

Daya Hambat Ekstrak Daun Tembakau terhadap Pertumbuhan Mikroba Rongga Mulut

Riria Hendarto Putri¹, Izzata Barid², Banun Kusumawardani³

¹ Mahasiswa Profesi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember

² Bagian Ilmu Kedokteran Gigi Dasar, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember

³ Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember

ABSTRACT

Oral cavity diseases can be caused by the oral microbes such as *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Candida albicans*. The oral microbes growth can be inhibited by chlorhexidine gluconate mouthwash, but its long term use have adverse effects, therefore it is important to do a further research to find effective antibacterial and antifungal as alternative substance mouthwash. Flavonoid compounds in tobacco leaf have potential as an antibacterial and antifungal. The objective was to analyze the inhibition effect of tobacco leaf extract to the growth of *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Candida albicans*. This research used 20%, 40%, 60%, 80% and 100% ethanol extract of tobacco leaf, 1% DMSO as negative control and 0.2% chlorhexidine gluconate as positive control. Antibacterial and antifungal activities were tested by diffusion disc method with four repetitions. The observation was conducted by measuring the diameter of inhibition zone after incubating for 24 and 48 hours. The largest inhibition zone of *Streptococcus mutans* growth were produced by ethanol extract of tobacco leaf with 80% concentration, the largest inhibition zone on *Porphyromonas gingivalis* and *Candida albicans* growth were produced by ethanol extract of tobacco leaf with 100% concentration. Diameter of inhibition zone ethanol extract of tobacco leaf was equal with the diameter of inhibition zone of 0.2 % chlorhexidine gluconate. The conclusion described that ethanol extract of tobacco leaf can inhibit the growth of *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Candida albicans*.

Keywords: antibacterial, antifungal, oral microbes, tobacco leaf

Korespondensi (Correspondence): Banun Kusumawardani, Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember. Alamat: Jl. Kalimantan 37 Jember 68121, Indonesia. Email: kusumawardani_banun@yahoo.co.id; banun_k.fkg@unej.ac.id

Daun tembakau secara umum hanya dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan rokok dan telah lama menjadi kontroversi karena dikenal bisa menyebabkan dampak negatif seperti gangguan pada jantung, terjadinya penyakit kanker paru-paru, sesak nafas, perubahan warna gigi menjadi lebih kuning, kerusakan jaringan, penurunan kemampuan indra pengecap, leukoplakia dan resiko kanker mulut.¹ Disisi lain, daun tembakau mengandung bahan yang bersifat antibakteri dan antijamur.² Bahan aktif tersebut antara lain golongan fenol berupa flavonoid, golongan alkaloid berupa nikotin, golongan saponin berupa steroid dan juga minyak atsiri berupa terpenoid.³

Alkaloid mempunyai sifat antibakteri dengan bekerja merusak komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel bakteri mengalami lisis dan terjadi kematian sel, sedangkan flavonoid bekerja dengan mendenaturasikan protein dan merusak permeabilitas sel bakteri, mikrosom serta lisosom sebagai hasil dari proses interaksi antara flavonoid dengan dinding bakteri.⁴ Selain itu, flavonoid dapat berperan sebagai antijamur dengan bekerja mendenaturasikan protein yang mengakibatkan pembentukan sel terganggu sehingga komposisi protein berubah dan akhirnya fungsi membran sel juga terganggu.⁵

Mikroba rongga mulut yang paling banyak terlibat dalam terjadinya penyakit-
penyakit rongga mulut diantaranya adalah

Streptococcus mutans, *Porphyromonas gingivalis* dan *Candida albicans*.⁶ *Streptococcus mutans* merupakan bakteri Gram-positif penyebab awal terjadinya karies gigi.⁷ *Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri Gram-negatif yang berpengaruh terhadap perkembangan suatu penyakit periodontal.^{8,9} *Candida albicans* merupakan jamur flora normal rongga mulut yang bisa mengakibatkan terjadinya *oral candidiasis* apabila pertumbuhannya berlebihan.⁶

Daun tembakau diketahui dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram-positif yaitu *Staphylococcus aureus*, bakteri Gram-negatif yaitu *Erwinia carotovora* dan jamur.² Hal tersebut dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan Taiga dan Friday (2009), yang menunjukkan bahwa ekstrak daun tembakau dengan konsentrasi 10% sampai 40% efektif menghambat pertumbuhan *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.*, dan *Rhizopus sp.* Efektivitas ini diakibatkan kandungan flavonoid dalam daun tembakau yang diketahui bersifat fungistatik dan fungisidal.² Selanjutnya, penelitian yang dilakukan oleh Duangsri dkk. (2012) menunjukkan bahwa ekstrak daun tembakau dengan konsentrasi 50%, 80% dan 100% efektif menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Streptococcus aureus*.¹⁰

Penelitian tentang daun tembakau sebagai antimikroba rongga mulut khususnya antibakteri dan antijamur terhadap *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* dan *Candida albicans* belum

pemah dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk meneliti daya hambat ekstrak etanol daun tembakau terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* dan *Candida albicans*, sehingga hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan dan dikembangkan sebagai acuan bahan dasar pembuatan obat kumur antimikroba untuk pencegahan penyakit karies gigi dan penyakit periodontal.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan jumlah sampel sebanyak 4 sampel untuk tiap kelompok perlakuan. Penelitian ini melalui beberapa tahapan kerja, yaitu pembuatan ekstrak etanol daun tembakau yang dilakukan dengan menyiapkan daun tembakau segar dan muda kemudian dicuci bersih dan dikering-anginkan selama satu minggu pada suhu kamar dan dihaluskan menjadi serbuk. Serbuk sebanyak 250gr dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 1.875mL selama 3 hari di dalam toples kaca dan dilakukan pengadukan menggunakan spatula setiap harinya, kemudian ampas dan filtrat rendaman dipisahkan menggunakan kertas saring kimia. Setelah itu, dilakukan evaporasi menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C. Hasil evaporasi dimasukkan ke dalam cawan porselen dan diuapkan menggunakan *waterbath* sampai ekstrak menjadi lebih pekat lagi dengan konsistensi *semisolid*. Ekstrak etanol daun tembakau yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun tembakau konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Pengenceran ekstrak menggunakan pelarut DMSO 1%.

Tahap selanjutnya adalah pembuatan suspensi *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* dan *Candida albicans*. Bakteri diinokulasikan pada media kultur TSA dengan *sheep blood* 5%, sedangkan jamur diinokulasikan pada media kultur SDA menggunakan gigaskrin kemudian didiamkan selama 15 menit agar dapat beradaptasi dengan media agar. Media dibalik dan menandai *petridish* menggunakan spidol, sehingga *petridish* terbagi menjadi 4 daerah dan diberi label pada masing-masing bagian. Selanjutnya, kertas cakram berdiameter 5 mm yang terbuat dari kertas saring Whatman No. 42 ditetesi ekstrak etanol daun tembakau konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% masing-masing sebanyak 13µL menggunakan mikropipet dan didiamkan selama satu menit sampai menyerap. Kertas cakram tersebut ditempelkan menggunakan pinset steril pada media kultur yang telah diinokulasikan bakteri dan jamur. Setelah itu, kertas cakram ditekan secara perlahan menggunakan pinset steril untuk memastikan bahwa kertas cakram pada masing-masing media kultur sudah benar-benar menempel. Cara peletakan

kertas cakram pada kontrol positif dan negatif dilakukan seperti pada kelompok perlakuan. Media kultur dibalik supaya uap pada permukaan tutup *petridish* tidak jatuh mengenai permukaan media kultur. Setelah itu, semua media kultur diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 dan 48 jam, kecuali untuk media kultur *Porphyromonas gingivalis* dimasukkan ke dalam desikator terlebih dahulu untuk mendapatkan suasana anaerob selama diinkubasi.

Setelah diinkubasi selama 24 dan 48 jam, masing-masing dilakukan pengukuran diameter zona hambat menggunakan jangka sorong digital dan dicatat hasilnya. Pengukuran dilakukan oleh tiga orang pengamat, masing-masing sebanyak 3 kali pengukuran. Hasil pengukuran diambil rata-rata. Pengukuran dilakukan pada hari ke-1 (24 jam) dan hari ke-2 (48 jam). Hal ini dilakukan untuk mengetahui sampai berapa lama khasiat dari ekstrak etanol daun tembakau bertahan.

HASIL

Penelitian ini merupakan uji aktivitas antimikroba yang pada dasarnya adalah uji antibakteri dan antijamur ekstrak etanol daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis*, serta terhadap jamur *Candida albicans* selama 24 dan 48 jam. Daya antibakteri dan antijamur tersebut diamati dengan mengukur terbentuknya diameter zona hambat berupa daerah atau wilayah jernih di sekeliling kertas cakram yang kemudian diukur diameternya menggunakan jangka sorong dalam skala milimeter.

Data yang digunakan pada penelitian ini hanya data pada hari ke-1 (24 jam) karena pada hari ke-2 (48 jam) zona hambat sudah ditumbuhi mikroba sehingga bisa dikatakan bahwa tidak terdapat pengaruh ekstrak etanol daun tembakau terhadap pertumbuhan mikroba, yaitu bakteri *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis* serta jamur *Candida albicans*. Hasil uji ekstrak etanol daun tembakau terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun tembakau konsentrasi 80% memiliki diameter zona hambat terbesar pada pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dibandingkan dengan ekstrak etanol daun tembakau konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 100%, sedangkan hasil uji ekstrak etanol daun tembakau terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis* dan jamur *Candida albicans* menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun tembakau konsentrasi 100% memiliki diameter zona hambat terbesar pada pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis* dan jamur *Candida albicans* dibandingkan dengan ekstrak etanol daun tembakau konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80%. Namun, ekstrak etanol daun tembakau konsentrasi 80% pada pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*,

dan ekstrak etanol daun tembakau konsentrasi 100% pada pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis* dan jamur *Candida albicans* tersebut memiliki diameter zona hambat yang besarnya hampir sama dengan diameter zona hambat yang dihasilkan oleh *chlorhexidine gluconate* 0,2% (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, dan *Candida albicans* pada hari ke-1 (24 jam) dalam satuan milimeter (mm)

Kelompok	n	Diameter zona hambat		
		<i>Streptococcus mutans</i> (X ± SD)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (X ± SD)	<i>Candida albicans</i> (X ± SD)
Kontrol positif	4	7,97 ± 0,17	8,52 ± 0,44	7,80 ± 0,30
Kontrol negatif	4	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00
Konsentrasi 20%	4	6,12 ± 0,10	5,82 ± 0,23	6,50 ± 0,26
Konsentrasi 40%	4	6,13 ± 0,10	6,48 ± 0,28	6,65 ± 0,10
Konsentrasi 60%	4	6,51 ± 0,41	7,31 ± 0,30	6,86 ± 0,05
Konsentrasi 80%	4	7,41 ± 0,20	7,43 ± 0,37	7,12 ± 0,13
Konsentrasi 100%	4	7,34 ± 0,07	7,53 ± 0,37	7,60 ± 0,50

Keterangan:

N = besar sampel,
(X ± SD) = (rata-rata ± standar deviasi).

Hasil penelitian menunjukkan terdapat variasi diameter zona hambat pada masing-masing kelompok perlakuan pada pertumbuhan *Streptococcus mutans*. Berdasarkan klasifikasi Corner dan Beuchat, pertumbuhan *Streptococcus mutans* pada hari ke-1 (24 jam) menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif DMSO 1% termasuk dalam kategori tidak menghambat pertumbuhan bakteri (diameter zona hambat <6mm), sedangkan kelompok kontrol positif *chlorhexidine gluconate* 0,2% dan ekstrak etanol daun tembakau konsentrasi 20%-100% memiliki rata-rata diameter zona hambat yang termasuk dalam kategori penghambat sedang (diameter zona hambat >6mm sampai <11mm). Diameter zona hambat bertambah sesuai dengan penambahan konsentrasi ekstrak etanol daun tembakau yang diuji, kecuali pada ekstrak etanol daun tembakau konsentrasi 80% dan 100%, dimana diameter zona hambat ekstrak etanol daun tembakau konsentrasi 80% lebih besar dari ekstrak etanol daun tembakau konsentrasi 100%, meskipun rata-ratanya tidak jauh berbeda dan setelah diuji statistik perbedaannya juga tidak signifikan.

Pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis* pada hari ke-1 (24 jam) menunjukkan berbagai variasi diameter zona hambat pada masing-masing kelompok perlakuan. Berdasarkan klasifikasi Corner dan

Beuchat, pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis* pada hari ke-1(24 jam), kontrol negatif DMSO 1% dan ekstrak etanol daun tembakau konsentrasi 20% termasuk dalam kategori tidak menghambat pertumbuhan bakteri (diameter zona hambat <6mm). Kontrol positif *chlorhexidine gluconate* 0,2% dan ekstrak etanol daun tembakau konsentrasi 40%-100% memiliki rata-rata diameter zona hambat yang termasuk dalam kategori penghambat sedang (diameter zona hambat >6mm sampai <11mm). Diameter zona hambat bertambah sesuai dengan penambahan konsentrasi ekstrak yang diuji.

Selanjutnya, pertumbuhan hari ke-1 (24 jam) *Candida albicans* memiliki berbagai variasi diameter zona hambat pada masing-masing kelompok perlakuan. Berdasarkan klasifikasi Corner dan Beuchat, pertumbuhan *Candida albicans* pada hari ke-1 (24 jam), kontrol negatif DMSO 1% termasuk dalam kategori tidak menghambat pertumbuhan bakteri (diameter zona hambat <6mm). Kontrol positif *chlorhexidine gluconate* 0,2% dan ekstrak etanol daun tembakau konsentrasi 20%-100% memiliki rata-rata diameter zona hambat yang termasuk dalam kategori penghambat sedang (diameter zona hambat >6mm sampai <11mm). Diameter zona hambat bertambah sesuai dengan penambahan konsentrasi ekstrak yang diuji. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antimikroba akan semakin kuat seiring dengan semakin tingginya konsentrasi suatu bahan antimikroba.

PEMBAHASAN

Hambatan pertumbuhan *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* dan *Candida albicans* akibat pemberian ekstrak etanol daun tembakau pada penelitian ini hanya terjadi pada hari ke-1 (24 jam). Penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri dan antijamur ekstrak etanol daun tembakau bersifat tidak kontinyu dan tidak seefektif kontrol positif *chlorhexidine gluconate* 0,2%. Hal ini diduga karena ekstrak etanol daun tembakau yang digunakan merupakan ekstrak kasar dan penurunan aktivitas antimikroba dari ekstrak kasar memiliki sifat yang tidak kontinyu karena mengandung semua bahan yang tersari dengan menggunakan pelarut organik. Faktor lain yang diduga berpengaruh terhadap penurunan aktivitas antibakteri dan antijamur adalah adanya kandungan senyawa flavonoid yang bersifat tidak stabil. Apabila dibandingkan dengan *chlorhexidine gluconate* 0,2% dapat bekerja secara lebih efektif karena mengandung *amidine* dan *guanidine* yang efektif terhadap bakteri Gram-positif, bakteri Gram-negatif dan jamur.¹¹

Pertumbuhan *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* dan *Candida albicans* menunjukkan bahwa diameter zona hambat pada masing-masing kelompok perlakuan mengalami penurunan

diameter zona hambat pada hari ke-2 (48 jam), hal ini diduga karena semakin lama suatu bahan digunakan, zat yang terdifusi akan semakin berkurang sehingga aktivitas antimikroba dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan jamur akan semakin rendah. Selain itu, hal tersebut juga bisa diakibatkan semakin lama masa inkubasi maka semakin besar kemungkinan mikroba untuk mulai berkembangbiak seiring dengan berkurangnya efektifitas suatu zat atau obat.

Penurunan diameter zona hambat ekstrak etanol daun tembakau diduga juga bisa disebabkan oleh aktivitas senyawa flavonoid di dalam ekstrak etanol daun tembakau memiliki sifat yang tidak stabil terhadap perubahan pengaruh oksidasi, cahaya dan perubahan kimia sehingga apabila terjadi oksidasi strukturnya akan mengalami perubahan dan fungsinya sebagai bahan aktif akan menurun bahkan hilang dan kelarutannya menjadi rendah.¹²

Kandungan ekstrak etanol daun tembakau yang dapat menyebabkan adanya aktivitas antibakteri adalah komponen bioaktifnya. Daun tembakau mengandung alkaloid, flavonoid, terpenoid dan steroid. Senyawa-senyawa tersebut bersifat antibakteri dengan mekanisme menghambat pertumbuhan bakteri yang khas sesuai dengan karakteristiknya masing-masing. Pada prinsipnya, mekanisme kerja senyawa alkaloid sebagai antibakteri yaitu dengan menyebabkan kerusakan pada proses sintesis DNA dan dinding sel.¹³

Senyawa terpenoid yang merupakan golongan minyak atsiri diduga juga berperan sebagai antibakteri. Minyak atsiri dapat menghambat kerja enzim yang terlibat dalam produksi energi dan pembentukan komponen struktural sehingga mengganggu pembentukan dinding sel bakteri.¹⁴ Mekanisme kerusakan dinding sel diakibatkan karena adanya akumulasi komponen lipofilik yang terdapat pada dinding sel atau membran sel sehingga terjadi perubahan komposisi penyusun dinding sel. Minyak atsiri yang aktif berfungsi sebagai antibakteri umumnya mengandung fenol yang merupakan gugus fungsi hidroksil (-OH) dan karbonil. Turunan dari fenol berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Pada fenol dengan kadar rendah, terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan lemah dan segera mengalami peruraian diikuti penetrasi fenol ke dalam sel dan menyebabkan terjadinya presipitasi serta denaturasi protein. Pada kadar tinggi fenol menyebabkan koagulasi protein dan sel membran mengalami lisis.¹⁵

Senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol daun tembakau ini merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol, dan mempunyai spektrum aktivitas antibakteri yang luas dengan cara mengurangi kekebalan organisme sasaran. Mekanisme antibakteri flavonoid yaitu

dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri.¹³ Zat antibakteri akan mengakibatkan kerusakan pada membran sel, sehingga pertumbuhan sel terganggu bahkan bisa menyebabkan sel mati.¹⁶ Selain sebagai antibakteri, flavonoid juga berfungsi dalam menghambat pembentukan spora jamur patogen. Flavonoid diketahui efektif dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans*.¹⁷ Flavonoid berfungsi merusak dinding sel jamur. Flavonoid dapat berikatan dengan dinding sel melalui sebuah kompleks protein-fenol, yang melibatkan adanya ikatan hidrogen antara protein dan fenol. Kompleks ini nantinya akan dapat menyebabkan kerusakan (denaturasi) ikatan hidrogen dalam protein pada dinding sel jamur. Selanjutnya, kerusakan inilah yang membuat matriks intraseluler jamur keluar. Keluarnya matriks ini menyebabkan kematian sel jamur.¹⁸

Kandungan bahan dalam ekstrak etanol daun tembakau yang diduga juga memiliki efek antijamur adalah alkaloid. Alkaloid merupakan senyawa kimia bersifat basa nitrogen yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, secara umum alkaloid tidak berwarna dan berbau apabila memiliki struktur kompleks dan bercincin aromatik.¹⁹ Kadar toksisitas suatu alkaloid berbeda dengan alkaloid jenis yang lainnya.²⁰ Alkaloid utama pada daun tembakau adalah nikotin. Konsentrasi nikotin diperkirakan mencapai 6-8%. Nikotin merupakan metabolit sekunder dari ornitin, yang berfungsi menghambat pertumbuhan jamur.²¹

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun tembakau memiliki daya antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis*, serta memiliki daya antijamur terhadap *Candida albicans*. Konsentrasi ekstrak etanol daun tembakau yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* adalah ekstrak etanol daun tembakau konsentrasi 80%, sedangkan ekstrak etanol daun tembakau yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis* dan *Candida albicans* adalah ekstrak etanol daun tembakau konsentrasi 100%. Selanjutnya, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penentuan senyawa bioaktif ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum*) yang memiliki aktivitas antibakteri dan antijamur paling optimum serta menguji toksisitas ekstrak daun tembakau terhadap jaringan rongga mulut sehingga dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan obat kumur.

Daftar Pustaka

1. Xin Z, Jinren N, Wen H. Extraction of solanesol from Tobacco with

- supercritical carbon dioxide. *Fine Chem.* 2006; 23: 480-501.
2. Taiga A, Friday E. Variations in phytochemical properties of selected fungicidal aqueous extracts of some plant leaves in Kogi State, Nigeria. *American-Eurasian J Sustainable Agriculture.* 2009; 3(3): 407-9.
 3. Fathiazad F, Delazar A, Amiri R, Sarker SD. Extraction of flavonoids and quantification of Rutin from waste Tobacco leaves. *Iranian J Pharmaceutical Res.* 2005; 3: 222-7.
 4. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential, and motility of bacteria. *Microbiol Res.* 1997; 152: 239-46.
 5. Abad LR, D'Urzo MP, Liu D, Narasimhan ML, Reuveni M, Zhu KJ, *et al.* Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 94: 7082-7.
 6. Lamont RJ, Jenkinson HS. *Oral microbiology at a glance.* Singapore: Wiley-Blackwell. 2010. p. 30-9, 41.
 7. Roeslan BO. Metabolisme karbohidrat oleh *S. mutans*: Pembentukan plak dan terjadinya karies gigi. *Jurnal PDGI.* 1992; 4: 8-12.
 8. Noril Y, Ozaki K, Nakae H, Matsuo, Ebisu S. Immunohistochemistry experimental study of localized Porphyromonas gingivalis, Campylobacter rectus, and Visicus actinomycesin periodontal pocket. *J Periodontol.* 1997; 32: 598-607.
 9. Cutler CW, Chalmer JR, Genco CA. Pathogenic strategies of the oral anaerob *P. gingivalis*. *Trends Microbiol.* 1995; 3: 45-51.
 10. Duangsri P, Juntarapun K, Sathirapipathkul C. The tobacco leaf extract and antibacterial activity in textile. *RMUTP International Conference: Textiles & Fashion 2012 July 3-4, 2012, Bangkok Thailand.*
 11. do Amorim CVG, Aun CE, Mayer MPA. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. *Braz Oral Res.* 2004; 18(3): 242-6.
 12. Handayani R, Joko S. Sintesis senyawa flavonoid-a-glikosida secara reaksi transglikosilasi enzimatik dan aktivitasnya sebagai antioksidan. *Biodiversitas.* 2008; 9(1): 1-4.
 13. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12: 564-82.
 14. Nychas GJE, Tassou CC. Traditional preservatives-oils and spices. *African Crop Sci J.* 2000; 18(1): 15-22.
 15. Parwata IMO, Dewi PFS. Isolasi dan uji aktivitas antibakteri minyak atsiri dari rimpang lengkuas (*Alpinia galanga L.*). *Jurnal Kimia.* 2008; 2(2): 100-4.
 16. Akiyama H, Kazuyasu F, Osamu Y, Takashi O, Keiji I. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrobial Chemotherapy.* 2001; 48: 487-91.
 17. Alka J, Padma K, Chitra J. Antifungal activity of flavonoids of *Sida acuta* Burm f. against *Candida albicans*. *Int J Drug Dev Res.* 2012; 4(3): 92-6.
 18. Obongoya BO, Wagai SO, Odhiambo G. Phytotoxic effect of selected crude plant extracts on soil-borne fungi of common bean. *African Crop Sci J.* 2010; 18(1): 15-22.
 19. Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrobial Agents.* 2005; 26: 343-5.
 20. Simbala HEI. Analisis senyawa alkaloid beberapa jenis tumbuhan obat sebagai bahan aktif fitofarmaka. *Pacific Journal.* 2009; 4: 489-94.
 21. Schneider S, Diederich N, Appenzeller B, Scharz, Lorang C, Wennig R. Internet Suicide Guidelines: *Report of A Life Threatening Poisoning Using Tobacco Extract.* 2008; 75(3): 134-6