

Pengaruh Ekstraksi Hidrotermal dari Limbah Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) terhadap Komposisi Kimia, Aktivitas Antioksidan dan Hipoglikemik

Marchelino Christofel Muaja¹, Edi Suryanto^{1*}, Dewa Gede Katja¹

¹Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi

*Email korespondensi: edisuryanto@unsrat.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstraksi hidrotermal terhadap kandungan fitokimia dan aktivitas antioksidan serta mengetahui efek hipoglikemik dari ekstrak limbah daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) terhadap kadar glukosa darah. Serbuk daun cengkeh diekstraksi dengan cara hidrotermal menggunakan pelarut air selama 1, 2, 3, dan 4 jam dengan suhu 180°C. Masing-masing filtrat dievaporasi sampai kering sehingga diperoleh empat ekstrak. Masing-masing ekstrak diuji kandungan total fenolik, tanin terkondensasi, aktivitas penangkal radikal bebas, penentuan enzim amilase, penentuan kadar glukosa serta identifikasi komponen kimia pada ekstrak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan total fenolik tertinggi terdapat pada ekstrak variasi waktu 1 jam ($95,35 \pm 0,78 \mu\text{g/mL}$), tanin tertinggi terdapat pada ekstrak variasi waktu 1 jam ($98,94 \pm 2,48 \mu\text{g/mL}$), aktivitas penangkal radikal bebas DPPH tertinggi terdapat pada ekstrak variasi waktu 1 jam ($63,18 \pm 1,22\%$), aktivitas penangkal radikal bebas FRAP tertinggi terdapat pada ekstrak variasi waktu 1 jam ($93,80 \pm 1,14\%$) penentuan enzim amilase tertinggi terdapat pada ekstrak variasi waktu 1 jam ($98,93 \pm 1,48\%$). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa ekstraksi hidrotermal selama 1 jam pada suhu 180°C menghasilkan ekstrak dengan aktivitas antioksidan dan efek hipoglikemik paling tinggi. Hasil ini menunjukkan potensi pemanfaatan limbah daun cengkeh sebagai agen antioksidan alami dan terapi pendukung dalam pengelolaan diabetes.

Kata Kunci: Daun Cengkeh; antioksidan; diabetes; hidrotermal

ABSTRACT

This study aims to evaluate the effect of hydrothermal extraction on the phytochemical content and antioxidant activity, as well as to assess the hypoglycemic effect of clove leaf waste extract (*Syzygium aromaticum* L.) on blood glucose levels. Clove leaf powder was extracted hydrothermally using water as a solvent for 1, 2, 3, and 4 hours at 180°C. Each extract was tested for total phenolic content, condensed tannins, free radical scavenging activity, α -amylase inhibition, glucose level determination, and chemical component identification. The results showed that the highest total phenolic content was found in the 1-hour extract ($95.35 \pm 0.78 \mu\text{g/mL}$), the highest tannin content in the 1-hour extract ($98.94 \pm 2.48 \mu\text{g/mL}$), the highest DPPH radical scavenging activity in the 1-hour extract ($63.18 \pm 1.22\%$), the highest FRAP activity in the 1-hour extract ($93.80 \pm 1.14\%$), the highest α -amylase inhibition in the 1-hour extract ($98.93 \pm 1.48\%$) and the highest glucose level reduction ($52.665 \pm 0.29\%$) were also observed in the 1-hour extract. Therefore, it can be concluded that hydrothermal extraction at 180°C for 1 hour produces an extract with the highest antioxidant activity and hypoglycemic effect. These findings highlight the potential of clove leaf waste as a natural antioxidant agent and a supportive therapy in diabetes management.

Keywords: Clove Leaf; Antioxidant; Diabetes; Hydrothermal.

PENDAHULUAN

Diabetes Melitus (DM) merupakan gangguan metabolismik yang ditandai dengan hiperglikemia akibat gangguan sekresi atau kerja insulin (Soegondo, 2009). Menurut (WHO) World Health Organization, DM menjadi ancaman kesehatan global dengan perkiraan peningkatan jumlah penderita di Indonesia dari 8,4 juta tahun 2000 menjadi 21,3 juta pada 2030. Data (IDF) International Diabetes Federation menunjukkan bahwa pada 2015 terdapat 415 juta penderita DM di dunia, dan jumlah ini diprediksi meningkat hingga 642 juta pada 2040. Sementara itu, hasil Riskesdas 2018 mencatat kenaikan prevalensi diabetes di Indonesia dari 6,9 persen pada 2013 menjadi 8,5 persen, menunjukkan tren peningkatan penyakit tidak menular yang signifika (Riskesdas, 2018).

Penyakit ini terutama dapat menyerang manusia karena adanya kelainan pada sekresi atau resistensi insulin. Alfa-amilase pankreas yang merupakan enzim utama di usus halus, enzim ini berperan besar dalam pencernaan pati yang menghasilkan glukosa dan maltosa, yang menyebabkan peningkatan kadar glukosa setelah makan. Oleh karena itu, mengurangi laju pencernaan pati dengan menghambat enzim seperti alfa-amilase adalah cara terbaik untuk mengelola diabetes (Sudha dkk., 2011). Stres oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas juga merupakan salah satu faktor penyebab diabetes. Senyawa antioksidan berperan besar dalam penangkal radikal bebas dan mengendalikan penyakit yang berhubungan dengan stres oksidatif seperti diabetes (Unnikrishnan dkk., 2015).

Oleh karena itu, pencarian sumber alami dengan aktivitas antioksidan dan hipoglikemik yang tinggi menjadi penting dalam upaya pencegahan dan pengobatan diabetes. Salah satu sumber alami yang berpotensi adalah limbah daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.). Daun cengkeh merupakan salah satu tanaman rempah yang banyak dimanfaatkan dalam industri farmasi, kosmetik, juga sebagai obat herbal, tetapi juga bermanfaat sebagai sumber senyawa bioaktif karena kemampuannya untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder telah didokumentasikan secara luas. Daun cengkeh mengandung sejumlah besar polifenol, yang merupakan antioksidan efektif dan memiliki aktivitas biologis tertentu. Kandungan utama dalam daun cengkeh seperti eugenol, flavonoid dan senyawa fenolik telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan dan memainkan peran kunci dalam pengelolaan diabetes melitus melalui aktivitas hipoglikemik (Talib, 2024).

Namun, tantangan utama dalam pemanfaatan senyawa bioaktif dari daun cengkeh adalah efisiensi metode ekstraksi yang digunakan. Metode ekstraksi konvensional seperti maserasi dan Soxhlet sering kali memerlukan pelarut organik (heksana, etil asetat, etanol, methanol) dalam jumlah besar serta waktu ekstraksi yang lama, yang dapat berdampak pada efisiensi dan keberlanjutan proses (Triesty, 2017). Beberapa penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ekstrasi daun cengkeh banyak menggunakan metode seperti eksraksi maserasi (Wahyulianingsih, 2016), sokletasi (Wardatun dkk., 2021) dan destilasi (Sumampouw, 2022) dimana ketiga metode ekstraksi ini memerlukan waktu yang cukup lama dan juga menggunakan pelarut organik yang tidak ramah lingkungan.

Oleh karena itu, diperlukan metode alternatif yang lebih ramah lingkungan dan efisien dalam mengekstraksi senyawa bioaktif dari limbah daun cengkeh. Ekstraksi hidrotermal merupakan metode yang jarang digunakan namun memiliki potensi besar dalam meningkatkan efisiensi ekstraksi senyawa bioaktif. Metode ini menggunakan air sebagai pelarut pada suhu dan tekanan tinggi, yang dapat meningkatkan kelarutan dan pelepasan senyawa aktif dari matriks tumbuhan tanpa perlu menggunakan pelarut organik (Sadat-Shojaei dkk, 2011). Oleh karena itu, ekstraksi hidrotermal dari limbah daun cengkeh menggunakan air sebagai pelarut diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam meningkatkan rendemen dan aktivitas ekstrak fenolik sebagai antioksidan dan agen hipoglikemik.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan antara lain daun cengkeh dari Desa Talaitad, aquades (air suling), reagen DNS (asam 3,5-dinitrosalisilat), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin), reagen Folin Ciocalteu 50%, Na₂CO₃ 2%, etanol 96%, AlCl₃ 4%, K₃[Fe(CN)₆], FeCl₃, AlCl₃ 2%, larutan penyanga fosfat (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄), reagen Nelson, reagen arsenomolibdat.

Preparasi Sampel

Daun cengkeh yang diambil dari Desa Talaitad, Kecamatan Suluun Tareran, Minahasa Selatan, Sulawesi Utara, dibersihkan terlebih dahulu, kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40-45°C. Setelah daun cengkeh kering, selanjutnya diblender dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh

Ekstraksi Hidrotermal

Sebanyak 5 gram sampel serbuk daun cengkeh dimasukkan ke dalam wadah hidrotermal kemudian ditambahkan aquades sebanyak 70 mL. Wadah hidrotermal dikunci erat kemudian dimasukkan dalam oven pada suhu 180 °C dengan variasi waktu 1, 2, 3 dan 4 jam. Setelah itu hasil yang diperoleh kemudian disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh masing-masing dievaporasi sampai kering sehingga diperoleh empat ekstrak dengan variasi waktu 1, 2, 3 dan 4 jam.

Penentuan Kandungan Total Fenolik

Kandungan total fenolik ekstrak daun cengkeh ditentukan menggunakan metode Folin-Ciocalteu (Sineke, 2016). Sebanyak 0,1 mL masing-masing sampel dengan konsentrasi 1000 µg/mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 0,1 mL reagen Folin Ciocalteu 50%. Campuran tersebut divortex, lalu ditambahkan 2 mL larutan natrium karbonat (Na_2CO_3 2%). Selanjutnya campuran diinkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit. Absorbansinya dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 750 nm.

Penentuan Kandungan Total Tanin Terkondensasi

Penentuan kadar total tanin menggunakan metode Julkunen-Tiitto (Suryanto & Wehantouw, 2009). Ekstrak sebanyak 0,5 mL dicampur dengan 8 mL air, 0,5 mL FeCl_3 0,1 M, dan 0,5 mL $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,008 M setelah itu diinkubasi selama 10 menit. Absorbansi dibaca pada spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 720 nm.

Penentuan Penangkal Radikal Bebas DPPH

Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak daun cengkeh ditentukan dengan metode 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) Suryanto dkk. (2018). Sebanyak 0,5 mL masing-masing ekstrak ditambahkan dengan 1,5 mL larutan DPPH dan divortex selama 2 menit. Berubahnya warna larutan dari ungu ke kuning menunjukkan efisiensi penangkal radikal bebas. Selanjutnya pada 5 menit terakhir menjelang 30 menit inkubasi, absorbansinya diukur pada panjang gelombang 517 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Penentuan Penangkal Radikal Bebas FRAP

Penentuan aktivitas antioksidan ditentukan dengan metode *ferric reducing ability of plasma*, FRAP, Safitri dkk. (2020). Pembuatan larutan FRAP Sebanyak 0,03 gr TPTZ dan 0,054 gr $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, masing-masing dilarutkan dalam 10 mL HCl 40 mM dan 10 mL aquades. Sebanyak 50 mL buffer asetat pH 3,6 dicampurkan dengan larutan TPTZ 5 mL, larutan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 5 mL. Lalu ditambahkan aquades hingga tepat 100 mL dalam labu ukur. Penentuan Aktivitas Antioksidan Sebanyak 0,1 mL masing-masing larutan ekstrak fenolik bebas dan fenolik terikat dengan perlakuan ekstrak etanol (ET), ekstrak aquades (AQ), dan ekstrak tanpa perlakuan (TP) ditambahkan 3 mL reagen FRAP. Kemudian divortex, lalu diamati absorbansinya pada panjang gelombang 596 nm.

Penentuan Enzim Alfa Amilase

Metode ini berdasarkan glukosa yang terbentuk (Mandels dkk., 1976). Sebanyak 0,5 mL enzim, 0,5 mL larutan pati 0,1% dan larutan penyanga fosfat pH 6,5 dicampur lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 60°C. Kemudian ditambahkan 2 mL pereaksi DNS (dinitrosalicylic acid) dididihkan selama 10 menit pada penangas air dan didinginkan. Setelah dingin, campuran tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm. Kadar glukosa yang terbentuk ditentukan dengan menggunakan kurva standar glukosa. Uji ini dilakukan pada tahap penentuan KM dan V_{maks}.

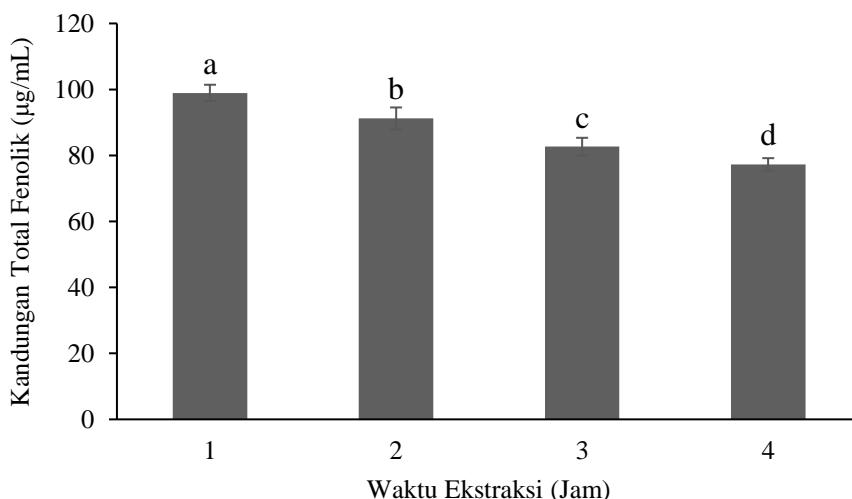
Identifikasi Komponen Kimia Ekstrak Limbah Daun Cengkeh

Sampel terbaik dikarakterisasi dengan menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) dan Spektrofotometer FTIR.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kandungan Total Fenolik

Folin-Ciocalteau digunakan dalam penentuan total fenolik karena fenolik dapat bereaksi bersama reagen Folin-Ciocalteau untuk menghasilkan larutan berwarna (kuning) sehingga menghasilkan senyawa kompleks yaitu molybdenum-tungstat yang absorbansinya dapat diuji dengan Spektrofotometri UV-Vis. Pereaksi Na_2CO_3 2% digunakan untuk menghasilkan lingkungan basa.

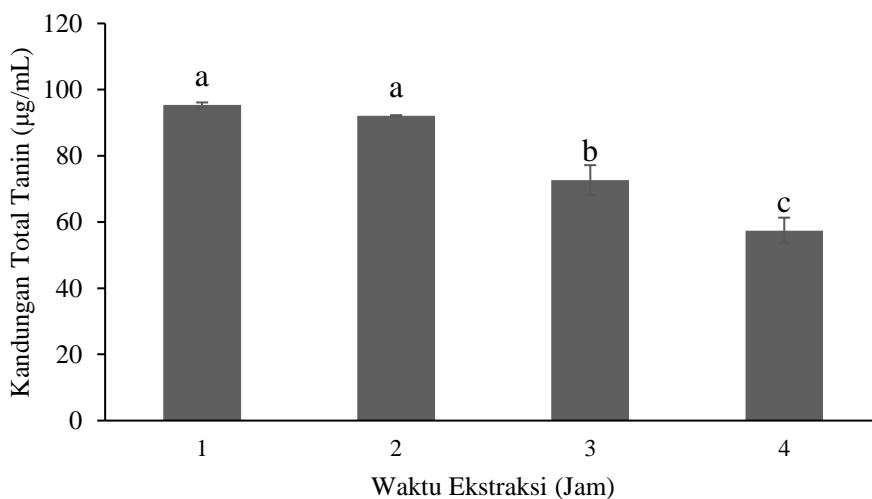


Gambar 1. Kandungan fenolik dari ekstrak daun cengkeh dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pada berbagai waktu ekstraksi.

Berdasarkan Gambar 1, kandungan total fenolik tertinggi terdapat pada perlakuan ekstraksi 1 jam sebesar $98,93 \pm 2,48 \mu\text{g}/\text{mL}$, diikuti oleh perlakuan ekstraksi 2 jam sebesar $91,19 \pm 3,35 \mu\text{g}/\text{mL}$, diikuti oleh perlakuan ekstraksi 3 jam sebesar $82,66 \pm 2,68 \mu\text{g}/\text{mL}$, dan terendah terdapat pada perlakuan ekstraksi 4 jam sebesar $77,27 \pm 1,90 \mu\text{g}/\text{mL}$. Rendahnya kandungan total fenolik pada perlakuan 4 jam, disebabkan karena senyawa fenolik masih kemungkinan besar telah rusak dan hilang oleh pengaruh tingginya suhu pada saat ekstraksi hidrotermal. Tingginya kandungan total fenolik pada perlakuan 1–2 jam, disebabkan oleh suhu yang digunakan mampu secara efektif memecah ikatan senyawa fenolik dengan komponen dinding sel. Namun, pada perlakuan 3 jam terjadi penurunan kandungan total fenolik. Penurunan ini disebabkan oleh efek degradasi termal atau oksidasi yang terjadi pada suhu tinggi, sehingga senyawa fenolik tertentu yang sensitif terhadap panas mengalami kerusakan. Suryanto dan Taroreh (2020) mengatakan bahwa hal ini disebabkan oleh perbedaan bahan tumbuhan saat diekstraksi dengan pelarut. Senyawa fenol biasanya berikatan dengan gula sebagai glikosida, sehingga cenderung mudah larut dalam pelarut polar. Studi yang dilakukan oleh Zhang dkk. (2018) menunjukkan bahwa teknik ekstraksi yang menggunakan pelarut polar seperti etanol memiliki kecenderungan untuk meningkatkan jumlah fenolik dalam ekstrak. Senyawa fenolik, yang biasanya berikatan dengan gula sebagai glikosida, lebih mudah larut dalam pelarut polar. Oleh karena itu, pemanasan 1 jam pada suhu 180°C memungkinkan senyawa fenolik untuk lebih efisien terlepas dari ikatannya dengan dinding sel serta mampu memecah ikatan antara senyawa fenolik dan komponen dinding sel serta pada waktu 1 jam suhu 180°C cukup untuk melarutkan senyawa fenolik tanpa merusaknya, sehingga kandungan total fenolik tetap tinggi, sementara pada waktu 2–4 jam suhu 180°C, degradasi senyawa fenolik yang sensitif terhadap panas dapat menyebabkan penurunan total fenolik yang terdeteksi. Secara keseluruhan, suhu pemanasan serta lama waktu ekstraksi memiliki pengaruh besar terhadap kandungan total fenolik ekstrak daun cengkeh. Waktu 1 jam suhu 180°C mendukung ekstraksi fenolik yang optimal tanpa menyebabkan kerusakan yang signifikan, sedangkan waktu 2–4 jam suhu 180°C dapat merusak sebagian senyawa fenolik. Oleh karena itu, suhu 180°C merupakan kondisi yang ideal untuk memperoleh kandungan total fenolik yang tinggi dalam ekstrak daun cengkeh.

Kadar Total Tanin Terkondensasi

Golongan tanin merupakan senyawa fenolik yang cenderung larut dalam air dan pelarut polar. Pengujian tanin dilakukan dengan melakukan penambahan FeCl_3 . Perubahan warna ini terjadi ketika penambahan FeCl_3 yang bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada senyawa tanin. Pada penambahan FeCl_3 pada ekstrak uji menghasilkan warna hijau kehitaman yang menunjukkan mengandung senyawa tanin terkondensasi (Sangi dkk., 2008). Hasil penentuan kandungan total tanin dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kandungan total tanin dari ekstrak daun cengkeh dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pada berbagai waktu ekstraksi.

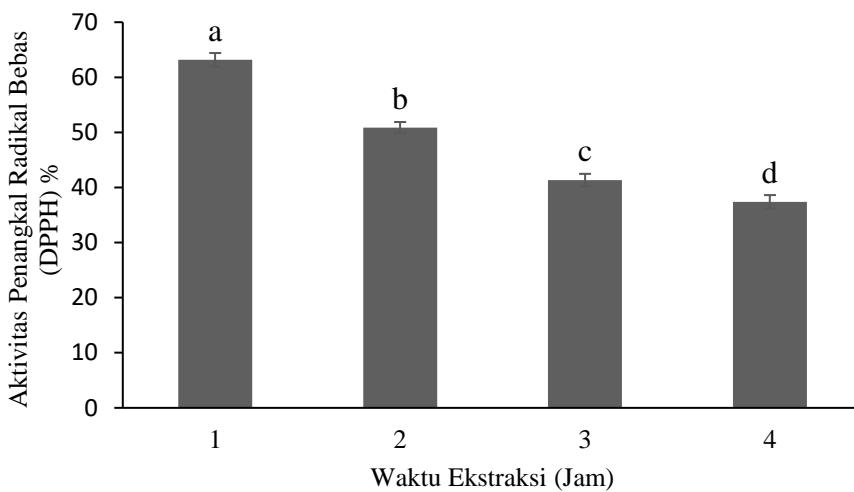
Pada Gambar 2 terlihat bahwa kandungan total tanin tertinggi terdapat pada perlakuan ekstraksi 1 jam sebesar $95,36 \pm 0,78 \mu\text{g}/\text{mL}$, diikuti oleh perlakuan ekstraksi 2 jam sebesar $92,08 \pm 0,20 \mu\text{g}/\text{mL}$, dan perlakuan ekstraksi 3 jam sebesar $74,49 \pm 1,4 \mu\text{g}/\text{mL}$ kemudian terendah terdapat pada perlakuan ekstraksi 4 jam sebesar $59,33 \pm 0,93 \mu\text{g}/\text{mL}$. Tingginya kandungan total tanin pada perlakuan ekstraksi 1 dan 2 jam dikarenakan suhu ini mampu merusak dinding sel tanaman dengan lebih efektif, sehingga memungkinkan pelarut etanol untuk lebih mudah mengakses dan melarutkan tanin. Pada perlakuan B terjadi penurunan kandungan total tanin, dimana tanin pada sampel mengalami kerusakan akibat tingginya suhu ekstraksi. Secara keseluruhan, suhu yang tinggi mempercepat proses ekstraksi dan meningkatkan jumlah tanin yang dapat diekstraksi dengan bantuan pelarut etanol akan tetapi suhu tinggi serta pemanasan lama mengakibatkan kerusakan pada tanin. Momuat dkk. (2015) menyatakan bahwa senyawa polifenol yang mengandung tanin sebagian besar berupa fenolik dan merupakan polimer dari senyawa flavonoid. Jenis tanin ini biasanya terdiri dari polimer flavonoid, salah satunya adalah senyawa katekin.

Penangkal Radikal Bebas DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Metode ini dipilih karena merupakan metode yang sederhana, mudah, cepat, peka, dan hanya memerlukan sedikit sampel (Molyneux, 2004). Pengujian ini berdasarkan pada kemampuan substansi antioksidan yang terdapat pada sampel dalam menetralkan radikal bebas DPPH. Radikal bebas DPPH yang memiliki elektron tidak berpasangan akan memberikan warna ungu, warna akan berubah menjadi kuning saat elektronnya berpasangan (Prakash dkk., 2001). Menurut Yen & Duh (1994), makin cepat nilai absorbansi turun, makin potensial antioksidan tersebut dalam mendonorkan hydrogen. Hasil pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dapat dilihat pada gambar 3.

Berdasarkan Gambar 3, terlihat bahwa aktivitas antioksidan (DPPH) tertinggi terdapat pada perlakuan ekstraksi 1 jam sebesar $63,18 \pm 1,22\%$, diikuti oleh perlakuan ekstraksi 2 jam sebesar $50,87 \pm 1,0\%$, diikuti oleh perlakuan ekstraksi 3 jam sebesar $41,33 \pm 1,1\%$, dan terendah pada perlakuan ekstraksi 4 jam sebesar $37,37 \pm 1,25\%$. Data ini menunjukkan bahwa perlakuan ekstraksi 1 jam dan 2 jam memiliki aktivitas penangkal radikal bebas DPPH di atas 50%, yang mengindikasikan bahwa kedua perlakuan tersebut mampu berperan sebagai antioksidan primer yang efektif. Antioksidan primer bekerja dengan cara menyumbangkan atom hidrogen kepada radikal bebas DPPH yang awalnya berwarna ungu. Setelah berinteraksi dengan antioksidan, radikal bebas ini berubah menjadi bentuk non-radikal yang berwarna kuning, mengurangi intensitas warna ungu pada larutan. Penurunan intensitas warna ungu ini mencerminkan kemampuan antioksidan dalam menetralkan radikal bebas (Suryanto, 2018). Semakin kuat kemampuan antioksidan dalam menetralkan radikal bebas, semakin banyak perubahan warna yang terjadi pada larutan tersebut. Berdasarkan Suryanto dkk. (2011), aktivitas penangkal radikal bebas sangat berkaitan dengan kandungan fitokimia, terutama senyawa fenolik.

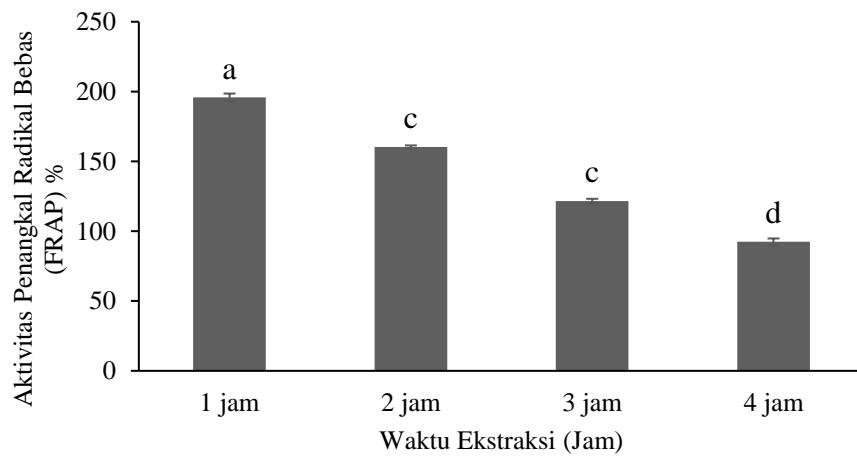
Fenolik merupakan senyawa yang dikenal memiliki aktivitas antioksidan yang kuat karena dapat mendonasikan elektron atau atom hidrogen untuk menetralkan radikal bebas, sehingga melindungi tubuh dari kerusakan oksidatif.



Gambar 3. Kandungan penangkal radikal bebas DPPH dari ekstrak daun cengkeh dengan konsentrasi 1000 µg/mL pada berbagai waktu ekstraksi.

Penangkal Radikal Bebas FRAP

Metode ini mengukur aktivitas antioksidan suatu sampel dengan cara menilai kemampuan senyawa antioksidan dalam mereduksi ion Fe^{3+} menjadi ion Fe^{2+} dalam lingkungan asam, yang ditandai dengan pembentukan kompleks berwarna hijau (Mangkasa dkk., 2018). Berdasarkan uji ragam (ANOVA) pada taraf 5%, proses modifikasi tepung pisang dari 3 perlakuan pada penelitian ini berpengaruh nyata ($p<0,05$) terhadap total antioksidan (FRAP). Hasil total antioksidan (FRAP) ekstrak daun cengkeh hasil ekstraksi hidrotermal dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Aktivitas penangkal radikal bebas FRAP dari ekstrak daun cengkeh dengan konsentrasi 1000 µg/mL pada berbagai waktu ekstraksi

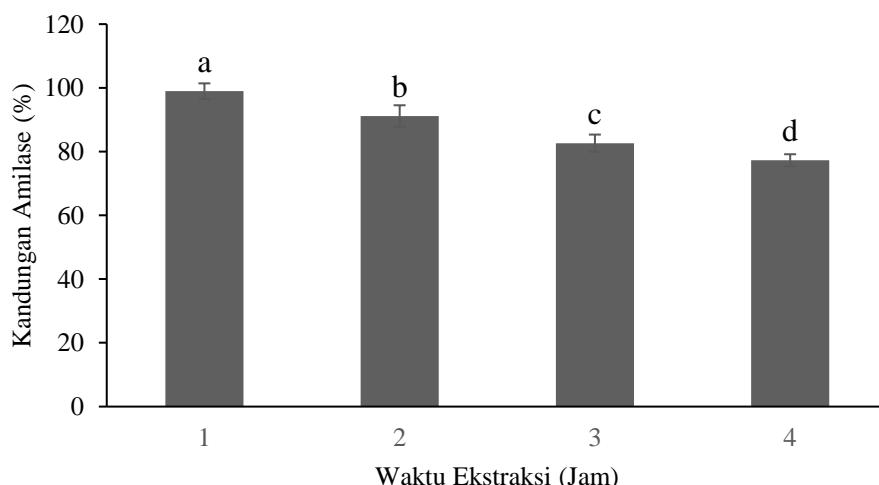
Pada Gambar 4 terlihat bahwa aktivitas antioksidan (FRAP) tertinggi terdapat pada perlakuan ekstraksi 1 jam 180°C sebesar $195,73 \pm 2,83$ mmol/100g, diikuti oleh perlakuan ekstraksi 2 jam 180°C sebesar $160,23 \pm 1,21$ mmol/100g, diikuti oleh perlakuan ekstraksi 3 jam 180°C sebesar $121,57 \pm 1,61$ mmol/100g dan terendah terdapat pada perlakuan ekstraksi 4 jam 180°C sebesar $92,37 \pm 1,75$ mmol/100g. Data ini menunjukkan bahwa perlakuan ekstraksi 1 jam 180°C menghasilkan total antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan ekstraksi 2 jam 180°C, ekstraksi 3

jam 180°C dan ekstraksi 4 jam 180°C yang menunjukkan bahwa dalam waktu 1 jam dan suhu 180°C memberikan hasil terbaik dalam kapasitas antioksidan dalam ekstrak daun cengkeh. Hasil yang lebih tinggi pada perlakuan ekstraksi 1 jam 180°C dapat dihubungkan dengan kandungan senyawa fenolik yang lebih besar. Senyawa fenolik, yang mengandung gugus hidroksi (-OH), berfungsi sebagai donor elektron atau proton, yang berkontribusi pada kemampuan antioksidan. Senyawa ini dapat berinteraksi dengan 56 radikal bebas, menetralkasirnya, dan mengurangi potensi kerusakan oksidatif pada sel (Suryanto dkk., 2012). Oleh karena itu, tingginya total antioksidan pada perlakuan ekstraksi 1 jam 180°C menunjukkan bahwa suhu dan waktu tersebut lebih efektif dalam mengoptimalkan ekstraksi senyawa fenolik yang berperan dalam aktivitas antioksidan.

Hasil ini sejalan dengan hasil yang diperoleh melalui pengujian metode DPPH, yang juga menunjukkan bahwa perlakuan dengan waktu 1 jam suhu 180°C memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan waktu ekstraksi yang lebih lama. Hal ini menunjukkan konsistensi antara metode pengujian DPPH dan FRAP, yang semuanya mengukur kemampuan senyawa antioksidan dalam menstabilkan radikal bebas, meskipun dengan mekanisme yang sedikit berbeda. Penemuan ini juga konsisten dengan penelitian yang dilakukan oleh Allo dkk. (2022), yang menemukan bahwa senyawa fenolik yang lebih tinggi dalam suatu sampel berhubungan langsung dengan peningkatan aktivitas antioksidan, termasuk dalam uji FRAP. Dengan demikian, hasil pengujian total antioksidan (FRAP) ini memperkuat hipotesis bahwa waktu yang relatif singkat pada suhu 180°C, lebih efektif dalam mengoptimalkan kandungan senyawa fenolik, yang pada gilirannya meningkatkan potensi antioksidan dalam ekstrak daun cengkeh.

Pengaruh Ekstrak Terhadap Aktivitas Enzim Amilase

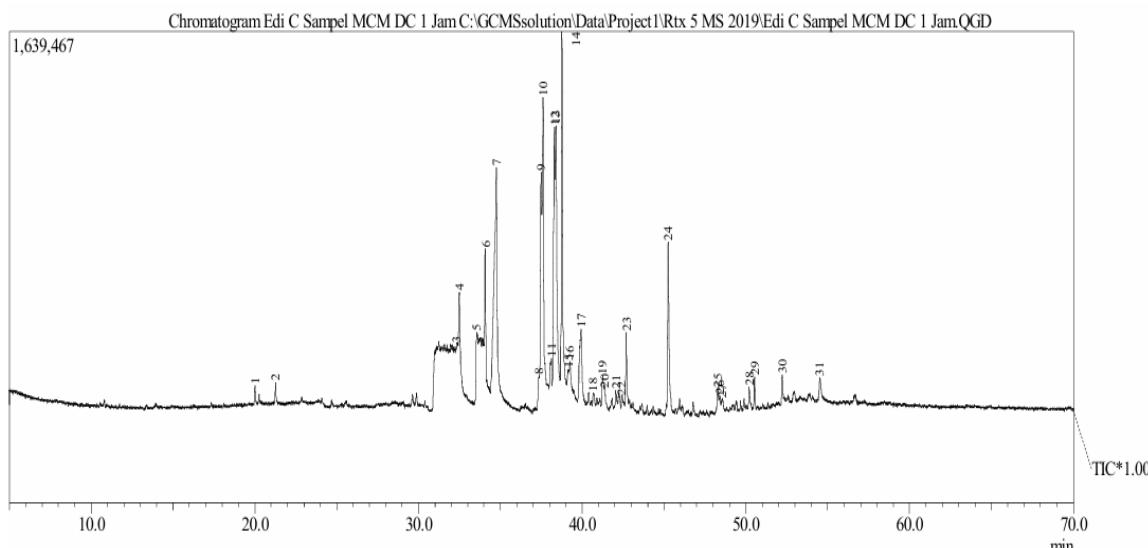
Pengujian aktivitas enzim dilakukan secara *in vitro*. Pati pada penelitian ini berfungsi sebagai substrat dari enzim. Sedangkan DNS berfungsi sebagai reagen pewarna, dimana reagen ini berikatan dengan substrat membentuk warna kuning, sehingga absorbansinya dibaca pada spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 540 nm. Berdasarkan penelitian aktivitas penghambatan amilase, keempat ekstrak sampel dapat menghambat kerja enzim. Hal ini dikarenakan sampel tersebut mengandung senyawa metabolit yang diduga memiliki khasiat sebagai obat antidiabetes yaitu alkaloid, flavonoid, fenolik dan saponin. Persentase penghambatan pati dan kelima ekstrak terhadap enzim α -amilase disajikan pada Gambar 5. Semua sampel yang diuji menunjukkan kemampuan untuk menghambat enzim α -amilase dan sampel yang paling unggul adalah perlakuan ekstraksi 1 jam 180°C sebesar $98,93 \pm 2,48$, diikuti perlakuan ekstraksi 2 jam sebesar $91,19 \pm 2,34$, diikuti perlakuan ekstraksi 3 jam $82,66 \pm 2,67$, diikuti perlakuan ekstraksi 4 jam $77,27 \pm 1,89$. Keempat ekstrak sampel mempunyai kemampuan untuk menghambat enzim α -amilase karena mengandung senyawa berupa alkaloid, tanin dan fenolik yang menurut penelitian Sinulingga dkk. (2008) merupakan senyawa aktif yang berpengaruh dalam menghambat aktivitas enzim amilase.



Gambar 5. Aktivitas Penghambatan Enzim α -amilase

Hasil Identifikasi Senyawa Ekstrak Daun Cengkeh Dengan Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Gambar 6 menunjukkan spektrum GC dari ekstrak daun cengkeh hasil ekstraksi hidrotermal merepresentasikan keberadaan berbagai senyawa volatil dalam sampel. Puncak-puncak yang muncul pada kromatogram menunjukkan waktu retensi dari masing-masing senyawa, yang mengindikasikan keberagaman senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak. Puncak-puncak dominan, seperti yang terlihat pada rentang waktu 35–45 menit, kemungkinan besar merepresentasikan senyawa-senyawa fenolik yang dikenal memiliki aktivitas biologis, termasuk antioksidan dan antidiabetik (Singh dkk., 2021). Proses ekstraksi hidrotermal yang digunakan dalam penelitian ini didesain untuk memaksimalkan pelepasan senyawa aktif dari material lignoselulosa daun, terutama senyawa polifenol yang larut dalam air pada suhu tinggi (Yuliarti dkk., 2022). Identifikasi lebih lanjut terhadap puncak-puncak dalam spektrum GC akan dilakukan menggunakan GC-MS untuk menentukan struktur molekul senyawa penyusun dan mengaitkannya dengan aktivitas biologis seperti penghambatan enzim α -amilase dan kemampuan menangkap radikal bebas (Mulyani dkk., 2020).



Total % Area:	91.52
---------------	-------

Berdasarkan Tabel 1, diketahui terdapat 12 senyawa kimia dan dengan kemiripan $\geq 90\%$ yang teridentifikasi dalam ekstrak daun cengkeh hasil ekstraksi hidrotermal. Eugenol, vanilin, senyawa fenol, dan asam-asam organik lainnya teridentifikasi pada ekstrak daun cengkeh hasil ekstraksi hidrotermal. Diketahui bahwa senyawa fenol yang teridentifikasi pada ekstrak daun cengkeh hasil ekstraksi hidrotermal yaitu Eugenol, Vanilin serta Asam lemak Asam palmitat & metil palmitat, Asam stearat, Asam oleat & metil oleat, Asam linoleoil klorida, Asam miristat, Asam heptadekenoat, dan Asam heksadecenoat.

Berdasarkan hasil analisis GC-MS terhadap ekstrak hidrotermal limbah daun cengkeh, diperoleh 12 senyawa utama dengan indeks kemiripan $\geq 90\%$ dan total persentase area sebesar 44,27%. Senyawa pertama yang teridentifikasi adalah eugenol (0,42%), senyawa fenolik utama dalam cengkeh yang dikenal memiliki aktivitas antioksidan tinggi karena kemampuannya menangkap radikal bebas. Senyawa vanilin (0,49%) juga ditemukan dalam jumlah kecil, berperan sebagai antioksidan ringan serta berkontribusi terhadap aroma khas. Senyawa dominan berikutnya adalah asam lemak seperti asam heksadecanoat serta asam tetradekanoat. Keberadaan eugenol dan vanilin sebagai senyawa fenolik mendukung aktivitas antioksidan ekstrak, sementara dominasi asam lemak tak jenuh seperti asam oleat dan palmitoleat memperkuat potensi aktivitas hipoglikemik dari ekstrak hidrotermal daun cengkeh. Oleh karena itu, hasil identifikasi senyawa ini mempertegas bahwa limbah daun cengkeh mengandung komponen bioaktif yang bermanfaat, terutama sebagai agen antioksidan dan antidiabetes alami.

KESIMPULAN

Ekstrak hidrotermal daun cengkeh yang dilakukan selama 1 jam menunjukkan hasil paling optimal dalam penelitian ini. Pada durasi tersebut, diperoleh kandungan total fenolik dan tanin tertinggi, sementara peningkatan waktu ekstraksi justru menurunkan kadar kedua senyawa tersebut akibat degradasi termal. Aktivitas antioksidan tertinggi ditunjukkan oleh ekstrak 1 jam berdasarkan uji DPPH dan FRAP, serta memiliki kemampuan paling baik dalam menghambat enzim α -amilase, yang mengindikasikan potensi efek hipoglikemik. Efektivitas ekstrak dalam menurunkan kadar glukosa juga terkonfirmasi melalui hasil pengujian. Analisis kimia lebih lanjut menggunakan GC-MS mengungkapkan keberadaan senyawa utama seperti eugenol dan vanillin serta senyawa fenolik lainnya yang diduga kuat berperan dalam aktivitas antioksidan dan hipoglikemik.

DAFTAR PUSTAKA

- Allo, I. S., Suryanto, E., & Koleangan, H. S. J. 2022. Aktivitas Antioksidan Fenolik Bebas dan Terikat dari Tepung Cangkang Pala (*Myristica fragrans Houtt.*). *Chemistry Progress*, 15(2), 83-92.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kemenkes RI. (2018). Laporan Nasional Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2018. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Cortés-Rojas DF, de Souza CRF, Oliveira WP. 2014. Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. *Asian Pac J Trop Biomed*, 4(2), 90–6.
- IDF. 2017. International Diabetes Federation Atlas 6th. Belgium: International Diabetes Federation
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia (KEMENKES RI). 2017. Apakah Itu Hipoglikemia Dan Bagaimana Hal Itu Dapat Dicegah Dan Dikelola. <https://p2ptm.kemkes.go.id/kegiatan-p2ptm/apakah-itu-hipoglikemia-dan-bagaimana-hal-itu-dapat-dicegah-dan-dikelola>. Diakses pada tanggal 19 November 2024.
- Mandels, M., Andreotti, R., & Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. In Biotechnol. Bioeng. Symp.;(United States) (Vol. 6). Army Natick Development Center, MA.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211–219

- Momuat, L. I., Suryanto, E., Rantung, O., Korua, A. & Datu, H. 2015. Perbandingan Senyawa Fenolik dan Aktivitas Antioksidan Antara Sagu Baruk Segar dan Kering. *Chemistry Progress*, 8(1), 17-24.
- Mulyani, Y., Pranowo, D., & Astuti, I. 2020. Antidiabetic activity and phytochemical analysis of clove (*Syzygium aromaticum*) leaf extracts. *Pharmacognosy Journal*, 12(6), 1403–1408.
- Prakash, A., Rigelhof, F., & Miller, E. 2001. *Antioxidant activity*. In *Antioxidants in Food: Practical Applications* (pp. 35–51). Woodhead Publishing.
- Prakash, D., Suri, S., Upadhyay, G., & Singh, B. N. 2001. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52(2), 153–162.
- Sadat-Shojai, M., Atai, M., & Nodehi, A. 2011. Design of experiments (DOE) for the optimization of hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanoparticles. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(1), 571-582.
- Saiya, A. 2017. Analisis Residu Klorpirifos Dalam Sayuran Kubis Dengan Metode Hplc Di Beberapa Pasar Tradisional Di Sulawesi Utara. *EKSAKTA: Berkala Ilmiah Bidang MIPA*, 18(02), 77-85
- Sineke, F.U. 2016. Penentuan kandungan fenolik dan sun protection factor (spf) dari ekstrak etanol dari beberapa tongkol jagung (*Zea mays L.*). *Pharmacon*. 5(1), 275-281.
- Sinulingga, S., Subandrate, S., & Tioline, N. W. 2021. Efek inhibisi infusa daun benalu kersen (*Dendrophthoe pentandra (L.) Miq*) terhadap enzim alfa-glukosidase dan alfa-amilase. *Jurnal Teknik Kimia USU*, 7(2), 55–61.
- Singh, S., Singh, D. K., & Verma, P. 2021. GC-MS analysis and biological activities of Syzygium aromaticum essential oil: Antioxidant, antimicrobial and anticancer properties. *Journal of Essential Oil Research*, 33(3), 258–265.
- Soegondo, S. 2009. Prinsip Dasar Ilmu Penyakit Diabetes Mellitus. Dalam: Sudoyo, A. W., Setiyohadi, B., Alwi, I., Simadibrata, M., & Setiati, S. (Eds.). Ilmu Penyakit Dalam, edisi ke-4, Jilid II. Jakarta: Interna Publishing
- Sudha P, Zinjarde SS, Bhargava SY, Kumar AR. Potent a-amylase inhibitory activity of Indian Sumampow, M. F., Suryanto, E., & Momuat, L. I. 2022. Potensi Antioksidan Dan Antibakteri Asap Cair Dari Limbah Sagu Baruk Dengan Daun Cengkeh. *Chemistry Progress*, 15(1), 47-54.
- Suryanto, E. 2012. Fitokimia Antioksidan. Surabaya: Putra Nusantara Media.
- Suryanto, E. & Momuat, L. I. 2017. Isolasi dan Aktivitas Antioksidan Fraksi dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea mays*). *AGRITECH*, 37,139-147.
- Suryanto, E. 2018. *Kimia Antioksidan*. CV. Patra Media Gravindo, Bandung.
- Suryanto, E., & Wehantouw, F. 2019. Aktivitas penangkap radikal bebas dari ekstrak fenolik daun sukun (*Artocarpus altilis F.*). *Chemistry Progress* , 2(1), 1-7.
- Suryanto, E., Momuat, L., Taroreh, M. & Wehantouw, F. 2019. Pengaruh Lemon Kalamansi (*Citrus Microcarpa*) terhadap Komposisi Kimia dan Fitokimia Antioksidan dari Tepung Pisang Goroho (*Musa spp.*). *Chemistry Progress*, 4(1), 11-19.
- Suryanto, E., & Wehantouw, F. 2019. Aktivitas Penangkap Radikal Bebas dari Ekstrak Fenolik Daun Sukun (*Artocarpus Altilis F.*). *Chemistry Progress*, 2(1), 1-7.
- Suryanto, E., & Taroreh, M. 2020. Aktivitas Antioksidatif Dan Anti-Glikasi Ekstrak Fenolik Bebas Dan Fenolik Terikat Dari Tongkol Jagung. *Chemistry Progress*, 13(2), 86-95.
- Talib, S., Sudin, S., & Suratin, M. D. 2024. Penerapan Metode Support Vector Machine (Svm) Pada Klasifikasi Jenis Cengkeh Berdasarkan Fitur Tekstur Daun. *PROSISKO: Jurnal Pengembangan Riset dan Observasi Sistem Komputer*, 11(1), 26-34.
- Triesty, I., & Mahfud, M. 2017. Ekstraksi Minyak Atsiri dari Gaharu (*Aquilaria Malaccensis*) dengan Menggunakan Metode Microwave Hydrodistillation dan Soxhlet Extraction. *Jurnal Teknik ITS*, 6(2), 393-396.
- Unnikrishnan, P.S., Suthindhiran, K., & Jayasri, M.A. 2015. Alpha-amylase Inhibition and Antioxidant Activity of Marine Green Algae and its Possible Role in Diabetes Management. *Pharmacognosy Magazine*, 11(44), 511-515.

- Wahyulianingsih, W., Handayani, S., & Malik, A. 2016. Penetapan kadar flavonoid total ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr & Perry). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 3(2), 188-193.
- Wardatun, S., & Sofihidayati, T. 2021. Kajian Pengaruh Metode Ekstraksi Tangkai Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap Kadar Eugenol. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 11(2), 82–88.
- WHO Study Group on Diabetes Mellitus. 2006. Diabetes mellitus: report of a WHO study group (Vol. 727). World Health Organization.
- Yen, G. C., & Duh, P. D. 1994. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(3), 629–632.
- Yuliarti, O., Lestari, N. D., & Suryadi, H. 2022. Optimization of hydrothermal extraction of phenolic compounds from plant waste and its antioxidant activity. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 29, 100401.
- Zhang, H., Zhang, Q., Zhang, Z., & Chen, H. 2018. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of different parts of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Molecules*, 23(12), 3097.