



**VARIASI SUHU DAN JENIS PELARUT PADA EKSTRAKSI DAUN
TEBKAU KASTURI INFERIOR SEBAGAI SENYAWA
ANTIBAKTERI**

SKRIPSI

Oleh

Nala Ummi Husainah

151710101020

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2020**



**VARIASI SUHU DAN JENIS PELARUT PADA EKSTRAKSI DAUN
TEMBAKAU KASTURI INFERIOR SEBAGAI SENYAWA ANTIBAKTERI**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan studi pada Program Studi Teknologi Hasil Pertanian (S1) dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian

Oleh

Nala Ummi Husainah

NIM 151710101020

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2020**

PERSEMBAHAN

Saya persembahkan skripsi ini untuk :

1. Keluarga tercinta Bapak Tohari dan Ibu Jami'ah, Kakak tersayang Muhammad Zain Muslimin, kedua adikku tercinta Muhammad Fathus Salim dan Miladiyatul Hafizhoh serta seluruh keluarga besar dan teman-teman yang selalu memberikan doa, dukungan, semangat, motivasi;
2. Almamater tercinta, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember beserta dosen dan guru-guru yang telah mendidik saya dari TK hingga tingkat Universitas semoga beliau-beliau mendapatkan pahala yang senantiasa mengalir.
3. Semua pihak yang telah membantu secara langsung atau pun tidak, dengan sengaja ataupun tidak. Terima kasih tak terhingga.

MOTTO

“Khayrunnaas anfa'uhum linnaas “
Sebaik-baik manusia adalah yang paling bermanfaat bagi manusia

“Ada hak orang lain atas hidup yang ditipkan untukmu.
Jadilah bermanfaat dan milikilah pribadi yang mengagumkan.”
(dr. Gamal Albinsaid, M. Biomed)



PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Nala Ummi Husainah

NIM : 151710101020

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul **“Variasi Suhu dan Jenis Pelarut pada Ekstraksi Daun Tembakau Kasturi Inferior sebagai Senyawa Antibakteri”** adalah benar-benar hasil karya saya sendiri kecuali dalam kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan dalam institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta mendapatkan sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 10 Juli 2020



Nala Ummi Husainah

NIM 151710101020

SKRIPSI



**VARIASI SUHU DAN JENIS PELARUT PADA EKSTRAKSI DAUN
TEMPAKAU KASTURI INFERIOR SEBAGAI SENYAWA
ANTIBAKTERI**

Oleh :

Nala Ummi Husainah

NIM 151710101020

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Ir. Jayus

Dosen Pembimbing Anggota : Ir. Giyarto, MSc.

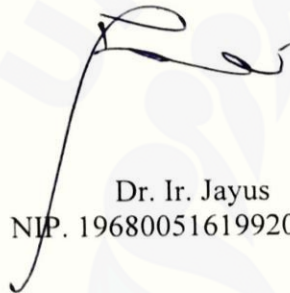
PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Variasi Suhu dan Jenis Pelarut pada Ekstraksi Daun Tembakau Kasturi Inferior sebagai Senyawa Antibakteri” karya Nala Ummi Husainah NIM 151710101020 telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada:

Hari, tanggal : Jum’at, 6 Maret 2020

Tempat : Ruang Sidang FTP Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama



Dr. Ir. Jayus
NIP. 1968005161992031004

Dosen Pembimbing Anggota



Ir. Giyarto, M.Sc.
NIP. 196607181993031013

Tim
Penguji :

Ketua



Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc.
NIP. 196411091989021002

Anggota



Aji Sukoco S.Pt., M.Si.
NIP. 760018065

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian



Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP., M.Eng
NIP. 19680923 199403 1 009

RINGKASAN

Variasi Suhu dan Jenis Pelarut pada Ekstraksi Daun Tembakau Kasturi Inferior sebagai Senyawa Antibakteri; Nala Ummi Husainah; 2015; 151710101020; 76 halaman; Program Studi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

Tanaman tembakau Kasturi banyak dibudidayakan di daerah Jember dan Bondowoso. Daun tembakau Kasturi digunakan sebagai bahan baku rokok kretek, namun tidak semua bagian daun Kasturi dapat dijadikan rokok kretek. Keterbatasan pemanfaatan daun tembakau Kasturi bagian pasir/koseran berpotensi diolah menjadi produk bernilai ekonomis. Daun tembakau diketahui memiliki kandungan senyawa aktif flavonoid yang dapat berfungsi sebagai antibakteri. Kandungan flavonoid daun tembakau dapat diperoleh dengan proses ekstraksi menggunakan pelarut yang bersifat polar agar hasil lebih maksimal.

Penelitian dilakukan dengan mengekstraksi daun tembakau Kasturi inferior menggunakan suhu dan jenis pelarut yang berbeda yaitu pelarut metanol dan etanol dengan suhu maserasi 30 °C, 60 °C dan 75 °C. Percobaan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Penggunaan jenis pelarut dan suhu yang berbeda diharapkan mampu meningkatkan jumlah ekstrak senyawa flavonoid dalam daun tembakau Kasturi inferior. Penelitian dilakukan dengan beberapa tahap, tahap pertama yaitu ekstraksi senyawa aktif dari daun inferior Kasturi, analisis total polifenol, analisis senyawa aktif dan uji aktivitas antibakteri. Data total polifenol yang diperoleh diuji statistik analisis keragaman (ANOVA), apabila ada perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) dengan tingkat signifikan $\alpha \leq 5\%$ untuk mengetahui tingkat perbedaan antar perlakuan. Pengolahan data menggunakan *software* SPSS versi 24. Data antibakteri dianalisis menggunakan *Microsoft excel* 2013. Data yang telah didapatkan diinterpretasikan sesuai hasil yang diperoleh dan dibandingkan dengan literatur yang ada.

Berdasarkan hasil penelitian ekstraksi daun tembakau Kasturi inferior menggunakan variasi jenis pelarut dan suhu maserasi diperoleh, hasil peningkatan total polifenol seiring dengan semakin tinggi polaritas pelarut dan meningkatnya suhu maserasi. Hasil penelitian menunjukkan perbedaan perlakuan pelarut metanol dan etanol meningkat tetapi tidak berpengaruh nyata terhadap total polifenol pada setiap suhu perlakuan sedangkan suhu perlakuan 30 °C, 60 °C dan 75 °C berpengaruh nyata terhadap total polifenol. Total polifenol pelarut metanol dan etanol pada masing-masing suhu perlakuan yaitu 13,71 ; 18,87 19,24 mg GAE/g dan 13,86 19,46 20,45 mg GAE/g.

Hasil analisis LC-MS ekstrak daun tembakau Kasturi inferior memiliki kandungan senyawa aktif golongan senyawa saponin, steroid, flavonoid, terpenoid dan aminoglikosida. Ekstrak daun tembakau Kasturi inferior berpotensi sebagai antibakteri. Pada ekstrak metanol memiliki nilai KHM pada bakteri *B. cereus* sebesar 0,711 mg/ml dan IC₅₀ sebesar 0,183 mg/ml dan pada bakteri *S. dysenteriae* menunjukkan nilai KHM sebesar 1,033 mg/ml dan IC₅₀ sebesar 0,249 mg/ml. Pada ekstrak etanol memiliki nilai KHM pada bakteri *B. cereus* sebesar 0,859 mg/ml dan IC₅₀ sebesar 0,210 mg/ml dan pada bakteri *S. dysenteriae* menunjukkan nilai KHM sebesar 2,089 mg/ml dan IC₅₀ sebesar 0,439 mg/ml.

SUMMARY

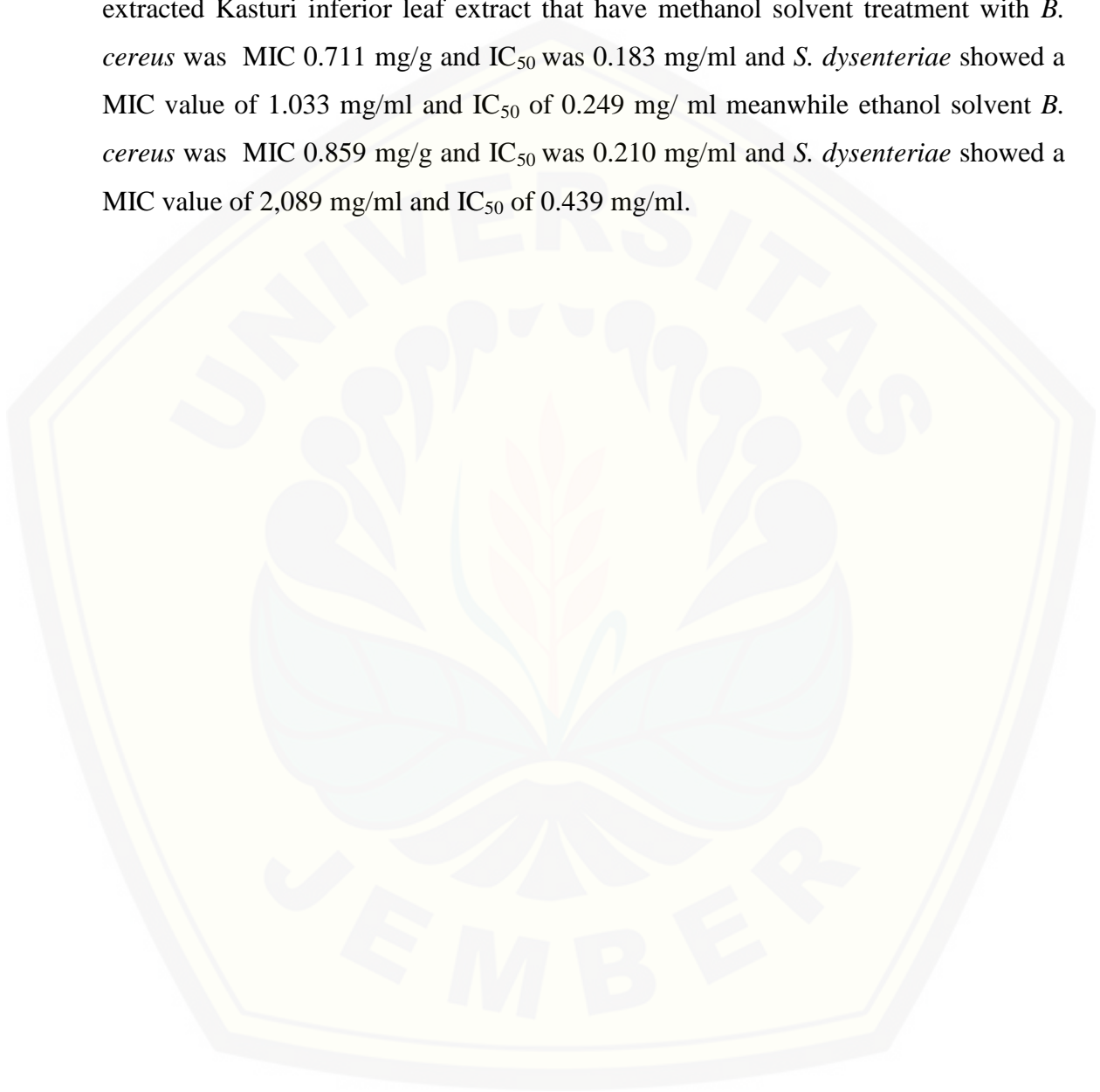
Extraction of Inferior *Kasturi* Tobacco Leaf at Different Temperature and Type of Solvents as Antibacterial Compounds; Nala Umami Husainah; 2015; 151710101020; 76 page; Department of Agricultural Product Technology, Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.

Kasturi tobacco is widely cultivated in Jember and Bondowoso and as use to fulfill the need of raw material for making clove cigarettes, but not all parts of *kasturi* leaves can be used as clove cigarettes. Limitations of the use tobacco leaves the sand / koseran need special handling by making it extract. Tobacco leaves contain active compounds such as alkaloids, flavonoids, and polyphenols. These compounds can be used as antibacterial. The flavonoids in tobacco leaf can be obtained by extraction process using polar solvent and maceration temperature that produces more maximum extract.

The study was conducted by extracting of *Kasturi* inferior leaf using different temperatures and types of solvents, namely methanol and ethanol solvents with maceration temperatures 30 °C, 60 °C and 75 °C. The use of solvent types and temperature variations are expected to increase flavonoids in *Kasturi* inferior leaves that produces more maximum extract. The research consist of four steps, the first step were extraction of active compounds from *Kasturi* inferior leaf, analysis total polyphenol, analysis active compound and antibacterial activity.

The research result showed that types of ethanol and methanol solvents did not significantly affect the total polyphenols at each different temperature and temperature maceration influent significantly in total polyphenols produced. Total polyphenols produced from methanol solvents at temperatures of 30 °C, 60 °C, and 75 °C respectively were 13.86 mg GAE/g; 19.46 mg GAE/g; 20.45 mg GAE/ g, while in ethanol the solvent produced a total polyphenol 13.71 mg GAE/g; 18.87 mg GAE/g; 19.24 mg GAE/g. The analysis chemical compound of extracted *Kasturi*

inferior leaf extract contain active compounds such as senyawa saponin, steroid, flavonoid, terpenoid and aminoglikosida. The result of antibacterial activity of extracted Kasturi inferior leaf extract that have methanol solvent treatment with *B. cereus* was MIC 0.711 mg/g and IC_{50} was 0.183 mg/ml and *S. dysenteriae* showed a MIC value of 1.033 mg/ml and IC_{50} of 0.249 mg/ml meanwhile ethanol solvent *B. cereus* was MIC 0.859 mg/g and IC_{50} was 0.210 mg/ml and *S. dysenteriae* showed a MIC value of 2,089 mg/ml and IC_{50} of 0.439 mg/ml.



PRAKATA

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Variasi Suhu dan Jenis Pelarut pada Ekstraksi Daun Tembakau Kasturi Inferior sebagai Senyawa Antibakteri”** dengan baik. Skripsi ini disusun berdasarkan hasil penelitian dan diajukan sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar Sarjana Teknologi Pertanian di Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik oleh penulis atas dukungan, bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP., M.Eng. selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
2. Dr. Ir. Jayus selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember dan selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah banyak membantu, membimbing, dan mengarahkan selama pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Ir. Giyarto, MSc. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan arahan, saran dan perbaikan dalam penyusunan skripsi.
4. Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc dan Aji Sukoco S.Pt., M.Si selaku Dosen Penguji Utama dan Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan saran dan arahan selama penyusunan skripsi.
5. Orang tua tercinta ibu Jami'ah dan bapak Tohari terimakasih atas kasih sayang, cinta, motivasi dan semangat yang luar biasa. Kakak tersayang Muhammad Zain Muslimin, kedua adikku tercinta Muhammad Fathus Salim dan Miladiyahul Hafizhoh serta seluruh keluarga besar yang tak pernah lelah mendoakan, memberikan motivasi serta dukungannya baik materil maupun moril

6. Partner pejuang proyek tembakau yang senantiasa membantu penulis selama penelitian hingga penyusunan skripsi dan sebagai tempat berbagi keluh kesah dan suka cita.
7. Keluarga besar THP B 2015 dan pejuang S.TP terima kasih telah memberikan saran dan dukungan.
8. Keluarga Kos Calysta Residence yang tidak bisa disebutkan satu per satu terimakasih atas doa dan semangatnya.
9. Partner dari lahir Luluk Nur Chasanah terima kasih atas doa, semangat dan motivasi kepada penulis, segera selesaikan juga hafalan Al-Qur'an nya.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah memberikan dukungan serta membantu pelaksanaan penelitian skripsi ataupun dalam penulisan skripsi sehingga dapat terselesaikan dengan baik.

Penulis sangat mengharapkan segala bentuk kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan di masa mendatang. Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Jember, Juli 2020

Penulis

DAFTAR ISI

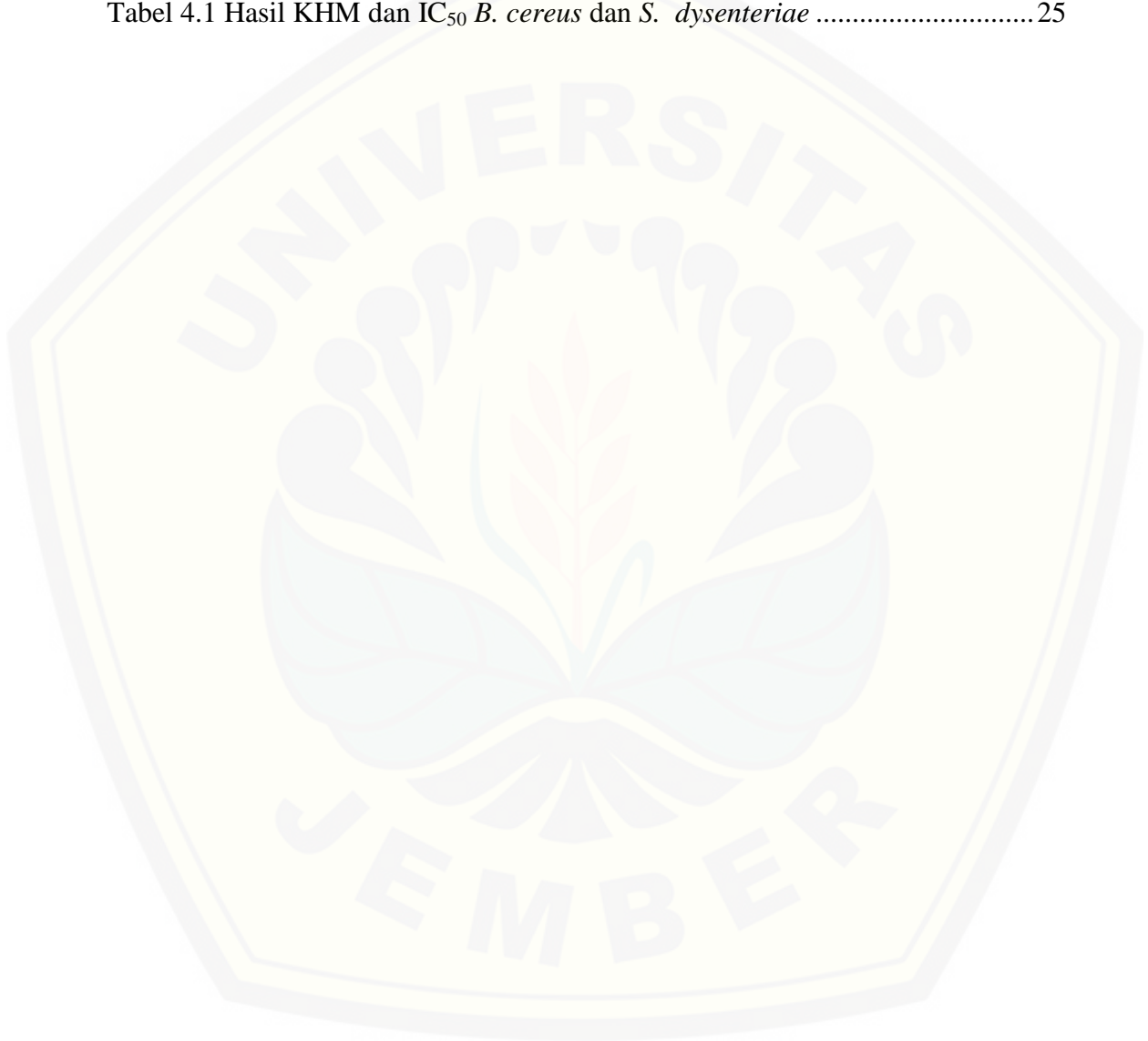
halaman

HALAMAN JUDUL	i
PERSEMBAHAN.....	ii
MOTTO	iii
PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
PENGESAHAN.....	vi
SUMMARY	viii
RINGKASAN	ix
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Tembakau Kasturi dan Komposisi Kimia Tembakau	4
2.2 Metabolit Sekunder Tembakau.....	5
2.3 Komponen Senyawa Antibakteri dan Mekanismenya.....	6
2.3.1 Flavonoid	6
2.3.2 Steroid.....	7
2.3.3 Saponin	7
2.4 Faktor yang Mempengaruhi Ekstraksi Maserasi.....	8
2.5 Karakteristik Bakteri Patogen	9
2.5.1 <i>Bacillus cereus</i>	10
2.5.2 <i>Shigella dysenteriae</i>	10
2.6 LC-MS (Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry)	11

BAB 3 METODE PENELITIAN.....	12
3.1 Tempat dan Waktu.....	12
3.2 Alat dan Bahan	12
3.2.1 Alat Penelitian	12
3.2.1 Bahan Penelitian	12
3.3 Pelaksanaan Penelitian.....	12
3.4 Rancangan Percobaan.....	13
3.5 Tahapan Penelitian.....	14
3.6 Prosedur Analisis	16
3.6.1 Uji Total Polifenol.....	16
3.6.2 Analisis LC-MS.....	16
3.6.3 Uji Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau Metode KHM.....	17
3.7 Analisis Data	18
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	19
4.1 Total Polifenol Ekstrak Daun Tembakau Kasturi Inferior.....	19
4.2 Hasil Analisis Kimia Ekstrak Daun Tembakau Kasturi Inferior ...	20
4.3 Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau Kasturi Inferior .	24
BAB 5. PENUTUP.....	30
5.1 Kesimpulan.....	30
5.2 Saran	31
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN - LAMPIRAN.....	38

DAFTAR TABEL

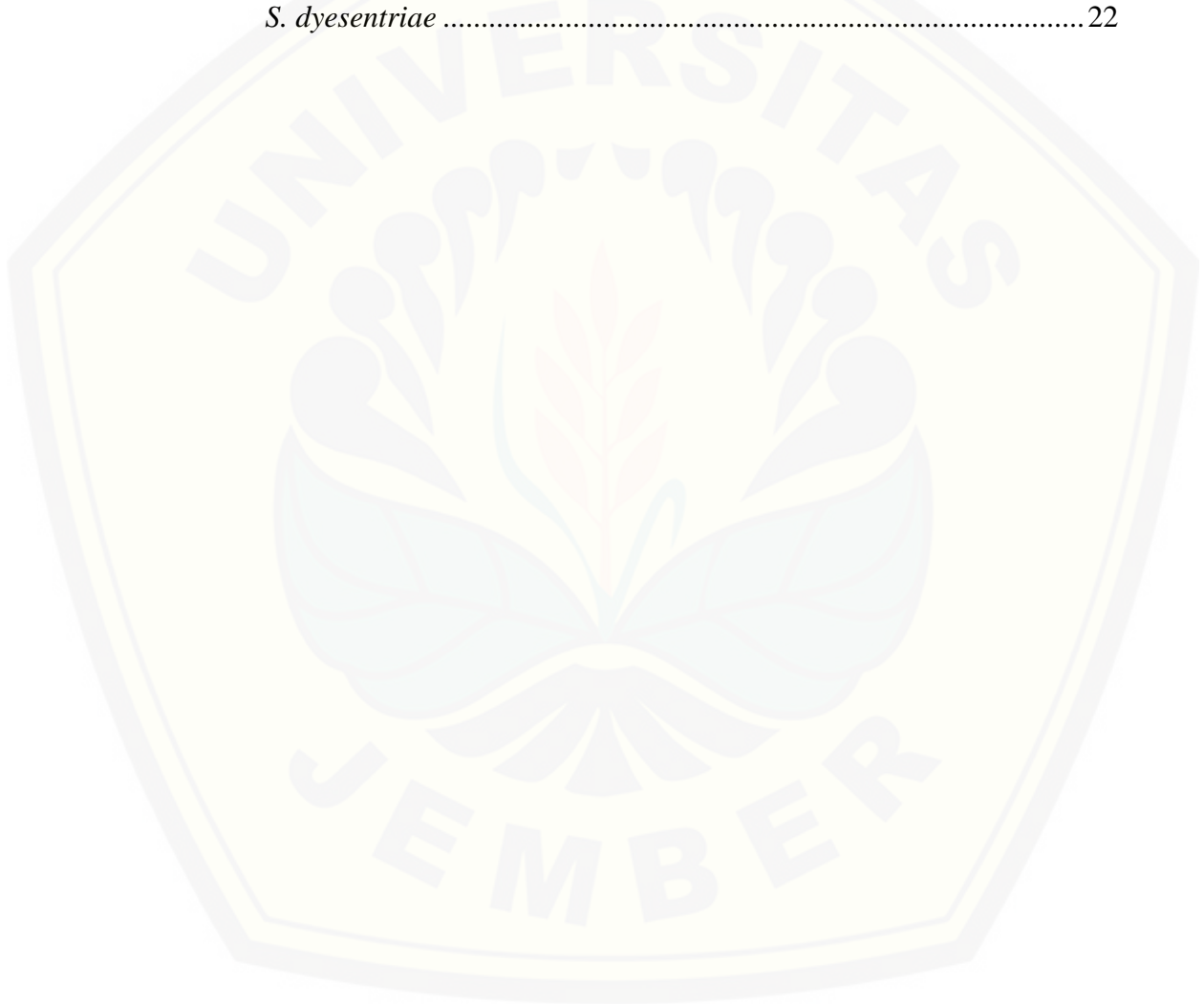
	halaman
Tabel 2.1 Kandungan fenolik dalam tembakau.....	6
Tabel 2.2 Jenis pelarut organik dan sifat fisiknya.....	9
Tabel 3.1 Rancangan percobaan ekstraksi daun tembakau.....	13
Tabel 4.1 Hasil KHM dan IC ₅₀ <i>B. cereus</i> dan <i>S. dysenteriae</i>	25



DAFTAR GAMBAR

halaman

Gambar 3.1 Diagram alir alur penelitian.....	13
Gambar 3.2 Diagram alir pembuatan ekstrak daun tembakau kasturi	15
Gambar 4.1 Total polifenol pada ekstrak daun tembakau kasturi inferior.....	20
Gambar 4.2 Kurva probit hubungan penghambatan ekstrak terhadap <i>B. cereus</i> .	22
Gambar 4.3 Kurva probit hubungan penghambatan ekstrak terhadap <i>S. dysenteriae</i>	22



LAMPIRAN-LAMPIRAN

halaman

Lampiran 4.1 Perhitungan total polifenol ekstrak daun tembakau	41
Lampiran 4.2 Perhitungan konsentrasi ekstrak daun tembakau untuk Uji KHM	51
Lampiran 4.3 Perhitungan aktivitas antibakteri	53
Lampiran 4.4 Kurva logarotmik <i>S. dysenteriae</i> dan <i>B. cereus</i>	57
Lampiran 4.5 Kurva probit <i>S. dysenteriae</i> dan <i>B. cereus</i>	65
Lampiran 4.6 Hasil LC-MS ekstrak metanol	72
Lampiran 4.7 Hasil LC-MS ekstrak etanol	73
Lampiran 4.8 Dokumentasi penelitian	74
Lampiran 4.9 Dokumentasi hasil penelitian.....	76

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman tembakau jenis Kasturi banyak dibudidayakan di daerah Jember dan Bondowoso Jawa Timur. Badan Pusat Statistik Kabupaten Jember (2018), menyebutkan bahwa produksi tanaman tembakau jenis Voor-Oogst (VO) Kasturi pada tahun 2017 mencapai 43.016,21 kw dan tembakau Na-Oogst (NO) sebanyak 32.593,00 kw. Kecamatan Kalisat salah satu kecamatan di Kabupaten Jember yang memiliki produksi tembakau Kasturi terbesar dibandingkan kecamatan lain dengan hasil produksi 9.956 kw. Daun tembakau Kasturi banyak digunakan sebagai bahan rokok kretek, akan tetapi tidak semua daun tembakau Kasturi dapat diproses menjadi rokok kretek. Daun pucuk, daun tengah dan daun kaki yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan rokok kretek. Daun pasir/koseran (inferior) seringkali dibiarkan mengering dipohon sehingga kurang termanfaatkan. Berdasarkan informasi dari petani Kalisat, rata-rata jumlah daun tembakau pasir/koseran mencapai 10-20% dari jumlah hasil panen. Bagian daun limbah tersebut masih dapat dimanfaatkan lebih dengan menjadikan ekstrak daun tembakau.

Daun tembakau diketahui mengandung senyawa aktif seperti alkaloid, tanin, saponin, flavonoid, glikosidik sianogenik, terpenoid dan steroid (Okorundu *et al.*, 2015). Senyawa aktif kelompok fenolik yang telah diisolasi dari berbagai tumbuhan diketahui mempunyai sifat toksik. Sifat tersebut dapat berpotensi sebagai anti jamur dan anti bakteri (Ergina *et al.*, 2014). Total polifenol ekstrak daun tembakau yaitu 44,77 mg GA/ml (Savira, 2018). Senyawa aktif daun tembakau terdapat dalam jaringan, sehingga perlu dilakukan ekstraksi untuk mendapatkan senyawa tersebut.

Ekstraksi merupakan suatu proses penarikan komponen senyawa yang diinginkan dari suatu bahan dengan cara pemisahan satu atau lebih komponen dari suatu bahan yang mengandung komponen tersebut (Ahmad, 2006). Tujuan dari ekstraksi yaitu untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan dari bahan yang akan

diekstrak menggunakan pelarut selektif selama ekstraksi (Ncube *et al.*, 2008). Faktor yang mempengaruhi hasil ekstraksi antara lain jenis pelarut, konsentrasi pelarut, ukuran partikel, suhu, pH dan lama ekstraksi (Chew *et al.*, 2011). Jumlah senyawa aktif yang dihasilkan melalui ekstraksi dapat dipengaruhi oleh jenis pelarut dan suhu ekstraksi yang digunakan. Ketepatan jenis pelarut dan suhu ekstraksi senyawa polifenol yang digunakan harus tepat dan sesuai dengan sifat bahan.

Pemilihan pelarut harus sesuai dengan kandungan senyawa yang akan diekstraksi. Senyawa aktif pada ekstrak yang bersifat polar maka akan lebih baik dan efektif digunakan pelarut yang bersifat polar. Demikian pula suhu ekstraksi juga berpengaruh pada kandungan ekstrak yang dihasilkan. Menurut Wazir *et al.* (2011), penggunaan suhu tinggi dalam ekstraksi dapat meningkatkan kelarutan fenol. Penggunaan suhu tinggi juga berpengaruh pada jenis pelarut yang digunakan. Suhu ekstraksi yang digunakan sebaiknya tidak jauh berbeda dengan titik didih pelarut.

Jenis pelarut dan suhu maserasi yang digunakan pada ekstraksi senyawa aktif dapat mempengaruhi kandungan fenolik yang dihasilkan (Wazir *et al.*, 2011). Penelitian Savira (2017), ekstrak tembakau dengan pelarut aquadest dengan suhu 60 C menghasilkan total polifenol 44,77 mg GAE/ml. Pemilihan pelarut dan suhu ekstraksi daun tembakau Kasturi inferior diharapkan dapat menghasilkan senyawa aktif pada tembakau yang berpotensi sebagai antibakteri. Oleh karena itu, penelitian mengenai variasi suhu dan jenis pelarut pada ekstraksi daun tembakau Kasturi inferior untuk menghasilkan senyawa aktif dan mengetahui apakah perlakuan suhu dan jenis pelarut memiliki sifat antibakteri terhadap bakteri patogen, seperti *Bacillus cereus* dan *Shigella dysenteriae*.

1.2 Rumusan Masalah

Daun tembakau Kasturi banyak digunakan sebagai bahan rokok kretek, akan tetapi tidak semua daun tembakau Kasturi dapat diproses menjadi rokok kretek. Daun pucuk, daun tengah dan daun kaki yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan rokok kretek. Daun pasir/koseran (inferior) seringkali dibiarkan mengering di pohon

sehingga kurang termanfaatkan. Keterbatasan pemanfaatan daun tembakau kasturi pasir/koseran (inferior) perlu penanganan khusus. Salah satu teknologi pengolahan daun tembakau inferior adalah mengubahnya menjadi ekstrak.

Teknik ekstraksi senyawa aktif daun tembakau dapat menggunakan cara maserasi. Ekstraksi metode maserasi dipengaruhi jenis pelarut (sifat polaritas) dan suhu maserasi. Sifat polaritas/kepolaran pelarut dapat meningkatkan senyawa aktif yang dihasilkan. Kondisi yang sama pada maserasi juga dapat dipengaruhi oleh suhu maserasi. Peningkatan suhu maserasi dapat menaikkan kelarutan senyawa fenol yang dihasilkan (Wazir *et al.*, 2011). Oleh karena itu, dilakukan penelitian mengenai variasi suhu dan jenis pelarut pada ekstraksi maserasi daun tembakau kasturi inferior untuk mengetahui apakah perlakuan suhu dan jenis pelarut memiliki kandungan total berbeda dan memiliki sifat antibakteri terhadap bakteri *B. cereus* dan *S. dysenteriae*.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh jenis pelarut dan suhu ekstraksi terhadap total polifenol ekstrak daun tembakau Kasturi inferior
2. Mengetahui komponen polifenol ekstrak daun tembakau Kasturi inferior
3. Mengetahui daya hambat ekstrak daun tembakau Kasturi inferior terhadap pertumbuhan bakteri *B. cereus* dan *S. dysenteriae*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah:

1. Meningkatkan nilai ekonomi daun tembakau Kasturi inferior dalam bentuk ekstrak
2. Mengurangi limbah daun tembakau Katsuri inferior yang terbuang tanpa dimanfaatkan lebih lanjut.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Daun Tembakau Kasturi dan Komposisi Kimia Daun Tembakau

Tanaman tembakau yang paling banyak dibudidayakan di Kabupaten Jember dan Bondowoso yaitu jenis *Nicotiana tabaccum* L. dan *Nicotiana rustica* (Hartanti *et al.*, 2012). Tembakau *Nicotiana tabaccum* L. yang dibudidayakan pada musim kemarau atau dikenal dengan tembakau Voor Oogst (VO) dan diolah secara krosok (*leaf type*) atau lembaran-lembaran. Salah satu jenis Voor Oogst yaitu tembakau Kasturi. Ciri-ciri spesies *Nicotiana tabacum* L. yaitu memiliki mahkota bunga berwarna merah muda hingga kemerahan, mahkota bunga berbentuk lonceng, daun lonjong dengan ujung yang runcing, kedudukan daun pada batang tegak, dan tingginya sekitar 120 cm (Usmadi *et al.*, 2007).

Daun tembakau Kasturi menurut klasifikasi berdasarkan letak daun dapat dibagi menjadi empat bagian yaitu daun pucuk, daun tengah, daun kaki dan daun pasir/koseran. Bagian daun pucuk, tengah dan kaki banyak digunakan sebagai bahan rokok kretek. Daun pasir/koseran (*inferior*) seringkali dibiarkan mengering dipohon sehingga kurang dimanfaatkan.

Produktivitas tembakau kasturi di Kabupaten Jember menurut Badan Pusat Statistik Kabupaten Jember (2018), menyebutkan bahwa produksi tanaman tembakau jenis Voor-Oogst (VO) Kasturi pada tahun 2017 mencapai 43.016, 21 kw dan tembakau Na-Oogst (NO) sebanyak 32.593, 00 kw. Kecamatan Kalisat merupakan kecamatan di Kabupaten Jember yang memiliki produksi tembakau Kasturi terbesar dibandingkan kecamatan lain dengan hasil produksi 9.956 kw. Menurut petani Kalisat rata-rata jumlah daun tembakau pasir/koseran mencapai 10-20% dari jumlah hasil panen atau sebanyak 995,6 – 1991,2 kw namun belum dimanfaatkan.

Komponen kimia yang terdapat pada tembakau *Nicotiana tabaccum* L. secara umum yaitu abu 20%, gula 0,5-2,5%, fenol 0,0-0,5%, nitrat 1,0-2,0%, nikotin 0,5-4,0% dan kandungan N total 2,18-3,58% (Cahyono, 1998). Senyawa kimia yang

terdeteksi pada daun tembakau jenis Plovdiv 7 yaitu nikotin 2,3%, gula reduksi 8,4 %, total nitrogen 1,9%, mineral 14,7 %. Ciri lain yang dapat membedakan tembakau Kasturi dengan tembakau lain yaitu kandungan nikotin yang tinggi daripada tembakau Na Oogst. Menurut Sholeh *et al.*, (2000) kandungan nikotin pada tembakau kasturi mencapai 3,21% sedangkan nikotin pada tembakau jenis Na Oogst hanya mencapai 1,75%.

2.2 Metabolit Sekunder Tembakau

Tanaman memiliki dua jenis senyawa metabolit, yaitu metabolit primer dan sekunder. Metabolit primer digunakan tanaman untuk pertumbuhan pada proses metabolisme sel dan keseluruhan proses sintesis dan perombakan zat-zat yang dilakukan oleh organisme untuk kelangsungan hidupnya, sedangkan metabolit sekunder tidak berperan secara langsung untuk pertumbuhan tanaman (Almatsier, 2009). Metabolit sekunder pada umumnya berfungsi untuk mempertahankan diri tumbuhan dari lingkungan dan dapat dimanfaatkan dalam bidang farmakologi. Tembakau menghasilkan beberapa metabolit sekunder antara lain berupa alkaloid, tanin, saponin, flavonoid, terpenoid, glikosidik sianogenik (Okorundu *et al.*, 2015). Senyawa-senyawa tersebut memiliki sifat antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

Senyawa flavonoid yang telah berhasil diisolasi dari berbagai tumbuhan diketahui mempunyai aktivitas biologi seperti bersifat toksik terhadap sel kanker, anti jamur dan anti bakteri (Ergina *et al.*, 2014). Senyawa terpenoid dapat dijadikan sebagai agen antimikroba (Saxena dan Kalra, 2011) dan tanin sebagai agen antibakteri (Min *et al.*, 2008). Penelitian sebelumnya pada etanol 80% daun tembakau mampu menghambat bakteri *E.coli*, *B. subtilis* dan *S. aureus* dengan zona hambat 20,32 mm, 12,89 mm, dan 17,66 mm (Wang *et al.*, 2008).

Penelitian yang dilakukan Popova *et al.* (2015), pada tiga jenis tembakau yang ditanam di Bulgaria menghasilkan beberapa kandungan senyawa aktif yang berbeda

setiap jenisnya. Kandungan fenolik pada masing-masing jenis tembakau disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kandungan fenolik dalam daun tembakau (mg/g)

Kandungan Fenolik	Burley	Virginia	Oriental
Galic	>0.01	0,12	0,15
Proto - catechuic	-	-	1.73
Salicylic	1.73	0.89	1.07
Chlorogenic	1.21	13.11	10.54
Vanillic	0.11	0.22	0.15
Caffeic	0.30	0.14	0.27
Syringic	0.10	0.13	0.46
p-Coumaric	0.06	0.11	0.67
Ferulic	0.30	0.10	0.24
Sinapic	0.44	0.65	0.04
Cinnamic	0.04	0.04	0.48
Total	4.29	15.51	15.80

Sumber: Popova *et al.*, (2015).

2.3 Komponen Senyawa Antibakteri dan Mekanismenya

Senyawa antibakteri daun tembakau mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan berbagai macam cara. Senyawa yang bersifat sebagai antibakteri yaitu seperti flavonoid, alkaloid, tannin, saponin. Berikut merupakan mekanisme senyawa metabolit daun tembakau sebagai antibakteri:

2.3.1 Flavonoid

Golongan terbesar senyawa fenol yang terdapat pada tumbuhan yaitu flavonoid. Flavonoid dapat menghambat pertumbuhan virus, bakteri dan jamur yang mengakibatkan kerusakan membran sitoplasma dengan mengurangi fluiditas dari membran dan menghambat sintesis asam nukleat (Gradisar *et al.*, 2007). Mekanisme kerja dari senyawa flavonoid yaitu mampu mendenaturasi protein dengan menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi, menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri (Taiga dan Friday, 2009). Selain itu, flavonoid mengakibatkan kerusakan membran sitoplasma

dengan mengurangi fluiditas dari membran (Tsuchiyah, 2000). Penelitian sebelumnya pada ekstrak etanol daun tembakau kasturi dengan kadar polifenol 44,77 mg GAE/ml memiliki nilai KHM dan IC50 pada bakteri *B. subtilis* yaitu 627,80 µg/ml dan 204,61 µg/ml (Savira, 2018).

2.3.2 Steroid

Steroid termasuk dalam senyawa yang penting dengan struktur sterana jenuh (*saturated tetracylic hydrocarbon: 1,2-cyclopentano-perhydrophenanthrene*) dengan 17 atom karbon dan 4 cincin (Dwilistiani, 2013). Mekanisme kerja steroid dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah adanya membran lipid yang memiliki sensitivitas terhadap komponen steroid sehingga menyebabkan kebocoran pada lisosom (Madduluri *et al.*, 2013) Steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat permeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun serta morfologi membran sel berubah yang menyebabkan sel rapuh dan lisi (Ahmed dan Bahar, 2007). Ekstrak etanol teh konsentrasi 13% memiliki daya hambat pada *Bacillus cereus* 12,75 mm dengan total pertumbuhan bakteri $1,1 \times 10^4$ CFU/ml (Widyasanti *et al.*, 2016).

2.3.4 Saponin

Saponin memberikan efek antibakteri yang dapat menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel yang dapat merusak permeabilitas membran sel (Madduluri *et al.*, 2013). Rusaknya membran sel menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel (Cavalieri *et al.*, 2005). Hal ini sangat mengganggu kelangsungan hidup bakteri sehingga lama kelamaan bakteri akan mati (Harborne, 2006). Hasil penelitian ekstrak daun *Abutilon indicum* konsentrasi saponin 1,11 mg/ml mampu menghambat *S. aureus* 17 mm (Ravi *et al.*, 2016).

2.4 Faktor yang Mempengaruhi Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi maserasi digunakan untuk mengambil atau mengekstraksi senyawa dari suatu larutan atau padatan dengan teknik perendaman terhadap bahan atau sampel yang diekstraksi (Ibrahim dan Marham, 2013). Perendaman sampel akan menyebabkan pemecahan dinding sel dan membran sel. Kerusakan tersebut sebagai akibat dari perbedaan tekanan antara dalam luar sel yang dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor.

Beberapa faktor yang mempengaruhi hasil ekstraksi antara lain jenis pelarut, konsentrasi pelarut, ukuran partikel, suhu, pH dan lama ekstraksi (Chew *et al.*, 2011). Pemilihan jenis pelarut harus mempertimbangkan beberapa faktor antara lain selektivitas (sifat polaritas), mempunyai daya larut tinggi, kemudahan untuk diuapkan dan harga pelarut (Harborne, 1987). Larutan pengestraksi yang digunakan harus sesuai dengan sifat polaritas senyawa yang diinginkan. Menurut prinsip polarisasi, suatu pelarut akan cenderung melarutkan senyawa yang mempunyai tingkat kepolaran yang sama (Harborne, 1987). Jika senyawa pada ekstrak yang dikehendaki bersifat polar maka pelarut yang digunakan lebih baik dan efektif bersifat polar.

Kepolaran suatu pelarut ditentukan oleh besar konstanta dielektik pada pelarut, semakin besar nilai konstanta dielektrik suatu pelarut maka polaritasnya semakin besar. Hal ini didukung penelitian Savitri *et al.* (2017), bahwa jenis pelarut metanol dan etanol yang memiliki konstanta dielektrik berbeda berpengaruh terhadap total fenolik *Sargassum polycystum* yang dihasilkan yaitu 4,43 dan 3,82 mgGAE/100g. Beberapa jenis pelarut organik dan sifat fisiknya disajikan pada Tabel 2.2

Tabel 2.2 Jenis pelarut organik dan sifat fisiknya

Nama pelarut	Konstanta dielektrik	Titik didih	Titik beku
Aquadest	80,2	100	0
Methanol	32,6	64	-98
Etanol	24,3	78,4	-117
Kloroform	4,8	61,2	-64
Etil asetat	6,0	7,1	-84
Dietil eter	4,3	35	-116
Aseton	20,7	56	-95

Sumber: Sudarmadji *et al.*, (2007).

Perbedaan suhu ekstraksi juga berpengaruh pada kandungan ekstrak yang dihasilkan. Menurut Wazir *et al.* (2011), penggunaan suhu tinggi dalam ekstraksi dapat meningkatkan kelarutan fenol. Suhu tinggi mampu melepaskan senyawa fenol sel dinding atau senyawa fenolik yang terikat disebabkan oleh rusaknya unsur-unsur sel, menyebabkan semakin banyak senyawa fenol yang terekstrak. Margaretta *et al.* (2011), mengatakan bahwa semakin tinggi suhu ekstraksi kandungan fenol yang didapat semakin banyak. Hal ini dikarenakan suhu yang tinggi akan menyebabkan kelarutan senyawa fenol dalam pelarut semakin besar. Dengan meningkatkan suhu, difusi yang terjadi juga semakin besar sehingga proses ekstraksi akan berjalan lebih cepat. Akan tetapi peningkatan suhu ekstraksi juga perlu diperhatikan karena suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan kerusakan pada bahan yang sedang di ekstraksi. Hasil penelitian Ibrahim *et al.* (2015), perlakuan terbaik minuman sari jahe diperoleh suhu 95 °C total fenol 447,93 ppm.

2.5 Karakteristik Bakteri Patogen

Bakteri adalah organisme golongan prokariotik. Bakteri dapat diklasifikasikan berdasarkan hasil pewarnaan gram yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Menurut Poeloengan *et al.* (2007), bakteri gram positif memiliki struktur dinding sel yang sederhana yaitu hanya tersusun dari peptidoglikan sehingga memudahkan senyawa aktif dalam ekstrak daun tembakau menembus dan merusak susunan sel. Hal tersebut mengakibatkan tekanan osmotik di dalam sel lebih besar

sehingga sel mengalami lisis atau mati, selain itu bakteri gram positif mengandung lipid yang rendah (1-4%) sehingga lebih mudah dirusak oleh senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak daun tembakau, sedangkan *S. dysenteriae* yang merupakan bakteri gram negatif memiliki dinding sel berlapis tiga (multilayer) yaitu lipoprotein, membran luar fosfolipid dan lipopolisakarida, dimana membran luar fosfolipid ini dapat menghalangi masuknya zat antibakteri ke dalam sel, sehingga penghambatan aktivitas antibakteri lebih sulit daripada gram positif. Bakteri gram negatif juga memiliki dinding sel dengan kandungan lipidnya lebih tinggi daripada bakteri gram positif yaitu sekitar 11-12% dan susunan dinding selnya lebih kompleks.

2.5.1 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus merupakan bakteri berbentuk batang, termasuk kelompok pembentuk endospora yang menjadi penyebab terjadinya keracunan pangan. (Todar, 2005). Jenis penyakit yang dapat ditimbulkan oleh bakteri ini adalah diare dan ametik (mutah). Penyakit terjadi seiring dengan termakannya sejumlah besar organisme ($>10^6$ - 10^7 sel) tumbuh di dalam usus halus, menghasilkan enterotoksin dan menyebabkan diare (Labbe, 1989; Brynestad dan Granum, 2002).

Suhu pertumbuhan *B. cereus* 7-49 °C dengan suhu minimum 4-5 °C dan suhu maksimum 48-50 °C. Suhu pertumbuhan spora 8-30 °C, dengan pH 4,9-9,3 dan toleransi garam <10% (Tajkarimi, 2007). Bakteri *B. cereus* tergolong gram positif yang memiliki kerentanan yang lemah dibanding bakteri gram negatif. Penelitian sebelumnya tentang daya hambat *B. cereus* telah dilakukan oleh Indrawati dan Rizki (2017), ekstrak Buah Buni (*Antidesma bunius*) pada konsentrasi 1,25% dan 80% memiliki potensi antibakteri terhadap *B. cereus* dengan diameter hambat 6,4 mm dan 18,4 mm sedangkan ekstrak etanol teh konsentrasi 13% memiliki daya hambat pada *B. cereus* 12,75 mm dengan total pertumbuhan bakteri $1,1 \times 10^4$ CFU/ml (Widyasanti *et al.*, 2016).

2.5.2 *Shigella dysenteriae*

Shigella dysenteriae termasuk bakteri gram negatif yang berukuran 0,5 – 0,7 μm x 2 – 3 μm . Bentuknya batang pendek, tidak berspora, tidak berflagel sehingga tidak bergerak, memiliki kapsul. Koloni *S. dysenteriae* berbentuk cembung, bundar, transparan dengan diameter kira – kira 2 mm, suhu optimum 37 C dan pH 6,4-7,8 (Jawetz, 2008). Hasil penelitian menunjukkan bahwa, ekstrak etanol 70% daun kersen dapat menghambat bakteri *S. dysenteriae*. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol 70% daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap bakteri *S. dysenteriae* sebesar 3,25% (Prasetyo dan Sasongko, 2014). Ekstrak etanol teh konsentrasi 13% memiliki daya hambat pada *S. dysenteriae* 10,6 mm dengan total pertumbuhan bakteri $4,6 \times 10^6$ CFU/ml (Widyasanti *et al.*, 2016).

2.6 LC-MS (*Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry*)

LC-MS merupakan salah satu teknik analisis dengan resolusi tinggi yang dapat digunakan dalam analisis kuantitatif maupun analisis struktural sehingga dapat memberikan pendekatan yang sangat berguna dalam menentukan profil suatu metabolit (Theoridis *et al.*, 2008). Prinsip kerja LC-MS yaitu menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan kemampuan analisis spektrometer massa. Kelebihan dari teknologi LC-MS yaitu hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spektrometer massa sebagai detektor, aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis karena penerapan LC-MS tidak terbatas untuk molekul volatil (biasanya dengan berat molekul di bawah 500 Da), mampu mengukur analit yang sangat polar, selain itu persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi, pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat. Selain itu, sejumlah data kualitatif maupun kuantitatif dapat diperoleh. Hal ini disebabkan seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter (Michel dan Kaufman, 1973).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Pangan dan Hasil Pertanian dan Laboratorium Mikrobiologi Pangan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Waktu pelaksanaan penelitian mulai bulan Maret 2019 sampai Juni 2019.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu blender (Philips), gelas ukur 500 ml (Pyrex, Germany), erlenmeyer 500 ml (Pyrex, Germany), neraca analitik (Ohaus, USA), shaker waterbath (Memmert D-91126, Jerman), rotary evaporator (Butchi, Jerman), spatula dan kertas saring. Alat yang digunakan untuk analisis yaitu pi-pump, cawan petri (Pyrex, Jerman), tabung reaksi (Pyrex, Jerman), gelas ukur 500 ml (Pyrex, Germany), spektrofotometer (Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS, China), *laminar air flow* (Crumair, Spanyol), *colony counter* (Stuart Scientific), bunsen (pyrex, Japan), pipet mikro (Biohit 12636255, Jerman), autoklaf (Hirayama HI, 36, Jepang), inkubator (Haraeus Inst B6200, Jerman).

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk proses ekstraksi maserasi yaitu daun tembakau Kasturi inferior kering dari petani rakyat Kalisat - Jember, etanol 96%, metanol 96%. Bahan yang digunakan analisis yaitu akuades, asam galat, etanol PA, reagen *Follin-Ciocalteu* 10%, Na_2CO_3 7%, media NA (Nutrient Agar), DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*). Bakteri yang digunakan yaitu *B. cereus* dan *S. dysenteriae* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.3 Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor yaitu perbedaan jenis pelarut (A) dan variasi suhu meserasi (B). Percobaan dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Rancangan percobaan penelitian disajikan pada Tabel 3.1:

Tabel 3.1 Rancangan percobaan ekstraksi senyawa aktif daun tembakau kasturi dengan perbedaan suhu dan jenis pelarut

A/B	B1	B2	B3
A1	A1B1	A1B2	A1B3
A2	A2B1	A2B2	A2B3

Keterangan:

A1: etanol 80%

A2: metanol 80%

B1: suhu 30 °C

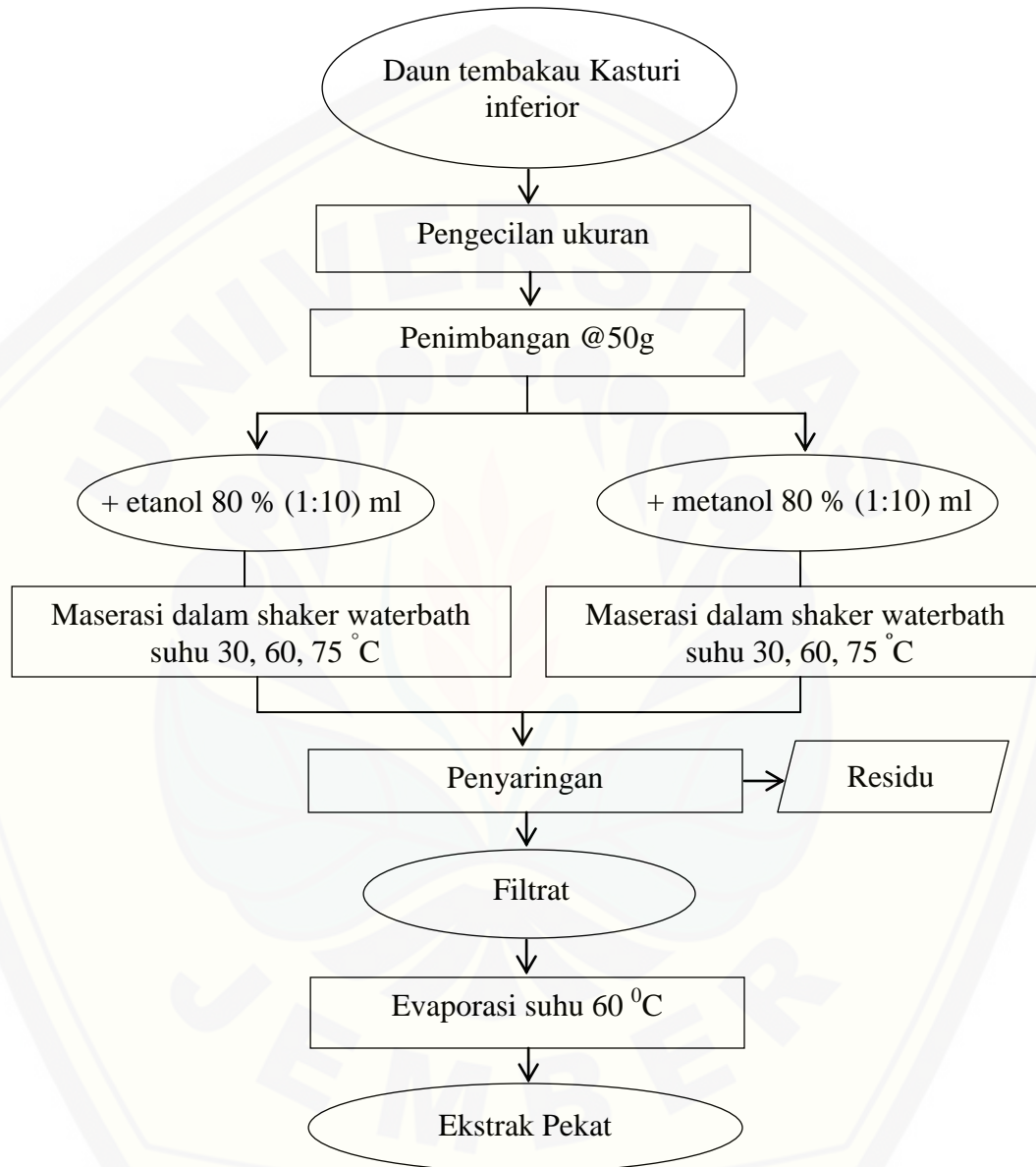
B2: suhu 60 °C

B3: suhu 75 °C

3.3.2 Tahapan Penelitian

Penelitian diawali dengan pembuatan ekstrak daun tembakau (Gambar 3.2). Daun tembakau Kasturi pasir/koseran kering yang berasal dari petani wilayah Kalisat Jember dilakukan pengecilan ukuran menggunakan blender. Serbuk daun tembakau Kasturi inferior sebanyak 50 gram dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut etanol 80% dan metanol 80% dengan perbandingan 1:10 ml. Pembuatan larutan dari konsentrasi 96% ke konsentrasi 80% menggunakan rumus $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$. Pengekstrakan dilakukan dalam shaker waterbath dengan suhu ekstraksi 30 °C, 60 °C, 75 °C selama 3 jam. Setelah ekstraksi, dilakukan penyaringan fraksi supernatan menjadi filtrat dan residu menggunakan kain saring dan kertas saring. Filtrat yang diperoleh selanjutnya dipekatkan menggunakan evaporator pada suhu 60 °C hingga

larutan ekstrak pekat. Diagram alir ekstraksi daun tembakau disajikan pada Gambar 3.2



Gambar 3.2 Diagram alir pembuatan ekstrak daun tembakau Kasturi (Shekins *et al.*, 2016 modifikasi)

3.4 Prosedur Analisis

3.4.1 Uji total polifenol

Analisa total polifenol ditentukan secara spektrofotometri UV-Vis menggunakan metode *Follin-ciocalteau* (Singelton dan Rossi dalam Othman *et al.*, 2007). Pembuatan kurva standar untuk perhitungan polifenol dibuat dengan cara menggunakan larutan asam galat dalam etanol PA (5,4 mg asam galat/5 ml). Larutan asam galat di *stirrer* selama 5-10 menit dan ditera sampai mencapai 10 ml. Siapkan 9 tabung reaksi yang masing-masing diisi dengan asam galat dengan jumlah pengambilan (0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, dan 200 μ l) dan tambahkan aquades sampai 400 μ l. Lalu ditambahkan 0,8 ml *reagen Follin-Ciocalteu* 10% pada masing-masing tabung reaksi. Sampel yang telah ditambahkan folin dilakukan pengocokan menggunakan vorteks dan didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,8 ml larutan Na₂CO₃ 7%. Tabung reaksi yang berisi larutan kurva standar tersebut dibungkus atau ditutup dengan aluminium foil dan didiamkan ditempat gelap selama 60 menit, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 765 nm.

Preparasi ekstrak daun tembakau untuk pengujian total polifenol dilakukan pengenceran terlebih dulu. Ekstrak tembakau yang telah diencerkan sebanyak 0,2 ml ditambahkan 5 ml aquadest dan 0,8 ml reagen *Follin ciocalteau* 10%, kemudian dilakukan pengocokan menggunakan vorteks dan didiamkan selama 5 menit. Sampel ditambahkan 0,8 ml larutan Na₂CO₃ 7% lalu divortex dan diamkan selama 60 menit dengan cara ditutup semua lapisan tabung reaksi menggunakan aluminium foil. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 765 nm.

Analisa kandungan total polifenol pada sampel dihitung berdasarkan kurva standar asam galat yang diperoleh. Nilai absorbansi (y) dimasukkan pada persamaan kurva standart asam galat, sehingga diperoleh nilai (x) dan dikalikan dengan volume ekstrak. Rumus yang digunakan yakni :

$$\text{Total Polifenol (mg GAE/g)} = \frac{\text{X} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) \times \text{Volume ekstrak}}{\text{berat sampel}}$$

3.4.2 Analisis LC-MS

Uji sampel dilakukan dengan peralatan LC-MS. Kolom yang digunakan dengan spesifikasi Hypersil Gold (50mm x 2.1mm x 1.9µm). UHPLC merk ACCELLA type 1250 buatan Thermo Scientific yang terdiri dari degasser vakum, pompa quartener, autosampler termostatik dikendalikan Personal computer melalui program x-calibur 2.1. Pelarut A terdiri dari 0,1% asam format dalam aquabidest, pelarut B terdiri dari 0,1% asam format dalam Acetonitrile. Suatu gradien linier dengan kecepatan 300 µl/menit dengan pengaturan fase gerak sebagai berikut : a) 0-0.6 menit 95%A dan 5%B; b) 7-7,5 menit 50%A dan 50%B; c) 7.6-9.0 menit 95%A dan 5%B. Volume injeksi pada LC adalah 2µL . Kolom dikontrol pada 30°C, dan autosampler ditetapkan untuk 10°C. Penggunaan LC-MS Triple Q (quadrupole) spektrometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX dari Thermo Finnigan dengan sumber ionisasi ESI (Electrospray Ionization) dikendalikan oleh software TSQ Tune yang dioperasikan dengan mode positive.

3.4.3 Uji Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau Metode KHM

Uji antibakteri ekstrak daun tembakau kasturi terhadap bakteri *B. cereus* dan *S. dysenteriae* dilakukan menggunakan respon penghambatan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dengan metode dilusi agar dan penentuan nilai IC₅₀ (*Inhibition Concentration*) dengan menghitung jumlah koloni menggunakan satuan CFU/ml. Metode dilusi adalah salah satu metode yang digunakan untuk mengetahui potensi suatu senyawa terhadap aktivitas mikroba dengan menentukan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) (Lennette *et al.*, 1991). Berikut beberapa tahap yang dilakukan:

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sebelum dilakukan uji antibakteri, mula-mula alat dan bahan (kecuali ekstrak polifenol) yang digunakan untuk pengujian disterilkan terlebih dahulu didalam autoklaf dengan temperatur 121 °C selama 15 menit

b. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Media NA sebanyak 4 g dilarutkan dalam 200 ml aquades kedalam tabung erlenmeyer. Campuran kemudian dipanaskan diatas *hotplate magnetic* sampai larutan berwarna kuning bening. Setelah larutan kuning bening, larutan NA dimasukkan kedalam masing-masing tabung reaksi. Tutup tabung reaksi menggunakan kapas, lalu sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

c. Pembuatan Isolat Bakteri

Preparasi biakan bakteri, sebanyak 1 ose kultur murni bakteri (*B. cereus* dan *S. dysenteriae*) digoreskan pada media miring agar NA dengan pola zig-zag, setiap perlakuannya dilakukan dalam keadaan steril didekat nyala api bunsen. Biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

d. Pembuatan suspensi bakteri

Sebanyak 1 ose bakteri (*B. cereus* dan *S. dysenteriae*) dari stok kultur agar miring NA diambil 1 ose menggunakan ose steril, kemudian dimasukkan kedalam ependorf yang berisi 1 ml akuadest steril. Hasil kemudian dibuat seri pengenceran dengan cara mencampurkan 0,1 ml stok kedalam ependorf 0,9 ml akuadest steril sampai pengenceran 10^{-4} (Pratiwi, 2008).

e. Pembuatan larutan uji

Pembuatan larutan uji dilakukan dengan membuat larutan stok konsentrasi 20% dengan cara mengambil 2 ml ekstrak pekat daun tembakau dan ditambahkan aquades hingga mencampapai 20 ml. Larutan stok yang telah dibuat kemudian diambil secara berurutan sebanyak 0, 30, 60, 120, 240, dan 480 µl untuk dimasukkan ke dalam cawan petri.

f. Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri daun tembakau dilakukan untuk menentukan KHM dan nilai IC_{50} pada bakteri *B. cereus* dan *S. dysenteriae* menggunakan metode dilusi agar. Sebanyak 200 μ l suspensi bakteri yang telah dibuat (pengenceran 10^{-4}) dimasukkan ke masing-masing cawan petri dan ditambahkan DMSO sebanyak 20 μ l. Larutan uji ditambahkan kedalam cawan petri masing masing sebanyak 0, 30, 60, 120, 240, dan 480 μ l, lalu ditambahkan media NA yang masih hangat (cair) berurut-urut ke masing-masing cawan petri kemudian diratakan dan diamkan hingga memadat. Media NA yang telah berisi bakteri dan ekstrak diinkubasi suhu 37°C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah koloni pada cawan petri menggunakan *colony counter*.

3.5 Analisa Data

Data yang didapatkan dari pengujian disusun dalam bentuk tabel. Data total polifenol diuji statistik dianalisis keragaman (ANOVA), apabila ada perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) dengan tingkat signifikan $\alpha \leq 5\%$ untuk mengetahui tingkat perbedaan antar perlakuan. Pengolahan data menggunakan *software* SPSS versi 24. Data antibakteri dianalisis menggunakan *Microsoft excel* 2013. Data yang telah didapatkan diinterpretasikan sesuai hasil yang diperoleh dan dibandingkan dengan literatur yang ada.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Penggunaan pelarut etanol dan metanol menghasilkan total polifenol pada setiap suhu perlakuan. Total polifenol pelarut etanol metanol pada suhu 30 °C yaitu 13,86 mg dan 13,71 mg GAE/g.
2. Semakin tinggi suhu ekstraksi menghasilkan semakin tinggi polifenol yang dihasilkan. Total polifenol yang dihasilkan dari pelarut metanol dan etanol dengan suhu 30 °C dan 60 °C berturut adalah 13,86 mg GAE/g dan 19,46 mg sedangkan pada pelarut etanol menghasilkan total polifenol berturut sebesar 13,71 mg GAE/g dan 18,87 mg GAE/g.
3. Hasil analisis LC-MS ekstrak daun tembakau Kasturi inferior memiliki kandungan senyawa aktif golongan senyawa saponin, steroid, flavonoid, terpenoid dan aminoglikosida dengan senyawa dugaan antara lain *Benzyl β-D-glucopyranoside*, *4-Androstene-3, 17-dione*, *Campesterol*, *Linalyl β-primeveroside*, *Erythromycin ethyl succinate*.
4. Ekstrak daun tembakau Kasturi inferior berpotensi sebagai antibakteri yang memiliki nilai KHM pada bakteri *B. cereus* sebesar 0,711 mg/ml dan IC₅₀ sebesar 0,183 mg/ml dan pada bakteri *S. dysenteriae* menunjukkan nilai KHM sebesar 1,033 mg/ml dan IC₅₀ sebesar 0,249 mg/ml.
5. Ekstrak etanol memiliki nilai KHM pada bakteri *B. cereus* sebesar 0,859 mg/ml dan IC₅₀ sebesar 0,210 mg/ml dan pada bakteri *S. dysenteriae* menunjukkan nilai KHM sebesar 2,089 mg/ml dan IC₅₀ sebesar 0,439 mg/ml.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya dapat dilakukan pengujian lebih lanjut terkait ekstrak daun tembakau Kasturi inferior terhadap aktivitas antijamur, sehingga dapat

dibandingkan dengan aktivitas antibakteri yang telah ada. Ekstrak yang didapat juga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait sifat antibakteri pada bakteri patogen lain.



DAFTAR PUSTAKA

- Arisawa, Ueno, Nimura Hayashi dan Morita. 1986. Rubiatriol, a New Triterpenoid from the Chinese Drug “ Qian Cao Gen” *Rubia Cordifolia*. *Journal of Natural Products*. 49 (6): 1114-1116.
- Asady, A. A. B. A., N. Y. Ahmed, dan T. A. Mustafa. 2014. Cytotoxic and Cytogenic Effects of Aqueous and Methanol Crude Extracts of *Nicotiana tabacum* on Rhabdomyosarcoma (RD) and L20B Cell lines in Vitro. *European Journal of Experimental Biology*. 4 (2): 164 – 171.
- Akiyama H, Kazuyasu F, Osamu Y, Takashi O, Keiji I. 2001. Antibacterial Action of Several Tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*; 48: 487-91.
- Aziz, T., Febrizky, S, dan Mario A. D. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Persen Yield Alkaloid Dari Daun Salam India (*Murraya koenigii*). *Jurnal Teknik Kimia*. 20 (2): 1-6.
- Badan Pusat Statistik. 2018. *Kabupaten Jember dalam Angka 2018*. Jember: BPS Kabupaten Jember.
- Brooks, G. F., J. S. Butel, dan S. A. Morse. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Penerjemah Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Jakarta: Salemba Medika.
- Cavalieri S.J., I.D. Rankin., R.J. Harbeck., R.S. Sautter., Y.S. Mc Carter., S.E. Sharp., J.H. Ortez., dan C.A. Spiegel. 2005. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. USA : American Society for Microbiology.
- Cahyono, B. 1998. *Tembakau, Budi Daya dan Analisis Tani*. Yogyakarta: Kanisius.
- Chen, H. J., B. S. Inbaraj., B. H. Chen. 2012. Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Taraxacum Formosanum* Kitam by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization Technique. *International Journal of Molecular Sciences*. 13, 260-285.
- Chew, K. K, Wan, W. M. 2011. Effect of Ethanol Concentration, Extraction Time and Extraction Temperature on the Recovery of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of *Centella Asiatica* Extracts. *International Food Research Journal*. 18: 571-578.
- Cowan, M. M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiology Rev*. 12: 564 – 82.

- Claveria, L. T, O. Jáureguib., C. Codinaa., A. F. Tiburcioa., J. Bastidaa., F Viladomata. 2012. Analysis Of Phenolic Compounds By High-Performance Liquid Chromatography Coupled To Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry In Senescent And Water-Stressed Tobacco. *Journal Plant Science*: 182. 71– 78.
- Duangstri, Pichet., K. Juntarapun, dan C. Satirapipathkul. 2012. *The Tabaco Leaf Extract And Antibacterial Activity In Textile*. Bangkok Thailand: RMUTP International Conference: Textiles & Fashion.
- Ergina, Nuryanti, S dan Puspitasari, D. I. 2014. Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder pada Daun Palado yang Diekstraksi dengan Pelarut Air dan Etanol. *Journal Akademi Kimia*. 3(3): 2302-6030.
- Eskin, N.A.M. and R. Przybylski. 2001. *Antioxidants and Shelf Life of Foods*. Florida: CRC Press LLC.
- Evans W. C. 2009. *Chapter 27-The Search for Naturally Derived Anticancer Agents. Trease an Evans Pharmacognosy (Sixteenth Edition)*. United State: Saunders Ltd.
- Fatikha, B., Khodir, M., Farid, D., Tiziri, R., Karima, B., Sonia, O., Mohamed, C. 2012. Optimisation of Solvent Extraction of Antioxidants (Phenolic Compounds) from Algerian mint (*Mentha spicata* L.). *Pharmacognosy Communications* 2:72-86.
- Gogoi, B. Tsering, J. Tg, H. Veer, V. 2012. Antioxidant Potential and Total Phenolic Content Of Leuca Aspera Of Sonitpur District Assam. *Journal Res. Pharm. Sci.* 3 (3): 376-378.
- Handayani, H, Sriherfyna, F. H dan Yunianta. 2016. Ekstraksi Antioksidan Daun Sirsak Metode Ultrasonic Bath (Kajian Rasio Bahan: Pelarut dan Lama Ekstraksi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 4 (1): 262-272.
- Harborne, J. B. 2006. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Edisi IV. Bandung: ITB.
- Hartanti, Nurhidayati, dan Muryono. 2011. Budidaya Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum* L var Prancok 95) pada Cekaman Kekeringan Polietilena Glikol (PEG) Secara *in Vitro*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Hendra R., S. Ahmad., A. Sukari., M. Y. Shukor., E. Oskoueian. 2011. Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit. *International Journal Mol Scientic*. 12: 3422-3431.

- Hidayah N, Hisan, KA, Solikin A, Irawati dan Mustikaningtyas D. 2016. Uji Efektifitas ekstrak *Sargassum muticum* sebagai Alternatif Obat Bisul akibat Aktivitas *Staphlococcus aureus*. *Journal of Creativity Students*. 1(1):1-9.
- Ibrahim, A. M, Yunianta dan Sriherryana, F. H. 2015. Pengaruh Suhu Dan Lama Waktu Ekstraksi Terhadap Sifat Kimia dan Fisik Pada Pembuatan Minuman Sari Jahe Merah (*Zingiber officinale* var. Rubrum) dengan Kombinasi Penambahan Madu Sebagai Pemanis. *Jurnal Pangan dan Agroindustrial*. 3 (2): 530-541.
- Indrawati, I dan Rizki, A. F. 2017. Potensi Ekstrak Buah Buni (*Antidesma bunius* L.) sebagai Antibakteri dengan Bakteri Uji *Salmonella thypimurium* dan *Bacillus cereus*. *Jurnal Biodjati*. 2 (2): 138-148.
- Jabrucka E. P., A. Pawełczak., J. L. Przybył., K. Bączek., Z. Węglarz. 2011. Accumulation of Phenolic and Sterol Compounds in *Euphorbia hirta* (L.). *Herba Polonica Journal*. 57 (2): 30 – 36.
- Jawetz, E., J. L. Melnick, E. A. Adelberg, G. F. Brooks, J. S. Butel, dan L. N. Ornston. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran*. Diterjemahkan Hartanto, H., C. Rachman, A. Dimanti, dan A. Diani. Edisi ke 20. ECG. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran.
- Jia, C., Z. Yonghua., Z. Jinjie., Y. Jing., X. Chunping., and M. Duobin. 2017. Identification of Glycoside Compounds from Tobacco by High Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Linear Ion-Trap Tandem Mass Spectrometry Coupled with Electrospray Ionization Orbitrap Mass Spectrometry. *Journal Braz. Chem. Soc.*, Vol. 28, No. 4, 629-640.
- Juriah, Siti., D. Suryanto, dan I. T. Jamilah. 2014. Aktivitas Antibakteri Spesies *Asterias Forbesii* Terhadap Beberapa Jenis Bakteri Patogen. *Jurnal Berkala Perikanan Terubuk*. 42 (2): 37 – 50.
- Kazeem, M. I., S. M. Ogungbe, G. M. Saibu, dan O. M. Aboyade. In vitro Study on the Hypoglycemic Potential of *Nicotiana tabacum* Leaf Extracts. *Bangladesh Journal Pharmacol*. 9: 140 – 145.
- Kang S,S, Lim D,R, Kyung. 2010. 3-(allyltrisulfanyl)-2-amino-propanoic acidI, a Novel Nonvolatile Water-soluble Antimicrobial Sulfur Compound in Heated Garlic. *Journal Medical Food*. 13 (5): 1247-1059.
- Madduluri, S, Rao, Babu, K dan Sitaram, B. 2013. In Vitro Evaluation of Antibacterial Activity of Five Indigenous Plant Extract Against Five Bacterial

- Pathogens of Human. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5 (4): 679-684.
- Mabhiza, D, Chitemerere dan Mukanganyama, S, 2016. Antibacterial Properties of Alkaloid Extracts from *Callistemon citrinus* and *Vernonia adoensis* Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Research Article*. Zimbabwe: Universitas Zimbabwe.
- Munte, Lliyanti, Runtuwene, M. Citraningtyas, G. 2015. Aktivitas Antioksidan dan Ekstrak Daun Prasmanan. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 4(3): 41-50.
- Moein, S. and M.R. Moein. 2010. Relationship between Antioxidant Properties and Phenolics in *Zhumeria majdae*. *Journal of Medical Plants Research*. (7): 517-521.
- Naiborhu, P.E. 2002. “Ekstraksi dan Mafaat Ekstrak Mangrove (*Sonneratia alba* dan *Sonneratia caselaris*) sebagai Bahan Alami Antibakterial pada Patogen Udara Windu *Vibrio harvey*”. Tesis. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Naidu A. S. 2000. *Natural Food Antimicrobial Systems*. USA: CRC Press.
- Okorundu, S. I, Okorundu, M. M. O dan Oranusi, S.C. 2015. Antimicrobial Effect of *Nicotina tabacum* (Tobacco) Leaf Extract on *Stapylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nigerian Journal of Microbiologi*. 29: 3049-3061.
- Othman, A. Ismail, A. Ghani, N. Adenan, I. 2007. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Cocoa Beans. *Journal Food Chemistry*. 100: 1523-1530.
- Patil, S. R, Desai, A. B dan Wagh, S. A. 2015. Comparative Study of Antimicrobial Compound Extracted From Leave Of *Nicotiana Tabacum* And Cigarette. *Wolrd Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Science*. 2 (03): 1511-1518.
- Pelzcar, M. J dan Chan, E. C. S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi 1*. Jakarta: Universitas Indonesia Pres.
- Podlejski, J dan Olenjniczak, W. 1983. Methods and Technique in Research of Tobacco Flavour. *Journal Nahrung*. 27 (5): 429-436.
- Poeloengan, M., Andriani., M. N. Susan., I. Komala dan M. Hasnita. 2007. Uji Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Batang Bungur (*Largerstoremia speciosa* Pers.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Echerichia coli* Secara In Vitro. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.
- Popova, V, Gochev, V, Girova, T, Iliev, I, Ivanova, T dan Stoyanova, A. 2015. Extraction Product from Tobacco – Aroma and Bioactive Compounds and Activities. *Current Bioactive Compounds*. 11 (1): 31-37.

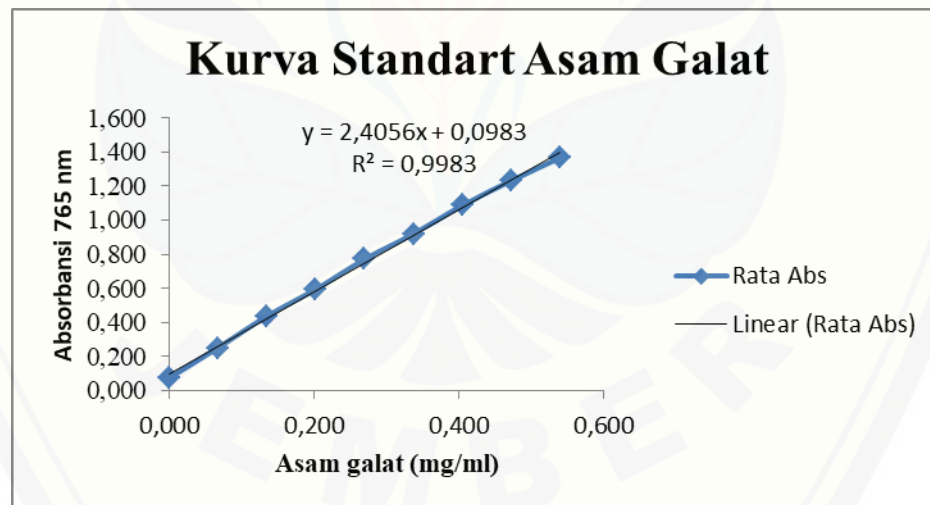
- Prasetyo, A. D dan Sasangko, H. 2014. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun kersen (*Muntingia Calabura* L.) terhadap *Bakteri Bacillus subtilis* dan *Shigella dysenteriae* sebagai Materi Pembelajaran Biologi SMA Kelas X untuk Mencapai Kd 3.4 pada Kurikulum 2013. *JUPEMASI-PBIO*. 1(1):2407-1269.
- Pratiwi, S. T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- Ratna, Y. Q, Ardani, U. T, Fathiana, Z. 2016. Daya Antibakteri Ekstrak dan Fraksi – Fraksi Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale* L.) terhadap *Bakteri Staphylococcus aureus* Sensitif dan Multiresisten. *Jurnal Ilmu Kefarmasian*. 14 (1): 103-110.
- Ravi, L, Manasvi V, Praveena, L. B. 2016. Antibacterial and Antioxidant Activity of Saponin Abutlion Indicum Leaves. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 9 (3): 344-347.
- Savira, A. A. 2018. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) terhadap *Bacillus subtilis* dan *Eschericia coli*. Skripsi Diterbitkan. Jember: Universitas Jember.
- Savitri I, Suhendra, L, Wartini N. M. 2017. Pengaruh Jenis Pelarut pada Metode Maserasi terhadap Karakteritik Ekstrak *Sargassum polycystum*. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. Vol 5 (3): 93-101.
- Sholeh, M., A. Rachman, dan Machfudz. 2000. Pengaruh Komposisi Pupuk Ks, Za, dan Urea, Serta Dosis N Terhadap Mutu Tembakau Besuki. *Jurnal Littri*. 6 (3): 80 – 87.
- Singleton, V. and J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal Enology and Viticulture*. 16 (3): 144 – 158.
- Soehendro, A. W Manuhara, G. J, Nurhartadi, E. 2015. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak Biji Melinjo dengan Pelarut Etanol dan Air. *Jurnal Teknosains Pangan*. 4 (4): 15-24.
- Sudarmadji, S., B. Haryono dan Suharji. 2007. *Prosedur Analisis untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Penerbit Liberty.
- Susilowati, E. Y. 2006. Identifikasi Nikotin dari Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum*) Kering dan Uji Efektifitas Ekstrak Daun Tembakau Sebagai Insektisida Penggerak Batang Padi (*Scirpo phagainnonata*). Tesis. Semarang: Universitas Negeri Semarang.

- Shekins, O, Dorathy E. U, Labaran L, M dan Joel, M. 2016. Phytochemical Screening of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) and its Effects on Some Haematological Parameters and Histopathology of Liver and Brain in Male Rats. *International Journal of Biochemistry Research*. 14 (4): 1-9.
- Taiga, A., dan Friday, E. 2009. Variations in Phytochemical Properties of Selected Fungicidal Aqueous Extracts of Some Plant Leaves in Kogi State, Nigeria. *Journal of Sustainable Agriculture*. 3 (3): 407-409.
- Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. 2010. Review: Antimicrobial Herb and Spice Compounds in Food. *Food Control*. 21: 1199-1218.
- Todar K. 2005. The Genus *Bacillus*. Di dalam *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. University of Wisconsin-Madison [terhubung berkala]. <http://textbookofbacteriology.net/B.cereus.html> [diakses tanggal 24 Desember 2019].
- Tukiran, Cahyasari dan Shimizu. 2012. An Ester og 4 Methoxy Cynamic Acid Isolated from *Xylocarpus moluccencis* (Lamk) M. Roem (Meliaceae). *Indonesian Journal Chemistry*. 12 (2): 184-188.
- Volk. W. A., dan M. F. Salyer. 1993. *Mikrobiologi Dasar Jilid I*. Jakarta: Erlangga.
- Wang, H, Zhao, M, Yang, B, Jiang, Y dan Rao, G. 2008. Identification of Polyphenols in Tobacco Leaf and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Food Chemistry*. 107: 1399-1406.
- Wax, G.R., K. Lewis, A.A. Salyer dan Taber, H. 2008. *Bacterial Resistance To Antimicrobials Second Edition*. New York: CRC Press.
- Wazir D, ahmad, S, Muse, R, Mahmood, M, Shukor, M. Y. 2011. Antioxidant Activities of Different Parts of *Gnetum gnemon* L. *Journal Plant Biochemistry and Biotechnology*. 10 (2): 234-240.
- Widyasanti, A, Priantiwi, A. M dan Rohdiana, D. 2017. Aktivitas *Bacillus cereus* dan *Shigella dysenteriae* Ekstrak Teh Putih dalam Variasi Jenis Pelarut. *Jurnal Penelitian Teh dan Kina*. 19 (1): 41-56.

LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 4.1. Perhitungan Total Polifenol Ekstrak Daun Tembakau
Kurva standart Asam Galat

As galat (µl)	Asam Galat (mg/ml)	Abs 1	Abs 2	Rata-rata Abs
0	0,000	0,073	0,074	0,074
25	0,068	0,249	0,252	0,251
50	0,135	0,435	0,438	0,437
75	0,203	0,594	0,594	0,594
100	0,270	0,770	0,771	0,771
125	0,338	0,921	0,919	0,920
150	0,405	1,088	1,085	1,087
175	0,473	1,233	1,231	1,232
200	0,540	1,368	1,365	1,367



Hasil Uji Polifenol Ekstrak Daun Tembakau Kasturi inferior

Etanol 30 °C

$$Y = 2,4056X - 0,0983$$

Pengenceran (kali)	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Rerata
100	U1	0,693	0,652	65,214	65,264	
		0,694	0,653	65,314		
	U2	0,625	0,584	58,414	58,414	61,364
		0,625	0,584	58,414		
	U3	0,645	0,604	60,414	60,414	
		0,645	0,604	60,414		
150	U1	0,555	0,514	77,121	76,971	
		0,553	0,512	76,821		
	U2	0,447	0,406	60,921	60,846	70,896
		0,446	0,405	60,771		
	U3	0,539	0,498	74,721	74,871	
		0,541	0,500	75,021		
200	U1	0,460	0,419	83,827	83,927	
		0,461	0,420	84,027		
	U2	0,373	0,332	66,427	66,427	77,627
		0,373	0,332	66,427		
	U3	0,454	0,413	82,627	82,527	
		0,453	0,412	82,427		
300	U1	0,355	0,314	94,241	94,241	
		0,355	0,314	94,241		
	U2	0,350	0,309	92,741	92,591	97,241
		0,349	0,308	92,441		
	U3	0,390	0,349	104,741	104,891	
		0,391	0,350	105,041		

Etanol 60 °C

$$Y = 2,4056X - 0,0983$$

Pengenceran (kali)	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Rerata
100	U1	0,786	0,745	74,514	74,614	
		0,788	0,747	74,714		
	U2	0,635	0,594	59,414	59,514	66,964
		0,637	0,596	59,614		
	U3	0,709	0,668	66,814	66,764	
		0,708	0,667	66,714		
150	U1	0,660	0,619	92,871	93,546	
		0,669	0,628	94,221		
	U2	0,541	0,500	75,021	75,171	81,871
		0,543	0,502	75,321		
	U3	0,554	0,513	76,971	76,896	
		0,553	0,512	76,821		
200	U1	0,576	0,535	107,027	107,027	
		0,576	0,535	107,027		
	U2	0,446	0,405	81,027	81,127	89,527
		0,447	0,406	81,227		
	U3	0,493	0,452	90,427	80,427	
		0,393	0,352	70,427		
300	U1	0,450	0,409	122,741	123,041	
		0,452	0,411	123,341		
	U2	0,368	0,327	98,141	97,991	110,19
		0,367	0,326	97,841		
	U3	0,405	0,364	109,241	109,541	
		0,407	0,366	109,841		

Etanol 75 °C

$$Y = 2,4056X - 0,0983$$

Pengenceran (kali)	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Rerata
100	U1	0,688	0,647	64,714	64,714	
		0,688	0,647	64,714		
	U2	0,732	0,691	69,114	69,214	67,114
		0,734	0,693	69,314		
	U3	0,715	0,674	67,414	67,414	
		0,715	0,674	67,414		
150	U1	0,584	0,543	81,471	81,546	
		0,585	0,544	81,621		
	U2	0,642	0,601	90,171	90,171	86,046
		0,642	0,601	90,171		
	U3	0,617	0,576	86,421	86,421	
		0,617	0,576	86,421		
200	U1	0,491	0,450	90,027	90,427	
		0,495	0,454	90,827		
	U2	0,444	0,403	80,627	80,627	92,527
		0,444	0,403	80,627		
	U3	0,573	0,532	106,427	106,527	
		0,574	0,533	106,627		
300	U1	0,388	0,347	104,141	104,291	
		0,389	0,348	104,441		
	U2	0,343	0,302	90,641	90,941	105,241
		0,345	0,304	91,241		
	U3	0,442	0,401	120,341	120,491	
		0,443	0,402	120,641		

Metanol 30 °C

$$Y = 2,4056X - 0,0983$$

Pengenceran (kali)	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Rerata
100	U1	0,894	0,853	85,314	84,864	
		0,885	0,844	84,414		
	U2	0,612	0,571	57,114	57,164	74,464
		0,613	0,572	57,214		
	U3	0,855	0,814	81,414	81,364	
		0,854	0,813	81,314		
150	U1	0,701	0,660	99,021	99,021	
		0,701	0,660	99,021		
	U2	0,488	0,447	67,071	67,221	84,871
		0,490	0,449	67,371		
	U3	0,627	0,586	87,921	88,371	
		0,633	0,592	88,821		
200	U1	0,548	0,507	101,427	101,327	
		0,547	0,506	101,227		
	U2	0,403	0,362	72,427	72,627	91,361
		0,405	0,364	72,827		
	U3	0,542	0,501	100,227	100,127	
		0,541	0,500	100,027		
300	U1	0,375	0,334	100,241	100,391	
		0,376	0,335	100,541		
	U2	0,329	0,288	86,441	86,441	101,291
		0,329	0,288	86,441		
	U3	0,438	0,397	119,141	117,041	
		0,424	0,383	114,941		

Metanol 60 °C

$$Y = 2,4056X - 0,0983$$

Pengenceran (kali)	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Rerata
100	U1	0,851	0,810	81,014	81,114	
		0,853	0,812	81,214		
	U2	0,707	0,666	66,614	66,614	72,280
		0,707	0,666	66,614		
	U3	0,730	0,689	68,914	69,114	
		0,734	0,693	69,314		
150	U1	0,650	0,609	91,371	91,446	
		0,651	0,610	91,521		
	U2	0,590	0,549	82,371	82,446	86,321
		0,591	0,550	82,521		
	U3	0,608	0,567	85,071	85,071	
		0,608	0,567	85,071		
200	U1	0,532	0,491	98,227	98,327	
		0,533	0,492	98,427		
	U2	0,510	0,469	93,827	93,827	95,494
		0,510	0,469	93,827		
	U3	0,512	0,471	94,227	94,327	
		0,513	0,472	94,427		
300	U1	0,426	0,385	115,541	115,541	
		0,426	0,385	115,541		
	U2	0,398	0,357	107,141	106,991	111,941
		0,397	0,356	106,841		
	U3	0,417	0,376	112,841	113,291	
		0,420	0,379	113,741		

Metanol 75 °C $Y = 2,4056X - 0,0983$

Pengenceran (kali)	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Rerata
100	U1	0,725	0,684	68,414	68,714	
		0,731	0,690	69,014		
	U2	0,848	0,807	80,714	80,814	72,330
		0,850	0,809	80,914		
	U3	0,715	0,674	67,414	67,464	
		0,716	0,675	67,514		
150	U1	0,581	0,540	81,021	81,246	
		0,584	0,543	81,471		
	U2	0,707	0,666	99,921	100,071	88,396
		0,709	0,668	100,221		
	U3	0,599	0,558	83,721	83,871	
		0,601	0,560	84,021		
200	U1	0,505	0,464	92,827	92,927	
		0,506	0,465	93,027		
	U2	0,581	0,540	108,027	108,227	97,694
		0,583	0,542	108,427		
	U3	0,501	0,460	92,027	91,927	
		0,500	0,459	91,827		
300	U1	0,399	0,358	107,441	107,291	
		0,398	0,357	107,141		
	U2	0,465	0,424	127,241	127,691	114,191
		0,468	0,427	128,141		
	U3	0,398	0,357	107,141	107,591	
		0,401	0,360	108,041		

Hasil Total Uji Polifenol Ekstrak Daun TembakauTabel Total Uji Polifenol (Metanol) $Y = 2,4056X - 0,0983$

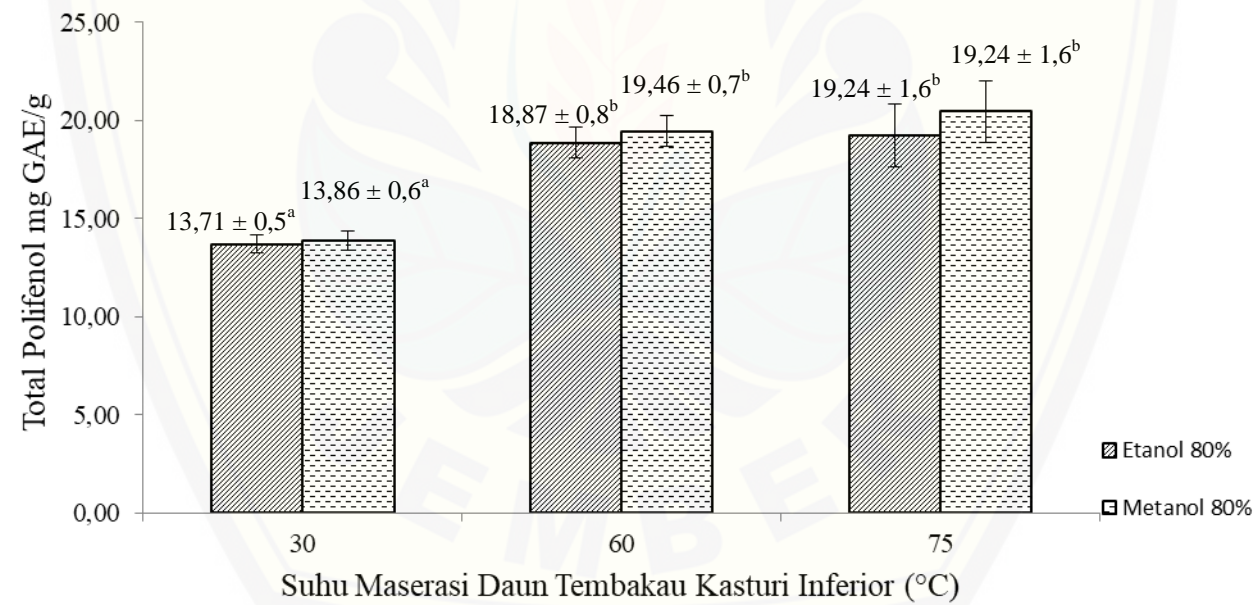
Sampel	Pengenceran	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/g) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/g)	Rerata	STDEV
Metanol 30 °C	300	U1	0,256	0,215	64,541	64,991	14,199	14,298	13,857	0,6
			0,259	0,218	65,441		14,397			
		U2	0,248	0,207	62,141	61,841	13,050	13,171		
			0,246	0,205	61,541		13,293			
		U3	0,259	0,218	65,441	65,291	14,135	14,103		
			0,258	0,217	65,141		14,070			
Metanol 60 °C	300	U1	0,346	0,305	91,541	91,541	18,674	18,674	19,462	0,4
			0,346	0,305	91,541		18,674			
		U2	0,348	0,307	92,141	91,991	19,902	19,870		
			0,347	0,306	91,841		19,838			
		U3	0,343	0,302	90,641	90,191	19,941	19,842		
			0,340	0,299	89,741		19,743			
Metanol 75 °C	300	U1	0,366	0,325	97,541	97,691	19,118	19,147	20,455	1,4
			0,367	0,326	97,841		19,177			
		U2	0,370	0,329	98,741	99,491	20,143	20,296		
			0,375	0,334	100,241		20,449			
		U3	0,372	0,331	99,341	99,641	21,855	21,921		
			0,374	0,333	99,941		21,987			

Tabel Total Uji Polifenol (Etanol) $Y= 2,4056X-0,0983$

Sampel	Pengenceran	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/g) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/g)	Rerata	ST DE V
Etanol 30 °C	300	U1	0,240	0,199	59,741	61,091	13,263	13,564	13,713	0,5
			0,249	0,208	62,441		13,862			
		U2	0,258	0,217	65,141	65,291	13,289	13,319		
			0,259	0,218	65,441		13,350			
		U3	0,248	0,207	62,141	61,991	14,292	14,258		
			0,247	0,206	61,841		14,223			
Etanol 60 °C	300	U1	0,327	0,286	85,841	85,541	18,542	18,477	18,868	0,8
			0,325	0,284	85,241		18,412			
		U2	0,337	0,296	88,841	89,141	19,723	19,789		
			0,339	0,298	89,441		19,856			
		U3	0,328	0,287	86,141	85,691	18,434	18,338		
			0,325	0,284	85,241		18,242			
Etanol 75 °C	300	U1	0,352	0,311	93,341	93,191	20,908	20,875	19,236	1,6
			0,351	0,31	93,041		20,841			
		U2	0,343	0,302	90,641	90,941	19,035	19,098		
			0,345	0,304	91,241		19,161			
		U3	0,342	0,301	90,341	90,491	17,707	17,736		
			0,343	0,302	90,641		17,766			

Tabel Rata – Rata Total Uji Polifenol

Pelarut dan suhu	Total Polifenol mg GAE/g	STDEV
Etanol 30°C	13,71	0,5
Etanol 60°C	18,87	0,8
Etanol 75°C	19,24	1,6
Metanol 30°C	13,86	0,6
Metanol 60°C	19,46	0,7
Metanol 75°C	20,45	1,4



Lampiran 4.2 Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Daun Tembakau untuk Uji KHM

Ekstrak (ml)	kons. Ekstak etanol (mg/ml)	kons. Eksrak metanol (mg/ml)	vol. total (ml)	Konsentrasi polifenol dalam cawan petri (V1.M1= V2.M2)	
				etanol (mg/ml)	metanol (mg/ml)
0	18,505	19,538	5	0,000	0,000
0,03	18,505	19,538	5	0,111	0,117
0,06	18,505	19,538	5	0,222	0,234
0,12	18,505	19,538	5	0,444	0,469
0,24	18,505	19,538	5	0,888	0,938
0,48	18,505	19,538	5	1,776	1,876

Data Total Polifenol			
Metanol	M1	97,694	mg GAE/ml
Etanol	M1	92,527	mg GAE/ml

Larutan stok yang digunakan dalam uji antibakteri	
Larutan stok metanol 20% $V1 \times M1 = V2 \times M2$ $2 \text{ ml} \times 97,694 \text{ mg/ml} = 10 \text{ ml} \times M2$ $M2 = (2 \text{ ml} \times 97,694 \text{ mg/ml})/10 \text{ ml}$ $M2 = 19,538 \text{ mg/ml}$	Larutan stok etanol 20% $V1 \times M1 = V2 \times M2$ $2 \text{ ml} \times 92,527 \text{ mg/ml} = 10 \text{ ml} \times M2$ $M2 = (2 \text{ ml} \times 92,527 \text{ mg/ml})/10 \text{ ml}$ $M2 = 18,505 \text{ mg/ml}$

Tabel Volume Total dalam Cawan Petri

<i>Shigella dysenteriae</i>				
Ekstrak (μl)	DMSO 2% (μl)	m.o (μl)	MEDIA (μl)	Total dalam capet
0	20	200	4780	5000
30	20	200	4750	5000
60	20	200	4720	5000
120	20	200	4660	5000
240	20	200	4540	5000
480	20	200	4300	5000

<i>Bacillus cereus</i>				
Ekstrak (μl)	DMSO 2% (μl)	m.o (μl)	MEDIA (μl)	Total dalam capet
0	20	200	4780	5000
30	20	200	4750	5000
60	20	200	4720	5000
120	20	200	4660	5000
240	20	200	4540	5000
480	20	200	4300	5000

Lampiran 4.3 Perhitungan Aktivitas AntibakteriTabel jumlah koloni *Shigella dysenteriae* (Metanol)

ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah koloni 10 ⁴		Rata-rata
		U1	U2	
0	0	43	48	45,5
0,03	0,116	28	33	30,5
0,06	0,233	17	27	22
0,12	0,465	15	24	19,5
0,24	0,931	7	3	5
0,48	1,862	2	0	1

Tabel jumlah % hambat dan *Shigella dysenteriae* (Metanol)

Data MIC Shigella Pelarut Metanol dalam CFU/ml (10⁴)							
ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah populasi CFU/200 μ l		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni
		U1	U2				
0	0	2,15E+06	2,40E+06	2,28E+06	1,25E+05	0	6,357
0,03	0,116	1,40E+06	1,65E+06	1,53E+06	1,25E+05	32,97	6,183
0,06	0,233	8,50E+05	1,35E+06	1,10E+06	2,50E+05	51,65	6,041
0,12	0,465	7,50E+05	1,20E+06	9,75E+05	2,25E+05	57,14	5,989
0,24	0,931	3,50E+05	1,50E+05	2,50E+05	1,00E+05	83,61	5,398
0,48	1,862	1,00E+05	0,00E+00	5,00E+04	0,00E+00	95,45	4,699

Tabel jumlah koloni *Shigella dysenteriae* (Etanol)

Ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah koloni 10 ⁴		Rata-rata
		U1	U2	
0	0	90	77	83,5
0,03	0,111	80	70	75
0,06	0,222	47	57	52
0,12	0,444	42	41	41,5
0,24	0,888	22	23	22,5
0,48	1,777	12	11	11,5

Tabel jumlah % hambat dan *Shigella dysenteriae* (Etanol)

Data MIC <i>Shigella</i> Pelarut Etanol dalam CFU/ml (10 ⁴)							
ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah Populasi CFU/200 μ l		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni
		U1	U2				
0	0	4,50E+06	3,85E+06	4,18E+06	3,25E+05	0,00	6,621
0,03	0,111	4,00E+06	3,50E+06	3,75E+06	2,50E+05	10,18	6,574
0,06	0,222	2,35E+06	2,85E+06	2,60E+06	2,50E+05	37,72	6,415
0,12	0,444	2,10E+06	2,05E+06	2,08E+06	2,50E+04	50,30	6,317
0,24	0,888	1,10E+06	1,15E+06	1,13E+06	2,50E+04	73,05	6,051
0,48	1,777	6,00E+05	5,50E+05	5,75E+05	2,50E+04	86,23	5,760

Tabel jumlah koloni *Bacillus cereus* (Metanol)

ekstrak (ml)	Konsentrasi (µg/ml)	Jumlah koloni 10 ⁴		Rata-rata
		U1	U2	
0	0	43	48	45,5
0,03	0,116	24	23	23,5
0,06	0,233	17	20	18,5
0,12	0,465	9	12	10,5
0,24	0,931	5	4	4,5
0,48	1,862	0	3	1,5

Tabel jumlah % hambat dan *Bacillus cereus* (Metanol)

Data MIC <i>Bacillus cereus</i> Pelarut Metanol dalam CFU/ml (10⁴)							
ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah Koloni CFU/200 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni
		U1	U2				
0	0	2,51E+06	2,40E+06	2,28E+06	1,25E+05	0	6,36
0,03	0,116	1,20E+06	1,15E+06	1,18E+06	2,50E+04	48,35	6,07
0,06	0,233	8,50E+05	1,00E+06	9,25E+05	7,50E+04	59,34	5,97
0,12	0,465	4,50E+05	6,00E+05	5,25E+05	7,50E+04	76,92	5,72
0,24	0,931	2,50E+05	2,25E+05	2,25E+05	2,50E+04	80,85	5,35
0,48	1,862	0,00E+00	1,50E+04	7,50E+03	7,50E+03	99,19	3,88

Tabel jumlah koloni *Bacillus cereus* (Etanol)

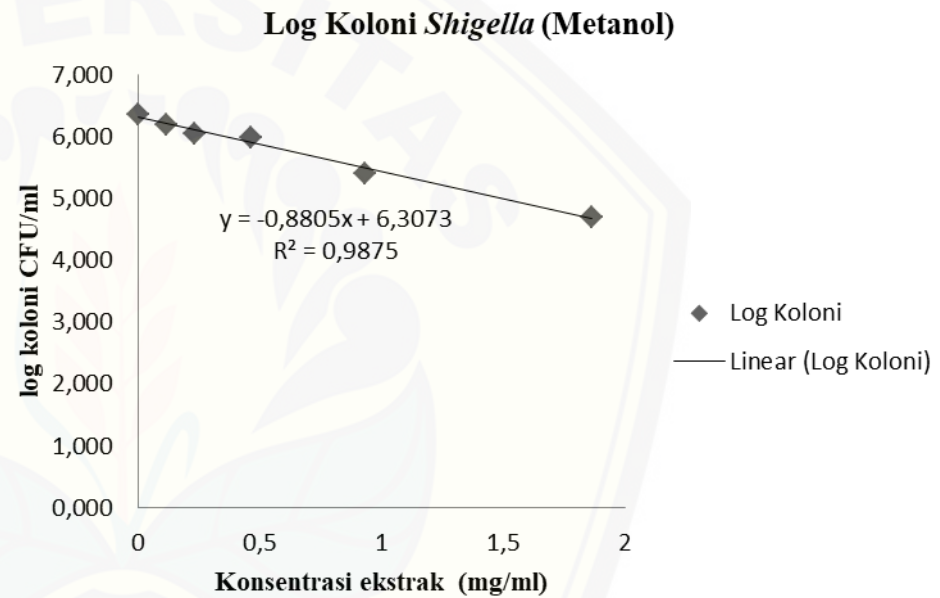
ekstrak (ml)	Konsentrasi (µg/ml)	Jumlah koloni 10 ⁴		Rata-rata
		U1	U2	
0	0	66	48	57
0,03	0,111	28	33	30,5
0,06	0,222	19	28	23,5
0,12	0,444	15	24	19,5
0,24	0,888	7	3	5
0,48	1,777	2	3	2,5

Tabel jumlah % hambat dan *Bacillus cereus* (Etanol)

Data MIC <i>Bacillus cereus</i> Pelarut Etanol dalam CFU/ml (10⁴)							
ekstrak (ml)	Konsentrasi (µg/ml)	Jumlah Koloni CFU/200 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni
		U1	U2				
0	0	3,30E+06	2,40E+06	2,85E+06	4,50E+05	0,00	6,45
0,03	0,111	1,40E+06	1,65E+06	1,53E+06	1,25E+05	46,49	6,18
0,06	0,222	9,50E+05	1,40E+06	1,18E+06	2,25E+05	58,77	6,07
0,12	0,444	7,50E+05	1,20E+06	9,75E+05	2,25E+05	65,79	5,99
0,24	0,888	3,50E+05	1,50E+05	2,50E+05	1,00E+05	91,23	5,40
0,48	1,777	1,00E+05	0,00E+00	5,00E+04	5,00E+04	95,61	5,10

Lampiran 4.4 Kurva logaritmik *Shigella dysenteriae* dan *Bacillus cereus*a. *Shigella dysenteriae* (Metanol)

Polifenol	Log Koloni
0	6,357
0,116	6,18
0,233	6,04
0,465	5,99
0,931	5,40
1,862	4,70



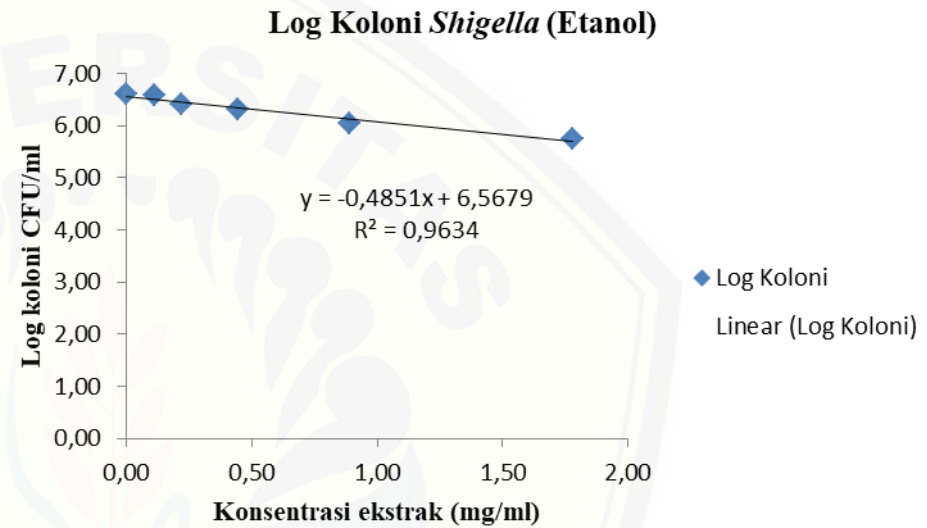
Kons. Polifenol (µg/ml)			
1 log	5	1,485	1,136
	4	2,622	
2 log	5	1,485	2,273
	3	3,758	
3 log	5	1,485	2,273
	3	3,758	

Y1 = 1 x 10⁸	Log Y1 = 8,000	X1 =	-1,924
Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10⁷	Log Y2 = 7,699	X2 =	-1,582
		IC₅₀	0,342

Y1 = 1 x 10⁸	Log Y1 = 7,000	X1 =	-0,788
Y2 = 90% (Y1) = 5 x 10⁷	Log Y2 = 6,000	X2 =	0,349
		IC₉₀	1,136

b. *Shigella dysenteriae* (Etanol)

Polifenol	Log Koloni
0,00	6,62
0,11	6,57
0,22	6,41
0,44	6,32
0,89	6,05
1,78	5,76



Kons. Polifenol ($\mu\text{g/ml}$)

1 log	5	3,375	2,155
	4	5,530	

2 log	5	3,375	4,310
	3	7,685	

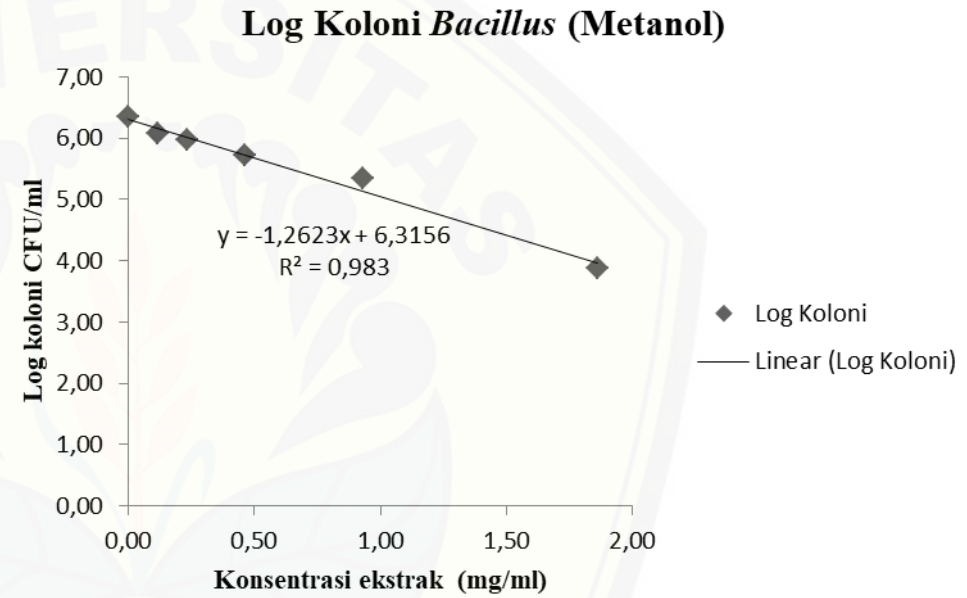
3 log	5	3,375	4,310
	3	7,685	

$Y1 = 1 \times 10^8$	Log Y1 =	8,000	X1 =	-3,091
$Y2 = 50\% (Y1) = 5 \times 10^7$	Log Y2 =	7,699	X2 =	-2,442
			IC₅₀	0,649

$Y1 = 1 \times 10^8$	Log Y1 =	7,000	X1 =	-0,935
$Y2 = 90\% (Y1) = 5 \times 10^7$	Log Y2 =	6,000	X2 =	1,220
			IC₉₀	2,155

c. *Bacillus cereus* (Metanol)

Polifenol	Log Koloni
0,00	6,36
0,12	6,07
0,23	5,97
0,47	5,72
0,93	5,35
1,86	3,88



Kons. Polifenol (mg/ml)

1 log	5	1,042	0,794
	4	1,835	

2 log	5	1,042	1,587
	3	2,629	

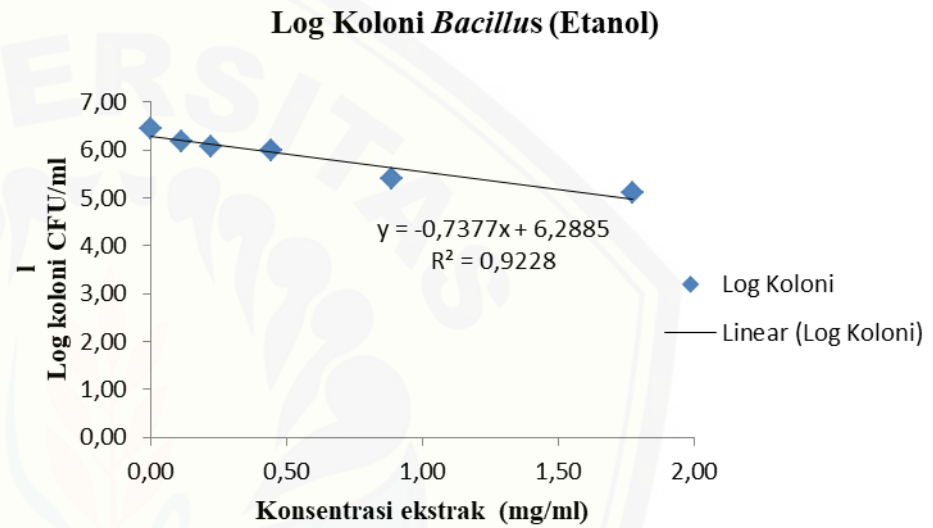
3 log	5	1,042	1,587
	3	2,629	

IC₅₀		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10 ⁸ Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10 ⁷	Log Y1 = 8,000	X1 =	-1,339
	Log Y2 = 7,699	X2 =	-1,100
		IC₅₀	0,239

IC₉₀		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10 ⁸ Y2 = 90% (Y1) = 5 x 10 ⁷	Log Y1 = 7,000	X1 =	-0,546
	Log Y2 = 6,000	X2 =	0,248
		IC₉₀	0,794

d. *Bacillus cereus* (Etanol)

Polifenol	Log Koloni
0,00	6,45
0,11	6,18
0,22	6,07
0,44	5,99
0,89	5,40
1,78	5,10



Kons. Polifenol (mg/ml)

1 log	5	1,747	1,364
	4	3,111	

2 log	5	1,747	2,728
	3	4,475	

3 log	5	1,747	2,728
	3	4,475	

IC₅₀		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10 ⁸ Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10 ⁷	Log Y1 = 8,000	X1 =	-2,344
	Log Y2 = 7,699	X2 =	-1,934
		IC₅₀	0,411

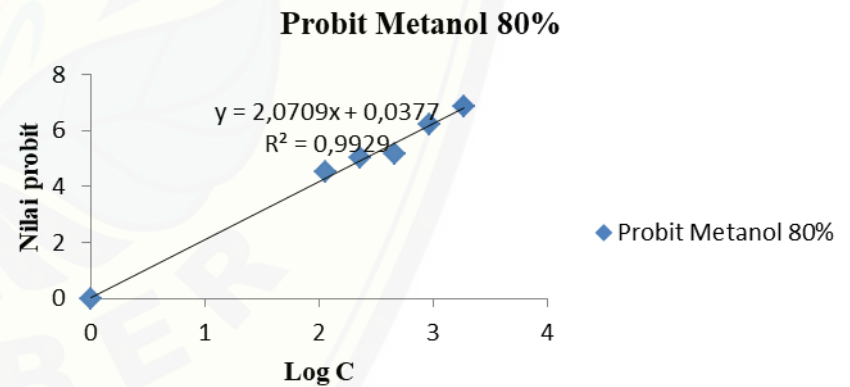
IC₉₀		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10 ⁸ Y2 = 90% (Y1) = 5 x 10 ⁷	Log Y1 = 7,000	X1 =	-0,980
	Log Y2 = 6,000	X2 =	0,384
		IC₉₀	1,364

Lampiran 4.5. Kurva probit *Shigella dysenteriae* dan *Bacillus cereus*

a. *Shigella dysenteriae* (Metanol)

ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah Koloni/200 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni	% pertumbuhan	Log C	Probit
		U1	U2							
0	0	2,15E+06	2,40E+06	2,28E+06	1,25E+05	0,00	6,357	100,0000	0,00	0
0,03	116,352	1,40E+06	1,65E+06	1,53E+06	1,25E+05	32,97	6,183	67,0330	2,07	4,53
0,06	232,704	8,50E+05	1,35E+06	1,10E+06	2,50E+05	51,65	6,041	48,3516	2,37	5,03
0,12	465,408	7,50E+05	1,20E+06	9,75E+05	2,25E+05	57,14	5,989	42,8571	2,67	5,18
0,24	930,816	3,50E+05	1,50E+05	2,50E+05	1,00E+05	89,01	5,398	10,9890	2,97	6,23
0,48	1861,632	1,00E+05	0,00E+00	5,00E+04	5,00E+04	97,80	4,699	2,1978	3,27	6,88

Log C	Probit Metanol 80%
0	0
2,07	4,53
2,37	5,03
2,67	5,18
2,97	6,23
3,27	6,88



$$y = 2,0709x + 0,0377$$

$$5 = 2,0709x + 0,0377$$

$$5 - 0,0377 = 2,0709 x$$

$$4,9623 = 2,0709 x$$

$$X = \text{Log } C_{50} = 4,9623 / 2,0709 = 2,396$$

$$\text{LOG } C_{50} = 2,396 \qquad 248,8857$$

$$\text{IC}_{50} = 248,8857 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$248,8857 \qquad 2,396$$

$$y = 2,0709x + 0,0377$$

$$6.28 = 2,0709x + 0,0377$$

$$6.28 - 0,0377 = 2,0709 x$$

$$6,2423 = 2,0709x$$

$$X = \text{Log } C_{90} = 6,2423 / 2,0709 = 3,014$$

$$\text{LOG } C_{90} = 3,014 \qquad 1032,7614$$

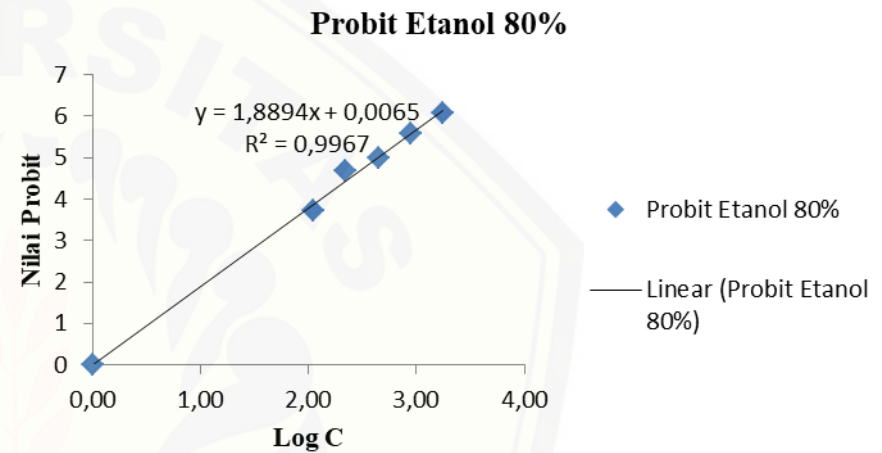
$$\text{IC}_{90} = 2072,0489 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$1032,7614 \qquad 3,014$$

b. *Shigella dysenteriae* (Etanol)

ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah Koloni/200 μ l		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni	% pertumbuhan	Log C	Probit
		U1	U2							
0	0	4,50E+06	3,85E+06	4,18E+06	3,25E+05	0,00	6,621	100,0000	0,00	0
0,03	111,036	4,00E+06	3,50E+06	3,75E+06	2,50E+05	10,18	6,574	89,8204	2,05	3,72
0,06	222,072	2,35E+06	2,85E+06	2,60E+06	2,50E+05	37,72	6,415	62,2754	2,35	4,67
0,12	444,144	2,10E+06	2,05E+06	2,08E+06	2,50E+04	50,30	6,317	49,7006	2,65	5
0,24	888,288	1,10E+06	1,15E+06	1,13E+06	2,50E+04	73,05	6,051	26,9461	2,95	5,58
0,48	1776,576	6,00E+05	5,50E+05	5,75E+05	2,50E+04	86,23	5,760	13,7725	3,25	86,23

Log C	Probit Etanol 80%
0,00	0
2,05	3,72
2,35	4,67
2,65	5
2,95	5,58
3,25	6,08



$y = 1,8894x + 0,0065$
 $5 = 1,8894x + 0,0065$
 $5 - 0,0065 = 1,8894x$
 $4,9935 = 1,8894x$
 $X = \text{Log } C_{50} = 4,9935 / 1,8894 = 2,642$

$y = 1,8894x + 0,0065$
 $6,28 = 1,8894x + 0,0065$
 $6,28 - 0,0065 = 1,8894x$
 $6,2735 = 1,8894x$
 $X = \text{Log } C_{90} = 6,2735 / 1,8894 = 3,320$

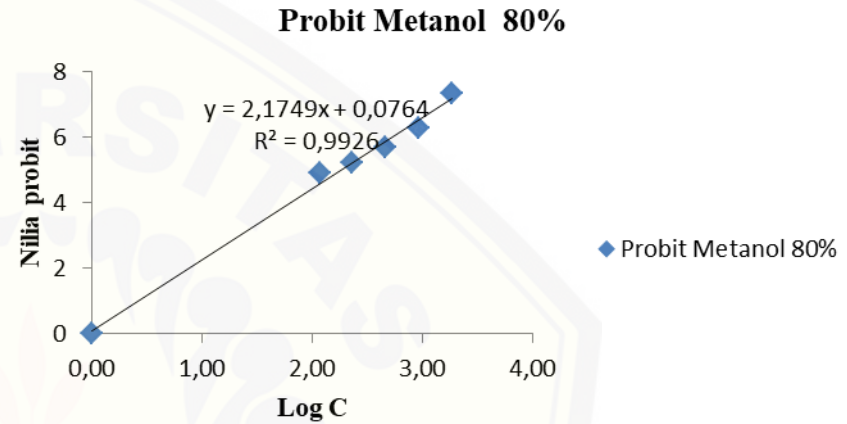
LOG C50 = 2,642	438,5307
IC50 = 438,5307 (µg/ml)	
438,5307	2,642

LOG C90 = 3,320	2089,2961
IC90 = 2089,29619 (µg/ml)	
2089,2961	3,32

c. *Bacillus cereus* (Metanol)

ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah Koloni/200 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni	% pertumbuhan	Log C	Probit
		U1	U2							
0	0	2,15E+06	2,40E+06	2,28E+06	1,25E+05	0,00	6,357	100,0000	0,00	0
0,03	116,352	1,20E+06	1,15E+06	1,18E+06	2,50E+04	48,35	6,070	51,6484	2,07	4,92
0,06	232,704	8,50E+05	1,00E+06	9,25E+05	7,50E+04	59,34	5,966	40,6593	2,37	5,23
0,12	465,408	4,50E+05	6,00E+05	5,25E+05	7,50E+04	76,92	5,720	23,0769	2,67	5,71
0,24	930,816	2,50E+05	2,00E+05	2,25E+05	2,50E+04	90,11	5,352	9,8901	2,97	6,28
0,48	1861,632	0,00E+00	1,50E+04	7,50E+03	7,50E+03	99,67	3,875	0,3297	3,27	7,33

Log C	Probit Metanol 80%
0,00	0
2,07	4,92
2,37	5,23
2,67	5,71
2,97	6,28
3,27	7,33



$y = 2,1749x + 0,0764$
 $5 = 2,1749x + 0,0764$
 $5 - 0,0764 = 2,1749 x$
 $4,923 = 2,1749 x$
 $X = \text{Log } C_{50} = 4,923 / 2,1749 = 2,263$
 $\text{LOG } C_{50} = 2,263$ 183,231
 $\text{IC}_{50} = 183,2314$
 (µg/ml)

 183,231 2,263

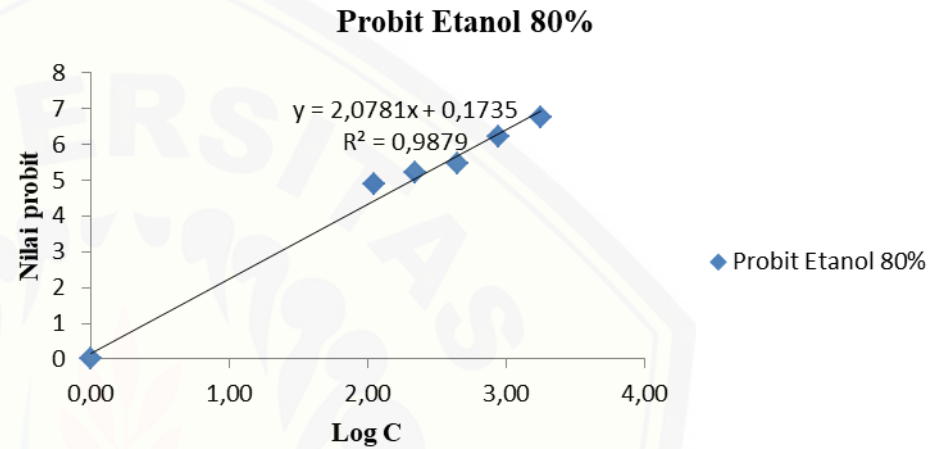
$y = 2,1749x + 0,0764$
 $6.28 = 2,1749x + 0,0764$
 $6.28 - 0,0764 = 2,1749 x$
 $6,2036 = 2,1749x$
 $X = \text{Log } C_{90} = 6,2036 / 2,1749 = 2,852$
 $\text{LOG } C_{90} = 2,852$ 711,214
 $\text{IC}_{90} = 711,2135 (\mu\text{g/ml})$

 711,214 2,852

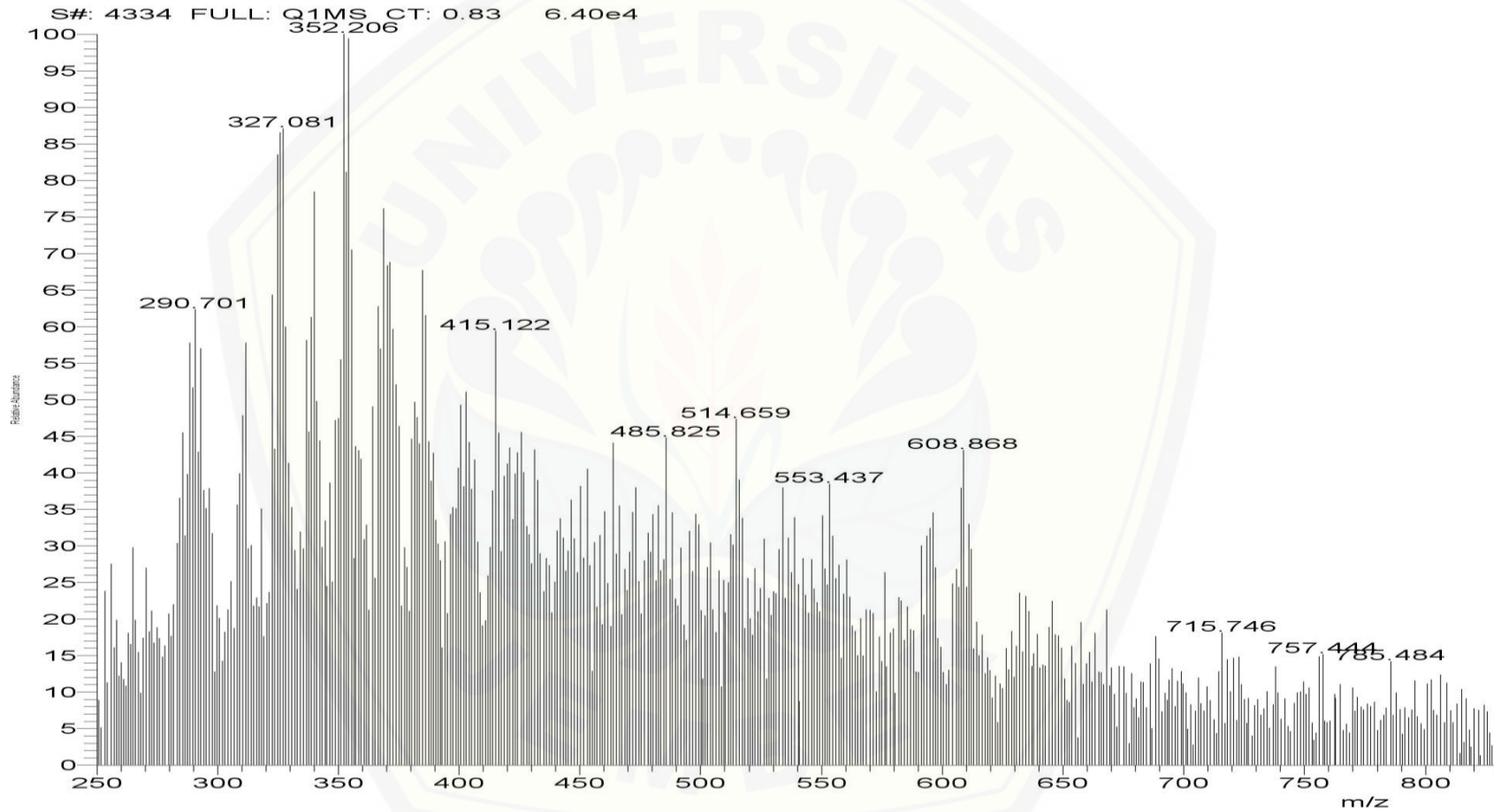
d. *Bacillus cereus* (Etanol)

ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah Koloni/200 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni	% pertumbuhan	Log C	Probit
		U1	U2							
0	0	3,30E+06	2,40E+06	2,85E+06	4,50E+05	0,00	6,455	100,0000	0,00	0
0,03	111,036	1,40E+06	1,65E+06	1,53E+06	1,25E+05	46,49	6,183	53,5088	2,05	4,9
0,06	222,072	9,50E+05	1,40E+06	1,18E+06	2,25E+05	58,77	6,070	41,2281	2,35	5,2
0,12	444,144	7,50E+05	7,70E+05	7,60E+05	1,00E+04	73,33	5,881	26,6667	2,65	5,47
0,24	888,288	3,50E+05	2,50E+05	3,00E+05	5,00E+04	89,47	5,477	10,5263	2,95	6,23
0,48	1776,576	1,00E+05	1,25E+05	1,13E+05	1,25E+04	96,05	5,051	3,9474	3,25	6,75

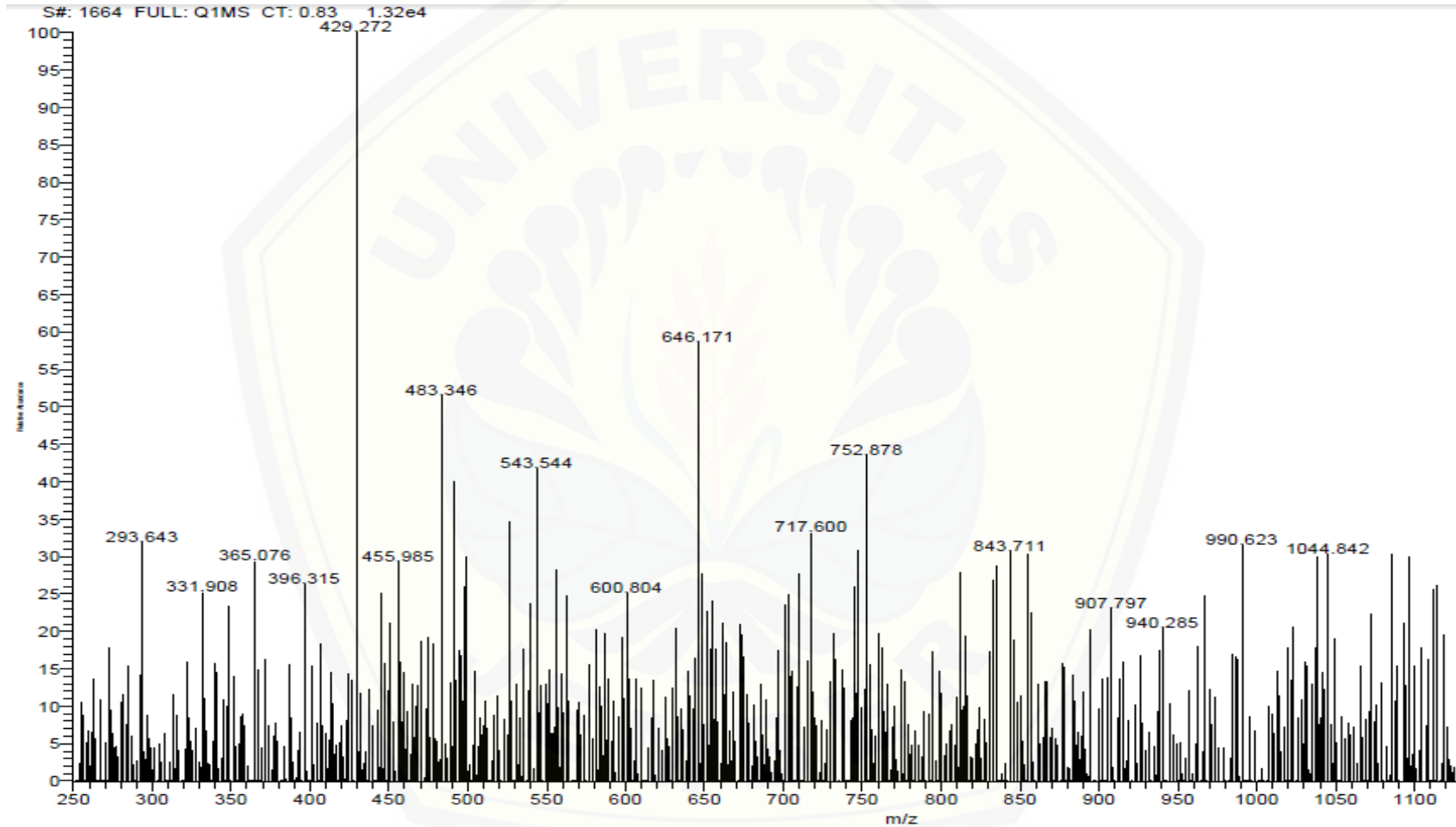
Log C	Probit Etanol 80%
0,00	0
2,05	4,9
2,35	5,2
2,65	5,47
2,95	6,23
3,25	6,75



$y = 2,0781x + 0,1735$ $5 = 2,0781x + 0,1735$ $5 - 0,1735 = 2,0781 x$ $4,8265 = 2,0781 x$ $X = \text{Log C50} = 4,8265 / 2,0781 = 2,323$ $\text{LOG C50} = 2,323$ $\text{IC50} = 210,3778 (\mu\text{g/ml})$	210,3778	
	210,378	2,323
$y = 2,0781x + 0,1735$ $6.28 = 2,0781x + 0,1735$ $6.28 - 0,1735 = 2,081 x$ $6,1065 = 2,081x$ $X = \text{Log C90} = 6,1065 / 2,081 = 2,934$ $\text{LOG C90} = 2,934$ $\text{IC90} = 859,014 (\mu\text{g/ml})$		859,014
	859,014	2,934

Lampiran 4.6 Hasil Identifikasi LC-MS Ekstrak Tembakau Kasturi Inferior Pelarut Metanol

Lampiran 4.7 Hasil Identifikasi LC-MS Ekstrak Tembakau Kasturi Inferior Pelarut Etanol



Lampiran 4.8 Dokumentasi Penelitian

a. Tembakau kasturi kering dan proses penimbangan



b. Proses ekstraksi dan penyaringan



c. Proses pemekatan (evaporasi)



d. Uji total polifenol




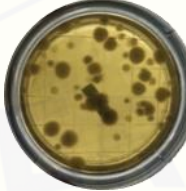











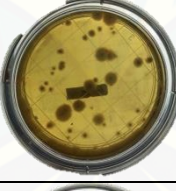






e. Pembuatan media NA



f. Proses plating dan pengamatan hasil inkubasi



Lampiran 4.9 Dokumentasi Hasil Penelitian

Konsentrasi (μ l)	<i>S.disentryae</i> (etanol)	<i>S.disentryae</i> (metanol)	<i>B.cereus</i> (etanol)	<i>B.cereus</i> (metanol)
0				
30				
60				
120				
240				
480	