

## BAB II

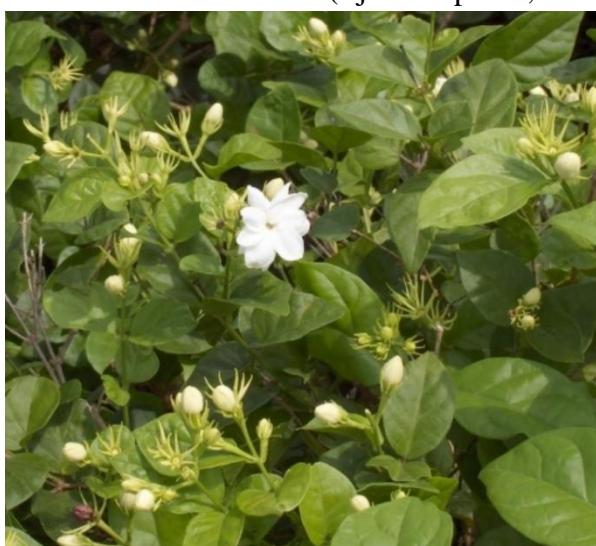
### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Tanaman Melati (*Jasminum sambac* L.)

##### 1. Sistematika Tanaman

Tanaman melati (*Jasminum sambac* L.) termasuk salah satu tanaman hias yang banyak dibudidayakan di wilayah Pulau Jawa. Tanaman ini tergolong dalam keluarga *Oleaceae*, yang biasa disebut dengan suku melati-melatian. Dalam klasifikasi taksonomi tumbuhan, posisi tanaman melati dapat dijelaskan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Kelas	: Dicotyledonae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Family	: Oleaceae
Ordo	: Oleales
Genus	: Jasminum
Spesies	: <i>Jasminum sambac</i> L. (Tjitrosoepomo, 2000)



Gambar 1. Tanaman dan Daun Melati (Dokumentasi Pribadi)

##### 2. Morfologi

Melati (*Jasminum sambac* L.) termasuk tanaman hias jenis perdu yang tumbuh menjalar dengan panjang batang yang dapat mencapai hingga 5 meter. Tanaman ini, yang juga dikenal dengan nama yasmin arab, tumbuh subur di daerah beriklim panas. Bunganya berwarna putih bersih dengan 4 hingga 5 kelopak, memiliki aroma harum yang sering dimanfaatkan dalam pembuatan minyak wangi.

Bentuk bunga melati menyerupai terompet, tumbuh di ujung cabang dan tersusun dalam tandan. Mekar bunga tidak terjadi secara bersamaan sehingga melati dapat berbunga sepanjang tahun. Terdapat dua jenis bunga melati, yaitu bunga tunggal dan bunga ganda (tumpuk). Bunga melati ganda biasanya digunakan sebagai hiasan karena aromanya kurang tahan lama dan jarang diambil minyaknya. Daun tanaman ini berbentuk oval dengan tepi yang sedikit bergelombang, terutama pada daun yang sudah tua. Daun muda berwarna hijau kekuningan, lalu berubah menjadi hijau tua yang mengkilap saat daun matang. Warna daun melati berkisar dari hijau hingga hijau kelabu, dengan bentuk helaian daun jorong hingga menyerupai bulat telur. Panjang daun berkisar antara 5–10 cm, dan lebarnya sekitar 4–6 cm. Ujung daun meruncing, pangkalnya bulat, serta tepi daun rata dengan tulang daun yang menyirip dan menonjol pada bagian bawah. Permukaan daun terlihat mengkilap, dan daun tumbuh berpasangan dengan tangkai pendek sekitar 5 mm (Eren, 2013).

### **3. Khasiat dan Aktivitas Farmakologi**

Melati (*Jasminum sambac* L.) merupakan tanaman obat yang daunnya mengandung beberapa metabolit sekunder, antara lain flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin. Senyawa-senyawa ini memiliki efek antiseptik yang membuatnya efektif dalam melawan bakteri. Selain itu, melati juga mengandung minyak atsiri yang membantu menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Sari *et al.*, 2022). Daun bunga melati kaya akan senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, dan tanin yang berpotensi menjadi antioksidan alami. Senyawa antioksidan ini berfungsi melindungi sel tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas, sehingga dapat membantu mencegah berbagai penyakit kronis (Selfiani *et al.*, 2023).

### **4. Kandungan Kimia**

Bunga dan daun melati memiliki rasa manis dan pedas serta memberikan sensasi dingin. Sedangkan akarnya memiliki rasa pedas dan manis dengan sifat netral serta sedikit beracun. Beberapa senyawa kimia yang terdapat dalam melati meliputi asam format, asam benzoat, asam salisilat, asam asetat, ester benzyl linalool, ester methyl linalool, benzyl alkohol, linalol, indol, metil anthranilat, seskuiterpena, alkohol seskuiterpen, fitol, isofital, fitil asetat, hexenil benzoat, metil palmitat, metil linolenat, geranil linalool, dan livalil asetat.

Tanaman melati mengandung berbagai senyawa seperti asam format, asam benzoat, dan minyak atsiri. Daunnya juga mengandung metabolit sekunder berupa flavonoid dan senyawa fenolik yang memiliki potensi sebagai antioksidan (Kholifah *et al.*, 2023). Analisis fitokimia menunjukkan bahwa bunga melati mengandung beberapa senyawa, yaitu karbohidrat, saponin, flavonoid, glikosida, tanin, fenolik, protein, kumarin, dan lemak. Hasil penelitian oleh Sari *et al.* (2022) melalui skrining fitokimia pada ekstrak pekat daun bunga melati mengidentifikasi keberadaan flavonoid, saponin, dan tanin sebagai komponen utama.

### **B. Pelarut Ekstrak dan Fraksi**

Pemilihan jenis pelarut memegang peranan penting dalam menentukan efisiensi ekstraksi dan fraksinasi. Jenis pelarut yang digunakan dapat memengaruhi jumlah senyawa aktif yang berhasil diekstrak. Senyawa aktif dalam tumbuhan cenderung larut dalam pelarut yang memiliki tingkat polaritas serupa dengan polaritas senyawa tersebut. Dengan demikian, senyawa polar akan larut dalam pelarut yang bersifat polar sedangkan senyawa semi polar atau nonpolar akan larut dalam pelarut dengan polaritas yang sesuai yaitu semi polar atau nonpolar (Wiranata dan Maria, 2022).

Menurut Saputra (2015), pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi harus bersifat selektif, yaitu mampu melarutkan seluruh senyawa dengan cepat. Di samping itu, Penggunaan pelarut dengan titik didih rendah memudahkan penguapan tanpa harus menaikkan suhu secara signifikan. Namun, titik didih yang terlalu rendah juga harus dihindari karena dapat menyebabkan pelarut mudah hilang akibat penguapan. Pelarut yang baik sebaiknya tidak reaktif terhadap komponen minyak, mudah diperoleh, dan memiliki biaya yang ekonomis.

Dalam proses ekstraksi maserasi, penggunaan pelarut organik sangat penting agar senyawa dapat larut secara maksimal. Penelitian ini menggunakan pelarut etanol 96%. Pemilihan etanol 96% didasarkan pada hasil penelitian Yuswi (2017) yang menunjukkan bahwa pelarut tersebut menghasilkan aktivitas antioksidan terbaik. Sementara itu, pemilihan pelarut untuk fraksinasi disesuaikan dengan sifat analitnya, di mana pelarut dan senyawa yang dipisahkan harus memiliki kesamaan sifat, terutama tingkat kepolaran. Metode fraksinasi

digunakan untuk memisahkan senyawa berdasarkan tingkat polaritasnya, dengan pelarut heksana yang bersifat nonpolar dan etil asetat sebagai pelarut yang digunakan dalam penelitian ini (Putri *et al*, 2022).

Di bawah ini adalah tabel deret eluotropik yang dapat digunakan untuk menentukan polaritas pelarut. Salah satu cara untuk mempelajari tentang polaritas pelarut adalah melalui konstanta dielektriknya. Konstanta dielektrik yang lebih tinggi menunjukkan bahwa suatu zat lebih polar.

**Tabel 1. Deret Eluotropik**

Pelarut	Tetapan dielektrik pada 20°C
n-heksan	1,89
Petroleum eter	1,90
n-oktan	1,95
n-dektan	1,99
n-dodekan	2,01
Sikliheksana	2,02
1,4-dioksan	2,21
Benzena	2,28
Toluena	2,38
Furan	2,29
Asam propanoat	3,30
Eter (dietil eter)	3,34
Kloroform	4,81
Butil asetat	5,01
Etil asetat	6,02
Asam asetat (glasial)	6,15
Metal asetat	6,68
Tetrahidrofuran	7,58
Metilenklorida	9,08
1-butanol	10,09
Piridina	12,30
2-butanol	15,80
n-butanol	17,80
2-propanol	18,30
1-propanol	20,10
Aseton	20,70
Etanol	24,30
Metanol	33,60
Asam formiat	58,50
Air	80,40

## 1. Etanol

Etanol adalah pelarut organik yang sering dipakai dalam ekstraksi karena efektif dalam melarutkan senyawa fenolik dan flavonoid yang terdapat pada tumbuhan. Agar pemanfaatan etanol sebagai pelarut optimal, perlu diperhatikan faktor-faktor seperti konsentrasi, suhu, waktu, serta metode ekstraksi yang digunakan.

Pemilihan etanol didasarkan pada sifat polar senyawa flavonoid, sehingga etanol yang juga bersifat polar mampu mengekstraksi senyawa tersebut dengan efektif (Hakim dan Saputri, 2020).

Beberapa alasan penggunaan etanol yang sangat luas antara lain karena etanol relatif tidak toksik dibandingkan dengan aseton dan metanol, biaya murah, dan dapat digunakan pada berbagai metode ekstraksi. Selain itu, etanol dipilih karena mudah diperoleh, efisien, ramah lingkungan, serta mampu menghasilkan tingkat ekstraksi yang tinggi (Fan *et al.*, 2020).

## 2. Air

Air termasuk sebagai pelarut yang sangat polar dan sering digunakan untuk mengekstraksi senyawa organik yang bersifat polar, sehingga cocok dipakai sebagai pelarut polar dalam proses fraksinasi. Flavonoid merupakan jenis senyawa yang memiliki kelarutan tinggi dalam air (Jannah *et al.*, 2024). Namun, penggunaan air sebagai pelarut penyari memiliki kekurangan karena dapat melarutkan zat-zat lain yang tidak diinginkan, yang dapat mengganggu proses ekstraksi. Air dipilih sebagai pelarut karena harganya yang terjangkau, ketersediaannya yang melimpah, stabilitasnya, serta sifatnya yang tidak mudah terbakar, tidak mudah menguap, alami dan tidak beracun. Selain itu, air juga dapat melarutkan enzim yang menyebabkan reaksi enzimatis sehingga menurunkan kualitas produk, meskipun keberadaan air dapat mempercepat proses hidrolisis (Arifin & Ibrahim, 2018).

## 3. Etil Asetat

Etil asetat termasuk pelarut semipolar yang mampu melarutkan senyawa-senyawa semipolar, seperti senyawa fenolik, termasuk golongan flavonoid. Pelarut ini efektif digunakan dalam ekstraksi karena sifatnya yang mudah menguap dan tingkat toksitasnya yang rendah (Tanaya *et al.*, 2015).

## 4. N-Heksana

n-Heksan termasuk pelarut nonpolar yang efektif melarutkan senyawa dengan sifat nonpolar. Pelarut ini memiliki karakteristik sangat nonpolar, mudah menguap, dan memiliki aroma khas. Karena sifat nonpolarnya, jumlah senyawa nonpolar yang dapat larut dalam n-heksan cenderung lebih sedikit dibandingkan dengan pelarut yang bersifat semipolar. Beberapa flavonoid, seperti aglikon polimetoksi atau isoflavon yang telah kehilangan gugus gula atau dalam bentuk glikosida terlepas, dapat larut dalam pelarut nonpolar seperti n-heksan (Rahmati *et al.*, 2020).

### C. Metode Pemisahan

#### 1. Ekstraksi dan Maserasi

Ekstraksi adalah teknik pemisahan senyawa yang larut dari matriks padat atau bahan tak larut dengan memanfaatkan pelarut cair tertentu. Komponen aktif dalam simplisia dapat diklasifikasikan ke dalam kelompok minyak atsiri, alkaloid, dan flavonoid. Identifikasi jenis senyawa aktif tersebut memudahkan dalam menentukan pelarut dan metode ekstraksi yang paling tepat. Tingkat kepolaran pelarut sangat mempengaruhi jenis senyawa yang berhasil diekstraksi. Karena flavonoid bersifat polar, maka pelarut yang digunakan juga harus memiliki sifat polar. Keberhasilan ekstraksi bergantung pada seberapa baik senyawa tersebut larut dalam pelarut, sesuai dengan prinsip “like dissolves like,” yang menyatakan bahwa senyawa akan larut dalam pelarut dengan sifat yang mirip. Contoh pelarut polar meliputi etanol, metanol, aseton, dan air (Prayudo *et al.*, 2015)

Teknik ekstraksi maserasi sering digunakan karena cara kerjanya mudah, yaitu dengan merendam serbuk tanaman dalam pelarut yang tepat di dalam wadah tertutup pada suhu ruang. Namun, teknik ini memiliki beberapa kelemahan, antara lain membutuhkan waktu ekstraksi yang cukup lama, memerlukan volume pelarut yang besar, serta berisiko menyebabkan hilangnya sebagian senyawa aktif. Selain itu, ekstraksi beberapa senyawa juga kurang efektif pada suhu kamar. Namun, kelebihan maserasi adalah dapat mencegah kerusakan senyawa termolabil dalam tanaman yang biasanya terjadi akibat pemanasan (Tetti, 2014). Metode maserasi dipilih dalam penelitian ini karena sesuai untuk mengekstraksi senyawa yang sensitif terhadap panas, serta salah satu teknik ekstraksi yang paling mudah dilakukan.

#### 2. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan proses pemisahan terhadap ekstrak kental yang diperoleh dari hasil penguapan ekstrak maserasi. Proses ini menggunakan pelarut-pelarut dengan kepolaran berbeda, sehingga masing-masing fraksi akan mengandung senyawa sesuai dengan tingkat kepolaran pelarut yang digunakan. Fraksinasi merupakan proses pemisahan senyawa dalam suatu ekstrak dengan menggunakan dua jenis pelarut yang tidak saling bercampur. Beberapa pelarut yang umum digunakan dalam proses ini meliputi n-heksan, etil asetat, dan metanol. n-Heksan berfungsi mengekstraksi senyawa nonpolar dan lemak, etil asetat digunakan untuk melarutkan senyawa semipolar,

sementara metanol dimanfaatkan untuk senyawa polar. Melalui tahapan ini, karakter kepolaran dari senyawa-senyawa yang terpisah dapat diidentifikasi. Pelarut nonpolar cenderung melarutkan senyawa dengan sifat nonpolar, sementara pelarut polar lebih efektif melarutkan senyawa polar. Sedangkan untuk senyawa semipolar, pelarut dengan tingkat kepolaran sedang akan memberikan kelarutan yang optimal (Mutiasari, 2012).

### 3. Kromatografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan yang memanfaatkan dua fase, yaitu fase gerak (*mobile phase*) dan fase diam (*stationary phase*), di mana pemisahan zat didasarkan pada perbedaan pergerakan relatif antara kedua fase tersebut. Teknik ini berfungsi untuk memisahkan suatu campuran menjadi bagian-bagian penyusunnya. Semua metode kromatografi bekerja berdasarkan prinsip serupa. Pada dasarnya, kromatografi selalu melibatkan fase diam yang dapat berupa padatan atau campuran cairan dengan padatan, serta fase gerak yang berbentuk cairan atau gas. Fase gerak akan melewati fase diam sambil membawa berbagai komponen dalam campuran, yang masing-masing bergerak dengan kecepatan berbeda tergantung interaksinya terhadap kedua fase (Rosydiati dan elia, 2019).

Secara umum, teknik kromatografi diklasifikasikan menjadi dua jenis utama yaitu kromatografi planar dan kromatografi kolom. Kromatografi kolom mencakup metode seperti kromatografi cair dan kromatografi gas, sedangkan kromatografi planar meliputi kromatografi kertas serta kromatografi lapis tipis. Salah satu metode kromatografi kolom adalah kromatografi kolom cair vakum (KCV), yang biasanya menggunakan pompa vakum dan gel silika (umumnya gel silika 60 G) sebagai adsorben. Tujuan dari KCV adalah untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terdapat dalam ekstrak. Dalam prosesnya, sampel bergerak melalui fase diam dan fase gerak dengan kecepatan tinggi karena adanya tekanan vakum. Prinsip kerja KCV didasarkan pada partisi dan adsorpsi senyawa, di mana pemisahan dibantu oleh tekanan yang dihasilkan dari alat vakum (Mutmainnah *et al.*, 2017).

**3.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT).** Kromatografi lapis tipis merupakan metode yang digunakan untuk mengonfirmasi hasil skrining fitokimia secara lebih lanjut. Teknik ini dimanfaatkan untuk menganalisis jumlah kecil senyawa organik, termasuk dalam mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder. Kromatografi lapis

tipis adalah teknik kromatografi cair yang memanfaatkan dua fase, yakni fase diam dan fase gerak (eluen). Fase gerak biasanya berupa campuran pelarut dengan daya larut tinggi, yang berfungsi dalam proses elusi dan pemisahan komponen senyawa. Efektivitas elusi dan ketajaman pemisahan ditentukan oleh polaritas total pelarut, polaritas fase diam, serta karakteristik senyawa yang diuji (Elisabeth *et al.*, 2020).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) bekerja berdasarkan tiga tahapan utama, yaitu adsorpsi, desorpsi, dan elusi. Pada tahap adsorpsi, larutan sampel yang diaplikasikan ke plat KLT sebagai fase diam menggunakan pipa kapiler akan menyebabkan komponen-komponennya menempel pada permukaan plat. Selanjutnya, saat fase gerak (eluen) bergerak naik melalui kapilaritas, terjadi proses desorpsi, yaitu pelepasan komponen dari fase diam akibat adanya persaingan antara eluen dan komponen untuk berinteraksi dengan permukaan fase diam. Elusi terjadi ketika komponen ikut terbawa oleh eluen sepanjang permukaan plat. Teknik KLT ini umumnya digunakan untuk identifikasi senyawa secara kualitatif dengan cara membandingkan nilai R<sub>f</sub> dari sampel terhadap nilai R<sub>f</sub> dari baku pembanding. Pengamatan lempeng KLT dilakukan terlebih dahulu secara visual, lalu bercak pada plat diidentifikasi menggunakan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Pengamatan bercak pada kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan dengan menyorotkan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm, di mana plat akan memancarkan fluoresensi dan senyawa flavonoid tampak sebagai bercak berwarna gelap. Jika bercak tidak tampak pada pengamatan UV 254 nm, maka pengamatan dilanjutkan menggunakan sinar UV 366 nm untuk membantu visualisasi. Fluoresensi yang terdapat pada plat KLT akan bereaksi terhadap cahaya UV dan menimbulkan penampakan bercak pada kedua panjang gelombang tersebut. Penambahan pereaksi semprot aluminium klorida ( $\text{AlCl}_3$ ) 5% digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa flavonoid, karena akan menimbulkan warna kuning pada bercak yang mengandung senyawa tersebut (Ramlah *et al.*, 2019).

Kromatografi lapis tipis (KLT) memiliki beberapa keunggulan, antara lain proses preparasi sampel yang mudah dan sederhana, biaya operasional yang relatif rendah karena sampel dan standar dapat diuji bersamaan, penggunaan volume pelarut yang minimal, serta tingkat selektivitas dan sensitivitas yang tinggi. Selain itu, hasil kromatogram

dapat langsung diamati secara visual, sehingga memudahkan analisis (Maknum *et al.*, 2018)

**3.2 Kromatografi Cair Vakum (KCV).** Kromatografi cair vakum (KCV) adalah teknik pemisahan campuran larutan berdasarkan perbedaan kepolaran dan kepadatan larutan dengan menggunakan kolom berisi bahan adsorben. Metode ini bekerja berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi, yang proses pemisahannya dipercepat dengan bantuan tekanan rendah dari pompa vakum. Tekanan rendah tersebut berfungsi untuk mempercepat laju aliran fase gerak selama proses pemisahan berlangsung (Ahmad, 2017).

Kromatografi cair vakum merupakan metode kromatografi yang memanfaatkan vakum dan menggunakan silika gel sebagai media adsorben. Teknik ini memiliki keunggulan dibandingkan kromatografi kolom konvensional, terutama dalam hal kecepatan proses pemisahan, karena elusi dipercepat dengan bantuan tekanan vakum. Selain itu, metode ini juga efektif untuk memisahkan sampel dalam jumlah besar. Pemilihan jenis dan ukuran partikel silika gel menjadi faktor penting yang memengaruhi efisiensi pemisahan; partikel yang terlalu halus dapat memperlambat laju elusi. Secara umum, kromatografi cair vakum (KCV) dilakukan menggunakan metode pengemasan basah, tetapi beberapa penelitian mengindikasikan bahwa metode pengemasan kering dapat menghasilkan hasil yang lebih optimal. Metode kering menghasilkan fase diam yang lebih rapat, serta dapat mencegah penggumpalan dan terbawanya adsorben bersama eluen keluar dari kolom (Hermawan *et al.*, 2017).

## D. Antioksidan

### 1. Definisi Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang memiliki struktur kimia khusus sehingga mampu mendonorkan elektron kepada radikal bebas tanpa merusak strukturnya sendiri, serta berperan dalam menghentikan reaksi berantai akibat radikal bebas. Senyawa ini umumnya banyak ditemukan dalam bahan pangan yang berasal dari tumbuhan (Alfaridz dan Amalia, 2018).

Tubuh manusia secara alami mampu menghasilkan antioksidan, meskipun jumlahnya sangat terbatas, namun senyawa ini berperan penting dalam mencegah terjadinya stres oksidatif. Tubuh manusia secara alami menghasilkan antioksidan seperti glutation dan katalase. Namun, karena jumlah yang diproduksi terbatas, maka tubuh

memerlukan tambahan antioksidan dari luar (antioksidan eksogen) melalui asupan makanan atau suplemen. Antioksidan eksogen yang umum dikenal masyarakat antara lain vitamin C, vitamin E, betakaroten yang bersumber dari tumbuhan, serta berbagai ekstrak tanaman yang mengandung senyawa beraktivitas antioksidan.

Antioksidan berfungsi sebagai lini pertahanan awal tubuh dalam melawan serangan radikal bebas. Peningkatan kadar radikal bebas dalam tubuh dapat dipicu oleh berbagai faktor, seperti paparan asap rokok, polusi lingkungan, stres, dan lainnya, yang berpotensi merusak jaringan serta mempercepat proses penuaan dan timbulnya penyakit degeneratif. Antioksidan berperan dalam menetralkan pembentukan serta aktivitas radikal bebas, sehingga mampu melindungi sel dari kerusakan lanjutan. Beberapa antioksidan yang umum ditemukan meliputi vitamin E (tokoferol) yang larut dalam lemak, serta vitamin C (askorbat) yang larut dalam air.

Mencegah stres oksidatif membutuhkan pemanfaatan molekul antioksidan eksogen secara efisien. Antioksidan yang ditemukan dalam makanan dan minuman disebut antioksidan eksogen, dan berfungsi sebagai pertahanan pencegahan.

## 2. Pengolongan Antioksidan

**2.1 Kategori Antioksidan.** Pengelompokan antioksidan berdasarkan asalnya meliputi antioksidan alami dan sintetis, keduanya efektif dalam menangkal radikal bebas.

**2.1.1 Antioksidan Sintetik.** Antioksidan hasil sintesis kimia dikenal sebagai "antioksidan sintetik." *Butyl hydroxyanisole* (BHA), *propyl gallate* (PG), *butyl hydroxytoluene* (BHT), dan *tert-butyl hydroxyquinoline* (TBHQ) adalah antioksidan sintetik yang dikaitkan dengan peningkatan risiko kanker. Penambahan antioksidan sintetik pada makanan merupakan praktik umum untuk memperlambat oksidasi lemak (Kamoda *et al.*, 2021).

**2.2.2 Antioksidan Alami.** Flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam organik (asam sitrat, asam askorbat, dan asam malat) adalah contoh bahan kimia antioksidan alami. Bahan **kimia** antioksidan alami polifenol dapat beroperasi sebagai agen pereduksi, penangkap radikal bebas, dan agen pengkelat logam (Kamoda *et al.*, 2021).

**2.2 Antioksidan Menurut Metode Kerja.** Antioksidan dibagi menjadi tiga kategori menurut metode kerjanya yaitu

antioksidan primer dan antioksidan sekunder.

### **2.2.1 Antioksidan Primer (Antioksidan Endogenus).**

Antioksidan primer memiliki peran penting dalam menghentikan reaksi berantai dan mencegah terbentuknya radikal bebas baru. Cara kerja antioksidan adalah dengan memutus rantai radikal dengan memberikan atom hidrogen secara cepat kepada lipid radikal, yang kemudian membentuk senyawa yang lebih stabil. Contoh antioksidan primer termasuk superoksida dismutase (SOD), protein pengikat logam, glutation peroksidase (GPx), vitamin C (asam askorbat), katalase, vitamin E (tokoferol), serta berbagai jenis antioksidan lainnya (Kurniawati dan Sutoyo, 2021).

### **2.2.2 Antioksidan tersier.** Antioksidan tersier berfungsi

dengan menghambat akumulasi biomolekul yang rusak dan membantu memperbaiki kerusakan akibat radikal bebas. Contohnya termasuk protein yang mengalami oksidasi dan kemudian diuraikan oleh enzim proteolitik, serta DNA yang diperbaiki oleh enzim metionin reduktase (Kurniawati dan Sutoyo, 2021).

## **3. Metode Pengujian Antioksidan**

### **3.1 Metode *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH).**

DPPH merupakan senyawa organik yang mengandung unsur nitrogen dan bersifat tidak stabil, dengan serapan maksimum pada panjang gelombang 517 nm serta memiliki warna ungu pekat. Ketika berinteraksi dengan senyawa antioksidan, radikal ini akan mengalami proses reduksi yang ditandai dengan perubahan warna menjadi kuning. Metode DPPH memiliki keunggulan dibandingkan metode lain karena bersifat sederhana, mudah dilakukan, dan sampel dan reagen yang dibutuhkan untuk pengujian aktivitas antioksidan juga lebih sedikit. DPPH adalah senyawa radikal bebas buatan yang memiliki warna ungu dan mengandung atom nitrogen yang tidak berpasangan. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH didasarkan pada reaksi antara radikal DPPH dan senyawa antioksidan, di mana antioksidan mendonorkan atom hidrogen kepada DPPH. Reaksi ini menyebabkan perubahan warna larutan dari ungu menjadi kuning, atau dari ungu tua menjadi lebih muda, yang selanjutnya ditunjukkan oleh penurunan nilai absorbansi pada sampel (Ngibad dan Lestari, 2020).

Salah satu parameter penting dalam menilai potensi antioksidan suatu senyawa adalah nilai  $IC_{50}$ , yaitu konsentrasi senyawa yang diperlukan untuk menurunkan aktivitas radikal bebas DPPH sebesar

50%. Perhitungan nilai ini dilakukan dengan menggunakan persamaan regresi linier yang menghubungkan konsentrasi larutan (x) dan persentase inhibisi (% inhibisi) (y). Untuk menentukan konsentrasi sampel pada nilai  $IC_{50}$ , nilai x dicari dengan memasukkan angka 50 ke dalam persamaan regresi linier tersebut sebagai nilai y, berdasarkan grafik hubungan antara konsentrasi dan persentase inhibisi (Pratiwi *et al.*, 2023). Kekuatan aktivitas antioksidan dari senyawa uji berdasarkan metode DPPH dapat diklasifikasikan menurut nilai  $IC_{50}$  yang tercantum pada Tabel 2.

**Tabel 2. Tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH**

Intensitas	Nilai $IC_{50}$
Sangat kuat	< 50 $\mu\text{g/mL}$
Kuat	50-100 $\mu\text{g/mL}$
Sedang	101-150 $\mu\text{g/mL}$
Lemah	> 150 $\mu\text{g/mL}$

**3.2 Uji ABTS (Asam 2,2'-Azinobis(3-etilbenzatiazolin)-6-sulfonat).** Prinsip uji ABTS adalah mengukur kemampuan antioksidan dalam menghilangkan warna kation radikal ABTS yang bereaksi langsung dengan radikal tersebut. Radikal ABTS merupakan senyawa yang mengandung pusat nitrogen dan memiliki warna khas biru-hijau, yang akan berubah menjadi tidak berwarna saat tereduksi oleh antioksidan menjadi bentuk nonradikal. Aktivitas antioksidan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 734 nm dan hasilnya dibandingkan dengan senyawa trolox sebagai standar (Bendra, 2012).

**3.3 Uji Penghambatan Radikal Superokksida.** Uji penghambatan radikal superokksida menggunakan medan molekular nitroblue tetrazolium (NBT) untuk mengukur kemampuan antioksidan untuk meredam radikal superokksida yang dihasilkan oleh sistem enzimatik hipoxantin-xantin oksidase (HPX-XOD). Metode ini bergantung pada autooksidasi riboflavin oleh cahaya yang mengaktifkan radikal superokksida dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 560 nm, nitroblue tetrazolium (NBT), yang memiliki warna kuning, dapat diukur sebagai formazan berwarna biru setelah radikal superokksida menurunkannya. Oksidasi hidroksilamin, yang menghasilkan nitrit, dapat digunakan untuk mengidentifikasi

radikal superokksida, yang kemudian dapat diukur dengan menggunakan reaksi kolorimetri (Bendra, 2012).

### **E. Sun Protection Factor (SPF)**

#### **1. Tabir Surya**

Tabir surya atau *sunblock* merupakan bahan yang berfungsi melindungi kulit dari paparan radiasi sinar ultraviolet (UV). Peran utama sunblock adalah sebagai penghalang fisik yang mencegah sinar UV mencapai kulit, sehingga efektivitasnya dalam melindungi kulit dari risiko kanker lebih tinggi dibandingkan dengan tabir surya biasa. Produk tabir surya tersedia dalam berbagai bentuk, seperti losion, krim, salep, gel, atau spray yang diaplikasikan langsung pada kulit. Pada kemasan produk tabir surya biasanya tercantum nilai SPF (*Sun Protecting Factor*) yang menunjukkan tingkat perlindungan terhadap sinar UV. Nilai SPF ini berkisar antara 2 hingga 60, yang menggambarkan durasi perlindungan produk terhadap radiasi UV yang dapat menyebabkan kulit terbakar (Isfardiyana dan Safitri, 2014).

#### **2. Sun Protection Factor (SPF)**

Parameter standar yang dipakai untuk mengukur efektivitas produk dalam melindungi kulit dari sinar matahari disebut *Sun Protection Factor* (SPF). Nilai SPF merefleksikan kemampuan produk tersebut dalam mencegah timbulnya eritema atau kemerahan pada kulit akibat paparan sinar ultraviolet (UV). Semakin besar angka SPF, maka semakin tinggi pula tingkat perlindungan terhadap sinar UV dan dampak buruknya. Perhitungan SPF dilakukan dengan membandingkan jumlah energi UV yang dibutuhkan untuk menimbulkan dosis eritema minimal (Minimal Erythema Dose/MED) pada kulit yang diolesi tabir surya, dengan energi UV yang dibutuhkan untuk menimbulkan efek serupa pada kulit tanpa perlindungan. MED sendiri merupakan ambang radiasi UV terendah yang cukup untuk menimbulkan kemerahan pada kulit (Dewi *et al.*, 2021).

Efektivitas sediaan tabir surya untuk melindungi kulit dari sinar UV B dapat diukur salah satunya melalui nilai SPF. Besarnya kemampuan senyawa dalam melindungi kulit terhadap paparan sinar matahari terlihat dari nilai SPF, yang menunjukkan tingkat perlindungan kulit terhadap risiko terbakar akibat sinar matahari. Nilai SPF juga mengindikasikan lamanya waktu seseorang dapat terpapar sinar matahari langsung tanpa mengalami kulit terbakar (Dipahayu dan Arifiana, 2019).

Nilai SPF dapat diukur Untuk mengetahui kemampuan suatu produk tabir surya dalam menyerap sinar ultraviolet dan untuk mengkategorikan potensi tabir surya, seperti yang ditunjukkan pada Tabel 3. *Sun Protection Factor* (SPF) hanya mengindikasikan perlindungan terhadap radiasi UV B. Kebutuhan nilai SPF pada tiap individu dipengaruhi oleh pengetahuan mengenai klimatologi UV, kebiasaan aktivitas di luar ruangan, serta tingkat kerentanan terhadap paparan sinar matahari. Selain itu, perbedaan geografis juga memengaruhi tingkat paparan radiasi UV berdasarkan garis lintangnya; daerah tropis menerima paparan UV tertinggi, sedangkan wilayah di kutub utara dan selatan mengalami paparan UV paling rendah (Purwaningsih *et al.*, 2021).

**Tabel 3. Keefektifan tabir surya berdasarkan nilai SPF**

Nilai SPF	Kategori Proteksi Tabir Surya
2-4	Proteksi minimal
4-6	Proteksi sedang
6-8	Proteksi ekstra
8-15	Proteksi maksimal
>15	Proteksi ultra

### 3. Pengukuran Nilai SPF

Penentuan nilai SPF pada produk tabir surya secara in vitro dapat dilakukan melalui dua pendekatan utama. Pendekatan pertama melibatkan pengukuran tingkat serapan atau transmisi sinar UV yang melewati lapisan tabir surya yang telah diaplikasikan pada plat kuarsa atau membran biologis. Sementara itu, pendekatan kedua dilakukan dengan menganalisis sifat serapan dari larutan hasil pengenceran tabir surya menggunakan metode spektrofotometri (Dipahayu dan Arifiyana, 2019).

## F. Instrumen

### 1. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah salah satu metode analisis yang berfungsi untuk menentukan intensitas cahaya yang diserap oleh senyawa kimia pada panjang gelombang spesifik. Spektrum ultraviolet meliputi panjang gelombang antara 200 sampai 400 nm, sementara spektrum sinar tampak berada dalam rentang 400 hingga 750 nm. Teknik ini memanfaatkan daerah serapan dalam spektrum UV dan tampak untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa tertentu. Umumnya, senyawa yang dapat terdeteksi melalui metode ini

mengandung gugus kromofor dan auksokrom. Selain itu, spektrofotometri UV-Vis dikenal sebagai metode yang praktis dan cepat dibandingkan dengan teknik analisis lainnya (Sahumena *et al.*, 2020). Beberapa aspek penting harus diperhatikan dalam melakukan analisis Spektrofotometri UV-Vis adalah:

**1.1. Pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar Uv-Vis.** Langkah ini diperlukan apabila senyawa yang dianalisis tidak menunjukkan serapan pada daerah tersebut, dengan cara mengubahnya menjadi senyawa lain atau mereaksikannya dengan pereaksi tertentu (Maghfiroh *et al.*, 2022).

**1.2. Waktu Operasional (*operating time*).** Metode ini biasanya digunakan untuk mengevaluasi hasil reaksi atau perubahan warna yang terjadi, dengan tujuan menentukan waktu pengukuran yang memberikan hasil paling stabil. Penetapan waktu operasional dilakukan dengan mengamati korelasi antara durasi pengukuran dan nilai absorbansi larutan (Maghfiroh *et al.*, 2022).

**1.3. Pemilihan Panjang Gelombang.** Panjang gelombang yang dipilih untuk analisis kuantitatif adalah yang menunjukkan nilai absorbansi tertinggi. Pemilihan panjang gelombang maksimum ini dilakukan dengan membuat kurva yang menggambarkan hubungan antara absorbansi dan panjang gelombang dari larutan standar dengan konsentrasi tertentu (Maghfiroh *et al.*, 2022).

## **2. Gas Chromatography Mass Spectrometer (GC-MS)**

Kromatografi gas merupakan teknik yang digunakan untuk memisahkan dan mendeteksi senyawa-senyawa volatil dalam suatu campuran. Metode ini secara umum berperan dalam pemisahan dinamis serta identifikasi berbagai senyawa organik yang mudah menguap, sekaligus memungkinkan analisis kualitatif dan kuantitatif dari komponen dalam campuran tersebut (Hendayana, 2006). Data kromatogram yang diperoleh dari instrumen GC-MS dapat digunakan untuk memperkirakan jenis senyawa dengan membandingkannya menggunakan *library* yang tersedia pada instrumen (Setyawati, 2005).

GC-MS adalah gabungan antara instrumen *Gas Chromatography* (GC) dan detektor *Mass Spectrometry* (MS). Gabungan dari kedua metode ini memungkinkan identifikasi senyawa secara lebih akurat, termasuk penentuan struktur molekulnya. Kromatografi gas sendiri merupakan teknik pemisahan yang bersifat dinamis dan digunakan untuk mendeteksi serta memisahkan senyawa-

senyawa volatil dalam suatu campuran (Gandjar & Rohman, 2007). Sedangkan *Mass Spectrometry* digunakan untuk menentukan berat molekul dengan mengukur rasio massa terhadap muatan ion. Ion bermuatan tersebut dianalisis berdasarkan lintasan orbitnya saat melewati medan magnet yang seragam (Silvester *et al.*, 1986).

Mekanisme kerja kromatografi gas dimulai dengan aliran gas bertekanan tinggi dari silinder baja yang melewati kolom berisi fase diam. Campuran sampel, biasanya dalam bentuk larutan, disuntikkan ke dalam aliran gas tersebut. Gas pembawa kemudian membawa sampel ke dalam kolom, di mana proses pemisahan komponen-komponen campuran berlangsung. Setelah terpisah, masing-masing komponen keluar dari kolom satu per satu dan terdeteksi oleh detektor (Hendayana, 2006).

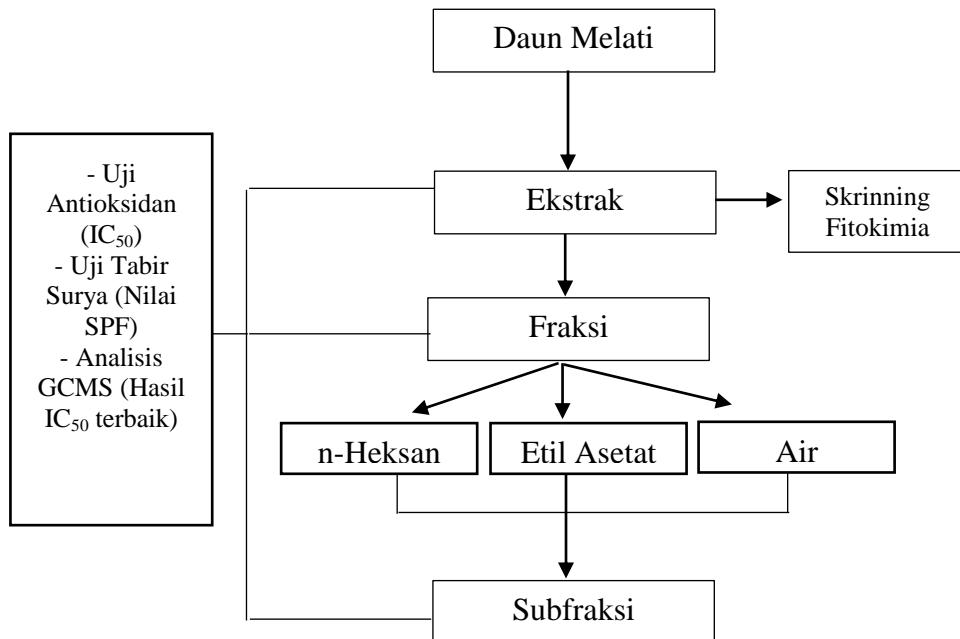
## G. Landasan Teori

Tanaman melati termasuk salah satu tanaman hias yang juga dikenal sebagai tanaman obat tradisional berdasarkan pengalaman empiris, dan telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia. Daun melati memiliki kandungan flavonoid setelah dilakukan pengujian terhadap kandungan flavonoid total pada ekstrak dan senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun melati memiliki efek antioksidan dengan kategori kuat (Kholifah *et al.*, 2023). Selfiani *et al.* (2023) melakukan penelitian mengenai aktivitas antioksidan ekstrak daun melati menggunakan metode DPPH. Ekstrak yang mengandung flavonoid, alkaloid, dan tanin dengan proses maserasi menggunakan etanol 96% menghasilkan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 56,05 µg/mL, sedangkan vitamin C sebagai pembanding memiliki nilai IC<sub>50</sub> 3,70 µg/mL. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun melati mengandung beberapa senyawa, khususnya flavonoid, yang memiliki potensi sebagai antioksidan dengan kategori kuat, meskipun masih lebih rendah dibandingkan vitamin C yang memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat.

Pemisahan yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya hanya sampai tahap ekstraksi, sehingga pemisahan lebih lanjut terhadap fraksi daun melati belum pernah dilakukan. Prinsip kelarutan yang digunakan adalah “like dissolves like”, yaitu pelarut polar akan melarutkan senyawa polar, sedangkan pelarut nonpolar akan melarutkan senyawa nonpolar (Kiswandono, 2011). Uji antioksidan dilakukan dengan

metode DPPH untuk mendapatkan fraksi daun melati dengan kandungan antioksidan tertinggi pada sampel. Uji SPF juga dilakukan pada ekstrak dan fraksi daun melati untuk mengetahui nilai SPF tertinggi. Metode GC-MS digunakan untuk mengidentifikasi karakteristik senyawa aktif antioksidan yang berasal dari metabolit sekunder dalam fraksi aktif daun melati (*Jasminum sambac* L.).

## H. Kerangka Konsep



Gambar 2. Kerangka Konsep Penelitian

## I. Hipotesis

Berdasarkan uraian tersebut, maka dapat ditarik hipotesis dalam penelitian ini bahwa:

1. Ekstrak etanol 96%, fraksi etil asetat, fraksi n-heksan, fraksi air dan subfraksi teraktif daun melati (*Jasminum sambac* L.) dapat memberikan aktivitas antioksidan secara *in vitro* dengan metode DPPH.
2. Salah satu subfraksi dari fraksi teraktif daun melati (*Jasminum sambac* L.) memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi dibanding subfraksi lainnya.
3. Ekstrak etanol 96%, fraksi etil asetat, fraksi n-heksan, fraksi air dan subfraksi teraktif daun Melati (*Jasminum sambac* L.) dapat

memberikan aktivitas tabir surya secara *in vitro* dengan metode spektrofotometri UV-Vis.

4. Subfraksi teraktif daun melati (*Jasminum sambac* L.) mengandung senyawa bioaktif yang dapat teridentifikasi dan terkarakterisasi melalui analisis GC-MS.