



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN TEMBAKAU Na-OOGST  
AFKIR DAN PENGHAMBATANNYA TERHADAP PERTUMBUHAN**

*Staphylococcus aureus* DAN *Salmonella typhi*

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**Hayuningtyas Suksmorini**

**NIM 151710101098**

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



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN TEMBAKAU Na-OOGST  
AFKIR DAN PENGHAMBATANNYA TERHADAP PERTUMBUHAN  
*Staphylococcus aureus* DAN *Salmonella typhi***

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**Hayuningtyas Suksmorini**

**NIM 151710101098**

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

## PERSEMBAHAN

Saya persembahkan skripsi ini untuk :

1. Allah SWT, yang telah memberikan nikmat berupa kesehatan jasmani dan rohani sehingga dengan nikmat itu saya dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik dan selalu bersyukur untuk setiap langkah yang telah dilalui;
2. Ibunda tersayang Lilik Sumiati, S.Pd, terima kasih untuk semua waktu, kasih sayang, cinta yang tulus, nasehat, do'a dan dukungan yang diberikan sampai detik ini, untuk semua perhatian dan motivasi agar tidak mudah putus asa, dan tetap semangat;
3. Alm. Ayahanda tersayang Ir. Gunawan Wibisono, B.Sc, terima kasih telah mengajarkan tentang banyak hal sehingga aku bisa jadi seorang yang mandiri, bertanggung jawab, disiplin dan berani. Terima kasih juga atas semua kasih sayang dan nasehat selama ini;
4. Kakak tercinta Fidya Hayu Anindita S.Pd, terima kasih telah hadir dalam kehidupan ku sebagai kakak yang paling sabar, baik, dan hebat. Kakak yang selalu memberikan dukungan, motivasi, semangat, do'a serta memberika canda tawa disaat kita bersama; dan
5. Almamater Fakultas Teknologi Pertanian Jember.

**MOTTO**

“Hidup tak selalu sesuai rencana. Kadang membuat kita jatuh, tapi kita akan selalu mampu menemukan cara untuk bangkit kembali”

“Sesungguhnya bersama kesulitan pasti ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari suatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain)”

-QS. 94 : 6-7-

“Setiap orang pernah merasakan yang namanya kehilangan. Beberapa orang melewatinya dengan perjuangan”

-Kunto Aji-

**PERNYATAAN**

Saya yang bertandatangan dibawah ini :

Nama : Hayuningtyas Suksmorini

NIM : 151710101098

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “**Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Tembakau Na-Oogst Afkir Dan Penghambatannya Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus Aureus* Dan *Salmonella Typhi*”** adalah benar-benar hasil karya saya sendiri kecuali dalam kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan dalam institusi mana pun, dan bukan akarya ilmiah 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, .....2020

Hayuningtyas Suksmorini

NIM 151710101098

**SKRIPSI**

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN TEMBAKAU Na-OOGST  
AFKIR DAN PENGHAMBATANNYA TERHADAP PERTUMBUHAN  
*Staphylococcus aureus* DAN *Salmonella typhi***

Oleh :

**Hayuningtyas Suksmorini**

**NIM 151710101098**

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Ir. Giyarto, MSc

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “**Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Tembakau Na-Oogst Afkir Dan Penghambatannya Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus Aureus* Dan *Salmonella Typhi*”** karya Hayuningtyas Suksmorini NIM 151710101098 telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada :

Hari, Tanggal :

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Ir. Giyarto, MSc  
NIP. 19660718 199303 1 013

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

Tim  
Penguji :

Ketua

Anggota

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

Dr. Ir. Sih Yuwanti, M.P  
NIP. 19650708 199403 2 002

Mengesahkan  
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian

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

## RINGKASAN

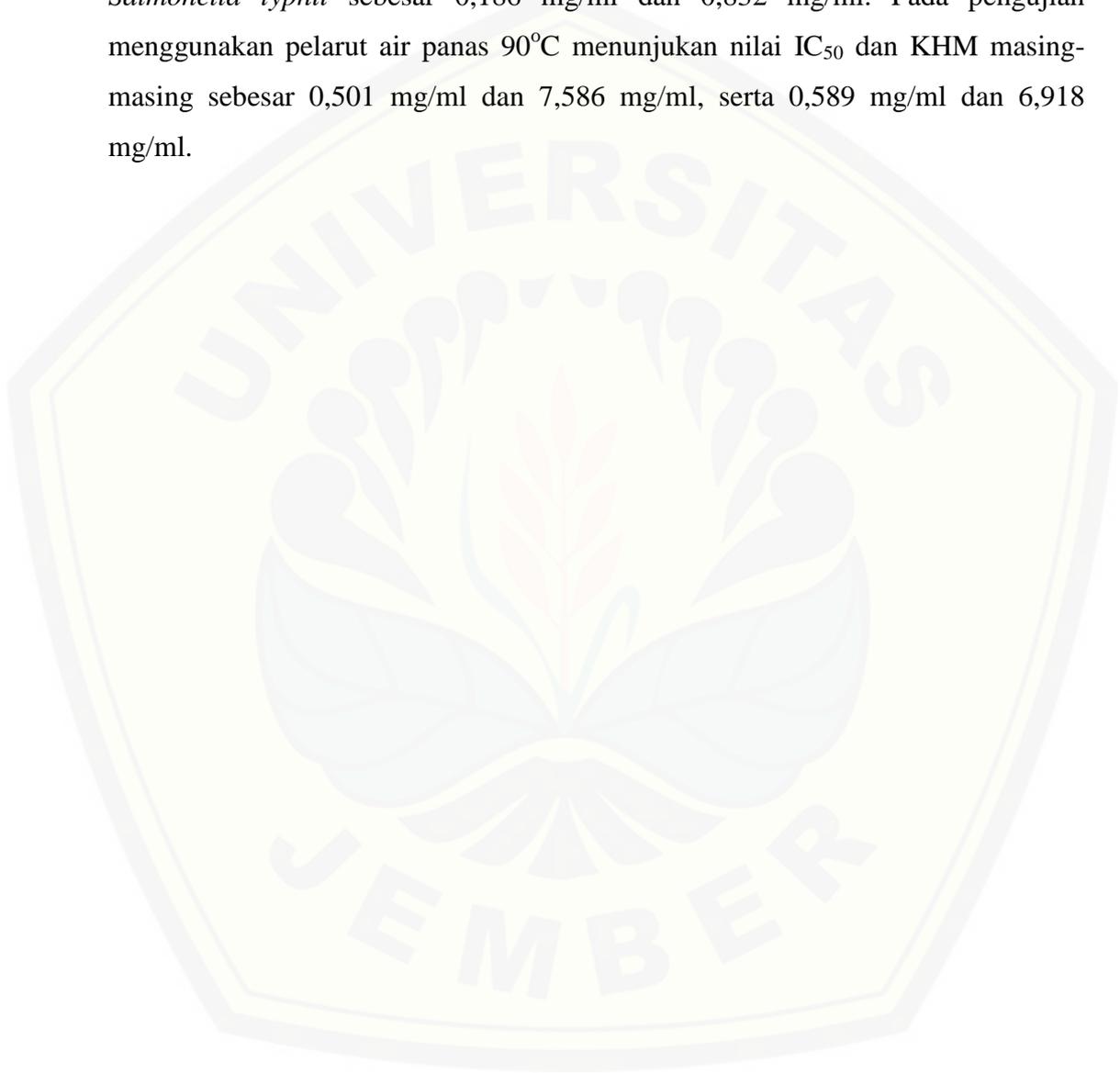
**Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Tembakau Na-Oogst Afkir Dan Penghambatannya Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus Aureus* Dan *Salmonella Typhi***; Hayuningtyas Suksmorini; 2015; 151710101098; 75 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

Tembakau merupakan produk pertanian, bukan termasuk komoditas pangan, melainkan komoditas perkebunan. Tembakau Na-Oogst adalah jenis tembakau yang ditanam pada musim kemarau, kemudian dipanen pada musim penghujan. Daun tembakau Na-Oogst afkir mengandung senyawa biokatif yang bersifat antibakteri dan antijamur. Senyawa bioaktif tersebut yaitu flavonoid, saponi, steroid, alkaloid dan terpenoid, dari senyawa flavonoid tersebut dimanfaatkan sebagai antibakteri alami. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pelarut yang efektif untuk mengekstrak kandungan antibakteri daun tembakau Na-Oogst afkir terhadap pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* yang merupakan penyebab keracunan pada makanan dan penyebab demam tifoid atau tipus.

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi dengan pelarut etanol 80% dan air panas 90°C. Penelitian ini dilakukan empat tahap yaitu ekstraksi daun tembakau, total polifenol (*Follin-Ciocalteu*), aktivitas antioksidan (*DPPH scavenging activity*), dan uji antibakteri pada daun tembakau Na-Oogst afkir menggunakan metode dilusi agar dengan penentuan nilai  $IC_{50}$  dan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum).

Hasil penelitian menunjukkan nilai kandungan total polifenol ekstrak daun tembakau Na-Oogst afkir pelarut etanol 80% menunjukkan hasil sebesar 84,8190 mg GAE/ml sedangkan dengan pelarut air panas 90°C menunjukkan hasil sebesar 40,6295 mg GAE/ml. Nilai aktivitas antioksidan dari ekstrak daun tembakau Na-Oogst afkir pelarut etanol 80% sebesar 83,77% sedangkan pada pelarut air panas 90°C sebesar 59,25%. Pengujian antibakteri ekstrak daun tembakau Na-Oogst

afkir menggunakan metode dilusi agar terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa nilai  $IC_{50}$  dan KHM menggunakan ekstrak daun tembakau Na-Oogst afkir pelarut etanol 80% masing-masing memperoleh hasil sebesar 0,042 mg/ml dan 0,129 mg/ml, sedangkan pada *Salmonella typhii* sebesar 0,186 mg/ml dan 0,832 mg/ml. Pada pengujian menggunakan pelarut air panas 90°C menunjukkan nilai  $IC_{50}$  dan KHM masing-masing sebesar 0,501 mg/ml dan 7,586 mg/ml, serta 0,589 mg/ml dan 6,918 mg/ml.



## SUMMARY

**Antioxidant activity of Na-Oogst Afkir Tobacco Leaf Extract and its inhibition on *Staphylococcus Aureus* and *Salmonella Typhi***; Hayuningtyas Suksmorini; 151710101098; 2015; 44 pages; Departement of Agricultural Product Technology, Faculty of Agricultural Technology, University of Jember

Tobacco is an agricultural product, not including food commodities, but plantation commodities. Na-Oogst tobacco is a type of tobacco that is planted in the dry season, then harvested in the rainy season. Na-Oogst tobacco leaf rejects contain bioactive compounds that are antibacterial and antifungal. The bioactive compounds, namely flavonoids, saponins, steroids, alkaloids, and terpenoids, from these flavonoid compounds are used as natural antibacterials. This study aims to determine an effective solvent for extracting the antibacterial content of Na-Oogst tobacco leaves to the growth of pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Typhi* which are the causes of food toxicity and the cause of typhoid or typhus fever.

In this study, extraction was carried out with 80% ethanol solvent and 90°C hot water. This research conducted in four stages, those were tobacco leaf extraction, total polyphenols (Follin-Ciocalteu), antioxidant activity (DPPH scavenging activity), and antibacterial test on Na-Oogst rejected tobacco leaves used agar dilution method by determining IC<sub>50</sub> and MIC values (Minimum Inhibition Concentration).

The results showed that the total content of polyphenols extract of Na-Oogst tobacco leaves rejected 80% ethanol solvent showed 84.8190 mg GAE / ml while with 90oC hot water solvent showed 40.6295 mg GAE / ml. The value of antioxidant activity from Na-Oogst tobacco leaf extract rejected 80% ethanol by 83.77% while for 90°C hot water solvent was 59.25%. Anti-bacterial testing of Na-Oogst tobacco leaf extract used the dilution method so that the growth of *Staphylococcus aureus* bacteria showed that the IC<sub>50</sub> and MIC values of

used Na-Oogst tobacco leaf extract rejected 80% ethanol solvent each obtained a result of 0.042 mg / ml and 0.129 mg / ml ml, whereas *Salmonella typhii* is 0.186 mg / ml and 0.832 mg / ml. Test used 90°C hot water solvents, the IC<sub>50</sub> and MIC values were 0.501 mg / ml and 7.586 mg / ml, and 0.589 mg / ml and 6.918 mg / ml, respectively.



## PRAKATA

Alhamdulillah dan puji syukur atas kehadiran Allah SWT telah memberikan limpahan ridho dan hidayah-Nya sampai saat ini, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Tembakau Na-Oogst Afkir dan Penghambatannya terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi***” 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 Progam Studi Teknologi Hasil Pertanian Universitas Jember;
3. Ir. Giyarto, MSc selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah banyak membantu, membimbing, dan mengarahkan selama pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi
4. Dr. Ir. Sony Suwasono, M. App.Sc selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, membimbing serta memperbaiki skripsi ini;
5. Ibunda Lilik Sumiati, S.Pd dan Alm. Ayah Ir. Gunawan Wibisono, B.Sc tersayang terima kasih atas segala kasih sayang, semangat serta dorongan selama penyelesaian skripsi ini;
6. Kakak tercinta Fidya Hayu Anindita S.Pd dan Istajib Uli Masduki terima kasih atas dukungan yang luar biasa kepada penulis;
7. Rochima ulva, Iklilla Muawanah, dan Dinda Aulia Rizky. Terima kasih atas doa, semangat selama penelitian dan penyusunan skripsi;
8. Ahmad Naufal R, M. Fawaid Fauzi Y, Irfan Dwi Satya dan Dzanil Djanuar P. terima kasih atas canda tawa yang selalu diberikan sebagai penyemangat selama mengerjakan skripsi;

9. Afina Desi terima kasih telah meluangkan waktu untuk diskusi selama pengerjakan skripsi ini;
10. Tim proyek tembakau Fatmawati Wilujeng, Susi Maimona Wati, Nala Umami Husaina, Nurul Nofiyanti, Agnes Emilda Pratiwi, Nani Masrurotin yang selalu membantu penulis selama penelitian hingga penyusunan skripsi;
11. Tim Jalan – jalan Sri Wulandari N, Hikmal Hakimi, Bagus Vinaldy, Andika Wahyu J, Syeni Tisna R A, Dwi Fitrianti, Whella Puput, Abed Al-Humaidi yang telah memberikan warna warni kehidupan serta canda tawa saat berkumpul;
12. Fauzi nabila dan Alfan Wicaksono yang selalu memberi semangat dalam penyelesaian skripsi dan sebagai tempat berkeluh kesah dan suka cita;
13. Teman-teman THP B 2015, UK- PSM Symphony Choir terima kasih atas kekompakan dan rasa kekeluargaan dan tetaplah jaya berkarya;
14. Segenap dosen dan karyawan Fakultas Teknologi Pertanian yang telah membantu dalam kelancaran penulisan skripsi ini;
15. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan dukungan, do'a, semangat. Terima kasih atas semuanya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari kata sempurna, oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan segala bentuk kritik dan saran yang bersifat membangun skripsi ini menjadi sempurna. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan menambah pengetahuan bagi pembaca.

Jember, Mei 2020

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>MOTTO</b> .....	iii
<b>PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEBIMBING</b> .....	v
<b>PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>SUMMARY</b> .....	ix
<b>PRAKATA</b> .....	xi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xiii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xviii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Perumusan Masalah</b> .....	2
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	2
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
<b>2.1 Tembakau Na-Oogst</b> .....	5
<b>2.2 Ekstraksi Senyawa Fenolik</b> .....	7
<b>2.3 Aktivitas Senyawa Antioksidan</b> .....	11
<b>2.4 Jenis Senyawa Bioaktif Daun Tembakau</b> .....	12
<b>2.5 Mekanisme Penghambatan Senyawa Antibakteri</b> .....	16
<b>2.6 Pengujian Antibakteri Metode Dilusi (Pengenceran)</b> .....	18
<b>2.7 <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	19
<b>2.8 <i>Salmonella typhi</i></b> .....	20

<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Tempat dan Waktu .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Bahan dan Alat.....</b>	<b>22</b>
3.2.1 Bahan Penelitian .....	22
3.2.2 Alat Penelitian.....	22
<b>3.3 Rancangan Peneliti .....</b>	<b>23</b>
3.3.1 Rancangan Percobaan .....	23
3.3.2 Alat Penelitian.....	23
<b>3.4 Prosedur Analisa.....</b>	<b>24</b>
3.4.1 Uji Total Polifenol.....	23
3.4.2 Uji Antioksidan.....	25
3.4.3 Uji Total Polifenol.....	26
<b>3.5 Analisa Data.....</b>	<b>25</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Kandungan Polifenol Ekstrak Daun Tembakau Na-Oogst Afkir .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Aktvitas Antioksidan Ekstrak Daun Tembakau Na-Oogst Afkir .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3 Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau Na-Oogst Afkir .....</b>	<b>32</b>
<b>BAB 5. PENUTUP.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>41</b>
<b>5.2 Saran.....</b>	<b>41</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>42</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>47</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
<b>2.1 Komposisi kimia daun tembakau Na-Oogst.....</b>	<b>6</b>



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
<b>3.1</b> Diagram alir pembuatan ekstrak daun tembakau Na-oogst afkir .....	24
<b>3.2</b> Penentuan respon penghambat k <sub>hm</sub> dan I <sub>c50</sub> .....	28
<b>4.1</b> Total polifenol ekstrak daun tembakau Na-oogst afkir hasil ekstraksi pelarut etanol 80% dan air panas 90°c .....	29
<b>4.2</b> Aktivitas antioksidan ekstrak daun tembakau Na-oogst afkir hasil ekstraksi pelarut etanol 80% dan air panas 90°c .....	31
<b>4.3</b> Kurva probit ekstrak daun tembakau Na-oogst afkir dengan pelarut etanol 80% terhadap pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i> .....	33
<b>4.4</b> Kurva probit ekstrak daun tembakau Na-oogst afkir dengan pelarut air panas 90°c terhadap pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i> .....	34
<b>4.5</b> Kurva probit ekstrak daun tembakau Na-oogst afkir dengan pelarut etanol 80% terhadap pertumbuhan <i>salmonella typhii</i> .....	35
<b>4.6</b> Kurva probit ekstrak daun tembakau Na-oogst afkir dengan pelarut air panas 90°c terhadap pertumbuhan <i>Salmonella typhii</i> .....	36
<b>4.7</b> Kurva logaritmik ekstrak daun tembakau Na-oogst afkir dengan pelarut etanol dan air panas 90°c terhadap pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i> .....	38
<b>4.8</b> Kurva logaritmik ekstrak daun tembakau Na-oogst afkir dengan pelarut etanol dan air panas 90°c terhadap pertumbuhan <i>Salmonella typhii</i> .....	39

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
<b>Lampiran 4.1</b> Perhitungan total polifenol ekstrak daun tembakau	
Na-Oogst afkir .....	47
<b>Lampiran 4.2</b> Perhitungan total antioksidan ekstrak daun tembakau	
Na-Oogst afkir .....	52
<b>Lampiran 4.3</b> Perhitungan konsentrasi ekstrak .....	55
<b>Lampiran 4.4</b> Perhitungan aktivitas antibakteri .....	57
<b>Lampiran 4.5</b> Perhitungan kurva logaritmik <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Salmonella typhii</i> .....	63
<b>Lampiran 4.6</b> Perhitungan kurva probit <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Salmonella typhii</i> .....	67
<b>Lampiran 4.7</b> Dokumentasi penelitian.....	75

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tanaman tembakau telah menjadi komoditas andalan dan berperan penting bagi perekonomian Indonesia. Tanaman tembakau dibudidayakan hampir di seluruh Indonesia, terutama tembakau rakyat (*native tobacoes* atau *bevolkings tobacoes*). Kelompok tembakau ini diusahakan oleh rakyat mulai dari pembuatan bedeng atau lahan, penyemaian, penanaman, dan pengolahan daunnya sehingga siap untuk dijual. Pemanfaatan tembakau secara umum digunakan sebagai bahan baku krosok untuk produksi cerutu dan rokok. Jenis tembakau yang digunakan untuk bahan baku krosok antara lain *Na-Oogst*, *Kasturi*, *Virginia Fc*, *Cigarillo* dan *Burley*. Pengolahan daun tembakau sebagai bahan krosok, menghasilkan limbah yang berupa daun afkir. Daun afkir dapat berupa daun yang terserang hama, daun robek, dan daun berlubang. Semakin banyak daun tembakau afkir, maka semakin besar potensi nilai ekonomi tembakau yang hilang. Persentase jumlah daun afkir tersebut bisa mencapai 60%. Data Badan Pusat Statistik Kabupaten Jember (2018) menyatakan bahwa pada tahun 2017 produksi tembakau *Na-Oogst* sebanyak 32.593,00 kuintal. Dengan produksi sebesar itu potensi daun tembakau afkir juga besar.

Daun tembakau, termasuk daun tembakau afkir mengandung senyawa bioaktif yang bersifat antibakteri dan antijamur. Senyawa bioaktif tersebut tergolong polifenol, yaitu flavonoid, saponin, steroid, alkaloid dan terpenoid. Senyawa polifenol daun tembakau berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai bahan antibakteri. Peranan senyawa antibakteri dan antijamur, ditunjukkan kemampuannya merusak dinding sel. Dinding sel bakteri dan jamur tersusun kompleks senyawa peptidoglikan dan lipoprotein, mampu mendenaturasi protein dinding sel dengan merusak ikatan hydrogen, sehingga mengakibatkan rusaknya dinding sel (Friday, 2009). Flavonoid bekerja sebagai bakterisidal dengan merusak membrane sitoplasma, menghambat metabolisme sintesis asam nukleat, menghambat metabolisme energi pada sel (Savira, 2018). Menurut Koru (2007) pemanfaatan senyawa bioaktif polifenol daun tembakau *Na-Oogst* afkir dapat

memberikan keuntungan secara ekonomis dan mengurangi limbah hasil pertanian karena aktivitas antibakteri dengan polifenol yang dihasilkan.

Ekstraksi daun tembakau menghasilkan ekstrak daun tembakau yang berupa senyawa volatil, beberapa senyawa volatil ditemukan dalam minyak atsiri tembakau dapat diekstrak dengan metode ekstraksi pelarut (Nurnasari dan Subiyakto, 2011). Senyawa tersebut menjadi penentu standar kualitas tembakau dengan aroma khas yang dimilikinya. Jenis senyawa pada ekstrak tersebut beragam komposisinya untuk setiap hasil ekstraksi, tergantung karakteristik perlakuan pendahuluan bahan yang dikenakan sebelumnya. Ekstraksi senyawa volatil dan semi volatil tembakau dapat dilakukan melalui metode ekstraksi pelarut (*solvent extraction*) dan distilasi (*distillation*). Pelarut yang banyak digunakan untuk menghasilkan komponen bioaktif daun tembakau pada metode ekstraksi pelarut (Xin *et al.*, 2006). Ekstraksi etanol daun tembakau pada konsentrasi 20% (b/v) tergolong lemah dalam kemampuan untuk menghambat *Escherichia coli*, dan tergolong sedang pada konsentrasi 40%-60% (Tarigan *et al.*, 2017). Pada penelitian yang telah dilakukan Fatmawati (2019) menunjukkan bahwa ekstrak daun tembakau kasturi inferior saat dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut etanol 80%, menghasilkan aktivitas antioksidan sebesar 64,05 mg/ml, lebih besar dibandingkan dengan ekstraksi menggunakan pelarut air 90°C diperoleh nilai 48,90 mg/ml.

Penyakit yang paling sering menyerang dan mengganggu sistem metabolisme tubuh terutama di saluran pencernaan adalah infeksi. Beberapa mikroorganisme secara umum menyebabkan penyakit infeksi pada saluran pencernaan, baik yang bersifat Gram negatif maupun Gram positif. Infeksi saluran pencernaan disebabkan oleh adanya kontaminasi mikroba patogen yang ada pada bahan pangan. Menurunnya kualitas pangan dapat terjadi karena kontaminasi bakteri patogen. Mikroba patogen yang dapat menyebabkan penyakit pada organ pencernaan yakni *Staphylococcus aureus*, sedangkan *Salmonella typhi* bakteri patogen yang dapat menyebabkan diare dan demam tifoid (penyakit infeksi akut usus halus) pada manusia (Widoyono, 2011). Menurut Balai Besar POM Surabaya (2018),

menyatakan bahwa data kasus keacunan di Jawa Timur terjadi sebanyak 2.115 kasus keracunan dari 76 rumah sakit di Jawa Timur.

Berdasarkan potensi yang dimiliki ekstrak daun tembakau, maka penelitian untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan daya hambat bakteri ekstrak daun tembakau Na-Oogst afkir terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* perlu dilakukan. Dengan metode ekstraksi yang tepat maka dapat dihasilkan ekstrak daun tembakau Na-Oogst afkir yang memiliki senyawa antioksidan dan antibakteri yang baik untuk mengendalikan mikroba patogen. Penelitian diharapkan dapat meningkatkan nilai ekonomi daun tembakau Na-Oogst afkir.

## 1.2 Perumusan Masalah

Industri pengolahan cerutu dapat menghasilkan limbah berupa krosok tembakau afkir, yaitu berupa tembakau yang tidak lolos sortir, daun cacat, daun berlubang, dan daun pucuk. Persentase jumlah daun afkir tersebut bisa mencapai 60%. Selama ini pemanfaatan daun krosok afkir belum maksimal dan masih sebagai limbah. Upaya peningkatan nilai guna daun tembakau Na-Oogst dapat dilakukan dengan memisahkan senyawa polifenol yang terkandung dengan memisahkan senyawa polifenol yang terkandung didalamnya. Polifenol termasuk flavonoid diketahui mempunyai spektrum aktivitas antibakteri yang luas. Mekanisme kerja flavonoid yaitu dengan cara membentuk senyawa kompleks protein-fenol ekstraseluler dan merusaknya, sehingga mengganggu integritas membran sel.

Ekstraksi dengan pelarut didasarkan pada sifat kepolaran zat dalam pelarut yang ekstraksi senyawa flavonoid daun tembakau Na-Oogst afkir dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut polar. Ekstraksi senyawa flavonoid daun tembakau Na-Oogst afkir dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut polar. Pada penelitian ini, menggunakan jenis pelarut etanol dan air panas. Menurut Trifani (2012) etanol dan air digunakan sebagai pelarut karena bersifat polar, universal, dan mudah didapat. Senyawa polar merupakan senyawa yang larut didalam air. Senyawa metabolit sekunder yang akan diambil pada buah pare bersifat polar

sehingga proses ekstraksi menggunakan pelarut polar. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan ekstraksi daun tembakau afkir menggunakan pelarut etanol dan air dan perlu teknik ekstraksi yang tepat agar diperoleh total polifenol dan aktivitas antioksidan, dari perlakuan terbaik akan diuji senyawa aktif antibakteri yang efektif menurunkan aktivitas bakteri pathogen.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. mengetahui jenis pelarut yang tepat untuk mengekstrak senyawa polifenol daun tembakau Na-Oogst afkir,
2. mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak polifenol daun tembakau Na-Oogst afkir, dan
3. mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak polifenol daun tembakau Na-Oogst afkir terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah :

1. mengurangi limbah daun tembakau Na-Oogst yang tidak lolos sortiran (afkir),
2. meningkatkan nilai ekonomi daun tembakau Na-Oogst afkir dalam bentuk ekstrak.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tembakau Na-Oogst

Tanaman tembakau memiliki karakteristik yang berbeda – beda sesuai dengan varietas tanaman. Bentuk daun tanaman tembakau juga bervariasi bergantung pada jenis tanaman tembakau, ada yang berbentuk ovalis, oblongus, orbicularis, dan ovatus. Tebal tipisnya daun tembakau juga berbeda – beda, tergantung jenis daun, varietas yang ditanam, kesuburan tanah, beserta pengelolaan. Daun tumbuh berselang-seling mengelilingi batang tanaman. Jumlah daun dalam satu tanaman 28-32 helai. (Usmadi dan Hartana, 2007). Menurut Eurika dan Hapsari (2017) daun tembakau afkir (limbah) masih mengandung bahan yang bersifat antibakteri dan antijamur yaitu golongan fenol berupa flavonoid, golongan alkaloid berupa nikotin, golongan saponin berupa steroid dan juga minyak atsiri berupa terpenoid.

Budidaya tanaman tembakau tersebar di seluruh Nusantara dan tembakau mempunyai kegunaan yang sangat banyak terutama untuk bahan baku rokok. Tembakau sebagai komoditi perkebunan dengan nilai jual tinggi, namun pemanfaatannya masih dianggap menimbulkan dampak yang negatif. Pemanfaatan alternatif tembakau secara tradisional telah banyak diaplikasikan oleh masyarakat diantaranya adalah penggunaannya sebagai obat tanaman sebagai kunyahan (*kinang*) atau sebagai pasta gigi, terutama di kalangan ibu-ibu di pedesaan. Pada penelitian ilmiah sebelumnya, telah diketahui bahwa daun tembakau dapat dimanfaatkan sebagai bakterisida nabati karena sifatnya yang dapat menghambat bakteri (Pratiwi, 2011).

Tembakau merupakan produk pertanian semusim yang bukan termasuk komoditas pangan. Berdasarkan musim tanam, tembakau dibedakan menjadi tembakau Voor-Oogst dan Na-Oogst. Tembakau NO (Na-Oogst) merupakan tembakau yang ditanam di akhir musim kemarau dan dipanen atau dipetik pada awal musim penghujan, dan tembakau VO (Voor-Oogst) merupakan jenis tembakau yang ditanam diakhir musim hujan dan dipetik pada musim kemarau.

Bedasarkan data Dinas Perkebunan Provinsi Jawa Timur, produksi tembakau di Jawa Timur selama tahun 2010-2016 mengalami penurunan hingga mencapai 42 ribu ton. Kabupaten dengan produksi tembakau Na-Oogst terbesar di Jawa Timur pada tahun 2016 yaitu Kabupaten Probolinggo sebesar 9,65 ribu ton. Pada tahun 2016 mengalami penurunan yang sangat drastic sekali sehingga membuat produksi keseluruhan Jawa Timur pun mengalami penurunan (Badan Pusat Statistik, 2017).

Tanaman tembakau secara umum dapat tumbuh dengan baik pada suhu 27°C atau berkisar antara 22°C – 33°C. Tipe tanah berstruktur remah, sedikit berpori, pasir halus (tanah ringan), dengan aerasi yang baik sangat cocok untuk pertumbuhan tembakau. Karakteristik tanah sebagai media tumbuh, sangat menentukan pertumbuhan tanaman tembakau. Sifat – sifat fisik, kimia, dan biologi tanah yang optimal (kualitas tanah baik) akan mendukung keberlanjutan tanaman berproduksi dan berkualitas tinggi. Selain senyawa alkaloid berupa nikotin, terdapat senyawa aktif lain yang ada pada daun tembakau spesies *Nicotiana tabacum* yaitu senyawa flavonoid, saponin, steroid, dan terpenoid. komposisi kimia daun tembakau selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 2.1

Tabel 2.1 Komposisi kimia daun tembakau Na-Oogst afkir

Golongan	Kandungan (%)
Selulose	7-16
Gula	0-22
Trigliserida	1
Protein	3,5-20
Nikotin	0,6-5,5
Pati	2-7
Bahan Organik	7-25
Abu (Ca, K)	9-25
Lilin	2,5-8
Pektinat, polifenol, flavon, karotenoid, minyak atsiri, parafin, sterin, dll.	7-12

Sumber : Rodgman, 2006

## 2.2 Jenis Senyawa Bioaktif Daun Tembakau

Senyawa kimia dalam tumbuhan tembakau ini dapat bersifat antibakteri yaitu mampu untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Beberapa senyawa metabolit sekunder yang meliputi fenol dan senyawa fenolik, alkaloid dan minyak atsiri berupa terpenoid yang memiliki sifat antibakteri. Zat-zat atau senyawa tersebut masing-masing memiliki cara sendiri dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Sebagian senyawa dapat merusak lapisan sel bagian luar, serta sebagian yang lain bereaksi langsung menembus lapisan dalam dari sel tersebut. Selain itu ada yang mempengaruhi lingkungan dari bakteri uji, sehingga bakteri tidak dapat tumbuh dengan baik. Pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Pratiwi (2017) menyatakan bahwa dengan terbentuknya diameter zona hambat di sekitar cakram yang sebelumnya diinkubasi 24 jam maka diperoleh hasil bahwa ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum L*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, dengan rerata ukuran zona hambat yang berbeda berdasarkan perlakuan konsentrasi ekstrak. Selain itu, dari penelitian yang dilakukan oleh Duangsri dkk (2012) menunjukkan bahwa ekstrak daun tembakau dengan konsentrasi 50%, 80% dan 100% efektif menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Streptococcus aureus*. Kelompok fenol yang mencakup senyawa flavonoid diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*, *E. coli*, dan *B. subtilis*. Zona hambat yang terbentuk pada media tumbuh ketiga bakteri tersebut di media agar oleh polifenol dengan konsentrasi 1 mg /ml secara berurutan adalah 17.7 mm, 20.2 mm, dan 12.9 mm. Berikut merupakan mekanisme senyawa metabolit daun tembakau sebagai antibakteri:

### 1. Flavonoid

Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol, dimana senyawa ini mempunyai sifat efektif menghambat pertumbuhan virus, bakteri dan jamur. Mekanisme kerja dari senyawa flavonoid dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara merusak permeabilitas dinding sel bakteri (Sabir, 2005). Selain itu gugus hidroksil yang terdapat pada struktur senyawa flavonoid menyebabkan perubahan komponen organik dan transport nutrisi yang akhirnya akan mengakibatkan timbulnya efek toksik terhadap bakteri.

Menurut Sanchez (2011), flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol dan flavonoid pada tumbuhan berfungsi untuk mengatur pertumbuhan, antibakteri. Hal ini dikarenakan flavonoid memiliki spectrum aktivitas antibakteri yang luas dengan mengurangi kekebalan pada organisme. Mekanisme dari antibakteri pada penelitian sebelumnya flavonoid membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler dan dapat merusak membrane sel terhadap bakteri *Streptococcus mutans* yang mengakibatkan terganggunya pertumbuhan sel bahkan menyebabkan sel mati.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Duangsri (2012) menyatakan bahwa senyawa flavonoid juga berfungsi dalam menghambat pembentukan spora jamur patogen bakteri *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* dan *Candida albicans*. Flavonoid berfungsi merusak dinding sel jamur. Flavonoid dapat berikatan dengan dinding sel melalui sebuah kompleks protein-fenol, yang melibatkan adanya ikatan hidrogen antara protein dan fenol. Kompleks ini nantinya akan dapat menyebabkan kerusakan (denaturasi) ikatan hidrogen dalam protein pada dinding sel jamur. Selanjutnya, kerusakan inilah yang membuat matriks intraseluler jamur keluar. Keluarnya matriks ini menyebabkan kematian sel jamur

## 2. Alkaloid

Alkaloid berpotensi sebagai antibakteri karena dapat merusak dinding sel. 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). 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.

Senyawa alkaloid juga terkandung dalam tembakau adalah nornikotin dan anabasin yang dapat menimbulkan kecanduan apabila dikonsumsi. Menurut Cushnie dan Lamb, (2005), senyawa nikotin yang tergolong alkaloid tersebut telah diujikan kemampuan aktivitas antibakterinya terhadap beberapa bakteri, salah satunya dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi minimum yang digunakan >10% dan >0%.

Konsentrasi nikotin dalam daun tembakau diperkirakan sekitar 6-8%. Kemampuan aktivitas antibakteri oleh ekstrak nikotin daun tembakau ditunjukkan dengan adanya penurunan total bakteri uji dalam media cair. (Juliantina, 2008).

### 3. Terpenoid dan Steroid

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). 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).

Senyawa steroid dan terpenoid yang merupakan golongan minyak atsiri, senyawa yang berperan sebagai antibakteri. Waluyo (2004) menyatakan minyak atsiri dapat menghambat enzim dalam pembentukan struktur komponen hingga pembentukan dinding sel bakteri terganggu. Mekanisme kerusakan dinding sel disebabkan oleh adanya akumulasi komponen lipofilik yang terdapat pada dinding sel atau membran sel sehingga menyebabkan perubahan komposisi penyusun dinding sel. Minyak atsiri yang aktif sebagai antibakteri pada umumnya juga mengandung fenol yang merupakan gugus fungsi hidroksil (-OH). dan karbonil. Hal ini telah dibuktikan pada penelitian yang dilakukan oleh Duangsri (2012) menyatakan bahwa senyawa terpenoid yang merupakan golongan minyak atsiri diduga juga berperan sebagai antibakteri. Minyak atsiri dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* dan *Candida albicans*, kerja enzim yang terlibat dalam produksi energi dan pembentukan

komponen struktural sehingga mengganggu pembentukan dinding sel bakteri. Pada penelitian sebelumnya menyatakan bahwa senyawa steroid dan terpenoid yang tergolong komponen minyak atsiri telah dibuktikan kemampuan antibakterinya terhadap *Staphylococcus aureus*, *E. coli* pada konsentrasi 1mg/ml. diameter zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi tersebut bakteri uji secara beruntun adalah 15,2 mm, dan 15,0 mm (Parlic, *et al*,2002).

#### 4. Saponin

Saponin dapat bekerja sebagai antibakteri dengan cara mengganggu stabilitas membran sel bakteri, yang menyebabkan komponen penting bakteri seperti protein, asam nukleat dan nukleotida sehingga bakteri menjadi lisis. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri yaitu dapat menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel. Saponin dapat menjadi anti bakteri karena zat aktif permukaannya mirip detergen, akibatnya saponin akan menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri dan merusak permeabilitas membran. Rusaknya membran sel ini sangat mengganggu kelangsungan hidup bakteri. Saponin berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan kemudian mengikat membran sitoplasma sehingga mengganggu dan mengurangi kestabilan membran sel. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel. Agen antimikroba yang mengganggu membran sitoplasma bersifat bakterisida (Lestari, 2016).

### 2.3 Aktivitas Senyawa Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa-senyawa yang mampu menghilangkan, membersihkan, menahan pembentukan ataupun memadukan efek spesies oksigen reaktif atau antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat, dan mencegah proses oksidasi lipid. Dalam arti khusus, antioksidan adalah zat dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi antioksidan radikal bebas dalam oksidasi lipid. Penggunaan senyawa antioksidan juga anti radikal saat ini semakin meluas seiring dengan semakin besarnya pemahaman masyarakat tentang peranannya dalam menghambat penyakit

degenerative seperti penyakit jantung, arteriosclerosis, kanker, serta gejala penuaan (Tahir, 2013). 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). 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).

Aktivitas antioksidan dari suatu tumbuhan pada umumnya disebabkan oleh adanya senyawa fenolik baik sebagai polifenol maupun fenol sederhana. Semakin besar kandungan total polifenol maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Senyawa fenolik dapat berupa golongan flavonoid dan tanin yang merupakan polifenol (Mohammad, *et al.* 2012). Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Antioksidan salah satu substansi yang dalam konsentrasi rendah sudah dapat menghambat atau menangkalkan proses oksidasi dan juga merupakan senyawa yang memberi elektron atau reduktan (Winarsih, 2007). Antioksidan dapat bersumber dari zat-zat sintetis atau zat-zat alami hasil isolasi. Antioksidan alami maupun sintetis dapat menghambat proses oksidasi lipid, mencegah kerusakan, dan perubahan degradasi komponen organik dalam bahan makanan (Alfira, 2014).

Pada penelitian sebelumnya hasil uji antioksidan menyatakan bahwa dari ekstrak etanol 96% dan air pada daun tembakau yang diambil dari Desa Cabbenge Kabupaten Soppeng memiliki aktivitas antioksidan, dengan indikator nilai  $IC_{50}$  masing-masing adalah sebesar 2,96 ppm dan 3,96 ppm. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi polifenol pada daun tembakau memiliki dampak signifikan terhadap penentuan kapasitas DPPH. Ekstraksi dengan konsentrasi 50% dan 80% pelarut organik yang digunakan menunjukkan aktivitas radikal DPPH yang cukup

tinggi. Ekstrak daun tembakau dengan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi, ekstrak yang diperoleh dengan menggunakan pelarut tinggi adalah pengambilan radikal yang jauh lebih baik efektivitas daripada yang menggunakan pelarut polaritas kurang. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan yang sangat kuat apabila nilai  $IC_{50} \leq 50$  ppm, antioksidan kuat bila nilai  $IC_{50}$  antara 51 – 100ppm (Prakash, 2011).

#### 2.4 Ekstraksi Senyawa Bioaktif

Tujuan ekstraksi adalah untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan atau menghilangkan komponen yang tidak diinginkan dari suatu bahan yang akan diekstrak dengan menggunakan pelarut selektif. Selama ekstraksi, pelarut akan berdifusi ke dalam bahan dan melarutkan senyawa yang terkandung didalamnya berdasarkan kepolaran yang sama (Ncube *et al.*, 2008). Berdasarkan bentuk fase yang diekstraksi digolongkan menjadi ekstraksi cair-cair dan ekstraksi cair-padat. Ekstraksi pad-cair atau *leaching* merupakan metode pemisahan satu atau beberapa komponen (*solute*) dari campurannya dalam padatan yang tidak dapat larut (*inert*) dengan menggunakan pelarut (*solvent*) berupa cairan. Pemisahan dapat terjadi karena adanya *driving force* yaitu perbedaan konsentrasi solute dipadatan dengan pelarut dan adanya perbedaan kemampuan melarut komponen dalam campuran. Proses ekstraksi padat cair secara umum terdiri dari lima tahap yaitu :

1. Pelarut berpindah dari *bulk solution* ke seluruh permukaan padatan (terjadi pengotakan antara pelarut dan padatan). Proses perpindahan pelarut dari *bulk solution* ke permukaan padatan berlangsung seketika saat pelarut dikontakan dengan padatan. Proses ini dapat berlangsung dengan dua cara yaitu perkolasi atau maserasi.
2. Pelarut berdifusi ke dalam padatan. Proses difusi pelarut ke padatan dapat terjadi karena adanya perbedaan konsentrasi (*driving force*) antara *solute* di pelarut dengan *solute* di padatan.
3. *Solute* yang ada dalam padatan larut ke dalam pelarut. *Solute* dapat larut dalam pelarut karena adanya gaya elektostatik antar molekul, yaitu disebut gaya

dipol-dipol, sehingga senyawa yang bersifat polar-polar atau nonpolar dapat saling berikatan.

4. *Solute* berdifusi dari padatan menuju permukaan padatan, proses difusi ini disebabkan oleh konsentrasi *solute* dalam pelarut yang berada di dalam pori-pori padatan lebih besar daripada permukaan padatan.
5. *Solute* berpindah dari permukaan padatan menuju *bulk solution*. Pada tahap ini perpindahan massa *solute* ke *bulk solution* lebih kecil daripada di dalam padatan. Proses ekstraksi berlangsung hingga kesetimbangan tercapai yang ditunjukkan oleh konsentrasi *solute* dalam *bulk solution* dengan padatan. (Sa'adah, 2010).

Pada ekstraksi cair-cair, satu komponen bahan atau lebih dari satu campuran dipisahkan dengan bantuan pelarut. Ekstraksi cair-cair terutama digunakan apabila pemisahan campuran dengan cara destilasi tidak mungkin dilakukan (misalnya karena karena kepekaannya terhadap panas) atau tidak ekonomis. Ekstraksi cair-cair selalu terdiri dari sedikitnya dua tahap, yaitu pencampuran secara intensif bahan ekstraksi dengan pelarut dan pemisahan kedua fase cair itu sesempurna mungkin. Pada ekstraksi cair-cair, zat terlarut dipisahkan dari cairan pembawa (diulen) menggunakan pelarut cair. Campuran cairan pembawa dan pelarut ini adalah heerogen, jika dipisahkan terdapat 2 fase yaitu fase diluen (rafinat) dan fase pelarut (ekstrak). Perbedaan konsentrasi zat terlarut di dalam suatu fasa dengan konsentrasi pada keadaan setimbang merupakan pendorong terjadinya pelarutan (pelepasan) zat terlarut dari larutan yang ada. Gaya dorong (*driving force*) yang menyebabkan terjadinya proses ekstraksi dapat ditentukan dengan mengukur jarak system dari kondisi setimbang (Indra Wibawa, 2012).

Untuk mencapai proses ekstraksi cair-cair yang baik, pelarut yang digunakan harus memenuhi kriteria yaitu kemampuan tinggi melarutkan komponen zat terlarut dalam campuran, kemampuan tinggi untuk diambil kembali, perbedaan berat jenis antara ekstrak dan rafinat lebih besar, pelarut dan larutan yang akan diekstraksi, tidak merusak alat secara korosi, tidak mudah terbakar, tidak beracun dan harganya relatif murah (Martunus, 2004).

Beberapa kandungan senyawa volatil yang ditemukan dalam minyak atsiri tembakau diantaranya neophitadien dan eugenol pada tembakau berpengaruh terhadap hasil ekstrak yang dihasilkan. Pelarut yang digunakan yaitu etanol untuk menghasilkan komponen bioaktif daun tembakau. Metode ekstraksi pelarut disebut juga metode maserasi. Pada penelitian Puspitasari (2010) menggunakan metode ekstraksi maserasi, dengan prinsip maserasi adalah ekstraksi zat aktif yang dilakukan dengan cara merendam serbuk dalam pelarut yang sesuai selama beberapa hari pada temperatur kamar, terlindungi dari cahaya, pelarut akan masuk ke dalam sel-sel tanaman melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara konsentrasi larutan didalam sel dengan diluar sel. Larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesa keluar dan diganti oleh pelarut dengan konsentrasi rendah.

Flavonoid merupakan golongan terbesar dari fenol. Flavonoid umumnya terdapat dalam tumbuhan berbentuk aglikol maupun terikat pada gula sebagai glikosida. Pada penelitian Pratiwi (2011) dari hasil ekstraksi bahwa senyawa flavonoid pada ekstrak etanol daun tembakau diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*, *E. coli*, dan *B. subtilis*. Zona hambat yang terbentuk pada media tumbuh ketiga bakteri tersebut di media agar oleh polifenol dengan konsentrasi 1 mg /ml secara berurutan adalah 17.7 mm, 20.2 mm, dan 12.9 mm. Faktor-faktor yang mempengaruhi laju ekstraksi yang meliputi:

1. Persiapan sampel

Persiapan sampel meliputi pengeringan . Sebelum dilakukan ekstraksi bahan dikeringkan terlebih dahulu untuk mengurangi kadar airnya, dengan pengeringan yang sempurna akan menghasilkan ekstrak dengan kemurnian yang tinggi. Bahan yang sudah dikeringkan kemudian dilakukan pengecilan ukuran. Tahapan ini bertujuan untuk memperluas bidang kontak antara sampel dengan pelarut, sehingga jumlah ekstrak yang diperoleh akan semakin besar.

2. Pemilihan jenis pelarut

Pemilihan jenis pelarut dalam ekstraksi didasarkan pada jenis sampel yang digunakan. Faktor yang perlu diperhatikan dalam memilih jenis pelarut antara lain

yaitu daya melarutkan (tingkat kepolaran), titik didih, sifat racun, mudah tidaknya terbakar, dan pengaruhnya terhadap peralatan ekstraksi (Hammado *et al.*, 2013).

Menurut Markham (1988), polifenol merupakan senyawa polar yang dapat dipisahkan dengan pelarut polar seperti air, methanol, etanol, butanol, imetil sulfoksida dan aseton atau campuran pelarut tersebut. Pelarut air memiliki keuntungan yaitu relatif murah, tidak mudah menguap, dan tidak mudah terbakar. Namun penggunaan pelarut air memiliki kelamahan antara lain dapat dimungkinkan terjadinya reaksi hidrolisa, dapat ditumbuhi jamur dan mikroba, tidak selektif, titik didih 100°C (tidak cocok untuk senyawa yang terurai pada temperatur tinggi), dan untuk pengeringan dibutuhkan waktu yang lama. Pada penelitian yang telah dilakukan oleh Melia dkk (2018) menunjukkan bahwa perlakuan jenis pelarut berpengaruh sangat nyata terhadap total flavonoid ekstrak kulit buah lemon, total flavonoid tertinggi ekstrak kulit buah lemon diperoleh menggunakan pelarut etanol 70% yaitu 7,14 mg QE/g sedangkan total flavonoid menggunakan pelarut aquades dihasilkan sebanyak 4,34 mg QE/g.

Jenis pelarut lain yang biasa digunakan untuk ekstraksi senyawa bioaktif adalah etanol. Penggunaan etanol juga didasarkan oleh keunggulan sebagai pelarut zat bioaktif. Pelarut etanol tidak bersifat racun, tidak menyebabkan pembengkakan membrane sel, dan menghambat kerja enzim. Etanol juga efektif menghasilkan bahan aktif yang optimal karena hanya terdapat sedikit kehilangan produk yang larut dalam pelarut. Pada pengujian daya hambat ekstrak daun tembakau menggunakan pelarut etanol dengan konsentrasi 80% b/v dan 100% b/v menghasilkan hasil yang baik dalam proses menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* dengan diameter daya hambatnya 7 mm dan untuk *S.aureus* diameter daya hambatnya yaitu 8 mm. hal ini dikarenakan dinding sel bakteri *S.aureus* lebih tipis dibandingkan *E.coli* sehingga mudah rusak oleh ekstrak daun tembakau dengan menggunakan pelarut etanol (Pratiwi, 2011).

### 3. Laju ekstraksi

Laju ekstraksi juga dipengaruhi oleh kuantitas pelarut yang digunakan, semakin banyak jumlah pelarut maka semakin banyak pula jumlah ekstrak yang didapatkan. Selain itu, faktor yang mempengaruhi laju ekstraksi adalah tipe

pelarut sampel, waktu, jumlah sampel, suhu dan jenis pelarut yang digunakan (utami, 2019). Tambahkan data2 hasil penelitian dari referensi.

#### 4. Suhu pelarut

Metode maserasi merupakan metode pengadukan pada suhu kamar sehingga rendemen yang dihasilkan lebih sedikit karena tidak semua metabolit sekunder tertarik secara sempurna (Damar, dkk.,2014). Flavonoid merupakan senyawa fenol yang memiliki system aromatic yang terkonjungsi. Beberapa golongan flavonoid memiliki ikatan glikosia dengan molekul gula yang mudah rusak pada suhu tinggi, sehingga suhu 50°C relatif aman serta mencegah terjadinya kerusakan pada senyawa metabolit sekunder, khususnya Flavonoid. (Oktavia, 2011). Metode ekstraksi dengan pelarut etanol 80% dan 95% lama ekstraksi 1 jam dan 1,5 jam dan suhu ekstraksi 85 – 100°C mampu memisahkan minyak kedelai secara baik (Yusuf, 2008).

### 2.5 Mekanisme Penghambatan Senyawa Antibakteri

Antibakteri digambarkan sebagai produk alami organic 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 *reverse transkriptase*, metaboli *intermediate* dan DNA *topoisomerase* sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Kordi *et al*,2012). 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 bakterisidal adalah zat yang bekerja mematikan bakteri sedangkan zat antibakteri bersifat bakteriostatik pada konsentrasi rendah dan bersifat bakterisidal pada konsentrasi rendah dan bersifat bakterisidal pada konsentrasi tinggi (Pratiwi, 2008)

Menurut Pratiwi (2008) menyatakan bahwa berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakteriostatik dan ada yang bersifat membunuh mikroba,

banyak antibiotik yang dibuat secara semisintetik atau sintetik penuh. Obat yang digunakan untuk membasmi mikroba, penyebab infeksi pada manusia, ditentukan harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin. Mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antibakteri dapat disebabkan oleh beberapa cara antara lain :

1. Mengganggu pembentukan dinding sel

Mekanisme ini terjadi disebabkan oleh adanya akumulasi komponen lipofilat yang terdapat pada dinding sel sehingga menyebabkan perubahan komposisi penyusun dinding sel. Terjadinya akumulasi senyawa antibakteri yang dipengaruhi oleh bentuk tak terdisosiasi. Pada konsentrasi rendah molekul phenol yang terdapat pada minyak *thyme* kebanyakan berbentuk tak terdisosiasi, lebih hidrofobik dan mengikat daerah hidrofobik membrane protein, dan dapat melarut baik pada fase lipid dari membrane bakteri.

2. Bereaksi dengan membrane sel

Komponen bioaktif dapat mempengaruhi integritas membrane sitoplasma yang dapat mengakibatkan kebocoran materi intraseluler. Misalnya senyawa fenol yang dapat mengakibatkan lisis sel dan menyebabkan denaturasi protein, menghambat pembentukan protein sitoplasma dan asam nukleat, serta menghambat ikatan ATP-ase pada membrane sel.

3. Menginaktivasi enzim

Metabolit sekunder akan memblokir biosintesis dinding sel dengan menghambat kerja enzim dalam mensintesis komponen berbeda dari dinding sel. Antibakteri yang mempengaruhi sintesis protein bertindak sebagai perusak unit ribosom, mencegah translasi dan mengikat unit 30S yang menyebabkan terjadinya kesalahan translasi, memproduksi racun dan mempengaruhi protein. Efek senyawa antibakteri dapat menghambat kerja enzim dengan komponen senyawa antibakteri.

4. Menginaktivasi fungsi material genetic

Komponen bioaktif dapat mengganggu pembentukan asam nukleat (RNA dan DNA) dan menyebabkan terganggunya transfer genetic yang selanjutnya akan

menginaktivasi atau merusak materi genetic sehingga terganggunya proses pembelahan sel untuk pembiakan.

## 2.6 Pengujian Antibakteri Metode Dilusi (Pengenceran)

Pengujian aktivitas antibakteri oleh ekstrak daun tembakau dengan menggunakan metode dilusi ini untuk mengukur konsentrasi hambat minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Metode dilusi ini menjadi dua yaitu: dilusi cair dan dilusi padat. Metode dilusi cair dilakukan dengan cara membuat seri pengenceran senyawa uji pada media cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Metode dilusi padat sama dengan dilusi cair hanya saja yang membedakan dari bahan media yang digunakan padat. kedua metode ini memiliki keuntungan yaitu satu konsesntrasi senyawa uji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Rahayu, 2009). Pada penentuan nilai KHM dan KBM dengan dilusi padat ini menggunakan dua macam kontrol, yaitu kontrol kontaminasi media dan kontrol pertumbuhan bakteri uji *E.coli* dan *S.aureus* (kontrol negatif). Metode dilusi ini digunakan untuk menentukan konsentrasi minimum dari zat antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Metode ini dilakukan dengan cara mencampurkan zat pada media pembedihan yang kemudian diinokulasikan dengan bakteri lalu diinkubasikan. Hasil pengujian didapat dengan mengamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri (Pratiwi, 2008).

Pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Yusrini (2014) menyatakan bahwa penilaian aktivitas antibakteri dilihat dari pengukuran zona inhibisi yang dipengaruhi kelarutan dan difusi bahan yang diuji sehingga kurang efektif dalam menginhibisi mikroorganismenya. Sedangkan metode dilusi dilakukan untuk mengamati aktivitas antibakteri dan dinyatakan lebih efektif karena bahan langsung berkontak dengan mikroorganismenya. Nilai KHM diperoleh dengan mengamati perubahan kekeruhan suspensi bakteri *Enterococcus faecalis*. yang telah diinkubasi 37°C selama 24 jam dan nilai KBM diperoleh dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan bakteri pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA) sehingga hasil penelitian akan lebih *representative*.

## 2.7 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif, berbentuk kokus dengan diameter 0,7 - 0,9  $\mu\text{m}$ , pola penataan berbentuk bola berpasangan, dan hidup secara aerob maupun anaerob fakultatif, bersifat non motil dan tidak membentuk spora. Bakteri ini sering ditemukan pada makanan yang memiliki kandungan protein cukup tinggi. Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu pengaruh lingkungan yaitu panas, adanya air, oksigen dan cahaya. Bakteri ini berwarna putih sampai kuning keemasan dan tumbuh optimum pada suhu 37°C dengan pH 7.0-7.5 dan dapat tumbuh dengan baik pada larutan NaCl 15% (Todar, 2004). Bakteri ini mampu memproduksi metabolit ekstra seluler seperti katalase, koagualase, eksotosin, lekosidin, t toksin *syndrome shock toxic*, dan enterotoksin (Brooks *et al*, 2001).

Daun tembakau diketahui dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi ekstrak daun tembakau 10% - 40%. Penelitian yang telah dilakukan oleh Dewi (2018) menyatakan bahwa konsentrasi hambat minimum (KHM) jahe merah menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi hambat minimumnya yang diketahui yakni 10001mg/ml aktivitas antimikroba dari ekstrak tanaman sangat dipengaruhi oleh jenis dan dosis yang digunakan. Menurut Duangsri (2012), hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun tembakau dengan konsentrasi 50% - 100% efektif menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Menurut Astuti (2015), menyatakan bahwa penentuan KHM dari ekstrak etanol dan ekstrak air daun Bandotan dilakukan dengan cara dilusi cair. Hasil percobaan kadar hambat minimum ekstrak etanol daun bandotan terhadap *Staphylococcus aureus* adalah sebesar 12,5 mg/mL, sedangkan kadar hambat minimum ekstrak etanol daun bandotan terhadap *E. coli* adalah sebesar 25 mg/m. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ajeng (2019) menyatakan bahwa hasil nilai IC<sub>50</sub> bakteri *Staphylococcus aureus* ekstrak daun tembakau kasturi dengan pelarut etanol sebesar 0,003 mg/ml, sedangkan nilai KHM yang dihasilkan 0,611 mg/ml

## 2.8 *Salmonella typhi*

*Salmonella typhi* merupakan kuman patogen penyebab demam tifoid. Inflamasi yang dapat merusak usus dan organ-organ hati. Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif batang, tidak membentuk spora, motil, berkapsul dan berflagella (bergerak dengan rambut getar). Bakteri ini dapat hidup pada pH 6-8 pada suhu 15-41°C (suhu optimal 37°C). Bakteri ini dapat mati dengan pemanasan 54,4°C selama satu jam dan suhu 60°C selama 15 – 20 menit, pasteurisasi, pendidihan dan klorinasi (Tumbelaka, 2003).

Menurut Pratiwi (2017), pada penelitian sebelumnya berdasarkan senyawa kimia yang dimiliki oleh daun tembakau yaitu flavonoid, saponin dan alkaloid pada buah tomat, dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhusa* pada konsentrasi minimal (paling rendah) 20%, dengan zona hambat. Kandungan yang berfungsi sebagai antibakteri yaitu senyawa flavonoid, saponin, dan alkaloid. Senyawa tersebut dapat berdifusi pada media agar, sehingga kontak dengan bakteri dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhusa*. Senyawa flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik.

Pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Amiruddin (2017) menyatakan bahwa pada penelitian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) terhadap *Salmonella typhi* secara *In Vitro* dengan Perlakuan terdiri dari 8 konsentrasi ekstrak daun tempuyung berkisar 2,5 µg/disk – 80 µg/disk yang diinokulasi sebanyak 10 µl suspensi sel dalam Mueller Hinton Agar, setelah itu diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C. Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan mulai terjadi pada pemberian ekstrak daun tempuyung pada konsentrasi 10 µg/disk, pertumbuhan *Salmonella typhi*. Kadar Hambat Minimal ekstrak daun tempuyung adalah 10 µg/disk secara kualitatif dan 4,43 µg/disk secara kuantitatif.

Pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Azzahra (2019) pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun alpukat dengan menggunakan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%, setiap perlakuan di inokulasikan

dengan suspensi bakteri kemudian ditetesi ekstrak etanol daun alpukat, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil yang diperoleh ekstrak etanol daun alpukat konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* berturut-turut  $8,50 \pm 0,38$  mm;  $7,45 \pm 1,03$  mm;  $9,35 \pm 0,08$  mm dan  $9,44 \pm 0,36$  mm, zona hambat ekstrak etanol daun alpukat terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* menunjukkan kategori antibakteri resisten. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun alpukat memiliki aktivitas menghambat bakteri *Salmonella typhi*.



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Waktu penelitian dimulai pada bulan September 2018 sampai Maret 2019.

### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

#### 3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan yaitu daun tembakau krosok Na-Oogst afkir (daun tembakau tidak lolos sortir seperti daun berlubang, daun catat, dan daun terserang hama), yang diperoleh dari perkebunan tembakau PTPN di kawasan Ajung Kabupaten Jember. Untuk bahan yang digunakan pada proses ekstraksi daun tembakau diantaranya etanol 80% dan air panas dengan suhu 90°C. Bahan pengujian yang digunakan yaitu aquades, NaCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7%, media NA (Nutrient Agar), DPPH (1,1 *diphenyl-1-2Picrylhidrazil*), reagen *Follin-Ciocalteu*. Bakteri uji yang digunakan yaitu kultur murni bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

#### 3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian untuk proses ekstraksi yaitu blender (Miyako, Indonesia), neraca analitik (Ohaus, USA) shaker waterbath (Memmert D-91126, Jerman), rotary evaporator (Butchi, Jerman). Sedangkan alat lainnya yang digunakan pada pengujian yaitu jarum ose, bunsen, korek api, pipet mikro (Biohit 12636255, Jerman), *colony counter* (Stuart Scientific), spektrofotometer (Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS, China), *laminar air flow* (Crumair,

Spainol), autoklaf (Hirayama HL 36, Jepang), incubator (Haraeus Inst B6200, Jerman).

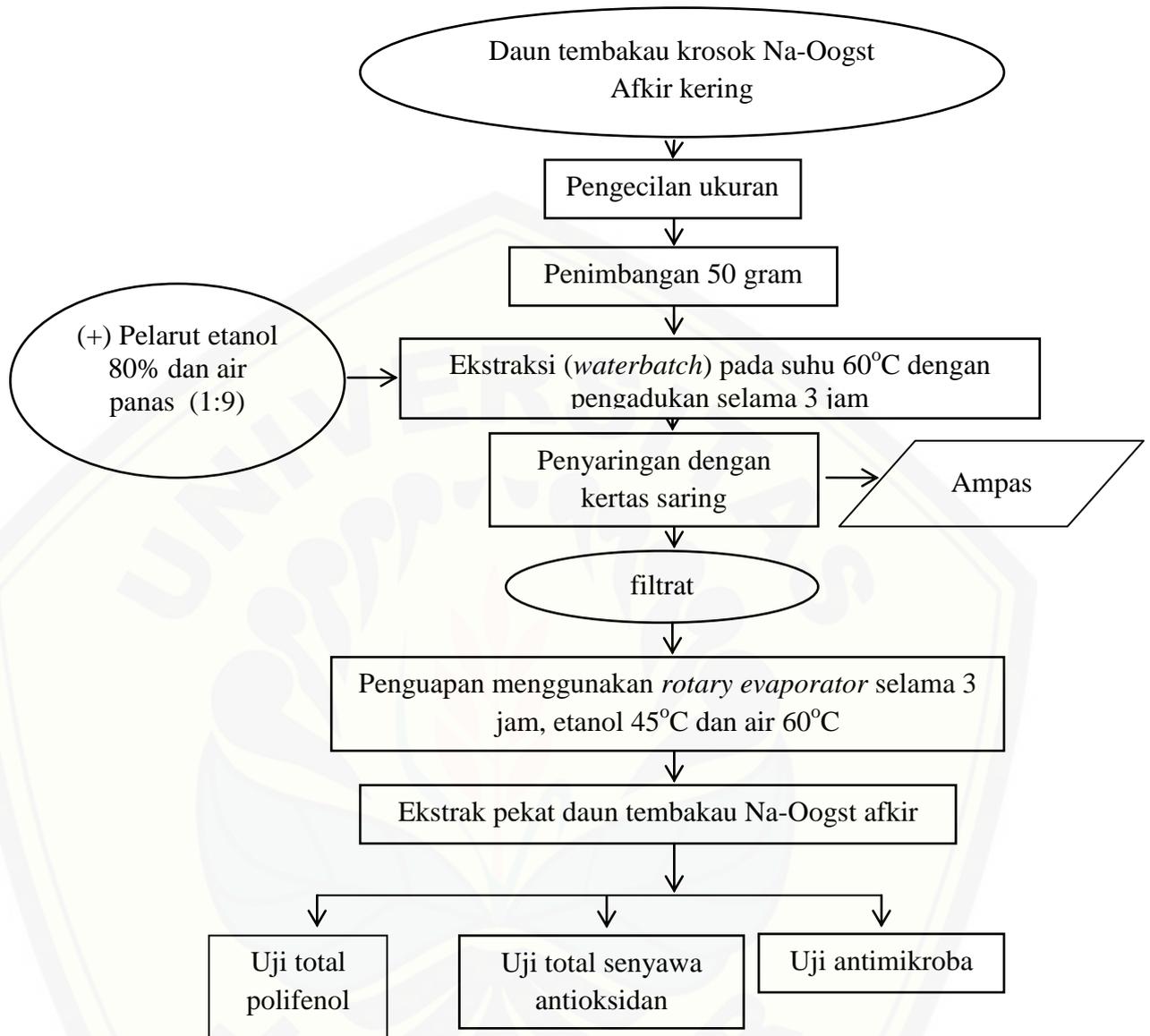
### 3.3 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.3.1 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang setiap perlakuannya dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dengan faktor tunggal yaitu variasi jenis pelarut. Pelarut yang digunakan adalah air panas (90°) dan etanol 80%.

#### 3.3.2 Tahapan Penelitian

Penelitian diawali dengan membersihkan daun tembakau Na-Oogst afkir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun. Daun yang bersih dikeringanginkan pada suhu ruang selama 14 hari. Daun tembakau yang sudah kering dilakukan pengecilan ukuran menggunakan blender, dan ditimbang sebanyak 50 gr lalu dimasukkan kedalam erlenmeyer 500 ml selanjutnya ditambahkan pelarut etanol 80% dan air panas 90°C sebanyak 450 ml dengan perbandingan 1:9 (b/v). Tahap berikutnya, dilakukan ekstraksi menggunakan *shaker waterbath* dengan suhu 60°C selama 3 jam. Hasil ekstraksi disaring menggunakan kain saring dan yang kedua menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dengan ampasnya. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat yang dihasilkan dilakukan pengujian total polifenol dan aktivitas antioksidannya. Setelah itu, diuji lebih lanjut tentang aktivitas antibakterinya terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella tyhpii*. Hal ini dikarenakan pada hasil total polifenol dan antioksidan tertinggi memiliki peran sebagai komponen bioaktif yang memiliki aktivitas antibakteri. Diagram alir pembuatan ekstrak daun tembakau rosok Na-Oogst afkir dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram alir pembuatan ekstrak daun tembakau Na- Oogst afkir (Shekins *et al.*, 2016)

### 3.4 Prosedur Analisis

#### 3.4.1 Uji total polifenol (Metode *Follin –Ciocalteau*) (Orak, 2006)

Analisa total polifenol ditentukan secara spektrofotometri menggunakan metode *Follin-ciocalteau*. Pembuatan kurva standar untuk perhitungan polifenol dibuat dengan cara menggunakan larutan asam galat dalam methanol. Pertama melarutkan bubuk asam galat sebanyak 5,4 mg ditambahkan metanol sebanyak

5ml kedalam tabung reaksi dicampur hingga homogen lalu ditera hingga tanda batas menggunakan larutan methanol. Setelah itu, cuplik setiap larutan masing-masing sebanyak (0; 25; 50;75; 100; 125; 150; 400)  $\mu$ l, ditambahkan aquades sesuai hingga larutan berjumlah 400  $\mu$ l dalam tabung reaksi tersebut lalu ditambahkan 0,8 ml reagen *Folin-Ciocalteau* dan aquades sebanyak 5ml setelah itu vortex agar larutan homegen. Setelah homogen, tabung reaksi di vortex dan didiamkan selama 5 menit, setelah itu ditambahkan 0,8 ml larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7%. Tabung reaksi yang berisi larutan kurva standar ditutup menggunakan alummunium foil dan didiamkan ditempat gelap selama 60 menit, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 765 nm menggunakan spektrofotometri.

Pada penelitian ini sampel yang diuji sebanyak 0,4 ml sampel ekstrak daun tembakau krosok Na-Oogst afkir yang sudah diencerkan 10/200; 10/300; 10/400; 1/500, dan ditambahkan 0,8 ml reagen *Follin – ciocalteu* 10%, selanjutnya vorteks hingga homogen dan diamkan selama 5 menit. Setelah itu, tambahkan 0,8 ml larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7% lalu divorteks kembali dan didiamkan selama 60 menit dengan ditutup semua permukaan tabung reaksi menggunakan *aluminium foil*. Setelah 60 menit dilakukan pengukuran absorbansi dengan panjang gelombang 765 nm. Analisa kandungan total polifenol pada sampel dan dihitung berdasarkan kurva standar asam galat yang diperoleh.

#### 3.4.2 Uji aktivitas antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan pada penelitian ini menggunakan metode serapan radikal DPPH (*1,1-diphenyl-1-2-Picrylhidroksil*). Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH yaitu dengan persiapan bahan uji ini dilakukan dengan cara ekstrak daun tembaka Na-Oogst afkir sebanyak 0,1 ml diencerkan menjadi 1 ml menggunakan aquades. Tahap selanjutnya yaitu pembuatan larutan pereaksi yang diawali dengan penimbangan serbuk DPPH sebanyak 0,01576 gram, selanjutnya dimasukkan kedalam labu ukur 100 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 ke tabung reaksi, lalu ditambahkan 1 ml DPPH 0,4 mM dan 3,9 ml etanol. Setelah itu, divortex dan didiamkan selama 30 menit dengan ditutup menggunakan aluminium 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:

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

Keterangan :

Abs blanko = absorbansi larutan blanko dengan panjang gelombang 517 nm

Abs sampel = absorbansi larutan uji/pembanding dengan panjang gelombang 517 nm

#### 3.4.3 Uji aktivitas antimikroba metode KHM

Pengujian antibakteri ekstrak daun tembakau Na-Oogst afkir terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella tyhpii* dilakukan menggunakan penentuan respon penghambatan (KHM) dengan metode dilusi agar dan penentuan nilai  $IC_{50}$  (*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

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

##### b. Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

Media NA sebanyak 4 gram dilarutkan dalam 200 ml aquades yang telah dihangatkan ke dalam tabung erlenmeyer. Campuran dipanaskan menggunakan *hotplate magnetic* sampai larutan berwarna kuning bening. Selanjutnya, larutan NA dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 4,980; 4,928;

4,876; 4,772; 4,668; 4,564; dan 4,460 mL. Tutup tabung reaksi menggunakan kapas, lalu sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

c. Pembuatan Isolat Bakteri

Preparasi biakan bakteri, diawali dengan sebanyak 1 ose kultur murni bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella tyhpii* ditempelkan pada media miring agar NA dengan pola zig-zag, dimana setiap perlakuannya dilakukan dalam keadaan steril didekat nyala api bunsen. Setelah itu, biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

d. Pembuatan suspensi media

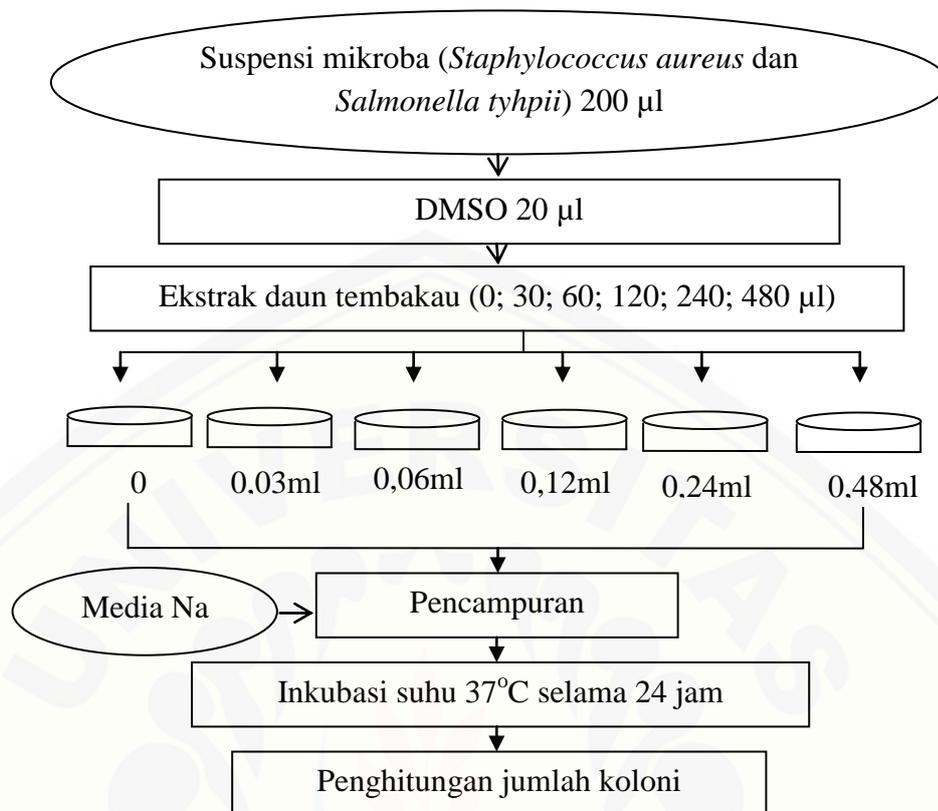
Sebanyak 2 ose bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella tyhpii* dari stok kultur agar miring NA diambil menggunakan ose steril, selanjutnya dimasukkan kedalam

e. Pembuatan larutan uji

Tahap pertama dalam membuat larutan stok dengan konsentrasi 20%, yaitu dengan mengambil ekstrak pekat daun tembakau sebanyak 2 ml kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan aquades hingga batas. Larutan stok yang telah dibuat diambil secara berurut sebanyak 0, 30, 60, 120, 240, dan 480 µl.

f. Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri daun tembakau Na-Oogst afkir dilakukan untuk menentukan KHM dan nilai IC<sub>50</sub> pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella tyhpii* menggunakan metode dilusi agar. Mula-mula sebanyak 200 µl suspensi bakteri yang telah dibuat (pengenceran 10<sup>-5</sup> dan 10<sup>-6</sup>) dimasukkan ke masing-masing cawan petri. Larutan uji yang telah dibuat dengan berbagai konsentrasi ditambahkan ke dalam cawan petri tersebut, lalu ditambahkan media NA sebanyak 4ml yang masih hangat (cair) berurut-urut ke masing-masing cawan petri sebanyak 0 ml; 0,06 ml; 0,12 ml; 0,24 ml; dan 0,48 ml, setelah diratakan dengan digeser seperti menulis angka delapan dan diamkan hingga memadat lalu diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah koloni pada cawan petri menggunakan *colony counter*. Diagram alir penentuan respon penghambat (KHM) dan IC<sub>50</sub> dapat lihat pada Gambar 3.3



Gambar 3.3. Penentuan respon penghambat (KHM) dan  $IC_{50}$

### 3.5 Analisa Data

Penyajian data diolah menggunakan *Microsoft excel* dan dimuat dalam bentuk grafik, dianalisis secara deskriptif dan diinterpretasikan sesuai dengan hasil yang telah diperoleh pada proses pengujian.

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Bedasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

- a. Pelarut etanol 80% mampu mengekstraksi lebih besar senyawa polifenol ekstrak daun tembakau Na-Oogst afkir dibanding pelarut air panas 90°C, dengan kadar total polifenol masing-masing sebesar 84,8190 mg GAE/ml dan 40,6295 mg GAE/ml
- b. Aktivitas antioksidan ekstrak daun tembakau Na-Oogst afkir dengan pelarut etanol 80% dan pelarut air panas 90°C masing-masing sebesar 83,77 % dan 59,25 %.
- c. Ekstrak daun tembakau Na-Oogst afkir memiliki sifat antibakteri dengan menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*. Nilai KHM dan IC<sub>50</sub> ekstrak daun tembakau Na-Oogst afkir dengan pelarut etanol 80% masing-masing untuk *Staphylococcus aureus* adalah sebesar 0,129 mg/ml dan 0,042 mg/ml, sedangkan untuk *Salmonella typhi* sebesar 0,832 mg/ml dan 0,186 mg/ml. Terhadap sampel hasil ekstraksi dengan pelarut air panas 90°C diperoleh nilai KHM dan IC<sub>50</sub> masing masing sebesar 7,586 mg/ml dan 0,501 mg/ml, serta 6,918 mg/ml dan 0,589 mg/ml.

### 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, perlu dilanjutkan tentang ekstrak daun tembakau Na-Oogst afkir, menggunakan metode ekstraksi yang lain, sehingga dapat membandingkan hasil yang diperoleh dengan pelarut etanol 96% dan pelarut air panas.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Ajeng, F. 2019. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau Inferior Jenis Kasturi Terhadap *Staphylococcus Aureus* dan *Salmonella typhi*. *Skripsi*. Jember : FTP UNEJ
- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* Terhadap Ekstrak Daun Psidium GuajavaL. *Journal Bioscientie*. 1(1) : 31-38
- Alfira, A.2014.Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Aktif Kulit Batang Sintok. *Skripsi*. Jakarta : UIN Syarif Hidayatullah.
- Amirrudin, R,R., dan Ismail, Darniati. 2017. Isolasi Dan Identifikasi *Salmonella sp* Pada Ayam Bakar Dirumah Makn Kecamatan Syiah Kuala Kota Banda Aceh. *Junal Kedokteran hewan. Jimvet* 01 (03): 265-274.
- Annindya Ayu, S. 2018. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana tabacum l*). terhadap *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*. *Skripsi*. Jember : Fakultas Teknologi Pertanian UJ
- Aprian, Indra Wibowo, Dwi Harjanto Ganang, and D. Kusworo Tutuk. 2012. "Pembuatan Asimetrik Membran Selulosa Asetat Untuk Pengolahan Air: Pengaruh Konsentrasi Zat Aditif Terhadap Kinerja Membran." *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri* 1(1): 194-199.
- Ariyanti, N. K., Darmayasa, I. B. G., & Sudirga, S. K. 2012. Daya Hambat Ekstrak Kulit Daun Lidah Buaya (*Aloe Barbadensis* Miller ) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. *Jurnal Biologi*, 16(1), 1-4.
- Astusi. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Ekstrak air daun bandotan Terhadap *Staphylococcus Aureus* dan *Escherichia Coli*. Yogyakarta. *Majalah Farmaseutik*, 11(1), 290-293
- Azzahra, F., Almalik, E.A. and Sari, A.A., 2019. Uji Aktivitas Antibakteri Dari Ekstrak Etanol Daun Alpukat (*Persea Americana* Mill.) Terhadap Bakteri *Salmonella typhi* Dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Kefarmasian Akfarindo*,4(02),1-10.
- Badan Pusat Statistik Kabupaten Jember. Kabupaten Jember dalam Angka 2018. *Katalog*. ISSN : 0215.5523 No. 1102001.2509. Jember : BPS Kabupaten Jember
- Balai Besar Pengawas Obat dan Makanan Surabaya. 2018. *Laporan Tahunan Tahun 2018*. Surabaya : BBPOM Surabaya

- Bangham, A. D., dan R. W. Horne. 2006. Actions Saponins on Biological Cell Membranes. *Journal Nature*. 196: 952 – 953.
- Brooks GF, Janet SB, Stephen AM. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Salemba Medika
- Budiman, Haryanto, S.P. 2011, *Budidaya Tanaman tembakau*. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Cushnine, T., dan ;Lamb, A. J 2005. Review: Antimicrobial activity of flavonoids. *International Kournal of Antimicrobial Agents*. 26 : 343-356
- Dewi, F.I., Wahyunitisari, M.R. 2018. Aktivitas Daya Hambat Ekstrak Jahe Merah (*Jinger oggicinalevar Rubtum*) terhadap Pertumbuhan Kuman *Staphylococcus aureus*. *Journal orf Vocational Studies*. 03 (1) :113-116.
- Duangstri, Pichet., K. Juntarapun, dan C. Satirapipathkul. 2012. *The Tabaco Leaf Extract And Antibacterial Activity In Textile*. Bangkok Thailand: RMUTP International Conference: Textiles & Fashion.
- El-ghfar, M.H.A.A., H.M. Ibrahim, I.M. Hassan, A.A.A. Fattah dan M.H. Mahmoud. 2016. Peels of lemon and orange as value-added ingredients: chemical and antioxidant properties. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 5(12): 777-794.
- Ganiswarna, S. 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4. Jakarta: Penerbit UI.
- Gunawan. 2008. Antibakteri pada Herba Meniran (*Phylanthus niruri Linn*). *Jurnal Kimia*. 2(22): 31 – 39.
- Hidayah, N., Hisan, A., Solikin, A., Irawati, Mustikanigtyas, D. 2016, Uji Efektivitas Ekstrak Sargassum muticum Sebagai Alternatif Obat Bisul Akibat Aktivitas *Staphylococcus aureus*. *Journal of Creativity Student I*. 01 : 1-9
- Hammado, N., dan I. Iling. 2013. Identifikasi Senyawa Bahan Aktif Alkaloid pada Tanaman Lahuna (*Eupatorium odoratum*). *Jurnal Dinamika*. 4(2): 1 – 18.
- Hariyatmi. 2004. Kemampuan Vitamin E sebagai Antioksidan terhadap Radikal Bebas pada Lanjut Usia. *Jurnal MIPA* 14 (1) : 52-60
- Haryoto, Santoso., N. Broto, dan Hafidz. 2009. Aktivitas Antioksidan Fraksi Polar Ekstrak Metanol dari Kulit Kayu Batang *Shorea acuminatissima* dengan Metode DPPH. *Jurnal Ilmu Dasar*. 8(2): 158 – 164.

- 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.
- Koru O, Toksiy F, Acikel CH, Tunca YM, Baysallar M, Uskudar Guclu A. 2007. *In Vitri Antimicrobial Activity of Propolis Samples From Different Geographical Origins Againt Certain Oral Pathogens*. *Anaerobe*, 13:140-5.
- Kuncahyo, I., dan Sunardi. 2007. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Belimbing Wuluh (*Avverhoa bilimbi*, L) Terhadap 1,1-Diphenyl-2-Picrylhidrazyl (DPPH). *Seminar Nasional Teknologi Yogyakarta*. Yogyakarta: Teknologi Farmasi, Fakultas Teknik, Universitas Setia Budi.
- Mohamad R, Widyastuti N, Suradikusumah E, Darusman LK. 2012. Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenol dan Flavonoid Total dari Enam Tumbuhan Obat Indonesia. *Trad. Med. J*.18:29-34.
- Ncube, N. S., A. J. Afolayan, dan A. I. Okoh. 2008. Assessment Techniques of Antimicrobial Properties of Natural Compounds of Plant Origin: Current Methids And Future Trends. *African Journal of Biotechnology*. 7(2): 1-10.
- Nely, F.2007. Aktivitas Antioksidan Rempah Pasar Dan Bubuk Rempah Pabrik Dengan Metode Polifenol Dan Uji AOM (Active Oxygen Method). *Skripsi*. Bogor : Institut Pertanian Bogor
- Neswati dan Ismanto, S.D., 2018 Ekstrasi Komponen Bioaktif Serbuk Kayu Secang ( *Caesalpinia sappan*, L) Dengan Metode Ultrasonikasi. *Jurnal Teknologi Pertanian Andalas*. 22 (02) : 187 -194.
- Pasril, Y. and Yuliasanti, A., 2014. Daya Antibakteri Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum*) terhadap Bakteri *Enterococcus Faecalis* sebagai Bahan Medikamen Saluran Akar dengan Metode Dilusi Anti-Bacterial Power of Red Batel Leaves (*Piper Crocatum*) to *Enterococcus Faecalis* Bacteria as Medi. *Insisiva Dental Journal: Majalah Kedokteran Gigi Insisiva*. 3(1) :88-95.
- Patil, R. S., B. A. Desai, dan S. A. Wagh. 2015. Comparative Study of Antimikrobal Compounds Extracted From Leaves of *Nicotiana Tabacum* and Cigarette. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(3): 1511 – 1518.

- Palic R, Stojanovic G, Alagic S, Nikolic M, Lepojevic Z. 2002. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of The Essential Oil and CO<sub>2</sub> Extracts of Semi-oriental Tobacco, Prilep. *Flavour Fragr J.* 17:323-326.
- Ploelongan, M., Chairul, Komala, I., Salmah, S., Susan, M.N.2006. *Aktivitas Antimikroba Dan Fitokimia Dari Beberapa Tanaman Obat.* Bogor : Fakultas Pertenakan IPB.
- Pourmourad, F, Hosseinimehr, S. J, Shahanimajd, N. 2006. Antioxidant Activity, Phenol And Flavonoid Contents Of Some Selected Iranian Medicinal Plants. *African Journal Of Biotechnology* 5(11) : 1142-1145
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi.* Jakarta : Erlangga
- Pratiwi, Donna. Suswati, Irma.Abdullah, Mariyam. 2017. Efek Anti Bakteri Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia*) Terhadap *Salmonella Typhi* Secara In Vitro. *Saintika Medika: Jurnal Ilmu Kesehatan dan Kedokteran Keluarga*, 9.2: 110-115.
- Pratiwi, E.P. 2011. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Tembakau Temanggung Varietas Genjah Kemloko.* Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Rahayu, T., dan R. Tuti. 2009. Uji Antijamur Kombucha Coffe Terhadap *Candida albicans* dan *Tricophyton mentagrophytes*. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi.* 10(1) : 10-17.
- Ramadhan, A. E. dan Phaza, H. A. 2010. Pengaruh Konsentrasi Etanol, Suhu dan Jumlah Stage pada Ekstraksi Oleoresin Jahe (*Zingiber officinale Rosc*) Secara Batch. *Skripsi.* Semarang: Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro.
- Ratna, Y. R. D., U. S. Ardani, Z. Fathiana, A. Rahmatillah, dan I. Trisharyanti. 2016. Daya Antibakteri Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale L.*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Sensitif dan Multiresisten. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia.* 14(1): 103-110.
- Redha, A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya dalam Sistem Biologis. *Jurnal Berlian.* 9(2): 196 – 202.
- Rodgman, A. and T.A. Perfetti. 2006. The composition of cigarette smoke; A catalogue of the polycyclic hydrocarbons. *Beiträge zur Tabakforschung* 22(1):13–69.
- 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.
- Sanchez-Maldonado, A.F., Schieber, A., and Ganzle, M.G. 2011. Structure–Function Relationships of the Antibacterial Activity of Phenolic Acids and Their Metabolism by Lactic Acid Bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, ISSN 1364-5072.5(1) : 1176-1184.
- Sayuti, M. 2017. Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Bagian dan Jenis Pelarut Terhadap Rendemen dan Aktivitas Antioksidan Bambu Laut (*Isis hippuris*). *Journal Technology Science and Engineering*. 1(3): 2549- 1601
- Saxena, G., Kalra. 2011. Antimicronial Activity Pattern of Certain Terpenoids. *Internasional Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2(1): 87-91.
- Subiyakto, R. Syaputra., E. Nurnasari., D. Winarno., Djajadi. 2011. *Pemanfaatan tembakau Untuk Pestisida Dan Parfum Badan Dan Pemanfaatan Dbu Tembakau Untuk Kompos*. Laporan Akhir Penelitian. Dewan Riset Nasional.
- Taringan, L.A., Desrina, Sarjito. 2017 Pengaruh Perendaman Ekstrak Daun TEMbakau (*Nicotiana tabacum*) Terhadap Kelulushidupan Dan Histopstologi Hati Ikan Nila (*Oreochromis Nicoloticus*) Yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas Hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. Semarang : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. 6 (3): 150-158.
- Todar K. 2004. Structure and Fuction of Prokarytic Cells. *Todar’s Online Textbook of Bacter iology*. Wisconsin-Madiso
- Tumbelaka, A. 2003. *Tatalaksana Demam Tifoid Pada Anak*. Jakarta: Balai Penerbit Ikatan Dokter Anak Indonesia FKUI.
- Trifani.2012.Ekstraksi pelarut caircair.<http://awjee.blog.com/2012/11/24/ekstraks-pelarut-cair-cair/>. Diakses pada tanggal 8 juli 2014
- Utami. 2009. Potensi daun alpukat (*Persea americana Mill*) sebagai sumber antioksidan alami. *Jurnal Teknik Kimia UPN Jawa Timur*. 2(1) : 58-64.
- Verdiana, M., Widarta, I.R. and Permana, I.M.,. 2018. Pengaruh Jenis Pelarut Pada Ekstraksi Menggunakan Gelombang Ultrasonik Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Lemon. *Ilmu dan Teknologi Pangan* 7 No, 4, 213-222
- Waluyo, L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Malang : UMM Press

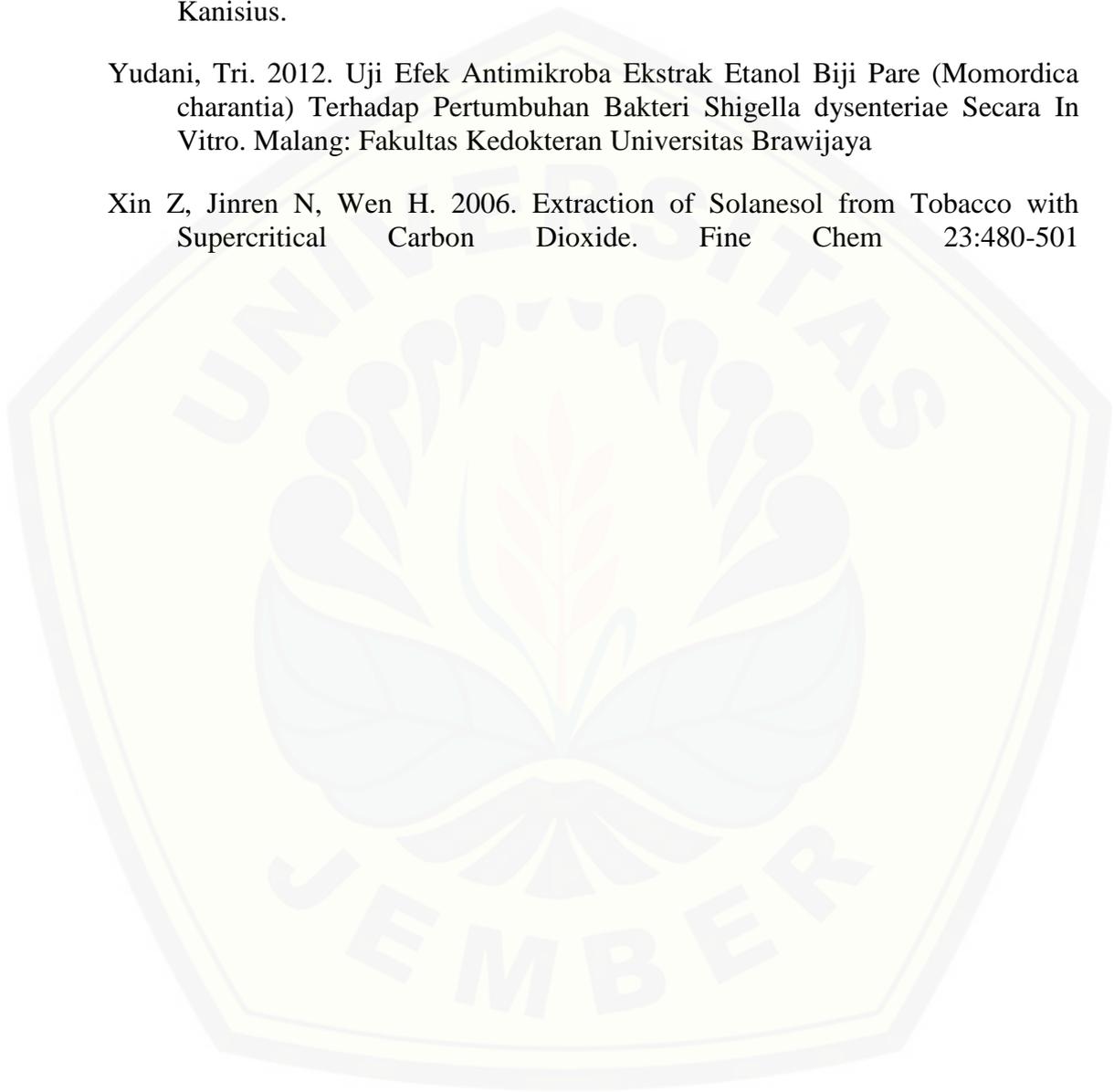
Wax, G.R., K. Lewis, A.A. Salyer dan Taber, H. 2008. *Bacterial Resistance To Antimicrobials Second Edition*. New York: CRC Press.

Widoyono.2011. *Penyakit Tropis*. Jakarta : Erlangga

Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.

Yudani, Tri. 2012. Uji Efek Antimikroba Ekstrak Etanol Biji Pare (*Momordica charantia*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae* Secara In Vitro. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

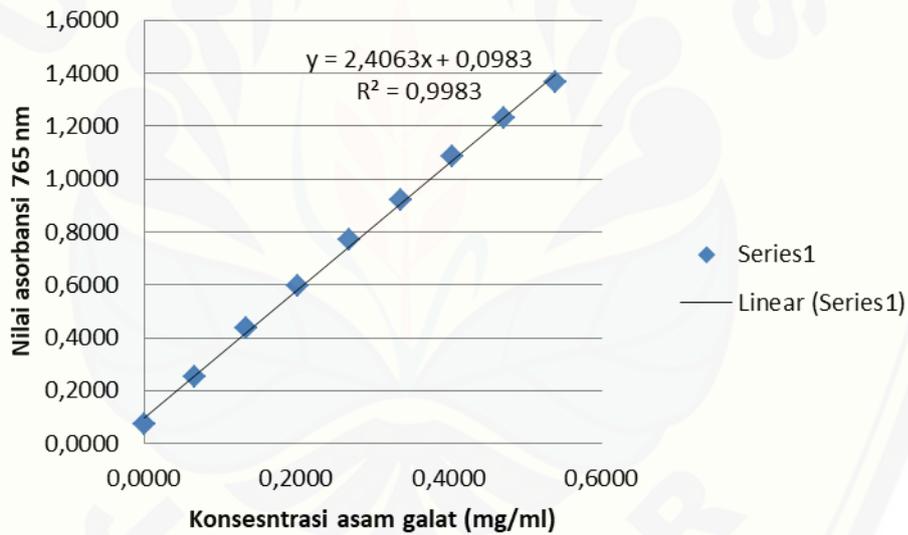
Xin Z, Jinren N, Wen H. 2006. Extraction of Solanesol from Tobacco with Supercritical Carbon Dioxide. *Fine Chem* 23:480-501



**Lampiran 4.1 Perhitungan Total Polifenol Ekstrak Daun Tembakau**

Kurva standart As. Galat

As galat (µl)	Asam Galat (mg/ml)	Abs 1	Abs 2	Rata Abs
0	0,0000	0,073	0,074	0,074
25	0,0675	0,249	0,252	0,251
50	0,1350	0,435	0,438	0,437
75	0,2024	0,594	0,594	0,594
100	0,2699	0,770	0,771	0,771
125	0,3374	0,921	0,919	0,920
150	0,4049	1,088	1,085	1,087
175	0,4724	1,233	1,231	1,232
200	0,5398	1,368	1,365	1,367



**Hasil Uji Polifenol Ekstrak Daun Tembakau Na-Oogst**

Etanol 80%

Pengenceran (kali)	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Rerata
200	U1	0,507	0,19032	38,0631	<b>38,0757</b>	
		0,51	0,19144	38,2883		
	U2	0,493	0,18506	37,0120	<b>37,0495</b>	<b>37,0495</b>
		0,494	0,18544	37,0871		
	U3	0,474	0,17793	35,5856	<b>35,7607</b>	
		0,476	0,17868	35,7357		
300	U1	0,377	0,14152	42,4550	<b>42,5113</b>	
		0,378	0,14189	42,5676		
	U2	0,372	0,13964	41,8919	<b>41,8482</b>	<b>42,1797</b>
		0,373	0,14002	42,0045		
	U3	0,339	0,12725	38,1757	<b>38,1757</b>	
		0,339	0,12725	38,1757		
400	U1	0,368	0,13814	55,2553	<b>55,0051</b>	
		0,366	0,13739	54,9550		
	U2	0,311	0,11674	46,6967	<b>46,8468</b>	<b>46,5465</b>
		0,313	0,11749	46,9970		
	U3	0,309	0,11599	46,3964	<b>46,2462</b>	
		0,307	0,11524	46,0961		
500	U1	0,332	0,12462	62,3123	<b>62,3062</b>	
		0,333	0,12500	62,5000		
	U2	0,275	0,10323	51,6141	<b>51,7080</b>	<b>55,1156</b>
		0,276	0,10360	51,8018		
	U3	0,273	0,10248	51,2387	<b>51,3326</b>	
		0,274	0,10285	51,4264		

Air Panas 90°C

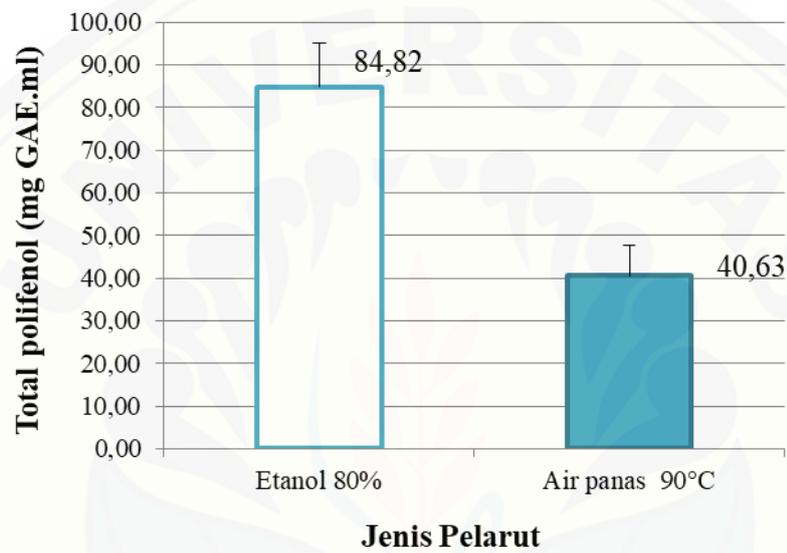
Pengenceran (kali)	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Asam Galat (mg/ml) KONSENTRAT	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Rerata
200	U1	0,507	0,19032	38,0631	<b>38,0757</b>	
		0,51	0,19144	38,2883		
	U2	0,493	0,18506	37,0120	<b>37,0495</b>	<b>37,0495</b>
		0,494	0,18544	37,0871		
	U3	0,474	0,17793	35,5856	<b>35,7607</b>	
		0,476	0,17868	35,7357		
300	U1	0,377	0,14152	42,4550	<b>42,5113</b>	
		0,378	0,14189	42,5676		
	U2	0,372	0,13964	41,8919	<b>41,8482</b>	<b>42,1797</b>
		0,373	0,14002	42,0045		
	U3	0,339	0,12725	38,1757	<b>38,1757</b>	
		0,339	0,12725	38,1757		
400	U1	0,368	0,13814	55,2553	<b>55,0051</b>	
		0,366	0,13739	54,9550		
	U2	0,311	0,11674	46,6967	<b>46,8468</b>	<b>46,5465</b>
		0,313	0,11749	46,9970		
	U3	0,309	0,11599	46,3964	<b>46,2462</b>	
		0,307	0,11524	46,0961		
500	U1	0,332	0,12462	62,3123	<b>62,3062</b>	
		0,333	0,12500	62,5000		
	U2	0,275	0,10323	51,6141	<b>51,7080</b>	<b>55,1156</b>
		0,276	0,10360	51,8018		
	U3	0,273	0,10248	51,2387	<b>51,3326</b>	
		0,274	0,10285	51,4264		

Tabel Total Uji Polifenol

Sampel	Pengenceran	Ulangan	Absorbansi	Konsentrasi Ekstrak	Asam Galat	Rata-rata	Rata-rata	SD
Etanol 80%	500x	U1	0,563	96,559033	0,1931	96,6629	84,8190	10,2702725
			0,564	96,766820	0,1935			
		U2	0,481	79,520426	0,1590	79,4165		
			0,480	79,312638	0,1586			
		U3	0,475	78,273698	0,1565	78,3776		
			0,476	78,481486	0,1570			
Air Panas 90	500x	U1	0,332	48,560030	0,0971	48,6639	40,6295	6,961152757
			0,333	48,767818	0,0975			
		U2	0,275	36,716120	0,0734	36,8200		
			0,276	36,923908	0,0738			
		U3	0,273	36,300544	0,0726	36,4044		
			0,274	36,508332	0,0730			

Tabel Rata-rata total uji polifenol

Jenis pelarut	Total polifenol (mg GAE/ml)
Etanol 80%	84,8190
Air panas 90	40,6295



**Lampiran 4.2 Perhitungan Antioksidan Ekstrak Daun Tembakau Na-Oogst**

Etanol 80%

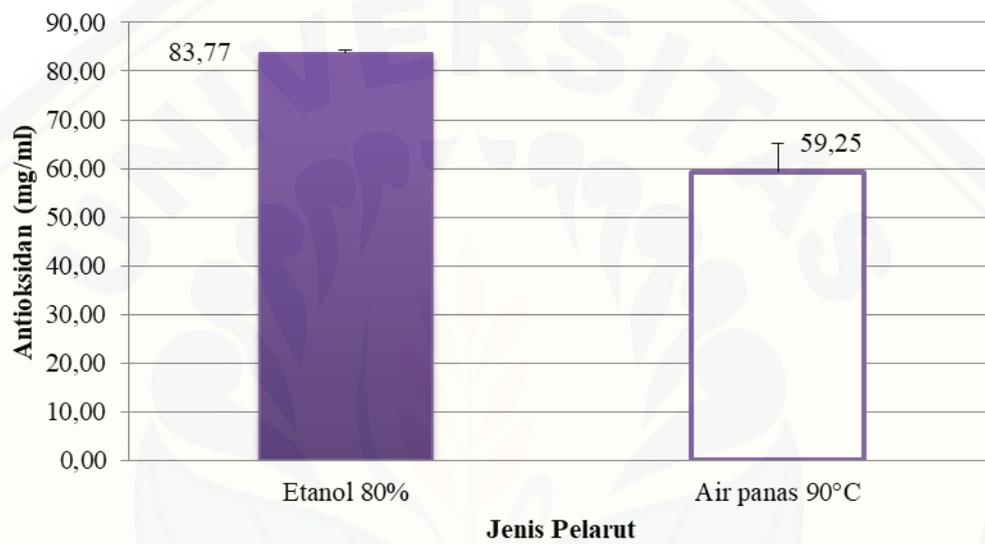
Konsentrasi Pengenceran	Ulangan	Blanko	Absorbansi	% Penghambatan	Rata-rata	Rata-rata
50x	U1	0,716	0,119	83,37988827	83,44972	83,765993
		0,716	0,118	83,51955307		
	U2	0,753	0,124	83,53253652	83,33333	
		0,753	0,127	83,13413015		
	U3	0,804	0,125	84,45273632	84,51493	
		0,804	0,124	84,57711443		
100x	U1	0,716	0,131	81,70391061	81,70391	82,903339
		0,716	0,131	81,70391061		
	U2	0,753	0,129	82,8685259	82,80212	
		0,753	0,13	82,73572377		
	U3	0,804	0,127	84,2039801	84,20398	
		0,804	0,127	84,2039801		
150x	U1	0,716	0,146	79,60893855	79,53911	80,290463
		0,716	0,147	79,46927374		
	U2	0,753	0,146	80,61088977	80,61089	
		0,753	0,146	80,61088977		
	U3	0,804	0,156	80,59701493	80,72139	
		0,804	0,154	80,84577114		

Air Panas

Konsentrasi Pengenceran	Ulangan	Blanko	Absorbansi	% Penghambatan	Rata-rata	Rata-rata
50x	U1	0,722	0,224	68,77506925	68,70582	67,21199
		0,722	0,225	68,6365651		
	U2	0,738	0,251	65,98915989	65,71816	
		0,738	0,255	65,44715447		
	U3	0,871	0,269	63,6501355	63,58238	
		0,871	0,27	63,51463415		
100x	U1	0,722	0,223	69,11357341	69,04432	66,80536
		0,722	0,224	68,97506925		
	U2	0,738	0,24	67,4796748	67,47967	
		0,738	0,24	67,4796748		
	U3	0,871	0,265	69,57520092	63,89208	
		0,871	0,364	58,20895522		
150x	U1	0,722	0,355	59,24225029	58,95522	53,77368
		0,722	0,36	58,66819747		
	U2	0,738	0,353	56,09756098	56,30081	
		0,738	0,351	56,50406504		
	U3	0,871	0,324	51,10803324	51,24654	
		0,871	0,321	51,38504155		

Tabel Rata-rata total uji antioksidan

Jenis Pelarut	Antioksidan
Etanol	83,766
air	67,212



**Lampiran 4.3 perhitungan konsentrasi ekstrak**

Ekstrak (ml)	kons. Ekstak etanol (mg/ml)	kons. Eksrak air (mg/ml)	vol. total (ml)	Konsentrasi polifenol dlm capet (V1.M1=V2.M2)	
				etanol (mg/ml)	air (mg/ml)
0	16,9638	8,125891756	5	0,0000	0,0000
0,03	16,9638	8,125891756	5	0,1018	0,0488
0,06	16,9638	8,125891756	5	0,2036	0,0975
0,12	16,9638	8,125891756	5	0,4071	0,1950
0,24	16,9638	8,125891756	5	0,8143	0,3900
0,48	16,9638	8,125891756	5	1,6285	0,7801

**Larutan stok etanol 20%**

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$2 \text{ ml} \times 84,8190 \text{ mg/ml} = 10 \text{ ml} \times M2$$

$$M2 = (2 \text{ ml} \times 84,8190 \text{ mg/ml}) / 10 \text{ ml}$$

$$M2 = 16,9638 \text{ mg/ml}$$

**Larutan stok air 20%**

$$M2 = 16,9638 \text{ mg/ml}$$

$$2 \text{ ml} \times 40,6295 \text{ mg/ml} = 10 \text{ ml} \times M2$$

$$M2 = (2 \text{ ml} \times 40,6295 \text{ mg/ml}) / 10 \text{ ml}$$

$$M2 = 8,1259 \text{ mg/ml}$$

Data Total Polifenol			
Etanol	M1	84,8190	mg GAE/ml
Air	M1	40,6295	mg GAE/ml

Table volume total dalam cawan petri

<i>Straptococcus aureus</i>			
Ekstrak ( $\mu\text{l}$ )	DMSO 2% ( $\mu\text{l}$ )	M.o ( $\mu\text{l}$ )	Media ( $\mu\text{l}$ )
0	20	200	4780
30	20	200	4750
60	20	200	4720
120	20	200	4660
240	20	200	4540
480	20	200	4300

---

*Salmonella typhi*

Ekstrak ( $\mu\text{l}$ )	DMSO 2% ( $\mu\text{l}$ )	M.o ( $\mu\text{l}$ )	Media ( $\mu\text{l}$ )
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 *Straptococcus aureus* pelarut etanol

ekstrak (ml)	Konsentrasi Polifenol ( $\mu\text{g/ml}$ )	Jumlah koloni $10^5$		Rata-rata	SD
		U1	U2		
0	0,0000	100	90	95	7,07
0,03	0,1018	77	69	73	5,66
0,06	0,2036	50	45	47,5	3,54
0,12	0,4071	30	20	25	7,07
0,24	0,8143	9	5	7	2,83
0,48	1,6285	1	0	0,5	0,71

Tabel jumlah koloni *Straptococcus aureus* pelarut air panas

ekstrak (ml)	Konsentrasi Polifenol ( $\mu\text{g/ml}$ )	Jumlah koloni $10^5$		Rata-rata	SD
		U1	U2		
0	0,0000	106	100	103	4,24
0,03	0,0488	90	85	87,5	3,54
0,06	0,0975	82	78	80	2,83
0,12	0,1950	74	69	71,5	3,54
0,24	0,3900	60	55	57,5	3,54
0,48	0,7801	42	38	40	2,83

Tabel jumlah % hambat *Straptococcus aureus* pelarut etanol

<b>Data mic <i>S.aureus</i> pelarut etanol dalam CFU/ml (<math>10^5</math>)</b>							
ekstrak (ml)	Konsentrasi polifenol ( $\mu\text{g/ml}$ )	Jumlah Populasi/200 $\mu\text{l}$		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni
		U1	U2				
0	0,0000	5,00E+07	4,50E+07	4,75E+07	3,54E+06	0,00	7,68
0,03	0,1018	3,85E+07	3,45E+07	3,65E+07	2,83E+06	23,16	7,56
0,06	0,2036	2,50E+07	2,25E+07	2,38E+07	1,77E+06	50,00	7,38
0,12	0,4071	1,50E+07	1,00E+07	1,25E+07	3,54E+06	73,68	7,10
0,24	0,8143	4,50E+06	2,50E+06	3,50E+06	1,41E+06	92,63	6,54
0,48	1,6285	5,00E+05	0,00E+00	2,50E+05	3,54E+05	99,47	5,40

Tabel jumlah % hambat *Straptococcus aureus* air panas

<b>Data MIC <i>S.aureus</i> pelarut air dalam CFU/ml (10<sup>5</sup>)</b>							
ekstrak (ml)	Konsentrasi polifenol (µg/ml)	Jumlah Populasi /200 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni
		U1	U2				
0	0,0000	5,30E+07	5,00E+07	5,155E+07	2,12E+06	0,00	7,71
0,03	0,0488	4,50E+07	4,25E+07	4,38E+07	1,77E+06	15,05	7,64
0,06	0,0975	4,10E+07	3,90E+07	4,00E+07	1,41E+06	22,33	7,60
0,12	0,1950	3,70E+07	3,45E+07	3,58E+07	1,77E+06	30,58	7,55
0,24	0,3900	3,00E+07	2,75E+07	2,88E+07	1,77E+06	44,17	7,46
0,48	0,7801	2,10E+07	1,90E+07	2,00E+07	1,41E+06	61,17	7,30

Tabel jumlah koloni *Salmonella typhii* pelarut etanol

ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah koloni 10 <sup>6</sup>		Rata-rata	SD
		U1	U2		
0	0,000	105	99	102	4,24
0,03	0,102	89	70	79,5	13,44
0,06	0,204	40	36	38	2,83
0,12	0,407	30	20	25	7,07
0,24	0,814	9	5	7	2,83
0,48	1,629	1	0	0,5	0,71

Tabel jumlah koloni *Salmonella typhii* pelarut air panas

ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah koloni 10 <sup>6</sup>		Rata-rata	SD
		U1	U2		
0	0,000	110	105	107,5	3,54
0,03	0,049	98	90	94	5,66
0,06	0,098	94	85	89,5	6,36
0,12	0,195	88	75	81,5	9,19
0,24	0,390	69	59	64	7,07
0,48	0,780	45	40	42,5	3,54

Tabel jumlah %hambat *Salmonella typhii* pelarut etanol

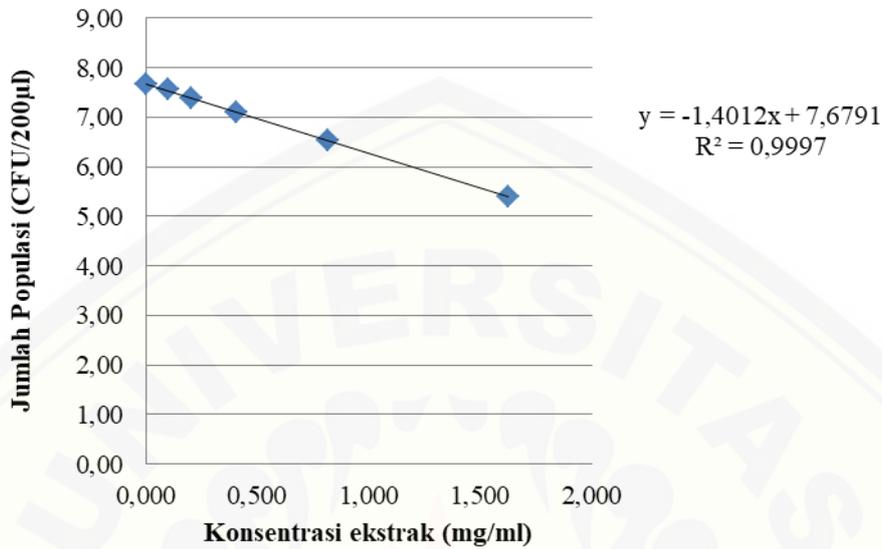
<b>Data MIC S.thypi pelarut etanol dalam CFU/ml (10<sup>6</sup>)</b>							
ekstrak (ml)	Konsentrasi polifenol (mg/ml)	Jumlah Koloni/200 $\mu$ l		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni
		U1	U2				
0	0,00	5,25E+08	4,95E+08	5,10E+08	2,12E+07	0	8,71
0,03	0,10	4,45E+08	3,50E+08	3,98E+08	6,72E+07	22,1	8,60
0,06	0,20	2,00E+08	1,80E+08	1,90E+08	1,41E+07	62,7	8,28
0,12	0,41	1,50E+08	1,00E+08	1,25E+08	3,54E+07	75,5	8,10
0,24	0,81	4,50E+07	2,50E+07	3,50E+07	1,41E+07	93,1	7,54
0,48	1,63	5,00E+06	0,00E+00	2,50E+06	3,54E+06	95,1	6,40

Tabel jumlah %hambat *Salmonella typhii* pelarut air panas

<b>Data MIC S.thypi pelarut air dalam CFU/ml (10<sup>6</sup>)</b>							
ekstrak (ml)	Konsentrasi Polifenol (mg/ml)	Jumlah Koloni / 200 $\mu$ l		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni
		U1	U2				
0	0,00	5,50E+08	5,25E+08	5,38E+08	1,77E+07	0	8,73
0,03	0,05	4,90E+08	4,50E+08	4,70E+08	2,83E+07	12,6	8,67
0,06	0,10	4,70E+08	4,25E+08	4,48E+08	3,18E+07	16,7	8,65
0,12	0,20	4,40E+08	3,75E+08	4,08E+08	4,60E+07	24,2	8,61
0,24	0,39	3,45E+08	2,95E+08	3,20E+08	3,54E+07	40,5	8,51
0,48	0,78	2,25E+08	2,00E+08	2,13E+08	1,77E+07	60,5	8,33

Lampiran 4.5 kurva logaritmik *Straptococcus aureus* dan *Salmonella typhii*

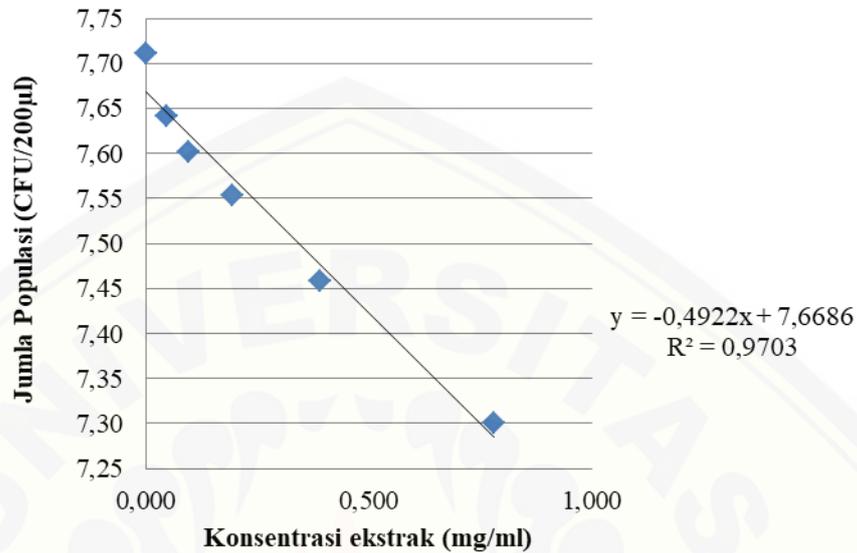
a. *Straptococcus aureus* pelarut etanol



Kons. Polifenol (mg/ml)			
1 log	5	1,912	0,714
	4	2,626	
2 log	5	1,912	1,427
	3	3,339	
3 log	5	1,912	1,427
	3	3,339	

IC <sub>50</sub>		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10 <sup>8</sup>	Log Y1 = 8,000	X1 =	-0,229
Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10 <sup>7</sup>	Log Y2 = 7,699	X2 =	-0,014
		IC <sub>50</sub>	<b>0,215</b>
IC <sub>90</sub>		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10 <sup>8</sup>	Log Y1 = 7,000	X1 =	0,485
Y2 = 90% (Y1) = 5 x 10 <sup>7</sup>	Log Y2 = 6,000	X2 =	1,198
		IC <sub>90</sub>	<b>0,714</b>

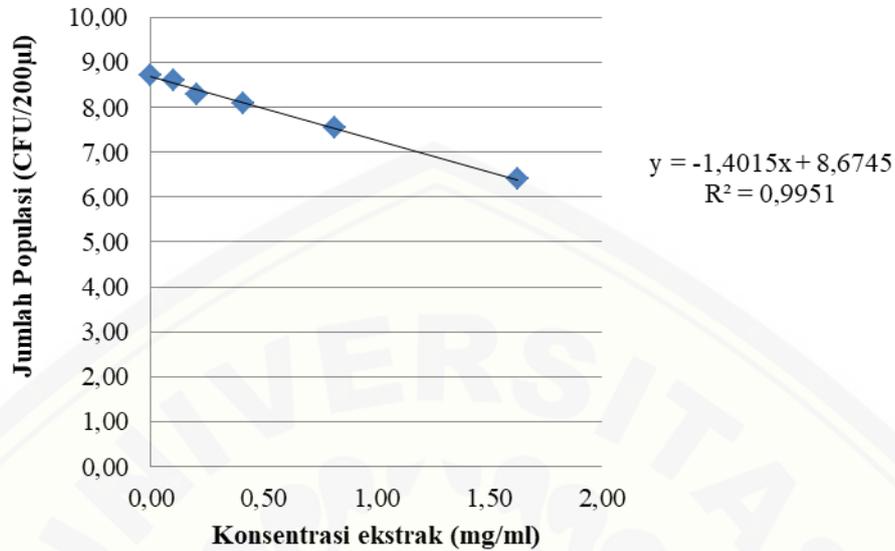
b. *Straptococcus aureus* pelarut air panas



Kons. Polifenol (µg/ml)			
1 log	5	5,422	2,032
	4	7,453	
2 log	5	5,422	4,063
	3	9,485	
3 log	5	5,422	4,063
	3	9,485	

IC <sub>50</sub>		Polifenol (µg/ml)	
Y1 = 1 x 10 <sup>8</sup>	Log Y1 = 8,000	X1 =	-0,673
Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10 <sup>7</sup>	Log Y2 = 7,699	X2 =	-0,062
		IC <sub>50</sub>	0,612
IC <sub>90</sub>		Polifenol (µg/ml)	
Y1 = 1 x 10 <sup>8</sup>	Log Y1 = 7,000	X1 =	1,358
Y2 = 90% (Y1) = 5 x 10 <sup>7</sup>	Log Y2 = 6,000	X2 =	3,390
		IC <sub>90</sub>	2,032

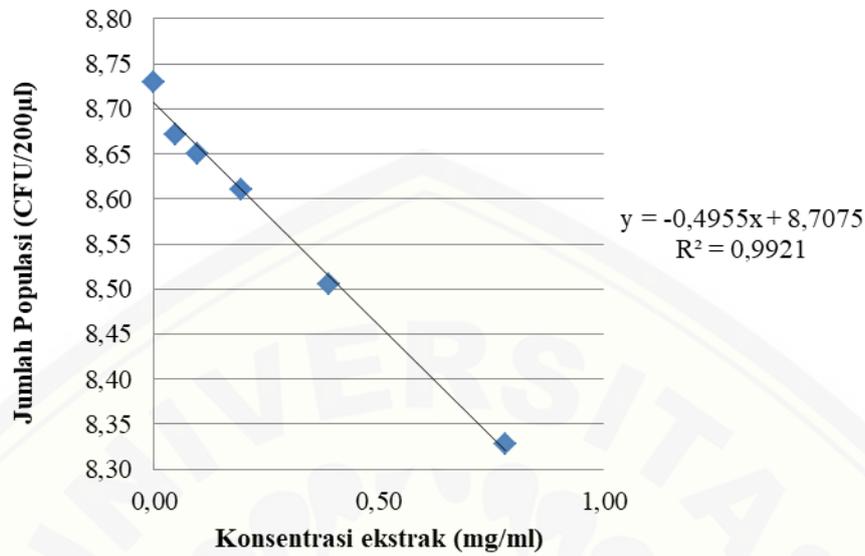
c. *Salmonella typhi* pelarut etanol



Kons. Polifenol (mg/ml)			
1 log	5	2,622	0,714
	4	3,335	
2 log	5	2,622	1,427
	3	4,049	
3 log	5	2,622	1,427
	3	4,049	

IC <sub>50</sub>		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10 <sup>8</sup>	Log Y1 = 8,000	X1 =	0,481
Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10 <sup>7</sup>	Log Y2 = 7,699	X2 =	0,696
		IC <sub>50</sub>	<b>0,215</b>
IC <sub>90</sub>		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10 <sup>8</sup>	Log Y1 = 7,000	X1 =	1,195
Y2 = 90% (Y1) = 5 x 10 <sup>7</sup>	Log Y2 = 6,000	X2 =	1,908
		IC <sub>90</sub>	<b>0,714</b>

d. *Salmonella typhi* pelarut air



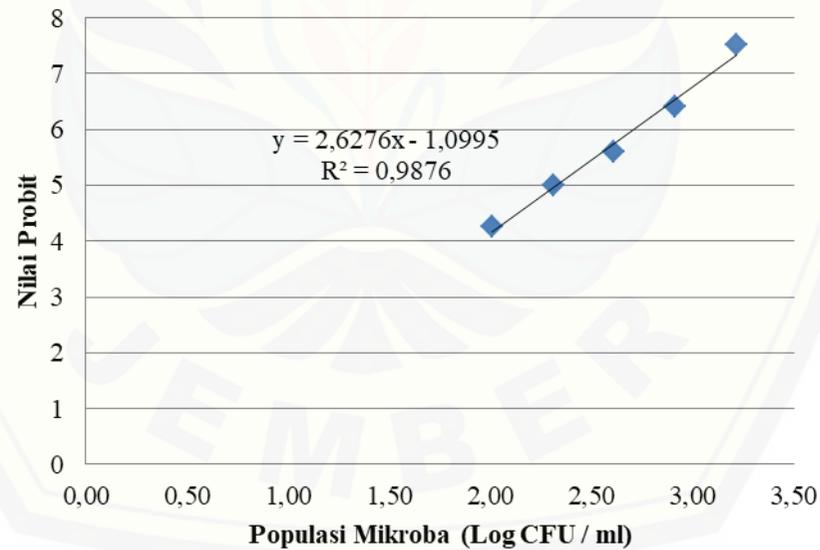
Kons. Polifenol (mg/ml)			
1 log	5	7,482	2,018
	4	9,501	
2 log	5	7,482	4,036
	3	11,519	
3 log	5	7,482	4,036
	3	11,519	

IC <sub>50</sub>		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10 <sup>8</sup>	Log Y1 = 8,000	X1 =	1,428
Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10 <sup>7</sup>	Log Y2 = 7,699	X2 =	0,884
		IC <sub>50</sub>	<b>-0,544</b>
IC <sub>90</sub>		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10 <sup>8</sup>	Log Y1 = 7,000	X1 =	1,428
Y2 = 90% (Y1) = 5 x 10 <sup>7</sup>	Log Y2 = 6,000	X2 =	3,446
		IC <sub>90</sub>	<b>2,018</b>

Lampiran 4.6 Kurva Porbit *Straptococcus aureus* dan *Salmonella typhii*

a. *Straptococcus aureus* pelarut etnaol

Ekstrak (ml)	Konsentrasi Ekstrak (µg/ml)	Jumlah Koloni/200 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log jumlah koloni	% pertumbuhan	Log C	Probit
		U1	U2							
0	0,000	5,30E+07	5,00E+07	5,15E+07	1,50E+06	0,00	7,68	100,0000	0,00	0
0,03	101,783	4,50E+07	4,25E+07	4,38E+07	1,25E+06	23,16	7,56	76,84	2,01	4,26
0,06	203,566	4,10E+07	3,90E+07	4,00E+07	1,00E+06	50,00	7,38	65,07	2,31	5
0,12	407,131	3,70E+07	3,45E+07	3,58E+06	1,25E+06	77,68	7,10	52,63	2,61	5,61
0,24	814,262	3,00E+07	2,75E+07	2,88E+06	1,25E+06	93,63	6,54	28,00	2,91	6,41
0,48	1628,525	2,10E+07	1,90E+07	2,00E+05	1,41E+06	99,47	5,40	7,14	3,21	7,51



$$y = 2,6276x - 1,0995$$

$$5 = 2,6276x - 1,0995$$

$$5 - 1,0995 = 2,6276x$$

$$6,09 = 2,6276x$$

$$X = \text{Log } C_{50} = 6,09/2,6276 = 2,32$$

$$\text{LOG } C_{50} = 2,32$$

$$\text{IC}_{50} = 208,9296 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$y = 2,6276x - 1,0995$$

$$6,28 = 2,6276x - 1,0995$$

$$6,28 - 1,0995 = 2,6276x$$

$$7,38 = 2,6276x$$

$$X = \text{Log } C_{90} = 7,38/2,6276 = 2,80$$

$$\text{LOG } C_{90} = 2,80$$

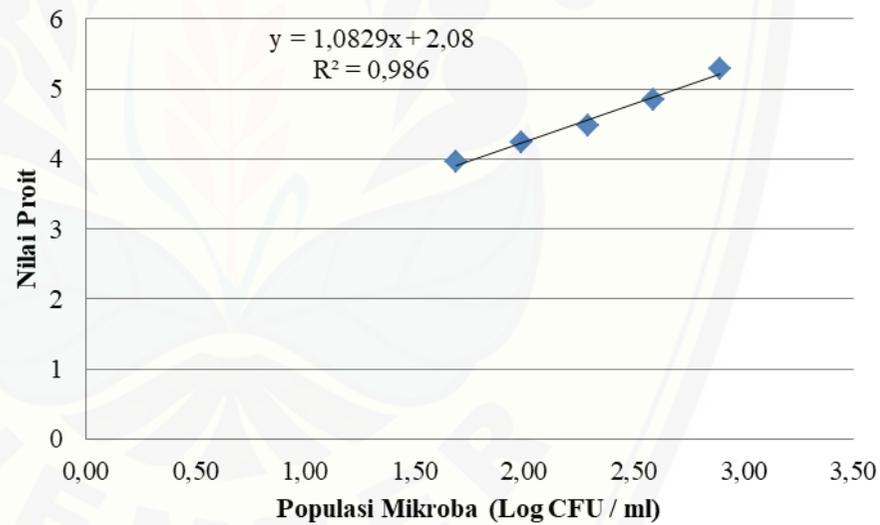
$$\text{IC}_{90} = 630,9573 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

Table 3.2 Transformation of percentages to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

b. *Straptococcus aureus* pelarut air

Ekstrak (ml)	Konsentrasi Ekstrak (µg/ml)	Jumlah Koloni/200 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log jumlah koloni	% pertumbuhan	Log C	Probit
		U1	U2							
0	0,0	5,30E+07	5,00E+07	5,15E+07	1,50E+06	0,00	7,71	100,00	0,00	0
0,03	48,8	4,50E+07	4,25E+07	4,38E+07	1,25E+06	15,05	7,64	91,43	1,69	3,96
0,06	97,5	4,10E+07	3,90E+07	4,00E+07	1,00E+06	22,33	7,60	89,38	1,99	4,23
0,12	195,0	3,70E+07	3,45E+07	3,58E+07	1,25E+06	30,58	7,55	80,42	2,29	4,48
0,24	390,0	3,00E+07	2,75E+07	2,88E+07	1,23E+06	44,17	7,46	69,57	2,59	4,85
0,48	780,1	2,10E+07	1,90E+07	2,00E+07	1,41E+06	61,17	7,30	0,00	2,89	5,28



$$y = 1,0829x + 2,08$$

$$5 = 1,0829x + 2,08$$

$$5 - 2,08 = 1,0829x$$

$$2,92 = 1,0829 x$$

$$X = \text{Log C50} = 2,92 / 1,0829 = 2,70$$

$$\text{LOG C50} = 2,70$$

$$\text{IC50} = 524,8075(\mu\text{g/ml})$$

$$y = 1,0829x + 2,08$$

$$6,28 = 1,0829x + 2,08$$

$$6,28 - 2,08 = 1,0829x$$

$$4,2 = 1,0829x$$

$$X = \text{Log C90} = 4,2/1,0829 = 3,88$$

$$\text{LOG C90} = 3,88$$

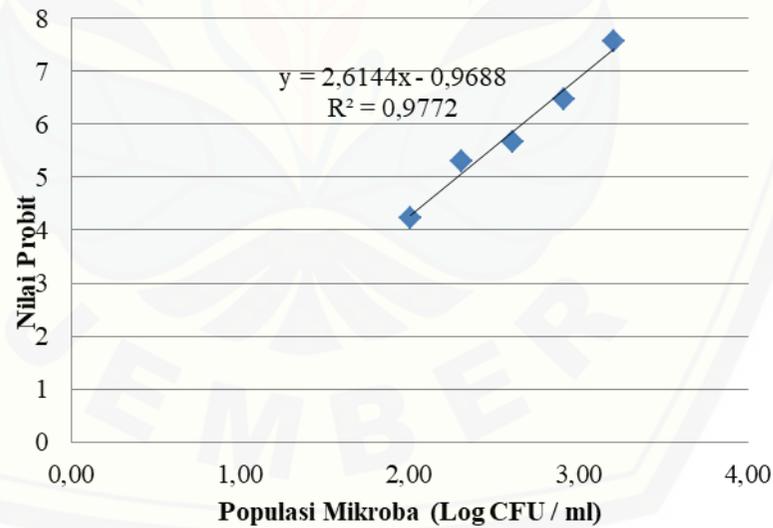
$$\text{IC90} = 7585,7758 (\mu\text{g/ml})$$

Table 3.2 Transformation of percentages to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

c. *Salmonella typhii* pelarut etanol

Ekstrak (µl)	Konsentrasi Ekstrak (µg/ml)	Jumlah Koloni/200 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log jumlah koloni	% pertumbuhan	Log C	Probit
		U1	U2							
0	0,00	5,25E+08	4,95E+08	5,10E+08	1,50E+07	0,00	8,71	100,00	0,00	0
30	101,783	4,45E+08	3,50E+08	3,98E+08	4,75E+07	22,06	8,60	47,80	2,01	4,23
60	203,566	2,00E+08	1,80E+08	1,90E+08	1,00E+07	62,75	8,28	65,79	2,31	5,31
120	407,131	1,50E+08	1,00E+08	1,25E+08	2,50E+07	75,49	8,10	28,00	2,61	5,67
240	814,262	4,50E+07	2,50E+07	3,50E+07	1,00E+07	93,14	7,54	7,14	2,91	6,48
480	1628,525	5,00E+06	0,00E+00	2,50E+06	2,50E+07	99,51	6,40	0,00	3,21	6,64



$$y = 2,6144x - 0,9688$$

$$5 = 2,6144x - 0,9688$$

$$5 + 0,9688 = 2,6144x$$

$$5,96 = 2,6144x$$

$$X = \text{Log } C_{50} = 5,96 / 2,6144 = 2,28$$

$$\text{LOG } C_{50} = 2,28$$

$$\text{IC}_{50} = 190,5461 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$y = 2,6144x - 0,9688$$

$$6,28 = 2,6144x - 0,9688$$

$$6,28 + 0,9688 = 2,6144x$$

$$7,24 = 2,6144x$$

$$X = \text{Log } C_{90} = 7,24 / 2,6144 = 2,77$$

$$\text{LOG } C_{90} = 2,77$$

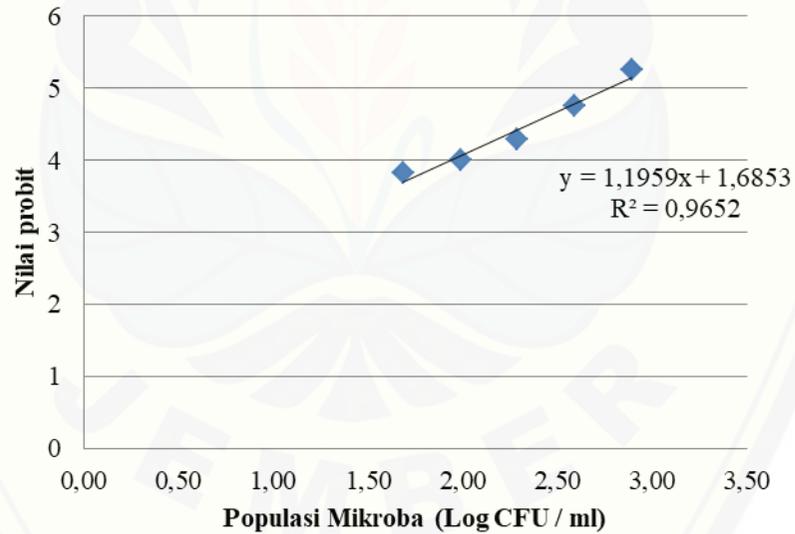
$$\text{IC}_{90} = 588,8437 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

Table 3.2 Transformation of percentages to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

d. *Salmonella typhii* pelarut air

Ekstrak (µl)	Konsentrasi Ekstrak (µg/ml)	Jumlah Koloni/200 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log jumlah koloni	% pertumbuhan	Log C	Probit
		U1	U2							
0	0,0	5,50E+08	5,25E+08	5,38E+08	1,25E+07	0,00	8,73	100,00	0,00	0
30	48,8	4,90E+08	4,50E+08	4,70E+08	2,00E+07	12,56	8,67	95,21	1,69	3,82
60	97,5	4,70E+08	4,25E+08	4,48E+08	2,25E+07	16,74	8,65	91,06	1,99	4,01
120	195,0	4,40E+08	3,75E+08	4,08E+08	3,25E+07	24,19	8,61	78,53	2,29	4,29
240	390,0	3,45E+08	2,95E+08	3,20E+08	2,50E+07	40,47	8,51	66,41	2,59	4,75
480	780,1	2,25E+08	2,00E+08	2,13E+08	1,25E+07	60,47	8,33	0,00	2,89	5,25



$$y = 1,1959x + 1,6853$$

$$5 = 1,1959x + 1,6853$$

$$5 - 1,6853 = 1,1959x$$

$$3,3147 = 1,1959 x$$

$$X = \text{Log C50} = 3,3147 / 1,1959 = 2,77$$

$$\text{LOG C50} = 2,77$$

$$\text{IC50} = 588,8437 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$y = 1,1959x + 1,6853$$

$$6,28 = 1,1959x + 1,6853$$

$$6,28 - 1,6853 = 1,1959 x$$

$$4,5947 = 1,1959x$$

$$X = \text{Log C90} = 4,5947 / 1,1959 = 3,84$$

$$\text{LOG C90} = 3,84$$

$$\text{IC90} = 6918,3097 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

Table 3.2 Transformation of percentages to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

**Lampiran 4.7 Dokumentasi Penelitian**

## a. Pengujian polifenol dan antioksidan



Gambar uji antioksidan



Gambar uji polifenol

## b. Proses ekstraksi daun tembakau

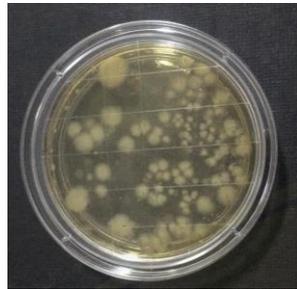


Gambar proses evaporasi ekstrak daun tembakau

c. Proses peremajaan bakteri *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus*

Gambar proses peremajaan bakteri

d. Proses Uji Antibakteri



*Salmonella typhi*



*Staphylococcus aureus*

Gambar pertumbuhan bakteri

