



**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN TEMBAKAU KASTURI  
(*Nicotiana tabaccum* L.) DENGAN PERBEDAAN KONSENTRASI PELARUT  
TERHADAP *Bacillus subtilis* DAN *Escherichia coli***

**SKRIPSI**

oleh

**Annindya Ayu Savira**

**141710101047**

**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN**

**2018**



**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN TEMBAKAU KASTURI  
(*Nicotiana tabacum* L.) DENGAN PERBEDAAN KONSENTRASI PELARUT  
TERHADAP *Bacillus subtilis* DAN *Escherichia coli***

**SKRIPSI**

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

oleh

**Annindya Ayu Savira**

**NIM 141710101047**

**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN**

**2018**

## PERSEMBAHAN

Saya persembahkan skripsi ini untuk :

1. Allah SWT, puji syukur atas kehadiran-Nya yang telah memudahkan segala urusan hamba-Mu, semoga rahmat dan ampunanmu-Mu selalu mengiringi setiap langkah hamba-Mu dan beri ampun atas segala dosa hamba;
2. Rosulullah SAW, terima kasih telah membimbing umat manusia menjadi khalifah di bumi serta menjadi tauladan umatmu untuk mencapai sebuah kedamaian;
3. Orangtua tercinta, mama Ika Hindriastutik, papa Gita Eka Bina Patrianta dan bunda Niken, terima kasih atas cinta, kasih sayang, doa serta semangat yang luar biasa
4. Kakakku tercinta Ananta Eka Jananndhika dan Adikku tersayang Arrizka Intan Puspitananda dan Amelia Fitriandita Putri serta seluruh keluarga besar yang selalu memberikan doa, dukungan, semangat, motivasi, yang selalu memberikan warna dalam kehidupan, sayang selalu untuk kalian;
5. Almamater Fakultas Teknologi Pertanian Jember.

**MOTTO**

“Hai orang-orang yang beriman, jadikanlah sabar dan shalatmu sebagai penolongmu, sesungguhnya Allah beserta orang-orang yang sabar”

(Al-Baqarah: 153)

Dan barang -siapa yang bertakwa kepada Allah, niscaya Allah menjadikan baginya kemudahan dalam urusannya.

(Q.S At-Talaq: 4)

Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya.

(Al-Baqarah: 286)

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Annindya Ayu Savira

NIM : 141710101047

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul **“Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) dengan Perbedaan Konsentrasi Pelarut Terhadap *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*”** adalah benar-benar hasil karya saya sendiri kecuali dalam kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan dalam institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember,

Annindya Ayu Savira

NIM 141710101047

**SKRIPSI**

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN TEMBAKAU KASTURI  
(*Nicotiana tabacum* L.) DENGAN PERBEDAAN KONSENTRASI PELARUT  
TERHADAP *Bacillus subtilis* DAN *Escherichia coli***

oleh :

**Annindya Ayu Savira**

**NIM 141710101047**

Pembimbing:

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

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Jayus

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “**Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) dengan Perbedaan Konsentrasi Pelarut Terhadap *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli***” karya Annindya Ayu Savira NIM 141710101047 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

Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc  
NIP. 196411091 98902 1 002

Dr. Ir. Jayus  
NIP. 196805161 99203 1 004

Tim  
Penguji:

Ketua

Anggota

Ahmad Nafi, S.TP, M.Si  
NIP. 197804032 00312 1 003

Ir. Giyarto, M.Sc  
NIP. 196607181 99303 1 013

Mengesahkan  
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian

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

## SUMMARY

**Antibacterial Activity of Kasturi's Tobacco Leaves Extract (*Nicotiana tabacum* L.) Produced Under Different Solvent Concentration Against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*; Annindya Ayu Savira; 141710101047; 2014; 66 pages; Departemen of Agricultural Product Technology, Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.**

The tobacco plants which often utilized the leaves, to be used as ingredients of making cigarettes. In practice efforts of tobacco leaves as raw smoking there are some tobacco leaves that do not meet the standards or did not qualify sort. Tobacco leaves which do not qualify for sorting still contains active compounds are antioxidants and antibacterial. Tobacco leaves are known to have antibacterial compounds in the form of flavonoids, saponins, alkaloids, steroids and terpenoids. The election of selectors or solvent compounds is an important factor in the process of extraction so that compounds in desired can be extracted to the maximum. In this study, the type of solvent used, namely ethanol and water, whereas the concentration of solvent used, namely 0% (water), 40% ethanol, and ethanol 80%. The use of different concentration is expected to extract the active compound found in tobacco leaves and can inhibit the growth of pathogenic bacteria such as *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*.

This research was carried out in four stages, namely the extraction of tobacco leaves, analysis of total polyphenols (*Folin-Ciocalteu*), analysis of antioxidant activity (DPPH *scavenging activity*), and analysis of antibacterials use tobacco leaf extract dilution method solid for the determination of Minimum Inhibitory Concentration (KHM) and IC<sub>50</sub>.

Results of the study showed extracts of tobacco leaves that have the appropriate criterion is on the use of ethanol as a solvent with 80% total polyphenols of 44,77 mg GAE/ml and antioxidant activity of 87,75%. Testing method of antibacterial activity



of solid dilution on the bacteria *Bacillus subtilis* showed KHM of 627,80  $\mu\text{g/ml}$  and  $\text{IC}_{50}$  of 204,61  $\mu\text{g/ml}$  whereas bacteria *Escherichia coli* shows KHM of 717,39  $\mu\text{g/ml}$  and  $\text{IC}_{50}$  of 215,45  $\mu\text{g/ml}$ .



## RINGKASAN

**Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) dengan Perbedaan Konsentrasi Pelarut Terhadap *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*; Annindya Ayu Savira; 2014; 141710101047; 66 halaman; Jurusan Teknologi Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.**

Tanaman tembakau yang sering dimanfaatkan yaitu bagian daunnya, untuk digunakan sebagai bahan pembuatan rokok. Dalam praktek usaha daun tembakau sebagai bahan baku rokok terdapat beberapa daun tembakau yang tidak memenuhi standar atau tidak lolos sortir. Daun tembakau yang tidak lolos sortir masih mengandung senyawa aktif bersifat antioksidan dan antibakteri. Daun tembakau diketahui memiliki senyawa antibakteri berupa flavonoid, saponin, steroid, alkaloid dan terpenoid. Pemilihan senyawa penyeleksi atau pelarut merupakan faktor penting dalam proses ekstraksi agar senyawa yang diinginkan dapat terekstrak secara maksimal. Pada penelitian ini, jenis pelarut yang digunakan yaitu etanol dan air, sedangkan konsentrasi pelarut yang digunakan yaitu 0% (air), etanol 40%, dan etanol 80%. Penggunaan konsentrasi yang berbeda-beda ini diharapkan mampu mengekstrak senyawa aktif yang terdapat dalam daun tembakau dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*.

Penelitian ini dilaksanakan dalam 4 tahapan, yaitu ekstraksi daun tembakau, analisis total polifenol (*Folin-Ciocalteu*), analisis aktivitas antioksidan (DPPH *scavenging activity*), dan analisis antibakteri ekstrak daun tembakau menggunakan metode dilusi padat untuk penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan IC<sub>50</sub>.

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak daun tembakau yang memiliki kriteria yang sesuai adalah pada penggunaan etanol 80% sebagai pelarut dengan total polifenol sebesar 44,77 mgGAE/ml dan aktivitas antioksidan sebesar 87,75%. Pengujian aktivitas antibakteri metode dilusi padat pada bakteri *Bacillus subtilis*

menunjukkan KHM sebesar 627,80  $\mu\text{g/ml}$  dan  $\text{IC}_{50}$  sebesar 204,61  $\mu\text{g/ml}$  sedangkan bakteri *Escherichia coli* menunjukkan KHM sebesar 717,39  $\mu\text{g/ml}$  dan  $\text{IC}_{50}$  sebesar 215,45  $\mu\text{g/ml}$ .



## PRAKATA

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana tabacum* L.) dengan Perbedaan Konsentrasi Pelarut Terhadap *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*”** 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 Sukarno., S.TP.,M.Eng selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
2. Dr. Ir. Jayus selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
3. Dr. Ir. Sony Suwasono., M.App.,Sc selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah banyak membantu, membimbing, dan mengarahkan selama pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi.
4. Dr. Ir. Jayus selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan arahan dan perbaikan dalam penyusunan skripsi ini.
5. Orangtua tercinta untuk mama (Ika Hindriastuti), papa (Gita Eka Bina Patrianta) dan bunda Niken, terimakasih atas kasih sayang, cinta, motivasi dan semangat yang luar biasa.
6. Kakakku tercinta Ananta Eka Jannandhika, adikku tercinta Arrizka Intan Puspitananda dan Amelia Fitriandita Putri, terimakasih atas doa, kasih sayang serta dukungan yang luar biasa kepada penulis.

7. Partner yang selalu ada dalam suka dan duka, Muhammad Iqbal Fahmi. Terimakasih atas kasih sayang, doa, semangat dan motivasi kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi.
8. Partner pejuang tembakau Dwi Tari Wulandari yang senantiasa membantu penulis selama penelitian hingga penyusunan skripsi dan sebagai tempat berbagi keluh kesah dan suka cita.
9. Keluarga besar THP B dan symphony choir, sahabatku tercinta eks gobezz, geng gelang dan gucci gang terimakasih kalian telah memberikan warna dalam hidupku.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah memberikan dukungan serta membantu pelaksanaan penelitian skripsi ataupun dalam penulisan skripsi sehingga dapat terselesaikan dengan baik..

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari kata sempurna, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan segala bentuk kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan di masa mendatang. Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Jember,  
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>PERSEMBAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>MOTTO</b> .....	<b>iv</b>
<b>PERNYATAAN</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBING</b> .....	<b>vi</b>
<b>PENGESAHAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>viii</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>x</b>
<b>PRAKATA</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xviii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Perumusan Masalah</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 Tanaman Tembakau Kasturi</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Efektivitas Ekstraksi</b> .....	<b>6</b>
<b>2.3 Aktivitas Senyawa Antioksidan</b> .....	<b>8</b>
<b>2.4 Jenis Senyawa Antibakteri Alami Daun Tembakau</b> .....	<b>9</b>
2.4.1 Flavonoid .....	9
2.4.2 Alkaloid .....	10
2.4.3 Terpenoid.....	10
2.4.4 Saponin.....	11
2.4.5 Steroid .....	11
<b>2.5 Mekanisme Penghambatan Senyawa Antibakteri</b> .....	<b>11</b>
<b>2.6 Pengujian Antibakteri Metode Dilusi (Pengenceran)</b> .....	<b>12</b>
<b>2.7 Jenis-Jenis Bakteri Patogen</b> .....	<b>13</b>
2.7.1 <i>Bacillus subtilis</i> .....	13

2.7.2 <i>Escherichia coli</i> .....	14
<b>BAB 3. METODELOGI PENELITIAN .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....</b>	<b>15</b>
3.2.1 Bahan Penelitian.....	15
3.2.2 Alat Penelitian .....	15
<b>3.3 Pelaksanaan Penelitian.....</b>	<b>16</b>
3.3.1 Rancangan Percobaan.....	16
3.3.2 Prosedur Penelitian.....	16
3.3.3 Prosedur Pengamatan.....	17
<b>3.4 Analisis Data.....</b>	<b>23</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1 Total Polifenol Ekstrak Daun Tembakau.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2 Identifikasi Senyawa Ekstrak Daun Tembakau</b>	
<b>Kasturi (LC-MS) .....</b>	<b>25</b>
<b>4.3 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Tembakau .....</b>	<b>27</b>
<b>4.4 Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau .....</b>	<b>28</b>
<b>BAB 5. PENUTUP.....</b>	<b>33</b>
<b>5.1 Kesimpulan.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2 Saran.....</b>	<b>33</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>34</b>

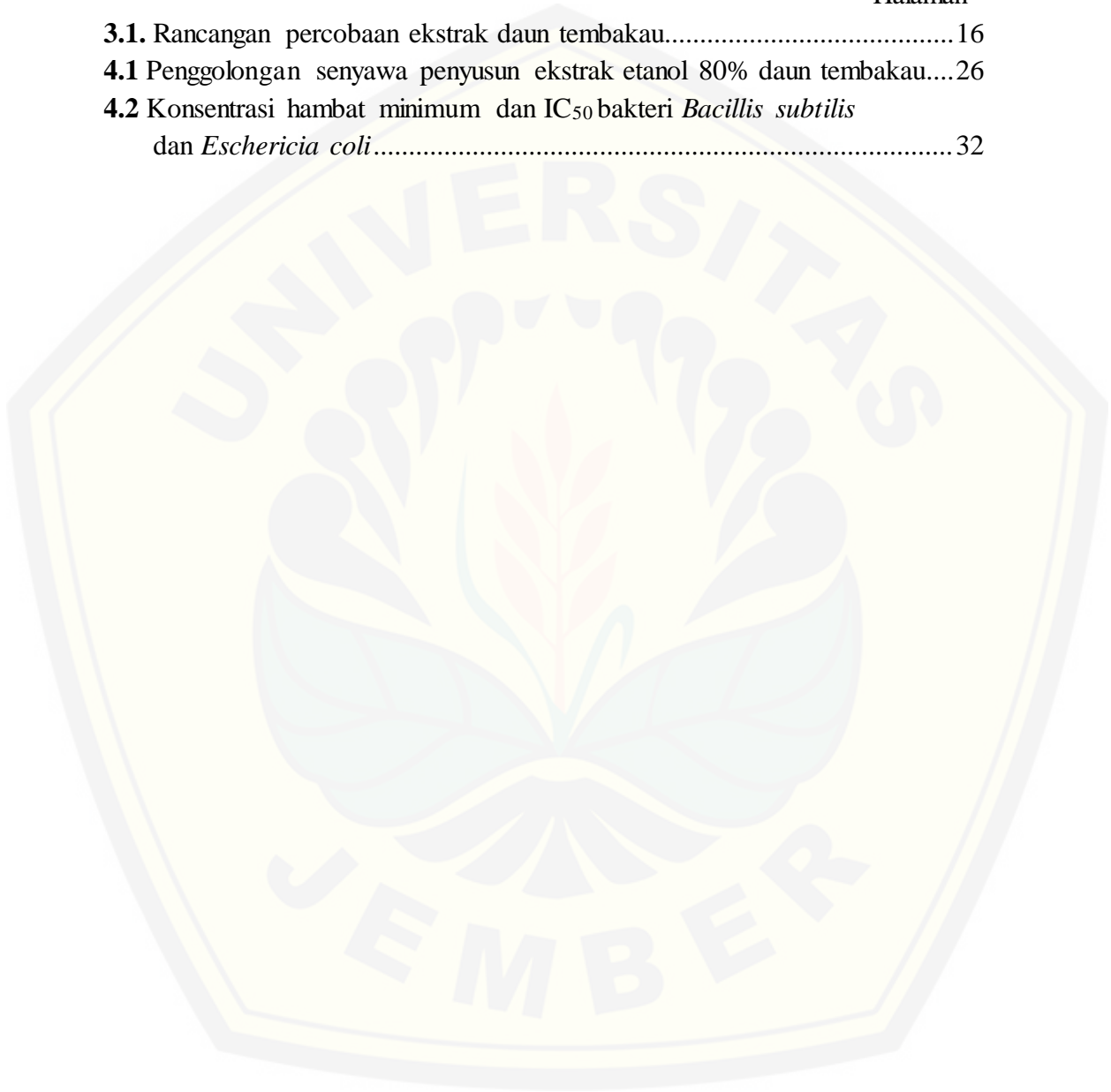
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Tanaman tembakau rakyat jenis kasturi.....	5
2.2 Mekanisme penangkapan radikal bebas oleh polifenol.....	8
2.3 Struktur senyawa flavonoid.....	9
2.4 Struktur senyawa alkaloid.....	10
2.5 Struktur senyawa terpenoid.....	10
2.6 Struktur senyawa saponin.....	11
2.7 Struktur senyawa steroid.....	11
2.8 Mekanisme penghambatan senyawa antibakteri.....	12
3.1 Diagram alir pembuatan ekstrak daun tembakau.....	19
3.2 Diagram alir preparasi isolat bakteri.....	22
3.3 Penentuan respon penghambat (KHM) dan IC50.....	23
4.1 Total polifenol ekstrak daun tembakau kasturi.....	24
4.2 Hasil identifikasi ekstrak etanol 80% daun tembakau jenis kasturi.....	26
4.3 Aktivitas Antioksidan ekstrak daun tembakau kasturi.....	28
4.4 Kurva hubungan penghambatan ekstrak etanol 80% daun tembakau kasturi terhadap pertumbuhan <i>Bacillus subtilis</i> .....	29
4.5 Kurva hubungan penghambatan ekstrak etanol 80% daun tembakau kasturi terhadap pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> .....	30



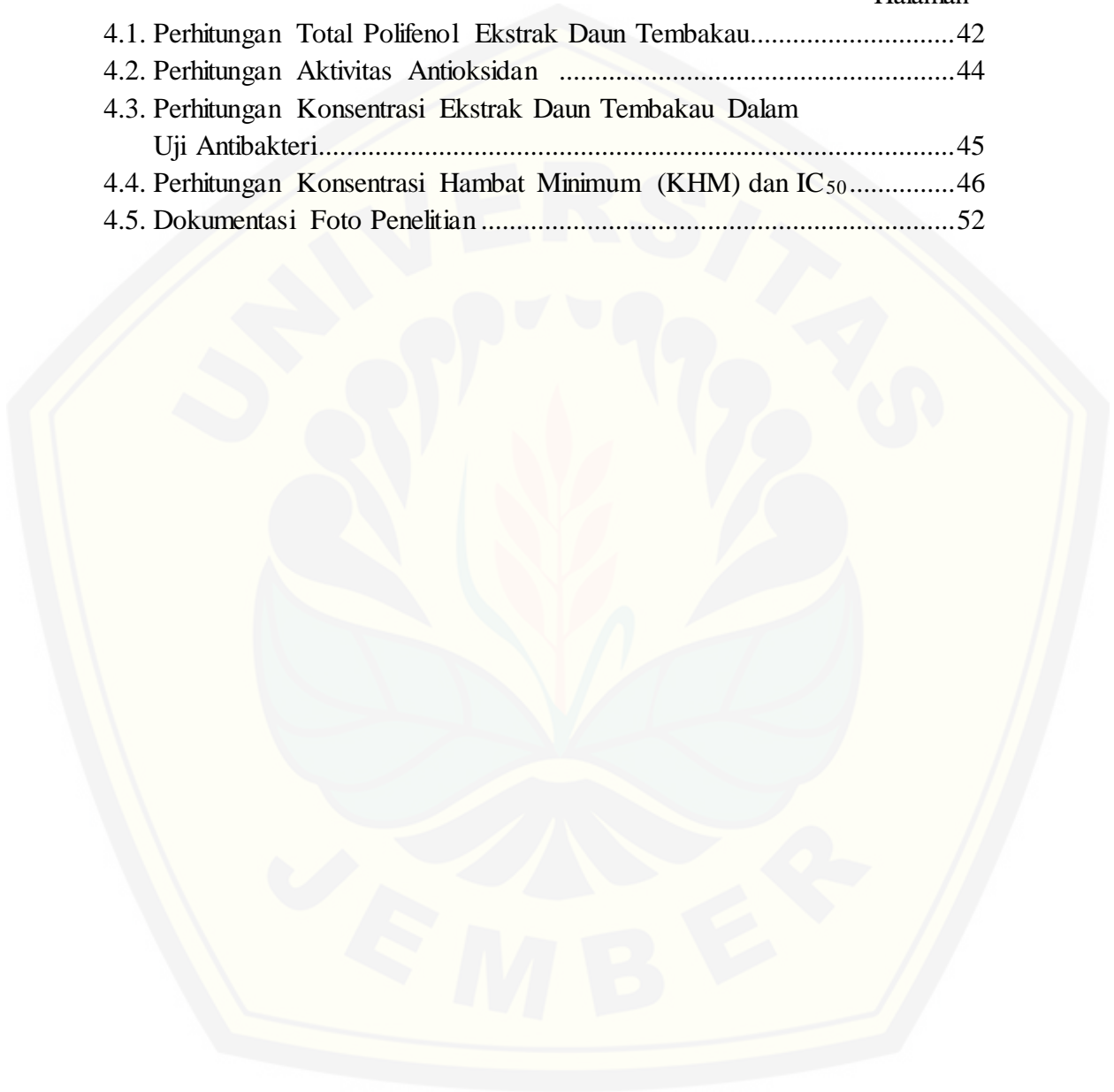
**DAFTAR TABEL**

	Halaman
3.1. Rancangan percobaan ekstrak daun tembakau.....	16
4.1 Penggolongan senyawa penyusun ekstrak etanol 80% daun tembakau....	26
4.2 Konsentrasi hambat minimum dan IC <sub>50</sub> bakteri <i>Bacillus subtilis</i> dan <i>Eschericia coli</i> .....	32



**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
4.1. Perhitungan Total Polifenol Ekstrak Daun Tembakau.....	42
4.2. Perhitungan Aktivitas Antioksidan .....	44
4.3. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Daun Tembakau Dalam Uji Antibakteri.....	45
4.4. Perhitungan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan IC <sub>50</sub> .....	46
4.5. Dokumentasi Foto Penelitian .....	52



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tembakau merupakan salah satu komoditas perkebunan unggulan di Kabupaten Jember. Berdasarkan data dari Badan Pusat Statistik Kabupaten Jember (2017) pada tahun 2016 produksi tanaman tembakau jenis Voor-Oogst (VO) Kasturi sebanyak 35.985,65 kuintal, tembakau Na-Oost (NO) sebanyak 22.425,40 kuintal, tembakau Voor-Oost (VO) Rajang sebanyak 3.890,25 kuintal dan tembakau Voor Oogst *White Burley* sebanyak 1.726,50 kuintal. Tanaman tembakau ini sering dimanfaatkan oleh masyarakat yaitu bagian daunnya sebagai bahan pembuatan rokok.

Dalam praktek usaha bahan baku rokok, terdapat beberapa daun tembakau rakyat jenis kasturi yang tidak lolos sortir (daun afkir). Salah satu penyebab turunnya kualitas dari daun tembakau ini yaitu adanya serangan hama yang menyebabkan kerusakan pada daun seperti robek atau berlubang (PTPN II, 2012). Keadaan ini tentu saja sangat memprihatinkan, khususnya bagi petani tembakau karena akan berdampak pada harga jual daun tembakau dipasaran. Untuk mengatasi kerugian akibat penurunan kualitas tersebut, perlu dilakukan penanganan khusus terhadap daun tembakau rakyat jenis kasturi.

Daun tembakau tidak lolos sortir (daun afkir) diketahui masih mengandung senyawa aktif yang bersifat antioksidan dan antibakteri (Duangsri, 2010). Daun tembakau diketahui memiliki senyawa antibakteri berupa flavonoid, saponin, steroid, alkaloid dan terpenoid (Patil *et al.* (2015); Asady *et al.* (2014); Shekins *et al.* (2016); dan Kazeem *et al.* (2014)). Adanya senyawa bioaktif yang terdapat pada daun tembakau ini dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri alami dalam bahan pangan maupun produk kesehatan. Oleh karena itu, dilakukan penelitian mengenai ekstrak daun tembakau sebagai antibakteri terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*. Bakteri *Bacillus subtilis* merupakan salah satu jenis bakteri Gram positif, sedangkan *Escherichia coli* dari jenis bakteri Gram negatif. Kedua bakteri tersebut merupakan bakteri patogen yang sering berada pada tubuh manusia, biasanya bakteri

ini berada pada bagian saluran pencernaan (usus) dan saluran pembuangan (Tjitrosoepomo, 1994).

## 1.2 Perumusan Masalah

Daun tembakau tidak lolos sortiran atau disebut juga dengan daun afkir memiliki nilai jual yang rendah, sehingga perlu dilakukan penanganan khusus dengan cara memanfaatkan daun tembakau afkir menjadi ekstrak. Daun tembakau diketahui memiliki senyawa antibakteri flavonoid, saponin, steroid, alkaloid dan terpenoid (Patil *et al.* (2015); Asady *et al.* (2014); Shekins *et al.* (2016); dan Kazeem *et al.* (2014)). Untuk mengekstrak senyawa aktif tersebut, memerlukan senyawa penyeleksi atau pelarut yang efektif agar senyawa yang di inginkan dapat terekstrak secara maksimal.

Flavonoid merupakan senyawa yang mengandung dua cincin aromatik dengan gugus hidroksil lebih dari satu. Senyawa fenol dengan gugus hidroksil yang semakin banyak akan memiliki tingkat kelarutan dalam air yang semakin besar atau bersifat polar (Robinson, 1995). Saponin merupakan senyawa yang memiliki gugus nonpolar berupa gugus steroid dan gugus triterpenoid, akan tetapi senyawa ini lebih cenderung bersifat polar karena ikatan glikosidanya (Harbone (2006) dan Sangi *et al.* (2008)). Alkaloid merupakan senyawa yang mengandung nitrogen sebagai bagian dari sistem sikliknya serta mengandung substituen yang bervariasi seperti gugus amina, amida, fenol, dan metoksi sehingga alkaloid bersifat semipolar (Dewi *et al.*, 2013). Terpenoid merupakan suatu senyawa kimia yang terdiri dari beberapa unit isopren yang hanya mengandung atom karbon dan hydrogen, atau karbon, hydrogen dan oksigen yang bersifat aromatis. Terpenoid umumnya larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel.

Ekstraksi dengan pelarut didasarkan pada sifat kepolaran zat dalam pelarut yang digunakan. Senyawa yang bersifat polar hanya akan larut pada pelarut polar seperti etanol, butanol, metanol dan air. Senyawa yang bersifat non-polar juga hanya larut pada senyawa non-polar seperti eter, kloroform dan n-heksana (Gritter *et al.*, 1991),

sehingga pemilihan pelarut yang sesuai merupakan faktor penting dalam proses ekstraksi. Pada penelitian ini, jenis pelarut yang digunakan yaitu etanol dan air. Penggunaan pelarut tersebut diharapkan mampu mengekstrak senyawa aktif seperti flavonoid dan alkaloid, saponin, steroid dan terpenoid. Pelarut etanol memiliki dua sisi yang terdiri dari gugus hidroksil ( $\text{OH}^-$ ) yang bersifat polar dan gugus  $\text{CH}_2\text{CH}_3$  yang bersifat non polar (Aziz *et al.*, 2014). Selain jenis pelarut yang digunakan, konsentrasi pelarut juga mempengaruhi jumlah atau banyaknya senyawa aktif yang terekstrak. Berdasarkan penelitian dari Munte *et al.* (2015) menunjukkan bahwa daun prasman yang diekstrak menggunakan etanol 60%, 80% dan 96% memiliki total fenolik dan aktivitas antioksidan yang semakin tinggi seiring dengan konsentrasi yang digunakan. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan ekstraksi daun tembakau afkir menggunakan pelarut air dan etanol dengan konsentrasi yang berbeda-beda untuk mengetahui total polifenol dan aktivitas antioksidannya, selanjutnya perlakuan terbaik akan diujikan aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

- a. mengetahui konsentrasi pelarut yang tepat untuk mengekstrak senyawa bioaktif ekstrak daun tembakau,
- b. mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum* L.), dan
- c. mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) terhadap *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*.

### 1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah :

- a. mengurangi limbah daun tembakau yang tidak lolos sortiran,

- b. meningkatkan nilai guna dan nilai ekonomi daun tembakau afkir dalam bentuk ekstrak, dan
- c. memberikan informasi mengenai ekstrak daun tembakau sebagai sumber antioksidan dan antibakteri alami.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Tembakau Kasturi (*Nicotiana tabacum*)

Tembakau merupakan tanaman semusim, yang termasuk dalam golongan tanaman perkebunan, akan tetapi tanaman ini tidak termasuk dalam golongan tanaman pangan. Ada beberapa jenis tanaman tembakau yang tumbuh di Indonesia meliputi tembakau Deli, tembakau Vorstenlanden, tembakau Temanggung, tembakau Besuki, tembakau Madura, tembakau Garut dan tembakau Lombok Timur. Selain itu spesies tembakau di dunia diketahui mencapai 50 jenis, dan diantara spesies tersebut terdapat 2 spesies yang paling banyak dibudidayakan yaitu *Nicotiana rustica*, dan *Nicotiana tabacum* (Hartanti *et al.*, 2012). Ciri-ciri spesies *Nicotiana tabacum* yaitu mahkota bunganya berwarna merah muda hingga kemerahan, mahkota bunganya berbentuk terompet panjang, daunnya berbentuk lonjong dengan ujung yang runcing, kedudukan daun pada batang tegak, dan tingginya sekitar 120 cm. Sedangkan ciri-ciri *Nicotiana rustica* yaitu mahkota bunganya berwarna kuning, bentuk mahkota bunga seperti terompet berukuran pendek dan sedikit bergelombang, daunnya berbentuk bulat dengan ujungnya yang tumpul, kedudukan daun pada batang mendatar agak terkulai dan tingginya sekitar 90 cm (Susilowati, 2006). Apabila dilihat berdasarkan ciri-cirinya, daun tembakau rakyat jenis Kasturi ini termasuk dalam spesies *Nicotiana tabacum*. Tanaman tembakau rakyat jenis Kasturi dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Tanaman tembakau rakyat jenis kasturi

Klasifikasi tanaman tembakau spesies *Nicotiana tabacum* menurut Siregar (2016) adalah sebagai berikut :

divisio : Plantae  
kelas : *Dicotyledonaea*  
ordo : *Personatae*  
famili : *Solanaceae*  
sub famili : *Nicotianae*  
genus : *Nicotianae*  
spesies : *Nicotiana tabacum* L.  
varietas : Kasturi Voor-Oogst

Tembakau Kasturi merupakan salah satu tipe tembakau yang diolah secara krosok (*leaf type*) atau lembaran-lembaran daun. Tembakau kasturi ini adalah salah satu tanaman tembakau yang di tanam pada musim kemarau dan dipanen pada musim penghujan atau dikenal dengan istilah Voor Oogst (VO). Tanaman ini banyak dibudidayakan di daerah Jember dan Bondowoso (Susilowati, 2006). Selain tembakau kasturi, ada jenis tembakau lain yang sering ditanam di Jember, yaitu tembakau jenis Na Oogst (NO). Tembakau ini merupakan tembakau yang ditanam pada musim penghujan dan dipanen pada musim kemarau. Kandungan nikotin pada tembakau yang ditanam pada musim penghujan lebih rendah dibandingkan dengan tembakau yang ditanam pada musim kemarau (Sudaryono, 2004). Menurut Sholeh *et al.* (2000) kandungan nikotin pada tembakau kasturi mencapai 3,21% sedangkan nikotin pada tembakau jenis Na Oogst, maksimal hanya mencapai 1,75%. Selain senyawa alkaloid berupa nikotin, terdapat senyawa aktif lain yang ada pada daun tembakau spesies *Nicotiana tabacum* yaitu senyawa flavonoid, saponin, steroid, dan terpenoid (Patil *et al.* (2015); Asady *et al.* (2014); Shekins *et al.* (2016); dan Kazeem *et al.* (2014))

## 2.2 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Efektivitas Ekstraksi

Ekstraksi adalah penarikan senyawa kimia yang dapat larut, sehingga akan memisahkan bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat



larut seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain. Senyawa aktif yang ada didalam simplisia dapat digolongkan kedalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain. Adanya senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (DepKes, 2000).

Tujuan dari ekstraksi yaitu untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan dan juga menghilangkan komponen yang tidak diinginkan dari tanaman yang akan diekstrak dengan menggunakan pelarut selektif. Selama ekstraksi, pelarut akan berdifusi kedalam bahan tanaman dan melarutkan senyawa yang terkandung didalamnya berdasarkan kepolaran yang sama (Ncube *et al.*, 2008). Ekstraksi digolongkan berdasarkan bentuk fase yang diekstraksi yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi cair-padat (Sa'adah, 2010). Faktor-faktor yang mempengaruhi laju ekstraksi yang meliputi :

#### 1. Persiapan sampel

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

#### 2. Pemilihan jenis pelarut

Pemilihan ini didasarkan pada jenis sampel yang pertimbangan harga pelarut 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).

#### 3. Laju ekstraksi

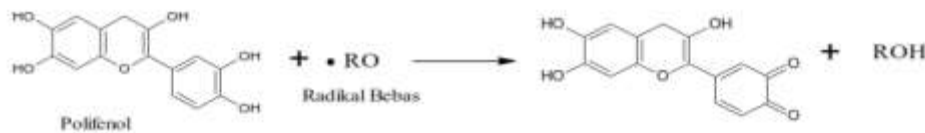
Laju ekstraksi juga dipengaruhi oleh kuantitas pelarut yang digunakan, semakin banyak jumlah pelarut maka semakin banyak pula jumlah ekstrak yang didapatkan (Ramadhan, 2010).

#### 4. Suhu pelarut

Suhu pelarut menentukan kecepatan ekstraksi, semakin rendah suhu ekstraksi, waktu yang dibutuhkan untuk larut akan semakin lama, sedangkan semakin tinggi suhu ekstraksi maka daya larut bahan yang diekstraksi akan semakin meningkat.

### 2.3 Aktivitas Senyawa Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat digunakan untuk melindungi komponen biologi seperti lipida, protein, vitamin dan DNA melalui perlambatan kerusakan, ketengikan atau perubahan warna yang disebabkan oleh oksidasi (Suryanto, 2012). Senyawa Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donor*) yang bekerja dengan cara mendonorkan satu atau lebih senyawa elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan (radikal bebas), sehingga aktivitas oksidan tersebut dapat diredam (Winarsi, 2007). Mekanisme penangkapan radikal bebas oleh polifenol yang disajikan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.2. Mekanisme penangkapan radikal bebas oleh polifenol (Haryoto, 2007).

Antioksidan dapat diperoleh dari 2 sumber yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami (Gordon, 1994). Saat ini penggunaan antioksidan sintetik mulai dibatasi karena dari hasil penelitian yang dilakukan, antioksidan sintetik seperti BHT (Butylated Hydroxy Toluena), BHA (*Butylated hidroxy aniline*) dan TBHQ (*Ters-Butylhydroquinone*) dapat meracuni dan bersifat karsinogenik. Oleh karena itu, industri makanan dan obat-obat mulai beralih pada sumber antioksidan alami (Takashi dan Takayumi, 1997). Antioksidan alami ini dapat diperoleh dari berbagai jenis tanaman karena mengandung senyawa kimia tertentu yang berpotensi sebagai antioksidan (Panjaitan *et al.*, 2014).

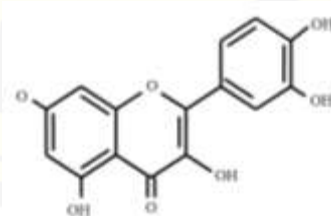
Fungsi utama antioksidan digunakan untuk memperkecil terjadinya proses oksidasi dari lemak dan minyak, memperkecil terjadinya proses kerusakan dalam makanan, memperpanjang masa pemakaian dalam industri makanan, meningkatkan stabilitas lemak yang terkandung dalam makanan serta mencegah hilangnya kualitas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

#### 2.4 Jenis Senyawa Antibakteri Alami Daun Tembakau

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

##### 1. Flavonoid

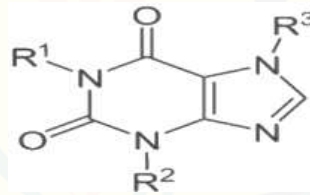
Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol, dimana senyawa ini mempunyai sifat efektif menghambat pertumbuhan virus, bakteri dan jamur. Mekanisme kerja dari senyawa flavonoid dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara merusak permeabilitas dinding sel bakteri (Sabir, 2005). Selain itu gugus hidroksil yang terdapat pada struktur senyawa flavonoid menyebabkan perubahan komponen organik dan transport nutrisi yang akhirnya akan mengakibatkan timbulnya efek toksik terhadap bakteri (Carlo *et al.*, 1999). Struktur senyawa flavonoid disajikan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Struktur senyawa flavonoid (Redha, 2010)

## 2. Alkaloid

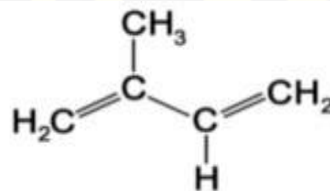
Alkaloid berpotensi sebagai antibakteri karena dapat merusak dinding sel (Juriah *et al.*, 2014). Mekanisme penghambatan senyawa alkaloid sebagai antibakteri yaitu dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Juliantina, 2008). Selain itu, menurut Gunawan (2008) dalam senyawa alkaloid terdapat gugus basa yang mengandung nitrogen akan bereaksi dengan senyawa asam amino yang menyusun dinding sel bakteri dan DNA bakteri. Reaksi ini akan mengakibatkan terjadinya perubahan struktur dan susunan asam amino yang akan menimbulkan perubahan keseimbangan genetic pada rantai DNA, sehingga akan mendorong terjadinya lisis sel bakteri yang menyebabkan kematian sel pada bakteri. Struktur senyawa alkaloid disajikan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Struktur senyawa alkaloid (Harborne, 1987)

## 3. Terpenoid

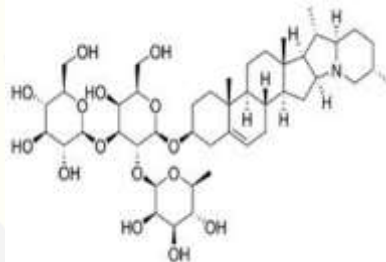
Senyawa terpenoid dapat menghambat pertumbuhan mikroba yakni dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel, dimana membran atau dinding sel tidak terbentuk secara sempurna (Ajizah, 2004). Struktur senyawa saponin disajikan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5. Struktur senyawa terpenoid (Sinulingga, 2011)

#### 4. Saponin

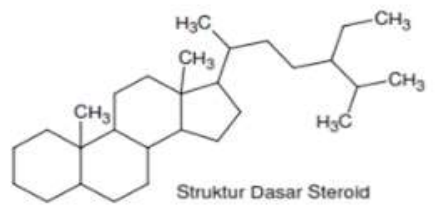
Saponin dapat bekerja sebagai antibakteri dengan cara mengganggu stabilitas membran sel bakteri, yang menyebabkan komponen penting bakteri seperti protein, asam nukleat dan nukleotida keluar sehingga bakteri menjadi lisis (Ganiswarna, 1995). Struktur senyawa saponin disajikan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6. Struktur senyawa saponin (Harborne, 1987)

#### 5. Steroid

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). Struktur senyawa steroid disajikan pada Gambar 2.7.

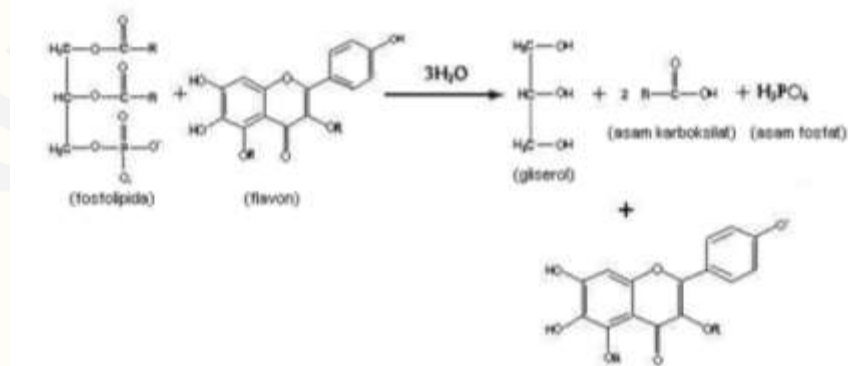


Gambar 2.7. Struktur senyawa steroid (Illing *et al.*, 2017)

### 2.5 Mekanisme Penghambatan Senyawa Antibakteri

Antibakteri merupakan zat yang dihasilkan oleh mikroorganisme (mahluk hidup berukuran kecil seperti jamur atau bakteri lain) atau bisa juga diperoleh dari hewan dan tumbuhan serta dapat dibuat secara sintesis (Mutschler, 1986). Aktivitas antibakteri ini dibagi menjadi 2 macam yaitu, aktivitas bakteriostatik (menghambat

pertumbuhan tetapi tidak membunuh patogen) dan aktivitas bakterisidal (dapat membunuh patogen dalam kisaran luas) (Brooks *et al.*, 2005). Zat antibakteri dapat bersifat bakterisidal pada konsentrasi tinggi dan bersifat bakteriostatik pada konsentrasi rendah (Volk, 1993). Selain itu berdasarkan mekanismenya, antibakteri bekerja dengan cara mempengaruhi dan mengganggu sintesis dinding sel, integritas membran sel, sintesis protein, perbaikan, replikasi dan transkripsi *deoxyribonucleic acid* (DNA) serta mengganggu metabolisme *intermediate* (Wax *et al.*, 2008). Mekanisme penghambatan senyawa antibakteri disajikan pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8. Mekanisme penghambatan senyawa antibakteri (Prajitno, 2007)

Gambar 2.8 menunjukkan proses perusakan membran sitoplasma, dimana ion H dari senyawa fenol dan turunannya (flavonoid) akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga menyebabkan molekul fosfolipida akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat dan asam fosfat. Hal ini yang mengakibatkan fosfolipida tidak mampu mempertahankan bentuk dari membran sitoplasma, akibatnya membran sitoplasma menjadi lisis dan bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan dan bahkan kematian (Volk Wheeler, 1988).

## 2.6 Pengujian Antibakteri Metode Dilusi (Pengenceran)

Metode dilusi secara umum digunakan untuk mengukur Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Keuntungan dari metode ini yaitu dapat menyajikan data dengan hasil kuantitatif, sehingga

menunjukkan jumlah zat antimikroba tertentu yang diperlukan untuk menghambat mikroorganisme yang diuji (Jawetz *et al.*, 2007). Metode dilusi dibedakan menjadi dua yaitu dilusi cair (*broth dilution*) dan dilusi padat (*solid dilution*). Metode dilusi cair ini dilakukan dengan cara membuat seri pengenceran senyawa uji pada media cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji senyawa antimikroba pada konsentrasi terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM dan kemudian dilakukan kultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji atau senyawa antimikroba dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media yang jernih setelah dilakukan inkubasi maka dapat ditetapkan sebagai KBM. Sedangkan metode dilusi padat ini serupa dengan metode dilusi cair yang membedakan hanyalah media menggunakan padat. Pada metode ini memiliki keuntungan yaitu satu konsentrasi senyawa uji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Rahayu, 2009).

## 2.7 Jenis-Jenis Bakteri Patogen

### 2.7.1 *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* merupakan bakteri gram positif yang berbentuk batang, bersel satu, memiliki ukuran 0,5 – 2,5  $\mu\text{m}$  x 1,2 – 10  $\mu\text{m}$ , bereaksi katalase positif, bersifat aerob atau anaerob fakultatif, dan heterotrof (Soesanto, 2008). Bakteri ini termasuk kelompok bakteri famili *Bacillaceae* yang hidup didalam saluran pencernaan manusia dan bersifat patogen (Stein, 2005). Suhu optimal pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* yakni antara 28 – 38°C. Apabila Bakteri ini diisolasi dari seorang penderita, suhu optimal yang diperlukan adalah 37°C, dan pH optimum pertumbuhannya adalah 7,4. Bakteri *Bacillus subtilis* juga terdapat pada hidung, mulut, tenggorokan, pori-pori, permukaan kulit, kelenjar keringat dan saluran usus. Infeksi *Bacillus subtilis* dapat berupa jerawat, bisul dan luka (Jawetz *et al.*, 2001). Berdasarkan penelitian dari Akinpelu dan Obuotor (2000) bahwa ekstrak daun *Nicotiana tabacum* menggunakan

pelarut methanol 60% dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* (NCIB 3610).

### 2.7.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif dan memiliki bentuk batang pendek (Dewanti dan Wahyudi, 2011). Bakteri ini memiliki panjang sekitar 2  $\mu\text{m}$ , diameter 0,4-0,7  $\mu\text{m}$ , dan bersifat anaerob fakultatif. *Escherichia coli* biasanya membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan tepi yang nyata (Jawetz *et al.*, 2007). Bakteri *Escherichia coli* dapat tumbuh pada suhu optimum 37°C, dengan interval pertumbuhannya yaitu 10 – 40°C dengan nilai pH maksimum 8,5. Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri yang relatif sensitif terhadap panas, sehingga akan mati atau inaktif pada suhu pasteurisasi atau selama proses pemanasan (Maloha, 2002). Dinding sel bakteri gram negatif tersusun atas membran luar, peptidoglikan, dan membran dalam. Peptidoglikan yang terkandung dalam bakteri gram negatif memiliki struktur yang lebih kompleks dibandingkan dengan bakteri gram positif. Membran luarnya terdiri dari lipid, liposakarida, dan protein. Peptidoglikan berfungsi mencegah sel lisis, menyebabkan sel kaku dan memberi bentuk kepada sel (Purwoko, 2007).

*Escherichia coli* ini dapat menyebabkan diare pada manusia atau disebut Entropatogenik *Escherichia coli* (EEG). Infeksi dari EEG dapat menyebabkan penyakit seperti kolera dan disentri pada anak-anak dan orang dewasa (Nuraeni *et al.*, 2000). Berdasarkan penelitian dari Bakht *et al.* (2012) bahwa daun *Nicotiana tabacum* yang diekstrak menggunakan etil asetat, butanol dan air dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, sedangkan daun *Nicotiana tabacum* yang diekstrak menggunakan pelarut etanol 95%, n-hexane dan aseton tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

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

### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

#### 3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan yaitu daun tembakau kasturi afkir yang diperoleh dari perkebunan tembakau rakyat dikawasan Kalisat,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , media NB (Nutrient Broth), media NA (Nutrient Agar), etanol 96% teknis, etanol *pro analysis*, DPPH (*1,1-diphenyl-1-2-Picrylhidrazil*), aquades, DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*), larutan garam fisiologis 0,85%, *reagen Follin-Ciocalteau*. Bakteri uji yang digunakan yaitu kultur murni bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* 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 ini yaitu, shaker waterbath (Memmert D-91126, Jerman), rotary evaporator (Butchi, Jerman), blender (Miyako, Indonesia), spektrofotometer (Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS, China), alat LC-MS (Shimadzu LC-MS 2020), pipet mikro (Biohit 12636255, Jerman), *laminar air flow* (Crumair, Spanyol), autoklaf (Hirayama HL 36, Jepang), inkubator (Haraeus Inst B6200, Jerman), *colony counter* (Stuart Scientific) dan neraca analitik (Ohaus, USA).

### 3.3 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.3.1 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental, dimana rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) yang setiap perlakuannya dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali ulangan. Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Rancangan percobaan ekstrak daun tembakau menggunakan berbagai konsentrasi pelarut

Konsentrasi Pelarut	Perlakuan	
	Air	Etanol
P0 (Air)	225 ml	0 ml
P1 (Etanol 40%)	131,25 ml	93,73 ml
P2 (Etanol 80%)	37,5 ml	187,5 ml

Rumus Konsentrasi yang digunakan yaitu :

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

#### 3.3.2 Prosedur Penelitian

Prosedur ini diawali dengan daun tembakau kasturi afkir dibersihkan terlebih dahulu untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel pada daun, lalu daun dilayukan pada suhu ruang selama 14 hari. Daun tembakau yang sudah kering kemudian dikecilkan ukurannya menggunakan blander. Selanjutnya daun tembakau yang telah halus ditimbang sebanyak 25 gram, lalu dimasukkan kedalam erlenmeyer 250 ml dan ditambahkan etanol (0, 40, dan 80%) sebanyak 225 ml atau rasio 1:10 (b/v). Tahap berikutnya, dilakukan pengestrakan menggunakan *shaker waterbath* dengan suhu 60°C selama 3 jam. Setelah itu dilakukan penyaringan untuk memisahkan supernatan dengan filtratnya. Filtrat yang diperoleh kemudian di *rotary evaporator* dengan suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat yang didapatkan kemudian diuji total polifenol dan aktivitas antioksidannya, lalu hasil pengujian terbaik akan diuji lebih lanjut aktivitas antibakterinya terhadap *Bacillus*

*subtilis* dan *Escherichia coli*. Diagram alir pembuatan ekstrak daun tembakau dapat dilihat pada Gambar 3.1.

### 3.3.3 Prosedur Pengamatan

#### 1. Uji Total Polifenol

Penelitian ini menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* (Orak, 2006). Penggunaan metode analisis dengan pereaksi *Folin-Ciocalteu* karena pereaksi ini merupakan pereaksi spesifik untuk senyawa fenol (Waterhouse, 1999). Pembuatan kurva standar untuk perhitungan polifenol dibuat dengan cara menggunakan larutan asam galat. Mula-mula asam galat dibuat dengan berbagai konsensentrasi (0; 125; 250; 500; 1000; 2000; 4000; 8000)  $\mu\text{M}$ , kemudian diambil masing-masing diambil sebanyak 0,4 ml dan dimasukkan kedalam 8 tabung reaksi berbeda. Tabung reaksi tersebut lalu ditambahkan 0,8 ml reagen *Folin-Ciocalteu* yang telah diencerkan 10 kali. Selanjutnya tabung reaksi di vortex dan didiamkan selama 5 menit, setelah itu ditambahkan 0,8 ml larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7% dan 0,36 ml aquades. Tabung reaksi yang berisi larutan kurva standar kemudian ditutup menggunakan alummunium foil dan didiamkan ditempat gelap selama 60 menit, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 765 nm.

Preparasi ekstrak daun tembakau dilakukan dengan cara ekstrak daun tembakau sebanyak 0,1 ml dimasukkan kedalam ependorf dan diencerkan menggunakan aquades hingga 1 ml. Setelah itu ekstrak yang telah diencerkan, diambil sebanyak 0,067  $\mu\text{l}$  dan ditambahkan aquades hingga 1 ml. Selanjutnya pengujian total polifenol dilakukan dengan cara sebanyak 0,2 ml sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 15,8 ml aquades dan 1 ml reagen *Folin-Ciocalteu* lalu di vortex. Tabung reaksi tersebut kemudian didiamkan selama 8 menit kemudian ditambahkan 3 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10%, lalu di vortex. Setelah itu, tabung reaksi ditutup menggunakan alummunium foil dan didiamkan pada tempat gelap selama 2 jam, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 765 nm.

Analisa kandungan total polifenol pada sampel dihitung berdasarkan kurva standard asam galat yang diperoleh. Rumus yang digunakan untuk menghitung total polifenol yaitu :

$$\text{Kandungan Total Polifenol (mg GAE/ml)} = C \times f_p \times \text{BM}$$

keterangan :

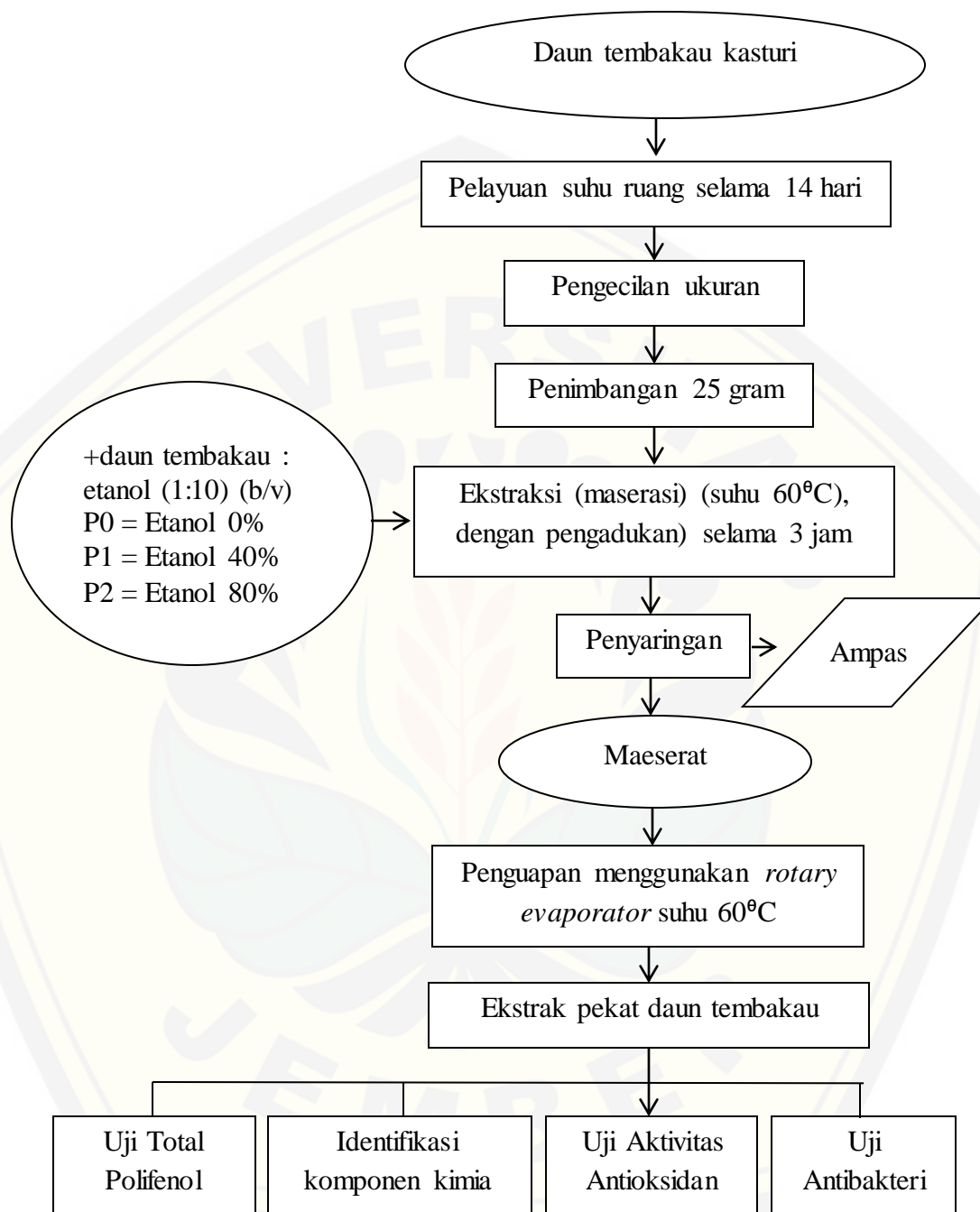
C = konsentrasi fenolik (nilai x)

Fp = faktor pengenceran

BM = konversi berat molekul asam galat

## 2. Identifikasi komponen ekstrak menggunakan LC-MS

Sampel di injeksi pada konsentrasi 1000 ppm, sebanyak 5  $\mu\text{l}$  pada alat Shimadzu LC-MS 2020 dengan kondisi fase gerak gradient pada menit ke 0 *mobile phase* B 0%, pada menit ke-60 *mobile phase* B 100%. *Column* yang digunakan ada dua, pada *column* 1 yaitu Shim-Pack GVP-ODS (5L x 2,0), *column* 2 yaitu Shim-Pack VP-ODS (250L x 4,6). *Mobile phase* A yaitu *water formatic acid* 0,1%, *mobile phase* B yaitu acetonitrile. Kecepatan alir sampel sebesar 0,3 ml/menit pada suhu 30°C. Data yang dihasilkan berupa scan berat molekul setiap zat yang terkandung di dalam sampel.



Gambar 3.1. Diagram alir pembuatan ekstrak daun tembakau kasturi yang telah dimodifikasi (Shekins *et al.*, 2016)

### 3. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Tembakau

Pengujian aktivitas antioksidan pada penelitian ini menggunakan metode serapan radikal DPPH (*1,1-diphenyl-1-2-Picrylhidroksil*). Mula-mula persiapan bahan uji ini dilakukan dengan cara ekstrak daun tembakau 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, kemudian 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 kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1 ml DPPH 0,4 mM dan 3,9 ml etanol. Selanjutnya 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:

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

### 4. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tembakau Metode KHM

Pengujian antibakteri ekstrak daun tembakau terhadap *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* dilakukan menggunakan penentuan respon penghambatan (KHM) dengan metode dilusi agar dan penentuan nilai IC<sub>50</sub> (*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 didalam autoklaf dengan temperatur  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit

b. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Media NA sebanyak 4 gram dilarutkan dalam 200 ml aquades yang telah dihangatkan kedalam tabung erlenmeyer. Campuran kemudian dipanaskan diatas *hotplate magnetic* sampai larutan berwarna kuning bening. Setelah itu, larutan NA dimasukkan kedalam 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  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.

c. Pembuatan media *Nutrient Broth* (NB)

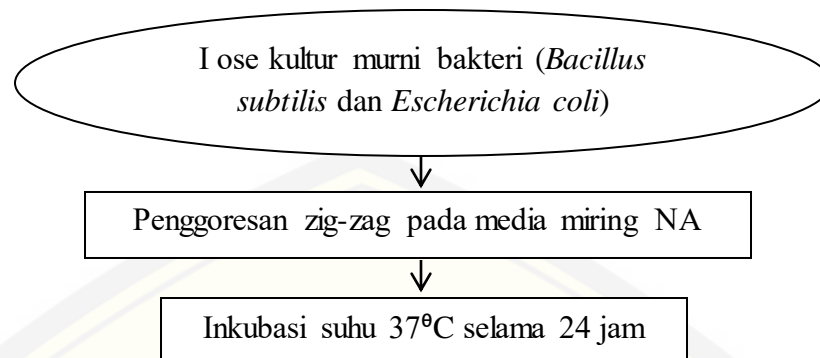
Media NB sebanyak 0,08 gram dilarutkan dalam 10 ml aquades tanpa pemanasan, lalu diaduk hingga larut. Larutan media NB kemudian dimasukkan kedalam masing-masing ependorf sebanyak 1 ml, lalu disterilisasi dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.

d. Pembuatan larutan fisiologi NaCl 0,85%

Sebanyak 1,38 gram serbuk NaCl dilarutkan kedalam 160 ml aquades, setelah itu dimasukkan kedalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 9 ml. tabung reaksi tersebut kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit.

e. Pembuatan Isolat Bakteri

Preparasi biakan bakteri, diawali dengan sebanyak 1 ose kultur murni bakteri (*Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*) ditempelkan pada media miring agar NA dengan pola zig-zag, dimana setiap perlakuannya dilakukan dalam keadaan steril didekat nyala api bunsen. Selanjutnya, biakan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Berikut diagram alir preparasi isolat bakteri dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Diagram alir preparasi isolat bakteri

f. Pembuatan suspensi media

Sebanyak 1 ose bakteri (*Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*) dari stok kultur agar miring NA diambil menggunakan ose steril, kemudian dimasukkan kedalam ependorf yang berisi 1 ml media NB dan diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C. Hasil inkubasi dibuat seri pengenceran dengan cara mencampurkan 1 ml media NB yang telah diinkubasi kedalam tabung reaksi yang berisi 9 ml NaCl 0,85% sampai pengenceran  $10^{-6}$  (Pratiwi, 2008).

g. Pembuatan larutan uji

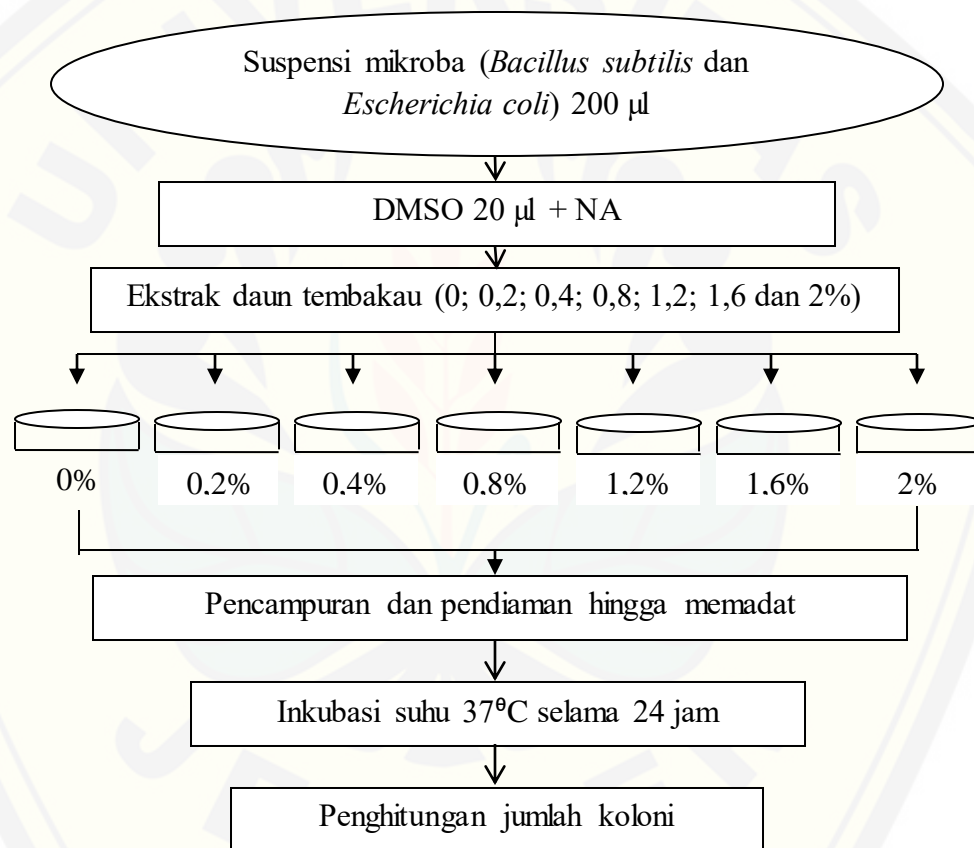
Mula-mula yaitu membuat larutan stok dengan konsentrasi 20%, dengan cara mengambil ekstrak pekat daun tembakau sebanyak 2 ml lalu dimasukkan kedalam labu ukur dan ditambahkan aquades hingga batas. Larutan uji selanjutnya dibuat dalam berbagai konsentrasi 0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; dan 2 %. Larutan stok yang telah dibuat kemudian diambil secara berurut-urut sebanyak 0, 52, 104, 208, 312, 416, dan 520  $\mu\text{l}$ . setelah itu, ditambahkan DMSO (Dimethyl Sulfoxide) masing-masing sebanyak 20  $\mu\text{l}$ .

h. Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri daun tembakau dilakukan untuk menentukan KHM dan nilai  $IC_{50}$  pada bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* menggunakan metode dilusi agar. Mula-mula sebanyak 200  $\mu\text{l}$  suspensi bakteri yang telah dibuat (pengenceran  $10^{-6}$ ) dimasukkan ke masing-masing cawan petri. Larutan uji yang telah



dibuat dengan berbagai konsentrasi ditambahkan kedalam cawan petri tersebut, lalu ditambahkan media NA yang masih hangat (cair) berurut-urut ke masing-masing cawan petri sebanyak 4,980; 4,928; 4,876; 4,772; 4,668; 4,564; dan 4,460 ml, kemudian diratakan 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<sub>50</sub>

### 3.4 Analisis Data

Data yang diperoleh nantinya akan dianalisis secara deskriptif disusun dalam tabel dan dimuat dalam bentuk grafik kemudian diinterpretasikan sesuai dengan pengamatan yang ada.

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah konsentrasi pelarut yang paling efektif yaitu pelarut etanol 80%, dimana menghasilkan total polifenol ekstrak daun tembakau tertinggi yaitu 44,77 mg GAE/ml dengan aktivitas antioksidan sebesar 87,75%. Ekstrak daun tembakau dapat berfungsi sebagai antibakteri terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* dengan nilai KHM dan IC<sub>50</sub> ekstrak daun tembakau terhadap bakteri *Bacillus subtilis* berturut-urut yaitu 627,80 µg/ml dan 204,61 µg/ml, sedangkan nilai KHM dan IC<sub>50</sub> ekstrak daun tembakau terhadap bakteri *Escherichia coli* berturut-urut yaitu 717,39 µg/ml dan 215,45 µg/ml.

### 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut ekstrak daun tembakau kasturi secara *in vivo* terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas *Salmonella Typhimurium* Terhadap Ekstrak Daun Psidium GuajavaL. *Journal Bioscientie*. 1(1): 31 – 8.
- Akinpelu, D. A., dan E. M. Obuotor. 2000. Antibacterial activity of *Nicotiana tabacum* Leaves. *Fitoterapia*. 71: 199 – 200.
- Asady, A. A. B. A., N. Y. Ahmed, dan T. A. Mustafa. 2014. Cytotoxic and Cytogenic Effects of Aqueous and Methanol Crude Extracts of *Nicotiana tabacum* on Rhabdomyosarcoma (RD) and L20B cel lines in vitro. *European Journal of Experimental Biology*. 4(2): 164 – 171.
- Aziz, T., S. Febrizky, dan A. D. Mario. 2014. *Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Persen Yield Alkaloid Dari Daun Salam India (Murraya Koenigii)*. Palembang: Universitas Sriwijaya.
- Badan Pusat Statistik Kabupaten Jember. 2017. *Kabupaten Jember Dalam Angka 2017*. Jember: BPS Kabupaten Jember.
- Bakht, J., Azra, dan M. Shafi. 2012. Antimicrobial Activity of *Nicotiana tabacum* Using Different Solvents Extracts. *Pak. J. Bot*. 44(1): 459 – 463.
- Bangham, A. D., dan R. W. Horne. 2006. Actions Saponins on Biological Cell Membranes. *Journal Nature*. 196: 952 – 953.
- Bankova, V., D. Bertelli, R. Borba, B. J. Conti, I. B. S. Cunha, C. Danert, M. N. Eberlin, S. Popova, K. B. Santiago, A. Salas, A. C. H. F. Sawaya, N. V. Schwab, J. M. Sforcin, M. S. Finstrom, M. Spivak, B. Trusheva, M. V. Boas, M. Wilson, dan C. Zampini. 2016. Standard Methods for Apis Mellifera Propolis Research. <http://www.tandfonline.com>. [Diakses 22 Juli 2018].
- Brooks, G. F., J. S. Butel, dan S. A. Morse. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Penerjemah Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Jakarta: Salemba Medika.
- Carlo, G., N. Mascolo, A.A. Izzo, dan Capasso. 1999. Falvonoids: Old and New Aspects of a Class of Natural Therapeutic Drugs. *Jurnal Life Science*. 65(4): 337 – 53.
- Cowan, M. M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev*. 12: 564 – 82.

- Davis, D. L., dan M. T. Nielson. 1999. *Basic Chemical Constituents of Tobacco Leaf and Differences among Tobacco Types*. Georgia: Blackwell Science.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cetakan Pertama. Jakarta: Depeks RI.
- Dewanti, S., dan M. T. Wahyudi. 2011. Antibacteri Activity of Bay Leaf Infuse (Folia *Syzygium polyanthum* Wight) to *Bacillus cereus* in Vitro. *J. Med. Planta*. 1(4): 78 – 81.
- Dewi, I. D. A. D. Y., K. W. Astuti, dan N. K. Warditiani. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 95% Kulit Buah Manggis (*Garcia mangostana* L.). *Skripsi*. Bali: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana.
- Duangstri, Pichet., K. Juntarapun, dan C. Satirapipathkul. 2012. *The Tabaco Leaf Extract And Antibacterial Activity In Textile*. Bangkok Thailand: RMUTP International Conference: Textiles & Fashion.
- Fernandez, M. M. R., M. Laloup, M. Wood, G. D Boeck, M. L. Rivadulla, P. Wallemacq, dan N. Samyn. 2007. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Analysis of Multiple Hallucinogens, Chlorpheniramine, Ketamine, Ritalinic Acid, dan Metabolites, in Urine. *Journal of Analytical Toxicology*. 31: 497 – 504.
- Ganiswarna, S. 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4. Jakarta: Penerbit UI.
- Gordon, I. 1994. *Functional Food, Food Design, Pharmafood*. New York: Champman and Hall.
- Gritter, R. J., J. M. Bobbit, dan A. E. Schwarting. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Bandung: ITB Press.
- Gunawan. 2008. Antibakteri pada Herba Meniran (*Phylanthus niruri* Linn). *Jurnal Kimia*. 2(22): 31 – 39.
- Hale, K. J. M., dan M. Sanders. 2013. Quantitative LC-MS Screening for Illicit Drugs Using Ultrahigh Resolution Mass Analysis and Accurate Mass Confirmation. [www.thermoscientific.com](http://www.thermoscientific.com) [Diakses 22 Juli 2018].
- Halliwell, B., dan J. M. C. Gutteridge. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3th Ed. New York: Oxford University Press, Inc.
- Hammado, N., dan I. Illing. 2013. Identifikasi Senyawa Bahan Aktif Alkaloid pada Tanaman Lahuna (*Eupatorium odoratum*). *Jurnal Dinamika*. 4(2): 1 – 18.

- Harborne, J. B. 1987. *Metoda Fitokimia Penuntun Cara Menganalisa Tumbuhan*. Edisi II. Bandung: ITB
- Harborne, J. B. 2006. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Edisi IV. Bandung: ITB.
- Hartanti, Nurhidayati, dan Muryono. 2011. Budidaya Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum L var Prancok 95*) pada Cekaman Kekeringan *Polietilena Glikol* (PEG) Secara *in Vitro*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Haryoto, Santoso., N. Broto, dan Hafidz. 2007. Aktivitas Antioksidan Fraksi Polar Ekstrak Metanol dari Kulit Kayu Batang *Shorea acuminatissima* dengan Metode DPPH. *Jurnal Ilmu Dasar*. 8(2): 158 – 164.
- Huang D., B. Ou, R. L. Prior. 2005. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agricultural and Food*. 53: 1841 – 1856.
- Illing, I., W. Safitri, dan Erfina. 2017. Uji Fitokimia Esktrak Buah Dengan. *Jurnal Dinamika*. 8(1): 66 – 84.
- Jawetz, E., J. L. Melnick, E. A. Adelberg, G. F. Brooks, J. S. Butel, dan L. N. Ornston. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran*. Diterjemahkan Hartanto, H., C. Rachman, A. Dimanti, dan A. Diani. Edisi ke 20. ECG. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran.
- Jawetz, Fortas., dan Lay. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Surabaya: Salemba Medical.
- Juliantina, F. R., D. A. Citra, B. Nirwani, T. Nurmasitoh, dan E. T. Bowo. 2009. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Agen Antibakteri Terhadap Gram Positif dan Gram Negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*. 1(1): 12 – 20.
- Juriah, Siti., D. Suryanto, dan I. T. Jamilah. 2014. Aktivitas Antibakteri Spesies *Asterias Forbesii* Terhadap Beberapa Jenis Bakteri Patogen. *Jurnal Berkala Perikanan Terubuk*. 42(2): 37 – 50.
- Kazeem, M. I., S. M. Ogungbe, G. M. Saibu, dan O. M. Aboyade. In vitro Study on the Hypoglycemic Potential of *Nicotiana tabacum* Leaf Extracts. *Bangladesh J Pharmacol*. 9: 140 – 145.
- 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.

Maloha, M. 2002. Pemeriksaan Angka Kuman *Bacillus cereus* dengan Usap Alat pada Restoran, Rumah Makan, dan Lokalisasi Makanan Jajanan di Kota Jambi Tahun 2001. *Skripsi*. Medan: FKM USU.

Mardawati, F. Filianty, dan H. Marta. 2008. *Kajian Aktivitas Antioksidan Akstrak Kulit Manggis (Garcinia mangostana L) dalam Rangka Pemanfaatan Limbah Kulit Manggis di Kecamatan Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya*. Bandung: Fakultas Teknologi Industri. Universitas Padjadjaran.

Munte, Liliyanti, M. R. Runtuwene, dan G. Citraningtyas. 2015. Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Daun Prasman. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 4(3): 41 – 50.

Mutschler, E. 1986. *Dinamika Obat Farmakologi dan Toksikologi*. Edisi ke-5. Bandung: Penerbit ITB.

Naiborhu, P. E. 2002. Ekstraksi dan Manfaat Ekstrak Mangrove (*Sonneratia alba* dan *Sonneratia caseolaris*) Sebagai Bahan Alami Antibakterial pada Patogen Udang Windu, *Vibrio harveyi*. *Tesis*. Bogor: Sekolah Pascasarjana IPB.

Naim, R. 2005. Senyawa Antimikroba dari Tanaman. Dosen FKH dan Pascasarjana IPB. <http://www.Iptek.net.id>. [Diakses pada 31 Mei 2018].

Ncube, N. S., A. J. Afolayan, dan A. I. Okoh. 2008. Assessment Techniques of Antimicrobial Properties of Natural Compounds of Plant Origin: Current Methods And Future Trends. *African Journal of Biotechnology*. 7(2): 1797 – 1806.

Nuraeni, K., Y. Wibisono, dan Idrial. 2002. *Mikrobiologi Pangan dan Pengolahan*. Jember: Politeknik Pertanian Negeri Jember.

Nurnasari, E., dan Subiyakto. 2011. Komposisi Kimia Ekstrak pada Beberapa Tipe Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.). *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*. 10 (5): 571-580.

Orak, H. 2006. Total Antioxidant Activities, Phenolics, Anthocyanins, Polyphenoloxidase Activities in Red Grape Varieties. *Electronic Journal of Polish Agricultural University Food Science and Technology*. 9: 117 – 118.

Panjaitan, M. P., A. H. Alimuddin, dan Adhitiyawarman. 2014. Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Kulit Batang Ceria (*Baccaurea hookeri*). *Jurnal JKK*. 3(1): 17 – 21.

- Patil, R. S., B. A. Desai, dan S. A. Wagh. 2015. Comparative Study of Antimicrobial Compounds Extracted From Leaves of *Nicotiana Tabacum* and Cigarette. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(3): 1511 – 1518.
- Peng, L. Y., S. X. Mei, B. Jiang, H. Zhou, dan H.D. Sun. 2000. Constituents from *Lonicera japonica*. *Fitoterapia*. 71: 713–715.
- Poeloengan, M., M. M. Andriani, I. Susan, M. Komala, dan M. Hasnita. 2007. Uji Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Batang Bungur (*Largerstoremia speciosa* Pers) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Secara *in Vitro*. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Bogor: Balai Besar Penelitian Veteriner.
- Prajitno, Arief. 2007. Uji Sensitifitas Flavonoid Rumput Laut (*Eucheuma Cottoni*) Sebagai Bioaktif Alami Terhadap Bakteri *Vibrio Harveyi*. *Skripsi*. Fakultas Perikanan, Universitas Brawijaya.
- Pratiwi, S. T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- PTPN II. 2012. *Tembakau Deli Terbaik*. Medan: Sumatera Utara.
- Purwoko, T. 2007. *Fisiologi Mikroba*. Edisi 1. Jakarta: Bumi Aksara.
- 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.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB.
- 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.
- Sangi, M., M. R. J. Runtuwene, H. E. I. Simbala, dan V.M.A. Makang. 2008. Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di kabupaten Minahasa Utara. *Chem. Prog.* 1(1):47-53.
- Shahidi, F. dan N. Marian. 1995. *Food Phenolics, Sources Chemistry Effects Applications* Technomic Publ. Lancaster, Basel.
- Sheen, S. J., D. W. Dejong, dan J. F. Chaplin. 1979. Polyphenol Accumulation in Chlorophyll Mutants of Tobacco under Two Cultural Practices. *Beitrlige zur Tabakforschung International*. 10(1): 57 – 64.
- Shekins, O. O., E. U. Dorathy, M. L. Labaran, dan P. Joel. 2016. Phytochemical Screening of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) and its Effects on Some Haematological Parameters and Histopathology of Liver and Brain in Male Rats. *International Journal of Biochemistry Research*. 14(4): 1 – 9.
- Sholeh, M., A. Rachman, dan Machfudz. 2000. Pengaruh Komposisi Pupuk Ks, Za, dan Urea, Serta Dosis N Terhadap Mutu Tembakau Besuki. *Jurnal Littri*. 6(3): 80 – 87.
- Simirgiotis, M. J., J. Benites, C. Areche, dan B. Sepulveda. 2015. Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic *Nolana* Species by HPLC-PDA- ESI-MS. [www.mdpi.com/journal/molecules](http://www.mdpi.com/journal/molecules). [Diakses 22 Juli 2018].
- Singleton, V. and J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am.J. Enol. Vitic.* 16(3): 144 – 158.
- Siregar, A.Z. 2016. Literasi Inventarisasi Hama dan Penyakit Tembakau Deli di Perkebunan Sumatra Utara. *Jurnal Pertanian Tropik*. Vol. 3(3): 206-213.
- Soesanto, L. 2008 . *Pengantar Pengendalian dan Hayati Penyakit Tanaman*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* Antibiotics: Structures, Syntheses And Specific Function. *Molecular Microbiology*. 56(4): 845 – 857.

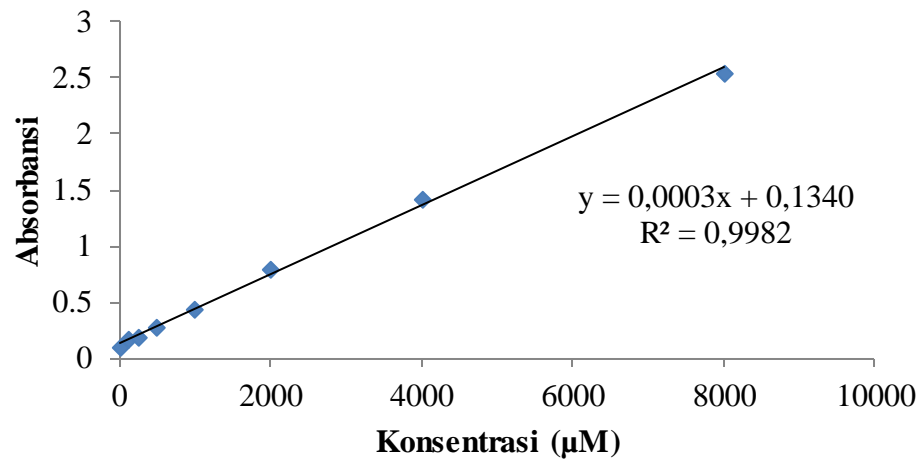


- Sudaryono. 2004. Rekayasa Lingkungan dengan Naungan Tertutup Untuk Perbaikan Kualitas dan Produktivitas Tembakau Rakyat di Sleman, Jogjakarta. *J. Teknologi Lingkungan*. 5(2): 122 – 127.
- Sumarlin, L. O., A. Muawanah, P. Wardhani, dan Masitoh. 2014. Aktivitas Antikanker dan Antioksidan Madu di Pasaran Lokal Indonesia. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)*. 19(3): 136 – 144.
- Suryanto, Edi. 2012. *Fitokimia Antioksidan*. Surabaya: Putra Media Nusantara.
- Susilowati, E. Y. 2006. *Identifikasi Nikotin dari Daun Tembakau (Nicotiana tabacum) Kering dan Uji Efektifitas Ekstrak Daun Tembakau Sebagai Insektisida Penggerak Batang Padi (Scirpophaga Innonata)*. Semarang: Universitas Negeri Semarang.
- Susilowati, E. Y. 2006. *Identifikasi Nikotin dari Daun Tembakau (Nicotiana tabacum) Kering dan Uji Efektifitas Ekstrak Daun Tembakau Sebagai Insektisida Penggerak Batang Padi (Scirpo phagainnonata)*. Tesis. Semarang: UNS.
- Takashi, M., dan S. Takayumi. 1997. Antioxidant Activities of Natural Compound Found In Plants. *Journal Agric. Food*. 45: 1819 – 1822.
- Tan, T. C., L. H. Cheng, R. Bhat, G. Rusul, A. M. Easa. 2014. Composition, Physicochemical Properties and Thermal Inactivation Kinetics of Polyphenol Oxidase and Peroxidase from Coconut (*Cocos nucifera*) Water Obtained from Immature, Mature and Overly-mature Coconut. *Food Chemistry*. 142: 121 – 128.
- Tayoub, G., H. Sulaiman, dan M. Alorfi. 2015. Determination of Nicotine Levels in the Leaves of Some *Nicotiana tabacum* Varieties Cultivated in Syria. *Botanical to Medical Research*. 61(4): 23 – 30.
- Tjitrosoepomo, G. 1994. *Taksonomi Tumbuhan*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Vaikkinen, A., B. Shrestha, J. Koivisto, R. Kostainen, A. Vertes, dan T. J. Kauppila. 2014. Laser Ablation Atmospheric Pressure Photoionization Mass Spectrometry Imaging of Phytochemicals from Sage Leaves. <http://www.wileyonlinelibrary.com>. [Diakses 22 Juli 2018].
- Volk, W.A., dan Wheeler, M. F. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Jilid II. Terjemahan Soenartomo Adisoemarto. Jakarta : Penerbit Erlangga.

- Volk, W. A., dan M. F. Salyer. 1993. *Mikrobiologi Dasar Jilid I*. Jakarta: Erlangga.
- Waterhouse, A. 1999. Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine. *Departemen of Viticultur and Enology University of California*. 28: 1 – 3.
- Wax, G.R., K. Lewis, A.A. Salyer dan Taber, H. 2008. *Bacterial Resistance To Antimicrobials Second Edition*. New York: CRC Press.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Ye, Z., J. R. Dai, C. G. Zhang, Y. Lu, L. L. Wu, A. G. W. Gong, H. Xu, K. W. K. Tsim, dan Z. T Wang. 2017. Chemical Differentiation of *Dendrobium officinale* and *Dendrobium devonianum* by Using HPLC Fingerprints, HPLC-ESI-MS, and HPTLC Analyses. <https://doi.org/10.1155/2017/8647212>. [Diakses pada 22 Juli 2018].

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

Kurva Standard Asam Galat



Konsentrasi (µM)	Absorbansi
0	0,104
125	0,175
250	0,186
500	0,283
1000	0,432
2000	0,789
4000	1,428
8000	2,549

Total Polifenol Ekstrak Daun Tembakau

Sampel	Ulangan	Absorbansi	Konstanta	Variabel x	x	Konsentrasi Ekstrak ( $\mu\text{M}$ )	Konversi As. Galat	Konsentrasi akhir (mg GAE/ml)	Rata-rata	Stdev
Etanol 0%	1	0,271	0,134	0,0003	456,67	68500	0,17012	11,65322	12,14	0,52
		0,272	0,134	0,0003	460,00	69000	0,17012	11,73828		
	2	0,273	0,134	0,0003	463,33	69500	0,17012	11,82334		
		0,277	0,134	0,0003	476,67	71500	0,17012	12,16358		
	3	0,28	0,134	0,0003	486,67	73000	0,17012	12,41876		
		0,287	0,134	0,0003	510,00	76500	0,17012	13,01418		
Etanol 40%	1	0,531	0,134	0,0003	1323,33	198500	0,17012	33,76882	34,78	0,91
		0,53	0,134	0,0003	1320,00	198000	0,17012	33,68376		
	2	0,549	0,134	0,0003	1383,33	207500	0,17012	35,2999		
		0,549	0,134	0,0003	1383,33	207500	0,17012	35,2999		
	3	0,548	0,134	0,0003	1380,00	207000	0,17012	35,21484		
		0,55	0,134	0,0003	1386,67	208000	0,17012	35,38496		
Etanol 80%	1	0,66	0,134	0,0003	1753,33	263000	0,17012	44,74156	44,77	0,17
		0,66	0,134	0,0003	1753,33	263000	0,17012	44,74156		
	2	0,659	0,134	0,0003	1750,00	262500	0,17012	44,6565		
		0,658	0,134	0,0003	1746,67	262000	0,17012	44,57144		
	3	0,662	0,134	0,0003	1760,00	264000	0,17012	44,91168		
		0,663	0,134	0,0003	1763,33	264500	0,17012	44,99674		

## Lampiran 4.2. Perhitungan Aktivitas Antioksidan

Sampel	Ulangan	Blanko	Absorbansi	%Penghambatan	Rata-rata	SD
Etanol 0%	U1	0,647	0,466	27,9753	27,38	1,0302
			0,464	28,2844		
			0,465	28,1298		
	U2	0,655	0,483	26,2595		
			0,483	26,2595		
			0,482	26,4122		
	U3	0,474	0,352	25,7384		
			0,349	26,3713		
			0,349	26,3713		
Etanol 40%	U1	0,833	0,145	82,5930	81,25	0,9515
			0,152	81,7527		
			0,151	81,8727		
	U2	0,892	0,174	80,4933		
			0,175	80,3812		
			0,175	80,3812		
	U3	0,435	0,086	80,2299		
			0,078	82,0690		
			0,079	81,8391		
Etanol 80%	U1	0,621	0,07	88,7279	87,75	1,1746
			0,07	88,7279		
			0,07	88,7279		
	U2	0,435	0,058	86,6667		
			0,048	88,9655		
			0,05	88,5057		
	U3	0,786	0,107	86,3868		
			0,105	86,6412		
			0,107	86,3868		

### Lampiran 4.3. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Daun Tembakau Dalam Uji Antibakteri

#### 1. Formulasi Uji Antibakteri

Konsentrasi (%)	Ekstrak (µl)	DMSO 2% (µl)	Suspensi m.o (µl)	NA (µl)
0	0	20	200	4980
2	52	20	200	4928
4	104	20	200	4876
8	208	20	200	4772
1,2	312	20	200	4668
1,6	416	20	200	4564
2	520	20	200	4460

Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan ekstrak daun tembakau dengan pelarut etanol 80%, yang diketahui memiliki total polifenol tertinggi yaitu sebesar 44,77 mg/ml

#### 2. Total Polifenol Ekstrak Daun Tembakau (Stok ekstrak 20%)

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 2,5 \text{ ml} \times 44,77 \text{ mg/ml} &= 10 \text{ ml} \times M_2 \\
 M_2 &= \frac{(2,5 \text{ ml} \times 44,77 \text{ mg/ml})}{10 \text{ ml}} \\
 &= 11,1925 \text{ mg/ml}
 \end{aligned}$$

#### 3. Konsentrasi Ekstrak (µg/ml)

Ekstrak (ml)	volume total capet (ml)	Konsentrasi Ekstrak (mg/ml)	Konsentrasi Ekstrak dalam capet (mg/ml)	Konsentrasi Ekstrak dalam capet (µg/ml)
0	5,2	11,1925	0	0
0,052	5,2	11,1925	0,111925	111,93
0,104	5,2	11,1925	0,22385	223,85
0,208	5,2	11,1925	0,4477	447,70
0,312	5,2	11,1925	0,67155	671,55
0,416	5,2	11,1925	0,8954	895,40
0,52	5,2	11,1925	1,11925	1119,25

**Lampiran 4.4. Perhitungan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan IC<sub>50</sub>**1. *Bacillus subtilis*Jumlah Koloni *Bacillus subtilis*

Konsentrasi Ekstrak (µg/ml)	Jumlah koloni/200µl (U1)	Jumlah koloni/200µl (U2)	Jumlah koloni/200µl (U3)	Rata-rata	Stdev
0	67	83	74	74,6667	8,0208
111,93	50	68	56	58	9,1652
223,85	36	32	23	30,3333	6,6583
447,70	4	14	20	12,6667	8,0829
671,55	2	8	11	7	4,5826
895,40	0	6	7	4,3333	3,7859
1119,25	0	1	3	1,3333	1,5275

Jumlah koloni *Bacillus subtilis* dalam CFU/ml

Konsentrasi Ekstrak ( $\mu\text{g/ml}$ )	Jumlah koloni (CFU/ml) (U1)	Jumlah koloni (CFU/ml) (U2)	Jumlah koloni (CFU/ml) (U3)	Rata-rata	Log jumlah koloni	SD	% Penghambatan
0	335000000	415000000	370000000	3,73E+08	8,5721	4,01E+07	0
111,93	250000000	340000000	280000000	2,90E+08	8,4624	4,58E+07	22,321
223,85	180000000	160000000	115000000	1,52E+08	8,1809	3,33E+07	59,375
447,70	200000000	70000000	100000000	6,33E+07	7,8016	4,04E+07	83,036
671,55	100000000	40000000	55000000	3,50E+07	7,5441	2,29E+07	90,625
895,40	0	30000000	35000000	2,17E+07	7,3358	1,89E+07	94,196
1119,25	0	5000000	15000000	6,67E+06	6,8239	7,64E+06	98,214

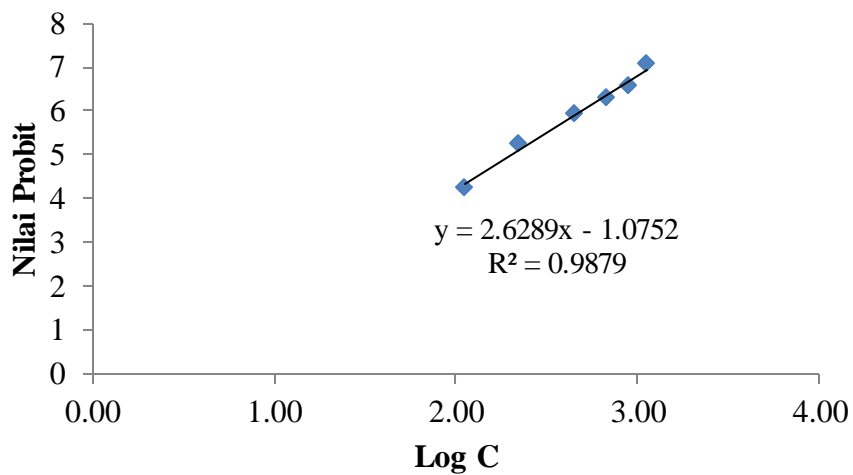
Kurva Probit Penghambatan Pertumbuhan *Bacillus subtilis*

Konsentrasi Ekstrak ( $\mu\text{g/ml}$ )	Rata-rata (CFU/ml)	Log	%Pertumbuhan	%Penghambatan	Log C	Probit
0	3,73E+08	8,5721	100,00	0,00	0,00	0
111,93	2,90E+08	8,4624	52,30	22,32	2,05	4,23
223,85	1,52E+08	8,1809	41,76	59,38	2,35	5,23
447,70	6,33E+07	7,8016	55,26	83,04	2,65	5,95
671,55	3,50E+07	7,5441	61,90	90,63	2,83	6,28
895,40	2,17E+07	7,3358	30,77	94,20	2,95	6,55
1119,25	6,67E+06	6,8239	0,00	98,21	3,05	7,05



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	8.00



$$y = 2,6289 X - 1,0752$$

$$5 = 2,6289 X - 1,0752$$

$$5 + 1,0752 = 2,6289 X$$

$$6,0752 = 2,6289 X$$

$$X = \text{Log } C_{50} = 6,0752 / 2,6289 = 2,31092853$$

$$\text{LOG } C_{50} = 2,31092853$$

$$\text{IC}_{50} = 204,6108 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$y = 2,6289 X - 1,0752$$

$$6,28 = 2,6289 X - 1,0752$$

$$6,28 + 1,0752 = 2,6289 X$$

$$7,3552 = 2,6289 X$$

$$X = \text{Log } C_{90} = 7,3552 / 2,6289 = 2,79782419$$

$$\text{LOG } C_{90} = 2,79782419$$

$$\text{IC}_{90} = 627,8042 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

## 2. *Escherichia coli*

Jumlah Koloni *Escherichia coli*

<b>Konsentrasi Ekstrak (μg/ml)</b>	<b>Jumlah koloni/200μl (U1)</b>	<b>Jumlah koloni/200μl (U2)</b>	<b>Jumlah koloni/200μl (U3)</b>	<b>Rata-rata</b>	<b>Stdev</b>
0	54	66	48	56	9,17
111,93	42	51	33	42	9
223,85	33	26	23	27,33	5,13
447,70	14	12	11	12,33	1,53
671,55	3	9	8	6,67	3,21
895,40	2	5	6	4,33	2,08
1119,25	1	1	3	1,67	1,15

Jumlah Koloni *Escherichia coli* dalam CFU/ml

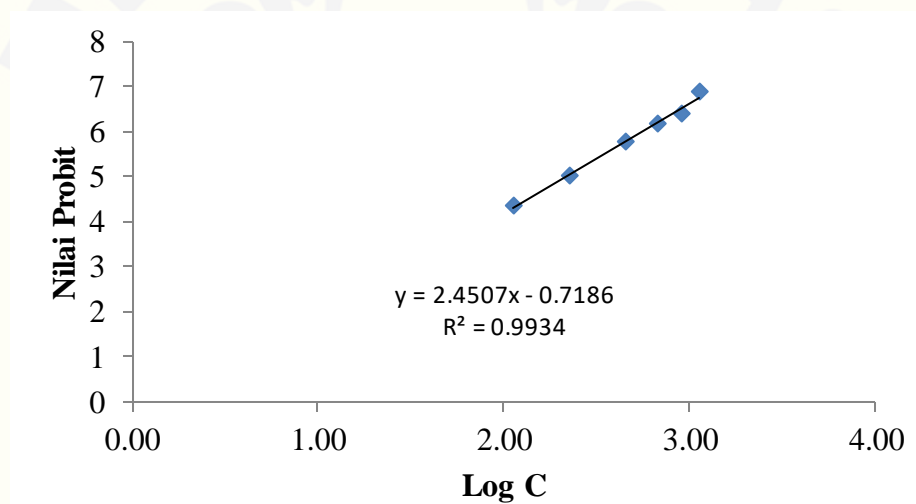
Konsentrasi Ekstrak ( $\mu\text{g/ml}$ )	Jumlah koloni (CFU/ml) (U1)	Jumlah koloni (CFU/ml) (U2)	Jumlah koloni (CFU/ml) (U3)	Rata-rata	Log jumlah koloni	SD	% Penghambatan
0	270000000	330000000	240000000	280000000	8,4472	4,58E+07	0
111,93	210000000	255000000	165000000	210000000	8,3222	4,50E+07	25
223,85	165000000	130000000	115000000	136666667	8,1357	2,57E+07	51,190
447,70	70000000	60000000	55000000	61666667	7,7901	7,64E+06	77,976
671,55	15000000	45000000	40000000	33333333	7,5229	1,61E+07	88,095
895,40	10000000	25000000	30000000	21666667	7,3358	1,04E+07	92,262
1119,25	5000000	5000000	15000000	8333333	6,9208	5,77E+06	97,024

Kurva Probit Penghambatan Pertumbuhan *Esherichia coli*

Konsentrasi Ekstrak ( $\mu\text{g/ml}$ )	Rata-rata (CFU/ml)	Log	%Pertumbuhan	%Penghambatan	Log C	Probit
0	3,E+08	8,4472	100,00	0,00	0,00	0
111,93	2,E+08	8,3222	65,08	25,00	2,05	4,33
223,85	1,E+08	8,1357	45,12	51,19	2,35	5,03
447,70	6,E+07	7,7901	54,05	77,98	2,65	5,77
671,55	3,E+07	7,5229	65,00	88,10	2,83	6,18
895,40	2,E+07	7,3358	38,46	92,26	2,95	6,41
1119,25	8,E+06	6,9208	0,00	97,02	3,05	6,88

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



$$y = 2,4507 X - 0,7186$$

$$5 = 2,4507 X - 0,7186$$

$$5 + 0,7186 = 2,4507 X$$

$$5,7186 = 2,4507 X$$

$$X = \text{Log } C_{50} = 5,7186 / 2,4507 = 2,333345575$$

$$\text{LOG } C_{50} = 2,333345575$$

$$\text{IC}_{50} = 215,4495 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$y = 2,4507 X - 0,7186$$

$$6,28 = 2,4507 X - 0,7186$$

$$6,28 + 0,7186 = 2,4507 X$$

$$6,9986 = 2,4507 X$$

$$X = \text{Log } C_{90} = 6,9986 / 2,4507 = 2,8557555$$

$$\text{LOG } C_{90} = 2,8557555$$

$$\text{IC}_{90} = 717,3903 \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

**Lampiran 4.5. Dokumentasi Foto Penelitian**

	
<p>Daun Tembakau Kasturi Afkir (Segar)</p>	<p>Daun Tembakau Kasturi Afkir (Kering)</p>
	
<p>Ekstrak Daun Tembakau</p>	<p>Pemekatan Ekstrak Daun Tembakau</p>
	
<p>Uji Total Polifenol</p>	<p>Uji Aktivitas Antioksidan</p>
	
<p>Uji Aktivita Antibakteri (<i>Esherichia coli</i>)</p>	<p>Uji Aktivitas Antibakteri (<i>Bacillus subtilis</i>)</p>