



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI EKSTRAK
DAUN TEMBAKAU NA-OOGST BESUKI**

SKRIPSI

Oleh

Agnes Emilda Pratiwi

NIM 151710101017

JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

UNIVERSITAS JEMBER

2020



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN
TEBKAU NA-OOGST BESUKI**

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

Agnes Emilda Pratiwi

NIM 1517101017

Dosen Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Ir. Jayus

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Nurhayati STP, M.Si

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2020

PERSEMBAHAN

Saya persembahkan skripsi ini untuk :

1. Allah SWT, puji syukur atas kehadiran-Nya yang telah memudahkan segala urusan hamba-Mu, semoga rahmat dan ampunanmu-Mu selalu mengiringi setiap langkah hamba-Mu dan beri ampun atas segala dosa hamba;
2. Rasulullah SAW, terima kasih telah membimbing umat manusia menjadi khalifah di bumi serta menjadi tauladan umatmu untuk mencapai sebuah kedamaian;
3. Orangtua tercinta, Ibu Tinuk, ayah Suwito, dan adik saya Chika Olivia Pratiwi terima kasih atas cinta, kasih sayang, doa serta semangat yang luar biasa;
4. Almamater Fakultas Teknologi Pertanian Jember.

MOTTO

“Hanya orang optimis yang akan bisa melihat bahwa ada kesempatan dibalik kegagalan”

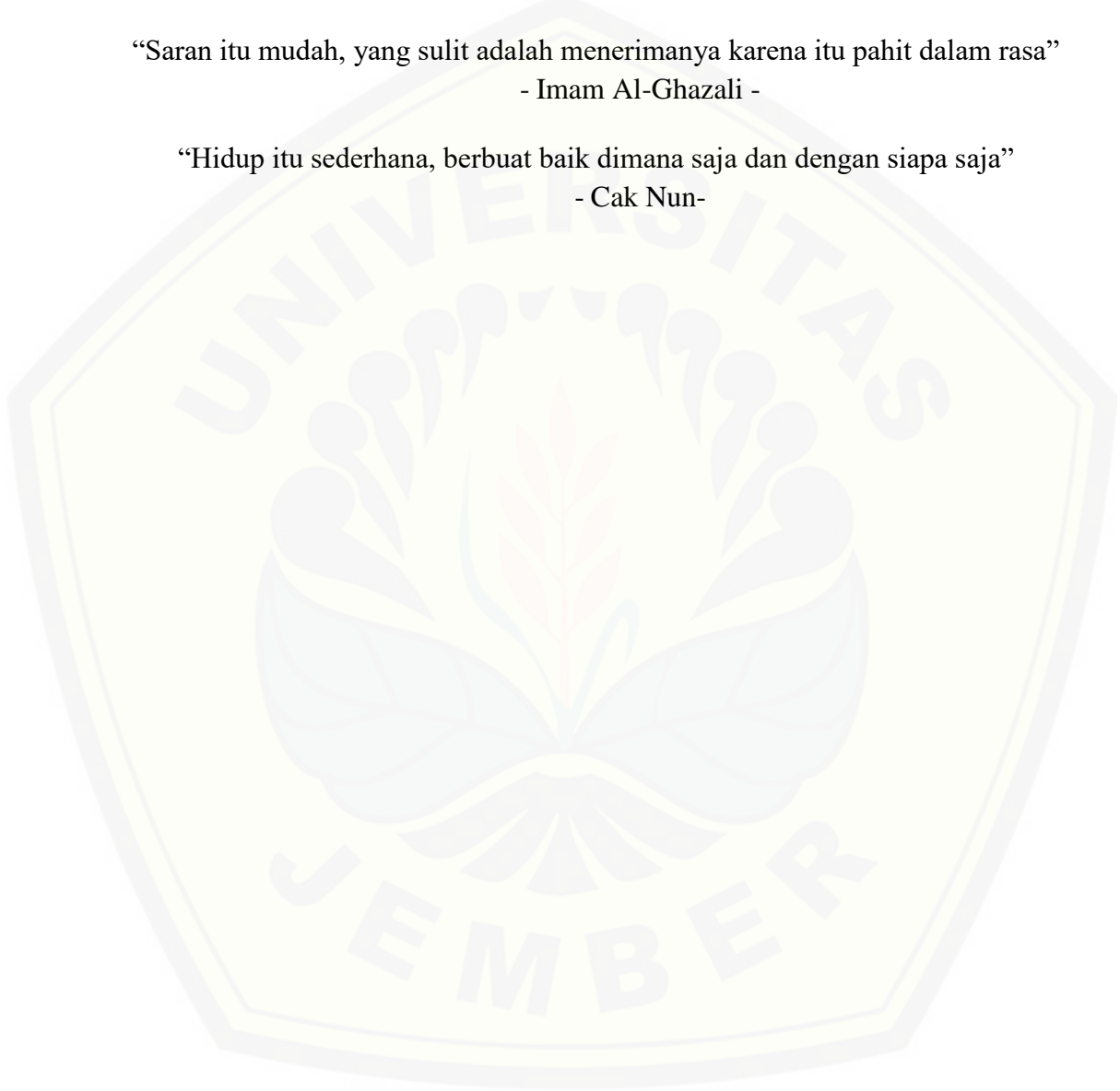
- Merry Riana-

“Saran itu mudah, yang sulit adalah menerimanya karena itu pahit dalam rasa”

- Imam Al-Ghazali -

“Hidup itu sederhana, berbuat baik dimana saja dan dengan siapa saja”

- Cak Nun-



PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Agnes Emilda Pratiwi

NIM : 151710101017

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “**Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau NA-OOGST BESUKI**” 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, 17 Januari 2020

Agnes Emilda Pratiwi
NIM 151710101017

SKRIPSI



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN
TEMPAKAU NA-OOGST BESUK**

Oleh :

Agnes Emilda Pratiwi

NIM 151710101017

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Ir. Jayus

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Nurhayati STP, M.Si

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau Na-Oogst Besuki**” karya Agnes Emilda Pratiwi NIM 151710101017 telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada:

Hari, tanggal : 17 Januari 2020

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Dr. Ir. Jayus
NIP. 19680516 199203 1 004

Dr. Nurhayati, S.TP., M.Si
NIP. 19790410 200312 2 004

Tim
Penguji :

Ketua

Anggota

Dr. Ir. Herlina, M.P
NIP. 19660518 199302 2 001

Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App,Sc
NIP. 19641109 198902 1 002

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian

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

SUMMARY

Antioxidant and Antibacterial Activity of Besuki Na-Oogst Tobacco Leaf Extract; Agnes Emilda Pratiwi; 2015; 151710101017; 81 pages; Department of Agricultural Product Technology, Faculty of Agricultural Technology, Jember University.

Tobacco is one commodity that can provide economic benefits, and social benefits that can be felt by the community. Jember Regency is one of the regions in East Java Province that is recognized as a center for tobacco production. The main variety of tobacco that can be planted in Jember Regency is Besuki *na-oogst* with a total of 22,425.40 quintals. NO (*Na-Oogst*) tobacco is tobacco that is planted at the end of the dry season and is harvested or picked at the beginning of the rainy season, but there are parts of leaves which do not pass the sorting which are left wasted so that they are underutilized. The leaves are believed to still be able to be utilized by extracting parts of the na-oogst tobacco leaves to be taken of the active compound.

Active compounds contained in tobacco leaves need to be extracted to get the desired active compound. The extraction result is expected to be able to be used as a barrier to the growth of pathogenic bacteria which often unsettles the community. Examples of pathogenic bacteria are *Escherichia coli* which causes infections in digestive disorders and *Bacillus subtilis* as a cause of infections in the nose, mouth, throat, intestinal tract and also in the digestive tract. This research was conducted with the difference in extraction time using 80% ethanol and aquades. The addition of varying extracts is expected to be able to inhibit bacterial growth optimally but with a minimal amount of extract. The study was conducted in several stages, those were extraction of tobacco leaves, analysis of total polyphenols (Follin-ciocalteau), analysis of antioxidant activity, (DPPH scavenging activity), and analysis of antibacterial activity of tobacco leaf extracts by dilution method in order to determine IC₅₀ and Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

The results showed that the extract of tobacco leaf na-oogst ethanol solvent for 4 hours extraction time obtained total polyphenol levels of 18.19 mg GAE / g obtained from the weight of 50 grams of tobacco that had been extracted and its antioxidant activity was 55.31 %.

Testing the antibacterial activity of na-oogst tobacco leaf extract with ethanol solvent using the dilution method so that bacteria *E.coli* showed that the MIC value was 0.406 mg / ml and IC₅₀ was 0.098 mg / ml, while the aquades solvent showed a MIC value of 0.982 mg / ml ml and IC₅₀ of 0.135. Tests on *B. subtilis* showed that the MIC value was 0.337 mg / ml and IC₅₀ was 0.089 mg / ml, while with distilled water the MIC value was 0.657 mg / ml and IC₅₀ was 0.276 mg / ml.

RINGKASAN

Aktivitas Antioksidan Dan Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau Na-Oogst Besuki; Agnes Emilda Pratiwi; 2015; 151710101017; 81 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

Tembakau merupakan salah satu komoditas yang bisa memberikan manfaat ekonomi, dan manfaat sosial yang bisa di rasakan oleh kalangan masyarakat. Kabupaten Jember adalah salah satu daerah di Provinsi Jawa Timur yang diakui sebagai pusat produksi tembakau. Varietas utama tembakau yang dapat ditanam di Kabupaten Jember adalah Besuki *na-oogst* sebanyak 22.425,40 kuintal. Tembakau NO (*Na-Oogst*) merupakan tembakau yang ditanam di akhir musim kemarau dan dipanen atau dipetik pada awal musim penghujan, namun terdapat bagian daun yang tidak lolos sortir dibiarkan terbuang sehingga kurang dimanfaatkan. Daun tersebut diyakini masih dapat dimanfaatkan keberadaannya dengan cara mengekstrak bagian daun tembakau *na-oogst* tersebut untuk diambil senyawa aktifnya.

Senyawa aktif yang terkandung pada daun tembakau perlu dilakukan ekstraksi untuk mendapatkan senyawa aktif yang diinginkan. Hasil ekstraksi diharapkan mampu digunakan sebagai penghambat tumbuhnya bakteri patogen yang kerap kali meresahkan masyarakat. Contoh bakteri patogen yaitu *Escherichia coli* penyebab infeksi pada gangguan pencernaan dan *Bacillus subtilis* sebagai penyebab infeksi pada bagian hidung, mulut, tenggorokan, saluran usus dan juga pada saluran pencernaan. Penelitian ini dilakukan dengan perbedaan waktu ekstraksi menggunakan pelarut etanol 80% dan aquades. Penambahan jumlah ekstrak yang bervariasi diharapkan mampu menghambat pertumbuhan bakteri secara maksimal namun dengan jumlah ekstrak yang minimal. Penelitian dilakukan dalam beberapa tahapan, yakni ekstraksi daun tembakau, analisa total polifenol (*Follin-ciocalteau*), analisa aktivitas antioksidan, (DPPH *scavenging activity*), dan analisa aktivitas antibakteri ekstrak daun tembakau dengan metode dilusi agar untuk penentuan IC₅₀ dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun tembakau na-oogst pelarut etanol perlakuan lama waktu ekstraksi 4 jam didapatkan total polifenol sebesar 18,19 mg GAE/g yang diperoleh dari berat 50 gram tembakau yang telah di ekstrak dan aktivitas antioksidannya sebesar 55,31 %.

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun tembakau na-oogst dengan pelarut etanol menggunakan metode dilusi agar terhadap bakteri *E.coli* menunjukkan bahwa nilai KHM sebesar 0,406 mg/ml dan IC₅₀ sebesar 0,098 mg/ml, sedangkan dengan pelarut aquades menunjukkan nilai KHM sebesar 0,982 mg/ml dan IC₅₀ sebesar 0,135. Pengujian pada *B. subtilis* menunjukkan bahwa nilai KHM sebesar 0,337 mg/ml dan IC₅₀ sebesar 0,089 mg/ml, sedangkan dengan pelarut aquades menunjukkan nilai KHM sebesar 0,657 mg/ml dan IC₅₀ sebesar 0,276 mg/ml.

PRAKATA

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Aktivitas Antioksidan Dan Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau Na-Oogst Besuki”** 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 Koordinator Program Studi 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. Dr. Nurhayati, S.TP., M.Si selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan arahan dan perbaikan dalam penyusunan skripsi ini.
4. Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App,Sc selaku Ketua Kelompok Riset Bioproses Pangan dan Hasil Pertanian dan selaku Dosen Penguji skripsi.
5. Dr. Ir. Herlina, M.P selaku Dosen Penguji skripsi yang telah memberi evaluasi dan saran kepada penulis.
6. Orangtua tercinta untuk ibu Tinuk, ayah Suwito, terimakasih atas kasih sayang, cinta, motivasi dan semangat yang luar biasa.
7. Adik Chika Olivia Pratiwi, nenek Suparti, kakek Ti'i terimakasih atas doa, kasih sayang serta dukungan yang luar biasa kepada penulis.
8. Partner yang selalu ada dalam suka dan duka, Jauharotun Nafi'ah dan Irna Noviyanti. Terimakasih atas kasih doa, semangat dan motivasi kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi.

9. Partner pejuang proyek tembakau Nany Masruotin, Nala Umami Husaina, Fatmawati Wilujeng, Susi Maimona Wati, dan Nurul Nofiyanti yang senantiasa membantu penulis selama penelitian hingga penyusunan skripsi dan sebagai tempat berbagi keluh kesah dan suka cita.
10. Keluarga besar THP B 2015, terima kasih kalian telah memberikan warna dalam hidupku.
11. 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 menyadari bahwa skripsi ini jauh dari kata sempurna, oleh karena itu 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, 17 Januari 2020

Penulis

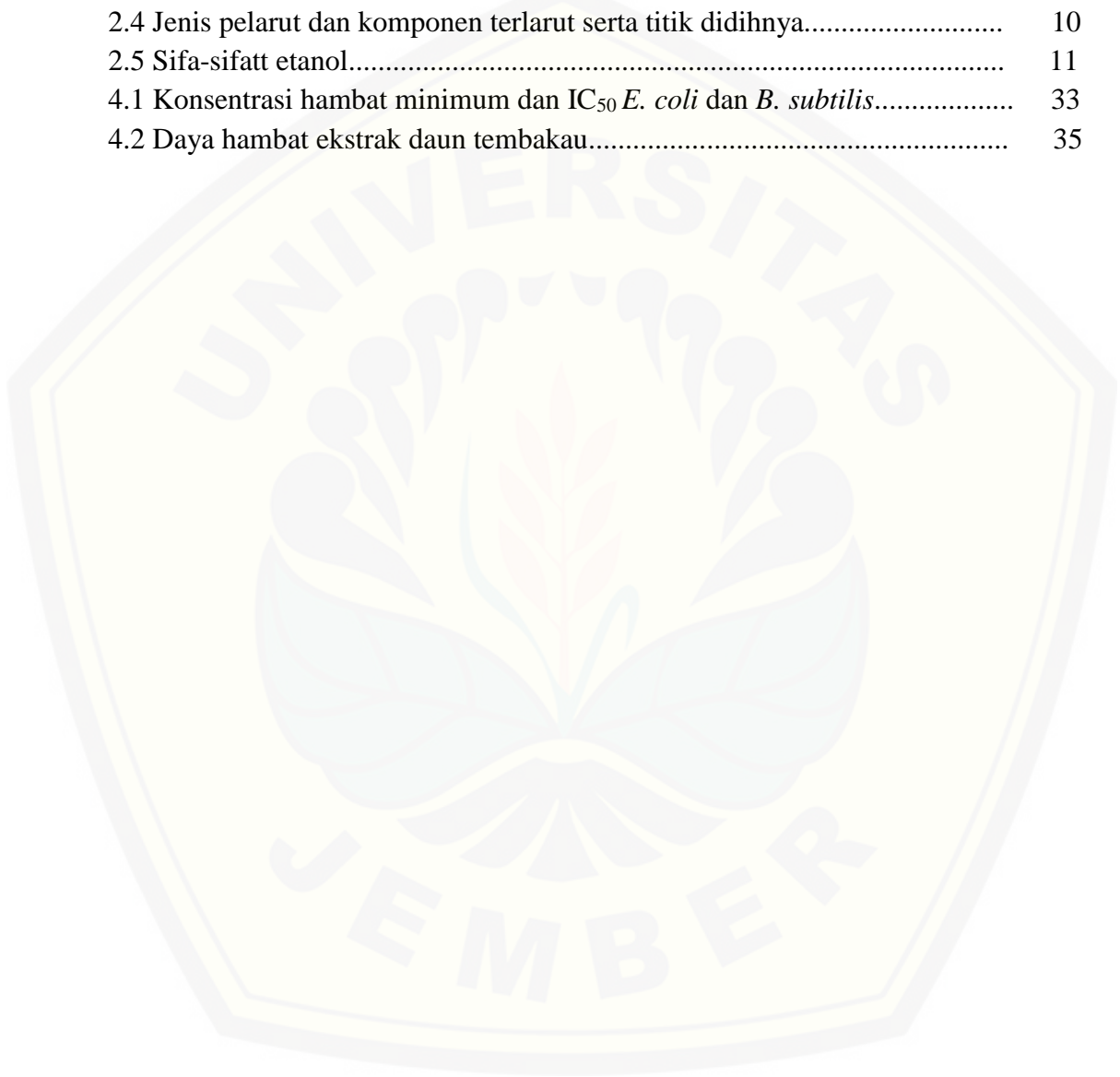
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PERSEMBAHAN.....	ii
MOTTO.....	iii
PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING.....	v
PENGESAHAN.....	vi
SUMMARY.....	vii
RINGKASAN.....	ix
PRAKATA.....	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
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 Kandungan Kimia Tembakau Na-Oogst.....	4
2.2 Komposisi Kimia Daun Tembakau.....	6
2.3 Ekstraksi.....	8
2.4 Jenis pelarut.....	9
2.5 Total Polifenol.....	11
2.6 Aktivitas Senyawa Antioksidan.....	12
2.7 Moduk Aksi Antibakteri.....	13
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	12
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	16

3.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	16
3.2.1 Alat Penelitian.....	16
3.2.2 Bahan Penelitian.....	16
3.3 Tahapan Penelitian.....	17
3.3.1 Rancangan Percobaan.....	17
3.3.2 Tahap Penelitian.....	17
3.3.3 Prosedur Pengamatan.....	18
3.4 Analisa Data.....	23
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	24
4.1 Total Polifenol Ekstrak Daun Tembakau Na-Oogst.....	24
4.2 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Tembakau Na-Oogst.....	25
4.3 Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau Na-Oogst.....	27
BAB 5. PENUTUP.....	37
5.1 Kesimpulan.....	37
5.2 Saran.....	37
DAFTAR PUSTAKA.....	38
LAMPIRAN-LAMPIRAN.....	44

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Susunan Senyawa Kimia Daun Tembakau.....	7
2.2 Komposisi Senyawa Daun Tembakau.....	7
2.3 Jenis pelarut organik dan sifat fisiknya.....	9
2.4 Jenis pelarut dan komponen terlarut serta titik didihnya.....	10
2.5 Sifat-sifat etanol.....	11
4.1 Konsentrasi hambat minimum dan IC_{50} <i>E. coli</i> dan <i>B. subtilis</i>	33
4.2 Daya hambat ekstrak daun tembakau.....	35



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Tanaman Tembakau Na-Oogst.....	4
3.1 Diagram Alir Pembuatan Ekstrak Daun Tembakau.....	18
3.2 Diagram Alir Preparasi Isolat Bakteri	22
3.3 Diagram Alir Penentu Respn Penghambat (KHM) dan IC ₅₀	23
4.1 Total Polifenol Ekstrak Daun Tembakau Na-Oogst.....	24
4.2 Total antioksidan ekstrak daun tembakau Na-Oogst.....	26
4.3 Kurva probit <i>E. coli</i> ekstrak daun tembakau na-oogst pelarut etanol.....	27
4.4 Kurva probit <i>E. coli</i> ekstrak daun tembakau na-oogst pelarut aquades	28
4.5 Kurva probit <i>B. subtilis</i> ekstrak daun tembakau na-oogst pelarut etanol...	29
4.6 Kurva probit <i>B. subtilis</i> ekstrak daun tembakau na-oogst pelarut aquades	30
4.7 Kurva logaritmik ekstrak daun tembakau terhadap <i>E. coli</i> dengan pelarut etanol dan aquades	31
4.8 Kurva logaritmik ekstrak daun tembakau terhadap <i>B.subtilis</i> dengan pelarut etanol dan aquades	32

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tembakau merupakan salah satu komoditas yang bisa memberikan manfaat ekonomi, dan manfaat sosial yang bisa dirasakan oleh kalangan masyarakat. Peran tembakau terhadap perekonomian Indonesia dapat ditunjukkan dari besarnya cukai yang disumbangkan sebagai penerimaan negara dan banyaknya tenaga kerja yang terserap baik dalam tahap penanaman dan pengolahan tembakau sebelum diekspor atau dibuat rokok, maupun pada tahap pembuatan rokok (Santoso, 2013). Menurut data Direktorat Jendral Perkebunan Nasional (2016) menyatakan bahwa, produksi tembakau terbanyak dihasilkan dari pulau jawa dengan total produksi 150.485 ton dengan luas tanam 169.663 ha.

Berdasarkan data dari Badan Pusat Statistik Kabupaten Jember (2017) pada tahun 2016 produksi tanaman tembakau jenis Na-Oost (NO) sebanyak 22.425,40 kuintal, Voor-Oost (VO) rajang sebanyak 3.890,25 kuintal dan tembakau Voor Oogst *White Burley* sebanyak 1.726,50 kuintal. Selain itu tembakau dianggap sebagai salah satu tanaman komersial yang memiliki harapan pertanian tinggi keuntungan. Kabupaten Jember adalah salah satu daerah di Provinsi Jawa Timur yang diakui sebagai pusat produksi tembakau. Varietas utama tembakau yang banyak ditanam di Kabupaten Jember adalah *Na-Oogst* Besuki. Tembakau NO (*Na-Oogst*) merupakan tembakau yang ditanam di akhir musim kemarau dan dipanen atau dipetik pada awal musim penghujan.

Tembakau na-oogst terdapat beberapa daun tembakau yang tidak lolos sortiran (afkir). Daun tembakau yang tidak lolos sortir tersebut diketahui mengandung senyawa aktif yang bersifat sebagai antioksidan dan antimikroba (Raman *et al.*, 2012; Palic *et al.*, 2002). Senyawa aktif tersebut diantaranya golongan fenol berupa flavonoid, golongan alkaloid berupa nikotin, golongan saponin berupa steroid dan minyak atsiri berupa terpenoid (Putri *et al.*, 2014). Senyawa bioaktif yang ada pada daun tembakau tersebut dapat dimanfaatkan sebagai antimikroba alami. Senyawa aktif yang terkandung pada daun tembakau perlu dilakukan ekstraksi untuk mendapatkan senyawa aktif yang diinginkan.

Beberapa faktor yang mempengaruhi hasil ekstraksi adalah pemilihan jenis pelarut, laju ekstraksi dan suhu pelarut. Suhu pelarut menentukan kecepatan ekstraksi dan hasil ekstrak, semakin rendah suhu ekstraksi, waktu yang dibutuhkan untuk larut akan semakin lama, sedangkan semakin tinggi suhu ekstraksi maka daya larut bahan yang diekstraksi akan semakin meningkat (Hammad *et al.*, 2013). Tujuan dari ekstraksi yaitu untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan dan juga menghilangkan komponen yang tidak diinginkan dari tanaman yang akan diekstrak dengan menggunakan pelarut selektif. Selama ekstraksi, pelarut akan berdifusi kedalam bahan tanaman dan melarutkan senyawa yang terkandung didalamnya berdasarkan kepolaran yang sama (Ncube *et al.*, 2008). Pada penelitian ini menggunakan dua jenis pelarut yaitu etanol 80% dan aquades dengan beberapa perbedaan lama waktu ekstraksi yaitu 2 jam, 3 jam dan 4 jam. Oleh karena itu, dilakukan penelitian mengenai aktivitas antioksidan dan antibakteri ekstrak daun tembakau na-oogst dengan perbedaan hasil waktu ekstraksi terhadap pertumbuhan bakteri *B. subtilis* dan *E. coli*. Menurut Samiullah dan Bano (2011), bakteri *B. subtilis* merupakan jenis bakteri Gram positif, sedangkan bakteri *E. coli* merupakan bakteri Gram negatif yang menyebabkan infeksi pada gangguan pencernaan seperti diare (Rahmaningsih *et al.*, 2012).

1.2 Rumusan Masalah

Daun tembakau afkir yang sudah tidak lolos sortir yang melimpah dapat dilakukan penanganan khusus dengan cara memanfaatkan daun tembakau afkir menjadi ekstrak. Daun tembakau diketahui mengandung senyawa antibakteri yang berupa flavonoid, steroid, alkaloid dan terpenoid (Kusumawardani *et al.*, 2014). Untuk mengekstrak senyawa aktif pada daun tembakau tersebut diperlukan pelarut yang efektif agar senyawa dapat terekstrak maksimal. Selain jenis pelarut yang digunakan, konsentrasi pelarut juga mempengaruhi jumlah atau banyaknya senyawa aktif yang terekstrak. Jenis pelarut yang digunakan yaitu etanol. Pelarut etanol memiliki dua sisi yang terdiri dari gugus hidroksil (OH^-) yang bersifat polar dan gugus CH_2CH_3 yang bersifat non polar (Aziz *et al.*, 2014). Ekstraksi pada daun tembakau bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang

diinginkan. Penelitian ini menggunakan perbedaan lama waktu ekstraksi yaitu 2 jam, 3 jam, dan 4 jam dengan pelarut etanol 80% dan aquades untuk mengetahui jumlah total polifenol dan aktivitas antioksidan. Etanol 80% sangat efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal. Aquades merupakan air murni hasil destilasi dan memiliki kemampuan yang baik untuk mengekstraksi sejumlah bahan simplisia (Voigt, 1995). Suhu pelarut menentukan kecepatan ekstraksi dan hasil ekstrak, semakin rendah suhu ekstraksi, waktu yang dibutuhkan untuk larut akan semakin lama, sedangkan semakin tinggi suhu ekstraksi maka daya larut bahan yang diekstraksi akan semakin meningkat (Hammado *et al.*, 2013).

Senyawa bioaktif pada daun tembakau dapat dimanfaatkan sebagai antimikroba alami. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan ekstraksi daun tembakau *na-oogst* afkir menggunakan pelarut etanol 80% dan aquades dengan perlakuan waktu ekstraksi yang berbeda untuk mengetahui total polifenol dan aktivitas antioksidan. Kemudian perlakuan terbaik akan diujikan pada pengujian antibakteri terhadap bakteri *B. subtilis* dan *E. coli*.

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh lama ekstraksi yang tertinggi dengan pelarut etanol 80% dan aquades terhadap total polifenol yang dihasilkan,
2. Mengetahui aktivitas antioksidan yang tertinggi dari ekstrak daun tembakau *na-oogst* Besuki (*Nicotiana tabacum* L.),
3. Mengetahui aktivitas antibakteri yang tertinggi dari ekstrak daun tembakau *na-oogst* Besuki (*Nicotiana tabacum* L.) terhadap *B.s subtilis* dan *E. coli*.

1.4 Manfaat

Manfaat penelitian ini adalah untuk meningkatkan nilai guna daun tembakau *na-oogst* afkir dalam bentuk ekstrak, serta mampu mengurangi limbah daun tembakau yang tidak lolos sortir.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kandungan Kimia Tembakau Na- Oogst

Tobaccos dibagi menjadi dua kelompok berdasarkan periode waktu tanam, yaitu *Voor-Oogst* dan *Na-Oogst*. Tembakau *Voor-Oogst* merupakan tembakau yang ditanam di akhir musim hujan dan panen di musim kemarau. Tembakau *Voor-Oogst* salah satu tembakau yang digunakan sebagai bahan baku rokok kretek sedangkan tembakau besuki na-oogst digunakan sebagai bahan baku rokok cerutu (Qoriah dan Meliczek, 2006).

Tembakau Besuki Na-Oogst adalah tembakau yang ditanam di akhir musim kemarau dan dipanen pada waktu musim hujan (Djajadi, 2015). Tembakau *na-oogst* merupakan sejenis tembakau yang dipakai untuk bahan dasar membuat cerutu dan hampir seluruh produknya diekspor (Qoriah dan Meliczek, 2006). Tanaman tembakau cerutu Besuki di Kabupaten Jember terdiri atas beberapa jenis, yaitu tembakau Besuki na-oogst tradisional (BesNOTRA); tembakau Besuki na-oogst tanam awal, yang pada dasarnya merupakan hasil terobosan teknologi tahun 1984 dengan cara menggunakan naungan (*waring*) (BPSMB-LT dan KUTJ, 2008). Tanaman tembakau Na Oogst dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Tanaman Tembakau Na-Oogst (*Nicotiana glauca*)

Senyawa yang terkandung dalam tembakau adalah alkaloid, saponin, kumarin, flavonoid dan polifanol (Syamsuhidayat dan Hutapea, 1991). Tembakau merupakan tanaman semusim, sehingga untuk mendapatkan metabolit sekundernya akan tergantung pada musim yang sedang berlangsung.

Metabolit sekunder adalah suatu senyawa yang disintesa oleh tanaman dan dibutuhkan oleh tanaman dalam jumlah sedikit serta lebih banyak dimanfaatkan

oleh organisme lainnya. Saponin merupakan salah satu metabolit sekunder yang dihasilkan oleh daun tembakau dalam jumlah yang sangat terbatas, yang memiliki fungsi sebagai bahan obat-obatan.

Daun tembakau memiliki senyawa yang bersifat sebagai antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Senyawa metabolit sekunder yang bersifat sebagai antibakteri yaitu seperti flavonoid, alkaloid dan terpenoid, saponin dan steroid. Berikut merupakan jenis senyawa antimikroba alami daun tembakau sebagai antibakteri :

1. flavonoid

Flavonoid adalah senyawa C₁₅ yang semuanya memiliki struktur C₆-C₃-C₆. Flavonoida dibagi menjadi tiga kelas besar berdasarkan struktur umumnya. Pada masing-masing kelas, dua benzene terikat bersama dengan kelompok tiga karbon. Pengaturan dari kelompok C₃ ini menentukan bagaimana senyawa dikalsifikasikan (Vermerris, 2006).

Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol, dimana senyawa ini mempunyai sifat efektif menghambat pertumbuhan virus, bakteri dan jamur. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dapat dibagi menjadi 3 yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi (Hendra *et al.*, 2011).

Mekanisme antibakteri flavonoid menghambat sintesis asam nukleat adalah cincin A dan B yang memegang peran penting dalam proses interkelas atau ikatan hidrogen dengan menumpuk basa asam nukleat yang menghambat pembentukan DNA dan RNA. Flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri (Cushine *et al.*, 2005).

Mekanisme kerja flavonoid menghambat fungsi membran sel adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Senyawa kompleks tersebut mengganggu permeabilitas membran sel dan menghambat ikatan enzim seperti ATPase dan fosfolipase (Li *et al.*, 2003). Flavonoid dapat menghambat metabolisme energi dengan cara menghambat

penggunaan oksigen oleh bakteri. Energi dibutuhkan untuk biosintesis makromolekul. Flavonoid menghambat pada sitokrom C reduktase sehingga pembentukan metabolisme terhambat (Cushine *et al.*, 2005).

2. alkaloid

Alkaloid berpotensi sebagai antibakteri karena dapat merusak dinding sel (Juriah *et al.*, 2014). Mekanisme penghambatan senyawa alkaloid sebagai antibakteri yaitu dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Juliantina, 2008). Selain itu, menurut Gunawan (2008) dalam senyawa alkaloid terdapat gugus basa yang mengandung nitrogen akan bereaksi dengan senyawa asam amino yang menyusun dinding sel bakteri dan DNA bakteri. Reaksi ini akan mengakibatkan terjadinya perubahan struktur dan susunan asam amino yang akan menimbulkan perubahan keseimbangan genetic pada rantai DNA, sehingga akan mendorong terjadinya lisis sel bakteri yang menyebabkan kematian sel pada bakteri.

3. Terpenoid merupakan senyawa terpenoid dapat menghambat pertumbuhan mikroba yakni dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel, dimana membran atau dinding sel tidak terbentuk secara sempurna (Ajizah, 2004).

4. Steroid dapat bekerja sebagai antibakteri yaitu dengan cara berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat impermeable terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun, morfologi sel berubah dan dapat menyebabkan membran sel rapuh dan lisis (Bangham dan Horne, 2006).

2.2 Komposisi Kimia Daun Tembakau

Daun tembakau mengandung bahan yang bersifat antibakteri dan antijamur (Bakht *et al.*, 2012). Bahan aktif tersebut antara lain golongan fenol berupa flavonoid, golongan alkaloid berupa nikotin, golongan saponin berupa steroid dan juga minyak atsiri berupa terpenoid (Fathiazad, 2005; Susilowati, 2006; Rudi *et al.*, 2011). Kandungan senyawa kimia tembakau dapat dilihat pada Tabel 2.1

Tabel 2.1. Susunan senyawa kimia dari daun tembakau

Uraian	Jumlah (%)
Abu	20
Gula	0,4-2,5
Fenol	0,0-0,5
Nitrat	1,0-2,0
Nikotin:	
a. Pada daun bawah	0,16-2,89
b. Pada daun tengah	0,3-3,75
c. Pada daun atas	0,5-4,0
Kandungan N total	2,18-3,58

Sumber: Cahyono (1998)

Tembakau dikenal sebagai tanaman herbal yang bermanfaat yang memiliki senyawa kimia yang bersifat antioksidan (Miller, 1973) dan juga antibakteri (Khidyrovaet *al.*, 2002). Senyawa antibakteri pada tembakau yang diketahui berdasarkan penelitian sebelumnya yaitu flavonoid (Machado *et al.*, 2010) dan minyak atsiri (*essential oil*) (Palic *et al.*, 2002). Komposisi senyawa pada daun tembakau dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2. Komposisi senyawa pada daun tembakau

Komponen	Komposisi (% bk)
Total nitrogen	2,20
Protein nitrogen (nitrogen)	1,58
Nikotin	0,67
Nitrogen dari asam α -amino	0,30
Air terlarut karbohidrat	25,9
Selulosa	12,3
Pektin	13,4
Polyptose	4,90
Minyak atsiri	0,13
Resin yang diekstrak menggunakan benzena	7,42
Resin yang diekstrak menggunakan petrolum eter	6,20
Polyphenol	4,39
Volatle karbonil (asetaldehid)	0,26
Asam organik	9,12
a. Asam oxalic	2,18
b. Asam citric	1,27
c. Asam malat	4,57
d. Asam volatile	1,12
pH dari air yang terekstrak	5,54
Abu	15,4

Sumber: Podlejski & Olejniczak (1983)

2.3 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses penarikan komponen senyawa yang diinginkan dari suatu bahan dengan cara pemisahan satu atau lebih komponen dari suatu bahan yang merupakan sumber komponennya. Pada umumnya ekstraksi akan semakin baik bila permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan pelarut semakin luas. Dengan demikian, semakin halus serbuk simplisia maka akan semakin baik ekstraksinya. Selain luas bidang, ekstraksi juga dipengaruhi oleh sifat fisik dan kimia simplisia yang bersangkutan (Ahmad, 2006).

Proses pemisahan senyawa dari simplisia dilakukan dengan menggunakan pelarut tertentu sesuai dengan sifat senyawa yang akan dipisahkan. Pemisahan senyawa berdasarkan kaidah *like dissolved like* yang artinya suatu senyawa akan larut dalam pelarut yang sama tingkat kepolarannya. Bahan dan senyawa kimia akan mudah larut pada pelarut yang relatif sama kepolarannya. Kepolaran suatu pelarut ditentukan oleh besar konstanta dielektriknya, yaitu semakin besar nilai konstanta dielektrik suatu pelarut maka polaritasnya semakin besar.

Secara umum metode ekstraksi dibagi dua macam yaitu ekstraksi tunggal dan ekstraksi bertingkat. Ekstraksi tunggal adalah melarutkan bahan yang akan diekstrak dengan satu jenis pelarut. Kelebihan dari metode ini yaitu lebih sederhana dan tidak memerlukan waktu yang lama, akan tetapi rendemen yang dihasilkan sangat sedikit. Adapun metode ekstraksi bertingkat adalah melarutkan bahan atau sampel dengan menggunakan dua atau lebih pelarut. Kelebihan dari metode ekstraksi bertingkat ini ialah dapat menghasilkan rendemen dalam jumlah yang besar dengan senyawa yang berbeda tingkat kepolarannya.

Ekstraksi bertingkat dilakukan secara berturut-turut yang dimulai dari pelarut non polar berupa kloroform, selanjutnya pelarut semipolar berupa etil asetat dan dilanjutkan dengan pelarut polar seperti metanol atau etanol (Sudarmadji *et al.*, 2007). Beberapa jenis pelarut organik dan sifat fisiknya disajikan pada tabel 2.3.

Tabel 2.3 Jenis pelarut organik dan sifat fisiknya

Pelarut	Titik didih	Titik beku	Konstanta dielektrik	Indeks polaritas
Aquades	100,0	0	80,2	10,2
Methanol	64,0	-98	32,6	5,1
Etanol	78,4	-117	24,3	5,2
Kloroform	61,2	64	4,8	4,1
Etil asetat	77,1	-84	6,0	4,4
Dietil eter	35,0	-116	4,3	2,8
Aseton	56,0	-95	20,7	5,1

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

2.4 Jenis Pelarut

Pelarut merupakan salah satu faktor yang menentukan dalam proses ekstraksi, sehingga banyak faktor yang harus diperhatikan dalam pemilihan pelarut (Guenther, 2006). Terdapat dua pertimbangan utama dalam memilih jenis pelarut, yaitu pelarut harus mempunyai daya larut yang tinggi dan pelarut tidak berbahaya atau tidak beracun. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus dapat melarutkan ekstrak yang diinginkan saja, mempunyai kelarutan yang besar, tidak menyebabkan perubahan secara kimia pada komponen ekstrak, dan titik didih kedua bahan tidak boleh terlalu dekat (Guenther, 2006). Menurut Heath dan Reinessius (1987), yang perlu diperhatikan dalam pemilihan pelarut adalah daya melarutkan komponen yang diinginkan, titik didih, sifat racun, mudah tidaknya terbakar dan sifat korosif terhadap peralatan ekstraksi. Untuk titik didih dari berbagai macam pelarut dan komponen terlarut dapat dilihat pada Tabel 2.4. Di antara pelarut-pelarut tersebut yang paling sering digunakan adalah air, etanol, etil asetat, petroleum eter, kloroform, dan heksana.

Tabel 2.4. Jenis pelarut dan komponen terlarut serta titik didihnya

Jenis pelarut	Titik didih (°C)
Air (aquades)	100
Etanol	78,4
Etil asetat	77
Petroleum eter	70
Kloroform	61,7
Heksan	71
Asam askorbat	>190
Flavanoid	>160
Karotenoid	>580
Alkaloid	>100
Steroid	>135

Sumber: Schefflan dan Morris (1983); Weissenberg (2001)

2.4.1 Air (aquades)

Aquades berasal dari istilah latin *aquadestilata* yang berarti air suling. Air suling merupakan air yang diperoleh dari pengembunan uap air akibat penguapan atau pendidihan air. Sebuah molekul air terdiri dari sebuah atom oksigen yang berikatan kovalen dengan dua atom hidrogen. Hidrogen dan oksigen mempunyai daya padu yang sangat besar antara keduanya. Kemampuan molekul air membentuk ikatan hidrogen menyebabkan air mempunyai sifat-sifat yang unik. Ikatan hidrogen air pada tekanan atmosfer bersifat mengalir (*flow*) pada suhu 0-100 °C, dan densitasnya 1 g/ml (Winarno, 2002).

2.4.2 Etanol

Etanol biasa disebut etil alkohol, hidroksietan atau alkohol diproduksi melalui fermentasi gula, karbohidrat dan pati, biasa digunakan sebagai pelarut, antiseptik, obat penenang, industri parfum dan obat-obatan. Etanol merupakan pelarut organik (Lewis, 1993 diacu dalam Ferdiansyah, 2006). Sifat-sifat etanol dapat dilihat pada Tabel 2.5.

Tabel 2.5. Sifat-sifat etanol

Nama lain	: Etanol, hidroksi etan, metil karbinol, ansol
Rumus bangun	: C_2H_5OH
Sifat	: Mudah menguap berbau khas, tidak beresidu
Berat molekul (BM)	: 46,7
Titik leleh	: -117,3 – 112%
Titik didih	: 78,4 °C
Berat jenis	: 0,789 g/ml
Kelarutan	: Dalam air, eter, kloroform, dan metil alkohol

Sumber: Schefflan dan Morris (1983)

Etanol merupakan senyawa alkohol dengan formula C_2H_5OH yang berbentuk cair, tidak berwarna, larut dalam air, eter, kloroform dan aseton. Dihasilkan dari peragian kanji, hidrolisis bromoetana dengan kalium hidroksida. Adanya gugus hidroksil (OH) pada alkohol memberikan sifat polar, sedangkan gugus alkil (R) merupakan gugus non polar. Proporsi dari kedua gugus tersebut merupakan faktor yang menentukan sifat alkohol (Kurniawan, 2006). Etanol tidak menyebabkan pembengkakan membran sel dan memperbaiki stabilitas bahan terlarut. Etanol 80% sangat efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal. Digunakan etanol bukan metanol karena antioksidan yang hendak diekstrak diharapkan dapat diaplikasikan pada produk makanan, minuman dan obat-obatan sehingga aman untuk dikonsumsi sedangkan metanol bersifat toksik (Voight, 1994). Etanol biasanya digunakan untuk mengekstraksi senyawa-senyawa aktif yang bersifat antioksidan dan antibakteri pada suatu bahan. Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa pelarut etanol lebih baik dari pada air, metanol maupun pelarut lain dalam mengekstraksi senyawa antioksidan maupun antibakteri (Hirasawa, 1999).

2.5 Total Polifenol

Polifenol adalah kelompok zat kimia yang ditemukan pada tumbuhan. Zat ini memiliki tanda khas yaitu memiliki banyak gugus phenol dalam molekulnya. Polifenol sering terdapat dalam bentuk glikosida polar dan mudah larut dalam pelarut polar (Hosttetman, 1985). Beberapa golongan bahan polimer penting dalam tumbuhan seperti lignin, melanin dan tanin adalah senyawa polifenol dan kadang-kadang satuan fenolitik dijumpai pada protein, alkaloid dan terpenoid (Harborne, 1987). Senyawa fenol sangat peka terhadap oksidasi enzim dan

mungkin hilang pada proses isolasi akibat kerja enzim fenolase yang terdapat dalam tumbuhan. Ekstraksi senyawa fenol tumbuhan dengan etanol mendidih biasanya mencegah terjadinya oksidasi enzim. Semua senyawa fenol berupa senyawa aromatik sehingga semuanya menunjukkan serapan kuat di daerah spektrum UV. Selain itu secara khas senyawa fenol menunjukkan geseran batokrom pada spektrumnya bila ditambahkan basa. Karena itu cara spektrometri penting terutama untuk identifikasi dan analisis kuantitatif senyawa fenol (Harborne, 1987).

Polifenol berperan dalam memberi warna pada suatu tumbuhan seperti warna daun saat musim gugur. Polifenol banyak ditemukan dalam buah-buahan, sayuran serta biji-bijian. Rata-rata manusia mengkonsumsi polifenol dalam sehari sampai 23 mg. Khasiat dari polifenol adalah menurunkan kadar gula darah dan melindungi terhadap berbagai penyakit seperti kanker. Polifenol membantu melawan pembentukan radikal bebas dalam tubuh sehingga dapat memperlambat penuaan dini (Arnelia, 2002).

2.6 Aktivitas Senyawa Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat digunakan untuk melindungi komponen biologi seperti lipida, protein, vitamin dan DNA melalui perlambatan kerusakan, ketengikan atau perubahan warna yang disebabkan oleh oksidasi (Suryanto, 2012). Senyawa Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donor*) yang bekerja dengan cara mendonorkan satu atau lebih senyawa elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan (radikal bebas), sehingga aktivitas oksidan tersebut dapat diredam (Winarsi, 2007).

Antioksidan dapat diperoleh dari 2 sumber yaitu antioksidan sintetis dan antioksidan alami (Gordon, 1994). Saat ini penggunaan antioksidan sintetis mulai dibatasi karena dari hasil penelitian yang dilakukan, antioksidan sintetis seperti BHT (Butylated Hydroxy Toluena), BHA (*Butylated hidroxy aniline*) dan TBHQ (*Ters-Butylhydroquinone*) dapat meracuni dan bersifat karsinogenik. Antioksidan alami selain dapat melindungi tubuh dari serangan radikal bebas, juga mampu memperlambat terjadinya penyakit kronik dan menghambat oksidasi lipid yang menyebabkan ketengikan dan kerusakan pada makanan (Halliwell dan Gutteridge,

199; Rohdiana, 2001). Oleh karena itu, industri makanan dan obat-obat mulai beralih pada sumber antioksidan alami (Takashi dan Takayumi, 1997). Antioksidan alami ini dapat diperoleh dari berbagai jenis tanaman karena mengandung senyawa kimia tertentu yang berpotensi sebagai antioksidan (Panjaitan *et al.*, 2014).

Fungsi utama antioksidan digunakan untuk memperkecil terjadinya proses oksidasi dari lemak dan minyak, memperkecil terjadinya proses kerusakan dalam makanan, memperpanjang masa pemakaian dalam industri makanan, meningkatkan stabilitas lemak yang terkandung dalam makanan serta mencegah hilangnya kualitas sensori dan nutrisi (Kuncahyo dan Sunardi, 2007).

2.7 Modus Aksi Antibakteri

Antibakteri digambarkan sebagai produk alami organik dengan berat molekul rendah dibentuk oleh mikroorganisme dan tumbuhan yang aktif melawan mikroorganisme lain pada konsentrasi rendah. Pengembangan aktivitas ini melalui jumlah terbatas dari mekanisme antibakteri yang dapat mempengaruhi sintesis dinding sel, integritas membran sel, sintesis protein, replikasi DNA dan *repair*, transkripsi, dan metabolit *intermediate* (Wax *et al.*, 2008).

Berdasarkan cara kerjanya, antibakteri dibedakan menjadi bakterisidal dan bakteriostatik. Bakteriostatik adalah zat yang bekerja menghambat pertumbuhan bakteri sedangkan bakterisidal adalah zat yang bekerja mematikan bakteri. Beberapa zat antibakteri bersifat bakteriostatik pada konsentrasi rendah dan bersifat bakterisidal pada konsentrasi tinggi (Chomnawang *et al.*, 2005). Mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antibakteri yaitu terganggunya pembentukan dinding sel, bereaksi dengan membran sel, menginaktivasi enzim, dan menginaktivasi fungsi material genetik.

Kemampuan suatu zat antibakteri tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu konsentrasi zat antibakteri, waktu penyimpanan, suhu lingkungan, sifat-sifat fisik, dan kimia makanan termasuk kadar air, pH, jenis, dan jumlah senyawa di dalamnya (Fardiaz, 1989). Mekanisme kerjanya secara umum adalah merusak dinding sel (seperti penisilin; sefalosporin; dan vankomisin), mengganggu permeabilitas sel (seperti penisilin, sefalosporin, vankomisin), dan

menghambat sintesis protein dan asam nukleat (seperti kloramfenikol; rifampisin; dan asam) (Fardiaz *et al.*, 1987).

Mekanisme penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri dapat berupa merusak dinding sel dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk, perubahan permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan keluarnya bahan makanan dari dalam sel, perubahan molekul protein dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim, dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein. Di bidang farmasi, bahan antibakteri dikenal dengan nama antibiotik, yaitu suatu substansi kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain. Senyawa antibakteri dapat bekerja sebagai bakteristatik, bakterisidal, dan bakterilitik (Pelczar dan Chan 1986). Uji aktivitas antibakteri dilakukan pada bakteri gram positif dan gram negatif.

Bacillus subtilis merupakan bakteri gram positif yang termasuk kelompok bakteri famili *Bacillaceae* yang hidup di dalam saluran pencernaan manusia dan bersifat patogen (Stein, 2005). Bakteri *B. subtilis* juga terdapat pada hidung, mulut, tenggorokan, pori-pori, permukaan kulit, kelenjar keringat dan saluran usus. Infeksi *B. subtilis* dapat berupa jerawat, bisul dan luka (Jawetz *et al.*, 2001).

Escherichia coli adalah bakteri gram negatif yang termasuk kelompok dari famili *Enterobacteriaceae* yang normal terdapat di saluran pencernaan hewan dan manusia. Beberapa strain *E.coli* bersifat patogen penyebab infeksi, antara lain infeksi saluran pencernaan, infeksi saluran kemih, dan meningitis (Todar, 2004). Bakteri *E. coli* merupakan bakteri yang relatif sensitif terhadap panas, sehingga akan mati atau inaktif pada suhu pasteurisasi atau selama proses pemanasan (Maloha, 2002).

Escherichia coli ini dapat menyebabkan diare pada manusia atau disebut Entropatogenik *E. coli* (EEG). Infeksi dari EEG dapat menyebabkan penyakit seperti kolera dan disentri pada anak-anak dan orang dewasa (Nuraeni *et al.*, 2000). Berdasarkan penelitian dari Bakht *et al.*, (2012) bahwa daun *Nicotiana tabacum* yang diekstrak menggunakan etil asetat, butanol dan air dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.

Metode yang digunakan pada pengujian ini yaitu metode dilusi agar dengan penentuan IC_{50} (*Inhibitor Concentration*) dan nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimal). Metode KHM ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara optimal yang lebih dari 90%, sedangkan IC_{50} dilakukan untuk mengetahui kemampuan menghambat 50% pertumbuhan bakteri.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan Hasil Pertanian dan Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Waktu Penelitian dimulai pada bulan Maret 2019 - September 2019.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat utama yang digunakan pada Penelitian ini yaitu, *shaker waterbath* (Memmert D-91126, Jerman), *rotary evaporator* (Butchi, Jerman), blender (Miyako, Indonesia), dan neraca analitik (Ohaus, USA). Bahan untuk analisis yang digunakan yaitu spektrofotometer (Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS, China), Pipet mikro (Biohit 12636255, Jerman), inkubator (Haraeus Inst B6200, Jerman), *colony counter* (Stuart Scientific), autoklaf (Hirayama HL 36, Jepang) dan cawan petri plastik.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan yaitu tembakau na-oosgt afkir yang diperoleh dari perkebunan tembakau PTPN X kebun Ajung, Kabupaten Jember. Bahan yang digunakan untuk ekstraksi daun tembakau yaitu etanol 80% dan aquades. Bahan untuk analisis yang digunakan adalah etanol *pro analysis*, DPPH (*1,1 diphenyl-1-1-2-Picrylhidrazil*), aquades, DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*), larutan garam fisiologis 0,85%, reagen *Follin-Ciocalteau*, dan Na_2CO_3 . Bahan yang digunakan untuk media diantaranya yaitu media NA (Nutrien Agar). Bakteri uji yang digunakan yaitu kultur murni bakteri *B. subtilis* dan *E. coli* yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

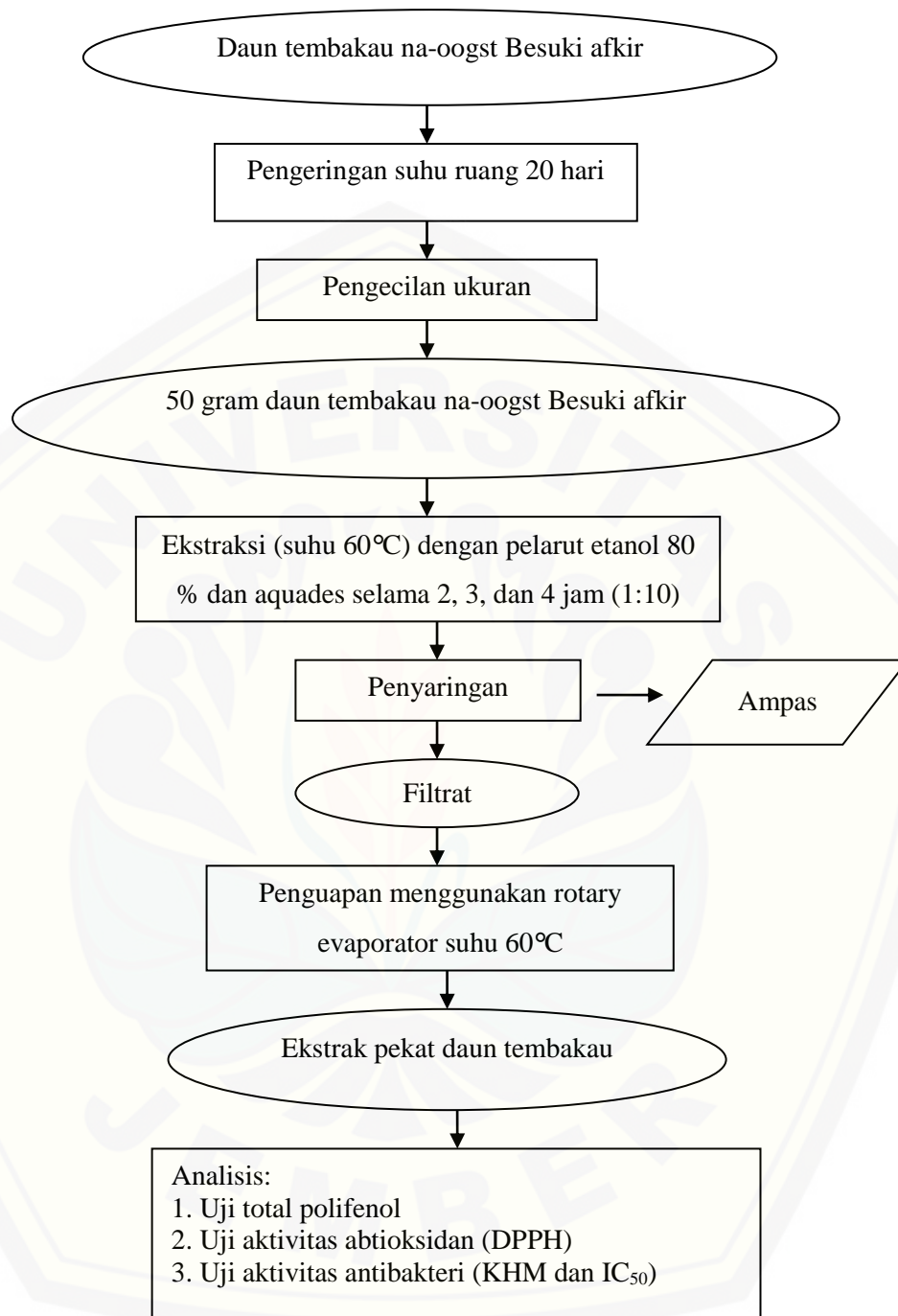
3.3 Tahapan Penelitian

3.3.1 Rancangan Percobaan

Rancangan penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan dua faktor dengan menggunakan perbedaan lama waktu ekstraksi yaitu 2 jam (P1), 3 jam (P2) dan 4 jam (P3) dengan dua jenis pelarut (etanol dan aquades) untuk mengetahui jumlah total polifenol dan aktivitas antioksidan.

3.3.2 Tahap Penelitian

Pada penelitian ini diawali dengan daun tembakau *na-oosgt* afkir dilakukan pengeringan pada suhu ruang selama 20 hari. Daun tembakau yang sudah kering kemudian dikecilkan ukurannya dengan menggunakan blander. Selanjutnya daun tembakau yang telah halus ditimbang sebanyak 50 gram, lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer ukuran 500 ml dan ditambahkan etanol 80% sebanyak 500 ml atau rasio 1:10 (b/v). Proses selanjutnya, dilakukan pengestrakkan menggunakan *shaker waterbath* dengan perbedaan lama waktu ekstraksi yaitu 2, 3, dan 4 jam menggunakan suhu 60°C. Kemudian dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring dan kain saring, penyaringan ini bertujuan untuk memisahkan rafinat dengan filtrat, karena fitrat (cairan jernih) akan di evaporasi. Setelah itu, fitrat yang diperoleh kemudian di *rotary evaporator* dengan suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak pekat. Kemudian ekstrak pekat yang didapat dilakukan pengujian polifenol dan aktivitas antioksidannya, lalu hasil pengujian terbaik akan diuji lebih lanjut aktivitas antibakterinya terhadap *B. subtilis* dan *E. coli*. Diagram alir pembuatan ekstrak daun tembakau dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Diagram alir pembuatan ekstrak daun tembakau

3.3.3 Prosedur Pengamatan

1. Uji Polifenol

Analisis uji total polifenol pada penelitian ini menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* (Singelton dan Rossi dalam Othmanet. *at. a.l*, 2005). Pembuatan kurva standar untuk perhitungan polifenol dibuat dengan cara menggunakan larutan asam galat dalam metanol (5,4 mg/5 ml), kemudian asam galat yang sudah dicampur dengan metanol tersebut *distirrer* selama 5-10 menit dan setelah itu ditera sampai 10 ml. Asam galat dibuat dengan berbagai konsensentrasi yaitu (0; 0,25; 50; 75; 100; 125; 150; 175 dan 200 μ l) dan dimasukkan ke dalam 9 tabung reaksi berbeda dan ditambahkan 5 ml aquades. Tabung reaksi tersebut lalu ditambahkan 0,8 ml reagen *Folin-Ciocalteu* 10%. Selanjutnya tabung reaksi di vortex dan didiamkan selama 5 menit, setelah itu ditambahkan 0,8 ml larutan Na₂CO₃ 7%. Tabung reaksi yang berisi larutan kurva standar kemudian ditutup menggunakan alumunium foil dan didiamkan ditempat gelap selama 60 menit, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 765 nm.

Preparasi ekstrak daun tembakau untuk pengujian total polifenol dilakukan pengenceran terlebih dahulu. Dilakukan pengambilan 0,2 ml ekstrak ditambahkan 0,8 ml reagen *Folin-Ciocalteu* 10%, kemudian dilakukan pengadukan dan dilakukan pendiaman selama 5 menit. Setelah itu, dilakukan penambahan 0,8 ml larutan Na₂CO₃ 7% kemudian dilakukan pengadukan, tabung reaksi yang sudah di dilakukan pengadukan ditutup dengan menggunakan alumunium foil. Selanjutnya dilakukan pendiaman selama 60 menit ditempat gelap. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 765 nm. Kandungan polifenol sampel dihitung berdasarkan kurva standart polifenol yang diperoleh. Nilai absorbansi (y) dimasukkan pada persamaan kurva standart asam galat. Diperoleh nilai (x), kemudian hasil perhitungan dibagi berat sampel yang digunakan untuk analisa.

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

2. Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan pada penelitian ini menggunakan metode serapan radikal DPPH (*1,1-diphenyl-1-2-Picrylhidroksil*) (Prakash, *et al.*, 2011). Mula-mula persiapan bahan uji ini dilakukan dengan cara ekstrak daun tembakau sebanyak 0,1 ml diencerkan dengan 0,9 ml aquades. Tahap selanjutnya yaitu pembuatan larutan pereaksi yang diawali dengan penimbangan serbuk DPPH sebanyak 0,01576 gram, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 25 ml dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas, sehingga akan didapatkan larutan DPPH dengan konsentrasi 0,4 mM. Tahap pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara sebanyak 0,1 ml ekstrak daun tembakau yang telah diencerkan dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 ml DPPH 0,4 mM dan 3,9 ml etanol. Selanjutnya divortex dan didiamkan selama 30 menit dengan ditutup menggunakan alummunium foil dan ditempatkan pada tempat gelap, setelah didiamkan selama 30 menit kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Blanko dibuat dengan cara mengganti sampel dengan aquades. Aktivitas antioksidan dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

3. Uji Aktivitas Antibakteri Metode KHM

Pengujian antibakteri ekstrak daun tembakau terhadap *B. subtilis* dan *E. coli* dilakukan menggunakan penentuan respon penghambatan (KHM) dengan metode dilusi agar dan penentuan nilai IC₅₀ (*Inhibition Concentration*) dengan menghitung jumlah koloni. KHM merupakan konsentrasi terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara optimal (lebih dari 90%) (Ratna *et al.*, 2016).

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat yang akan digunakan seperti cawan petri, tabung reaksi, dan pipet harus melalui proses sterilisasi terlebih dahulu. Berbagai alat tersebut disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C (Deby, 2012). Namun, untuk jarum ose yang akan digunakan dibakar terlebih dahulu dengan bunsen hingga

pijar, kemudian setelah mendingin dapat digunakan. Hal tersebut dilakukan untuk memperkecil kemungkinan adanya kontaminasi bakteri dari berbagai alat.

b. Pembuatan Larutan Uji

Mula-mula yakni membuat larutan stok dengan konsentrasi 20%, dengan cara mengambil ekstrak pekat daun tembakau sebanyak 2 ml lalu dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml dan tambahkan aquades steril hingga tanda batas. Larutan stok yang telah dibuat kemudian diambil secara berurutan sebanyak 0, 30, 60, 120, 240, dan 480 μ l.

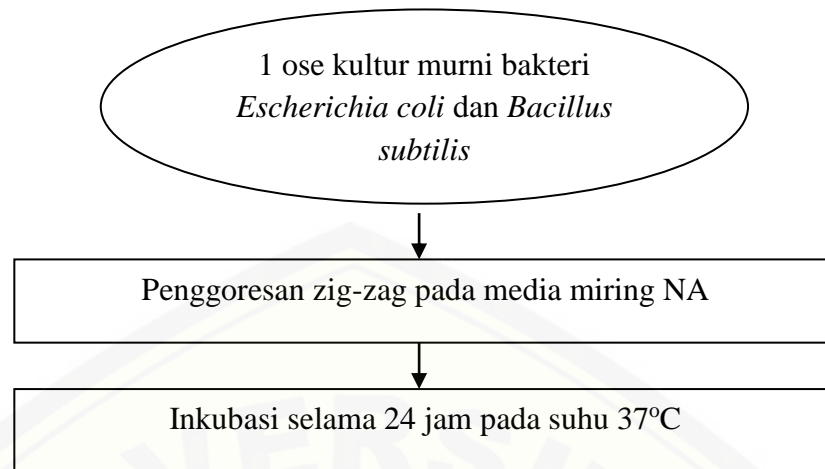
c. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Media NA bubuk sebanyak 4 gram dilarutkan menggunakan 200 ml aquadest dalam *beaker glass* 250 ml. Media tersebut dipanaskan menggunakan *magnetik stirer* untuk mempercepat larutnya bubuk NA. Kemudian larutan media dilakukan sterilisasi dalam autoklaf dalam kurun waktu 15 menit pada suhu 121°C. Untuk mencegah memadatnya media saat penyimpanan, media NA disimpan dalam oven pada suhu 50°C (Jauhar, 2010).

Media NA miring dapat dibuat dengan cara mengambil stok larutan NA yang belum disterilisasi kemudian dituang kedalam tabung reaksi masing-masing 5 ml. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Tabung reaksi berisi larutan NA yang telah steril diposisikan pada sudut kemiringan 15° dan biarkan media memadat (Rustanti, 2007).

d. Peremajaan bakteri uji

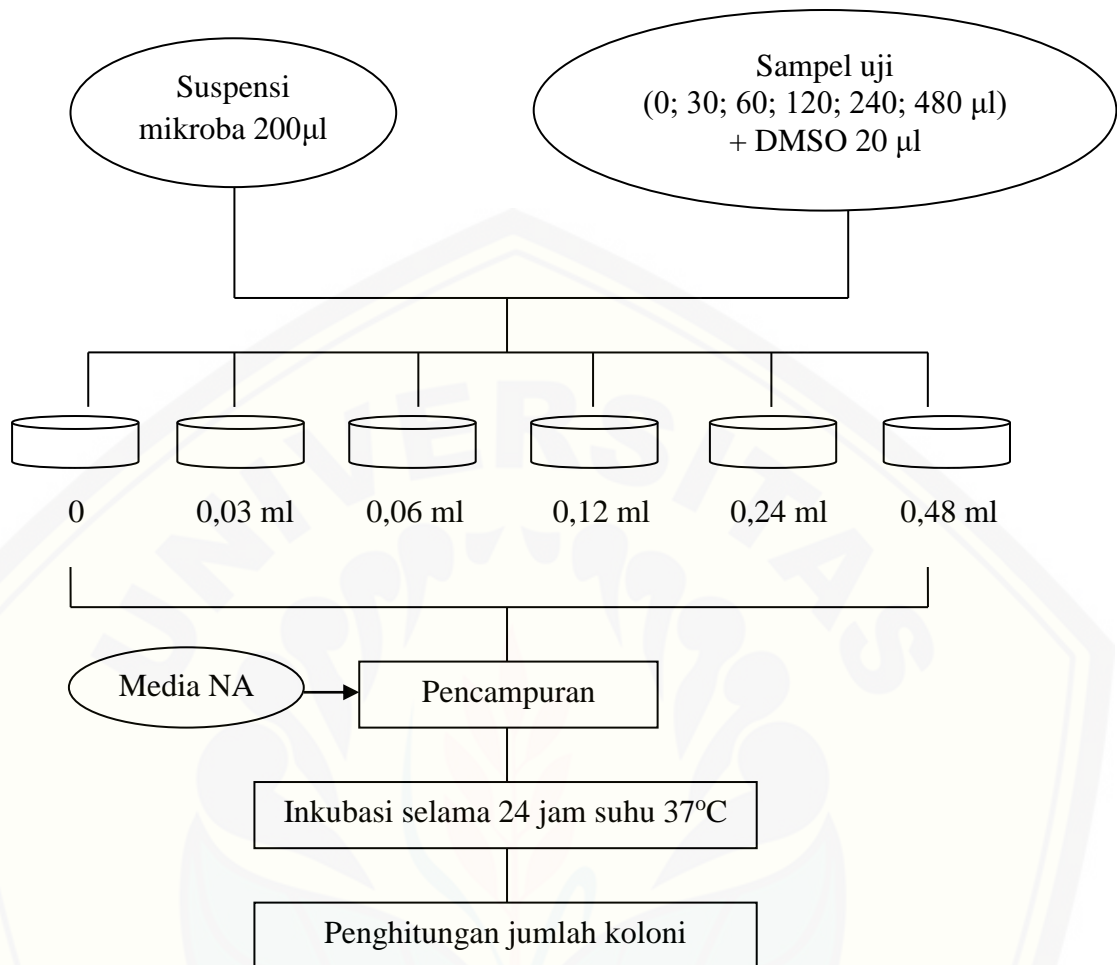
Mikroba murni yang akan digunakan perlu dilakukan peremajaan, hal tersebut guna mendapatkan kualitas mikroba yang baik (Jauhari, 2010). Bakteri tersebut diinokulasikan kedalam media NA miring sebanyak satu ose dan dilanjutkan dengan proses inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Peremajaan bakteri uji harus dilakukan dalam *laminar air flow* untuk meminimalisir adanya kontaminasi dengan mikroba yang tidak diharapkan. Berikut merupakan diagram alir preparasi isolat bakteri dapat dilihat pada Gambar 3.2



Gambar 3.2. Diagram alir preparasi isolat bakteri

e. Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri daun tembakau dilakukan untuk menentukan KHM dan nilai IC_{50} pada bakteri *B. subtilis* dan *E. coli* menggunakan metode dilusi agar. Mula-mula siapkan sebanyak 200 μ l suspensi bakteri yang telah dibuat pengenceran hingga 10^{-6} dan larutan uji dengan berbagai konsentrasi (0, 30, 60, 120, 240, dan 480 μ l) dimasukkan kedalam cawan petri lalu ditambahkan media NA yang masih hangat (cair) berurut-urut ke masing-masing cawan petri sebanyak 4,780; 4.750,; 4,720; 4,660; 4,540; dan 4,300 ml, kemudian diratakan dan diamkan hingga memadat lalu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah koloni pada cawan petri menggunakan *colony counter*. Diagram alir penentuan respon penghambat (KHM) dan IC_{50} dapat lihat pada Gambar 3.3



Gambar 3.3. Diagram alir penentuan respon penghambat (KHM) dan IC_{50}

3.4 Analisis Data

Data hasil penelitian diolah menggunakan aplikasi *Microsoft excel*. Kemudian data dianalisis secara deskriptif, serta data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Total polifenol ekstrak daun tembakau na-oogst dengan pelarut etanol dan lama ekstraksi 4 jam sebesar 18,19 mg GAE/g, sedangkan yang pelarut aquadest sebesar 12,95 mg GAE/g dari berat 50 gram tembakau yang telah di ekstrak.
2. Aktivitas antioksidan tertinggi dihasilkan dari ekstrak daun tembakau na-oogst pelarut etanol dan waktu ekstraksi selama 4 jam (55,31 %) dibandingkan pelarut aquades (31,12 %).
3. Ekstrak daun tembakau na-oogst pelarut etanol memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* dengan nilai KHM diperoleh sebesar 0,406 mg/ml dan nilai IC₅₀ sebesar 0,098 mg/ml. Pada bakteri *B. subtilis* diperoleh nilai KHM diperoleh sebesar 0,337 mg/ml dan nilai IC₅₀ sebesar 0,089 mg/ml, sedangkan ekstrak daun tembakau dengan pelarut aquades terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* diperoleh nilai KHM sebesar 0,982 mg/ml dan nilai IC₅₀ sebesar 0,135 mg/ml. Pada bakteri *B. subtilis* diperoleh nilai KHM diperoleh sebesar 0,657 mg/ml dan nilai IC₅₀ sebesar 0,276 mg/ml.

5.2 Saran

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan mengenai uji in vivo ekstraksi daun tembakau terhadap pertumbuhan bakteri *Eschericia coli* dan *Bacillus subtilis*. Ekstrak pekat yang didapat perlu dilakukan penelitian dalam hal pengaplikasian ekstrak tersebut pada produk pangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Agung, Kurniawan. 2005. *Transformasi Pelayanan Publik*. Yogyakarta: Pembaharuan.
- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas *Salmonella Typhimurium* Terhadap Ekstrak Daun Psidium GuajavaL. *Journal Bioscientie*. 1(1): 31 – 8.
- Arnelia. 2002. *Fito-Kimia Komponen Ajaib Cegah PJK, DM, dan Kanker* <http://Puslitbangbogor.go.id/> 22 Agustus 2006.
- Aziz, T., S. Febrizky, dan A. D. Mario. 2014. *Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Persen Yield Alkaloid Dari Daun Salam India (Murraya Koenigii)*. Palembang: Universitas Sriwijaya.
- Badan Pusat Statistik Kabupaten Jember. 2017. *Kabupaten Jember Dalam Angka 2017*. Jember: BPS Kabupaten Jember.
- Bakht, J., Azrea., dan M. Shafi. 2012. Antimicrobial Activity of Nicotina Tabacum Using Different Solvent Extract. *Pak. J. Bot.* 44(1): 459-463.
- Bangham AD, Horne RW. 2006. Action of Saponins on Biological Cell Membranes. *Journal Nature*. 196:952-953.
- Brotodiharjo, R, Santoso (1991). *Pengantar Ilmu Hukum Pajak*. Bandung : PT Eresco.
- Cahyono B. 1998. *Tembakau, Budidaya dan Analisis Tani*. Yogyakarta: Kanisius.
- Carlo, G., N. Mascolo, A.A. Izzo, dan Capasso. 1999. Flavonoids: Old and New Aspects of a Class of Natural Therapeutic Drugs. *Jurnal Life Science*. 65(4): 337 – 53.
- Chomnawang MT, Surassno S, Nukoolkarn VS, and Gristanapan W. 2005. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acneinducing bacteria. *Jethnopharmacol* 101: 330-333.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cetakan Pertama. Jakarta: Depeks RI.
- Dewanti, S., Wahyudi, M.T., 2011, Antibacteri Activity of Bay Leaf Infuse (*Folia Syzygium polyanthum WIGHT*) to *Escherichia coli* IN VITRO, *J. Med Planta*, 1 (4): 78-81.
- Dewi, Z. Y, Nur, A, dan Hertriani, T. Efek Antibakteri Dan Penghambatan Biofilm Ekstrak Sereh (*Cymbopogon nardus L.*) Terhadap Bakteri *Streptooccus mutans*. *Maj Ked Gi Ind. Desember 2015; 1(2): 136-141p- ISSN 2460-0164e-ISSN 2442-2576*.

- Direktorat Jendral Perkebunan. 2016. *Statistik Perkebunan Indonesia 2015-1017 TEMBAKAU*. Jakarta : Sekretariat Direktorat Jenderal Perkebunan Kementerian Pertanian.
- Djajadi, D. 2015. Tobacco Diversity in Indonesia : A review. *Journal of Biological Researches*, 20(27–32), 20–27. Retrieved from <http://berkalahayati.org/files/journals/1/articles/851/submission/851-2416-1-SM.pdf>
- Fathiazad, F., Delazar, A., Amiri, R., dan Sarker, S. D. 2005. Extraction of Flavonoids and Quantification of Rutin from waste Tobacco Leaves. *IJPR*, 3: 222-227.
- Guenther, E. 2006. *Minyak Atsiri*. UI-Press. Jilid 1. Jakarta.
- Gunawan. 2008. Antibakteri pada Herba Meniran (*Phylanthus niruri Linn*). *Jurnal Kimia*. 2(22): 31 – 39.
- Halliwell, B., dan J. M. C. Gutteridge. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3th Ed. New York: Oxford University Press, Inc.
- Harborne, J. B. 1987. *Metoda Fitokimia Penuntun Cara Menganalisa Tumbuhan*. Edisi II. 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 SepuluhNopember.
- Heath, J.B dan Reinessius, G. 1987. *Flavor Chemistry and Technology*. Van Nostrand Reinhold Co. New York.
- Hirasawa M. 1999. The Kinds of Antibacterial Substances from *Lentinus adobes* Singshitake an Edible Mushroom. *International Journal of Antibacterial Agents* 11, 1561-157.
- Hostettmann, K. 1985. *Cara Kromatografi Preparatif : Penggunaan pada Isolasi Senyawa Alam*. Penerjemah: Padmawinata, K. Bandung: Penerbit ITB.
- Huang D., B. Ou, R. L. Prior. 2005. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agricultural and Food*. 53: 1841 – 1856.
- Illing, I., W. Safitri, dan Erfina. 2017. Uji Fitokimia Ekstrak Buah Dengan. *Jurnal Dinamika*. 8(1): 66 – 84.
- Jawetz, Fortas., dan Lay. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Surabaya: Salemba Medical.
- Juliantina, F. R., D. A. Citra, B. Nirwani, T. Nurmasitoh, dan E. T. Bowo. 2009. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Agen Antibakteri Terhadap

- Gram Positif dan Gram Negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*. 1(1): 12 – 20.
- 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.
- Khadambi. 2007. *Extraction of Phenolic Compounds and Quantification of The Total Phenol and Condensed Tannin Content of Bran Fraction of Condensed Tannin and Condensed Tannin Free Sorghum Varieties*. <http://upetd.up.ac.za/thesis/available/etd-03022007-164705/unrestricted/02chapter2.pdf>. [26 April 2007].
- Kusumawardhani, I Gusti A.K. 2014. Perhitungan Dana Pensiun dengan Metode *Projected Unit Credit* dan *Individual Level Premium*. *E-Jurnal Matematika*, Vol.3, No.2, Halaman 64-74.
- Maloha, M. 2002. Pemeriksaan Angka Kuman *Bacillus cereus* dengan Usap Alat pada Restoran, Rumah Makan, dan Lokalisasi Makanan Jajanan di Kota Jambi Tahun 2001. *Skripsi*. Medan: FKM USU.
- Markham KR, 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid* (Terjemahan), Penerbit ITB, Bandung.
- Naiborhu, P. E. 2002. Ekstraksi dan Manfaat Ekstrak Mangrove (*Sonneratia alba* dan *Sonneratia caseolaris*) Sebagai Bahan Alami Antibakterial pada Patogen Udang Windu, *Vibrio harveyi*. *Tesis*. Bogor: Sekolah Pascasarjana IPB.
- Ncube, N.S., A. J. Afolayan, dan A. I. Okoh. 2008. Assessment Techniques of Antimicrobial Properties of Natural Compounds of Plant Origin: Current Methods And Future Trends. *African Journal of Biotechnology*. 7(2): 1797 – 1806.
- Neswati dan Ismanto, S.D., 2018. Ekstraksi Komponen Bioaktif Serbuk Kayu Secang (*Caesalpinia sappan, L*) Dengan Metode Ultrasonikasi. *Jurnal Teknologi Pertanian Andalas*. Vol. 22, No.2.
- Nuraeni, K., Y. Wibisono, dan Idrial. 2002. *Mikrobiologi Pangan dan Pengolahan*. Jember: Politeknik Pertanian Negeri Jember.
- Nurhayati, N, M. Maryanto., R. Tarikhah. 2016. Ekstraksi Pektin Dari Kulit dan Tandan Pisang Dengan Variasi Suhu dan Metode. *Jurnal Agritech*. Vol 36:3
- Othman, A., Ismail, A., Ghani, N., and I. Adenan. 2007. Antioxidant capacity and Phenolic Content Of Cocoa Beans. *Food Chemistry* 100 (2007) : 1523-1530.
- Patil, R. S., B.A. Desai, dan S.A. Wagh. 2015. Comparative Study of Antimicrobial Compounds Extracted From Leaves of *Nicotiana Tabacum*

- and Cigarette. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(3): 1511 – 1518.
- Pelczar MJ dan Chan ECS. 1998. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Pr.
- Peng, L. Y., S. X. Mei, B. Jiang, H. Zhou, dan H.D. Sun. 2000. Constituents from *Lonicera japonica*. *Fitoterapia*. 71: 713–715.
- Podlejski J, Olejniczak W. 1983. methods and techniques in research of tobacco flavour. *Nahrung* 27. 5:429-436.
- Poeloengan, M., M. M. Andriani, I. Susan, M. Komala, dan M. Hasnita. 2007. Uji Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Batang Bungur (*Largerstoremia speciosa* Pers) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Secara in Vitro. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Bogor: Balai Besar Penelitian Veteriner.
- Pokorni,. *Antioxidant in Foods Practical Applications*. CRC Press: New York. 2001.
- Prakash, A., Rigelhof, F. & Miller, E., 2011. *Antioksidant Activity*. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 15(4), pp. 376-378. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21621684>.
- Pratama, A. L. Y., Soetrisno, S., & Januar, J. 2018. The Farm Risk Management Of Besuki Na-Oogst Tobacco In Tanjungrejo Village, Jember Regency. *Agricultural Social Economic Journal*, 18(1), 13–22. <https://doi.org/10.21776/ub.agrise.2018.018.1.3>
- Pratiwi, S. T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- PTPN II. 2012. *Tembakau Deli Terbaik*. Medan: Sumatera Utara.
- Putri, R. H., Barid, I., dan Kusumawardani, B. 2014. Daya Hambat Ekstrak Daun Tembakau Terhadap Pertumbuhan Mikroba Rongga Mulut. *Stomatogonic (J. K. G Unej)* Vol. 11 No. 2 2014: 27-31
- Putri. Suzery, M. Cahyono, B. 2010. Total Fenol dan Flaonoid Daei Ekstrak dan Fraksi Daun Kumis Kucing (*Orthosiphon stamineus* B.) Jawa Tengah Serta Aktivitas Antioksidannya. *Jurnal Sains & Matematika (JSM)*. Vol 18
- Qoriah, C. G., & Meliczek, H. 2006. Supply Response and Competitiveness of Na-Oogst Tobacco Production Analysis in Jember Regency-Indonesia. In *Tropentag "Prosperity and Poverty in a Globalised World—Challenges for Agricultural Research"* (p. 356). University of Bonn. Retrieved from <http://www.tropentag.de/2006/proceedings/proceedings.pdf>
- Redha, A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya Dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian* , 9, 196-202.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi VI. diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata: ITB press. Bandung. Hal 57, 73, 199.

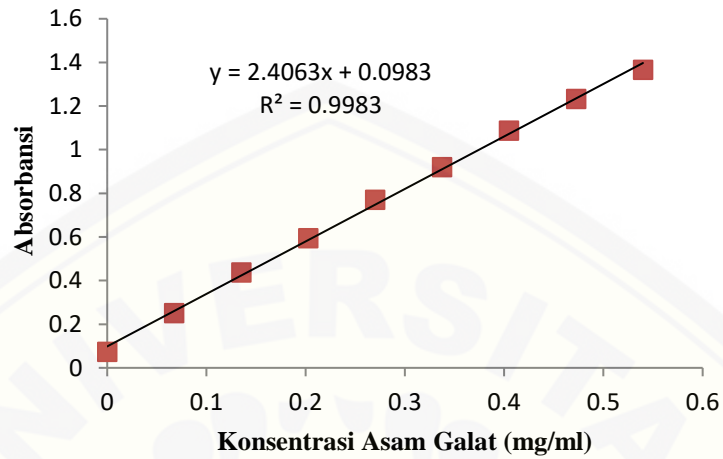
- Sa'dah, L. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Tanin dari Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim.
- Sabir, Ardo. 2005. *Aktivitas Antibakteri Flavonoid Propolis Trigona sp Terhadap Bakteri Streptococcus mutans (in vitro)*. *Maj. Ked. Gigi. (Dent. J.)*. 38(3): 135 – 141.
- Samiullah & Bano, A., 2011, In Vitro Inhibition Potential of Four Chenopod Halophytes Against Microbial Growth, *Pak. J. Bot.*, 43, 123-127.
- Schefflan L., Morris B.J. 1983. *The Handbook of Solvent*. New York: D. Van Nostrand Comp. Inc.
- Shekins, O. O., E. U. Dorathy, M. L. Labaran, dan P. Joel. 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.
- Soesanto, L. 2008 . *Pengantar Pengendalian dan Hayati Penyakit Tanaman*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* Antibiotics: Structures, Syntheses And Specific Function. *Molecular Microbiology*. 56(4): 845 – 857.
- Sudarmadji. S., Haryono, B., Suhardi. 2007. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty Yogyakarta. Yogyakarta.
- Sukaria, Sinulingga. 2011. *Metode Penelitian*. Sumatra Utara : USU Press.
- Syamsuhidayat dan Hutapea, J.R., 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, 305-306, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan :Jakarta.
- Syamsunihar A, R Soedradjad, Usmadi. 2007. *Karakterisasi Asosiasi Bakteri Fotosintetik Synechococcus sp. dengan tanaman Kedelai (Glycine max L. Merrill)*. Laporan Kemajuan Penelitian. Lembaga Penelitian Universitas Jember. Jember.
- Vermerris, W., Nicholson, R. 2006. Phenolic Compound Biochemistry. *USA: Springer. Nueva york, EEUU*. pp. 316, 151153.
- Voigt, R., 1995, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, Diterjemahkan oleh Soendani N. S., UGM Press, Yogyakarta.
- Wax, G.R., K. Lewis, A.A. Salyer dan Taber, H. 2008. *Bacterial Resistance To Antimicrobials Second Edition*. New York: CRC Press.
- Winarno, FG. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia. Jakarta.
- Yanti, N., Samingan., dan Mudatsir. 2016. Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Gal Manjakani (*Quercus Infectoria*) Terhadap *Candida albicans*. *Jurnal*

ilmia Mahasiswa Pendidikan Biologi, Volume 1, Issue 1, Agustus 2016. hl 1-9.



Lampiran 4.1. Perhitungan total polifenol ekstrak daun tembakau

Kurva standart Asam Galat



Asam Galat (mg/ml)	Absorbansi
0	0,074
0,067	0251
0,135	0,437
0,202	0,594
0,270	0,771
0,337	0,920
0,405	1,087
0,472	1,232
0,540	1,367

Uji Polifenol Na-Ogst (Etanol waktu 2 jam) $Y = 2,406X$

Pengenceran (kali)	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Rerata	SD
150	U1	0,580	0,53914	80,8716	81,0216		0,4702
		0,582	0,54114	81,1716			
	U2	0,519	0,47814	71,7216	71,9466	77,1966	
		0,522	0,48114	72,1716			
	U3	0,564	0,52314	78,4716	78,6216		
		0,566	0,52514	78,7716			
200	U1	0,443	0,40214	80,4288	80,4288		1,1364
		0,443	0,40214	80,4288			
	U2	0,449	0,40814	81,6288	81,7288	87,6288	
		0,450	0,40914	81,8288			
	U3	0,546	0,50514	101,0288	100,7288		
		0,543	0,50214	100,4288			
300	U1	0,331	0,29014	87,0431	86,7431		0,2357
		0,329	0,28814	86,4431			
	U2	0,342	0,30114	90,3431	90,4931	89,4431	
		0,343	0,30214	90,6431			
	U3	0,345	0,30414	91,2431	91,0931		
		0,344	0,30314	90,9431			

Uji Polifenol Na-Ogst (Aquadest) waktu 2 jam $Y = 2,406X$							
Pengenceran (kali)	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Rerata	SD
150	U1	0,383	0,34215	51,3223	51,4723		3,3850
		0,385	0,34415	51,6223			
	U2	0,429	0,38815	58,2223	58,2223	54,9973	
		0,429	0,38815	58,2223			
	U3	0,409	0,36815	55,2223	55,2973		
		0,41	0,36915	55,3723			
200	U1	0,341	0,30015	60,0298	60,0298		2,4214
		0,341	0,30015	60,0298			
	U2	0,363	0,32215	64,4298	64,5298	61,7631	
		0,364	0,32315	64,6298			
	U3	0,345	0,30415	60,8298	60,7298		
		0,344	0,30315	60,6298			
300	U1	0,255	0,21415	64,2447	64,3947		0,6538
		0,256	0,21515	64,5447			
	U2	0,257	0,21615	64,8447	65,4447	64,6947	
		0,261	0,22015	66,0447			
	U3	0,254	0,21315	63,9447	64,2447		
		0,256	0,21515	64,5447			

Uji Polifenol Na-Ogst (Etanol Waktu 3 jam) $Y = 2,406 X$							
Pengenceran (kali)	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Rerata	SD
150	U1	0,561	0,52014	78,0216	78,0966		1,5315
		0,562	0,52114	78,1716			
	U2	0,516	0,47514	71,2716	71,3466	66,0966	
		0,517	0,47614	71,4216			
	U3	0,366	0,32514	48,7716	48,8466		
		0,367	0,32614	48,9216			
200	U1	0,460	0,41914	83,8288	83,8288		1,8265
		0,460	0,41914	83,8288			
	U2	0,447	0,40614	81,2288	81,1288	71,9621	
		0,446	0,40514	81,0288			
	U3	0,296	0,25514	51,0288	50,9288		
		0,295	0,25414	50,8288			
300	U1	0,354	0,31314	93,9431	93,4931		0,1085
		0,351	0,31014	93,0431			
	U2	0,350	0,30914	92,7431	91,5431	92,7931	
		0,342	0,30114	90,3431			
	U3	0,354	0,31314	93,9431	93,3431		
		0,350	0,30914	92,7431			

Uji Polifenol Na-Ogst (Aquadest) Waktu 3 jam $Y = 2,406 X$							
Pengenceran	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Rerata	SD
150	U1	0,446	0,40514	60,7716	59,6466		2,2537
		0,431	0,39014	58,5216			
	U2	0,467	0,42614	63,9216	64,1466	61,8216	
		0,470	0,42914	64,3716			
	U3	0,454	0,41314	61,9716	61,6716		
		0,450	0,40914	61,3716			
200	U1	0,368	0,32714	65,4288	65,3288		0,6429
		0,367	0,32614	65,2288			
	U2	0,363	0,32214	64,4288	64,1288	64,8621	
		0,360	0,31914	63,8288			
	U3	0,367	0,32614	65,2288	65,1288		
		0,366	0,32514	65,0288			
300	U1	0,268	0,22714	68,1431	67,9931		0,9644
		0,267	0,22614	67,8431			
	U2	0,263	0,22214	66,6431	66,1931	67,2931	
		0,260	0,21914	65,7431			
	U3	0,267	0,22614	67,8431	67,6931		
		0,266	0,22514	67,5431			

Uji Polifenol Na-Ogst (Etanol Waktu 4 jam) $Y = 2,406X$							
Pengenceran (kali)	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Rerata	SD
150	U1	0,520	0,47914	71,8716	72,0216		3,0413
		0,522	0,48114	72,1716			
	U2	0,539	0,49814	74,7216	74,7966	74,9716	
		0,540	0,49914	74,8716			
	U3	0,560	0,51914	77,8716	78,0966		
		0,563	0,52214	78,3216			
200	U1	0,377	0,33614	67,2288	67,4288		11,3694
		0,379	0,33814	67,6288			
	U2	0,428	0,38714	77,4288	77,6288	78,3954	
		0,430	0,38914	77,8288			
	U3	0,491	0,45014	90,0288	90,1288		
		0,492	0,45114	90,2288			
300	U1	0,353	0,31214	93,6431	93,1931		3,2276
		0,350	0,30914	92,7431			
	U2	0,362	0,32114	96,3431	96,6431	96,4931	
		0,364	0,32314	96,9431			
	U3	0,372	0,33114	99,3431	99,6431		
		0,374	0,33314	99,9431			

Uji Polifenol Na-Ogst (Aquadest) Waktu 4 jam $Y = 2,406 X$							
Pengenceran	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Rerata	SD
150	U1	0,359	0,31814	47,7216	47,7966		7,459013
		0,360	0,31914	47,8716			
	U2	0,455	0,41414	62,1216	62,1966	56,1216	
		0,456	0,41514	62,2716			
	U3	0,429	0,38814	58,2216	58,3716		
		0,431	0,39014	58,5216			
200	U1	0,308	0,26714	53,4288	53,5288		8,778952
		0,309	0,26814	53,6288			
	U2	0,393	0,35214	70,4288	70,6288	60,9288	
		0,395	0,35414	70,8288			
	U3	0,333	0,29214	58,4288	58,6288		
		0,335	0,29414	58,8288			
300	U1	0,274	0,23314	69,9431	70,2431		4,950758
		0,276	0,23514	70,5431			
	U2	0,286	0,24514	73,5431	72,9431	74,3431	
		0,282	0,24114	72,3431			
	U3	0,309	0,26814	80,4431	79,8431		
		0,305	0,26414	79,2431			

Total Polifenol Ekstrak Daun Tembakau *Na-Oogst* (Etanol) 4jam

Uji Polifenol Na-Ogst Etanol

$$y=2,4063x + 0,0983$$

Perlakuan	Pengenceran (x)	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Rerata	SD
Waktu 2 jam	300	U1	0,331	0,29014	87,0431	86,74		0,2357
			0,329	0,28814	86,4431			
		U2	0,342	0,30114	90,3431	90,49	89,44	
			0,343	0,30214	90,6431			
		U3	0,345	0,30414	91,2431	91,09		
			0,344	0,30314	90,9431			
Waktu 3 jam	300	U1	0,354	0,31314	93,9431	93,49		0,1085
			0,351	0,31014	93,0431			
		U2	0,350	0,30914	92,7431	91,54	92,79	
			0,342	0,30114	90,3431			
		U3	0,354	0,31314	93,9431	93,34		
			0,350	0,30914	92,7431			
Waktu 4 jam	300	U1	0,353	0,31214	93,6431	93,19		3,2276
			0,350	0,30914	92,7431			
		U2	0,362	0,32114	96,3431	96,64	96,49	
			0,364	0,32314	96,9431			
		U3	0,372	0,33114	99,3431	99,64		
			0,374	0,33314	99,9431			

Total Polifenol Ekstrak Daun Tembakau *Na-Oogst* (Aquadest) 4 jam**Uji Polifenol *Na-Oogst* (Aquadest)**

Perlakuan	Pengenceran (x)	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Rerata	SD
Waktu 2 jam	300	U1	0,255	0,21415	64,2447	64,3947	64,69	0,6538
			0,256	0,21515	64,5447			
		U2	0,257	0,21615	64,8447	65,4447		
			0,261	0,22015	66,0447			
		U3	0,254	0,21315	63,9447	64,2447		
			0,256	0,21515	64,5447			
Waktu 3 jam	300	U1	0,268	0,22714	68,1431	67,9931	67,29	0,9644
			0,267	0,22614	67,8431			
		U2	0,263	0,22214	66,6431	66,1931		
			0,260	0,21914	65,7431			
		U3	0,267	0,22614	67,8431	67,6931		
			0,266	0,22514	67,5431			
Waktu 4 jam	300	U1	0,274	0,23314	69,9431	70,2431	74,34	4,9508
			0,276	0,23514	70,5431			
		U2	0,286	0,24514	73,5431	72,9431		
			0,282	0,24114	72,3431			
		U3	0,309	0,26814	80,4431	79,8431		
			0,305	0,26414	79,2431			

Diagram Total Polifenol

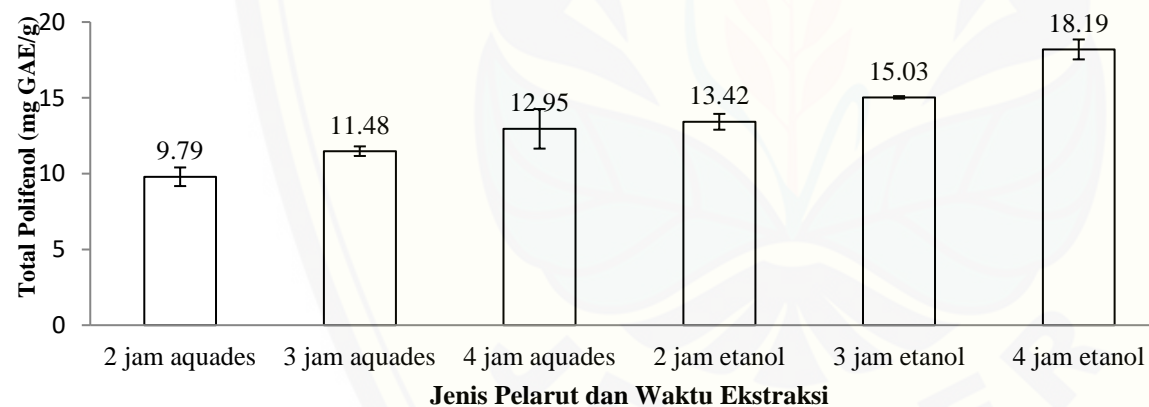
	Total Polifenol	SD
(P1) aquades	9,79	0,6
(P2) aquades	11,48	0,3
(P3) aquades	12,95	1,3
(P1) etanol	13,42	0,5
(P2) etanol	15,03	0,1
(P3) etanol	18,19	0,7

Diagram total polifenol mg/g tembakau pelarut Etanol

Rerata asam galat (mg/g)	jumlah /ml ekstrak	berat sampel asli	mg/g	Rerata	SD
86,74	7,4	50	12,838	13,4189	0,52156
90,49	7,5	50	13,574		
91,09	7,6	50	13,846		
93,49	8	50	14,958	15,0307	0,08284
91,54	8,2	50	15,013		
93,34	8,1	50	15,121		
93,19	9,5	50	17,706	18,1942	0,65715
96,64	9,8	50	18,941		
99,64	9	50	17,935		

Diagram total polifenol mg/g tembakau pelarut Aquades

Rerata asam galat (mg/g)	jumlah /ml ekstrak	berat sampel asli	mg/g	Rerata	SD
64,39	7,2	50	9,2722	9,7929	0,61433
65,44	8	50	10,4704		
64,24	7,5	50	9,6360		
67,99	8,2	50	11,1504	11,4798	0,31663
66,19	8,9	50	11,7818		
67,69	8,5	50	11,5073		
70,24	8,4	50	11,8003	12,9544	1,30543
72,94	8,7	50	12,6916		
79,84	9	50	14,3712		

Diagram Total Polifenol Ekstrak Daun Tembakau *Na-Oogst* 4 jam

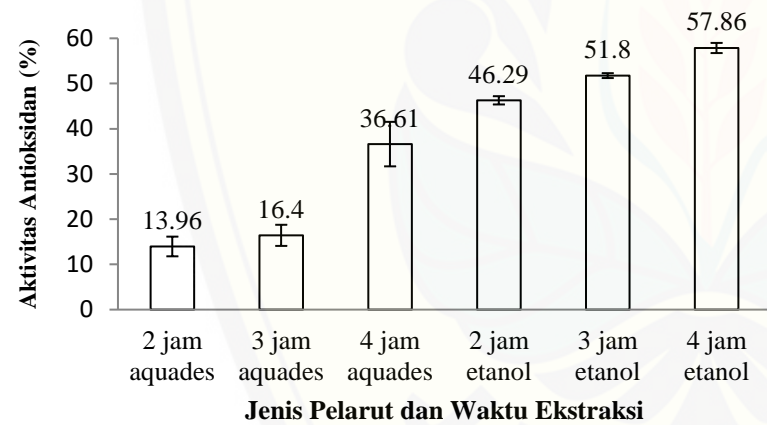
Lampiran 4.2 Aktivitas AntioksidanAktivitas antioksidan ekstrak tembakau *na-oogst* (etanol)

Uji Antioksidan Na-Ogst (Etanol 80%)							
konsentrasi	Ulangan	Blanko	Absorbansi	% Penghambatan	Rata-rata	Rata-rata	SD
Waktu 2 jam	U1	0,808	0,438	45,79207921	45,73	46,29	0,91
		0,808	0,439	45,66831683			
	U2	0,808	0,439	45,66831683	45,79		
		0,808	0,437	45,91584158			
	U3	0,828	0,438	47,10144928	47,34		
		0,828	0,434	47,58454106			
Waktu 3 jam	U1	0,865	0,421	51,32947977	51,21	51,8	0,54
		0,865	0,423	51,0982659			
	U2	0,865	0,415	52,02312139	52,29		
		0,879	0,417	52,55972696			
	U3	0,879	0,426	51,53583618	51,76		
		0,879	0,422	51,99089875			
Waktu 4 jam	U1	0,941	0,403	57,17321998	56,80	57,86	1,12
		0,941	0,410	56,4293305			
	U2	0,941	0,396	57,91710946	57,76		
		0,941	0,399	57,59829968			
	U3	0,941	0,389	58,66099894	59,03		
		0,941	0,382	59,40488842			

Aktivitas antioksidan ekstrak tembakau *na-oogst* (aquades) 4 jam

Uji Antioksidan Na-Ogst (Aquades)							
konsentrasi	Ulangan	Blanko	Absorbansi	% Penghambatan	Rata-rata	Rata-rata	SD
Waktu 2 jam	U1	0,886	0,757	14,55981941	14,90	13,96	2,18
		0,886	0,751	15,23702032			
	U2	0,886	0,749	15,46275395	15,52		
		0,886	0,748	15,57562077			
	U3	0,828	0,732	11,5942029	11,47		
		0,828	0,734	11,352657			
Waktu 3 jam	U1	0,828	0,713	13,88888889	13,83	16,43	2,34
		0,828	0,714	13,76811594			
	U2	0,828	0,678	18,11594203	18,36		
		0,828	0,674	18,59903382			
	U3	0,828	0,687	17,02898551	17,09		
		0,828	0,686	17,14975845			
Waktu 4 jam	U1	0,977	0,645	33,98157625	34,19	36,61	4,92
		0,977	0,641	34,39099284			
	U2	0,977	0,65	33,46980553	33,37		
		0,977	0,652	33,26509724			
	U3	0,977	0,565	42,16990788	42,27		
		0,977	0,563	42,37461617			

Perlakuan waktu ekstraksi	Antioksidan	SD
(P1) aquades	13,96	2,18
(P2) aquades	16,4	2,34
(P3) aquades	36,61	4,92
(P1) etanol	46,29	0,91
(P2) etanol	51,8	0,54
(P3) etanol	57,86	1,12

Diagram Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Tembakau *Na-Oogst*

4.3 Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Daun Tembakau Untuk Uji KHM

Formulasi uji KHM

Formulasi Uji KHM

Ekstrak (ml)	Kons. Ekstrak Etanol (mg/ml)	Kons. Ekstrak Aq (mg/ml)	Vol. Total	Konsentrasi polifenol dlm capet (V1.M1=V2.M2)	
				(etanol mg/ml)	(Aquades mg/ml)
0	3,638	2,59	5	0	0
0,03	3,638	2,59	5	0,02	0,02
0,06	3,638	2,59	5	0,04	0,03
0,12	3,638	2,59	5	0,09	0,06
0,24	3,638	2,59	5	0,17	0,12
0,48	3,638	2,59	5	0,35	0,25

etanol (µg/ml)	aquades (µg/ml)
0,0000	0,0000
21,8280	15,5400
43,6560	31,0800
87,3120	62,1600
174,6240	124,3200
349,2480	248,6400

Data Polifenol

Etanol	M1	18,19 mg GAE/g
Aquades	M1	12,95 mg GAE/g

larutan stok etanol 20%

$V1XM1=V2XM2$ 2 18,19

$2ml \times 18,19 \text{ mg/ml} = 10ml \times M2$ 10

M2= 3,6380

larutan stok etanol 20%

$V1XM1=V2XM2$ 2 12,95

$2ml \times 12,95 \text{ mg/ml} = 10ml \times M2$ 10

M2= 2,5900

Tabel volume total dalam capet

<i>E. Coli</i>			
Ekstrak (μl)	DMSO 2% (μl)	m.o (μl)	MEDIA (μl)
0	20	200	4780
30	20	200	4750
60	20	200	4720
120	20	200	4660
240	20	200	4540
480	20	200	4300

<i>B. Subtilis</i>			
Ekstrak (μl)	DMSO 2% (μl)	m.o (μl)	MEDIA (μl)
0	20	200	4780
30	20	200	4750
60	20	200	4720
120	20	200	4660
240	20	200	4540
480	20	200	4300

Lampiran 4.4 Perhitungan Aktivitas Antibakteri

Tabel jumlah koloni *Escherchia coli* (etanol)

ETANOL						
ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah koloni 10 ⁴		Rata-rata	SD	
		U1	U2			
0	0,00	86	80	83	4,2426	
0,03	0,02	74	77	76	2,1213	
0,06	0,04	64	60	62	2,8284	
0,12	0,09	43	46	45	2,1213	
0,24	0,17	32	36	34	2,8284	
0,48	0,35	6	8	7	1,4142	

Tabel jumlah % penghambatan dan koloni *Escherchia coli* (etanol)

Data mic E. Coli pelarut etanol dalam CFU/ml (10 ⁴)							
ekstrak (ml)	Konsentrasi (µg/ml)	Jumlah Koloni/200 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni
		U1	U2				
0	0,00	4300000	4000000	4150000	212132	0,00	6,62
0,03	0,02	3700000	3850000	3775000	106066	9,04	6,58
0,06	0,04	3200000	3000000	3100000	141421,4	25,30	6,49
0,12	0,09	2150000	2300000	2225000	106066	46,39	6,35
0,24	0,17	1600000	1800000	1700000	141421,4	59,04	6,23
0,48	0,35	300000	400000	350000	70710,68	91,57	5,54

Tabel jumlah koloni *Escherchia coli* (aquades)

AQUADES						
ekstrak (ml)	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah koloni 10^4		Rata-rata	SD	
		U1	U2			
0	0,00	104	107	106	2,1213	
0,03	0,02	83	88	86	3,5355	
0,06	0,03	75	78	77	2,1213	
0,12	0,06	54	52	53	1,4142	
0,24	0,12	42	48	45	4,2426	
0,48	0,25	20	16	18	2,8284	

Tabel jumlah % penghambatan dan koloni *Escherchia coli* (aquades)

Data mic E. Coli pelarut aquades dalam CFU/ml (10^4)							
ekstrak (ml)	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah Koloni/200 μl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni
		U1	U2				
0	0,00	5200000	5350000	5275000	106066	0,00	6,72
0,03	0,02	4150000	4400000	4275000	176776,7	18,96	6,63
0,06	0,03	3750000	3900000	3825000	106066	27,49	6,58
0,12	0,06	2700000	2600000	2650000	70710,68	49,76	6,42
0,24	0,12	2100000	2400000	2250000	212132	57,35	6,35
0,48	0,25	1000000	800000	900000	141421,4	82,94	5,95

Tabel jumlah koloni *Bacillus subtilis* (etanol)

ETANOL						
ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah koloni 10 ⁴		Rata-rata	SD	
		U1	U2			
0	0,00	60	66	63	4,242641	
0,03	0,02	53	58	55,5	3,535534	
0,06	0,04	48	44	46	2,828427	
0,12	0,09	33	36	34,5	2,12132	
0,24	0,17	22	26	24	2,828427	
0,48	0,35	2	4	3	1,414214	

Tabel jumlah % penghambatan dan koloni *Bacillus subtilis* (etanol)

Data mic B.Subtilis pelarut etanol dalam CFU/ml (10 ⁴)							
ekstrak (ml)	Konsentrasi (µg/ml)	Jumlah Koloni/200 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni
		U1	U2				
0	0,00	3000000	3300000	3150000	212132	0,0000	6,50
0,03	0,02	2650000	2900000	2775000	176776,7	11,9048	6,44
0,06	0,04	2400000	2200000	2300000	141421,4	26,9841	6,36
0,12	0,09	1650000	1800000	1725000	106066	45,2381	6,24
0,24	0,17	1100000	1300000	1200000	141421,4	61,9048	6,08
0,48	0,35	100000	200000	150000	70710,68	95,2381	5,18

Tabel jumlah koloni *Bacillus subtilis* (aquades)

AQUADES						
ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah koloni 10 ⁴		Rata-rata	SD	
		U1	U2			
0	0,00	94	97	95,5	2,12132	
0,03	0,02	78	73	75,5	3,535534	
0,06	0,03	68	65	66,5	2,12132	
0,12	0,06	44	45	44,5	0,707107	
0,24	0,12	36	40	38	2,828427	
0,48	0,25	14	11	12,5	2,12132	

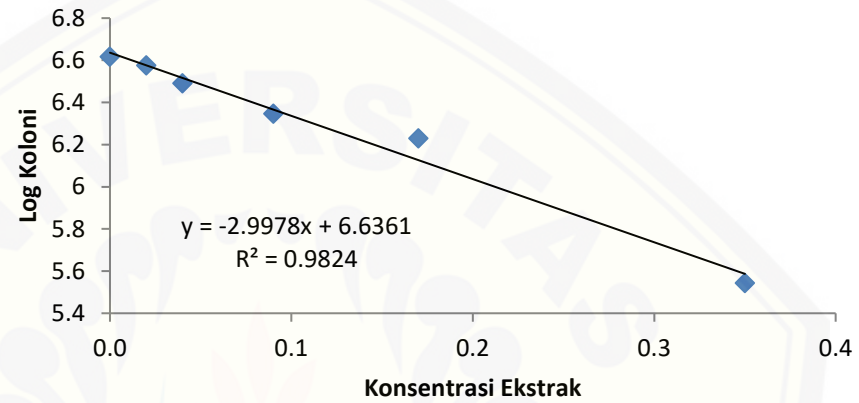
Tabel jumlah % penghambatan dan koloni *Bacillus subtilis* (aquades)

Data mic B.Subtilis pelarut aquades dalam CFU/ml (10 ⁴)							
ekstrak (ml)	Konsentrasi (µg/ml)	Jumlah Koloni/200 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni
		U1	U2				
0	0,00	4700000	4850000	4775000	106066	0,0000	6,68
0,03	0,02	3900000	3650000	3775000	176776,7	20,9424	6,58
0,06	0,03	3400000	3250000	3325000	106066	30,3665	6,52
0,12	0,06	2200000	2250000	2225000	35355,34	53,4031	6,35
0,24	0,12	1800000	2000000	1900000	141421,4	60,2094	6,28
0,48	0,25	700000	550000	625000	106066	86,9110	5,80

Lampiran 4.5 Kurva logaritmik *Eschericia coli* dan *Bacillus subtilis*

a. *Eschericia coli* (Etanol)

Polifenol (mg/ml)	Log Koloni
0,0	6,62
0,02	6,58
0,04	6,49
0,09	6,35
0,17	6,23
0,35	5,54



Kons. Polifenol (mg/ml)

1 log

5	0,546	0,334
4	0,880	

2 log

5	0,546	0,667
3	1,213	

3 log

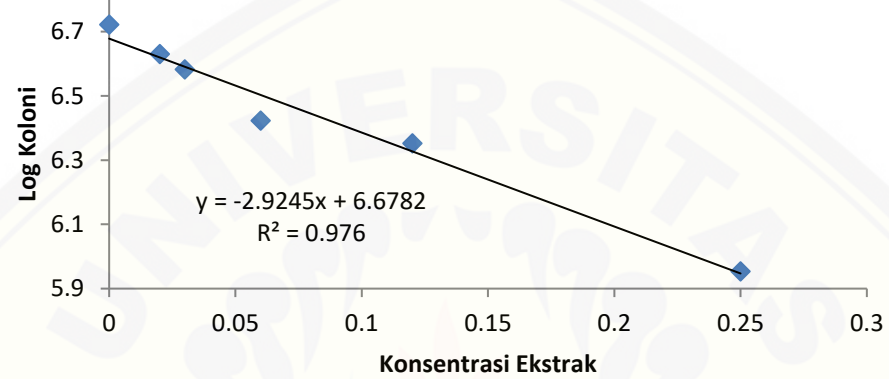
5	0,546	0,667
3	1,213	

IC₅₀		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10⁸	Log Y1 = 8,000	X1 =	-0,455
Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10⁷	Log Y2 = 7,699	X2 =	-0,355
		IC₅₀	0,100

IC₉₀		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10⁸	Log Y1 = 7,000	X1 =	-0,121
Y2 = 90% (Y1) = 5 x 10⁷	Log Y2 = 6,000	X2 =	0,212
		IC₉₀	0,334

b. *Eschericia coli* (Aquades)

Polifenol (mg/ml)	Log Koloni
0	6,72
0,02	6,63
0,03	6,58
0,06	6,42
0,12	6,35
0,25	5,95



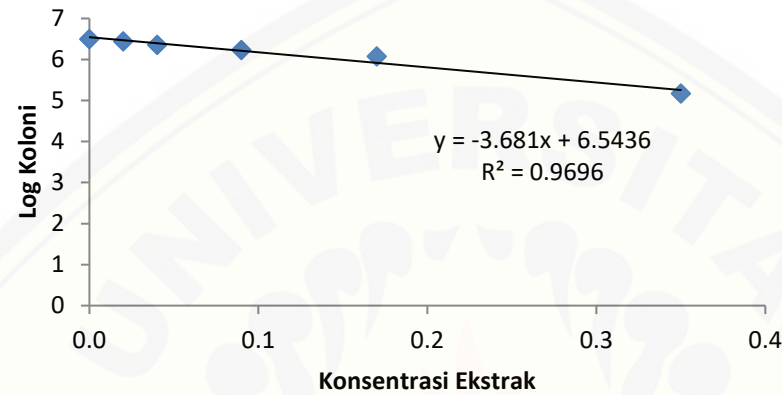
	Kons. Polifenol (mg/ml)		
1 log	5	0,574	0,342
	4	0,916	
2 log	5	0,574	0,684
	3	1,258	
3 log	5	0,574	0,684
	3	1,258	

IC₅₀		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10⁸	Log Y1 = 8,000	X1 =	-0,452
Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10⁷	Log Y2 = 7,699	X2 =	-0,349
		IC₅₀	0,103

IC₉₀		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10⁸	Log Y1 = 7,000	X1 =	-0,110
Y2 = 90% (Y1) = 5 x 10⁷	Log Y2 = 6,000	X2 =	0,232
		IC₉₀	0,342

c. *Bacillus subtilis* (Etanol)

Polifenol (mg/ml)	Log Koloni
0,0	6,50
0,02	6,44
0,04	6,36
0,09	6,24
0,17	6,08
0,35	5,18



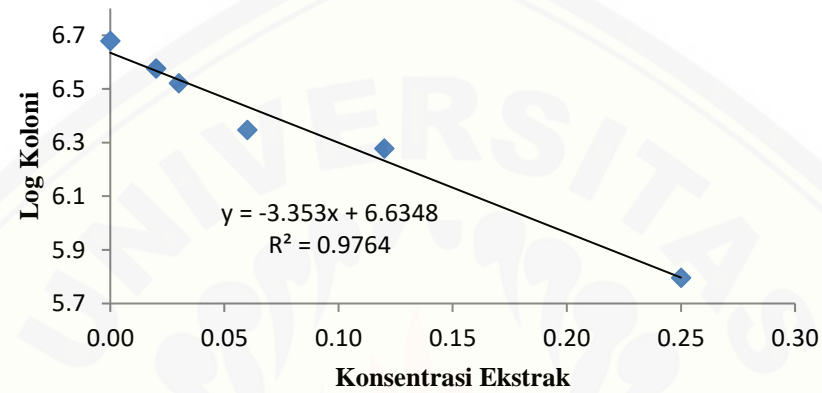
Kons. Polifenol (mg/ml)		
1 log	5	0,419
	4	0,691
2 log	5	0,419
	3	0,963
3 log	5	0,419
	3	0,963

IC₅₀		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10⁸	Log Y1 = 8,000	X1 =	-0,396
Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10⁷	Log Y2 = 7,699	X2 =	-0,314
		IC₅₀	0,082

IC₉₀		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10⁸	Log Y1 = 7,000	X1 =	-0,124
Y2 = 90% (Y1) = 5 x 10⁷	Log Y2 = 6,000	X2 =	0,148
		IC₉₀	0,272

d. *Bacillus subtilis* (Aquadres)

Polifenol (µg/ml)	Log Koloni
0,00	6,68
0,02	6,58
0,03	6,52
0,06	6,35
0,12	6,28
0,25	5,80



Kons. Polifenol (mg/ml)		
1 log	5	0,487
	4	0,786

2 log	5	0,487
	3	1,084

3 log	5	0,487
	3	1,084

IC₅₀		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10⁸	Log Y1 = 8,000	X1 =	-0,407
Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10⁷	Log Y2 = 7,699	X2 =	-0,318
		IC₅₀	0,090

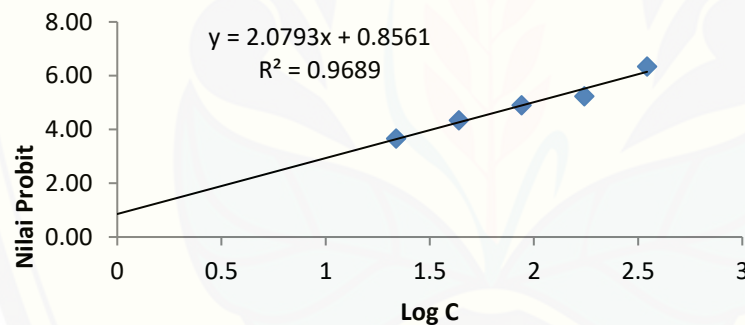
IC₉₀		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10⁸	Log Y1 = 7,000	X1 =	-0,109
Y2 = 90% (Y1) = 5 x 10⁷	Log Y2 = 6,000	X2 =	0,189
		IC₉₀	0,298

Lampiran 4.6 Kurva probit *Eschericia coli* dan *Bacillus subtilis*

a. *Eschericia coli* (Etanol)

ekstrak (ml)	Konsentrasi (µg/ml)	Jumlah Koloni/200 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni	%Pertumbuhan	LOG C	Probit
		U1	U2							
0,00	0,00	4300000	4000000	4150000	212132,03	0,00	6,62	100,00	0,00	-
0,03	21,82	3700000	3850000	3775000	106066,02	9,04	6,58	90,96	1,34	3,66
0,06	43,65	3200000	3000000	3100000	141421,36	25,30	6,49	74,70	1,64	4,33
0,12	87,31	2150000	2300000	2225000	106066,02	46,39	6,35	53,61	1,94	4,90
0,24	174,62	1600000	1800000	1700000	141421,36	59,04	6,23	40,96	2,24	5,23
0,48	349,24	300000	400000	350000	70710,68	91,57	5,54	8,43	2,54	6,34

Log C	Probit
0	
1,34	3,66
1,64	4,33
1,94	4,90
2,24	5,23
2,54	6,34



$$y = 2,079x + 0,856$$

$$5 = 2,079x + 0,856$$

$$5 - 0,856 = 2,079x$$

$$4,144$$

$$X = \text{Log } C_{50} = 4,144/2,079$$

$$\text{LOG } C_{50} = 1,993 \qquad 98,5$$

$$\text{IC}_{50} = 98,5 \qquad 98,46 \text{ } (\mu\text{g/ml})$$

$$0,098 \text{ mg/ml}$$

$$1,993266$$

$$y = 2,079x + 0,856$$

$$6,28 = 2,079x + 0,856$$

$$6,28 - 0,856 = 2,079x$$

$$5,424$$

$$X = \text{Log } C_{90} = 5,424/2,079$$

$$\text{LOG } C_{90} = 2,609 \qquad 406,4$$

$$\text{IC}_{90} = 406,4 \qquad 406,39 \text{ } (\mu\text{g/ml})$$

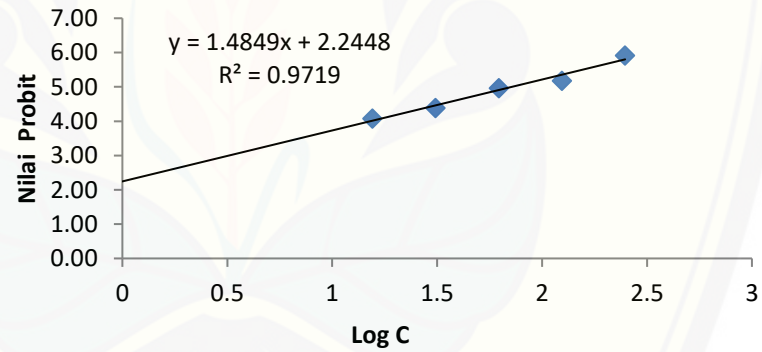
$$0,406 \text{ mg/ml}$$

$$2,608947$$

b. *Eschericia coli* (Aquades)

ekstrak (ml)	Konsentrasi (µg/ml)	Jumlah Koloni/200 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni	%Pertumbuhan	LOG C	Probit
		U1	U2							
0,00	0,00	5200000	5350000	5275000	106066,02	0,00	6,72	100,00	0,00	
0,03	15,54	4150000	4400000	4275000	176776,70	18,96	6,63	81,04	1,19	4,08
0,06	31,08	3750000	3900000	3825000	106066,02	27,49	6,58	72,51	1,49	4,39
0,12	62,16	2700000	2600000	2650000	70710,68	49,76	6,42	50,24	1,79	4,97
0,24	124,32	2100000	2400000	2250000	212132,03	57,35	6,35	42,65	2,09	5,18
0,48	248,64	1000000	800000	900000	141421,36	82,94	5,95	17,06	2,40	5,92

Log C	Probit
0	
1,19	4,08
1,49	4,39
1,79	4,97
2,09	5,18
2,40	5,92



$$y = 1,484x + 2,244$$

5

$$5 = 1,484x + 2,244$$

1,484

$$5 - 2,244 = 1,484x$$

2,244

7,244

$$X = \text{Log } C_{50} = 7,244/1,484$$

$$\text{LOG } C_{50} =$$

4,881

134,7

IC50 =

134,70 (µg/ml)

0,135 mg/ml

134,7

2,129368

$$y = 1,484x + 2,244$$

6,28

$$6,28 = 1,484x + 2,244$$

1,484

$$6,28 - 2,244 = 1,484x$$

2,244

8,524

$$X = \text{Log } C_{90} = 8,524/1,484$$

$$\text{LOG } C_{90} =$$

5,744

981,6

IC90 =

981,60 (µg/ml)

0,982 mg/ml

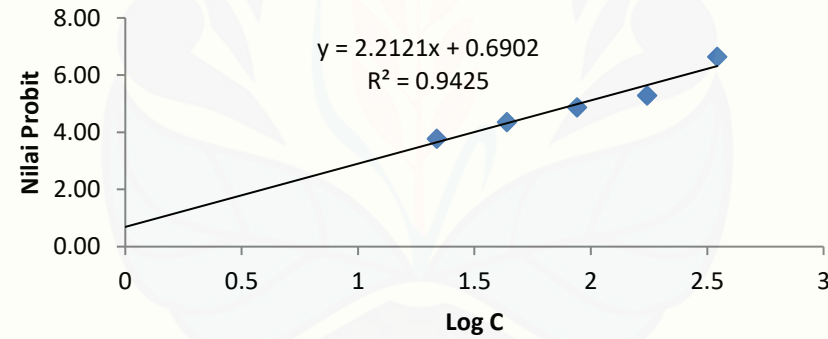
981,6

2,991935

c. *Bacillus subtilis* (Etanol)

ekstrak (ml)	Konsentrasi (µg/ml)	Jumlah Koloni/200 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni	%Pertumbuhan	LOG C	Probit
		U1	U2							
0	0,00	3000000	3300000	3150000	212132	0,00	6,50	100	0	-
0,03	21,82	2650000	2900000	2775000	176776,7	11,90	6,44	88,095	1,34	3,77
0,06	43,65	2400000	2200000	2300000	141421,4	26,98	6,36	73,016	1,64	4,36
0,12	87,31	1650000	1800000	1725000	106066	45,24	6,24	54,762	1,94	4,87
0,24	174,62	1100000	1300000	1200000	141421,4	61,90	6,08	38,095	2,24	5,28
0,48	349,24	100000	200000	150000	70710,68	95,24	5,18	4,762	2,54	6,64

Log C	Probit
0	
1,34	3,77
1,64	4,36
1,94	4,87
2,24	5,28
2,54	6,64



$$y = 2,212x + 0,690$$

$$5 = 2,212x + 0,690$$

$$5 - 0,690 = 2,212x$$

$$X = \text{Log } C_{50} = 4,310 / 2,212$$

$$\text{LOG } C_{50} = 1,948$$

$$\text{IC}_{50} = 88,8 \quad 88,8 \quad (\mu\text{g/ml})$$

$$0,089 \quad \text{mg/ml}$$

$$y = 2,212x + 0,690$$

$$6,28 = 2,212x + 0,690$$

$$6,28 - 0,690 = 2,212x$$

$$X = \text{Log } C_{90} = 5,590 / 2,212$$

$$\text{LOG } C_{90} = 2,527$$

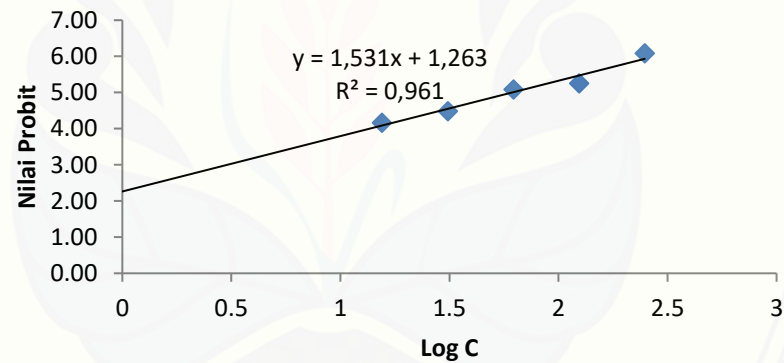
$$\text{IC}_{90} = 336,6 \quad 336,6 \quad (\mu\text{g/ml})$$

$$0,337 \quad \text{mg/ml}$$

d. *Bacillus subtilis* (Aquades)

ekstrak (ml)	Konsentrasi (µg/ml)	Jumlah Koloni/200 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni	%Pertumbuhan	LOG C	Probit
		U1	U2							
0	0,00	4700000	4850000	4775000	106066,0172	0,00	6,68	100	0	
0,03	15,54	3900000	3650000	3775000	176776,6953	20,94	6,58	79,1	1,19	4,16
0,06	31,08	3400000	3250000	3325000	106066,0172	30,37	6,52	69,6	1,49	4,48
0,12	62,16	2200000	2250000	2225000	35355,33906	53,40	6,35	46,6	1,79	5,08
0,24	124,32	1800000	2000000	1900000	141421,3562	60,21	6,28	39,8	2,09	5,25
0,48	248,64	700000	550000	625000	106066,0172	86,91	5,80	13,1	2,40	6,08

Log C	Probit
0	
1,19	4,16
1,49	4,48
1,79	5,08
2,09	5,25
2,40	6,08



$$y = 1,531x + 1,263$$

$$5 = 1,531x + 1,263$$

$$5 - 1,263 = 1,531x$$

$$3,737$$

$$X = \text{Log C50} = 2,737/1,531$$

$$\text{LOG C50} = 2,441$$

IC50 =	275,99	(µg/ml)
	0,276	mg/ml
	276,0	2,441

$$y = 1,571x + 0,998$$

$$6,28 = 1,571x + 0,998$$

$$6,28 - 0,998 = 1,571x$$

$$5,017$$

$$X = \text{Log C90} = 5,282/1,571$$

$$\text{LOG C90} = 3,277$$

IC50 =	657,01	(µg/ml)
	0,657	mg/ml
	657,0	2,818

4.7 Lampiran Dokumentasi

a. Proses pengeringan tembakau na-oogst dan penimbangan hasil pengeringan



b. Proses ekstraksi dan penyaringan



c. Proses pemekatan (evaporasi)



d. Uji total polifenol



e. Uji aktivitas antioksidan



f. Pembuatan media NA



g. Proses plating dan inkubasi

