x + 0,3208$	33,2916	
<i>Apis cerana</i>	1	$y = -0,00240x + 0,1530$	13,5300	13,5725 ± 0,099
	2	$y = -0,00560x + 0,2398$	13,7100	
	3	$y = -0,00920x + 0,3140$	13,4800	
<i>Trigona</i> sp.	1	$y = -0,00265x + 0,3152$	58,7547	51,4667 ± 5,185
	2	$y = -0,00333x + 0,3227$	48,5585	
	3	$y = -0,00429x + 0,4160$	47,0862	

Lampiran 2. Penentuan Kadar Total Fenolik

Kadar total fenolik ditentukan menggunakan prosedur kerja Sharma (2011) dengan sedikit modifikasi yaitu:

a. Pembatan Kurva Standar Asam Galat

1. Dibuat konsentrasi asam galat 8,000 ppm, 6,750 ppm, 3,375 ppm, 1,688 ppm, dan 0,844 ppm
2. Diambil 1 mL tiap konsentrasi, dimasukkan kedalam tabung reaksi
3. Ditambahkan larutan Na_2CO_3 75 g/L sebanyak 4 mL dan reagen Folin (diencerkan 1:10) sebanyak 5 mL
4. Divortex selama 1 menit
5. Diinkubasi dalam kondisi gelap selama 1 jam
6. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 725 nm

b. Penentuan Kadar Total Fenolik

1. Sejumlah 0,5 g sampel diekstraksi dengan 2 mL dari 90% metanol, kemudian ditempatkan pada orbital shaker selama 120 menit pada 50°C .
2. Campuran kemudian disaring dengan Whatman No1. filter kertas dan filtrat digunakan untuk kuantifikasi dari total fenolat.
3. 100 μL ekstrak sampel dicampur dengan 0,75 mL Folin - Ciocalteau reagen dan campuran dibiarkan disuhu 22°C selama 5 menit .
4. Kemudian 0,75 mL natrium karbonat (60 g/L) larutan ditambahkan ke dalam campuran. Setelah 90 menit di 22°C , absorbansi diukur pada 725 nm.
5. Pengukuran dibandingkan dengan kurva standar asam galat (G) dan dinyatakan sebagai rata-rata (\pm SD) mg asam galat (GA).

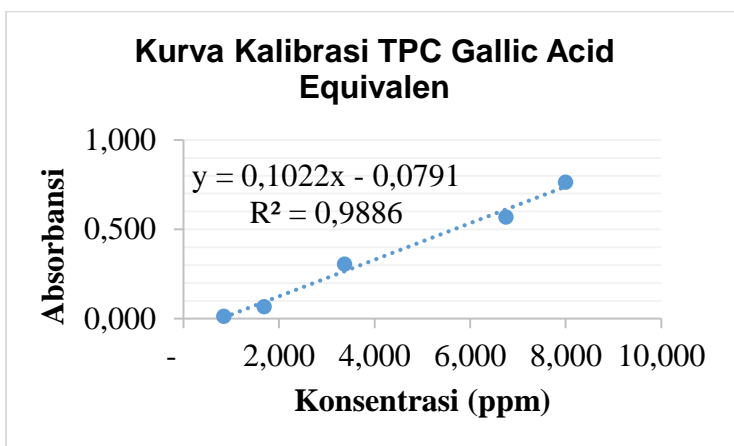
c. Data Analisis Kadar Total Fenolik Pada Madu Kaliandra Dari Tiga Jenis Lebah Yang Berbeda

Kadar Total Fenolik (mg GAE/g)

Ulangan	Sampel Analisis (g)	FP	absorbansi	Total fenolik	Rerata \pm SD
P1U1	0,5543	121,58	0,190	1,629	1,187 \pm 0,3220
P1U2	0,5543	79,04	0,221	1,059	
P1U3	0,5543	65,10	0,405	0,872	
P1U4	0,5543	88,58	0,272	1,187	
P2U1	0,5386	147,77	0,216	1,959	1,351 \pm 0,4367
P2U2	0,5386	86,13	0,290	1,142	
P2U3	0,5386	71,82	0,304	0,952	
P2U4	0,5386	101,91	0,270	1,351	
P3U1	0,5211	124,56	0,404	2,698	2,030 \pm 0,5155
P3U2	0,5211	89,97	0,466	1,949	
P3U3	0,5211	66,62	0,571	1,443	
P3U4	0,5211	93,71	0,480	2,030	

Kurva Standar Asam Galat

NO	Konsentrasi (ppm)	ABS RATA-RATA
1	8,000	0,763
2	6,750	0,568
3	3,375	0,305
4	1,688	0,067
5	0,844	0,013



Kurva Hubungan Konsentrasi Asam Galat dengan Tingkat Absorbansi

Lampiran 3. Penentuan Kadar Total Flavonoid

Kadar total flavonoid ditentukan berdasarkan metode kerja Moniruzzaman (2013) dengan sedikit modifikasi yaitu:

a. Pembuatann Larutan Standar Kuersetin

1. 2,5 g kuersetin dilarutkan kedalam 10 mL metanol sebagai larutan standar kuersetin 100 ppm.
2. Dibuat seri konsentrasi larutan standar kuersetin 8,00 ppm, 4,00 ppm, 2,00 ppm, 1,00 ppm, dan 0,50 ppm.
3. Diambil 1 mL tiap konsentrasi, dimasukkan kedalam tabung reaksi
4. Ditambahkan metanol 4 mL dan 0,3 mL NaNO_2 5 %, diinkubasi selama 5 menit
5. Ditambahkan 0,3 mL AlCl_3 10 %, diinkubasi selama 6 menit
6. Ditambahkan 2 mL NaOH 1 M dan 2,4 mL metanol
7. Divortex selama 1 menit, diinkubasi selama 15 menit
8. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 415 nm
9. Dibuat kurva standar kuersetin dengan x = konsentrasi larutan kuersetin dan y = absorbansi

b. Penentuan Kadat Total Flavonoid

1. Sebanyak 0,5 g sampel ditambahkan metanol 2,5 mL dan 0,3 mL NaNO_2 5 %, kemudian diinkubasi selama 5 menit
2. Ditambahkan 0,3 mL AlCl_3 10%, kemudian diinkubasi selama 6 menit
3. Ditambahkan 2 mL NaOH 1 M dan 5 mL metanol
4. Divortex selama 1 menit
5. Diinkubasi selama 15 menit
6. Diiukur absorbansinya pada panjang gelombang 415 nm

7. Dikalibrasi dengan kurva standar kuersetin untuk didapatkan total flavonoid dalam mg QE/g

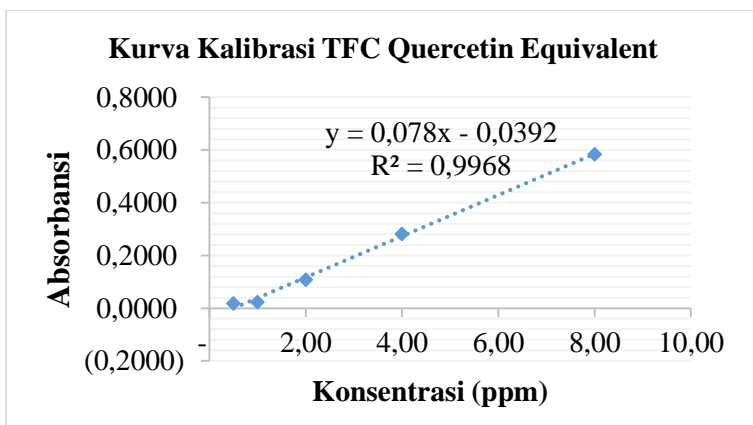
8. Dihitung total flavonoid dalam g QE/g.

c. Data Analisis Kadar Total Flavonoid Pada Madu Kaliandra Dari Tiga Jenis Lebah Yang Berbeda

Ulangan	Berat sampel (g)	FP (mL)	absorpansi	Total fenolik	Rerata \pm SD
P1U1	0,5194	51,00	0,050	0,2807	0,2664 \pm 0,0102
P1U2	0,5194	26,00	0,122	0,2578	
P1U3	0,5194	17,67	0,200	0,2608	
P1U4	0,5194	31,56	0,124	0,2664	
P2U1	0,5601	17,67	0,262	0,1422	0,1176 \pm 0,0193
P2U2	0,5601	13,50	0,272	0,1153	
P2U3	0,5601	11,00	0,285	0,0952	
P2U4	0,5601	14,06	0,273	0,1176	
P3U1	0,5186	51,00	0,046	0,2670	0,2491 \pm 0,0144
P3U2	0,5186	26,00	0,116	0,2486	
P3U3	0,5186	17,67	0,173	0,2317	
P3U4	0,5186	31,56	0,111	0,2491	

Kurva Standar Kuersetin

NO	Konsentrasi (ppm)	ABS RATA-RATA
1	8,00	0,5835
2	4,00	0,2810
3	2,00	0,1075
4	1,00	0,0230
5	0,50	0,0175



Kurva Hubungan Konsentrasi Kuersetin dengan Tingkat Absorbansi

Lampiran 4. Data dan Analisis Statistik Uji Antioksidan Madu

Perlakuan	Ulangan				Jumlah	Rata-rata	SD
	1	2	3	4			
P1	33,58	31,12	33,29	32,63	130,62	32,655	1,098
P2	13,53	13,71	13,48	13,57	54,29	13,5725	0,099
P3	58,75	48,56	47,09	51,467	205,867	51,4667	5,185
Total	105,86	93,39	93,86	97,667	390,78	97,694	6,382

Analisis ragam:

Faktor Koreksi (FK)

$$\begin{aligned}
 \text{FK} &= \frac{(\sum ij Y_{ij})^2}{txr} \\
 &= \frac{(390,777)^2}{12} \\
 &= 12.725,56
 \end{aligned}$$

Jumlah Kuadrat

$$\begin{aligned}
 \text{JK total} &= \sum X^2 - \text{FK} \\
 &= (33,58^2 + 31,12^2 + \dots + 51,467^2) - 12.725,56 \\
 &= 15.681,85 - 12.725,56 \\
 &= 2.956,293
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JK Perlakuan} &= \frac{\sum Y_i^2 + \dots + Y_j^2}{\text{Ulangan}} - \text{FK} \\
 &= \frac{130,62^2 + 54,29^2 + 205,867^2}{4} - 12.725,56 \\
 &= 15.597,55 - 12.725,56 \\
 &= 2.871,997
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JK galat} &= \text{JK total} - \text{JK perlakuan} \\
 &= 2.956,293 - 2.871,997 \\
 &= 84,2958
 \end{aligned}$$

Derajat Bebas (db)

$$\begin{aligned}
 \text{db Perlakuan} &= t - 1 \\
 &= 3 - 1 \\
 &= 2
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{db Galat} &= t(r-1) \\
 &= 3(4-1) \\
 &= 9
 \end{aligned}$$

Kuadrat Tengah (KT)

$$\begin{aligned}
 \text{KT perlakuan} &= \frac{\text{JK perlakuan}}{\text{db perlakuan}} \\
 &= \frac{2.871,997}{2} \\
 &= 1.435,999
 \end{aligned}$$

Kuadrat Tengah (KT)

$$\begin{aligned}
 \text{KT galat} &= \frac{\text{JKgalat}}{\text{db galat}} \\
 &= \frac{84,2958}{9} \\
 &= 9,3662
 \end{aligned}$$

F hitung

$$\begin{aligned}
 \text{F hitung} &= \frac{\text{KT perlakuan}}{\text{KT galat}} \\
 &= \frac{1.435,999}{9,3662} = 153,317
 \end{aligned}$$

Tabel ANOVA

SK	db	JK	KT	F hit	F 0,05	F 0,01
Perlakuan (T)	2	2.871,997	1.435,9	153,317	4,2565	8,0215
Galat (E)	9	84,2958	9,3662			
Total	11					

**Fhitung > Ftabel 1%, menunjukkan bahwa perlakuan memberikan pengaruh yang sangat berbeda nyata ($P < 0,01$).

Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)/ *Least Significant Difference*

$$BNT = (t_{\alpha, db_{\text{error}}}) \times \sqrt{\frac{2MSE}{r}}$$

$$BNT = 3,2498 \times \sqrt{\frac{2(9,3661)}{4}}$$

$$BNT = 7,0327$$

NOTASI

Perlakuan	Rataan	Notasi	Rata-Rata + BNT
P2	13,5733	a	20,6061
P1	32,6633	b	39,6961
P3	51,4667	c	58,5995

Lampiran 5. Data dan Analisis Statistik Uji Fenolik Madu

Perlakuan	Ulangan				Jumlah	Rata-rata	SD
	1	2	3	4			
P1	1,629	1,059	0,872	1,187	4,747	1,187	0,3220
P2	1,96	1,14	0,95	1,35	5,40	1,35	0,4368
P3	2,698	1,949	1,443	2,030	8,12	2,03	0,5155
Total	6,2867	4,1502	3,2678	4,5682	18,2730	4,5682	1,2744

Analisis ragam:

Faktor Koreksi (FK)

$$\begin{aligned}
 \text{FK} &= \frac{(\sum_{ij} Y_{ij})^2}{txr} \\
 &= \frac{(18,2730)^2}{12} \\
 &= 27,8252
 \end{aligned}$$

Jumlah Kuadrat

$$\begin{aligned}
 \text{JK total} &= \sum X^2 - \text{FK} \\
 &= (1,629^2 + 1,059^2 + \dots + 2,030^2) - 27,8252 \\
 &= 31,1049 - 27,8252 = 3,2797
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JK Perlakuan} &= \frac{\sum Y_i^2 + \dots + Y_j^2}{\text{Ulangan}} - \text{FK} \\
 &= \frac{4,747^2 + 5,40^2 + 8,12^2}{4} - 27,8252 \\
 &= 1,5986
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JK galat} &= \text{JK total} - \text{JK perlakuan} \\
 &= 3,2797 - 1,5986 \\
 &= 1,6810
 \end{aligned}$$

Derajat Bebas (db)

$$\begin{aligned} \text{db Perlakuan} &= t - 1 \\ &= 3 - 1 \\ &= 2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{db Galat} &= t (r-1) \\ &= 3 (4-1) \\ &= 9 \end{aligned}$$

Kuadrat Tengah (KT)

$$\begin{aligned} \text{KT perlakuan} &= \frac{\text{JK perlakuan}}{\text{db perlakuan}} \\ &= \frac{1,5986}{2} \\ &= 0,7993 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KT galat} &= \frac{\text{JK galat}}{\text{db galat}} \\ &= \frac{1,6810}{9} \\ &= 0,1867 \end{aligned}$$

F hitung

$$\begin{aligned} \text{F hitung} &= \frac{\text{KT perlakuan}}{\text{KT galat}} \\ &= \frac{0,7993}{0,1867} \\ &= 4,2794 \end{aligned}$$

Tabel ANOVA

SK	db	JK	KT	F hit	F 0,05	F 0,01
Perlakuan (T)	2	1,5986	0,7993	4,2794	4,2565	8,0215
Galat (E)	9	1,6810	0,1867			
Total	11					

**Fhitung > Ftabel 5%, menunjukkan bahwa perlakuan memberikan pengaruh berbeda nyata ($P < 0,05$).

Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) / *Least Significant Difference*

$$BNT = (t_{\alpha}, db_{\text{error}}) \times \sqrt{\frac{2MSE}{r}}$$

$$BNT = 2,2622 \times \sqrt{\frac{2(0,1867)}{4}}$$

$$BNT = 0,6913$$

NOTASI

Perlakuan	Rataan	Notasi	Rata-Rata + BNT
P1	1,187	a	1,8785
P2	1,350	ab	2,0420
P3	2,030	b	2,7215

Lampiran 6. Data dan Analisis Statistik Uji Flavonoid Madu

Perlakuan	Ulangan				Jumlah	Rata-rata	SD
	1	2	3	4			
P1	0,2907	0,2578	0,2608	0,2664	1,0757	0,2689	0,0102
P2	0,1422	0,1152	0,0951	0,1176	0,4702	0,1176	0,0193
P3	0,267	0,2486	0,2317	0,2491	0,9964	0,2491	0,0439
Total	0,6899	0,6217	0,5876	0,6331	2,5323	0,6331	0,0439

Analisis ragam:

Faktor Koreksi (FK)

$$\begin{aligned}
 \text{FK} &= \frac{(\sum_{ij} Y_{ij})^2}{txr} \\
 &= \frac{(2,5323)^2}{12} \\
 &= 0,5344
 \end{aligned}$$

Jumlah Kuadrat

$$\begin{aligned}
 \text{JK total} &= \sum X^2 - \text{FK} \\
 &= (0,2907^2 + 0,2578^2 + \dots + 0,2491^2) - 0,5344 \\
 &= 0,5895 - 0,5344 \\
 &= 0,0551
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JK Perlakuan} &= \frac{\sum Y_i^2 + \dots + Y_j^2}{\text{Ulangan}} - \text{FK} \\
 &= \frac{1,0757^2 + 0,4702^2 + 0,9964^2}{4} - 0,5344 \\
 &= 0,0530
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{JK galat} &= \text{JK total} - \text{JK perlakuan} \\
 &= 0,0551 - 0,0530 \\
 &= 0,0020
 \end{aligned}$$

Derajat Bebas (db)

$$\begin{aligned} \text{db Perlakuan} &= t - 1 \\ &= 3 - 1 \\ &= 2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{db Galat} &= t(r-1) \\ &= 3(4-1) \\ &= 9 \end{aligned}$$

Kuadrat Tengah (KT)

$$\begin{aligned} \text{KT perlakuan} &= \frac{\text{JK perlakuan}}{\text{db perlakuan}} \\ &= \frac{0,0530}{2} \\ &= 0,0265 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{KT galat} &= \frac{\text{JK galat}}{\text{db galat}} \\ &= \frac{0,0020}{9} \\ &= 0,0002 \end{aligned}$$

F hitung

$$\begin{aligned} \text{F hitung} &= \frac{\text{KT perlakuan}}{\text{KT galat}} \\ &= \frac{0,0265}{0,0002} \\ &= 116,4695 \end{aligned}$$

Tabel ANOVA

SK	db	JK	KT	F hitung	F 0,05	F 0,01
Perlakuan (T)	2	0,0530	0,0265	116,4695	4,2565	8,0215
Galat (E)	9	0,0020	0,0002			
Total	11					

**Fhitung > Ftabel 1%, menunjukkan bahwa perlakuan memberikan pengaruh yang sangat berbeda nyata ($P < 0,01$).

Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) / *Least Significant Difference*

$$BNT = (t_{\alpha}, db_{\text{error}}) \times \sqrt{\frac{2MSE}{r}}$$

$$BNT = 3,2498 \times \sqrt{\frac{2(0,0002)}{4}}$$

$$BNT = 0,0347$$

NOTASI

Perlakuan	Rataan	Notasi	Rata-Rata + BNT
P2	0,1176	a	0,1522
P3	0,2491	b	0,2838
P1	0,2664	b	0,3011

Lampiran 7. Gambar Sampel Madu



P1



P2



P3

Keterangan:

P1 = Madu Kaliandra *Apis mellifera*

P2 = Madu Kaliandra *Apis cerana*

P3 = Madu Kaliandra *Trigona* sp.