



Aktivitas Antimikroba Minyak Atsiri Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) terhadap Fungi *Candida albicans*

SKRIPSI

Oleh :

Dwi Tari Wulandari 141710101117

JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

UNIVERSITAS JEMBER

KEMENTERIAN RISET TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

2018



Aktivitas Antimikroba Minyak Atsiri Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) terhadap *Candida albicans*

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk penyelesaian Program Studi Teknologi Hasil Pertanian (S1) dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian

Oleh :

Dwi Tari Wulandari 141710101117

JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

UNIVERSITAS JEMBER

KEMENTERIAN RISET TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

2018

PERSEMBAHAN

Saya persembahkan skripsi ini untuk :

1. Allah SWT, puji syukur kehadiratNya yang telah memberikan kemudahan dan kelancaran kepada hambaMu dalam mengambil keputusan disetiap langkah hambaMu ini;
2. Rasullullah SAW, terima kasih telah membimbing umat manusia menjadi seorang khalifah di bumi dan menjadikan suri tauladan umatmu;
3. Kedua orang tua tercinta, Mama Marjatic dan Papa Sunardi, S.H. (Alm) yang telah membimbing anakmu menjadi manusia yang bermanfaat untuk bangsa dan negara Indonesia khususnya untuk mama telah memberikan doa, semangat dan kasih sayang kepada Tari selama ini;
4. Kakak tercinta saya (Ratna) dan Adikku tersayang Sherly yang telah mendukung dan memberikan semangat selama penelitian dan menyelesaikan skripsi;
5. Seluruh keluarga besar Tari yang telah memberikan dukungan, kasih sayang dan semangat selama ini;
6. Teman seperjuangan Ayu dan Ambar, yang telah menemani Tari selama penelitian tembakau dan memberikan semangat untuk menyelesaikan skripsi;
7. Teman – teman yang telah mendukung dan memberikan semangat yang luar biasa (Indah, Wasil, Aurora, Wulan, Hujjah, Sri Dewi, Rizky Fathonah Imami, Rahayu, THP B 2014, THP 2014, Angkatan FTP 2014, UKM-O SAHARA, KKN UMD 68 Gel. 2 th 2017, Sahabat SMP dan SMA)
8. Almamater Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

MOTTO

“Karunia Allah yang paling lengkap adalah kehidupan yang didasarkan pada ilmu pengetahuan”

-Ali bin Abi Thalib-



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dwi Tari Wulandari

NIM : 141710101107

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “**Aktivitas Antimikroba Minyak Atsiri Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) terhadap Fungi *Candida albicans***” adalah benar – benar hasil karya saya sendiri, kecuali dalam kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan dalam institusi manapun dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggungjawab 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 manapun serta mendapatkan sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar

Jember, Mei 2018

Dwi Tari Wulandari

NIM 141710101107

SKRIPSI

**AKTIVITAS ANTIMIKROBA MINYAK ATSIRI DAUN TEMBAKAU
(*Nicotiana tabacum* L.) terhadap Fungi *Candida albicans***

oleh :

**Dwi Tari Wulandari
NIM 141710101107**

Pembimbing :

**Dosen Pembimbing Utama : Dr.Ir.Sony Suwasono, M.App.,Sc.
Dosen Pembimbing Anggota : Andrew Setiawan Rusdianto, S.TP.,M.Si**

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Aktivitas Antimikroba Minyak Atsiri Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) terhadap Fungi *Candida albicans*”** karya Dwi Tari Wulandari NIM 141710101107 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.

Andrew Setiawan Rusdianto, S.TP.,M.Si

NIP. 196411091989021002

NIP.198204222005011002

Tim Penguji :

Ketua

Anggota

Dr.Ir. Herlina, M.P

Dr. Nurhayati, S.TP.,M.Si

NIP. 196605181993022001

NIP. 197904102003122004

Mengesahkan

Dekan Fakultas Teknologi Pertanian

Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP.,M.Eng.

NIP. 196805161992031004

SUMMARY

Antimicrobial Activity of Essential Oil of Tobacco Leaves (*Nicotiana tabacum* L.) against Fungi *Candida albicans*; Dwi Tari Wulandari; 141710101107; 99 pages; Departmen of Agricultural Product Technology. Faculty of Agricultural Technology, University of Jember

Tobacco leaf is one part of tobacco plants that are used as raw materials of cigarettes. In addition to being used as raw materials of cigarettes, tobacco leaves have alkaloid and terpenoid compounds that can be used as a raw material for the manufacture of essential oils of tobacco leaf. In this study used tobacco leaves to produce essential oils that will be tested as an antimicrobial compound. The purpose of this research knows the capability of antimicrobial compound in essential oil of Kasturi's tobacco leaves in inhibiting the growth of *Candida albicans*

Methods conducted in the research are classified into four stages: vapor leaf-water steam distillation, physical testing of essential oil of tobacco leaf, testing of essential oils component of tobacco leaf using GC-MS and testing of antimicrobial activity by solid diffusion and dilution methods. The concentration of antimicrobial assay used was 0; 2; 6; 18; 36; 72% for solid diffusion method and 0; 0.24; 0.4; 0.8; 1.6; 2.4 and 3.0% for solid dilution methods. The results of research have been done states that fresh water content of tobacco leaf of 79.67%. In addition, the yield of essential oil of tobacco leaves is 0.026% with specific gravity of 0.933 g/ml. The chemical components contained in the essential oils of GC-MS yielded 39 composite species with 16 major component compounds, for example 13,19% and 17-*neophytadeiene*Octadecanoic acid, methyl ester (CAS) 18,67%. Tests of antimicrobial activity conducted in this study consist of 2 kinds of inhibition zone and MIC (Minimum Inhibitory Concentration) determination. The width of the inhibit zone on the testing of the tobacco leaves essential oil was 10.33 mm at a concentration of 72%. The second antimicrobial assay obtained by MIC value of essential oil of tobacco leaf with probit curve *Candida albicans* yielding MIC (IC50) of 3,67 mg / ml (24 hours) and 11,79 mg / ml (48 hours).

RINGKASAN

Aktivitas Antimikroba Minyak Atsiri Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) terhadap Fungi *Candida albicans*; Dwi Tari Wulandari; 141710101107; 99 halaman; Jurusan Teknologi Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Daun tembakau merupakan salah satu bagian dari tanaman tembakau yang dimanfaatkan sebagai bahan baku rokok. Selain digunakan sebagai bahan baku rokok, daun tembakau yang memiliki senyawa alkaloid dan terpenoid dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan minyak atsiri daun tembakau. Pada penelitian ini digunakan daun tembakau untuk menghasilkan minyak atsiri yang akan diujikan sebagai senyawa antimikroba. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui tingkat kemampuan senyawa antimikroba dalam minyak atsiri daun tembakau Kasturi dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans*

Metode yang dilakukan dalam penelitian tergolong dalam empat tahapan yaitu destilasi uap-air daun tembakau, pengujian fisik minyak atsiri daun tembakau, pengujian komponen kimia minyak atsiri daun tembakau menggunakan GC-MS dan pengujian aktivitas antimikroba dengan metode difusi dan dilusi padat. Konsentrasi pengujian antimikroba yang digunakan adalah 0; 2; 6; 18; 36; 72% metode difusi padat dan 0; 0,24; 0,4; 0,8; 1,6; 2,4 dan 3,0% metode dilusi padat. Hasil penelitian yang telah dilakukan menyatakan bahwa kadar air daun tembakau segar sebesar 79,67%. Selain itu, rendemen minyak atsiri daun tembakau sebesar 0,026% dengan berat jenis 0,933 g/ml. Komponen kimia yang terdapat dalam minyak atsiri dari hasil GC – MS diperoleh 39 jenis kompoen dengan 16 senyawa komponen utama, contohnya adalah neofitadeiена 13,19% dan 17-*Octadecanoic acid*, methyl ester (CAS) 18,67%. Pengujian aktivitas antimikroba yang dilakukan pada penelitian ini terdiri dari 2 macam yaitu zona hambat dan penentuan KHM. Luas zona hambat pada pengujian minyak atsiri daun tembakau sebesar 10,33 mm pada konsentrasi 72%. Pengujian antimikroba yang kedua didapatkan nilai KHM minyak atsiri daun tembakau dengan kurva

probit *Candida albicans* menghasilkan nilai KHM (IC50) sebesar 3,67 mg/ml (24 jam) dan 11,79 mg/ml (48 jam).



PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya dalam menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Antimikroba Minyak Atsiri Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) terhadap *Candida albicans*” dengan baik. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan studi strata satu (S1) di jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Proses penyusunan skripsi ini telah mendapat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak sehingga dapat terselesaikan dengan baik. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang teramat dalam kepada :

1. Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP., M.Eng., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
2. Dr. Ir. Jayus., selaku Ketua Jurusan/Program Studi Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
3. Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.,Sc., selaku dosen pembimbing utama yang telah memberikan waktu dan ilmunya serta kesabaran dalam membimbing penelitian yang telah disusun dalam skripsi ini;
4. Andrew Setiawan Rusdianto, S.TP., M.Si., selaku dosen pembimbing anggota yang telah memberikan waktu, arahan dan perbaikan dalam penulisan skripsi ini;
5. Dr. Ir. Herlina, M.P., dan Dr. Nurhayati, S.TP., M.Si., selaku tim penguji yang telah memberikan kritik, saran dan waktunya dalam membantu perbaikan penulisan skripsi;
6. Mama Atik, Kakakku Ratna Sari Dewi dan Adik Sherly Apta Maharani telah memberikan semangat dan doa serta dukungan dalam menyelesaikan studi S1 yang tak terhingga;
7. Ayu, Ambar, Indah, Aurora, Sri Dewi, Wasil, Wulan dan Hujjah untuk motivasi, semangat dan bantuannya saat menyelesaikan penelitian hingga terselesaikannya skripsi ini;

8. Teman-teman kelas THP B 2014 tercinta yang telah memberikan dukungan, motivasi dan semangat serta bantuan;
9. Teman-teman SAHARA, Angkatan 2014 dan THP 2014 yang telah memberikan dukungan dan semangatnya;
10. Sahabat semasa SMPN 5 Lumajang dan SMAN 2 Lumajang atas semangat, doa dan dukungan dari jauh;
11. Semua pihak terkait yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah memberikan doa, dukungan dan membantu selama pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi hingga selesai tepat waktu dan baik.

Penulis memahami bahwa selama penyusunan skripsi ini tidak ada kata sempurna dan masih terdapa kesalahan. Penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari pembaca agar penulisan karya ilmiah ini menjadi lebih baik. Semoga dengan adanya skripsi ini dapat bermanfaat dalam bidang pengetahuan dan menambah ilmu bagi para pembaca.

Jember, Mei 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
PERSEMBAHAN	iii
MOTTO	iv
PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
PENGESAHAN	vii
SUMMARY	viii
RINGKASAN	ix
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tembakau (<i>Nicotiana tabacum</i>)	4
2.1.1 Klasifikasi Tembakau	4
2.1.2 Morfologi Tembakau.....	4
2.1.3 Jenis–Jenis Tanaman Tembakau.....	5
2.1.4 Pemanfaatan Tanaman Tembakau.....	6
2.1.5 Komponen Kimia Tanaman Tembakau.....	8
2.2 Minyak Atsiri	9
2.3 <i>Candida albicans</i>	13
2.4 Antimikroba	15
2.4.1 Senyawa dan Mekanisme Kerja Antimikroba.....	15
2.4.2 Pengujian Antimikroba	17
BAB 3. METODE PENELITIAN	20
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	20
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	20
3.2.1 Bahan Penelitian.....	20
3.2.2 Alat Penelitian.....	20
3.3 Pelaksanaan Penelitian	21
3.3.1 Rancangan Percobaan.....	21
3.3.2 Rancangan Tahapan Penelitian	22
3.3.3 Prosedur Penelitian.....	24
3.5 Prosedur Analisa	29
3.5.1 Analisa Kadar Air Daun Tembakau.....	29
3.5.2 Analisa Rendemen Minyak Atsiri Daun Tembakau.....	30
3.5.3 Analisa Berat Jenis Minyak Atsiri Daun Tembakau.....	30
3.5.4 Komponen Kimia Minyak Atsiri Daun Tembakau.....	30

3.5.5 Pengukuran Zona Hambat	31
3.5.6 Pengukuran Nilai KHM	32
3.6 Analisa Data	32
BAB 4. PEMBAHASAN.....	33
4.1 Kadar Air Daun Tembakau.....	33
4.2 Rendemen Minyak Atsiri Daun Tembakau.....	33
4.3 Berat Jenis Minyak Atsiri Daun Tembakau.....	34
4.4 Analisa Kandungan Kimia Minyak Atsiri Daun Tembakau.....	35
4.5 Potensi Antimikroba Minyak Atsiri Daun Tembakau Kasturi terhadap <i>Candida albicans</i>	38
4.6 Respon Penghambatan Pertumbuhan <i>Candida albicans</i>	41
BAB 5. PENUTUP.....	48
5.1 Kesimpulan.....	48
5.2 Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA.....	49
LAMPIRAN.....	56

DAFTAR GAMBAR

2.1 Struktur <i>Candida albicans</i>	13
3.1 Diagram alir tahapan penelitian aktivitas antimikroba minyak atsiri daun tembakau Kasturi terhadap <i>Candida albicans</i>	23
4.1 Kromatogram GC minyak atsiri aaun tembakau jenis Kasturi.....	36
4.2 Zona hambat metode disk minyak atsiri daun tembakau terhadap <i>Candida albicans</i>	38
4.3 Zona hambat <i>Candida albicans</i>	40
4.4 Hubungan persentase penghambatan minyak atsiri daun tembakau jenis Kasturi terhadap persentase penghambatan <i>Candida albicans</i>	41
4.5 Total pertumbuhan koloni <i>Candida albicans</i> dengan waktu pertumbuhan 24 jam (a) dan 48 jam (b)	42
4.6 Kurva hubungan penghambatan minyak atsiri daun tembakau terhadap <i>Candida albicans</i> menggunakan kurva linier	44
4.7 Kurva hubungan penghambatan minyak atsiri daun tembakau terhadap nilai probit <i>Candida albicans</i> menggunakan kurva linier	45

DAFTAR TABEL

2.1 Kandungan kimia tembakau bahan rokok.....	8
2.2 Penggolongan kandungan kimia minyak atsiri daun tembakau Bondowoso ..	9
3.1 Rancangan pengujian minyak atsiri daun tembakau untuk pengujian difusi padat metode disk	21
3.2 Rancangan pengujian minyak atsiri daun tembakau untuk pengujian dilusi padat.....	22
4.1 Rendemen minyak atsiri daun tembakau.....	34
4.2 Berat jenis minyak atsiri.....	35
4.3 Penggolongan senyawa minyak atsiri daun tembakau.....	37

DAFTAR LAMPIRAN

1. Kadar Air Tembakau.....	56
2. Rendemen Minyak Atsiri Daun Tembakau.....	56
3. Berat Jenis Minyak Atsiri Daun Tembakau.....	56
4. Komponen Kimia Minyak Atsiri Daun Tembakau.....	57
5. Penghitungan Konsentrasi Minyak Atsiri Daun Tembakau.....	59
6. Penghitungan Konsentrasi MAT dalam pengujian KHM (mg/ml)	60
7. Perhitungan Zona Hambat <i>Candida albicans</i>	60
8. Hasil Analisa ANOVA Zona Hambat 1 Faktor.....	62
9. Hasil Analisa ANOVA KHM 2 Faktor	63
10. Perhitungan nilai KHM <i>Candida albicans</i>	65
11. Foto Kegiatan Penelitian.....	73

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Potensi daun tembakau di Indonesia memiliki nilai yang tinggi dalam hal perdagangan ekspor ke berbagai negara di dunia seperti Amerika Serikat, Senegal, Jepang dan Ukraina (Paramartha dan Lazuardi, 2013). Daun tembakau di Indonesia yang dijadikan sebagai barang ekspor merupakan salah satu jenis daun tembakau dengan kualitas yang terbaik. Hal ini didukung dengan adanya jumlah varietas tanaman tembakau di Indonesia yang jumlahnya kurang lebih 100 varietas antara lain yaitu tembakau Deli, tembakau Temanggung, tembakau Vorstenlanden, tembakau Madura, tembakau Besuki, tembakau Garut dan tembakau Lombok Timur (Chirst Hanspari, 2010 *dalam* Paramartha dan Lazuardi, 2013). Berbagai macam varietas tanaman tembakau tersebut dapat dilihat dari produksi daun tembakau di Indonesia yang didapatkan dari Badan Pusat Statistik bahwa pada tahun 2016 produksi tembakau pada perkebunan besar sebesar 0,6 ribu ton sedangkan pada perkebunan rakyat sebesar 195,6 ribu ton (Badan Pusat Statistik, 2017). Selain itu, volume dan nilai ekspor komoditi tembakau di Jawa Timur pada tahun 2015 dan 2016 sebesar 42.095.695 dan 40.991.842 ton (BPS Jawa Timur, 2017).

Jumlah daun tembakau yang melimpah membuat sebagian daun tembakau yang tidak lolos seleksi sortasi menjadi rokok akan dibuang atau bisa disebut dengan daun tembakau afkir. Daun tembakau afkir yang dibuang masih terdapat komponen kimia yang dapat dimanfaatkan menjadi produk selain rokok seperti pestisida, bahan campuran pembuatan parfum badan dan bio-oil (Nurnasari dan Subiyakto, 2011). Salah satu jenis daun tembakau afkir yang akan digunakan pada penelitian ini adalah daun tembakau Kasturi. Tanaman tembakau Kasturi merupakan salah satu spesies dari tembakau *Nicotiana tabacum*. Pemilihan daun tembakau jenis Kasturi didasarkan pada tingkat produksi yang melimpah daun tembakau Kasturi Voor oogst (VO) di Jember pada tahun 2016 sebesar 35.985.65 kw/ha (Badan Pusat Statistik Jember, 2017) dapat dikembangkan menjadi produk lain yang lebih bermanfaat selain rokok yaitu minyak atsiri. Salah satu penelitian

menyebutkan bahwa pemanfaatan minyak atsiri dari daun tembakau Bondowoso jenis Virginia didasarkan dari komponen kimia daun tembakau yang terdiri dari 39,89% neofitadiena, 4,88% solanone, dan 1,15% eugenol (Nurnasari dan Subiyakto, 2011). Senyawa neofitadiena yang terbesar daun tembakau pada beberapa penelitian memiliki aktivitas farmakologi seperti antipiretik, analgesik, anti-inflamasi, antimikroba dan antioksidan (Dinas Komunikasi dan Informatika Provinsi Jawa Timur, 2017).

Adanya sifat minyak atsiri daun tembakau sebagai antifungi maka pada penelitian akan dilakukan pengujian aktivitas minyak atsiri daun tembakau terhadap fungi jenis *Candida albicans*. Fungi jenis *Candida albicans* merupakan mikroba jenis khamir yang bersifat patogen dan banyak ditemui di bagian tubuh manusia khususnya bagian oral dan mukosa genital. Mikroba jenis ini dapat menyebabkan suatu penyakit infeksi jamur atau biasa disebut kandidiasis (Zoric *et al.*, 2016). Bahaya yang ditimbulkan dari mikroba tersebut dapat merugikan manusia jika tidak dilakukan pencegahan dengan cara mengurangi jumlah populasi mikroba *Candida albicans* pada diri manusia. Hal ini menjadikan minyak atsiri pada daun tembakau dapat digunakan sebagai senyawa antifungi terhadap daya hambat pertumbuhan *Candida albicans*.

Oleh karena itu, untuk mengurangi pertumbuhan jamur jenis *Candida albicans* dalam hal mencegah terjadinya dampak negatif terhadap kesehatan tubuh manusia maka perlu adanya penggunaan minyak atsiri daun tembakau sebagai antimikroba. Selain itu, keefektifan minyak atsiri daun tembakau juga diteliti melalui pengujian aktivitas antimikroba dengan memberikan berbagai macam konsentrasi minyak atsiri daun tembakau dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans*.

1.2 Rumusan Masalah

Pemanfaatan daun tembakau khususnya daun tembakau afkir masih belum dilakukan secara maksimal sehingga perlu adanya penanganan lebih lanjut dalam memanfaatkan daun tembakau afkir Kasturi VO. Daun tembakau afkir Kasturi VO nantinya akan diekstrak kandungan minyak atsiri seperti kandungan alkaloid dan

terpenoid untuk dijadikan sebagai senyawa antimikroba. Penggunaan minyak atsiri daun tembakau sebagai senyawa antimikroba akan diuji pada salah satu jenis fungi yaitu *Candida albicans*. Penggunaan fungi jenis *Candida albicans* dalam pengujian aktivitas antimikroba didasarkan pada kenyataan bahwa fungi ini banyak terdapat pada tubuh manusia sehingga jika dibiarkan tanpa adanya tindakan pencegahan dan pengobatan maka dapat menyebabkan penyakit berbahaya khususnya pada bagian oral dan gastrointestinal. Pencegahan pertumbuhan *Candida albicans* dalam tubuh dapat dilakukan dengan pengujian membuat berbagai macam variasi konsentrasi minyak atsiri daun tembakau guna untuk mengetahui berbagai tingkat keefektifan minyak atsiri daun tembakau terhadap daya hambat pertumbuhan *Candida albicans*. Oleh karena itu, dalam penelitian ini perlu diuji pengaruh berbagai macam konsentrasi minyak atsiri dalam penghambatan pertumbuhan jamur *Candida albicans*.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Mengekstrak minyak atsiri daun tembakau dan menghitung rendemennya
2. Mengetahui senyawa aktif pada minyak atsiri daun tembakau
3. Mengetahui daya hambat minyak atsiri daun tembakau terhadap pertumbuhan fungi (*Candida albicans*) pada berbagai macam konsentrasi

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang terdapat pada penelitian ini adalah

1. Memberikan alternatif pemanfaatan daun tembakau sebagai sumber minyak atsiri
2. Memberikan informasi bahwa senyawa dalam minyak atsiri daun tembakau dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans*

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tembakau (*Nicotiana tabacum*)

2.1.1 Klasifikasi Tembakau

Tembakau merupakan suatu tanaman komersial dan juga salah satu tanaman tropis asli Amerika untuk dimanfaatkan daunnya sebagai bahan baku rokok, pipa atau tembakau kunyah (*chewing*) atau biasanya dihisap melalui hidung dan disebut sebagai tembakau sedotan (*snuff*) (Siregar, 2016). Secara umum varietas tembakau yang banyak diketahui adalah *Nicotiana bigelovii*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana plumbagifolia* dan *Nicotiana tabacum* (Paramartha dan Yuda, 2013). Di Indonesia juga terdapat daun tembakau yang telah dikembangkan berdasarkan adaptasi lokasi tembakau seperti tembakau Virginia, Burley dan Turki. Ketiga tembakau tersebut menjadi sumber komoditas perkebunan tembakau terbesar yang ada di Indonesia (Siregar, 2016). Berdasarkan berbagai macam jenis tembakau, terdapat klasifikasi tanaman tembakau secara umum dari jenis *Nicotiana tabacum* (Matnawi, 1997) adalah sebagai berikut.

Kelas	: <i>Dycotyledoneae</i>
Ordo	: <i>Personatae</i>
Familia	: <i>Solanaceae</i>
Genus	: <i>Nicotiana</i>
Spesies	: <i>Nicotiana tabacum</i> L.

2.1.2 Morfologi Tembakau

1. Akar

Akar tanaman tembakau merupakan akar tunggang yang memiliki panjang antara 50 – 70 cm dan juga terdapat akar serabut yang berada di sekitar leher akar dari tanaman tembakau (Soedarmanto dan Abdullah, 1970). Penggunaan akar dari tanaman tembakau ini digunakan sebagai tempat sintesis nikotin sebelum diangkut melewati pembuluh menuju daun sehingga jika bagian akar mengalami pemangkasan dan kekeringan dalam pertumbuhannya maka akan terjadi

peningkatan kadar nikotin dalam tanaman tembakau khususnya pada daun (Hartana, 1978 dalam Tohari 1992).

2. Batang

Batang tembakau memiliki ciri berdiri tegak, berwarna hijau muda, berbulu dan disetiap ketiak daun tumbuh cabang dalam keadaan dorman (Suwarso, 1991). Cabang – cabang yang tumbuh disetiap ketiak daun jika mengalami pemangkasan maka akan mengalami perkembangan menjadi cabang baru yang akan menghambat pertumbuhan tanaman (Akehurst, 1981).

3. Daun

Bentuk daun tembakau bervariasi tergantung varietas dari tanaman tembakau, namun pada umumnya memiliki ciri tunggal, bertangkai atau duduk di batang, dan tersusun secara spiral. Bentuk daun tembakau yang berbeda tersebut pada umumnya digunakan sebagai bahan baku rokok yang terbagi menjadi dua yaitu blat dan oval (Basuki *et al.*, 1999).

4. Bunga

Bunga pada tanaman tembakau memiliki bentuk terompet yang tersusun atas kelopak (*callyx*) berwarna hijau dan berlekuk, mahkota bunga berwarna merah muda dan berbentuk terompet dengan lekuk lima, benang sari bertangkai panjang dengan kepala sari berwarna krem, memiliki putik yang juga bertangkai panjang dengan kepala putik berwarna hijau (Ochse *et al.*, 1961).

2.1.3 Jenis – Jenis Tanaman Tembakau

Tembakau merupakan salah satu komoditas perdagangan penting di dunia termasuk Indonesia dan peranannya sangat penting dalam perekonomian nasional (Peraturan Menteri Pertanian, 2012). Hal ini ditandai dengan adanya peningkatan pertumbuhan produksi tembakau Indonesia sejak tahun 1980 sampai 2013 rata – rata pertumbuhan sebesar 7,92%. Produktivitas tembakau di Indonesia cukup fluktuatif namun cenderung mengalami peningkatan dan 96,64% tanaman tembakau di Indonesia adalah milik rakyat yang dipelihara dengan baik sedangkan yang lainnya milik Perkebunan Negara (PBN) sebesar 3,29% (Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, 2014).

Peningkatan jumlah produktivitas tembakau terjadi karena budidaya komoditi tembakau menyebar di sebagian provinsi di Indonesia khususnya 15 provinsi salah satunya adalah Jawa Timur, Nusa Tenggara Barat dan Jawa Tengah. Ketiga daerah tersebut memiliki kontribusi kumulatif terhadap produksi tembakau di Indonesia sebesar 90,76%. Pada ketiga daerah tersebut, memiliki waktu pemanenan tembakau yang digolongkan menjadi 2 jenis tembakau yaitu kelompok tembakau VO (*voor-oogst*) dan kelompok tembakau NO (*na-oogst*). Menurut Tirtosastro (2004), kedua jenis tembakau tersebut memiliki ciri – ciri sebagai berikut :

1. Kelompok tembakau VO dapat dilakukan penanaman pada akhir musim hujan (Maret – Mei) dan dipanen pada musim kemarau (Agustus – Oktober). Pada jenis tembakau VO terbentuk lapisan lilin pada permukaan daun yang tidak larut karena selama menjelang panen sampai selesai pengolahan diharapkan tidak ada hujan dan matahari bersinar terang (Davis dan Nielsen, 1999). Selain itu pada tembakau VO juga terdapat bulu – bulu daun (*trychome*) yang dipertahankan karena dapat mempengaruhi aroma tembakau VO (Johnson *et al.*, 1985). Tembakau jenis VO digolongkan sebagai tembakau rakyat yang digunakan sebagai bahan baku industri rokok kretek dan rokok putih.
2. Kelompok Tembakau NO merupakan tembakau yang ditanam pada akhir musim kemarau (September – Oktober) dan dipanen pada awal musim hujan (Desember – Januari). Tembakau jenis NO memiliki permukaan daun yang bersih dari lilin dan bulu – bulu daun sehingga setelah diolah menjadi krosok mempunyai karakteristik rasa dan aroma berbeda dengan tembakau VO. Penggunaan tembakau NO biasanya digunakan untuk kebutuhan ekspor dan digunakan sebagai bahan cerutu.

2.1.4 Pemanfaatan Tanaman Tembakau

Pemanenan tembakau dapat mempengaruhi mutu tembakau selama proses pengolahan. Pemanenan tanaman tembakau dilakukan ketika daun telah masak artinya daun yang dalam pertumbuhannya telah mencapai kondisi yang optimal

untuk menghasilkan krosok atau rajangan sesuai permintaan konsumen. Salah satu tanda daun telah mencapai tingkat kemasakan yaitu ditandai dengan adanya kandungan klorofil yang rendah dan pati yang tinggi dengan munculnya warna kuning pada daun. Warna kuning yang muncul pada daun dihasilkan dari karotenoid atas xantofil dan karoten yang mengindikasikan terjadinya penurunan kandungan klorofil (Tirtosastro, 2000). Tembakau yang telah dipanen akan mengalami proses pengolahan menjadi tembakau kering (krosok dan rajangan). Pengolahan tembakau menjadi tembakau kering dapat melalui beberapa proses pengeringan yaitu proses pengeringan dengan aplikasi udara panas matahari (penjemuran) dan panas buatan maupun panas dari alam. Proses pengeringan ini bertujuan untuk menguapkan kandungan air yang terdapat pada daun (Tirtosastro dan Murdiyati, 2011).

Saat ini produksi industri tembakau kering sebagian besar digunakan untuk pembuatan sigaret kretek, sigaret putih, cerutu, tembakau shag, sigaret kelembak menyan, dan hasil pengolahan tembakau lainnya (Tirtosastro dan Murdiyati, 2011).. Jenis – jenis rokok atau sigaret yang diproduksi di Indonesia adalah rokok kretek mesin (SKM), rokok kretek tangan (SKT) dan rokok kretek putih mesin (SPM). Produksi rokok kretek atau sigaret mulai tahun 1995 sampai tahun 2000 dapat mencapai 225.671 juta batang dengan mengalami rata – rata kenaikan sebesar 2,10% dengan 87,42% merupakan produksi rokok nasional. Namun pada produksi rokok putih mengalami penurunan produksi rokok nasional dengan tingkat produksi sebesar 12,57%. Penurunan terjadi karena adanya perubahan selera konsumen rokok yang lebih menyukai rokok kretek dibanding rokok putih (Tirtosastro, 2004).

Selain pemanfaatan tembakau dalam hal produksi rokok atau sigaret, tembakau kering juga dapat dimanfaatkan dalam industri cerutu yang cukup banyak dan keberadaannya sudah sangat lama akan tetapi produksi cerutu lebih kecil dibanding produksi rokok. Pemanfaatan tembakau lainnya yang masih sangat kecil produksinya adalah tembakau shag dan tembakau pipa (Tirtosastro, 2004). Bahan baku tembakau yang berupa daun diolah untuk digunakan dengan

cara dibakar, dihisap dan dihirup atau dikunyah (Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, 2014).

2.1.5 Komponen Kimia Tanaman Tembakau

Tanaman tembakau memiliki 2.500 komponen kimia yang dapat digunakan sebagai bahan baku rokok (Tirtosastro dan Murdiyati, 2010). Namun, komponen tersebut mengalami perubahan setelah dilakukan berbagai macam proses seperti pengasapan turun sebesar 1.100 dan terjadi dekomposisi yang dapat bereaksi dengan komponen lain sehingga terbentuk 4.800 komponen kimia yang baru di dalam asap (Rodgman dan Perfetti, 2006). Selain itu, 2.500 komponen kimia dapat mempengaruhi mutu asap yang terjadi di daun tembakau (Tirtosastro dan Murdiyati, 2010). Kandungan kimia yang berpengaruh terhadap mutu tembakau dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1. Kandungan kimia tembakau bahan rokok

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

Sumber : Tirtosastro dan Murdiyati (2010)

Berdasarkan Tabel 2.1 terdapat kandungan minyak atsiri daun tembakau yang bercampur dengan senyawa aktif tembakau lainnya sebesar 7 – 12%. Dalam hal ini minyak atsiri daun tembakau dalam penelitian Nurnasari dan Subiyakto (2011) menyebutkan bahwa minyak atsiri tembakau jenis Bondowoso berdasarkan analisa GC – MS memiliki 67 senyawa dengan rincian 10 komponen kimia merupakan komponen utama yaitu neofitadiena sebesar 39,89%, solanone 4,88%, norsolanadione 3,32%, megastigmatrienon 3,15%, farnesylactone 2,82%, neril

aseton 2,80%, heksahidrofarnesil aseton 2,69%, 2-buten-1-one,1-(2,6,6-trimetil-1,3-sikloheksadien-1-il) 2,57%, etilbenzena 2,37% dan m-silena 2,32%. Komponen kimia minyak atsiri tersebut berasal dari proses distilasi uap daun tembakau sebanyak 29,743 gram (0,8428%). Selain itu, dalam penelitian tersebut juga ditemukan senyawa eugenol sebesar 1,15% yang dapat bersifat sebagai antiserangga, antijamur dan antiseptik. Beberapa komponen kimia daun tembakau dapat digolongkan dalam Tabel 2.2.

Tabel 2.2. Penggolongan kandungan kimia minyak atsiri daun tembakau

Bondowoso	
Golongan	Kandungan (%)
Monoterpena	0
Nonoterpena teroksigenasi	0
Seskiterpena	0,16
Seskiterpena teroksigenasi	0
Turunan Benzena	11,05
Asam organik	0,45
Ester alifatik	0,83
Ester aromatik	0
Hidrokarbon alifatik	6,02
Senyawa lain – lain	81,49

Sumber : Nurnasari dan Subiyakto (2011)

2.2 Minyak Atsiri

Minyak atsiri merupakan suatu senyawa aromatik yang didapatkan dari beberapa bagian tanaman seperti daun, bunga, batang dan akar (Richards, 1944 dalam Feriyanto *et al.*, 2013). Minyak atsiri memiliki karakteristik tertentu yang berasal dari penyusun komponen volatilnya sesuai dengan tumbuhan yang akan diambil minyak atsirinya (Muchtaridi, 2007). Minyak atsiri merupakan salah satu jenis minyak nabati yang memiliki wujud cairan kental pada suhu ruang namun mudah menguap sehingga memberikan aroma yang khas (Nurnasari dan Subiyakto, 2011). Sumber bahan baku minyak atsiri dapat berasal dari salah satu bagian dari tanaman seperti daun, bunga, biji, kulit biji, batang, akar atau rimpang (Effendi dan Simon, 2014). Beberapa bagian dari tanaman yang menghasilkan minyak atsiri pada umumnya tersusun atas campuran berbagai senyawa yang

cukup rumit, namun sebagian besar termasuk golongan senyawa terpena dan terpenoid yang bersifat larut dalam minyak (lipofil) (Nurnasari dan Subiyakto, 2011). Minyak atsiri dibagi menjadi dua kelompok menurut kemampuan terurainya komponen minyak atsiri yaitu minyak atsiri yang mudah dipisahkan menjadi komponen atau penyusun murninya (minyak serai, daun cengkeh, minyak permen dan minyak terpenin) dan minyak atsiri yang sukar dipisahkan menjadi komponen murninya seperti minyak nilam dan kenanga) (Sastrohamidjojo, 2004 dalam Dewi, 2015). Beberapa komponen dalam minyak atsiri tersebut dapat diketahui dengan menggunakan analisa GC – MS untuk mengetahui komponen atau senyawa yang berada pada minyak atsiri (Cai *et al.*, 2002).

Minyak atsiri memiliki aroma yang khas dan dapat dimanfaatkan menjadi beberapa produk seperti bahan pembuat kosmetik, parfum, antiseptik dan lain – lain (Nurnasari dan Subiyakto, 2011). Selain itu, bau dan aroma dari minyak atsiri tersebut merupakan hasil dari beberapa komponen volatil. Salah satu komponen volatil yang terdapat pada minyak atsiri adalah eugenol dari daun kemangi yang memiliki sifat sebagai antibakteri (Maryati *et al.*, 2007). Komponen volatil lainnya dari minyak atsiri yaitu senyawa fenol contohnya adalah flavonoid. Berdasarkan penelitian sebelumnya menyatakan bahwa flavonoid pada daun tembakau dapat digunakan sebagai senyawa antibakteri (Machado *et al.*, 2010) dan minyak atsiri juga dapat digunakan sebagai antijamur (Agusta, 2000; Palic *et al.*, 2002).

Pemanfaatan minyak atsiri lainnya dalam bidang pertanian yaitu sebagai bahan penarik serangga yang pernah dilakukan dalam mengendalikan lalat buah pada markisa (Mizu – Istianto, 2007). Fungsil lain dari minyak atsiri adalah sebagai obat yang disebabkan adanya bahan aktif seperti bahan anti radang, hepatoprotektor, analgetik, anestetik, antiseptik, psikoaktif (Agusta, 2000).

Minyak atsiri dapat diperoleh dengan cara ekstraksi yang menggunakan pelarut organik dan dapat dipres atau dikempa serta dapat diperoleh secara enzimatik (Dewi, 2015). Pengambilan minyak atsiri dari suatu tanaman dapat dilakukan dengan metode penyulingan (destilasi) (Ella *et al.*, 2013). Prinsip metode destilasi merupakan isolasi atau pemisahan dua atau lebih komponen zat

cair berdasarkan titik didih dan pada metode ini menggunakan air sebagai bahan yang akan didestilasi secara langsung dengan menggunakan air mendidih (Dewi, 2015). Hasil dari metode destilasi akan menghasilkan minyak atsiri dengan tekstur kasar yang mengandung air sehingga diperlukan proses penarikan air dari minyak atsiri agar warna menjadi lebih jernih dan kualitas minyak atsiri meningkat (Dewi, 2015). Cara menjernihkan minyak atsiri dari proses destilasi adalah dengan cara menggunakan Natrium Sulfat (Na_2SO_4) anhidrat yang telah dilakukan pada penelitian Arswendiyumna (2011) bahwa pada penelitian tersebut dihasilkan minyak atsiri dengan kemurnian yang tinggi jika menggunakan Na_2SO_4 anhidrat (Dewi, 2015).

Metode destilasi minyak atsiri terdiri tiga macam yaitu destilasi air, uap – air dan uap. Ketiga metode ini mengambil bahan mentah yang akan diambil minyak atisirinya contoh batang dan daun yang selanjutnya ditambahkan dan dilakukan pemanasan. Cara kerja dari tiga metode destilasi dapat dijelaskan secara detail yaitu.

a. Metode Destilasi Air (*Water Distillation*)

Metode destilasi air memiliki sistem kerja yang menggunakan air mendidih untuk dihubungkan langsung dengan bahan yang akan disuling. Air yang terdapat pada ketel penyulingan akan kontak langsung dengan bahan baku dan membawa minyak atsiri keluar, kemudian baru akan mengalami penguapan secara bersama – sama dengan air setelah proses pemanasan dilakukan. Kandungan minyak atsiri tersebut akan tertinggal dalam air yang mengakibatkan rendemen minyak atsiri menjadi tidak maksimal. Namun, metode destilasi air merupakan metode sederhana dan membutuhkan biaya yang lebih rendah dibandingkan metode destilasi uap (Yulianto *et al.*, 2012).

b. Metode Destilasi Uap (*Steam Distillation*)

Metode destilasi uap merupakan suatu metode yang menggunakan tekanan dan uap panas untuk mengekstraksi bahan. Metode destilasi uap berlangsung cepat dan menggunakan suhu yang sangat tinggi ($>100^\circ\text{C}$) (Mullvaney, 2012). Cara kerja metode destilasi uap yaitu dengan menggunakan uap yang terjadi

dengan cara mengalirkan uap panas pada bahan. Uap panas yang bersentuhan secara langsung dengan bahan akan mengangkut minyak atsiri dalam bahan dan dibawa bersama dengan uap panas yang ditiupkan secara langsung. Prinsip metode ini hampir sama dengan metode kukus namun air tidak diisikan pada ketel penyulingan. Uap panas yang dihasilkan dari boiler akan dialirkan melalui pipa berbentuk melingkar berpori yang berada di bawah bahan dan uap tersebut akan bergerak ke atas tanki atau ketel penyulingan. Faktor – faktor yang mempengaruhi jumlah minyak yang menguap dengan metode destilasi uap adalah besarnya tekanan uap yang digunakan, berat molekul masing – masing komponen dalam minyak dan kecepatan minyak untuk keluar dari bahan (Muyassaroh, 2016).

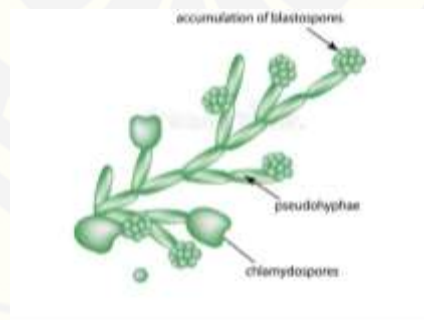
c. Metode Destilasi Uap–Air (*Steam-Hydro Distillation*)

Metode destilasi uap-air dalam proses kerjanya jika dilihat secara teoritis memiliki hubungan erat dengan proses difusi khususnya pada peristiwa osmosis (Jumiarti *et al.*, 2011). Pada metode destilasi uap air bahan yang akan didestilasi akan diletakkan di atas saringan berlubang dan ketel suling di isi dengan air sampai permukaan air berada di bawah saringan. Ciri khas dari metode destilasi uap – air adalah uap selalu dalam keadaan basah, jenuh dan tidak terlalu panas serta bahan yang disuling hanya berhubungan dengan uap dan tidak dengan air panas (Guenther, 1987). Keuntungan penggunaan metode destilasi uap-air adalah akan menghasilkan rendemen yang lebih banyak jika dibandingkan dengan metode uap dan menghambat terjadinya kerusakan mutu minyak. Namun, kelemahan dari metode ini adalah waktu yang dibutuhkan cukup lama untuk menghasilkan mutu minyak yang baik (Habibi *et al.*, 2013).

2.3 *Candida albicans*

Candida merupakan salah satu fungi yang berada pada golongan khamir dengan membentuk sel ragi dan hifa yang semu. Genus *Candida* merupakan salah satu jamur yang termasuk dalam kelas *fungi imperfecti*. *Candida* memiliki jumlah spesies sebesar ± 80 spesies yang hidup dalam berbagai unsur dan organisme yang 17 diantaranya ditemukan pada manusia seperti *Candida albicans* (Komariah dan Sjam, 2012). *Candida albicans* merupakan salah satu bagian dari flora normal yang ada di saluran pencernaan, selaput mukosa saluran pernafasan, vagina, uretra, kulit dan dibawah jari – jari kuku tangan dan kaki (Kayser *et al.*, 2005). Secara morfologi, *Candida albicans* mempunyai bentuk elemen jamur yaitu sel ragi (blastospora/yeast). Sel ragi berbentuk lonjong atau bulat dengan ukuran $2-5 \mu \times 3-6 \mu$ sampai $2-5,5 \mu \times 5-28 \mu$. *Candida albicans* memiliki tunas yang menghasilkan *pseudomycellium* dalam biakan, jaringan dan eksudat serta memiliki ukuran sekitar $2 - 3 \text{ mm} \times 4 - 6 \text{ mm}$ (Mozer, 2015). Ciri *Candida albicans* terdapat pada gambar 2.1. Taksonomi *Candida albicans* menurut C.P. Robin Berkhout 1923 (Komariah dan Sjam, 2012) yaitu.

Kingdom	: <i>Fungi</i>
Phylum	: <i>Ascomycota</i>
Subphylum	: <i>Saccharomycotina</i>
Kelas	: <i>Saccharomycetes</i>
Ordo	: <i>Saccharomycetales</i>
Familia	: <i>Saccharomycetaceae</i>
Genus	: <i>Candida</i>
Spesies	: <i>Candida albicans</i>



Gambar 2.1 Struktur *Candida albicans*

Candida albicans termasuk dalam salah satu jenis spesies jamur patogen dari golongan *ascomycota*. Spesies ini yang menyebabkan infeksi oportunistik atau bisa disebut dengan kandidiasis pada kulit, mukosa dan organ dalam manusia. *Candida albicans* juga dapat menyebabkan keadaan menjadi patogenik jika tubuh mengalami penurunan daya tahan secara lokal maupun sistemik (Brooks *et al.*, 2007). Infeksi jamur *Candida albicans* dapat bersifat sebagai oportunistik bagi tubuh manusia dengan beberapa faktor yang dapat mempengaruhi predisposisi pertumbuhan jamur yaitu pemakaian gigi tiruan, penggunaan antibiotik yang spektrum luas dengan jangka waktu lama, diabetes militus tidak terkontrol, defisiensi (zat besi, vitamin B₁₂ dan asam folat) dan kondisi immunosupresi (Bimbaum dan Dunne, 2010). Penyakit yang disebabkan oleh *Candida albicans* atau yang biasa disebut dengan penyakit kandidiasis khususnya pada bagian oral di Indonesia memiliki prevalensi yang sangat tinggi yaitu sejumlah 7.098 kasus dan 24.482 kasus penderita HIV/AIDS (Kementerian Kesehatan RI, 2013 dalam Permatasari *et al.*, 2016).

Candida albicans dalam perannya sebagai mikroba yang meragikan karbohidrat dikarenakan adanya sifat moloni dan morfologi koloni yang membedakan *Candida albicans* dengan spesies *Candida* yang lain (Jawetz *et al.*, 1986 dalam Mozer, 2015). Hal ini menyebabkan spesies *Candida albicans* dapat tumbuh dengan cepat pada media yang mengandung karbohidrat yang dapat difermentasikan dan sedikit adanya penambahan suasana aerob dengan adanya penambahan nitrogen dengan jumlah lebih pada media. Selain itu, mikroba jenis khamir ini dapat tumbuh pada temperatur dibawah 33°C dengan pH mendekati netral. Suhu pertumbuhan *Candida albicans* yang berada dibawah 33°C dapat menjadikan mikroba ini dapat tumbuh dalam tubuh manusia khususnya pada bagian rongga mulut. Hal ini yang menyebabkan lebih dari 50% atau 80% terjadi infeksi jamur yang terdapat didalam rongga mulut. Selain itu, penyakit infeksi kandidiasis ini juga terjadi pada bagian vagina yang telah diketahui data penyebaran penyakit kandidiasis vaginalis di India mengalami peningkatan yang signifikan dari tahun 2005 hingga 2010 sebesar 83,02% (Dinastutie *et al.*, 2015). Kejadian ini dapat menyebabkan permasalahan penting bagi wanita dikarenakan

penyakit kandidiasi vaginalis dapat mengganggu aktivitas dan jika pertumbuhan jamur ini lebih besar lagi maka ditingkatkan pada tahap keputihan yang dapat menyebabkan kanker bahkan kemandulan pada organ reproduksi wanita (Clayton, 1995 dalam Widyaningrum dan Try, 2015).

Berbagai macam kemunculan penyakit yang terjadi di daerah oral dan bagian organ reproduksi wanita yang disebabkan oleh *Candida albicans* diperlukan adanya pengobatan yang dapat menurunkan prevalensi penyakit infeksi jamur seperti nystatin dan ketokonazol (Dinastutie *et al.*, 2015). Selain itu, pada bidang kedokteran gigi, terdapat senyawa yang dapat mengobati kandidiasis oral yang terdapat dalam obat kumur antiseptik yaitu *chlorhexidine gluconate* sebesar 0,2%. Senyawa – senyawa tersebut jika dikonsumsi dalam jangka waktu yang lama dapat menimbulkan efek samping (Permatasari *et al.*, 2016). Hal ini yang menyebabkan dibutuhkan senyawa alternatif yang lebih aman dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* seperti flavonoid, tanin dan polifenol yang terdapat dalam buah anggur merah (Tilong, 2012). Selain itu, dalam beberapa studi penelitian melaporkan bahwa kandungan ekstrak minyak zaitun seperti oleuropein dan *hydroxytyrosol* dapat bersifat sebagai antimikroba dan antioksidan (Zoric *et al.*, 2016).

2.4 Antimikroba

2.4.1 Senyawa dan Mekanisme Kerja Antimikroba

Senyawa antimikroba yang terdapat dalam suatu bahan memiliki mekanisme kerja antimikroba terhadap mikroba yang dihambat pertumbuhannya. Secara umum, mekanisme kerja antimikroba khususnya dalam menghambat pertumbuhan fungi patogen dapat melalui beberapa cara yaitu menghambat sintesis dinding sel fungi, mengganggu membran sel fungi, menginaktivasi enzim – enzim metabolik dan menghambat sintesis asam (Lestari, 2013). Beberapa senyawa antimikroba yang dapat berasal dari beberapa tanaman yang memiliki senyawa aktif. Aktivitas antimikroba khususnya antifungi suatu senyawa dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kandungan senyawa antifungi, daya difusi, jenis fungi yang dihambat dan konsentrasi ekstrak (Jawetz *et al.*, 1996

dalam Andayani *et al*, 2014). Beberapa senyawa aktif yang dapat dijadikan sebagai antimikroba beserta mekanisme kerja senyawa tersebut dalam penelitian Lestari (2013) adalah

1. Flavonoid

Senyawa ini dapat menghambat pertumbuhan mikroba dengan adanya kemampuan flavonoid dalam berikatan dengan enzim ekstraseluler dan protein terlarut (Al-bayati dan Al-Mola, 2008) dan mampu merusak membran sel fungi. Rusaknya membran sel fungi dapat mempengaruhi proses pertumbuhan fungi karena membran sel merupakan tempat terjadinya reaksi enzimatik sel.

2. Alkaloid

Aktivitas alkaloid sebagai senyawa antimikroba khususnya antifungi dengan cara menyisip di antara dinding sel atau DNA kemudian mencegah terjadinya replikasi DNA fungi sehingga dapat mengganggu pertumbuhan fungi (Lestari, 2013).

3. Terpenoid

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. Mekanisme kerja terpenoid dalam menghambat pertumbuhan mikroba dapat disebabkan oleh terpenoid sebagai pelarut yang mampu memasukkan metabolit sekunder lainnya ke dalam membran dan mengakibatkan perubahan permeabilitas membran atau gangguan permeabilitas (Haraguchi *et al*, 1999; Gershenzon dan Dudareva, 2007). Salah satu senyawa terpenoid adalah neofitadiena, *phytol* dan *tetracosahexaene*.

4. Asam lemak organik

Asam lemak organik memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan fungi dengan cara menyisip diantara membran sel fungi, meningkatkan permeabilitas membran dan dapat merusak sitoplasma. Asam lemak organik juga dapat menghambat morfogenesis fungi dan mencegah pembentukan

hifa (Tyler dan B. Richard, 2001; Mclain *et al*, 2000). Salah satu contoh asam lemak organik yaitu *hexadecanoic acid*.

2.4.2 Pengujian Antimikroba

Antimikroba merupakan suatu zat yang bersifat toksik bagi mikroba sehingga dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain (Farter, 2009). Pengujian antimikroba merupakan suatu sistem atau cara pengobatan yang efektif dan efisien (Mozer, 2015). Pengujian aktivitas antimikroba dapat dilakukan dengan tiga macam metode yaitu.

a. Metode Difusi

Metode difusi adalah metode yang menggunakan pengujian dengan difusi cakram dan banyak dipengaruhi oleh faktor fisik dan kimia seperti sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekuler dan stabilitas obat (Jawetz *et al.*, 2007). Menurut Ratnasari (2009) menyatakan bahwa metode difusi dibagi menjadi tiga cara yaitu metode silinder gelas, metode kertas cakram *disk diffusion*, dan metode cetak lubang (metode sumur). Ketiga metode tersebut yang sering digunakan adalah metode difusi dengan uji cakram. Cara kerja uji cakram yaitu dengan menggunakan kertas cakram filter yang berisi sejumlah senyawa antimikroba tertentu untuk ditempatkan di atas medium padat yang telah diinokulasi pada permukaan dengan organisme yang akan diujikan. Hasil dari inkubasi kertas cakram tersebut akan dilihat diukur diameter zona jernih inhibisi disekitar cakram sebagai ukuran kekuatan inhibisi senyawa antimikroba dalam menghambat organisme uji tertentu (Nuraina, 2015). Selain itu, pada metode difusi padat juga terdapat uji sumuran dengan menggunakan cawan petri yang ditanami dengan organisme uji pada medium agar. Permukaan medium tersebut dibuat lubang dengan bantuan silinder gelas. Lubang yang terbentuk pada medium agar akan diisi dengan senyawa antimikroba untuk selanjutnya dilakukan inkubasi. Hasil dari inkubasi adalah jika ada potensi antimikroba maka disekitar lubang pada medium agar akan terlihat zona penghambatan pertumbuhan organisme yang diuji. Diameter zona hambat di sekitar lubang diukur sebagai nilai dari potensi ada atau tidaknya senyawa antimikroba (Rahayu dan Tuti, 2009). Selain itu, terdapat

faktor yang dapat mempengaruhi metode difusi yaitu faktor fisik dan kimia maupun faktor lain seperti sifat medium, kemampuan difusi, ukuran molekuler dan stabilitas senyawa antimikroba/antibiotik (Jawetz *et al.*, 2007 dalam Nuraina, 2015).

b. Metode Dilusi

Metode dilusi merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengetahui potensi suatu senyawa terhadap aktifitas mikrobial dengan menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) (Lennette *et al.*, 1991 dalam Fatisa, 2013). Metode ini menggunakan teknik pengenceran untuk mendapatkan sejumlah zat antimikroba yang dimasukkan ke dalam medium bakteriologi padat maupun cair (Nuraina, 2015). Keuntungan dari metode ini adalah dapat menyajikan data yang hasilnya kuantitatif sehingga menunjukkan jumlah zat antimikroba tertentu yang diperlukan untuk menghambat mikroorganisme yang diuji (Jawetz *et al.*, 2007). Metode ini dibagi menjadi tiga cara yaitu cara penapisan lempeng agar, cara pengenceran tabung, Turbidimetri (Ratnasari, 2009). Cara mendapatkan data dari metode dilusi dapat ditentukan dengan menghitung nilai absorbansi setelah perlakuan inkubasi dikurangi absorbansi sebelum perlakuan inkubasi untuk menentukan nilai KHM. Apabila terdapat konsentrasi terendah dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan ($OD \text{ bakteri} \leq 0$) maka didapatkan KHM atau MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*). Berbeda dalam menentukan nilai KBM, penentuan dilakukan dengan uji lanjutan yakni dengan cara mengambil beberapa ml dari suspensi untuk ditambahkan dalam media baik padat maupun cair dan kemudian diinkubasi selama 12 – 18 jam pada suhu 37°C dalam inkubator. Hasil perhitungan dapat ditentukan menurut bentuk media uji yang digunakan seperti pada media cair maka penghitungan nilai KBM dapat ditentukan dengan menggunakan pengukuran absorbansi (OD) dengan Spektrofotometer UV – Vis ($\lambda = 480 \text{ nm}$). Hasil pengukuran ditunjukkan dengan adanya konsentrasi terendah ekstrak mempunyai $OD = 0$ (tidak ada kekeruhan) maka didapatkan KBM atau MBC (*Minimum Bacteridal Concentration*) (Lennette *et al.*, 1991 dalam Fatisa, 2013).

c. Metode Bioautografi

Metode bioautografi merupakan metode yang digunakan untuk mendeteksi adanya suatu senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan cara melokalisasi aktivitas antimikroba pada suatu kromatogram (Nuraian, 2015). Prosedur yang digunakan pada metode ini didasarkan pada teknik difusi agar yang didalamnya terdapat senyawa antimikroba yang akan diuji untuk dipindahkan dari lapisan KLT ke medium agar yang telah diinokulasikan secara merata pada bakteri uji yang peka (Nuraina, 2015). Selain itu, bioautografi dibagi menjadi tiga kelompok yaitu bioautografi langsung, kontak dan pencelupan (Nuraina, 2015).

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian dan Laboratorium Rekayasa Pangan dan Hasil Pertanian pada Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember serta Laboratorium Biosains - Politeknik Negeri Jember untuk mengetahui komponen kimia minyak atsiri daun tembakau Kasturi. Waktu penelitian dimulai pada bulan Oktober 2017 sampai Maret 2018.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan untuk proses pembuatan minyak atsiri daun tembakau adalah timbangan, pisau dan destilator. Alat yang digunakan dalam pengujian antifungi minyak atsiri daun tembakau adalah inkubator (Haraeus Inst B6200), autoklaf (Hirayama HL 36, Jepang), *laminar air flow* (Crumair, Spanyol), *colony counter* (Stuart Scientific), pipet mikro (Biohit 12636255, Jerman), cawan petri diameter 10 cm dan 5 cm, bunsen, penangas listrik, jarum ose, erlenmeyer, tabung reaksi, beaker glass, spektrofotometer UV-Vis ($\lambda = 530$ nm) dan analisa GC-MS.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan utama penelitian yang digunakan adalah daun tembakau yang didapatkan di sekitar area perkebunan tembakau daerah Jember khususnya daerah Kalisat dengan jenis *Nicotiana tabacum* L. atau daun tembakau Kasturi dan kultur fungi *Candida albicans* ATCC-10231 yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquades untuk proses destilasi dan tween 20 pembentukan konsentrasi minyak atsiri daun tembakau, sedangkan untuk proses pengujian antifungi minyak atsiri daun tembakau menggunakan media SDA (*Sabouround's Dextrose Agar*), larutan NaCl 0,9% sebagai larutan fisiologis, aquades sebagai pelarut, ketokonazol 1 mg/ml sebagai kontrol positif, BaCl₂ dan H₂SO₄ untuk pembuatan larutan Mc Farland 0,5.

3.3 Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Rancangan Percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan dengan menggunakan satu sampel dengan satu faktor yaitu konsentrasi minyak atsiri daun tembakau. Sampel dilakukan dua kali pengulangan dengan jumlah perlakuan sebanyak tujuh macam perlakuan konsentrasi dan menggunakan data RAL (Rancangan Acak Lengkap). Perlakuan konsentrasi difusi padat yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.1 dengan menggunakan larutan minyak atsiri daun tembakau Kasturi pada berbagai macam konsentrasi dan terdapat adanya campuran aquades dan tween 20 sebesar 0,05% untuk mencampurkan minyak atsiri daun tembakau dalam larutan tersebut.

Tabel 3.1 Rancangan pengujian minyak atsiri daun tembakau untuk pengujian difusi padat metode disk

Sampel	Perlakuan		
	Aquades (μ l)	Minyak Atsiri (μ l)	Tween 20 (%)
K-	1000	0	
A1 (2%)	980	20	
A2 (6%)	940	60	0,05
A3 (18%)	820	180	
A4 (36%)	640	360	
A5 (72%)	280	720	

Konsentrasi minyak atsiri daun tembakau yang digunakan pada pengujian difusi padat berbeda dengan konsentrasi pada dilusi padat. Minyak atsiri yang digunakan pada pengujian dilusi padat tidak dilakukan pengenceran terlebih dahulu. Namun, minyak atsiri daun tembakau Kasturi tersebut akan kontak langsung dengan campuran media, suspensi mikroba dan tween 20 dengan tujuh macam konsentrasi yang telah ditentukan. Konsentrasi minyak atsiri Kasturi yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Rancangan pengujian minyak atsiri daun tembakau untuk pengujian dilusi padat

Sampel (MA)	Perlakuan (T)	
	24 Jam	48 Jam
K-	A ₀ T ₁	A ₀ T ₂
0,24%	A ₁ T ₁	A ₁ T ₂
0,4%	A ₂ T ₁	A ₂ T ₂
0,8%	A ₃ T ₁	A ₃ T ₂
1,6%	A ₄ T ₁	A ₄ T ₂
2,4%	A ₅ T ₁	A ₅ T ₂
3,0%	A ₆ T ₁	A ₆ T ₂

3.3.2 Rancangan Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan dalam mengekstrak minyak atsiri daun tembakau Kasturi dilakukan melalui 6 tahap penelitian. Tahapan pertama dalam melaksanakan penelitian ini adalah dengan cara melakukan pengambilan daun tembakau Kasturi afkir dalam kondisi segar sebesar 16 kg. selanjutnya dilakukan pengeringan dengan menggunakan metode *sun drying* selama 7 hari untuk menguapkan kandungan air yang terdapat di dalam daun tembakau segar. Setelah 7 hari pengeringan dengan berubahnya daun tembakau segar menjadi coklat maka dilakukan penimbangan dan pengecilan ukuran untuk dapat memudahkan proses destilasi. Jumlah daun tembakau Kasturi kering yang telah didapatkan sebesar 3950 gram akan di destilasi dengan metode uap-air selama 6 – 7 jam. Hasil dari destilasi berupa minyak atsiri daun tembakau yang telah dipisahkan dengan air destilat. Minyak atsiri daun tembakau Kasturi tersebut dapat diuji sifat fisik (rendemen dan berat jenis), komponen kimia (GC-MS) dan antimikroba secara kualitatif (difusi padat) dan kuantitatif (dilusi padat). Diagram alir tahapan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram alir tahapan penelitian aktivitas antimikroba minyak atsiri daun tembakau Kasturi terhadap *Candida albicans*

3.3.3 Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Minyak Atsiri Daun Tembakau yang telah dimofidikasi (Nurnasari dan Subiyakto, 2011)

Pembuatan minyak atsiri daun tembakau menggunakan metode destilasi uap-air. Metode destilasi uap-air dilakukan dengan menambahkan 3.950 gram daun tembakau afkir yang telah dikeringkan selama 7 hari. Kemudian daun tembakau afkir yang telah kering dilakukan pemotongan menjadi beberapa bagian untuk memperkecil ukuran dan memudahkan proses destilasi. Hasil potongan daun tembakau afkir selanjutnya dimasukkan kedalam tanki destilasi pada salah satu rak yang sebelumnya di bagian bawah rak telah ditambahkan air sebesar 4 Liter untuk proses distilasi minyak atsiri daun tembakau. Setelah itu dilakukan pemanasan untuk memulai proses destilasi uap selama 4 – 6 jam untuk mendapatkan minyak atsiri daun tembakau. Hasil dari proses destilasi minyak atsiri daun tembakau dilakukan pengukuran total volume minyak atsiri yang didapatkan dan ditimbang dengan dimasukkan ke dalam botol timbang untuk dilakukan penimbangan berat minyak atsiri dan diketahui rendemen minyak atsiri daun tembakau. Selanjutnya botol timbang yang berisi minyak atsiri ditutup rapat dan dilapisi dengan aluminium foil kemudian disimpan didalam lemari pendingin agar tidak terjadi kerusakan.

2. Pembuatan Konsentrasi Minyak Atsiri Daun Tembakau

Konsentrasi minyak atsiri daun tembakau yang digunakan pada penelitian terdiri dari dua macam yang digunakan dalam dua macam pegujian yaitu sebesar 2; 6; 18; 36 dan 72% untuk pegujian difusi padat dan 0,24; 0,4; 0,8; 1,6; 2,4 dan 3,0% untuk pegujian dilusi padat. Pembuatan konsentrasi pada pegujian difusi padat dilakukan dengan cara pembuatan larutan stok minyak atsiri daun tembakau pada konsentrasi tertinggi yaitu 72%. Pembuatan larutan stok dilakukan dengan cara menambahkan pelarut aquades dan 0,05% tween 20 digunakan untuk melarutkan minyak atsiri daun tembakau konsentrasi 100%. Sedangkan pembuatan konsentrasi pada pegujian KHM dan KBM metode dilusi padat dilakukan dengan cara mengambil minyak atsiri daun tembakau 100% yang disesuaikan dengan konsentrasi pegujian dan dicampurkan dengan tween 20

konsentrasi 0,05% (Nabigol dan Hosein, 2011) pada media sebagai pelarut antara minyak atsiri dengan campuran media pada cawan petri. Pembuatan konsentrasi minyak atsiri daun tembakau pada dua macam pengujian digunakan rumus pengenceran yaitu.

$$M_1V_1=M_2V_2$$

Konsentrasi minyak atsiri daun tembakau pada pengujian difusi padat metode cakram disk didapatkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Andayani *et al* (2014) bahwa konsentrasi minyak atsiri lengkuas putih pada pengujian antimikroba terhadap *Candida albicans* menyatakan bahwa dengan konsentrasi 100; 50; 25 dan 12,5% dapat menghambat pertumbuhan dan konsentrasi 6,25% tidak dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans*. Berdasarkan konsentasi tersebut dilakukan uji pendahuluan dengan dasar bahwa jenis minyak atsiri yang digunakan berbeda. Oleh karena itu, digunakan tingkat konsentrasi pengenceran sebesar 2; 6; 18; 36 dan 72% untuk mengetahui tingkat minimum dan maksimum konsentrasi minyak atsiri daun tembakau yang dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans* secara kualitatif melalui pembentukan zona hambat disekitar disk. Hasil yang didapat pada konsentrasi minyak atsiri daun tembakau untuk pengujian difusi padat metode cakram *disk* yang terkecil berada pada konsentrasi 2% dan tertinggi pada konsentrasi 72%.

Pada pengujian yang kedua yaitu secara kuantitatif, konsentrasi yang digunakan pada pengujian KHM dan KBM metode dilusi padat didapatkan dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Griffin dan Julie (2000) bahwa konsentrasi yang digunakan dalam media pada pengujian *Candida albicans* sebesar 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 1,0; dan 2,0%. Hasil dari penelitian tersebut diambil beberapa konsentrasi untuk dilakukan uji pendahuluan dengan konsentrasi sebesar 0,4; 0,8 dan 1,6%. Berdasarkan uji pendahuluan tersebut, pada konsentrasi 0,4% telah menghambat pertumbuhan *Candida albicans* sehingga dilakukan konsentrasi minimum sebesar 0,24% dan 3,0% sebagai konsentrasi maksimum yang dilakukan untuk pengujian KHM dan KBM metode dilusi padat. Oleh karena itu pada pengujian KHM metode dilusi padat digunakan konsentrasi 0; 0,24; 0,4; 0,8; 1,6; 2,4 dan 3,0%.

3. Pembuatan Kultur Media

Media yang digunakan untuk pertumbuhan *Candida albicans* maka diperlukan media kultur *Sabouround's Dextrose Agar* (SDA) dengan cara memanaskan 100 ml aquades didalam erlenmeyer untuk 6,5 gram bubuk SDA. Kemudian aquades yang telah panas ditambahkan bubuk SDA dan dilakukan pengadukan. Media yang telah dibuat disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit dan dibiarkan pada suhu 45°C.

4. Pembuatan Larutan Fisiologis NaCl 0,9% (Berlian, 2016)

Larutan fisiologis NaCl digunakan sebagai larutan untuk pengenceran mikroba *Candida albicans* dalam pengujian aktivitas antimikroba minyak atsiri daun tembakau. Konsentrasi larutan fisiologis NaCl yang digunakan sebesar 0,9%. Pembuatan larutan fisiologis dilakukan dengan cara penimbangan padatan NaCl sebesar 2,25 gram. Padatan NaCl yang telah ditimbang, dilarutkan ke dalam 250 ml aquades sehingga didapatkan konsentrasi NaCl sebesar 0,9%. Setelah didapatkan konsentrasi NaCl sebesar 0,9% maka larutan tersebut dilakukan pengukuran volume sebesar 9 ml untuk digunakan sebagai larutan pengencer dalam metode pengenceran mikroba dan 10 ml untuk suspense mikroba dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Larutan NaCl yang telah berada pada tabung reaksi dan akan digunakan untuk pengujian dilakukan sterilisasi dengan suhu 121°C selama 15 menit.

5. Pembuatan Larutan Mc Farland 0,5 (Biesher, 1983).

Larutan Mc Farland 0,5 digunakan sebagai standarisasi suspense mikroba yang akan dibuat untuk diketahui jumlah mikroba dalam suspense mikroba. Nilai Mc Farland 0,5 menyatakan bahwa jumlah mikroba sebanding dengan 3×10^8 atau 10^8 . Pembuatan larutan Mc Farland 0,5 menggunakan dua jenis larutan yaitu larutan BaCl₂ 1,175% dan H₂SO₄ 1%. Larutan BaCl₂ 1,175% dibuat dari 0,118 gram padatan BaCl₂ yang akan dilarutkan dalam 1 ml aquades steril sehingga didapatkan BaCl₂ 1,175%. Larutan H₂SO₄ 1% dibuat dari 0,01 H₂SO₄ pekat yang ditera menggunakan labu ukur dengan menambahkan aquades steril sampai

volume 10 ml. Selanjutnya kedua larutan tersebut dicampur dengan mengambil 0,05 ml BaCl₂ 1,175% dan 9,95 ml H₂SO₄ 1%. Kemudian dilakukan pengadukan dengan menggunakan vortex agar kedua larutan tersebut tercampur. Hasil pencampuran kedua jenis larutan yang telah dimasukkan ke dalam tabung reaksi, tabung reaksi tersebut dilakukan penutupan dengan aluminium foil dan penyimpanan di suhu ruang pada tempat gelap dengan tujuan untuk menghindari kerusakan pada larutan Mc Farland 0,5 yang telah dibuat.

6. Pembuatan Suspensi Fungi *Candida albicans* (WHO, 2009 dalam Yanti *et al.*, 2016).

Kultur *Candida albicans* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan telah dibiakkan selama 24 jam akan akan diambil 1 ose untuk dimasukkan ke dalam media larutan fisiologis NaCl 0,9% dengan volume 10 mL. Inokulum *Candida albicans* yang telah diencerkan dalam larutan fisiologis akan dilakukan pengecekan dengan tingkat kekeruhan larutan menurut standar McFarland 0,5 sebesar 10⁸CFU/ml dengan nilai absorbansi sebesar 0,05 untuk dilakukan pengujian antifungi.

7. Pengujian Antimikroba Minyak Atsiri Daun Tembakau Metode Difusi Padat (Cakram Disk) yang telah dimodifikasi (Alim *et al.*, 2009).

Pengujian aktivitas antifungi minyak atsiri daun tembakau terhadap *Candida albicans* dilakukan dengan metode cakram disk dengan cara pemberian kertas cakram berdiameter 6 mm yang telah diberikan konsentrasi minyak atsiri daun tembakau yaitu 0; 2; 6; 8; 16; 36; 72% dan diletakkan pada permukaan media yang telah diberi suspensi *Candida albicans* dengan teknik agar sebar. Setelah kertas cakram ditempel pada permukaan media maka dilakukan inkubasi selama 24 jam untuk mengetahui adanya potensi antifungi pada minyak atsiri daun tembakau. Jika potensi antifungi ada pada medium tersebut, maka di sekitar area cakram disk terdapat zona penghambatan pertumbuhan fungi. Daya hambat zona pertumbuhan tersebut dapat diketahui dengan cara mengukur zona hambat yang berada disekitar kertas cakram.

8. Pengenceran Bertingkat *Candida albicans* yang telah dimodifikasi (Desmara, 2017)

Metode pengenceran bertingkat pada mikroba *Candida albicans* dilakukan untuk mengetahui jumlah mikroba yang terdapat pada masing – masing tingkat pengenceran yaitu 10^{-1} sampai 10^{-7} . Metode pengenceran menggunakan larutan fisiologis NaCl konsentrasi 0,9% sebagai media pelarut pada masing – masing tingkat pengenceran dan media SDA sebagai media pertumbuhan mikroba. Mikroba yang akan digunakan dalam metode pengenceran bertingkat adalah *Candida albicans* yang telah dibuat suspensinya dengan cara memasukkan 1 ose mikroba ke dalam 10 ml larutan NaCl 0,9% dan sebanding dengan 3×10^8 CFU/ml. Suspensi mikroba *Candida albicans* diambil 1 ml untuk dimasukkan ke dalam 9 ml larutan NaCl 0,9% dan dilakukan pencampuran dengan vortex sehingga didapatkan tingkat pengenceran 10^{-1} . Pengambilan 1 ml untuk dimasukkan ke dalam tingkat pengenceran selanjutnya berlaku hingga mencapai tingkat pengenceran 10^{-7} dan selanjutnya dilakukan pencampuran pada masing – masing tingkat pengenceran dengan menggunakan vortex. Kemudian masing – masing dari tingkat pengenceran tersebut diambil 0,1 ml untuk dimasukkan ke dalam cawan petri. Cawan petri yang telah berisi suspense mikroba dari masing – masing tingkat pengenceran akan ditambahkan media SDA steril sebesar 4 ml dan didiamkan hingga media memadat. Selanjutnya masing – masing cawan petri yang telah berisi media dan mikroba dimasukkan ke dalam inkubator suhu 37°C untuk ditumbuhkan mikroba *Candida albicans* sehingga dapat diketahui total mikroba yang terdapat pada masing – masing tingkat pengenceran. Jumlah total mikroba yang dapat digunakan dalam pengujian antimikroba minyak atsiri daun tembakau jika mikroba tersebut berada pada skala 30 – 300 koloni.

9. Pengujian Antimikroba Minyak Atsiri Daun Tembakau Metode Dilusi Padat yang telah dimodifikasi (Desmara *et al.*, 2017).

Penentuan nilai KHM dan KBM suatu mikroba dapat dihitung melalui metode dilusi. Salah satu metode dilusi yang dilakukan pada penelitian ini adalah metode dilusi padat. Pengujian antimikroba minyak atsiri daun tembakau dengan metode dilusi padat dilakukan dengan membuat berbagai variasi konsentrasi pengujian minyak atsiri daun tembakau. Konsentrasi pengujian minyak atsiri daun tembakau yang dilakukan terdiri dari tujuh konsentrasi yaitu 0; 0,24; 0,4; 0,8; 1,6;

2,4 dan 3,0%. Selain itu, pada pengujian antimikroba dengan metode dilusi padat digunakan ketokonazol sebagai kontrol positif dan merupakan salah satu antibiotik terhadap penghambatan pertumbuhan *Candida albicans*. Penggunaan 7 perlakuan konsentrasi tersebut dilakukan dengan cara mencampurkan larutan aquades dengan tween 20 0,05% sebagai kontrol negatif dimasukkan ke dalam media SDA 4 ml yang telah disterilkan dengan cara sterilisasi suhu 121°C selama 15 menit. Metode ini juga dilakukan pada 6 perlakuan konsentrasi yang menggunakan minyak atsiri daun tembakau 100% dengan tween 20 0,05% dimasukkan ke dalam 4 ml media SDA steril yang masih dalam keadaan cair. Setelah dimasukkan bahan uji ke dalam media, media yang berisi bahan uji dilakukan homogenisasi dengan menggunakan *vortex* untuk melarutkan bahan uji di dalam media SDA. Media SDA yang telah homogen dengan bahan uji dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi 100 µl suspensi mikroba dengan tingkat pengenceran sebesar 10^{-3} . Media dan bahan uji yang telah dituangkan ke dalam cawan petri selanjutnya didiamkan untuk memadatkan media yang berada pada cawan petri. Cawan petri yang telah berisi media, suspensi mikroba dan bahan uji yang telah padat selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 dan 48 jam untuk mengetahui jumlah mikroba yang tumbuh dengan perbedaan 2 waktu pertumbuhan. Setelah mencapai 2 perlakuan waktu yang diuji kemudian dilakukan penghitungan total mikroba dengan *colony counter*. Total mikroba yang telah diketahui, diolah dengan menggunakan grafik persentase penghambatan dan jumlah log koloni untuk menentukan nilai KHM pada *Candida albicans*.

3.4 Prosedur Analisis

3.4.1 Analisis Kadar Air Daun Tembakau (AOAC, 1995)

Kadar air daun tembakau dapat diketahui dengan cara menimbang sebanyak 2 gram bahan yang akan diuji dalam botol timbang yang telah dikeringkan sebelumnya dan diketahui bobotnya. Botol timbang yang berisi bahan sebanyak 2 gram dilakukan pengeringan dalam oven dengan suhu 105 – 110°C selama tiga jam. Setelah tiga jam, botol timbang dan bahan dimasukan ke dalam desikator

untuk mengurangi sisa kandungan air yang berada pada permukaan botol selama 15 menit dan dilakukan penimbangan. Pengeringan dilanjutkan kembali dan setiap setengah jam didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot yang konstan. Penghitungan kadar air dapat dihitung melalui rumus.

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{bobot awal} - \text{bobot konstan}}{\text{bobot awal}} \times 100\%$$

3.4.2 Analisis Rendemen Minyak Atsiri Daun Tembakau (Widiyanto dan Mohamad, 2013)

Rendemen minyak atsiri didapatkan melalui proses destilasi atau penyulingan yang dilakukan selama 5 – 7 jam. Rendemen dapat menunjukkan banyaknya jumlah minyak yang dihasilkan dari penyulingan daun tembakau dalam jumlah besar dan dinyatakan dalam persentase (%). Penghitungan rendemen minyak atsiri dapat dihitung melalui rumus.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat minyak atsiri daun tembakau (output)}}{\text{berat daun tembakau segar (input)}} \times 100\%$$

3.4.3 Analisis Berat Jenis Minyak Atsiri Daun Tembakau (SNI 06-2387-2006)

Berat jenis merupakan perbandingan antara berat minyak dengan berat air pada volume dan suhu yang sama. Penghitungan berat jenis dapat diketahui melalui rumus.

$$\text{Bobot jenis} = \frac{m_2 - m}{m_1 - m}$$

dengan :

m adalah massa, tabung kosong (g)

m₁ adalah massa, tabung berisi air pada 20°C

m₂ adalah massa, tabung berisi contoh pada 20 °C

3.4.4 Komponen Minyak Atsiri Daun Tembakau (Nurhaen, 2016)

Pengamatan komponen minyak atsiri daun tembakau perlu dilakukan untuk mengetahui komponen – komponen yang terkandung dalam minyak atsiri daun

tembakau. Komponen minyak atsiri daun tembakau dapat dilakukan dengan menggunakan analisa GC–MS (*Gas Chromatography Mass Spectrofotometer*).

Analisis komponen kimia minyak atsiri daun tembakau menggunakan GC – MS yang dioperasikan pada suhu sebesar 60°C selama 4 menit dan dilakukan kenaikan suhu menjadi 120°C dan terjadi kenaikan suhu 2°C setiap menitnya. Selama 5 menit suhu 120°C dipertahankan kemudian dilanjutkan dengan terjadinya kenaikan suhu sebesar 50°C per menit sampai suhu akhir sebesar 290°C dan dipertahankan selama 10 menit. Kemudian laju aliran gas total yang digunakan sebesar 50 ml/menit dengan plit ratio 1 : 30 dan suhu injektor 300°C dengan jumlah sampel yang di ambil dengan cara penyuntikkan ke injektor sebesar 0,1 µl. Energi yang digunakan pada GC – MS merupakan energi elektron sebesar 70 eV dengan *accelerating voltage* yaitu 1,30 kV. *Mass range* yang dideteksi pada analisis GC – MS berada pada nilai 40 – 400 µg/mol dengan *interval scanning* sebesar 1 detik.

3.4.5 Pengukuran Zona Hambat

Zona hambat dari hasil pengujian antifungi minyak atsiri daun tembakau dapat diketahui melalui pengukuran daerah hambat dari pertumbuhan *Candida albicans* di sekitar lubang pada permukaan medium agar. Pengukuran zona hambat dilakukan sebanyak 3 kali pada sisi horizontal, vertikal dan diagonal kemudian dilakukan penjumlahan dan dirata – rata (Hartono *et al.*, 2012 dalam Berlian *et al.*, 2016). Diameter zona hambat dapat diperoleh dengan cara mengurangi zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram dengan diameter kertas cakram yang mengandung bahan uji (Berlian *et al.*, 2016). Diameter yang didapatkan merupakan luas zona hambat yang telah terbentuk. Luas zona hambat yang telah diukur, dimasukkan ke dalam 4 tahap kriteria yang mengacu pada ketentuan Davis dan Stout (1971) yaitu.

- a. Diameter zona hambat 5 mm atau kurang dikategorikan lemah
- b. Diameter zona hambat 5 – 10 mm dikategorikan sedang
- c. Diameter zona hambat 10 – 20 mm dikategorikan kuat
- d. Zona hambat 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat

3.4.6 Pengukuran Nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) (Nabigol dan Hosein, 2011).

Nilai KHM (konsentrasi hambat minimum) dapat ditentukan dengan metode dilusi padat. Nilai KHM ditentukan melalui rata – rata pertumbuhan selama 24 jam dan 48 jam. Hasil yang diperoleh akan digunakan untuk menentukan konsentrasi hambatan minimum (KHM) atau MIC (*minimum inhibitory centration*) dengan cara menghitung rata – rata jumlah koloni yang terdapat pada tingkat pengenceran 10^{-3} dengan menggunakan satuan CFU/ml. Kemudian ditentukan persentase penghambatan dari pertumbuhan koloni *Candida albicans* agar dapat menentukan nilai probit yang disesuaikan dengan tabel probit pada setiap persentase penghambatan yang telah diketahui. Nilai probit dari setiap perlakuan konsentrasi akan dibuat kurva grafik linier yang menghubungkan antara nilai probit dan log konsentrasi perlakuan untuk diketahui persamaan linier kurva grafik pertumbuhan mikroba dalam menentukan nilai IC50. Nilai IC50 dihitung dari data yang diperoleh melalui analisis probit. Nilai IC50 akan menunjukkan tingkat minimum konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba sebesar 50% pada pengujian dilusi padat.

3.5 Analisis Data

Data hasil pengujian difusi dan dilusi padat yang telah didapatkan akan diolah secara ANOVA. Jika terdapat perbedaan, maka akan dilanjutkan dengan uji Duncan's Multiple Range Test (DNMRT) dengan menggunakan aplikasi SPSS 15.0 *for windows evaluation* untuk mengetahui tingkat perbedaan dari beberapa perlakuan pada taraf uji $\leq 5\%$. Penyajian data akan disusun dalam bentuk tabel dan dimuat dalam bentuk grafik selanjutnya diinterpretasikan dalam kalimat sesuai dengan pengamatan yang telah ada.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan analisa dan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa

1. Minyak atsiri daun tembakau Kasturi memiliki rendemen sebesar 0,026% yang berasal dari 3950 gram daun tembakau kering sedangkan kadar air daun tembakau segar sebesar 79,67% dan berat jenis minyak atsiri daun tembakau sebesar 0,933 g/ml
2. Minyak atsiri daun tembakau Kasturi memiliki 39 jenis komponen kimia dengan 16 senyawa merupakan komponen utama salah satunya yaitu neofitafiena sebesar 13,19% dan 17-*Octadecanoic acid*, methyl ester (CAS) sebesar 18,67%.
3. Daya hambat minyak atsiri daun tembakau secara kualitatif terdapat pada konsentrasi 72% dengan diameter hambatan sebesar 10,333 mm dan nilai konsentrasi hambat minimum dengan menggunakan nilai IC50 sebesar 3,67 mg/ml untuk waktu pertumbuhan 24 jam dan konsentrasi 11,79 mg/ml pada waktu pertumbuhan 48 jam.

5.2 Saran

Penggunaan minyak atsiri daun tembakau Kasturi sebagai senyawa antimikroba masih diperlukan penelitian lanjutan mengenai aplikasi dari minyak atsiri daun tembakau Kasturi. Selain itu, minyak atsiri juga perlu dilakukan uji lebih lanjut mengenai sifat fisik dan kimia minyak atsiri daun tembakau Kasturi agar dapat diketahui karakteristik dari minyak atsiri daun tembakau Kasturi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agusta, Andrea. 2000. *Minyak Atsiri Tumbuhan Tropika Indonesia*. Bandung : ITB.
- Akerhrst, B.C. 1981. *Tobacco 2nd ed.* London : Longman.
- Alim, Ahmet., Ismihan Goze., Ali Cetin., Ahmet D. Atas., Niluver Vural dan Erol Donmez. 2009. Antimicrobial Activity of The Essential Oil of *Cyclotrichium niveum* (Boiss.) Manden. Et Scheng. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 3 (8) : 422 – 425.
- Al-bayati, F.A dan H.F. Al-Mola. 2008. Antibacterial and Antifungal Activities of Different Parts of *Tribulus terrestris* L. growing in Iraq. *Journal Zhejiang Univ Sci B*. Vol. 9 (2) : 154 – 159.
- Andayani, Anik., Ari Susilowati dan Artini Pangastuti. 2014. Anti *Candida* Minyak Atsiri Lengkuas Putih (*Alpinia galangal*) terhadap *Candida albicans* Penyebab Candidiasis secara In Vitro. *ISSN : 2339 – 1901*. Vol. 2 (2) : 1 – 9.
- AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis*. Washington : Association of Official Analytical Chemists.
- Arswendiyumna. 2011. Minyak Atsiri Daun dan Batang Tanaman Dua Spesies Genus *Cymbopogon*, Famili Gramineae Sebagai Insektisida Alami dan Antibakteri. *Prosiding Skripsi Semester Genap*. Surabaya : FMIPA ITS.
- Badan Pusat Statistik. *Statistik Indonesia 2017*. Jakarta : CV Dharmaputra.
- Badan Pusat Statistik Jawa Timur. *Provinsi Jawa Timur dalam Angka 2017*. Surabaya : CV Bima Media Mandiri.
- Badan Pusat Statistik Jember. 2017. *Kabupaten Jember dalam Angka 2017*. Jember : BPS Kabupaten Jember.
- Badan Standarisasi Nasional. 2006. *SNI 06-2385-3006 : Minyak Nilam*. Jakarta : BSN.
- Badan Standarisasi Nasional. 2006. *SNI 06-2387-2006 : Minyak Daun Cengkih*. Jakarta : BSN.
- Basuki, Sesanti., Suwarso., Anik Herwati., dan Sri Yulaikah. 1999. *Biologi dan Morfologi Tembakau Madura*. Malang : Balai Penelitian Tembakau dan Tanaman Serat.
- Berlian, Zinal., Fitriatul Aini., Weni Lestari. 2016. Aktivitas Antifungi Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum americanum* L.) terhadap Fungi *Fusarium oxysporum* Schlecht. *Jurnal Biota*. Vol. 2 (1) : 99 – 105.

- Bimbaum W dan Dunne S.M. 2010. *Diagnosis Kelainan dalam Mulut Petunjuk Bagi Klinis*. Diterjemahkan oleh Ruslijanto Hardono dan Rasyad Enny M. Jakarta : Buku Kedokteran EGC.
- Bobbarala, V. 2012. *Antimicrobial Agents*. Croatia : Intech.
- Brooks G.F., Carrol K.C., Butel J.S., dan Morse S.A. 2007. *Medical Microbiology 24th ed*. Mc Graw Hill.
- Choi, H.W. 2008. A Role for a Methone Reductase in Resistance Against Microbial Pathogens in Plants. <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/full/148/1/383>.
- Clayton. 1995. *Keputihn dan Infeksi Jamur Candida*. Jakarta : Arca.
- Daisy P., Mathew S., Suveena S., dan Rayan N.A. 2008. A Novel Terpenoid From Elephantopus Scabe – Antibacterial Activity on Staphylococcus aureus : A Substante Computational Approach. *International Journal of Biomedical Science*. 4 (3) : 193-203.
- Davis, W.W and Stout, T.R. 1971. Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay. *Microbiology*. 22(4): 659-665.
- Desmara, Silvia., Sri Rezeki., Sunnati. 2017. Konsentrasi Hambat Minimum dan Konsentrasi Bunuh Minimum Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum sanctum L.*) terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*. *Journal Consinus Dentistry*. Vol 2 (1) : 31 – 39.
- Dewi, D.N.S. 2015. Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Batang Sereh (*Cymbopogon citratus*) terhadap *Propionibacterium acnes* secara *In Vitro*. *Skripsi*. Jember : Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Dinastutie, Rina., Sri Poeranto YS., Dwi Yuni Nur Hidayati. 2015. Uji Efektivitas Antifungi Ekstrak Kulit Pisang Kepok (*Musa acuminata x balbisiana*) Mentah terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* secara *In Vitro*. *Majalah Kesehatan*. Vol. 2 (3) : 173 – 180.
- Dinas Komunikasi dan Informatika Provinsi Jawa Timur, 2017. Litbang Pertanian Rilis Parfum Hasil Diversifikasi Produk Tembakau. <http://kominfo.jatimprov.go.id/read/umum/litbang-pertanian-rilis-parfum-hasil-diversifikasi-produk-tembakau>. [Diakses pada tanggal 12 Mei 2017].
- Effendi, Prisca Violetta dan Simon Bambang Widjanarko. 2014. Distilasi dan Karakterisasi Minyak Atsiri Rimpang Jeringau (*Acorus calamus*). Dengan Kajian Lama Waktu Distilasi dan Rasio Bahan : Pelarut. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol 2 (2) : 1 – 8.
- Ella, Maria Ulfa., Ketut Sumiartha., Ni Wayan Suniti., I Putu Sudiarta dan Nyoman Semadi Antara. 2013. Uji Efektivitas Minyak Atsiri Sereh Dapur (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) terhadap Pertumbuhan Jamur *Aspergillus* sp. secara *In Vitro*. *E-jurnal Agroteknologi Tropika*. Vol 2 (1) : 2301 – 6515.

- Fatisa, Y. 2013. Daya Antibakteri Ekstrak Kulit dan Biji Buah Pulasan (*Nephelium mutabile*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *In Vitro*. *Jurnal Peternakan ISSN 1829 – 8729*. Vol 10 (1) : 31 – 38.
- Feriyanto, Yuni Eko., Patar Jonathan Sipatuhar., Mahfud dan Pantjawarni Prihatini. 2013. Pengambilan Minyak Atsiri dari Daun dan Batang Serai Wangi (*Cymbopogon winterianus*) Menggunakan Metode Distilasi Uap dan Air dengan Pemanasan Microwave. *Jurnal Teknik Pomits ISSN : 2337 – 2359*. 2 (1) : 93.
- Gershenzon, J dan N. Dudaneva. 2007. The Function of Terpene Natural Products in The Natural World. *Nature Chemical Biology*. Vol. 5 (3) : 408 – 414.
- Guenther, Ernest. 1987. *Minyak Atsiri Jilid 1*. Terjemahan oleh S. Ketaren. Jakarta : UI-Press.
- Griffin, Shane G dan Julie L. Markham. 2000. An Agar Dilution Method for The Determination of The Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils. *Journal Essential Oil Research*. Vol. 12 : 249 – 255.
- Habibi, Wildan., Ayong Ziyatul Haq., Pantjawarni Prihatini dan Mahfud. 2013. Perbandingan Metode *Steam Distillation* dan *Steam-Hydro Distillation* dengan *Microwave* terhadap Jumlah Rendemen serta Mutu Minyak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum*). *Jurnal Teknik POMITS ISSN : 2337 – 3539*. Vol 2 (2) : 234 – 238.
- Haraguchi, H., S. Kataoka., S. Okamoto., M. Hanafi dan K. Shibata. 1999. Antimicrobial Triterpenes From *Ilex Integra* and The Mecanism of Antifungal Action. *Phytotherapy Research*. Vol. 13 (2). : 151 – 156.
- Hartana, I. 1978. *Budidaya Tembakau Certu*. Subbalai Penelitian Jember : Balai Penelitian perkebunan Bogor.
- Hartono., C. Muthiadin, dan Z. Bakri. 2012. Daya Hambat Simbiotik Ekstrak Inulin Bawang Merah (*Allium cepa* L.) dengan Bakteri *Lactobacillus acidophilus* terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Bionature*. 3 (1): 34.
- Jawetz, E., R.C.B. Van den Brink., J.L. Melnick., dan Andelberg. 1986. *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan Edisi 16*. Terjemahan Bonang. Jakarta : CV EGC Penerbit Buku Kedokteran.
- Jawetz, E., J.L Melnick., dan E.A. Adelberg. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. Penerjemah Edi Nugroho dan R.F. Maulany. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Jawetz, Melnick dan Adelberg. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran, 23th ed*. Jakarta : ISBN 978-979-448-859-1.
- Juniarti, Yuhernita dan Susi Endrini. 2011. Destilasi Minyak Atsiri Daun Surian sebagai Krim Pencegah Gigitan Nyamuk *Aedes aegypty* L. *Makara Sains*. Vol. 15 (1) : 38 – 42.

- Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert J., dan Zinkernagel, R.M. 2005. *Fungi as Human Pathogens : Medical Microbiology*. New York : Thieme Stuttgart.
- Kementerian Kesehatan RI. 2013. *Profil Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan tahun 2012*. Jakarta : Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan.
- Komariah dan Sjam, Ridhawati. 2012. Kolonisasi *Candida* dalam Rongga Mulut. *Majalah Kedokteran FK UKI*. Vol. 28 (1) : 39 – 47.
- Lennette, T. H., Barilows, A., Hausler, W. J., dan Shadoni, H. J. 1991. *Manual Clinical Microbiology (5th ed)*. Washington, DC : American Society for Microbiology.
- Lestari, Putriana Indah. 2013. Aktivitas Antifungi Ekstrak Daun Teh terhadap Pertumbuhan *Aspergillus flavus*. *Journal of Infectious Diseases ISSN 2354 - 6077*. Vol. 1 (01) : 29 – 38.
- Machado, F.C., Portela MB., Cunha AC., Souza IPR., Soares RMA., dan Castro GFBA. 2010. Antifungal Activity of Chlorhexidine on *Candida* spp. biofilm. *Rev Odontol UNESP*. 39 (5) : 271 – 275.
- Maligan, Jaya Mahar., Heni Adhinata., Elok Zubaidah. 2016. Produksi dan Identifikasi Senyawa Antimikroba dari Mikroalga *Tetraselmis chuii* dengan Metode UAE (Kajian Jenis Pelarut dan Jumlah Siklus Ekstraksi). *Jurnal Teknologi Pertanian*. Vol. 17 (3) : 203 – 213.
- Maryati., Ratna Sorayya Fauzia., Triastuti Rahayu. 2007. Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*. Vol. 8 (1) : 30 – 38.
- Matnawi, Hudi. 1997. *Budidaya Tembakau Bawah Naungan*. Yogyakarta : Penerbit Kanisius.
- Mclain, N., R. Ascario dan C. Baker. 2000. Undecylenic Acid Inhibits Morphogenesis of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. Vol 2000 (44) : 2873 – 2875.
- Mozer, H. 2015. Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol 96% Kulit Batang Kayu Jawa (*Lannea coromandelica*) terhadap *Aspergillus niger*, *Candida albicans* dan *Trichophyton rubrum*. *Skripsi*. Jakarta : Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah.
- Muchtaridi. 2007. Penelitian Pengembangan Minyak Atsiri sebagai Aromaterapi dan Potensinya sebagai Produk Sediaan Farmasi. *J. Tek. Ind. Pert*. 17 (3) : 80.
- Muyassaroh. 2016. Destilasi Daun Kayu Putih dengan Varian Tekanan Operasi dan Kekeringan Bahan untuk Mengoptimalkan Kadar Sineol dalam Minyak Kayu Putih. *Jurnal Teknik Kimia*. Vol. 10 (2) : 36 – 39.

- Nabigol, Amrollah dan Hosein Morshedi. 2011. Evaluation of The Antifungal Activity of The Iranian Thyme Essentials Oils on The Postharvest Pathogens of Strawberry Fruits. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 10 (48) : 9864 – 9869.
- Nuraina. 2015. Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun *Garcinia banthami* Pierre dengan Metode Dilusi. *Skripsi*. Jakarta : UIN Syarif Hidayatullah.
- Nurhaen., D. Winarsii dan A. Ridhoy. 2016. Isolasi dan Identifikasi Komponen Kimia Minyak Atsiri dari Daun, Batang dan Bunga Tumbuhan Salembangu (*Melissa* sp.). *Online Journal of Natural Science*. Vol. 5 (2) : 149 – 157.
- Nurnasari, E dan Subiyakto. 2011. Komposisi Kimia Minyak Atsiri pada Beberapa Tipe Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.). *Jurnal Ilmu – ilmu Hayati*. Vol. 10 (5) : 571 – 580.
- Ochse, J.J., M.J. Soule, Jr., M.J. Djikman and C. Wehlburg. 1961. *Tropical and Sbtropical Agriculture Vol II*. New York : The MacMillan.
- Palic R., Stojanovic G., Alagic S., Nikolic M dan Lepojevie Z. 2002. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of The Essential Oil and CO₂ Extracts of The Oriental Tobacco, Prilep. *Flavour and Frgrance Journal*. 17 (5) : 323 – 326.
- Paramartha, Dibran dan Lazuardi, Yuda. 2013. Pemanfaatan Nikotin pada Daun Tembakau untuk Memproduksi Bioinsektisida dengan Proses Ekstraksi Cair – Cair. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. 2 (2) : 234.
- Peraturan Menteri Pertanian. 2012. Pedoman Penanganan Pascapanen Tembakau Nomor 56/Permentan?OT.140/9/2012.
- Permatasari, Dita., Lia Yulia Budiarti., Maharani Lailyza Apriasari. 2016. Efektivitas Antifungi Ekstrak Metanol Batang Pisang Muli (*Musa acuminata*) dan Chlorhexidine gluconate 0,2% terhadap *Candida albicans*. *Jurnal Kedokteran Gigi*. 1 : (1).
- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. 2014. *Outlook Komoditi Tembakau*. Jakarta : ISSN 1907–1507.
- Rahayu, Triastuti dan Tuti Rahayu. 2009. Uji Antijamur Kombucha Coffee terhadap *Candida albicans* dan *Tricophyton mentagrophytes*. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*. Vol. 10 (1) : 10 – 17.
- Ratnasari. 2009. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Diklorometan dan Etil Asetat Daun MIMBA (Azadiracnta indica A. Juss) terhadap Bakteri Staphylococcus aures dan Escherichia coli*. Jakarta : Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Rodgman, A. Dan T. A. Perfetti. 2006. The Composition of Cigarette Smoke; A Catalogue ot The Polyclinic Hydrocarbons. *Beitrage zur Tabakeforschung*. 22 (1) : 13 – 69.
- Sastrohamidjojo, H. 2004. *Kimia Minyak Atisri*. Yogyakarta : UGM Press.

- Siregar, Ameilia Zuliyanti. 2016. Literasi Inventarisasi Hama dan Penyakit Tembakau Deli di Perkebunan Sumatera Utara. *Jurnal Pertanian Tropik ISSN online : 2356 – 4725*. 3 (3) : 206–207.
- Soedarmanto dan A. Abdullah. 1970. *Tembakau*. Jakarta : PT Soeroengan.
- Suwarso. 1991. *Pemuliaan Tanaman Tembakau Virginia dan Tembakau Asli dalam Prosiding Pemuliaan Tanaman*. Malang : PPTI Komda Jatim.
- Tanjung, A. 2007. Rancang Bagun Alat Pengering Gabah Tipe Bak Segitiga. *Skripsi*. Lampung : Fakultas Pertanian UNILA.
- Tilong, A.D. 2012. *Cegah Kanker dengan Anggur*. Jogjakarta : Diva Press.
- Tirtosastro, Samsuri. 2000. Panen dan Pengolahan Tembakau Rajangan Temanggung. Monograf Balai Penelitian Tanaman Tembakau dan Serat. *Jurnal Litbang Pertanian*. 5 : 71 – 86.
- Tirtosastro, Samsuri. 2004. Penerapan Standar Mutu Tembakau di Indonesia. *Jurnal Litbang Pertanian*. 3 (1) : 24 – 34.
- Tirtosastro, Samsuri dan Murdiyati, A.S. 2010. Kandungan Kimia Tembaca dan Rokok. *Buletin Tanaman Tembakau, Serat dan Minyak Industri*. ISSN : 2085 – 6717. 2 (1) : 35.
- Tirtosastro Samsuri dan A.S. Mardiyati. 2011. Pengolahan Daun Tembakau dan Dampaknya Terhadap Lingkungan. *Buletin Tanaman Tembakau, Serat dan Minyak Industri* ISSN : 2085 – 6717. 3 (2) : 80 – 88.
- Tohari. 1992. *Tembakau dalam Fisiologi Tanaman Budidaya Tropik* (Terjemahan). Yogyakarta : Gajah Mada University Press, p.747–836.
- Tyler, A dan B. Richard. 2001. Specificity and Mode of Action of The Antifungal Fatty Acid cis-9-heptadecanoic acid Produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Applied and Enviromental Microbiology*. Vol. 67 (2) : 956 – 960.
- Wardana, Humaidillah Kurniadi. 2006. Analisis Distribusi Suhu, Aliran Udara, Kadar Air pada Pengeringan Daun Tembakau Rajangan Madura. *Seminar Nasional Jurusan Fisika FMIPA UM ISBN 978 – 602*. 23 – 28.
- WHO. 2009. *Laboratory Manual for Diagnosis of Fungal Opportunistic Infections in HIV/AIDS Patients*. India : World Helath House.
- Widiyanto, Ary dan Mohamad Siarudin. 2013. Karakteristik Daun dan Rendemen Minyak Atsiri Lima Jenis Tumbuhan Kayu Putih (*Characteristics of Leaf and Essential Oil Yield of Five Cajuput Tree Species*). *Jurnal Penelitian Hasil Hutan* ISSN : 0216 – 4329. Vol. 31 (4) : 235 – 241.
- Widyaningrum, Trianik dan Try Wahyuni. 2015. Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol dan Daun Sidaguri. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi*. 377 – 385.

- Yanti, Novi., Samingan., Mudatsir. 2016. Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Gal Manjakani (*Quercus infectoria*) terhadap *Candida albicans*. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Pendidikan Biologi*. Vol. 1 (1) : 1 – 9.
- Yulianto, Fuki Tri., Lia Umi Khasanah., R. Baskara Katri Anandito. 2012. Pengaruh Ukuran Bahan dan Metode Destilasi (Destilasi Air dan Destilasi Uap – Air) terhadap Kualitas Minyak Atsiri Kulit Kayu Manis (*Cinnamon burmannii*). *Jurnal Teknosains Pangan ISSN : 2302 – 0733*. Vol. 1 (1) : 12 – 23.
- Zoric, Natasa., Nevenka Kopjar., Ivan Bobnjarić., Igor Horvat., Sinisa Tomic., dan Ivan Kosalec. 2016. Antifungal Activity of Oleuropein against *Candida albicans* – The In Vitro Study. *Article Molecules* : 21121631.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Kadar Air Daun Tembakau

Perlakuan	Berat Basah (g)	Berat Botol (g)	Berat Botol+Bahan (g)						Berat kering	Kadar air (%)	Rata2 KA (%)	
			0	1	2	3	4	5				6
T1	2	17,53	19,43	18,23	18,10	17,96	17,85	17,85	17,85	1,58	79,0	79,67
T2	2	17,22	19,11	17,96	17,84	17,70	17,51	17,52	17,50	1,61	80,5	
T3	2	17,19	19,06	17,92	17,79	17,65	17,49	17,49	17,47	1,59	79,5	
T4	2	17,64	19,50	18,27	18,27	18,02	17,97	17,97	17,96	1,54	77,0	
T5	2	17,33	19,20	17,99	17,99	17,72	17,63	17,60	17,63	1,57	78,5	

Lampiran 2. Rendemen Minyak Atsiri Daun Tembakau

Destilasi	Lama destilasi (jam)	Berat kering (g)	Berat botol	hasil ekstrak			Rendemen (%)	Rata2 Rendemen (%)
				Berat MA+botol (g)	Berat MA (g)	volume (ml)		
1	6 jam 25 menit	1075	18,03	18,36	0,33	0,40	0,031	0,026
2	6 jam 15 menit	1450	18,03	18,37	0,34	0,60	0,023	
3	4 jam 40 menit	1425	12,48	12,81	0,33	0,50	0,023	

Lampiran 3. Berat Jenis Minyak Atsiri Daun Tembakau

Berat eppendorf kosong (minyak) (g)	Berat eppendorf kosong (air) (g)	Berat tempat +air (g)	Berat Air (g)	Berat tempat + minyak (g)	berat minyak (g)	Berat jenis (g/ml)	Rata2 Berat jenis (g/ml)
1,2269				1,297	0,0701	0,739	0,9339
0,6408	1,1571	1,2519	0,0948	0,7368	0,096	1,013	
0,9995				1,099	0,0995	1,049	

Lampiran 4. Komponen Kimia Minyak Atsiri Daun Tembakau

Peak	Rumus Molekul	Jumlah senyawa (%)	Berat Molekul	Nama Senyawa	Golongan
1	C ₁₃ H ₂₂ O	0,45	194	(E) – Solanone	Alkaloid
2	C ₁₃ H ₁₈ O	0,29	190	Beta-Damascenone	
3	C ₃₂ H ₅₄ O ₂	0,14	470	9,19-Cyclolanostan-3-ol, acetate, (3.beta)- (C	
4	C ₁₈ H ₃₄	0,28	250	1 – Octadecyne	Hidrokarbon
5	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	0,23	328	Retinol, acetate (CAS)	Retinoid (vitamin A)
6	C ₂₀ H ₆₀ O ₁₀ S	0,17	740	Eicosamethylcyclodecasiloxane	Diterpenoid
7	C ₃₀ H ₄₄	0,13	404	Dibenzo[a, H]cyclotetradecene, 2,3,11,12-tetra	Triterpenoid
8	C ₁₈ H ₂₄ O	0,21	256	Estra-1,3,5(10)-trien-17.beta-ol	
9	C ₁₅ H ₂₆ O	0,66	222	Epiglobulol	Seskiterpena
10	C ₁₄ H ₂₈ O	1,24	212	Tetradecanal (CAS)	
11	C ₂₀ H ₃₈	13,19	277	Neophytadiene	Diterpen
12	C ₁₇ H ₃₂ O	0,20	252	13-Heptadecyn-1-ol (CAS)	Asam lemak organik
13	C ₁₈ H ₃₆ O	0,56	268	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl- (CAS)	Asam lemak organik
14	C ₁₃ H ₂₂ O	0,27	194	(E) – Solanone	Alkaloid
15	C ₇ H ₁₆ BNO	1,23	141	1,3,2-Oxazaborinane, 2-butyl- (CAS)	
16	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	5,11	270	Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS)	Asam lemak organik
17	C ₂₁ H ₂₂ FEN ₂ O ₅	1,69	438	Iron, monocarbonyl-(1,3-butadiene-1,4-dicar 3-	
18	C ₂₉ H ₄₂ O	0,64	406	Oxatricyclo[20.8.0.0(7,16)]triacont a-1(22),	
19	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1,56	256	Hexadecanoic acid (CAS)	
20	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	18,67	296	17-Octadecenoic acid, methyl ester (CAS)	Ester
21	C ₂₀ H ₆₀ O ₁₀ S ₁₀	3,15	740	Eicosamethylcyclodecasiloxan	Diterpenoid
22	C ₃₀ H ₄₄	2,02	404	Dibenzo[A, H]cyclotetradecene, 2	Triterpenoid
23	C ₁₈ H ₅₄ O ₉ Si ₉	5,26	666	Cyclononasiloxane, octadecam	Aromatik
24	C ₁₅ H ₂₄ O	0,30	220	(-)-Caryophyllene oxide	Seskiterpena

25	$C_{18}H_{34}O_2$	0,49	282	9-Octadecenoic acid (Z)- (CAS) Oleic acid	
26	$C_{12}H_{10}FN_5$	4,90	243	1H-Purin-6-amine, [(2- fluorophenyl)methyl]-	
27	$C_{10}H_{23}N$	1,56	157	1-Hexanamine, 2-ethyl-N,N- dimethyl- (CAS	Monoterpena
28	$C_{44}H_{90}$	0,58	619	Tetratetracontane (CAS) n- Tetratetracontane	
29	$C_{24}H_{72}O_{12}Si_{12}$	2,72	888	Tetracosamethylcyclododecasi	Aromatik
30	$C_{24}H_{72}O_{12}Si_{12}$	5,27	888	Tetracosamethyl- cyclododecasiloxane	Aromatik
31	$C_{24}H_{72}O_{12}Si_{12}$	3,71	888	Tetracosamethyl- cyclododecasiloxane	Aromatik
32	$C_{24}H_{72}O_{12}Si_{12}$	4,07	888	Tetracosamethyl- cyclododecasiloxane	Aromatik
33	$C_{24}H_{38}O_4$	0,69	390	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhe	
34	$C_{24}H_{72}O_{12}Si_{12}$	2,60	888	Tetracosamethyl- cyclododecasiloxane	Aromatik
35	$C_{24}H_{72}O_{12}Si_{12}$	3,25	888	Tetracosamethyl- cyclododecasiloxane	Aromatik
36	$C_{24}H_{72}O_{12}Si_{12}$	3,81	888	Tetracosamethyl- cyclododecasiloxane	Aromatik
37	$C_{24}H_{72}O_{12}Si_{12}$	4,30	888	Tetracosamethyl- cyclododecasiloxane	Aromatik
38	$C_{21}H_{22}FEN_2O_5$	3,79	438	Iron, monocarbonyl-(1,3- butadiene-1,4-dicar	Aromatik
39	$C_{57}H_{104}O_6$	0,61	884	9-Octadecenoic acid, 1,2,3- propanetriyl ester	Asam lemak organik

Lampiran 5. Penghitungan Konsentrasi Minyak Atsiri Daun Tembakau

a. Konsentrasi 72%

$$M1V1 = M2V2$$

$$100\% \times V1 = 72\% \times 60 \mu l$$

$$V1 = \frac{72}{100} \times 60 = 43,2 \mu l$$

b. Konsentrasi 36%

$$M1V1 = M2V2$$

$$72\% \times V1 = 36\% \times 60 \mu l$$

$$V1 = \frac{36}{72} \times 60 = 30 \mu l$$

c. Konsentrasi 18%

$$M1V1 = M2V2$$

$$36\% \times V1 = 18\% \times 60 \mu l$$

$$V1 = \frac{18}{36} \times 60 = 30 \mu l$$

d. Konsentrasi 6%

$$M1V1 = M2V2$$

$$18\% \times V1 = 6\% \times 60 \mu l$$

$$V1 = \frac{6}{18} \times 60 = 20 \mu l$$

e. Konsentrasi 2%

$$M1V1 = M2V2$$

$$6\% \times V1 = 2\% \times 60 \mu l$$

$$V1 = \frac{2}{6} \times 60 = 20 \mu l$$

Lampiran 6. Penghitungan Konsentrasi MAT dalam pengujian KHM ($\mu\text{g/ml}$)

Konsentrasi MAT murni (%)	Berat jenis (g/ml)	Konsentrasi pengujian (%)	Volume MAT pengujian (ml)	Total Capet (ml)	Konsentrasi pengujian (g/ml)	Konsentrasi pengujian (mg/ml)
100	0,933	0,24	0,01	4,12	0,002	2,26
		0,4	0,016	4,13	0,004	3,61
		0,8	0,033	4,136	0,007	7,44
		1,6	0,066	4,153	0,015	14,83
		2,4	0,196	4,186	0,044	43,69
		3,0	0,246	4,316	0,053	53,18

Lampiran 7. Perhitungan Zona Hambat *Candida albicans*

1. Pendahuluan

Perlakuan	Diameter zona bening		Rata2 (cm)	Rata2 (mm)	Diameter zona bening (mm)
	I	II			
K-	0	0	0	0	-6
K+	1,5	1,4	1,45	14,5	8,5
2%	0,8	0,7	0,75	7,5	1,5
4%	0,8	0,9	0,85	8,5	2,5
6%	1,1	1,0	1,05	10,5	4,5
8%	1,0	1,0	1,0	10,0	4,0
16%	1,1	1,0	1,05	10,5	4,5

2. Hasil uji

a. Ulangan 1

Perlakuan	diameter zona bening			Rata2 (cm)	Rata2 (mm)
	I	II	III		
K-	0,8	0,8	0,8	0,80	8,00
K+	1,5	1,5	1,5	1,50	15,00
2%	0,9	0,9	0,9	0,90	9,00
6%	1,2	1,0	1,0	1,067	10,67
18%	1,1	1,0	0,9	1,00	10,00
36%	1,0	0,9	1,1	1,00	10,00

72%	1,1	1,2	0,9	1,067	10,667
-----	-----	-----	-----	-------	--------

b. Ulangan 2

Perlakuan	diameter zona bening			Rata2 (cm)	Rata2 (mm)
	I	II	III		
K-	0,8	0,8	0	0,53	5,33
K+	1,4	1,5	1,4	1,43	14,33
2%	0,8	0,7	0,8	0,767	7,67
6%	0,8	0,8	0,8	0,80	8,00
18%	0,9	0,8	1,0	0,90	9,00
36%	1,0	0,9	0,9	0,93	9,33
72%	1,0	1,0	1,0	1,00	10,00

c. Rata – rata diameter zona bening ulangan 1 dan 2

Perlakuan	Luas zona hambat (mm)	Keterangan
K-	6,667	Sedang
2%	8,333	Sedang
6%	9,333	Sedang
18%	9,500	Sedang
36%	9,667	Sedang
72%	10,333	Kuat
K+	14,667	Kuat

Lampiran 8. Hasil Analisa ANOVA zona hambatan 1 faktor

1. Descriptives

Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	2	6.6650	1.88798	1.33500	-10.2978	23.6278
2%	2	8.3350	.94045	.66500	-.1146	16.7846
6%	2	9.3350	1.88798	1.33500	-7.6278	26.2978
18%	2	9.5000	.70711	.50000	3.1469	15.8531
36%	2	9.6650	.47376	.33500	5.4084	13.9216
72%	2	10.3350	.47376	.33500	6.0784	14.5916
K+	2	14.6650	.47376	.33500	10.4084	18.9216
Total	14	9.7857	2.50677	.66996	8.3383	11.2331

	Minimum	Maximum
K-	5.33	8.00
2%	7.67	9.00
6%	8.00	10.67
18%	9.00	10.00
36%	9.33	10.00
72%	10.00	10.67
K+	14.33	15.00
Total	5.33	15.00

2. Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df ₁	df ₂	Sig.
-	6		.-

3. ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	72.504	6	12.084	9.208	.005
Within Groups	9.187	7	1.312		
Total	81.691	13			

4. Uji Duncan

konsentrasi	N	Subse for = .05		
		t	alpha	
		1	2	3
K-	2	6.6650		
2%	2	8.3350	8.3350	
6%	2	9.3350	9.3350	
18%	2	9.5000	9.5000	
36%	2		9.6650	
72%	2		10.3350	
K+	2			14.6650
Sig.		.052	.146	1.000

Lampiran 9. Hasil Analisa ANOVA KHM 2 faktor

1. Descriptive Statistics

Konsentrasi	Waktu Pertumbuhan	Mean	Std. Deviation	N
0%	24 jam	525000.00	35355.339	2
	48 jam	1280000.0	28284.271	2
	Total	902500.00	436682.570	4
0.24%	24 jam	460000.00	14142.136	2
	48 jam	1090000.0	14142.136	2
	Total	775000.00	363913.909	4
0.4%	24 jam	390000.00	14142.136	2
	48 jam	965000.00	21213.203	2
	Total	677500.00	332302.573	4
0.8%	24 jam	285000.00	49497.475	2
	48 jam	840000.00	14142.136	2
	Total	562500.00	321804.806	4
1.6%	24 jam	165000.00	21213.203	2
	48 jam	690000.00	14142.136	2
	Total	427500.00	303466.088	4

Lampiran 10. Perhitungan Nilai KHM *Candida albicans*

1. Total mikroba dalam beberapa pengenceran

Tingkat pengenceran	Total mikroba /100 μ l
10 ⁻¹	TBUD
10 ⁻²	450
10 ⁻³	65
10 ⁻⁴	5
10 ⁻⁵	2
10 ⁻⁶	0
10 ⁻⁷	2

2. Konsentrasi pengujian

Konsentrasi pengujian (%)	Volume pengujian (μ l)	Konsentrasi MA (%)	Volume MAT (μ l)	Tween 20 (μ l)
0			0	
0,24			9,84	
0,4			16,40	
0,8	4100	100	32,80	
1,6			65,60	20
2,4			98,40	
3,0			123	
Total volume MAT			346.04	
Total Volume 2x pengujian			692.08	

3. Jumlah total mikroba

Perlakuan (%)	Jumlah koloni (10^{-3})/100 μ l				Rata-rata		Standar deviasi	
	24 jam		48 jam		24 jam	48 jam	24 jam	48 jam
	UL 1	UL 2	UL 1	UL 2				
0	50	55	124	161	52,5	142,5	3,54	26,16
0,24	33	40	98	112	36,5	105	4,95	9,89
0,4	28	20	90	86	24	88	5,66	2,82
0,8	16	12	80	72	14	76	2,82	5,66
1,6	10	7	68	63	8,5	65,5	2,12	3,53
2,4	4	6	50	49	5	49,5	1,41	0,70
3,0	1	3	36	43	2	39,5	1,41	4,94

4. Data MIC *Candida albican* dalam CFU/ml

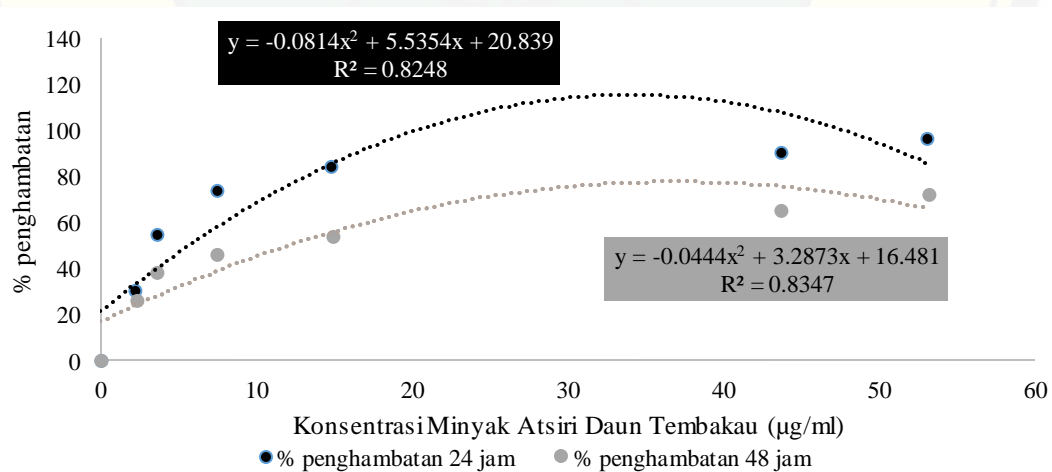
Konsentrasi (%)	Minyak Atsiri (μ l)	Jumlah Koloni/100 μ l (U1)		Jumlah Koloni/100 μ l (U2)		Rata2		Standar Deviasi	
		24 jam	48 jam	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam
0	0	5×10^5	124×10^4	55×10^4	161×10^4	525×10^3	1425×10^3	413561,76	537990,09
0,24	10	33×10^4	98×10^4	4×10^5	112×10^4	365×10^3	105×10^4	356791,26	381750,36
0,4	16	28×10^4	9×10^5	2×10^5	86×10^4	24×10^4	88×10^4	383144,88	393107,28
0,8	33	16×10^4	8×10^5	12×10^4	72×10^4	14×10^4	76×10^4	381575,68	371662,93
1,6	66	1×10^5	68×10^4	7×10^4	63×10^4	85×10^3	655×10^3	343850,74	338673,88
2,4	98	4×10^4	5×10^5	6×10^4	49×10^4	5×10^4	495×10^4	260000	251197,13
3,0	123	1×10^4	36×10^4	3×10^4	43×10^4	2×10^4	395×10^4	196553,63	213619,60

Konsentrasi (%)	Minyak Atsiri (µl)	% penghambatan		Log jumlah koloni	
		24 jam	48 jam	24 jam	48 jam
0	0	0	0	5,72	6,15
0,24	10	30,48	26,32	5,56	6,02
0,4	16	54,29	38,24	5,38	5,94
0,8	33	73,33	46,67	5,14	5,88
1,6	66	83,80	54,03	4,92	5,81
2,4	98	90,48	65,26	4,69	5,69
3,0	123	96,19	72,28	4,30	5,59

5. Persentase penghambatan

Konsentrasi (µl/ml)	% penghambatan	
	24 jam	48 jam
0	0,00	0,00
2,4	30,48	26,32
4	54,29	38,25
8	73,33	46,67
16	83,81	54,04
24	90,48	65,26
30	96,19	72,28

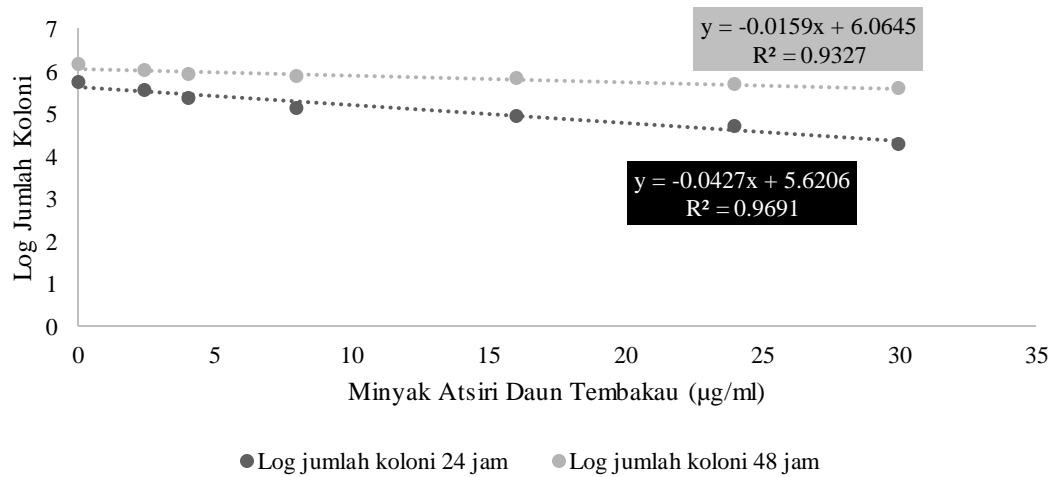
6. Grafik persentase penghambatan



7. Jumlah log koloni

Konsentrasi ($\mu\text{l/ml}$)	Log jumlah koloni	
	24 jam	48 jam
0	5,72	6,15
2,4	5,56	6,02
4	5,38	5,94
8	5,15	5,88
16	4,93	5,82
24	4,70	5,69
30	4,30	5,60

8. Grafik log jumlah koloni



9. Data Probit *Candida albicans*

a. Waktu Pertumbuhan 24 jam

MAT (mg/ml)	Jumlah koloni (CFU/ml) (U1)	Jumlah koloni (CFU/ml) (U2)	Rata - rata (CFU/ml)	Log	% Pertumbuhan	% Penghambatan	Log C	Probit
0	5×10^5	55×10^4	525×10^3	5,72	100,00	0,00	0,00	0,00
2,26	33×10^4	4×10^5	365×10^3	5,56	69,52	30,48	0,35	4,48
3,61	28×10^4	2×10^5	24×10^4	5,38	45,71	54,29	0,56	5,10
7,44	16×10^4	12×10^4	14×10^4	5,15	26,67	73,33	0,87	5,61
1,83	1×10^5	7×10^4	85×10^3	4,93	16,19	83,81	1,17	5,95
43,69	4×10^4	6×10^4	5×10^4	4,70	9,52	90,48	1,64	6,28
53,18	1×10^4	3×10^4	2×10^4	4,30	3,81	96,19	1,73	6,75

b. Waktu Pertumbuhan 48 jam

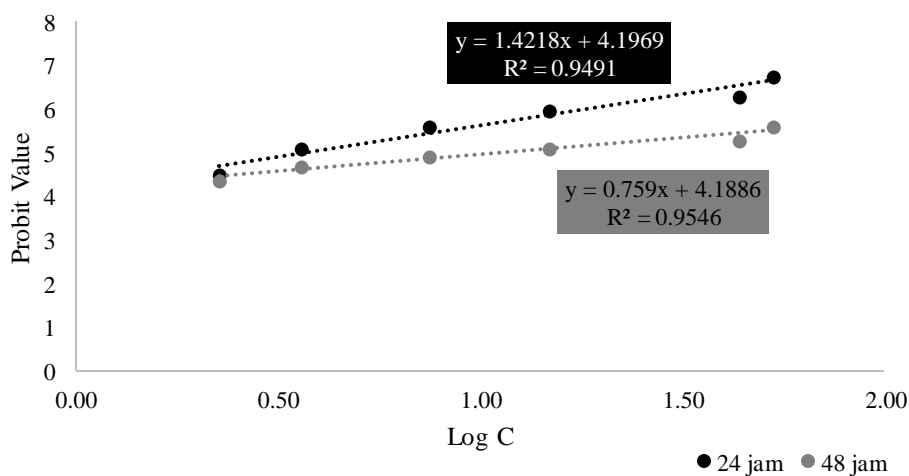
MAT (mg/ml)	Jumlah koloni (CFU/ml) (U1)	Jumlah koloni (CFU/ml) (U2)	Rata - rata (CFU/ml)	Log	% Pertumbuhan	% Penghambatan	Log C	Probit
0	124×10^4	161×10^4	1425×10^3	6,15	100,00	0,00	0,00	0,00
2,26	98×10^4	112×10^4	105×10^4	6,02	73,68	26,32	0,35	4,36
3,61	9×10^5	86×10^4	88×10^4	5,94	61,75	38,25	0,56	4,69
7,44	8×10^5	72×10^4	76×10^4	5,88	53,33	46,67	0,87	4,90
1,83	68×10^4	63×10^4	655×10^3	5,82	45,96	54,04	1,17	5,10
43,69	5×10^5	49×10^4	495×10^3	5,69	34,74	65,26	1,64	5,30
53,18	36×10^4	43×10^4	395×10^3	5,60	27,72	72,28	1,73	5,58

c. Tabel Probit

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

10. Grafik Probit *Candida albicans*



a. Nilai Probit 24 jam

- IC50

$$\text{Persamaan : } Y = 1,4218x + 4,1969$$

Y = nilai hambatan dan x = nilai konsentrasi MAT

Jika nilai Y = 50% maka nilai IC50 : (Probit 50% sebesar 5,00)

$$Y = 1,4218x + 4,1969$$

$$5,00 = 1,4218x + 4,1969$$

$$5,00 - 4,1969 = 1,4218x$$

$$0,8031 = 1,4218x$$

$$x = \text{Log C50} = \frac{0,8031}{1,4218} = 0,5648$$

$$\text{Log C50} = 0,5648$$

$$\text{IC50} = 3,67 \text{ mg/ml}$$

- IC90

$$\text{Persamaan : } Y = 1,4218x + 4,1969$$

Y = nilai hambatan dan x = nilai konsentrasi MAT

Jika nilai Y = 90% maka nilai IC90 : (Probit 90% sebesar 6,28)

$$Y = 1,4218x + 4,1969$$

$$6,28 = 1,4218x + 4,1969$$

$$6,28 - 4,1969 = 1,4218x$$

$$2,0831 = 1,4218x$$

$$x = \text{Log C50} = \frac{2,0831}{1,4218} = 1,465$$

$$\text{Log C50} = 1,465$$

$$\text{IC50} = 29,18 \text{ mg/ml}$$

b. Nilai Probit 48 jam

$$\text{Persamaan : } Y = 0,759x + 4,1866$$

Y = nilai hambatan dan x = nilai konsentrasi MAT

Jika nilai Y = 50% maka nilai IC50 : (Probit 50% sebesar 5,00)

$$Y = 0,759x + 4,1866$$

$$5,00 = 0,759x + 4,1866$$

$$5,00 - 4,1866 = 0,759x$$

$$0,8134 = 0,759x$$

$$x = \text{Log C50} = \frac{0,8134}{0,759} = 1,0718$$

$$\text{Log C50} = 1,0718$$

$$\text{IC50} = 11,79 \text{ mg/ml}$$

• IC90

$$\text{Persamaan : } Y = 0,759x + 4,1866$$

Y = nilai hambatan dan x = nilai konsentrasi MAT

Jika nilai Y = 90% maka nilai IC90 : (Probit 90% sebesar 6,28)

$$Y = 0,759x + 4,1866$$

$$6,28 = 0,759x + 4,1866$$

$$6,28 - 4,1866 = 0,759x$$






$$2,0934 = 0,759x$$

$$x = \text{Log C50} = \frac{2,0934}{0,759} = 2,758$$

$$\text{Log C50} = 2,758$$

$$\text{IC50} = 572,93 \text{ mg/ml}$$

Lampiran 11. Foto Kegiatan Penelitian

No	Foto Kegiatan	Keterangan
1	Sortasi Daun Tembakau	
2	Penimbangan Daun Tembakau	
3	Pengeringan Daun Tembakau selama 5-7 hari	
4	Pengecilan ukuran Daun Tembakau Kering	
5	Destilasi Daun Tembakau	

6 Minyak Atsiri Daun Tembakau



7 Pengujian difusi padat



8 Pengujian dilusi padat

