

Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) sebagai Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

Anis Uswatun Khasanah^{1*}, Sri Juni Nastiti²

¹Fakultas Sains UIN Sultan Maulana Hasanuddin Banten

²Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada

Abstract

Tobacco leaf contains bioactive compounds as antibacterial. *Staphylococcus aureus* is a pathogenic bacterium causing several infection diseases. The purpose of this study was to identify the active compounds group that have antibacterial against and determine the optimum concentration which was able to inhibit *S. aureus* ATCC 25923 activities in tobacco leaf extract. The assay of inhibitory activity of tobacco leaf extract was carried out qualitatively using diffusion disc method at various concentration of tobacco leaf extract; 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100%. Gradual maceration (M2) and total maceration were used to perform the extraction process, using methanol 70% and etanol 96% as the solvent. Thin Layer Chromatografi (TLC) assay were carried out to identify the bioactive compounds. The results showed that the methanol (M2) and etanol (E) extract of tobacco leaf had antibacterial activity against *S. aureus*. Their bactericidal activity (inner diameter of inhibition) was 12,5 mm, and bacteriostatic (outer diameter inhibition) was 20 mm. The optimum concentration of antibacterial methanol extract was 50%, and the optimum concentration of antibacterial etanol extract was 60%. It was found that the antibacterial compound was detected as flavanoid and terpenoid.

Keywords: Antibacterial; Tobacco leaf; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Abstrak

Daun tembakau mengandung senyawa bioaktif yang diduga bersifat antibakteri. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri patogen penyebab beberapa penyakit infeksi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi golongan senyawa aktif dan mengetahui konsentrasi optimum ekstrak daun tembakau dalam menghambat aktivitas *S. aureus* ATCC 25923. Pengujian daya hambat ekstrak dilakukan secara kualitatif yaitu dengan metode difusi cakram/*paper disc* dengan variasi konsentrasi ekstrak 40, 50, 60, 70, 80, 90 dan 100%. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi berjenjang dengan pelarut metanol 70% (M2) dan maserasi total dengan pelarut etanol 96% (E). Dilakukan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengetahui golongan senyawa aktif antibakteri. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak metanol berjenjang (M2) dan etanol (E) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*, serta memiliki sifat bakterisidal (diameter penghambatan dalam) sebesar 12,5 mm dan bakteristatik (diameter penghambatan luar) sebesar 20 mm. Konsentrasi optimum antibakterial ekstrak metanol berjenjang pada konsentrasi 50%, dan konsentrasi optimum antibakterial ekstrak etanol pada konsentrasi 60%. Golongan senyawa yang terdeteksi bersifat antibakteri adalah flavanoid, dan terpenoid.

Kata Kunci: Antibakteri; daun tembakau; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Corresponding Author: Anis Uswatun Khasanah, email: anis.uk@uinbanten.ac.id, Fakultas Sains UIN Sultan Maulana Hasanuddin Banten, Jalan Jendral Sudirman No. 30 Panancangan Cipocok Jaya, Sumurpecung, Kecamatan Serang, Kota Serang, Banten 42118.

Pendahuluan

Tanaman kaya akan senyawa terapan yang dapat diaplikasikan di dalam dunia farmasi (Akhtar, 2018). Daun tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) mengandung lebih dari 4000 komponen senyawa aktif. Ekstrak metanolik daun tembakau dapat digunakan sebagai langkah awal untuk mendapatkan senyawa aktif yang dikehendaki. Nikotin merupakan alkaloid yang dominan ditemukan dalam ekstrak kasar daun tembakau. Senyawa non alkaloid seperti tannin, saponin, gula reduksi, flavonoid dan triterpen belum banyak diketahui aktivitasnya. *N. tabacum* K326 and *Nicotiana glutinosa* diketahui memiliki aktivitas antelmintik (Schorderet et al., 2019).

Rebusan daun tembakau secara tradisional digunakan sebagai antispasmodik, ekspektoran, emetika, obat penenang, reumatik, pembengkakan, anestesi, antikonvulsan, antibakteri, diuretik, antimikroba, antijamur, dan antelmintik (Sastya et al., 2017). Senyawa yang memiliki sifat antimikrobia di antaranya alkaloid, tannin, terpenoid, flavonoid dan fenol (Jaberian et al., 2013)

S. aureus merupakan bakteri patogen Gram positif yang dapat menyebabkan penyakit infeksi. *S. aureus* bertanggung jawab atas 80% penyakit kulit (Tang et al., 2020). *S. aureus* berbentuk bulat, dapat ditemukan dalam saluran pernafasan (Mustopa et al., 2016).

Flavonoid diketahui memiliki fungsi antioksidan, antibakteri, antivirus, anti-alergi, dan antikanker. Senyawa flavonoid adalah senyawa yang mengandung C15, terdiri dari dua inti fenolat yang dihubungkan dengan tiga satuan karbon. Flavonoid terdapat pada daun, bunga, buah, biji-bijian, kacang-kacangan, bulir padi,

rempah dan pada tumbuhan berkhasiat obat (Chem, 2017)

Dari semua produk alami yang ditemukan pada tumbuhan, terpenoid merupakan kelas terbesar, beragam secara fungsional dan struktural. Sebanyak 5.000 senyawa yang telah teridentifikasi. Beberapa terpenoid diketahui memiliki sifat antikanker, pestisida, antimikrobia, anti-inflamasi dan imunomodulasi. Terpenoid memiliki profil rasa dan aroma yang menguntungkan bagi dunia industri sebagai minyak esensial, penyedap makanan, dan parfum (Nguyen et al., 2020)

Dari informasi tersebut, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai golongan senyawa antibakteri yang terdapat di dalam daun tembakau, aktivitas antibakteri ekstrak daun tembakau terhadap *S. aureus*, dan konsentrasi optimum ekstrak daun tembakau dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Hasil yang diperoleh diharapkan dapat menjadi solusi alternatif pemanfaatan lain dari daun tembakau sebagai antibakteri.

Metode Penelitian

Prosedur penelitian meliputi preparasi sampel, yaitu menghitung berat kering dari daun tembakau kemudian dibuat sediaan serbuk. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi, menggunakan pelarut metanol dan etanol. Serbuk daun tembakau yang telah kering, diekstraksi dengan perbandingan serbuk tembakau dan pelarut 1:10. Untuk optimasi, maserasi dilakukan dengan menggunakan dua perlakuan (berjenjang dan total) dan dua pelarut methanol 70% dan etanol 96%.

Konfirmasi mikrobial dilakukan untuk memastikan strain *S. aureus* ATCC 25923 merupakan strain murni. Identifikasi dilakukan dengan pengecatan Gram, dan

ditumbuhkan dalam medium selektif Mannitol Salt Agar (MSA). Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi *paper disc*. Penentuan golongan senyawa aktif menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Hasil Penelitian dan Pembahasan

Daun tembakau yang digunakan adalah daun dengan kondisi sehat, dicirikan dengan warna hijau, segar, dan tidak terdapat bekas penyakit pada daun, seperti bercak daun atau belang daun. Daun yang diambil merupakan daun yang berada pada posisi tiga terbawah.

Daun tembakau yang telah dikoleksi, selanjutnya dilakukan pengukuran panjang dan lebarnya, dikeringkan dengan menggunakan oven suhu 50 0C selama 14 hari untuk mengetahui kadar airnya, selanjutnya dihaluskan menggunakan blender, dan diekstraksi dengan metode maserasi. Maserasi dilakukan dengan dua pelarut; metanol 70% dan etanol 96%. Hasil dapat dilihat dalam Tabel 1 dan 2.

Tabel 1

Panjang, lebar, serta pengukuran kadar air daun tembakau

Daun Tembakau	Panjang (cm)	Lebar (cm)	Kadar Air (%)
G1	46,6	34	13,36
G2	45,5	29,5	12,10
G3	47,5	29,5	12,06
G4	48	30	10,58
G5	49	37	11,56
G6	51,8	35	13,84
Rerata	48,5	32,5	12,25

Konfirmasi bakteri *S. aureus* dengan pengecatan gram dapat dilihat pada (Gambar 1) dan pengamatan pertumbuhan pada medium selektif Mannitol Salt Agar/MSA terdapat pada (Gambar 2).

Berdasarkan hasil pengamatan (Gambar 2) dapat diketahui bahwa *S. aureus* mampu memfermentasi manitol pada medium MSA. Medium MSA digunakan untuk mengetahui prevalensi dan karakteristik *S. aureus* (Akkou et al., 2018). Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna medium setelah diinokulasi dari merah menjadi kuning. Medium MSA mengandung indikator asam basa, yaitu fenol merah yang akan berwarna kuning dalam kondisi asam.

Medium MSA mengandung kasein, beef extract sebagai sumber nitrogen, vitamin dan karbon, D-manitol sebagai sumber karbohidrat, dan sodium klorida yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain selain *Staphylococcus*, seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella*.

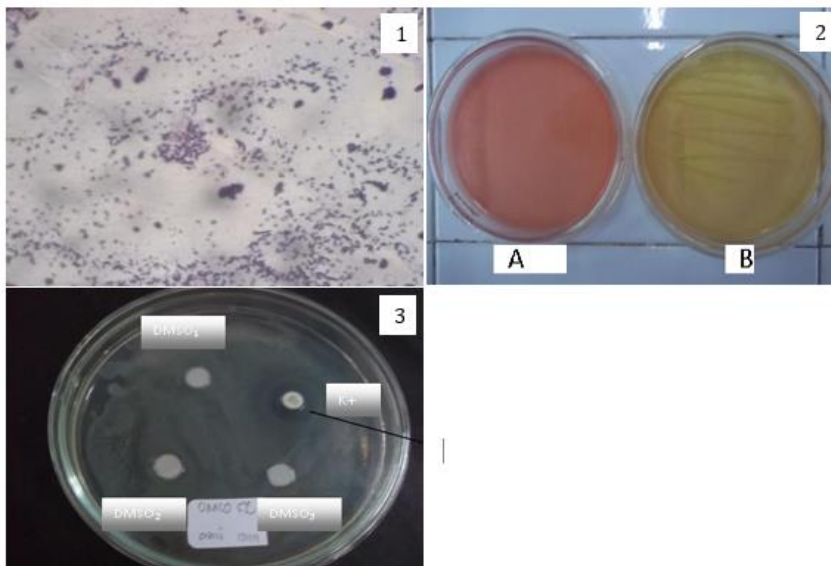
Tabel 2

Hasil Ekstraksi daun tembakau (*Nicotiana tabacum* var. Garut) dengan pelarut methanol 70% dan etanol 96%

Metode Ekstraksi	Pelarut	Ekstrak (g)	Organoleptik
Maserasi berjenjang 1:10 (M2)	Metanol 70%	1,79	Berwarna coklat kehijauan, bau khas tembakau, rasa pahit menggigit, konsistensi ekstrak kental hamper padat
Maserasi Total (E)	Etanol 96%	1,14	Berwarna coklat kehijauan, bau khas tembakau, rasa pahit menggigit, konsistensi kental seperti karamel

Gambar 1

Panjang, lebar, serta pengukuran kadar air daun tembakau



Keterangan: 1. Hasil Pengecatan Gram *S. aureus*. Menunjukkan warna ungu, Gambar 2. Pertumbuhan *S. aureus* pada medium MSA. A (kontrol), B (medium MSA yang telah diinokulasi *S. aureus*), Gambar 3. Aktivitas antibakteri ekstrak dalam pelarut DMSO 5% terhadap *S. aureus*. Keterangan: DMSO: DMSO 5%

Medium MSA mengandung kasein, *beef extract* sebagai sumber nitrogen, vitamin dan karbon, D-manitol sebagai sumber karbohidrat, dan sodium klorida yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain selain *Staphylococcus*, seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella*.

Dalam penelitian ini digunakan pelarut DMSO dengan konsentrasi 5% untuk melarutkan ekstrak daun tembakau (M2 dan E). Untuk memastikan pelarut tidak bersifat antibakteri, maka diuji terlebih dengan difusi cakram. Hasilnya terlihat pada Gambar 3.

Metode yang digunakan dalam pengujian ini adalah difusi cakram (*disc diffusion method*). Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri DMSO terhadap *S. aureus* dapat diketahui bahwa dengan menggunakan metode difusi cakram, DMSO 5% tidak menunjukkan adanya penghambatan terhadap aktivitas *S. aureus*, sehingga dapat disimpulkan bahwa pengaruh pelarut terhadap hambatan pertumbuhan *S. aureus* dapat diabaikan. Sementara pada kontrol positif, terdapat diameter hambatan sebesar 16 mm.

Konsentrasi DMSO yang rendah lebih disarankan untuk digunakan, hal ini dikarenakan masing-masing ekstrak daun tembakau memiliki batas tingkat kelarutan

tersendiri terhadap DMSO. Dalam hal ini, DMSO 5% memberikan kelarutan yang lebih tinggi terhadap ekstrak daun tembakau, dan meningkatkan efektivitas dari ekstrak yang akan diuji (Koo *et al.*, 2003).

Uji aktivitas antibakteri adalah suatu uji yang digunakan untuk mengetahui aktivitas suatu bahan terhadap bakteri uji. Digunakan variasi konsentrasi 40, 50, 60, 70, 80, 90, dan 100%. Pada penelitian ini digunakan metode difusi cakram sebagai uji pendahuluan untuk mengetahui aktivitas ekstrak daun tembakau (M2, dan E) terhadap *S. aureus*. Hasil pengamatan uji aktivitas antibakteri dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 4, 5, 6 dan 7.

Tabel 3

Diameter hambatan ekstrak daun tembakau terhadap S. aureus

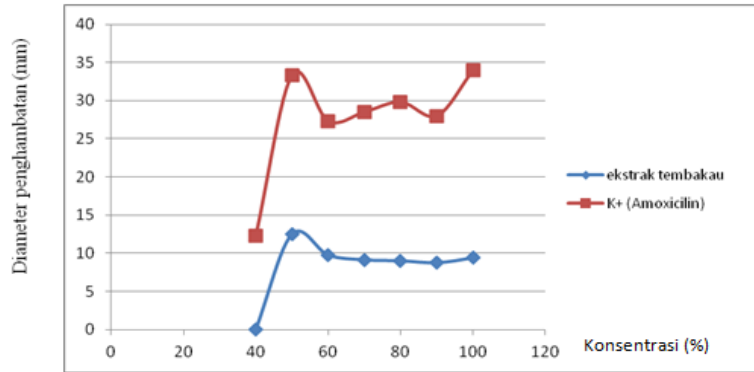
Kons. Ekstrak (%)	Diameter hambatan ekstrak methanol (mm)		Diameter hambatan ekstrak etanol (mm)		Diameter kontrol positif Amoxicillin (mm)	
	Dalam	Luar	Dalam	Luar	Dalam	Luar
100	9,38	-	10	-	34	39,5
90	8,75	-	10,5	20	28	39,5
80	9	-	9,13	-	29,8	40,25
70	9,13	13,5	9,6	-	28,5	39,8
60	8,9	-	12	-	27,3	38,8
50	12,5	-	-	-	33,3	39,3
40	-	-	-	-	12,3	39,5

Keterangan :

- Diameter hambatan merupakan diameter zona hambatan
- Diameter *paper disc* adalah 7,00 mm
- Perhitungan diameter merupakan hasil perhitungan untuk tiga replikasi

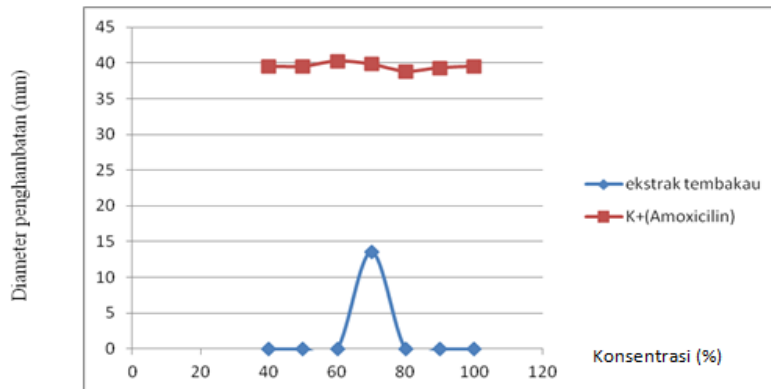
Gambar 2

Diameter hambatan dalam, ekstrak metanol 70% daun tembakau terhadap S. aureus



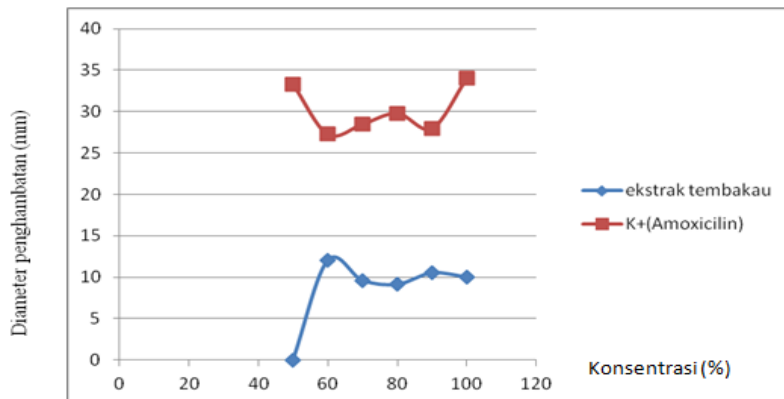
Gambar 3

Diameter hambatan luar, ekstrak metanol 70% daun tembakau terhadap S. aureus.



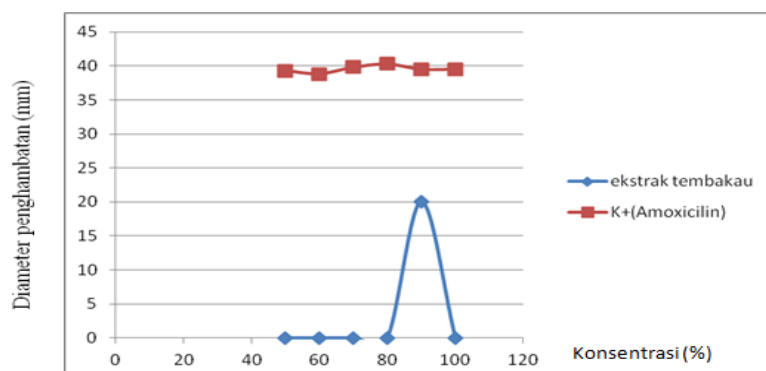
Gambar 4

Diameter hambatan dalam, ekstrak etanol 96% daun tembakau terhadap S. aureus.



Gambar 5

Diameter hambatan luar, ekstrak etanol 96% daun tembakau terhadap *S. aureus*.



Setelah dilakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak Metanol (M2) dan etanol (E) dari daun tembakau, maka dapat diketahui bahwa kedua macam ekstrak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen *S. aureus*. Sifat antibakteri dapat dibagi lagi menjadi bakterisidal (membunuh mikrobia) dan bakteriostatik (menghambat pertumbuhan mikrobia) (Prescott *et al.*, 1999).

Sifat bakterisidal diduga ditunjukkan dengan zona jernih di sekitar *paper disc* (diameter dalam), dan sifat bakteriostatik ditunjukkan dengan adanya zona pertumbuhan *S. aureus* disekitar *paper disc* yang lebih sedikit dibandingkan pertumbuhan normal pada medium (diameter luar).

Dalam ekstrak metanol (M2), sifat bakterisidal tertinggi terlihat pada konsentrasi 50%, dengan diameter hambatan dalam sebesar 12,5 mm. Sedangkan bakteriostatik optimum pada konsentrasi 70%, (Gambar 5) terlihat dari adanya diameter hambatan luar sebesar 13,5 mm. Pada kontrol positif, sifat bakterisidal tertinggi pada konsentrasi 100% sebesar 34 mm, dan bakteriostatik optimum pada

konsentrasi 60% sebesar 40,25 mm. Sehingga dari data ini, diketahui konsentrasi optimum ekstrak metanol sebagai antibakteri terhadap *S. aureus* adalah 50%.

Dalam ekstrak etanol (E), sifat antibakteri/bakterisidal tertinggi terlihat pada konsentrasi 60%, dengan diameter hambatan dalam sebesar 12 mm. Sedangkan bakteriostatik optimum pada konsentrasi 90%, terlihat dari adanya diameter hambatan luar sebesar 20 mm (Gambar 6). Kontrol positif menunjukkan sifat bakterisidal tertinggi pada konsentrasi ekstrak 100% dengan diameter 34 mm, dan bakteriostatik tertinggi pada konsentrasi 80% dengan diameter 40,3 mm. Sehingga dari data ini, diketahui konsentrasi optimum ekstrak etanol (E) sebagai antibakteri terhadap *S. aureus* adalah 60%.

Hasil ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang digunakan tidak menunjukkan pengaruh yang berbanding lurus dengan zona jernih yang dihasilkan. Bahkan, jika dilihat dari diameter hambatan pada keenam variasi konsentrasi yang digunakan, tidak terjadi perbedaan yang signifikan. Hal ini dapat disebabkan karena konsentrasi senyawa aktif daun

tembakau, termasuk yang bersifat anti-bakterial mengalami agregat/pengumpulan, sehingga membentuk masa yang besar, dan tidak dapat dibawa oleh protein transport dinding sel *S. aureus* untuk menetrasi ke dalam sel. Selain itu, dapat juga dilihat dari kelarutan senyawa antibakteri oleh DMSO. Diduga senyawa antibakteri konsentrasi 50 dan 60 % lebih banyak terlarut dengan pelarut DMSO 5%, secara kuantitas pelarut pada konsentrasi 50% lebih banyak dibandingkan konsentrasi 60 sampai 100%.

Dari hasil yang diperoleh, terlihat bahwa tidak pada semua variasi konsentrasi memiliki aktifitas bakteriostatik, yang ditunjukkan dengan adanya diameter hambatan luar. Namun semua ekstrak tembakau pada variasi konsentrasi menunjukkan sifat bakterisidal, ditunjukkan dengan diameter hambatan dalam, meskipun tidak terlalu besar. Hal ini menunjukkan mekanisme penghambatan ekstrak diduga lebih banyak bersifat bakterisidal.

Pengujian lebih lanjut dapat digunakan untuk menunjukkan sifat antibakteri dari ekstrak daun tembakau, yaitu dengan mencari Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). KHM didefinisikan sebagai konsentrasi terendah yang mampu menghambat seluruh pertumbuhan mikrobia. Nilai KHM ini dapat diperoleh dengan metode mikrodilusi. Sedangkan KBM didefinisikan sebagai konsentrasi terendah yang mampu membunuh seluruh pertumbuhan bakteri uji dan ditetapkan pada konsentrasi yang memberikan zona jernih tanpa pertumbuhan mikrobia uji pada media agar dengan pengamatan secara visual (Jawetz *et al.*, 2005).

Perbedaan variasi pelarut (metanol dan etanol) dimaksudkan untuk mendapatkan

pelarut yang optimum dalam menghasilkan ekstrak yang bersifat antibakteri. Dari hasil (Tabel 3) dapat terlihat bahwa pelarut metanol lebih optimum digunakan, karena pada konsentrasi 50% masih bersifat antibakteri. Sedangkan pelarut etanol optimum digunakan pada konsentrasi 60%. Sehingga dapat dikatakan senyawa antibakteri lebih banyak terlarut pada pelarut metanol. Hal ini dapat dipengaruhi oleh kepolaran kedua pelarut. Pelarut metanol 70% bersifat lebih polar dibandingkan etanol 96%, karena kandungan airnya lebih besar, sehingga diduga lebih banyak senyawa antibakteri yang bersifat polar yang terekstrak dalam pelarut metanol, dibandingkan pada pelarut etanol. Ekstraksi dengan pelarut pada tingkat kepolaran tertentu maka akan menarik senyawa dengan tingkat kepolaran serupa (Seidel, 2006).

Perlakuan maserasi yang berbeda, yaitu maserasi berjenjang pada metanol dan maserasi total pada etanol diduga tidak memberikan pengaruh yang signifikan. Tetapi hasil yang berbeda terdapat pada jumlah ekstrak yang dihasilkan (Tabel 2) pada maserasi berjenjang diperoleh jumlah ekstrak sebanyak 1,79 g, lebih besar dibandingkan ekstrak pada etanol, sebesar 1,41 g. Sehingga, untuk menghasilkan jumlah ekstrak yang lebih besar dapat dilakukan maserasi berjenjang.

Penggunaan kontrol pelarut menunjukkan bahwa pelarut yang digunakan yaitu DMSO 5%, tidak dapat menghambat pertumbuhan mikroba uji sehingga dapat disimpulkan bahwa pengaruh pelarut terhadap hambatan pertumbuhan mikroba uji dapat diabaikan. Sedangkan kontrol positif/pembanding berupa amoxicillin pada setiap media mikroba uji menunjukkan bahwa terdapat

pertumbuhan dan aktivitas penghambatan mikroba uji pada media tersebut.

Masing-masing ekstrak daun tembakau memiliki tingkat kelarutan tersendiri di dalam pelarut yang akan digunakan untuk uji. Pada penelitian ini digunakan pelarut DMSO dengan konsentrasi 5%, karena DMSO pada konsentrasi ini aman digunakan untuk uji dan mampu digunakan untuk melarutkan kedua macam ekstrak daun tembakau. Adanya DMSO dalam larutan uji dapat meningkatkan keefektifan dari masing-masing ekstrak yang akan diuji.

Bakteri Gram positif diketahui lebih sensitif terhadap zat antibakteri daripada Gram negatif. Bakteri Gram negatif mempunyai struktur yang lebih kompleks dibandingkan dengan bakteri Gram positif. Membran sel pada Gram negatif terdiri dari dua lapisan, sedangkan Gram positif satu lapisan (tidak memiliki *outer membrane*). Dinding sel bakteri Gram negatif mengandung lipid, lemak, atau substitusi seperti lemak dalam prosentase yang lebih tinggi dibandingkan dengan Gram positif. Bakteri Gram positif memiliki 60%-100% peptidoglikan sedangkan bakteri Gram negatif mengandung lebih sedikit peptidoglikan yaitu 10%-20% (Siegel *et al.*, n.d.). Maka senyawa aktif yang bersifat polar akan lebih sulit menembus dinding sel bakteri Gram negatif daripada Gram positif.

Selain memiliki peptidoglikan yang lebih tebal, bakteri Gram positif juga mengandung sejumlah besar asam berupa polimer yang larut air. Hal ini menyebabkan dinding sel bersifat polar, sehingga bakteri Gram positif seperti *S. aureus* mudah ditembus oleh senyawa yang bersifat polar jika dibandingkan bakteri Gram negatif.

Amoxicillin 25 µg digunakan sebagai kontrol positif pada uji antibakteri *S. aureus*

karena termasuk dalam obat antimikroba yang telah diketahui nilai KHM-nya dan telah digunakan secara luas untuk pengobatan antibakteri. Mekanisme antibiotic amoxicillin adalah dengan berikatannya golongan aminoglikosida pada ribosom bakteri subunit 30S dan menghambat translokasi peptidyl-tRNA dari situs A ke situs P sehingga menyebabkan kesalahan pembacaan mRNA yang mengakibatkan bakteri tidak mampu mensintesis protein vital untuk pertumbuhannya.

Mekanisme kerja antimikroba dapat dikelompokkan menjadi empat yaitu antimikroba yang bekerja melalui penghambatan sintesis dinding sel (Basitrasin, Penisilin, Vankomisin, Sealosporin, Sikloserin), penghambatan fungsi membrane sel (Amfosterin, Kolistin, Imidasol, Triasol, Polien, Polimiksin), penghambatan sintesis protein (Kloramfenikol, Eritromisin, Linkomisin, Tetrasiklin) dan penghambatan sintesis asam nukleat.

Mekanisme antibakteri dari flavonoid melalui pembentukan kompleks flavonoid dengan dinding sel bakteri yang menyebabkan terganggunya permeabilitas sel, mengakibatkan pengangkutan zat-zat ke dalam sel terganggu, dan selanjutnya menyebabkan lisisnya bakteri. Sedangkan mekanisme kerja terpenoid dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* belum banyak diketahui.

Identifikasi golongan senyawa dari ekstrak daun *N. tabacum* menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia secara kualitatif. Dari uji pendahuluan yang telah dilakukan, terdapat senyawa antibakterial di dalam ekstrak daun tembakau. Kandungan senyawa yang

terdapat di dalam daun tembakau antara lain alkaloid, saponin, flavanoid dan polifenol. Turunan dari alkaloid diantaranya saponin dan flavonoid. Menurut Ruiz-Rodriguez *et al.* (2007) di dalam daun tembakau juga terdapat senyawa solanesol yang merupakan derivat dari terpenoid. Ekstrak methanol digunakan karena dalam konsentrasi yang lebih rendah masih dapat menunjukkan sifat antibakteri dibandingkan ekstrak etanol.

Fase gerak yang digunakan untuk analisis senyawa flavonoid adalah etil asetat-metanol- asam formiat dengan perbandingan 95:5:0,5. Pemilihan fase gerak berdasarkan sifat kelarutan dan polaritas. Untuk memisahkan sampel yang bersifat polar maka digunakan pelarut yang bersifat polar dan juga sebaliknya. Pereaksi semprot yang digunakan adalah Alumunium Klorida. Fase gerak yang digunakan untuk analisis senyawa terpenoid adalah Toluene - Etil Asetat dengan perbandingan 93:7. Pereaksi semprot yang digunakan adalah Vanilin Asam Sulfat. Hasil profil KLT dan perhitungan Rf bercak dapat dilihat pada

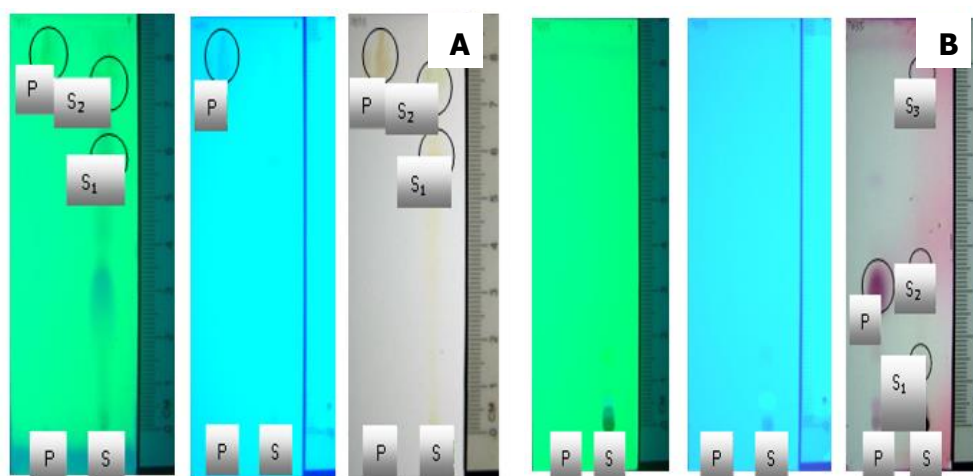
gambar 8 untuk flavanoid, dan gambar 9 untuk terpenoid.

Deteksi hasil kromatografi ekstrak metanol berjenjang (M2) menggunakan sinar UV dengan λ 254 nm (Gambar 8) menunjukkan adanya bercak yang tidak berpendar dan sedikit kekuningan. Pengamatan di bawah UV λ 365 nm (Gambar 8) dijumpai bercak yang berfluoresensi dan pengamatan pada cahaya *visible* terlihat *spot* berwarna kuning.

Identifikasi flavonoid dapat dideteksi dengan diuapi amoniak. Alumunium Korida digunakan sebagai pereaksi semprot untuk mendeteksi adanya flavonoid dengan ditunjukkannya adanya bercak pada UV365 warna berfluoresensi kuning, hijau, atau oranye dan berwarna kuning pada sinar tampak. Dalam struktur flavonoid tertentu, terdapat gugus ortohidroksi dan hidroksi-karbonil sehingga logam aluminium dapat membentuk kompleks dengan gugus-gugus tersebut dan memberikan warna bercak yang khas. Umumnya berwarna kuning pada cahaya tampak dan ungu tua pada sinar UV.

Gambar 6

Diagram rata-rata morfologi normal spermatozoa



Keterangan A:

Fase diam	: silika gel F254
Fase gerak	: etil asetat-metanol-asam formiat dengan perbandingan 95:5:0,5
P	: Komparator Quercetin, Rf = 0,82
S	: Ekstrak tembakau
Rf S1	: 0,61
Rf S2	: 0,69

Keterangan B

Fase diam	: Silika gel F254
Fase gerak	: Toluena – Etil Asetat (93:7)
P	: Komparator Terpeneol, Rf= 0,39
S	: Ekstrak tembakau
Rf S1	: 0,16
Rf S2	: 0,41
Rf S3	: 0,86

Tabel 4

Profil Kromatografi Lapis Tipis pada Ekstrak daun tembakau

Analisis	Pereaksi	UV 254	UV 365	Visibel	Rf
Flavonoid	Alumunium Chloride	Teredam	Fluoresens kuning	Kuning	0,61; 0,69
Terpenoid	Vanilin Asam Sulfat	Teredam	Biru	Merah Violet	0,16; 0,41; 0,86

Dari tabel 4 di atas diketahui bahwa daun tembakau (*N. tabacum*) mengandung flavonoid dan terpenoid yang diduga memiliki sifat antibakteri.

Hasil penyemprotan menunjukkan adanya senyawa flavonoid pada lempeng KLT (spot berwarna kuning) dengan Rf flavanoid terdeteksi 0,61 dan 0,69. Rf flavanoid terdeteksi sedikit berbeda dengan Rf komparator quercetin (0,82) sebagai pembanding, hal ini dapat terjadi karena senyawa flavonoid yang terdapat didalam ekstrak diduga bukan termasuk quercetin, namun masih dalam golongan flavanoid.

Anisaldehyd asam sulfat maupun vanilin asam sulfat merupakan pereaksi yang dapat digunakan untuk mendeteksi senyawa turunan terpenoid seperti saponin. Anisaldehyd akan berkondensasi dengan

suatu senyawa sehingga terbentuk ikatan rangkap terkonjugasi yang semakin panjang dan berwarna pada pengamatan di bawah sinar tampak. Senyawa terpenoid ditunjukkan dengan warna biru dan biru violet di bawah sinar UV 366 nm, dan ditunjukkan oleh warna biru, biru violet, merah, abu-abu, dan hijau setelah dilakukan pemanasan pada suhu 110°C selama 5 menit setelah penyemprotan. Pada penelitian ini, penyemprotan dengan pereaksi vanillin asam sulfat dan pemanasan memperlihatkan bercak yang diduga adalah senyawa terpenoid (bercak warna ungu violet).

Hasil pengamatan di bawah UV365 nm (Gambar 9) juga menunjukkan bercak berfluoresensi biru maupun biru violet yang menjadi tanda senyawa terpenoid. Terdapat tiga spot yang memiliki nilai Rf sebesar 0,61;

0,41, dan 0,86. Berbeda dengan Rf pembanding terpineol sebesar 0,39. Terdapatnya tiga *spot* dalam *plate* menunjukkan tiga senyawa berbeda terelusi dan masih tergolong terpenoid, dengan Rf yang berbeda.

Silika gel bertindak sebagai penyerab (*adsorbent*) yang berfungsi sebagai fase diam dan bersama-sama fase gerak tertentu akan memisahkan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya. Bercak yang telah dipisahkan dapat tertinggal pada silika gel karena adanya ikatan hidrogen antara senyawa yang diadsorb dengan penyerap (*sorbent*).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah diuraikan maka diperoleh kesimpulan sebagai berikut, ekstrak daun tembakau (Metanol berjenjang dan Etanol) memiliki aktivitas antibakteri (bakterisidal dan bakteriostatik) terhadap *S. aureus*. Konsentrasi optimum antibakterial ekstrak metanol berjenjang adalah 50%. Konsentrasi optimum antibakterial ekstrak etanol pada konsentrasi 60%. Golongan senyawa yang memiliki aktivitas antimikrobia adalah flavanoid dan terpenoid.

Daftar Pustaka

- Akhtar, N. (2018). Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(8), 1223–1235. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.01.013>
- Akkou, M., Bentayeb, L., Ferdji, K., Medrouh, B., Bachtarzi, M. A., Ziane, H., Kaidi, R., & Tazir, M. (2018). Phenotypic characterization of *Staphylococcus* causing mastitis in goats and microarray-based genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates. *Small Ruminant Research*, 169, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.10.015>
- Chem, J. (2017). Isolasi, Identifikasi, Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid Sebagai Antibakteri Dari Daun Mangga. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 6(2), 91–96.
- Jaberian, H., Piri, K., & Nazari, J. (2013). Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. *Food Chemistry*, 136(1), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.084>
- Jawetz, E., Melnick J.L. and Adelberg, E.A. 2005. Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan. Edisi 14. Jakarta : Penerbit EGC. Hlm 801-806, 438
- Koo, H., Hayacibara, M.F., Schobel, B.D., Cury, J.A., Rosalen, P.A., Park, Y.K., Vacca-Smith, A.M., dan Bowen, W.H., 2003, Inhibition of *Streptococcus* mutans Biofilm Accumulation and Polysaccharide Production by Apigenin and α -Farnesol, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 782–789.
- Mustopa, A. Z., Budiarto, B. R., & Tarman, K. (2016). *Antibacterial Activity of Extracellular Protease Isolated From an Algicolous Fungus Xylaria psidii KT30 Against Gram-Positive Bacteria*. 23, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2016.06.005>
- Nguyen, T. D., Riordan-Short, S., Dang, T. T. T., O'Brien, R., & Noestheden, M. (2020). Quantitating terpenes / terpenoids and nicotine in plant materials and vaping products using high-temperature headspace

- gas chromatography–mass spectrometry. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (1st ed.). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2020.04.006>
- Prescott, L. M., John P. H., and Donal A. K. 1999. *Microbiology*. Forth edition. Mc Graw Hill Company. North America. 113 pp
- Ruiz-Rodriguez, Bronze Maria-Rosario, Nunes da Ponte, M. 2007. Supercritical Fluid Extraction of Tobacco Leaves: A preliminary Study on The Extraction of Solanesol. *Journal of Supercritical Fluids* 45 (2008) 171-176
- Sastya, S., Kumar, R. R., & Vatsya, S. (2017). *Evaluation of Anthelmintic Efficacy of Nicotiana tabacum against Gastrointestinal Nematodes of Goats*. 6(10), 780–789.
- Schorderet, S., Kaminski, K. P., Perret, J., Leroy, P., Mazurov, A., Peitsch, M. C., Ivanov, N. V., & Hoeng, J. (2019). Antiparasitic properties of leaf extracts derived from selected *Nicotiana* species and *Nicotiana tabacum* varieties. *Food and Chemical Toxicology*, 132(July), 110660. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.11.0660>
- Seidel, V. 2006. *Natural Product Isolation* 2nd edition. Humana Press Inc. new Jarsey, pp 27-37.
- Siegel, S. D., Liu, J., & Ton-that, H. (n.d.). ScienceDirect Biogenesis of the Gram-positive bacterial cell envelope. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.015>
- Tang, C., Chen, J., Zhang, L., Zhang, R., Zhang, S., Ye, S., Zhao, Z., & Yang, D. (2020). International Journal of Medical Microbiology Exploring the antibacterial mechanism of essential oils by membrane permeability , apoptosis and bio film formation combination with proteomics analysis against methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(5), 151435. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151435>

Anis Uswatun Khasanah, Sri Juni Nastiti