



**PEMANFAATAN DAUN TEMBAKAU JENIS NA-OOGST  
SEBAGAI SUMBER ANTIMIKROBA TERHADAP  
*Streptococcus mutans* DAN *Candida albicans***

**SKRIPSI**

Oleh :

**Nurul Nofiyanti  
NIM 151710101077**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2019**



**PEMANFAATAN DAUN TEMBAKAU JENIS NA-OOGST SEBAGAI  
SUMBER ANTIMIKROBA TERHADAP *Streptococcus mutans*  
DAN *Candida albicans***

**SKRIPSI**

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

Oleh :

**Nurul Nofiyanti**

**NIM 151710101077**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2019**

## PERSEMBAHAN

Dengan mengucapkan syukur kehadiran Allah SWT, skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Orangtua tercinta, Ibu Zulfatun dan Ayah Pelordi, Kakak tercinta Nuzul Ainur Rosyida, Adik tersayang Wanda Maulida Nurzuldi, dan seluruh keluarga besar yang selalu memberikan dukungan, semangat, dan motivasi, baik dalam bentuk doa, moral, bimbingan, dan materi yang mengiringi perjalanan saya dari awal sampai pada tahap ini.
2. Almamater Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember beserta semua dosen, dan semua Bapak, Ibu Guru di TK Dharma Wanita 1 Wongsorejo, SDN 1 Sumberkencono, SMPN 1 Wongsorejo, dan SMAN 1 Glagah Banyuwangi yang saya banggakan, terimakasih telah memberikan bantuan, bimbingan dan ilmu semoga dapat menjadi ladang pahala yang terus mengalir.
3. Sahabat-sahabat saya tercinta, teman-teman kos Kalduga, teman-teman kelompok riset yang saya banggakan, teman-teman UKM K DOLANAN, teman-teman UKM REYOG UNEJ, teman-teman KKN 103 Desa Gunung Anyar dan teman-teman Fakultas Teknologi Pertanian angkatan 2015, Ayuning, Rizki, Mbak Alya, Ajeng, Ismi, yang selalu memberikan dukungan dan bantuan selama proses pembuatan skripsi ini.
4. Cahya Prana Widya Utama yang telah memberikan semangat serta dukungan untuk saya untuk menyelesaikan tugas akhir ini.
5. Semua pihak yang sudah membantu, dan memberikan dukungan dalam penyusunan skripsi ini.

**MOTTO**

"Kebanggaan kita yang terbesar adalah bukan tidak pernah gagal, tetapi bangkit kembali setiap kali kita jatuh."

(Confusius)

“Hanya karena sesuatu yang baik belum terjadi, bukan berarti sesuatu yang baik tidak akan menghampiri”

(Aesteutic)



**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Nurul Nofiyanti

NIM : 151710101077

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul **“Pemanfaatan Daun Tembakau Jenis *Na-Oogst* sebagai Sumber Antimikroba terhadap *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans*”** adalah benar-benar hasil karya saya sendiri kecuali dalam kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan dalam institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta mendapatkan sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar

Jember, 17 Juli 2019

**Nurul Nofiyanti**  
**NIM. 151710101077**

**SKRIPSI**

**PEMANFAATAN DAUN TEMBAKAU JENIS NA-OOGST SEBAGAI  
SUMBER ANTIMIKROBA TERHADAP *Streptococcus mutans*  
DAN *Candida albicans***

Oleh :

**Nurul Nofiyanti  
NIM 151710101077**

Pembimbing :

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

Dosen Pembimbing Anggota : Ir. Giyarto, M.Sc

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “**Pemanfaatan Daun Tembakau Jenis *Na-Oogst* sebagai Sumber Antimikroba terhadap *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans***” karya Nurul Nofiyanti NIM 151710101077 telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada :

Hari, tanggal :

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Umum

Dosen Pembimbing Anggota

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

Ir. Giyanto, M.Sc.  
NIP. 19660718 199303 1 013

Tim  
Penguji :

Ketua

Anggota

Ahmad Nafi, S.TP., M.P.  
NIP. 19780403 200312 1 003

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

Mengesahkan,  
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian

Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP., M.Eng.  
NIP. 196809231994031009



## SUMMARY

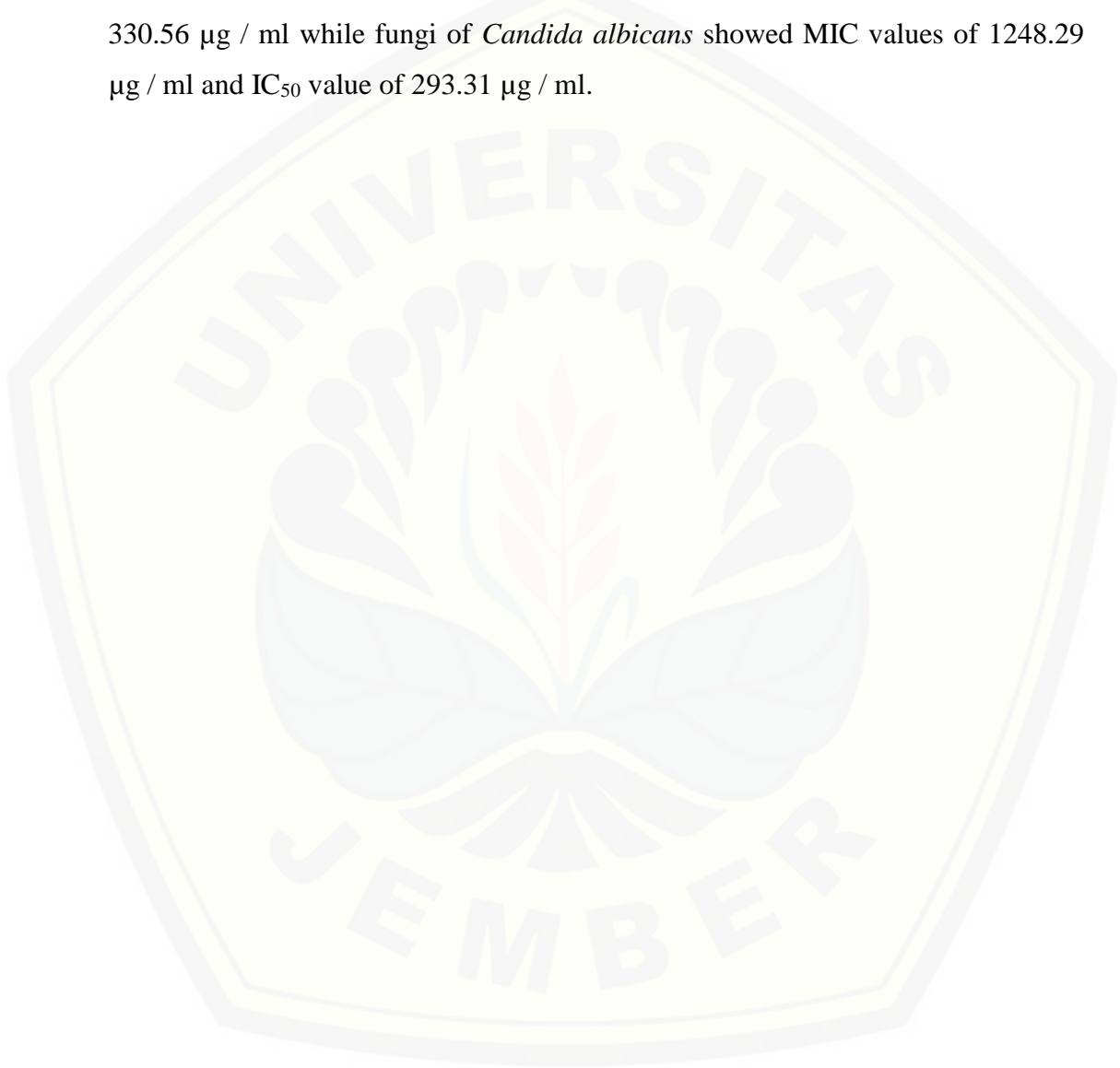
**Utilization of *Na-Oogst* Tobacco Leaf as an Antimicrobial Source for *Streptococcus mutans* and *Candida albicans***; Nurul Nofiyanti; 151710101077; 2015; 67 pages; Departemen of Agricultural Product Technology, Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.

Tooth and mouth disease is still a significant health problem in Indonesia, which is mostly caused by pathogenic microbial infections. Dental and oral problems according to the RISKESDAS in 2018, the Indonesian population experienced dental and oral problems of 57.6%. The most common pathogenic microbial causes of oral cavity disease are *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. To reduce microbial pathogens in the oral cavity can be suppressed by natural antimicrobials. The use of plants is a good solution to reduce pathogenic infections and is not carcinogenic, such as the negative effects caused by chemical drugs. Sources of natural antimicrobial compounds can be obtained from rejected tobacco leaves resulting from cigar tobacco processing (do not pass sorting). Waste tobacco leaves still contain antibacterial and antifungal ingredients, namely flavanoids, alkaloid groups in the form of nicotine, saponin groups in the form of steroids and essential oils in the form of terponoid. In this study, the type of solvent being the most important factor in the extraction process to obtain bioactive compounds can be extracted optimally.

This research method uses two types of solvents namely 80% ethanol and 90°C water temperature. The use of various concentrations of tobacco leaf extract is expected to be able to extract active compounds contained in tobacco leaves and can inhibit the growth of pathogenic microbes such as *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. This study uses 4 stages, namely extraction of tobacco leaves, analysis of total polyphenols (Folin-Ciocalteu), analysis of antioxidant activity (DPPH scavenging activity), and antimicrobial analysis of tobacco leaf extract using solid dilution method to determine Minimum Inhibitory Concentration



(MIC) and  $IC_{50}$ . The results showed that tobacco leaf extract which had the appropriate criteria was 80% ethanol as a solvent with a total polyphenol of 95.06 mgGAE / ml and antioxidant activity of 83.76%. Testing of antimicrobial activity of 80% ethanol solvent tobacco leaf extract by solid dilution method on *Streptococcus mutans* bacteria showed MIC value of 1471.23  $\mu\text{g}$  / ml and  $IC_{50}$  of 330.56  $\mu\text{g}$  / ml while fungi of *Candida albicans* showed MIC values of 1248.29  $\mu\text{g}$  / ml and  $IC_{50}$  value of 293.31  $\mu\text{g}$  / ml.



## RINGKASAN

**Pemanfaatan Daun Tembakau Jenis *Na-Oogst* sebagai Sumber Antimikroba terhadap *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans***; Nurul Nofiyanti; 2015; 151710101077; 67 halaman; Jurusan Teknologi Hasil pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember.

Penyakit gigi dan mulut masih menjadi permasalahan kesehatan yang cukup besar di Indonesia yang sebagian besar ditimbulkan oleh infeksi mikroba patogen. Mikroba patogen penyebab penyakit rongga mulut yang paling sering ditemukan yaitu *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans*. Untuk mengurangi mikroba patogen dalam rongga mulut dapat ditekan dengan antimikroba alami. Pemanfaatan tumbuhan menjadi solusi yang baik untuk mengurangi infeksi patogen dan tidak bersifat karsinogenik seperti dampak negatif yang diakibatkan oleh obat kimia. Sumber senyawa antimikroba alami dapat diperoleh dari daun tembakau afkir hasil pengolahan tembakau cerutu (tidak lolos sortir). Daun tembakau afkir masih mengandung bahan yang bersifat antibakteri dan antijamur yaitu flavanoid, golongan alkaloid berupa nikotin, golongan saponin berupa steroid dan juga minyak atsiri berupa terpenoid. Pada penelitian ini, jenis pelarut menjadi faktor terpenting dalam proses ekstraksi untuk mendapatkan senyawa bioaktif secara optimal.

Metode penelitian ini menggunakan dua jenis pelarut yaitu etanol 80% dan air suhu 90°C. Penggunaan berbagai konsentrasi ekstrak daun tembakau diharapkan mampu mengekstrak senyawa aktif yang terdapat dalam daun tembakau dan dapat menghambat pertumbuhan mikroba patogen seperti *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans*. Penelitian ini menggunakan 4 tahapan yaitu ekstraksi daun tembakau, analisis total polifenol (*Folin-Ciocalteu*), analisis aktivitas antioksidan (*DPPH scavenging activity*), dan analisis antimikroba ekstrak daun tembakau menggunakan metode dilusi padat untuk penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan IC<sub>50</sub>. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak daun tembakau yang memiliki kriteria yang sesuai adalah

pada penggunaan etanol 80% sebagai pelarut dengan total polifenol sebesar 95,06 mgGAE/ml dan aktivitas antioksidan sebesar 83,76%. Pengujian aktivitas antimikroba ekstrak daun tembakau pelarut etanol 80% metode dilusi padat pada bakteri *Streptococcus mutans* menunjukkan nilai KHM sebesar 1471,23 µg/ml dan IC<sub>50</sub> sebesar 330,56 µg/ml sedangkan fungi *Candida albicans* menunjukkan nilai KHM sebesar 1248,29 µg/ml dan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 293,31 µg/ml.



## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pemanfaatan Daun Tembakau Jenis *Na-Oogst* Sebagai Sumber Antimikroba terhadap *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans*”** dapat terselesaikan dengan baik. Skripsi ini disusun berdasarkan hasil penelitian dan diajukan sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar Sarjana Teknologi Pertanian di Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik oleh penulis atas dukungan, bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. Siswoyo Soekarno, S.TP., M.Eng selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember;
2. Ir. Jayus selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember;
3. Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App. Sc. Selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah banyak membantu, membimbing dan mengarahkan selama pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi;
4. Ir. Giyarto, M.Sc. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan arahan dan perbaikan dalam penyusunan skripsi ini;
5. Orang tua tercinta untuk ibu Zulfatun dan ayah Pelordi selalu memberikan doa, semangat, motivasi, dan dukungan yang luar biasa selama pelaksanaan penelitian hingga penyusunan skripsi;
6. Kakakku tercinta Nuzul Ainur Rosyida dan adikku tercinta Wanda Maulida Nurzuldi, terimakasih atas doa, kasih sayang serta dukungan yang luar biasa;
7. Partner yang selalu ada dalam suka dan duka, Cahya Prana Widya Utama. Terimakasih atas kasih sayang, doa, semangat dan motivasi selama penelitian dan penyusunan skripsi;

8. Partner pejuang tembakau Fatmawati Wilujeng, Susi Waimona, Nala Ummi, Agnes Emilda, Nany, Hayuningtyas yang senantiasa membantu penulis selama proses penelitian hingga penyusunan skripsi dan sebagai tempat berbagi keluh kesah dan suka cita;
9. Sahabat tercinta Rizki Amalia dan Ayuning Mutthia, terimakasih atas kesetiiaannya untuk mengingatkan dan memberikan motivasi untuk segera menyelesaikan semua tugas dan urusan dengan baik;
10. Sahabat THP-B 2015 dan seluruh kru UKM-K Dolanan tercinta yang selalu menjadi inspirasi dan motivasi untuk menyelesaikan tugas dan kewajiban saya dengan baik.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu penulis mengharapkan adanya kritik dan saran yang bersifat membangun sehingga penulisan selanjutnya menjadi lebih baik. Penulis juga berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan menambah wawasan bagi berbagai pihak.

Jember, 17 Juli 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>MOTTO.....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN.....</b>	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>vii</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>viii</b>
<b>RINGKASAN.....</b>	<b>x</b>
<b>PRAKATA .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xviii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.3 Manfaat Penelitian.....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Tanaman Tembakau.....	5
2.2 Tembakau <i>Na-Oogst</i> .....	7
2.3 Senyawa Bioaktif dari Tembakau.....	8
2.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Efektivitas Ekstrak.....	11
2.5 Aktivitas Senyawa Antioksidan.....	12
2.6 Mekanisme Penghambatan Senyawa Antimikroba .....	14
2.7 Karakteristik Mikroba Rongga Mulut.....	15
2.7.1 <i>Streptococcus mutans</i> .....	15
2.7.2 <i>Candida albicans</i> .....	17
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	19
3.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	19
3.2.1 Alat Penelitian .....	19



3.2.2 Bahan Penelitian .....	19
3.3 Rancangan Penelitian .....	20
3.4 Tahap Prosedur Penelitian .....	20
3.5 Prosedur Pengamatan .....	22
3.5.1 Uji Total Polifenol .....	22
3.5.2 Uji Antioksidan Metode DPPH .....	24
3.5.3 Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun Tembakau.....	25
3.5 Parameter Pengamatan .....	28
3.5 Analisa Data .....	29
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Total Polifenol Ekstrak Daun tembakau <i>Na-Oogst</i> .....	30
4.2 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Tembakau <i>Na-Oogst</i> .....	32
4.3 Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun Tembakau <i>Na-Oogst</i> .....	34
<b>BAB 5. PENUTUP</b>	
5.1 Kesimpulan .....	43
5.2 Saran .....	43
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>44</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>51</b>



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tanaman tembakau jenis Besuki <i>Na-Oogst</i> .....	5
Gambar 2.2 <i>Streptococcus mutans</i> .....	16
Gambar 2.3 Bentuk mikroskopis <i>Candida albicans</i> .....	17
Gambar 3.1 Diagram alir pembuatan ekstrak daun tembakau <i>Na-Oogst</i> .....	21
Gambar 3.2 Diagram alir pembuatan kurva standart .....	22
Gambar 3.3 Diagram alir uji total polifenol ekstrak daun tembakau <i>Na-Oogst</i> .....	23
Gambar 3.4 Diagram alir uji aktivitas antioksidan ekstrak daun tembakau <i>Na-Oogst</i> .....	24
Gambar 3.5 Diagram alir uji antimikroba ekstrak daun tembakau <i>Na-Oogst</i> .....	28
Gambar 4.1 Total polifenol ekstraksi pelarut air suhu 90°C dan etanol 80% .....	30
Gambar 4.2 Aktivitas antioksidan ekstraksi pelarut air suhu 90°C dan etanol 80% .....	32
Gambar 4.3 Kurva hubungan pelarut etanol 80% dan air suhu 90°C terhadap pertumbuhan <i>S. mutans</i> menggunakan kurva probit.....	34
Gambar 4.4 Kurva hubungan penghambatan pelarut etanol 80% dan air suhu 90°C terhadap pertumbuhan <i>C. albicans</i> menggunakan kurva probit .....	35
Gambar 4.5 Kurva hubungan penghambatan pelarut etanol 80% dan air suhu 90°C terhadap pertumbuhan <i>S. mutans</i> menggunakan kurva linier .....	36
Gambar 4.6 Kurva hubungan penghambatan pelarut etanol 80% dan air suhu 90°C terhadap pertumbuhan <i>C. albicans</i> menggunakan kurva linier .....	37

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 2.1 Susunan kimia daun tembakau.....	6
Tabel 2.2 Kandungan daun tembakau .....	6
Tabel 3.1 Rancangan percobaan ekstrak daun tembakau .....	20
Tabel 3.2 Rancangan pengujian antimikroba ekstrak daun tembakau .....	20
Tabel 4.1 Hasil Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan IC <sub>50</sub> <i>Streptococcus mutans</i> dan <i>Candida albicans</i> .....	38
Tabel 4.2 Daya hambat ekstrak daun tembakau <i>Na-Oogst</i> pelarut etanol 80% dan air suhu 90°C terhadap bakteri <i>S. mutans</i> dan <i>C. albicans</i> .....	41

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 4.1 Perhitungan total polifenol ekstrak daun tembakau.....	51
Lampiran 4.2 Perhitungan aktivitas antioksidan.....	53
Lampiran 4.3 Perhitungan konsentrasi daun tembakau uji mikroba .....	54
Lampiran 4.4 Perhitungan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan IC <sub>50</sub> Menggunakan kurva probit.....	56
Lampiran 4.5 Perhitungan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan IC <sub>50</sub> Menggunakan kurva linier .....	66
Lampiran 4.6 Perhitungan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan IC <sub>50</sub> Menggunakan kurva polynomial .....	70
Lampiran 4.7 Dokumentasi foto penelitian.....	72

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyakit gigi dan mulut masih menjadi permasalahan kesehatan yang cukup besar di Indonesia. Menurut RISKESDAS tahun 2018, penduduk Indonesia mengalami masalah gigi dan mulut sebanyak 152.640.000 dihitung dari 57,6% jumlah penduduk Indonesia. Penyakit gigi dan mulut tersebut sebagian besar ditimbulkan oleh infeksi mikroba patogen. Mikroba patogen penyebab penyakit rongga mulut yang paling sering ditemukan yaitu *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans*. Mikroba tersebut penyebab penyakit karies gigi dan *oral candidiasis* (Nur'aeny, 2017). Untuk mengurangi mikroba patogen rongga mulut dapat ditekan dengan antimikroba alami. Penggunaan senyawa antimikroba alami lebih disarankan dibandingkan dengan penggunaan senyawa antimikroba sintetis. Sumber senyawa antimikroba alami dapat diperoleh dari daun tembakau afkir hasil pengolahan tembakau cerutu.

Menurut hasil data Badan Pusat Statistik Jember (2018) pada tahun 2017 produksi tembakau *Na-Oogst* atau disebut Besuki *Na-Oogst* sebanyak 32.593,00 kuintal. Berdasarkan hasil observasi dan diskusi dengan petani tembakau Jember, bahwa daun tembakau inferior atau daun afkir yang dihasilkan sekitar 10% hingga 20% dari produksi daun tembakau utuh. Daun tembakau afkir menurut Eurika dan Hapsari (2017) yaitu daun yang memiliki nilai mutu rendah seperti robek atau terserang hama. Daun tembakau afkir (limbah) masih mengandung bahan yang bersifat antibakteri dan antijamur yaitu golongan fenol berupa flavanoid, golongan alkaloid berupa nikotin, golongan saponin berupa steroid dan juga minyak atsiri berupa terponoid (Duangsri, 2010). Oleh karena itu perlu dilakukan ekstraksi komponen bioaktif dengan maksimal.

Pemilihan pelarut ekstraksi merupakan faktor penting dalam proses ekstraksi karena ekstraksi dengan pelarut didasarkan pada sifat kepolaran zat dalam pelarut yang digunakan. Menurut Gritter dkk (1991), ekstraksi dengan pelarut didasarkan pada sifat kepolaran zat yaitu senyawa yang bersifat polar

hanya akan larut pada pelarut polar (etanol, butanol, metanol dan air), sedangkan senyawa yang bersifat non-polar juga hanya larut pada senyawa non-polar (eter, kloroform dan n-heksana).

Etanol dan air digunakan sebagai pelarut karena memiliki sifat polar, universal, dan mudah didapat. Senyawa metabolit sekunder yang akan diambil pada ekstrak daun tembakau bersifat polar sehingga proses ekstraksi menggunakan pelarut polar. Maka dari itu penelitian ini menggunakan variasi perbandingan pelarut antara etanol 80% dan air panas dengan suhu 90°C sehingga dapat diketahui konsentrasi jenis pelarut yang paling optimal dalam ekstraksi komponen flavanoid dalam daun tembakau. Senyawa polifenol dari hasil ekstraksi daun tembakau akan dianalisis dengan total polifenol, aktivitas antioksidan dan antimikroba sehingga dapat diketahui besar total polifenol, aktivitas antioksidan dan besar penghambatan terhadap mikroba bakteri Gram-positif yaitu *Streptococcus mutans* dan jamur yaitu *Candida albicans*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Daun tembakau tidak lolos sortiran atau disebut daun afkir masih memiliki senyawa bioaktif yang mampu bekerja sebagai antimikroba, sehingga perlu dilakukan penanganan khusus dengan cara memanfaatkan daun tembakau afkir menjadi ekstrak. Daun tembakau memiliki senyawa antibakteri dan antijamur diantaranya flavanoid, alkaloid, steroid, dan terpenoid (Putri dkk., 2014). Untuk mendapatkan senyawa aktif tersebut memerlukan pelarut yang efektif dalam mengekstrak senyawa yang diinginkan.

Flavanoid merupakan senyawa mengandung dua cincin aromatik dengan gugus hidroksil lebih dari satu. Senyawa fenol dengan gugus hidroksil yang semakin banyak akan memiliki tingkat kelarutan dalam air yang semakin tinggi atau bersifat polar (Robinson, 1995). Alkaloid merupakan senyawa yang mengandung nitrogen sebagai bagian dari sistem sikliknya serta mengandung substituen yang bervariasi seperti gugus amina, amida, fenol, dan metoksi sehingga alkaloid bersifat semipolar (Dewi *et al.*, 2013). Saponin merupakan senyawa yang memiliki gugus nonpolar berupa gugus steroid dan gugus



triterpenoid, akan tetapi senyawa ini lebih cenderung bersifat polar karena ikatan glikosidanya (Harbone (2006) dan Sangi *et al.* (2008) 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.

Hasil ekstraksi yang optimal diperlukan pelarut yang memiliki polaritas yang sama dengan senyawa yang akan diekstrak karena senyawa polar hanya larut dengan baik dalam pelarut yang polar seperti etanol, butanol, methanol, dan air, begitu pula senyawa non polar dapat larut dengan baik pada pelarut non polar seperti eter, klorofom dan n-heksana (Sirwutubun dkk., 2015), sehingga penentuan pelarut sangat penting untuk dalam proses ekstraksi. Pada penelitian ini menggunakan dua jenis pelarut yaitu etanol 80% dan air suhu 90°C. penggunaan pelarut tersebut diharapkan mampu mengekstrak senyawa flavanoid, alkaloid, steroid, dan terpenoid. Hasil ekstraksi daun tembakau akan diuji total polifenol, aktivitas antioksidan dan antimikroba terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan fungi yaitu *Candida albicans* untuk mengetahui daya hambat ekstrak daun tembakau terhadap pertumbuhan mikroba patogen rongga mulut.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

- a. mengetahui jenis pelarut yang tepat dan total polifenol daun tembakau *Na-Oogst*,
- b. mengetahui aktivitas antimikroba ekstrak daun tembakau *Na-Oogst* terhadap *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans*.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian adalah sebagai berikut :

- a. memanfaatkan limbah daun tembakau yang tidak lolos penilaian mutu cerutu
- b. memberikan sumber informasi bahwa senyawa dalam ekstrak daun tembakau *Na-Oogst* dapat digunakan sebagai antimikroba alami.

## BAB 2. TINJUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Tembakau

Tembakau merupakan jenis tanaman komoditi ekspor yang sudah dikenal sejak dulu oleh masyarakat Indonesia. Tanaman semusim ini bukan tergolong komoditas pangan melainkan komoditas perkebunan. Tanaman ini tersebar di seluruh Nusantara dan memiliki banyak kegunaan yaitu sebagai bahan baku rokok dan cerutu. Selain itu tembakau juga dapat dikomsumsi dengan cara dikunyah, dan juga dapat digunakan sebagai peptisida, parfum serta bahan baku obat (Parwati dkk., 2017). Secara umum varietas tembakau yang banyak diketahui adalah *Nicotiana bigelovii*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana plumbagifolia* dan *Nicotiana tabacum* (Paramartha dan Yuda, 2013). Tanaman tembakau jenis *Na-Oogst* dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Tanaman tembakau jenis Besuki *Na-Oogst* (Eurika dan Hapsari, 2017)

Berdasarkan berbagai macam jenis tembakau, terdapat klasifikasi tanaman tembakau secara umum dari spesies *Nicotiana tabacum* menurut Siregar (2016) adalah sebagai berikut :

Devisio : *Plantae*  
Kelas : *Dicotyledonae*  
Ordo : *Personatae*  
Family : *Solanaceae*  
Sub family : *Nicotianae*  
Genus : *Nicotianae*



Spesies : *Nicotiana tabacum L.*

Varietas : *Na-Oogst*

Tembakau memiliki kandungan zat-zat seperti abu, gula, fenol, nitrat dan nikotin dengan rincian persentase dalam Tabel 2.1 dan Tabel 2.2.

Tabel 2.1 Susunan kimia daun tembakau

Uraian	Jumlah (%)
Abu	20
Gula	0,4 – 2,5
Fenol	0,0 – 0,5
Nitrat	1,0 – 2,0
Nikotin	
1. Daun bawah	0,16 – 2,89
2. Daun tengah	0,3 – 3,75
3. Daun atas	0,5 – 4,0
Kandungan N total	2,18 – 3,58

Sumber : Cahyono (1998)

Tabel 2.2 Kandungan daun tembakau

Konponen	Komposisi (% bk)
Total Nitrogen	2,20
Protein Nitrogen (nitrogen)	1,58
Nikotin	0,67
Nitrogen dari asam $\alpha$ -amino	0,30
Air terlarut karbohidrat	25,9
Selulosa	12,3
Pektin	13,4
Polypentose	4,90
Minyak atsiri	0,13
Resin yang diekstrak menggunakan benzena	7,42
Resin yang diekstrak menggunakan petroleum eter	6,20
Polyphenol	4,39
Asetaldehid	0,26
Asam organik	9,12
a. Asam oksalat	2,18
b. Asam sitrat	1,27
c. Asam hidroksi	4,57
d. Asam volatil	1,12
pH dan air yang terekstrak	5,54
Abu	15,4

Sumber : Podlejski dan Olejniczak (1983)

## 2.2 Tembakau *Na-Oogst*

Tembakau jenis *Na-Oogst* merupakan tembakau cerutu yang biasanya ditanam pada akhir musim kemarau dan dipetik atau dipanen pada musim penghujan dengan teknik budidaya menggunakan naungan (Eurika dan Hapsari, 2017). Tembakau cerutu ini banyak dibudidayakan di Kabupaten Jember, terutama wilayah Jember bagian selatan. Jember merupakan salah satu penghasil terbesar di Indonesia sehingga dijuluki kota *Bako* yang artinya kota tembakau (Sari, 2014). Selain tembakau *Na-Oogst*, ada jenis tembakau yang berbeda yang sering ditanam oleh masyarakat Jember yaitu tembakau jenis *Voor-Oogst*. Tembakau ini merupakan salah satu tipe tembakau yang diolah secara krosok (*leaf type*) dan biasanya dimanfaatkan sebagai tembakau rajangan dan bahan baku sigaret. Tembakau rajangan ini biasanya ditanam pada akhir musim hujan dan dipanen pada musim kemarau (Susilowati, 2006). Menurut Sudaryono (2004), kandungan nikotin pada tembakau salah satunya dipengaruhi oleh waktu tanam. Tembakau yang ditanam pada musim penghujan kandungan nikotinnya lebih rendah dibandingkan dengan tembakau yang ditanam pada musim kemarau. Menurut penelitian Sholeh dkk (2000), kadar nikotin tembakau *Voor-Oogst* dan *Na-Oogst* yaitu mencapai 3,21% dan 1,75%. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan nikotin yang dimiliki tembakau *Voor-Oogst* lebih tinggi dibandingkan tembakau *Na-Oogst*. Selain nikotin golongan alkaloid, ada kandungan bahan aktif lain yaitu fenol berupa flavanoid, golongan saponin berupa steroid dan juga minyak atsiri berupa terpenoid (Putri dkk., 2014).

Bahan baku yang baik maka akan menghasilkan produk yang baik. Salah satu syarat bahan baku cerutu yang baik yaitu memenuhi syarat masak petik. Pemetikan dilakukan secara bertahap. Kriteria tanaman siap dipanen yaitu tanaman yang telah berumur 50 hari, warna daun *menongo bener* (hijau seperti bunga kenanga), tanaman dalam keadaan segar dan sudut daun melebar serta daunnya merunduk dan mudah dipetik. Adapun banyaknya daun tembakau, jenis daun yang dipetik terdiri dari : 2 lembar daun tanah/pasir (DT), 6 lembar daun koseran pertama (DKP) 10 lembar daun koseran atas (DKA), 4 lembar daun madya pertama (DMP) 6 lembar daun madya tengah (DMT) dan 4 lembar daun

madya atas (DMA). Pemetikan dilakukan pada pukul 06.00 – 08.00 pagi secara manual karena pemetikan pada pagi hari akan menghasilkan warna lebih cerah dibandingkan pemetikan disore hari (Bina UKM, 2010). Menurut observasi dan diskusi dengan petani tembakau Jember, daun tembakau yang tergolong afkir adalah daun bawah yang menempel pada tanah, daun yang kondisinya rusak, robek atau berlubang, dan warna serta ukuran yang tidak seragam.

### 2.3 Senyawa Bioaktif dari Tembakau

Daun tembakau memiliki senyawa aktif yang bersifat sebagai antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba (Taiga dan Friday, 2009; Bakh *et al.*, 2012). Bahan bioaktif tersebut antara lain golongan fenol berupa flavanoid, golongan saponin berupa steroid, golongan alkaloid berupa nikotin dan jugamengandung golongan minyak atsiri berupa terpenoid (Fathiazad, 2005; Susilowati, 2006; Rusli dkk., 2011). Berikut merupakan mekanisme senyawa metabolit dau tembakau sebagai antimikroba :

#### a. Flavanoid

Flavanoid merupakan golongan terbesar dari fenol yang mampu mendenaturasi protein dan berfungsi sebagai antibakteri dan antijamur (Taiga dan Friday, 2009; Bakh *et al.*, 2012). Mekanisme kerja flavanoid sebagai antibakteri yaitu dengan merusak permeabilitas sel bakteri, mikrosom dan lisosom sebagai hasil dari proses interaksi dinding bakteri dengan anti flavanoid. Flavanoid juga mampu melepas energi transduksi terhadap membran sitoplasma bakteri sehingga mengakibatkan penghambatan motilitas bakteri (Sabir, 2005). Sebagai anti bakteri, flavanoid juga memiliki gugus hidroksil yang mampu merubah komponen organik dan transport nutrisi sehingga menimbulkan efek toksik terhadap bakteri itu sendiri (Markham, 1988).

Mekanisme flavanoid sebagai anti jamur yaitu dengan mengganggu permeabilitas membran sel jamur dan merubah komponen organik serta transport nutrisi sehingga menyebabkan efek toksik pada jamur (Jupriadi, 2011). Membran yang diganggu fungsi kerjanya akan menyebabkan peningkatan permeabilitas sel sehingga akhirnya jamur mengalami kematian (Jawetz, 2007).

b. Alkaloid

Alkaloid bersifat antimikroba karena mampu merusak keseimbangan komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel bakteri mengalami lisis dan terjadi kematian sel (Juliantina, 2008). Alkaloid utama yang terdapat dalam daun tembakau adalah nikotin. Konsentrasi nikotin dalam daun tembakau diperkirakan sekitar 6-8%. Nikotin merupakan metabolit sekunder dari senyawa ornitin yang berfungsi menghambat pertumbuhan jamur yang berkaitan dengan fungsi nikotin dalam menghambat kerja enzim (Ardwiantoro, 2010; Garatfini, 1990).

c. Terpenoid

Terpenoid bersifat antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel, sehingga dinding sel bakteri tidak dapat terbentuk secara sempurna yang menyebabkan sel bakteri mengalami kematian (Ajizah, 2004).

d. Saponin

Saponin bersifat antibakteri yang dapat menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel. Saponin berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan kemudian mengikat membran sitoplasma sehingga mengganggu dan mengurangi kestabilan membran sel. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel (Cavalieri *et al.*, 2005).

e. Steroid

Mekanisme kerja steroid dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah adanya membran lipid yang memiliki sensitivitas terhadap komponen steroid sehingga mampu menyebabkan kebocoran pada lisosom (Madduri *et al.*, 2013). Steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat permeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun serta morfologi membran sel berubah yang menyebabkan sel rapuh dan lisi (Ahmad *et al.*, 2007).

## 2.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Efektivitas Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pengambilan senyawa kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan tak larut dengan suatu pelarut cair. Berbagai simplisia mengandung senyawa aktif yang digolongkan kedalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavanoid, dan lain-lain. Secara umum pelarut etanol merupakan pelarut yang sering digunakan dalam proses ekstraksi bahan alam karena dapat melarutkan seluruh golongan metabolit sekunder (Tambun, 2016). Adanya senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat (Depkes, 2000). Ada beberapa metode ekstraksi yaitu maserasi, soxhlet extraction, ekstraksi berlawanan arah, dan ekstraksi ultrasonik dan superkritik. Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi ekstraksi yaitu meliputi :

### 1. Persiapan sampel

Persiapan sampel ini meliputi pengecilan ukuran dan pengeringan bahan. Pengecilan ukuran bertujuan untuk memperluas bidang kontak antara sampel dengan pelarut. Semakin kecil ukuran partikel, maka semakin luas bidang kontak antara sampel dengan pelarut, sehingga proses ekstraksi menjadi cepat dan efisien. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air, dengan pengeringan yang sempurna akan menghasilkan ekstrak dengan kemurnian yang baik. Pengeringan juga dapat memperpanjang masa simpan sebelum dilakukan proses ekstraksi.

### 2. Waktu ekstraksi

Semakin lama waktu ekstraksi maka semakin tinggi yield yang yang diperoleh, namun penambahan waktu tidak berpengaruh jika ekstraksi telah mencapai batas maksimum.

### 3. Suhu

Ekstraksi kelarutan bahan dan difusivitas akan meningkat dengan meningkatnya suhu, sehingga diperoleh laju ekstraksi yang tinggi. Suhu untuk proses ekstraksi memiliki batas suhu yang ditentukan oleh beberapa faktor, salah satunya adalah perlunya menghindari reaksi samping yang tidak diinginkan.



#### 4. Jenis pelarut

Pada proses ekstraksi memiliki banyak pilihan untuk pelarut yang digunakan. Adapun beberapa hal yang harus diketahui untuk pemilihan pelarut yaitu sebagai berikut :

- a. Selektivitas, pelarut hanya melarutkan ekstrak yang dikehendaki dan ekstrak yang dihasilkan perlu dilakukan pembersihan dengan mengekstrak hasil larutan tersebut dengan pelarut kedua
- b. Kelarutan, pelarut harus mampu melarutkan solut secara sempurna. Kelarutan solut terhadap pelarut yang tinggi akan mengurangi jumlah pengguna pelarut, sehingga menghindarkan terlalu besarnya perbandingan antara pelarut dan padatan.
- c. Kerapatan, jika kerapatan antara pelarut dan solut perbedaannya besar maka akan memudahkan proses pemisahan keduanya
- d. Aktivitas kimia pelarut, didalam sistem pelarut harus dari bahan kimia yang stabil dan inert terhadap komponen agar proses ekstraksi berjalan dengan baik.
- e. Titik didih, pada proses ekstraksi biasanya pelarut dan solut akan dipisahkan dengan cara penguapan, destilasi atau rektifikasi. Maka dari itu titik didih keduanya tidak boleh dekat. Lebih baik titik didih pelarut tidak terlalu tinggi.
- f. Viskositas pelarut, pelarut harus mampu berdifusi kedalam maupun keluar dari padatan agar mempermudah kontak dengan seluruh solut. Maka dari itu viskositas pelarut harus rendah agar dapat keluar masuk dengan mudah terhadap padatan.
- g. Rasio pelarut, perbandingan solut dan pelarut yang tepat akan mampu menghasilkan ekstraksi yang diharapkan.

#### 2.5 Aktivitas Senyawa Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa kimia yang mampu menghambat proses reaksi oksidasi dan melawan radikal bebas dalam tubuh. Antioksidan berfungsi untuk menetralkan radikal bebas yang terdapat dalam tubuh (Winarsi, 2007).

Radikal bebas merupakan suatu molekul kimia yang kekurangan elektron sehingga bersifat sangat reaktif untuk mencari pasangan elektron agar konfigurasi stabil. Radikal bebas terdiri dari bermacam-macam spesies oksigen reaktif yang mampu menyerang membran lipid, asam nukleat, protein dan enzim. Hal ini dapat mengakibatkan kerusakan sel-sel yang menimbulkan dampak merugikan bagi kesehatan manusia (Shivaprasad, 2005). Oleh karena itu dibutuhkan senyawa antioksidan untuk menstabilkan senyawa radikal bebas pada proses reaksi oksidasi. Menurut sifatnya antioksidan dibedakan menjadi antioksidan endogenus dan antioksidan eksogenus. Antioksidan endogenus merupakan antioksidan primer yang sifatnya enzimatis. Antimikroba yang tergolong kelompok ini yaitu SOD, glutathion peroksidase dan katalase. Sedangkan antioksidan eksogenus merupakan antioksidan sekunder yang sifatnya non-enzimatis. Antioksidan yang tergolong kelompok ini meliputi flavonoid, fenol, tannin dan karotenoid serta beberapa vitamin A, C dan E (Lingga, 2012).

Menurut Widowati dkk (2005) berdasarkan jenisnya antioksidan dibagi menjadi dua yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetis. Antioksidan alami merupakan antioksidan yang berasal dari tanaman dan berguna untuk mencegah polimerisasi asam lemak tak jenuh dan oksidasi. Antioksidan sintetis merupakan antioksidan buatan manusia dan dimanfaatkan untuk lemak, lipid dan minyak yang terdapat dalam makanan seperti, BHT, BHA, TBHQ dan propyl galat. Saat ini penggunaan antioksidan sintetis mulai dibatasi karena hasil penelitian menunjukkan bahwa antioksidan sintetis BHT dan BHA pada binatang percobaan dapat meracuni dan meningkatkan resiko karsinogenesis.

Menurut Winarsi (2007) mekanisme kerja antioksidan yaitu dengan memperkecil kerusakan oksidatif yang disebabkan pembentukan radikal bebas yang umumnya melalui inisiasi, propagasi dan terminasi. Antioksidan primer atau disebut endogenus berperan untuk menangkap radikal bebas untuk memecah rantai inisiasi dan rantai propagasi dengan menambahkan elektron sehingga menjadikan produk yang lebih stabil. Sedangkan antioksidan sekunder atau disebut eksogenus berperan memotong reaksi oksidasi yang berantai sehingga memberikan efek penghambatan pada pembentukan senyawa oksigen reaktif.



## 2.6 Mekanisme Penghambatan Senyawa Antimikroba

Senyawa antimikroba merupakan suatu senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang mana zat tersebut memiliki kemampuan untuk menghambat atau membasmi aktivitas mikroorganisme yang merugikan tubuh manusia (Waluyo, 2004). Berdasarkan sifat toksisitas selektif antimikroba dibagi menjadi 2 yaitu antimikroba yang bersifat menghambat pertumbuhan mikroba yang disebut aktivitas bakteriostatik, dan yang bersifat membunuh mikroba yang disebut aktivitas bakterisid (Farter, 2009). Menurut Farter (2009) mekanisme kerja antimikroba dalam menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroba dibagi menjadi 5 yaitu :

### 1. Antimikroba yang menghambat metabolisme sel mikroba

Antimikroba yang tergolong kelompok ini yaitu trimetopim, sulfonamid, sulfon, dan asam p-aminosalisilat (PAS), dengan mekanisme kerjanya menghasilkan efek bakteriostatik. Dalam kelangsungan hidupnya mikroba membutuhkan asam folat. Mikroba patogen tidak memperoleh asam folat dari luar tubuh, sehingga mikroba harus mampu mensintesis asam folat sendiri. Peranan zat antimikroba ini yaitu mengganggu proses pembentukan asam folat, sehingga asam folat yang dihasilkan nonfungsional dan metabolisme dalam mikroba akan terganggu juga.

### 2. Antimikroba yang menghambat sintesis dinding sel mikroba

Antimikroba yang tergolong dalam kelompok ini yaitu sefalosporin, penisilin, basitrasin, vankomisin, dan sikloserin. Antimikroba tersebut dapat menghambat proses sintesis dinding sel yang paling awal hingga paling akhir. Maka akan terjadi lisis yang disebabkan tekanan osmotik dalam sel kuman lebih tinggi dibanding diluar sel, dengan mekanisme kerjanya menghasilkan efek bakterisidal pada kuman yang peka.

### 3. Antimikroba yang mengganggu keutuhan membran sel mikroba

Membran sel berperan sebagai penghalang permeabilitas selektif, selain itu membrane sel mampu melakukan pengangkutan aktif dan mengendalikan susunan dalam sel. Konsentrasi metabolit, bahan gizi dalam sel dan tempat berlangsungnya pernafasan sel serta aktivitas biosintesis dipengaruhi oleh membran sel sehingga

jika antimikroba merusak salah satu fungsi tersebut dari membran sel maka dapat mengakibatkan gangguan dalam perkembangan sel.

#### 4. Antimikroba yang menghambat sintesis protein sel mikroba

Antimikroba yang tergolong dalam kelompok ini yaitu golongan obat makrolid, aminoglikosid, linkomisin, kloramfenikol dan tetrasiklin. Zat kimia tersebut dapat menghambat dan menghalangi proses sintesis protein. Akibatnya akan membentuk protein yang abnormal dan nonfungsional sel mikroba. Sel mikroba tidak akan hidup jika molekul-molekul protein dan asam nukleat dalam sel tidak dalam kondisi alamiahnya.

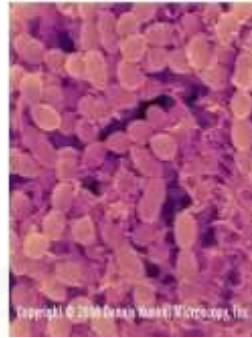
#### 5. Antimikroba yang menghambat sintesis asam nukleat sel mikroba

Antimikroba yang tergolong dalam kelompok ini yaitu golongan kuinolon dan rifampisin. Rifampisin salah satu produk derivat rifampisin yang berikatan dengan enzim polimerase-RNA (pada sub unit) sehingga dapat menghambat sintesis RNA dan DNA pada kuman. RNA, DNA dan protein memegang peranan penting didalam proses kehidupan sel. Sehingga jika terdapat gangguan pada pembentukan atau fungsi zat-zat tersebut akan mengakibatkan kerusakan secara menyeluruh pada sel.

## 2.7 Karakteristik Mikroba Rongga Mulut

### 2.7.1 *Streptococcus mutans*

*Streptococcus mutans* merupakan mikroorganisme gram positif berbentuk bulat (*cocci*) tunggal, ovoid dan tidak mudah lepas sehingga cenderung tumbuh dalam formasi rantai serta merupakan bakteri anaerob fakultatif (Sumawinata, 2004). Bakteri ini tumbuh optimal pada suhu sekitar 18°C - 40°C (Nugraha, 2008). Pada umumnya warna yang dimiliki bakteri *Streptococcus mutans* yaitu abu-abu, kuning, dan putih. Untuk diameternya berukuran sekitar 0,5-0,2 mm (Dworin *et al.*, 2006).



Gambar 2.2 *Streptococcus mutans* (Kunkel, 2006)

Populasi utama *Streptococcus mutans* yaitu pada permukaan gigi. Namun bakteri ini tidak tumbuh secara menyeluruh pada permukaan gigi, tetapi sering tumbuh pada area tertentu. Jumlah populasi *Streptococcus mutans* dipengaruhi oleh berbagai faktor yaitu sukrosa, penggunaan antibiotik, topikal aplikasi fluor, obat kumur dengan antiseptic dan *oral hygiene*. *Streptococcus mutans* biasanya ditemukan pada area proksimal gigi, pit, permukaan oklusal, fisur, gingival atau pada lesi karies gigi. Didalam mulut kuman ini ditemukan pada plak gigi, karena bakteri tersebut memerlukan permukaan yang deskkuatik (Nugraha, 2008).

*Streptococcus mutans* merupakan penyebab utama karies gigi, namun tanpa adanya faktor tertentu seperti sukrosa, bakteri ini tidak mampu menyebabkan karies (Samaranayake, 2002). Bakteri ini dapat menghasilkan beberapa enzim yaitu *glikosiltransferase* dan *fruktosiltransferase*. Enzim-enzim bersifat spesifik untuk substrat sukrosa yang digunakan untuk mensintesis glukosa dan fruktosa. Karies gigi merupakan kerusakan gigi yang bermula dari permukaan gigi lalu menjalar ke arah dalam gigi. Hal ini terjadi karena adanya pengaruh asam hasil peragian bakteri. Bakteri rongga mulut mampu mengubah karbohidrat menjadi asam sehingga melarutkan kalsium fosfat pada email sehingga menghasilkan lesi karies (Marsh, 1999).

Bakteri *Streptococcus mutans* bersifat asidogenik dan asidodurik. Asidogenik yaitu mampu menghasilkan asam sedangkan asidodurik mampu tinggal pada lingkungan asam dan menghasilkan polisakarida yang lengket yang disebut *dextran*. Hal ini yang menyebabkan lengket dan mendukung email gigi dituju oleh bakteri-bakteri lain (Nugraha, 2008).

### 2.7.2 *Candida albicans*

*Candida albicans* atau *C. albicans* merupakan salah satu fungi yang berada pada golongan khamir yang bersifat dimorfik dikarenakan kemampuannya untuk tumbuh dalam dua bentuk yang berbeda yaitu sel ragi dan hifa yang semu. Perbedaan bentuk ini tergantung dengan faktor eksternal yang mempengaruhi. Sel ragi (blastospora) berbentuk bulat, lonjong atau bulat lonjong dengan ukuran  $2-5 \mu \times 3-6 \mu$  hingga  $2-5,5 \mu \times 528 \mu$ , berdinding tipis, gram positif (Komariyah, 2012). *Candida albicans* merupakan mikroba flora normal yang mudah beradaptasi dengan baik untuk hidup pada organ manusia seperti yang ada disaluran pencernaan, selaput mukosa saluran pencernaan, vagina, uretra, kulit dibawah jari-jari kuku tangan dan kaki (Mutiawati, 2016).



Gambar 2.3 Bentuk mikroskopis *C. albicans* (Mutiawati, 2016)

*C. albicans* termasuk dalam salah satu jenis spesies jamur patogen dari golongan *ascomycota*. Pada orang yang memiliki daya tahan tubuh yang baik jamur ini bersifat apatogen, namun jika daya tahan tubuh menurun maka jamur ini dapat berubah sifat menjadi patogen dengan menimbulkan berbagai keluluh (Elya dan Soemiati, 2002). *C. albicans* penyebab penyakit kandidiasis yang merupakan infeksi jamur dengan insiden tertinggi disebabkan oleh infeksi oportunistik. Gejala kandidiasis berupa bercak berwarna putih yang konfluen dan melekat pada faring serta mukosa oral. Kandida kulit menyerang daerah intertriginosa yang mengalami maserasi serta berubah menjadi warna merah, paronikia, balanitis, ataupun pruritis ani, di daerah skrotum dan perineum dan juga disertai dengan lesi pustule yang disikrit dibagian permukaan paha. Untuk kandidiasis vulvovagina



biasanya muncul keluhan gatal, keputihan, kemerahan divagina, bahkan terkadang terasa nyeri (Mutiawati, 2016).

*C. albicans* mampu tumbuh pada media agar *saboroud*, namun dapat juga tumbuh pada media kultur biasa. *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 dkk., 1986). 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 antara 4,5 – 6,5. Maka dari itu mikroba jenis khamir ini menyebabkan 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). Hal ini menjadi permasalahan yang cukup besar bagi wanita dikarenakan penyakit kandidiasis 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). Berdasarkan dari segi banyak penyakit yang muncul disebabkan *Candida albicans* diperlukan adanya pengobatan dengan senyawa alternatif yang lebih aman dan tidak berbahaya jika dikonsumsi terus menerus seperti flavanoid, tannin, dan polifenol yang terdapat dalam buah anggur merah (Tilong, 2012). Selain itu, dalam beberapa studi penelitian menunjukkan bahwa kandungan ekstrak daun tembakau dapat bersifat antimikroba (Duangsri dkk., 2012).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember dan Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember. Waktu penelitian dimulai pada bulan Oktober 2018 sampai Juni 2019.

### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu, shaker waterbath (Menmert D-91126, Jerman), rotary evaporator (Butchi, Jerman), blender (Miyako, Indonesia), spektrofotometer (Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS, China), alat LC-MS (Shimadzu LC-MS 2020), pipet mikro (Biohit 12636255, Jerman), *laminar air flow* (Crumair, Spanyol), autoklaf (Hirayama HL 36, Jepang), inkubator (Haraeus Inst B6200, Jerman), *colony counter* (Stuart Scientific) dan neraca analitik (MATRIX type Esj 210-4B), gelas ukur 500 ml (pyrex, Jerman), cawan petri (Pyrex, Jerman), tabung reaksi (Pyrex, Jerman), spatula, lemari pendingin (Toshiba)

#### 3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan yaitu daun tembakau *Na-Oogst* afkir yang diperoleh dari perkebunan PTPN X Ajong Gayasan Jember,  $\text{Na}^2\text{CO}^3$ , media TSA (Tryptone Soya Agar), media SDA (Sabouraud Dextrose Agar), aquades, etanol 96%, etanol pro *analysis*, DPPH (*1,1 diphenyl-1-2-Picrylhidrazil*), DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) 2%, larutan garam fisiologis 0,85% reagen *Follin-Ciocalteau*. Bakteri yang digunakan yaitu kultur murni bakteri *Streptococcus mutans* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan kultur fungi *Candida albicans* ATCC-10231 yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan dengan menggunakan 1 sampel dengan 2 faktor yaitu perbedaan jenis pelarut ekstraksi (air dan etanol) dan konsentrasi ekstrak daun tembakau (0, 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 ml). Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 3.1 dan Tabel 3.2.

Tabel 3.1 Rancangan percobaan ekstrak daun tembakau

Jenis pelarut	Perlakuan
P1 (Air 90°C)	450 ml
P2 (Etanol 80%)	450 ml

3.2 Rancangan pengujian antimikroba ekstrak daun tembakau

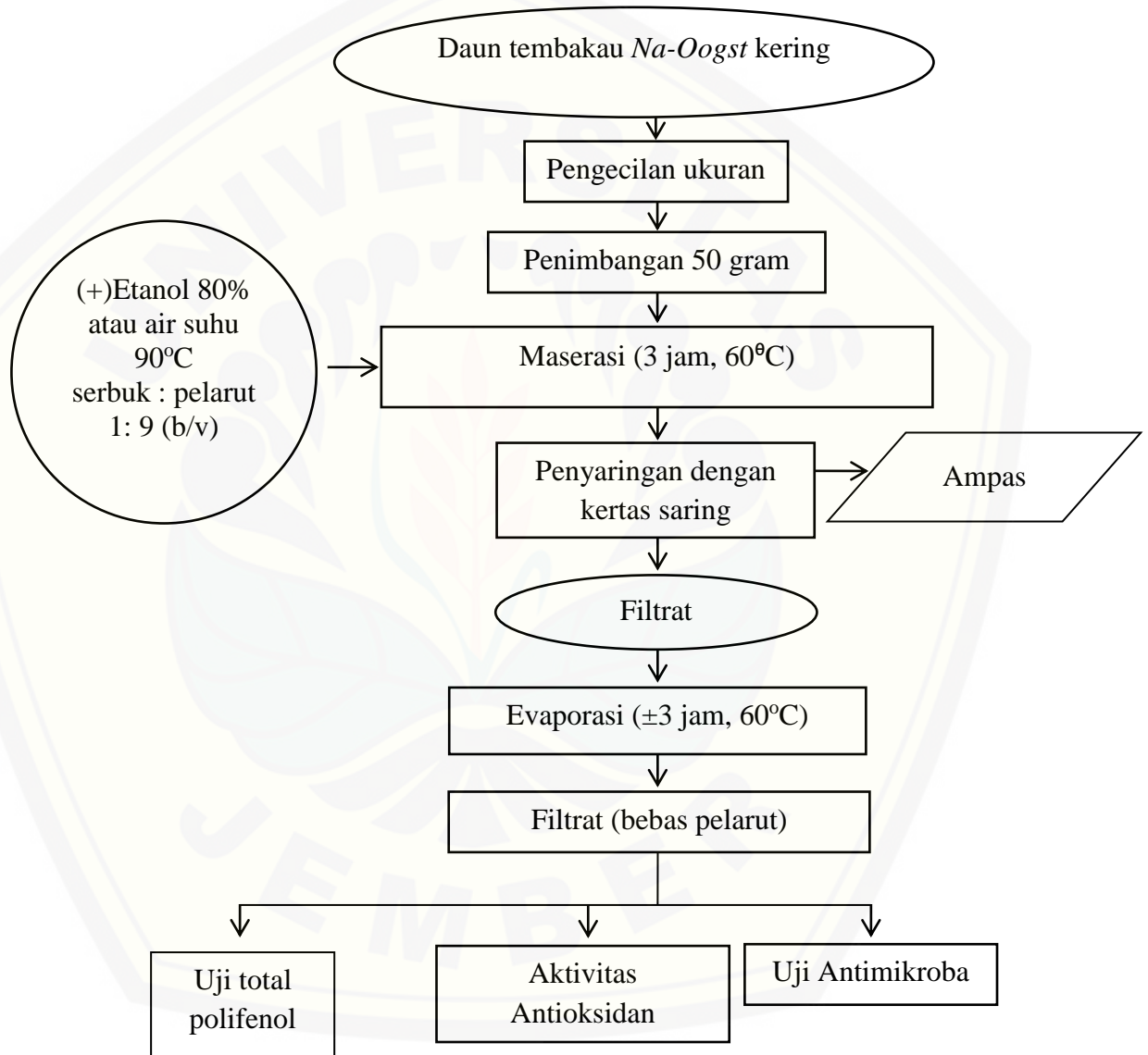
Perlakuan	Jenis Mikroba	
	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Candida albicans</i>
Konsentrasi Ekstrak Tembakau (ml)	0	0
	0,2	0,2
	0,4	0,4
	0,6	0,6
	0,8	0,8
	1	1
DMSO 2% (µl)	20	0

### 3.4 Tahap Prosedur Penelitian

Langkah awal dalam penelitian ini adalah memisahkan kotoran yang melekat pada daun tembakau *Na-Oogst* afkir lalu dikering anginkan selama 21 hari pada suhu kamar dan selanjutnya pengecilan ukuran menjadi serbuk menggunakan blender. Tahap selanjutnya yaitu serbuk daun tembakau ditimbang 50 gram lalu dimasukkan kedalam Erlenmeyer 500 ml dan ditambahkan etanol 80% sebanyak 450 ml dengan rasio 1: 9 (b/v) atau ditambahkan air panas (90°C) sebanyak 450 ml, perlakuan ini dilakukan sebanyak tiga kali. Tahapan selanjutnya dilakukan pengekstrakan menggunakan *shaker waterbath* dengan suhu 60°C selama 3 jam. Setelah diekstrak dilakukan penyaringan dengan kertas dan kain saring untuk memisahkan supernatan dengan filtratnya. Filtrat yang diperoleh kemudian di *rotary evaporator* dengan suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak pekat.



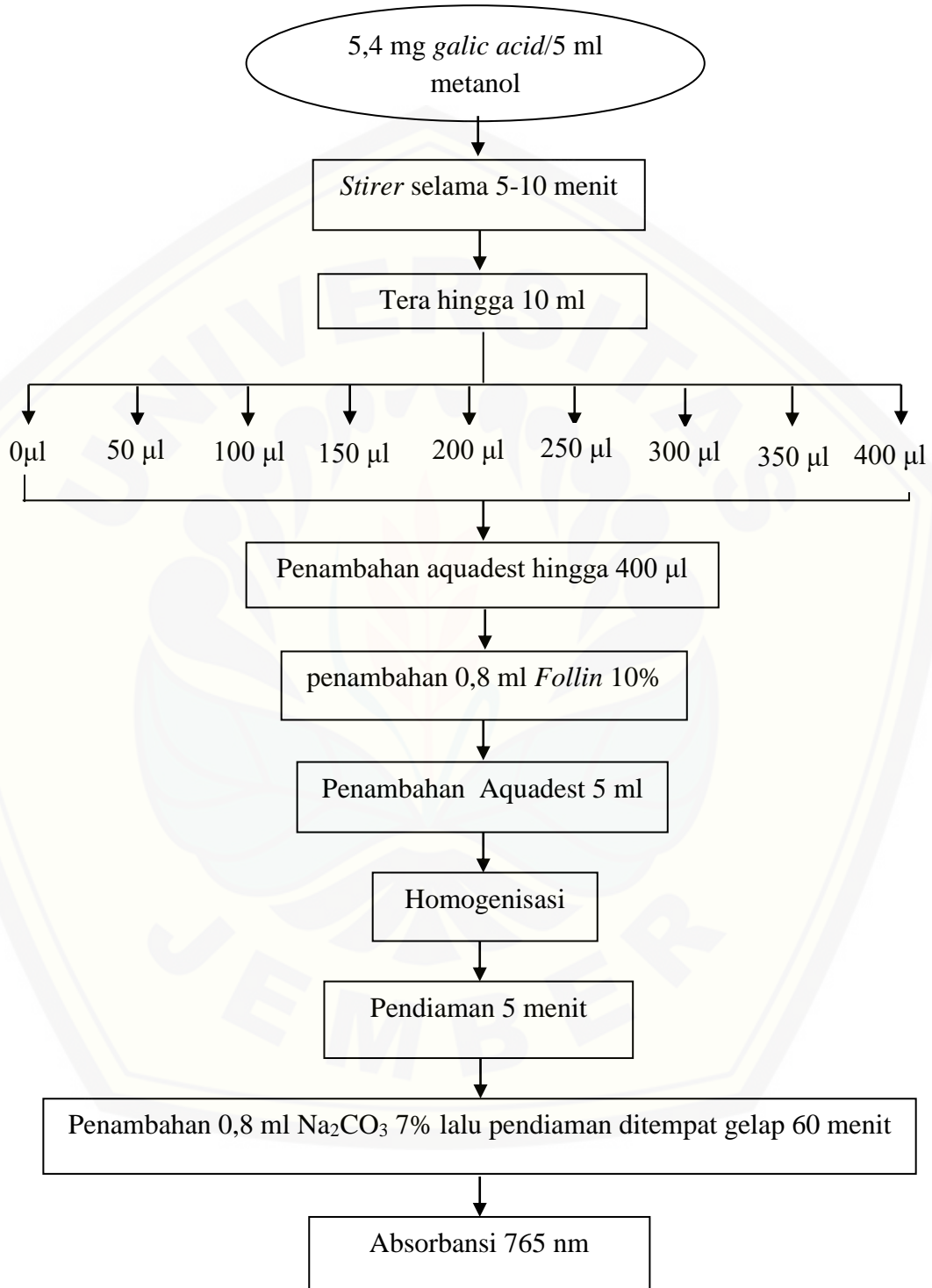
Ekstrak pekat yang didapatkan diuji total polifenol dan aktivitas antioksidannya, lalu hasil pengujian terbaik akan diuji lebih lanjut aktivitas antimikrobanya terhadap *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans*. Diagram alir pembuatan ekstrak daun tembakau dapat dilihat pada Gambar 3.1



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

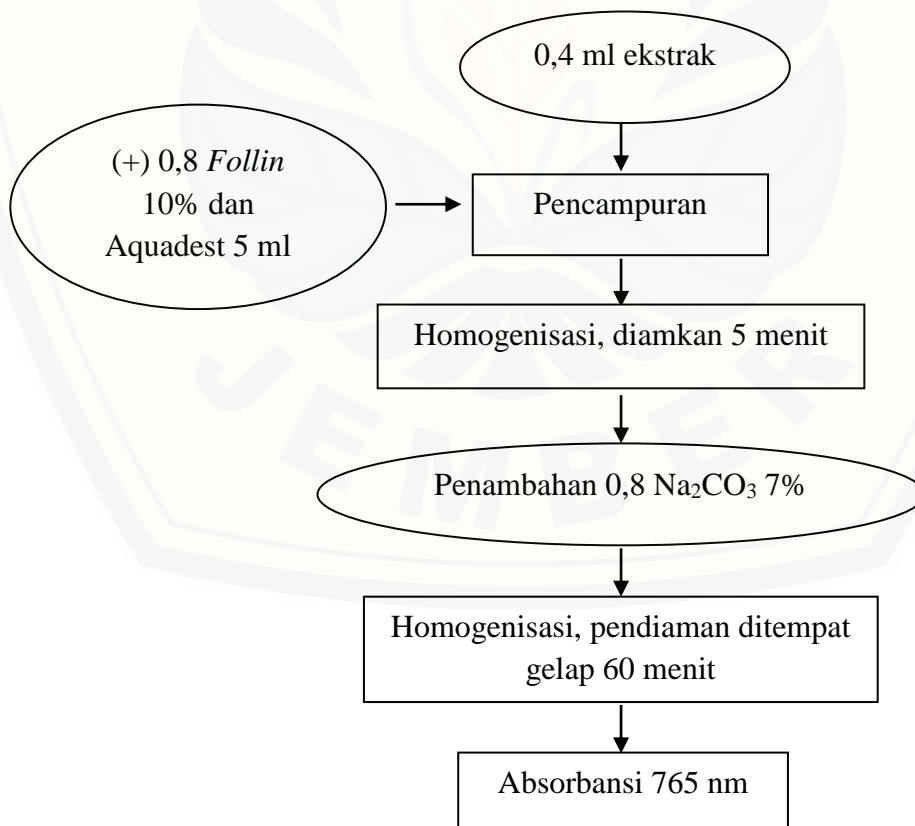
### 3.5 Prosedur Pengamatan

#### 3.5.1 Uji Total Polifenol (Metode *Follin-ciocalteau*) (Othman *et al.*, 2007)



Gambar 3.2 Diagram alir pembuatan kurva standard (Singelton dan Rossi, 2007)

Perhitungan kandungan total polifenol dalam ekstrak daun tembakau ditentukan dengan cara spektrofotometri yang menggunakan metode *Follin-ciocalteau* (Singelton dan Rossi, 2007). Pembuatan kurva standar untuk perhitungan polifenol dibuat dengan cara menggunakan larutan asam galat dalam metanol (5,4 mg *galid acid*/ 5 ml). Kemudian larutan asam galat di *stirrer* selama 5-10 menit dan ditera sampai mencapai 10 ml. Selanjutnya persiapan 9 tabung reaksi masing-masing diisi dengan asam galat dengan jumlah pengambilan (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 dan 400  $\mu$ l) dan penambahan aquades sampai 400  $\mu$ l. Hasil larutan asam galat tersebut ditambahkan 0,8 ml *reagen Follin-Ciocalteu* 10% dan 5 ml aquadest pada masing-masing tabung reaksi lalu dilakukan pengocokan menggunakan vortex setelah itu didiamkan selama 5 menit. Tahapan selanjutnya ditambahkan 0,8 ml larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7% dan setelah itu dibungkus atau ditutup rapat dengan aluminium foil lalu didiamkan ditempat gelap selama 60 menit, setelah itu dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 765 nm.



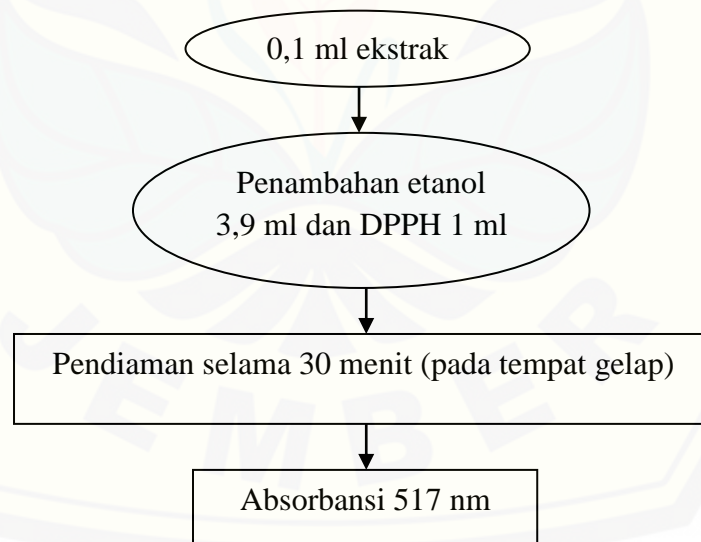
Gambar 3.3 Diagram alir uji total polifenol ekstrak daun tembakau *Na-Oogst*

Pengujian analisa total polifenol ini terdapat sampel yang diuji berupa ekstrak pekat. Sebanyak 0,4 ml sampel ekstrak tembakau (sudah diencerkan 1/200 ; 1/300 ; 1/400 ; 1/500 ), lalu ditambahkan 0,8 ml reagen *Follinciocalteau* 10% dan 5 ml aquadest, kemudian dilakukan pengocokan menggunakan vortex dan didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya tambahkan 0,8 ml larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7% lalu divortex dan diamkan selama 60 menit dengan cara ditutup semua lapisan tabung reaksi menggunakan aluminium foil. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 765 nm.

Analisa kandungan total polifenol pada sampel dihitung berdasarkan kurva standar asam galat yang diperoleh. Nilai absorbansi (y) dimasukkan pada persamaan kurva standar asam galat, sehingga diperoleh nilai (x) yang kemudian dikali faktor pengenceran, lalu hasil perhitungan dibagi dengan berat sampel yang digunakan untuk analisa.

$$\text{Total Polifenol (mg GAE/ml)} = \frac{X \times \text{faktor pengenceran}}{\text{berat sampel}} \times 100$$

### 3.5.2 Uji Antioksidan Metode DPPH



Gambar 3.4 Diagram alir uji aktivitas antioksidan ekstrak daun tembakau *Na-Oogst*

Pengujian aktivitas antioksidan pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (*1,1-diphenyl-1-2-Picrylhidroksil*) secara spektrofotometri. Langkah awal yang dilakukan yaitu persiapan bahan uji dengan

cara ekstrak daun tembakau sebanyak 0,1 ml diencerkan menjadi 1 ml menggunakan aquades. Tahap selanjutnya yaitu pembuatan larutan pereaksi yang diawali dengan penimbangan serbuk DPPH sebanyak 0,0039432 gram, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 25 ml dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas, sehingga akan diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 0,4 mM. Tahap penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara sebanyak 0,1 ml ekstrak daun tembakau yang telah diencerkan dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1 ml DPPH 0,4 mM dan 3,9 ml etanol. Larutan ini kemudian divortex dan didiamkan selama 30 menit dengan ditutup menggunakan alummunium foil dan ditempatkan pada tempat gelap. Setelah didiamkan selama 30 menit, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Blanko yang digunakan dibuat dengan cara mengganti sampel dengan aquades. Aktivitas antioksidan dapat dihitung menggunakan rumus:

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

### 3.5.3 Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun Tembakau

Pengujian antimikroba pada ekstrak daun tembakau jenis *Na-Oogst* terhadap *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans* menggunakan pengukuran nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) yang dapat ditentukan dengan metode dilusi padat dan penentuan nilai IC<sub>50</sub> (*Inhibition Concentration*) dengan cara menghitung jumlah koloni dengan menggunakan satuan CFU/ml. KHM merupakan konsentrasi terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara optimal (lebih dari 90%) (Ratna *et al.*, 2016).

#### a. Sterilisasi alat dan bahan

Semua alat yang terbuat dari kaca atau gelas seperti gelas ukur, tabung reaksi dan lain lain disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu temperature 121°C selama 15 menit. Untuk semua alat yang terbuat dari plastik dicuci bersih dan dikeringkan kemudian diulas menggunakan alkohol 70% (Cappucino dan Sherman, 2005). Hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya kontaminasi mikroba yang tidak diinginkan yang terdapat pada alat.



b. Pembuatan larutan uji

Mula-mula yaitu membuat larutan stok dengan konsentrasi 20%, dengan cara mengambil ekstrak pekat daun tembakau sebanyak 2 ml lalu dimasukkan kedalam labu ukur dan ditambahkan aquades steril hingga batas. Larutan stok yang telah dibuat kemudian diambil secara berurut-urut sebanyak 0, 200, 400, 600, 800, dan 1000  $\mu$ l. setelah itu, ditambahkan DMSO (Dimethyl Sulfoxide) masing-masing sebanyak 20  $\mu$ l untuk perlakuan *Streptococcus mutans*, sedangkan *Candida albicans* tanpa penambahan DMSO.

c. Pembuatan media TSA

Media yang digunakan untuk pertumbuhan *Streptococcus mutans* yaitu media kultur TSA (*Tryptone Soya Agar*) dengan cara 4 gram bubuk TSA dilarutkan dalam 100 ml aquades yang telah dihangatkan kedalam erlenmeyer selanjutnya dilakukan pengadukan. Media yang dibuat disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit setelah selesai diautoklaf didiamkan hingga memadat. Selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin.

d. Pembuatan media SDA

Membuat media kultur SDA (*Sabouround's Dextrose Agar*) untuk media pertumbuhan jamur *Candida albicans* dengan cara mencampurkan 6,5 gram bubuk SDA dan 100 ml aquades yang telah dipanaskan didalam erlemeyer. Campuran tersebut lalu diaduk hingga homogen kemudian disterilkan dengan autoklaf 121°C selama 15 menit setelah selesai diautoklaf didiamkan hingga memadat. Selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin.

e. Pembuatan isolat bakteri

Preparasi biakan bakteri, diawali dengan sebanyak 1 ose kultur murni bakteri *Streptococcus mutans* digoreskan pada media miring agar TSA sebanyak 5 ml dengan pola zig-zag yang dilakukan dengan teknik aseptis. Selanjutnya, biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

f. Pembuatan isolat kapang

Preparasi biakan bakteri, diawali dengan sebanyak satu ose kultur murni bakteri *Candida albicans* ditempelkan pada media miring agar SDA sebanyak 5



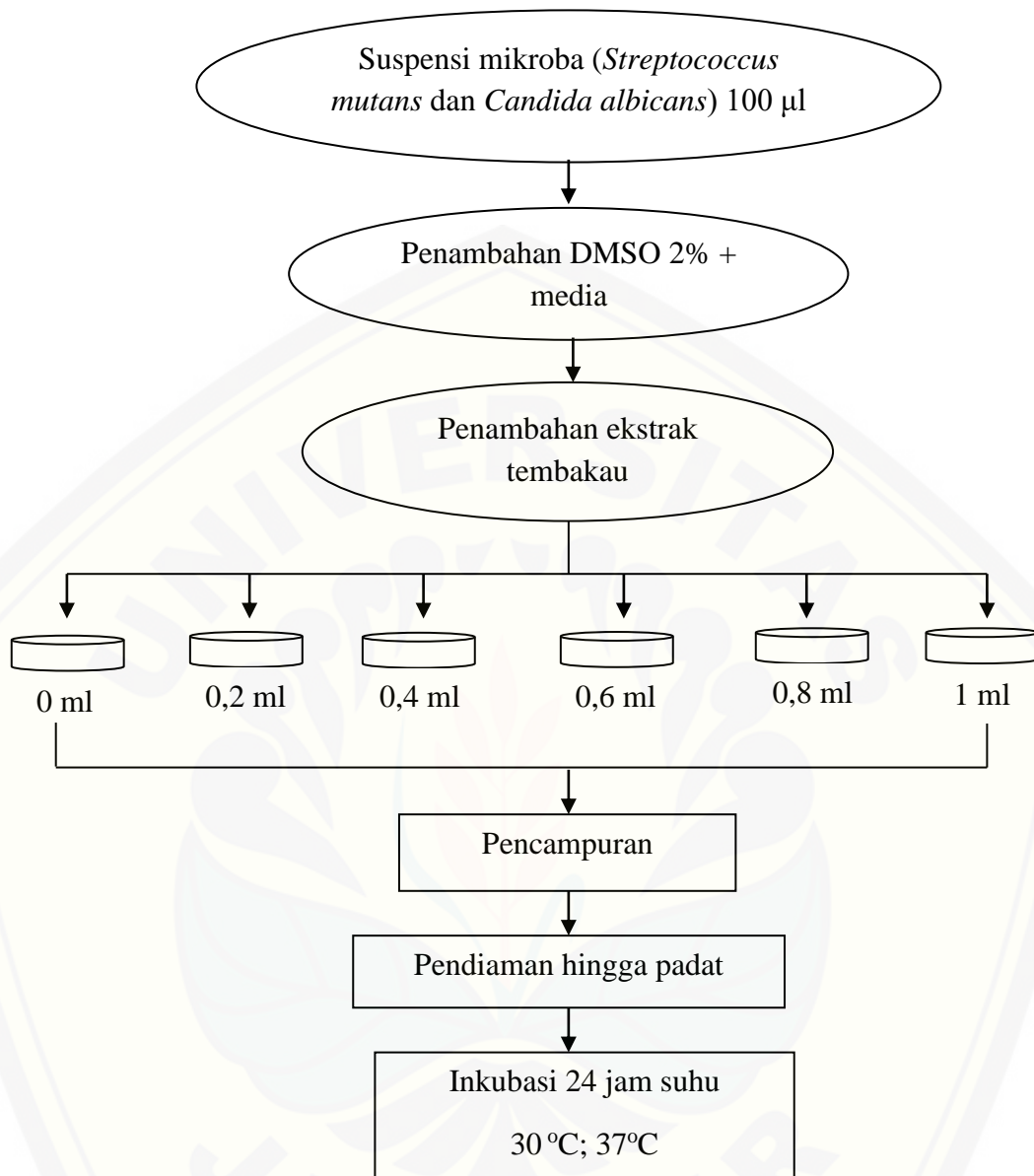
ml dengan pola zig-zag yang dilakukan dengan teknik aseptis. Selanjutnya, biakan diinkubasi pada suhu 31°C selama 24 jam.

g. Pembuatan suspensi mikroba (WHO, 2009 dalam Yanti dkk, 2016)

Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* atau suspensi *Candida albicans* dilakukan pengambilan satu ose steril bakteri *Streptococcus mutans* atau *Candida albicans* dari sediaan biakan, kemudian dimasukkan kedalam *ependorf* yang berisi 1 ml aquadest steril. Selanjutnya campuran suspensi di vorteks skitar 15 detik. Selanjutnya dilakukan pengambilan 0,1 ml dan dimasukkan pada *ependorf* yg berisi 0,9 ml aquadest steril. Kegiatan tersebut dilakukan hingga pengenceran  $10^{-5}$ .

h. Uji Aktivitas antimikroba metode dilusi padat agar

Uji aktivitas antimikroba daun tembakau dilakukan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimum) dan nilai  $IC_{50}$  pada bakteri *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans* menggunakan metode dilusi agar dengan menghitung jumlah koloni. Mula-mula sebanyak 100  $\mu$ l suspensi bakteri yang telah dibuat (pengenceran  $10^{-5}$ ) dimasukkan ke masing-masing cawan petri. Penambahan DMSO 20  $\mu$ l untuk pengujian bakteri *Streptococcus mutans*. Larutan uji yang telah dibuat dengan berbagai konsentrasi ditambahkan kedalam cawan petri tersebut, lalu ditambahkan media SDA dan TSA sebanyak 5 ml pada masing-masing cawan petri. Kemudian diratakan dan didiamkan hingga memadat lalu diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah koloni pada cawan petri menggunakan *colony counter*.



Gambar 3.5 Diagram alir uji antimikroba ekstrak daun tembakau *Na-Oogst*

### 3.6 Parameter Pengamatan

Pengujian ekstrak tembakau digambarkan dengan beberapa parameter pengamatan yaitu :

- Total polifenol (Metode Follin Ciocalteu)
- Aktivitas antioksidan
- KHM (Kadar Hambat Minimum) dan  $IC_{50}$  (Inhibition Concentration ) pada bakteri *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans*

### 3.7 Analisa Data

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



## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Jenis pelarut yang efektif untuk mengekstrak daun tembakau *Na-Oogst* adalah pelarut etanol 80%, karena memiliki tingkat polaritas yang lebih rendah dibandingkan dengan pelarut air panas. Total polifenol yang dihasilkan menggunakan pelarut etanol 80% mencapai 95,06 mg GAE/ml sedangkan pelarut menggunakan air panas 90°C menunjukkan hasil terendah yaitu 55,15 mg GAE/ml.
2. Pengujian antioksidan ekstrak daun tembakau *Na-Oogst* dengan pelarut etanol 80% sebesar 83,76%, sedangkan pelarut menggunakan air panas 90°C menunjukkan sebesar 59,24% yang disebabkan oleh kandungan total polifenol.
3. Ekstrak daun tembakau *Na-Oogst* memiliki daya antijamur terhadap *Candida albicans* dan antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*. Pelarut menggunakan etanol 80% memiliki daya antimikroba paling efektif dibandingkan dengan pelarut air suhu 90°C.

### 5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan pada penelitian ini yaitu sebaiknya lebih diperhatikan kembali terkait faktor-faktor yang mempengaruhi hasil ekstraksi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, B. 2007. *Chemistry of Natural Products*. New Delhi: Departement of Pharmaceutical Chemistry Faculty of Science Jamia Hamdard.
- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas *Salmonella Typhimurium* Terhadap Ekstrak Daun Psidium GuajavaL. *Journal Bioscientie*. 1(1): 31 – 8.
- Anumudu CK, Nwachukwu MI, Obasi CC, Nwachukwu IO, Ihenetu FC (2019) Antimicrobial Activities of Extracts of Tobacco Leaf (*Nicotiana tabacum*) and Its Grounded Snuff (Utaba) on *Candida albicans* and *Streptococcus pyogenes*. *J Trop Dis* 7: 300
- Ardwiantoro, A. (2011). *Metabolit Sekunder*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Arenas R., Esrada R. 2001. *Tropical Dermatology*. Georgetown: Landes Bioscience. 17-22.
- Arif T, Bhosale JD, Kumar, Naresh, Mandala TK, Bendre RS, Lavekar GS and Rajesh Dabur. Natural Products – Antifungal Agents Derived From Plants. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2009; 7(7):621–638.
- Badan Pusat Statistik Kabupaten Jember. 2018. *Kabupaten Jember Dalam Angka 2017*. Jember: BPS Kabupaten Jember.
- Bakht, J., Azra, dan M. Shafi. 2012. Antimicrobial Activity of *Nicotiana tabacum* Using Different Solvents Extracts. *Pak. J. Bot*. 44(1): 459 – 463.
- Bangham, A. D., dan R. W. Horne. 2006. Actions Saponins on Biological Cell Membranes. *Journal Nature*. 196: 952 – 953.
- Berlian, Zinal., Fitratul Aini., Weni Lestari. 2016. Aktivitas Antifungi Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum americanum* L.) terhadap Fungi *Fusarium oxysporum* Schlecht. *Jurnal Biota*. 2 (1) : 99 – 105.
- Bina UKM. 2010. Panen dan Pasca Panen dalam Budidaya Tembakau. Tersedia di :<http://binaukm.com/2010/05/panen-dan-pascapanen-dalam-budidaya-tembakau/> (diakses tanggal 20 Maret 2011)
- Budiarso, F. S., Suryanto., E. dan Yudishtira, A. 2017. Ektraksi dan Aktivitas Antioksidan dari Biji Jagung Manado Kuning (*Zea mays* L). *Jurnal Ilmiah Farmasi*. UNSRAT. Vol.6 No. 3 ISSN 2302 - 2493
- Cahyono, B. 1998. *Tembakau, Budidaya dan Analisis Tani*. Yogyakarta: Kaninus
- Cappucino, J. G., dan Sherman, N. 2005. *Microbiology: A Laboratory Mannual*. San Fransisco: Person Benjamin Cumming.



- Cavalieri, S.J., I.D. Rankin., R.J. Harbeck., R.S. Sautter., Y.S. McCarter., S.E. Sharp., J.H. Ortez., dan C.A. Spiegel. 2005. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. USA: American Society for Microbiology.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cetakan Pertama. Jakarta: Depeks RI.
- Dhamawati, I. 2011. *Efek Ekstrak Mengkudu dalam Menghambat Pertumbuhan Streptococcus mutans Penyebab Dental Plak secara in vitro*. Bali: Universitas Udayana.
- Duangri, P., Juntarapan, K., dan Sathirapipathkul, C. 2012. *The Tobacco Leaf Extract and Antibacterial Activity In Textile*. Bangkok Thailand: RMUTP International Conference: Textiles & Fashion.
- Elya, B., Soemiati, A dan Farida. 2009. Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Manggis Hutan (*Garcinia rigida* MIQ), *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 6: 09-17.
- Eurika, N., dan A.I. Hapsari. 2017. Analisis Potensi Tembakau Na Oogst sebagai Sumber Belajar Biologi. *Jurnal Biologi dan Pembelajaran Biologi*. 2(2).11-22 .ISSN 2527-7111 : ISSN 2528-1615.
- Fathiazad, F., Delazar, A., Amiri, R., dan Sarker, S.D. 2005. Extraction of Flavonoid and Quantification of Rutin from waste Tobacco Leaves. *Iranian Journal of Pharmaceutical*, 3: 222-227.
- Firdiyani F, Agustini TW, Ma'ruf WF. 2015. Ekstraksi senyawa bioaktif sebagai antioksidan alami *Spirulina platensis* segar dengan pelarut yang berbeda. *JPHPI* 18(1):28- 37
- Gritter, R. J., J. M. Bobbit, dan A. E. Schwarting. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Bandung: ITB Press.
- Hardiningtyas, S. D. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Karang Lunak Sarcophyton sp. yang Difragmentasi dan Tidak Difragmentasi Di Perairan Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu. (*Skripsi*). FMIPA. IPB.
- Hermawan, S. Nasution, Y. R. A. dan Hasibuan, R. 2012. Penentuan Efisiensi Inhibisi Korosi Baja Menggunakan Ekstrak Kulit Buah kakao. *Jurnal Teknik Kimia*. 1(2):23-24.
- Huang D., B. Ou, R. L. Prior. 2005. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agricultural and Food*. 53: 1841 – 1856.
- Jawetz, E., J. L. Melnick, E. A. Adelberg, G. F. Brooks, J. S. Butel, dan L. N. Ornston. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran*. Diterjemahkan Hartanto, H., C. Rachman, A. Dimanti, dan A. Diani. Edisi ke 20. ECG. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran.



- Juliantina, F. R., D. A. Citra, B. Nirwani, T. Nurmasitoh, dan E. T. Bowo. 2009. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Agen Antibakteri Terhadap Gram Positif dan Gram Negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*. 1(1): 12 – 20.
- Jupriadi, L. 2011. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Waru (*Hibiscus tilaceus* L.) terhadap Jamur *Malassezia furfur*. Skripsi. Program Studi Farmasi Stikes Ngudi Waluyo Ungaran, Semarang.
- Komariyah, Ridhawati Sjam. 2012. Kolonisasi *Candida* dalam Rongga Mulut. *Majalah Kedokteran FK UI*. 28 (1).
- Kunkel, D. 2006. *Microscopy of Streptococcus mutans*. (on line). <http://www.denniskunkel.com/DK/DK/Bacteria/97700A.html>. [17 Juli 2011].
- Kurniawan, R., Usmadi., dan J. A. Arifandi. 2011. Kualitas Tembakau Besuki *Naoogst* pada Lahan yang Dipupuk Menggunakan Pupuk Alam dan Urea. *Berkala Ilmiah Pertanian*.
- Lingga, Lanny. 2012. *The Healing Power of Antioxidant*. Jakarta: Elex Media Komputindo.
- Madduluri, Suresh. Rao, K. Babu. Sitaram, B. In Vitro Evaluation of Antibacterial Activity of Five Indigenous Plants Extract Against Five Bacterial Pathogens of Human. 2013. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5(4): 679-684.
- Markham, K.R., 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, 15, Penerbit ITB, Bandung.
- Marsh, P. dan Martin, M. V. 1999. *Oral Microbiology*. 4th edition. Great Britain: MPG Books Ltd.
- Martinus, B.A, Arel, A., dan Gusman, A. 2014. Perbandingan Kadar Fenolat Total Dan Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Daun Teh (*Camellia Sinensis* [L.] O. K.) Dari Kayu Aro Dengan Produk The Hitamnya Yang Telah Beredar. *Scientia*. 4 (2) : 52-54.
- Middleton, E., dan Chitan, K. 2000. The Impact of Plant Flavonoids on Mammalian Biology: Implication for Immunity, Inflammation and Cancer di dalam Harborne, J. B. The Flavonoids. London: Chapman and Hall.
- Mutiawati, Vivi Keumala. 2016. Pemeriksaan Mikrobiologi pada *Candida albicans*. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*. 16(1): 53-54.

- Ningsi, A.L. 2018. Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Daun Tembakau (*Nicotiana Tabacum* L.) Yang Berasal Dari Desa Cabbenge Kabupaten Soppeng. (Skripsi). Makassa : Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin.
- Nugraha, A. W. 2008. *Streptococcus mutans, si Plak Dimana-mana*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
- Nuraeni, K., Y. Wibisono, dan Idrial. 2017. *Mikrobiologi Pangan dan Pengolahan*. Jember: Politeknik Pertanian Negeri Jember.
- Nuryani, S. dan Jhunnison. 2016. Daya Antifungi Infusa Daun Kenikir (*cosmos caudatus* k.) Terhadap Pertumbuhan Jamur *Candida albicans* Secara *in Vitro*. *Teknolabjournal*. Vol. 5, No. 1. ISSN: 2338 - 5634
- Paramartha, D., dan Y, Lazuardi. 2013. Pemanfaatan Nikotin Pada Daun Tembakau untuk Memproduksi Bioinsektisida dengan Proses Ekstraksi Cair-Cair. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. 2(2): 233-239.
- Parwati, N, N, D., U, Vipriyanti., dan D, Tariningsih. 2017. Strategi Pengembangan Tanaman Tembakau di Subak Abian Geluwung, Kabupaten Karangasem Bali. *Agrimeta*. 7(13) ISBN : 2088-2521.
- Podlejski, J., dan Olejniczak, W. 1983. *Methods and Techniques in Research of Tobacco Flavour*. *Nahrung*, 27 (5): 429-436
- Praptiwi, Dewi, P. & Harapini, M., 2006, Nilai peroksida dan aktivitas anti radikal bebas diphenyl picril hidrazil hydrate (DPPH) ekstrak metanol Knema laurina, *Majalah Farmasi Indonesia*, 17(1), 32 –36.
- Prastama, A.Y. 2012. Perbandingan Efektivitas Rebusan Daun Tembakau (*Nicotiana Tabacum*) Dan *Sodium Hypochlorite* Sebagai Pembersih Gigi Tiruan Resin Akrilik Terhadap Pertumbuhan *Candida Albicans*. (Skripsi). Jember : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Putri, R.H., I, Barid., dan B, Kusumawardani. 2014. Daya Hambat Ekstrak Daun Tembakau Terhadap Pertumbuhan Mikroba Rongga Mulu. *Stomatognatic (J. K. G Unej)*. 11(2): 27-31.
- Ratna, Y. R. D., U. S. Ardani, Z. Fathiana, A. Rahmatillah, dan I. Trisharyanti. 2016. Daya Antibakteri Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

- Sensitif dan Multiresisten. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 14(1): 103-110.
- Refdanita, Maksum, R., Nurgani, A., dan Endang, P. 2004. Faktor yang Mempengaruhi Ketidaksesuaian Penggunaan Antibiotika dengan Uji Kepekaan di Ruang Intensif Rumah Sakit Fatmawati Jakarta Tahun 2001-2002. *Makara, Kesehatan* 8 (1): 21- 26.
- Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS). 2018. *Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia*.
- Rivai, H., Widiya, E., dan Rusdi. 2013. Pengaruh Perbandingan Pelarut Etanol-Air Terhadap Kadar Senyawa Fenolat Total Dan Daya Antioksidan Dari Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata L*). *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*.18 (1) : 35-42.
- Rusli, M. S., Suryani., dan Puspita, P. E. 2011. *Antibacterial Activity of Temanggung Tobacco Extract Variety Genjah Kemloko*. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Sabir, Ardo. 2005. *Aktivitas Antibakteri Flavonoid Propolis Trigona sp Terhadap Bakteri Streptococcus mutans (in vitro)*. *Maj. Ked. Gigi. (Dent. J.)*. 38(3): 135 – 141.
- Samarayanake, L. P. 2002. *Essential Mikrobiologi for Dentistry second edition*. Philadelphia, United States of America: Elsevier's Health Sciences Rights Departement.
- Sari, W.U., Daryanto. A., dan Rujito, H. 2014. Strategi Peningkatan Daya Saing Tembakau Besuki *Na-Oogst* Berbasis Perbaikan Kinerja Mutu. *Jurnal Manajemen & Agribisnis*. 11(2): 100-101.
- Savira, A. A. 2018. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kasturi (Nicotiana tabacum L.) Terhadap Bacillus subtilis dan Escherichia coli. (Skripsi)*. Jember : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Shivaprasad, H.N., S. Mohan, M.D. Kharya. 2005. *In-vitro Models for Antioxidant Activity Evaluation*. A. Riew. <http://www.pharmainfo.net>
- Sholeh, M., A. Rachman, dan Machfudz. 2000. Pengaruh Komposisi Pupuk Ks, Za, dan Urea, Serta Dosis N Terhadap Mutu Tembakau Besuki. *Jurnal Littri*. 6(3): 80 – 87.

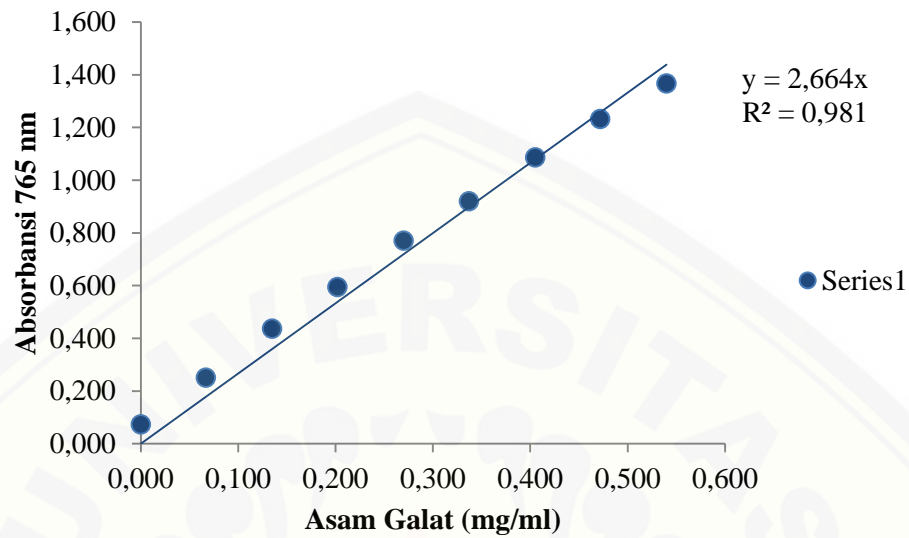
- Siregar, Ameilia Zuliyanti. 2016. Literasi Inventarisasi Hama dan Penyakit Tembakau Deli di Perkebunan Sumatera Utara. *Jurnal Pertanian Tropik ISSN online : 2356 – 4725*. 3 (3) : 206–207.
- Sirwutubun, M. , Ludong, M.M., dan Rawung, D. 2015. Pengaruh Konsentrasi Etanol Terhadap Karakteristik Ekstrak Pewarna Alami Buah Merah (*Pandanus Conoideus Lamk.*) Dan Aplikasinya Pada Produk Pangan. Jurusan Teknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sam Ratulangi Manado Korespondensi.
- Staib, P.,Morschhauser, J. 2007. Chlamyospore formation in *C. albicans* and *Candida dubliniensis*. *Enigmatic Developmental Programme*. 55:637-652.
- Sudaryono. 2004. Rekayasa Lingkungan dengan Naungan Tertutup Untuk Perbaikan Kualitas dan Produktivitas Tembakau Rakyat di Sleman, Jogjakarta. *J. Teknologi Lingkungan*. 5(2): 122 – 127.
- Sumawinata, Narlan. 2004. *Senarai Istilah Kedokteran Gigi Inggris-Indonesia*. Jakarta: EGC.
- Susi.,Bachtiar, H., dan Sali, N. 2015. Perbedaan Daya Hambat Pasta Gigi Berbahan Herbal Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus Mutans* *Jurnal MKA*. 38 (2) : 16-17.
- Susilowati, E. Y. 2006. Identifikasi Nikotin dari Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum*) Kering dan Uji Efektifitas Ekstrak Daun Tembakau Sebagai Insektisida Penggerak Batang Padi (*Scirpo phagainnonata*). *Tesis*. Semarang: Universitas Negeri Semarang.
- Taiga, A., dan Friday, E. 2009. Variation in Phytochemical Properties of Selected Fungicidal Aqueous Extracts of Some Plant Leaves in Kogi State, Nigeria. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agricultural*, 3 (3): 407-409.
- Tambun, R. 2016. Pengaruh Ukuran Partikel, Waktu Dan Suhu Pada Ekstraksi Fenol dari Lengkuas Merah. *Jurnal Teknik Kimia USU*. 5(4): 1 53-56.
- Waluyo, L. 2004. *Mikrobiologi Umum*. Umm : Malang
- Wahdaningsih, S., Setyowati, E, p., dan Wahyuono, S. 2011. Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas dari Batang Pakis (*Alsophila glauca J. Sm*). *Majalah Obat Tradisioanl*, 16(3), 156 – 160.



- WHO. 2009. *Laboratory Manual for Diagnosis of Fungal Opportunistic Infections in HIV/AIDS Patients*. India : World Helath House.
- Widowati, W., Safitri, R., Rumumpuk, R., dan Siahaan, M. 2005. Pernapasan Aktivitas Superoksida Dismutase pada Berbagai Tanaman. *Universitas Kristen Maranatha Bandung, MKU, Universitas Padjadjaran Bandung, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Manado, Fakultas MIPA Uniersitas Advent Indonesia Bandung, Fakultas MIPA*. 5 (1): 33-48.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Yun, D.-J., Ibeas, J. I., Lee, H., Coca, M. A., Narasimhan, M. L., Uesono, Y., Bressan, R. A. (1998). *Osmotin, a Plant Antifungal Protein, Subverts Signal Transduction to Enhance Fungal Cell Susceptibility*. *Molecular Cell*, 1(6), 807–817. doi:10.1016/s1097-2765(00)80080-5

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

## 1. Kurva Standart Asam Galat



Asam Galat (mg/ml)	Absorbansi
0,000	0,0735
0,067	0,2505
0,135	0,4365
0,202	0,5940
0,270	0,7705
0,337	0,9200
0,405	1,0865
0,472	1,2320
0,540	1,3665



2. Total Polifenol Ekstrak Daun Tembakau

Jenis Pelarut	Pengenceran (kali)	Ulangan	Absorbansi	Asam Galat (mg/ml)	Konsentrasi ekstrak	Rerata Asam Galat (mg/ml)	Rerata	SD
Etanol 80%	500x	U1	0,563	0,21134	105,6682	105,7620	95,0638	9,276786
			0,564	0,21171	105,8559			
		U2	0,475	0,17830	89,1517	89,2455		
			0,476	0,17868	89,3393			
		U3	0,481	0,18056	90,2778	90,1839		
			0,480	0,18018	90,0901			
Air panas 90°C	500x	U1	0,273	0,10248	51,2387	51,3326	55,1489	6,287771
			0,274	0,10285	51,4264			
		U2	0,332	0,12462	62,3123	62,4062		
			0,333	0,12500	62,5000			
		U3	0,275	0,10323	51,6141	51,7080		
			0,276	0,10360	51,8018			

Lampiran 4.2 Perhitungan Aktivitas Antioksidan

Jenis pelarut	konsentrasi	Ulangan	Blanko	Absorbansi	% Penghambatan	Rata-rata	Rata-rata	SD
Etanol 80%	50x	U1	0,716	0,119	83,37988827	83,4497207	83,76599	0,6512
			0,716	0,118	83,51955307			
		U2	0,753	0,124	83,53253652	83,33333333		
			0,753	0,127	83,13413015			
		U3	0,804	0,125	84,45273632	84,5149254		
			0,804	0,124	84,57711443			
Air panas 90°C	50x	U1	0,722	0,252	65,09695291	64,8891967	59,24839	5,911031
			0,722	0,255	64,68144044			
		U2	0,738	0,298	59,62059621	59,7560976		
			0,738	0,296	59,89159892			
		U3	0,871	0,407	53,27210103	53,0998852		
			0,871	0,41	52,92766935			

### 4.3 Perhitungan Konsentrasi Daun Tembakau Uji Antimikroba

#### 1. Formulasi Uji Antimikroba Pada *Streptococcus mutans*

Ekstrak (µl)	DMSO 2% (µl)	Suspensi m.o (µl)	Media SDA (µl)
0	0	100	4800
200	0	100	4600
400	0	100	4400
600	0	100	4200
800	0	100	4000
1000	0	100	3800

#### 2. Formulasi Uji Antimikroba Pada *Candida albicans*

Ekstrak (µl)	DMSO 2% (µl)	Suspensi m.o (µl)	Media TSA (µl)
0	20	100	4780
200	20	100	4580
400	20	100	4380
600	20	100	4180
800	20	100	3980
1000	20	100	3780

Pengujian aktivitas antimikroba menggunakan ekstrak daun tembakau dengan pelarut etanol 80%, yang diketahui memiliki total polifenol tertinggi yaitu sebesar 95,0638 mg/ml dan total polifenol ekstrak daun tembakau pelarut air pada 90°C sebesar 55,1489 mg/ml

Total Polifenol Ekstrak Etanol Daun Tembakau (Stok ekstrak 20%)

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 2 \text{ ml} \times 95,0638 \text{ mg/ml} &= 10 \text{ ml} \times M_2 \\
 M_2 &= (2 \text{ ml} \times 95,0638 \text{ mg/ml}) / 10 \text{ ml} \\
 M_2 &= 19,01276 \text{ mg/ml}
 \end{aligned}$$

Total Polifenol Ekstrak Air Daun Tembakau (Stok ekstrak 20%)

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 2 \text{ ml} \times 31,2813 \text{ mg/ml} &= 10 \text{ ml} \times M_2 \\
 M_2 &= (2 \text{ ml} \times 31,2813 \text{ mg/ml}) / 10 \text{ ml} \\
 M_2 &= 11,0297 \text{ mg/ml}
 \end{aligned}$$

3. Konsentrasi Ekstrak (mg/ml)

Ekstrak (ml)	kons. Ekstak etanol (mg/ml)	kons. Eksrak air (mg/ml)	vol. total (ml)	Konsentrasi polifenol dlm capet (V1.M1= V2.M2)	
				etanol (mg/ml)	air (mg/ml)
0	19,01276	11,0297	5	0,0	0,0
0.2	19,01276	11,0297	5	0,8	0,4
0.4	19,01276	11,0297	5	1,5	0,9
0.6	19,01276	11,0297	5	2,3	1,3
0.8	19,01276	11,0297	5	3,0	1,8
1	19,01276	11,0297	5	3,8	2,2

## Lampiran 4.4 Perhitungan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan IC<sub>50</sub> menggunakan kurva probit

*Streptococcus mutans*

### 1. Jumlah Koloni *Streptococcus mutans* (Perlakuan Menggunakan Pelarut Etanol)

ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah koloni / 100 $\mu$ l		Rata-rata	SD
		U1	U2		
0	0,0	132	101	116,5	21,92
0,2	0,8	28	34	31	4,24
0,4	1,5	12	23	17,5	7,78
0,6	2,3	8	17	12,5	6,36
0,8	3,0	3	9	6	4,24
1	3,8	1	4	2,5	2,12

Jumlah Koloni *Streptococcus mutans* (Perlakuan Menggunakan Pelarut Air)

ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah koloni / 100 $\mu$ l		Rata-rata	SD
		U1	U2		
0	0,0	130	189	159,5	41,72
0,2	0,4	65	136	100,5	50,20
0,4	0,9	41	95	68	38,18
0,6	1,3	24	78	51	38,18
0,8	1,8	10	43	26,5	23,33
1	2,2	6	27	16,5	14,85



2. Jumlah Koloni Pelarut Etanol *Streptococcus mutans* dalam CFU/ml ( $10^5$ )

ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah Koloni (CFU/ml)		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni
		U1	U2				
0	0,0	132000000	101000000	116500000	21920310,22	0	8,1
0,2	0,8	28000000	34000000	31000000	4242640,687	73,4	7,5
0,4	1,5	12000000	23000000	17500000	7778174,593	85,0	7,2
0,6	2,3	8000000	17000000	12500000	6363961,031	89,3	7,1
0,8	3,0	3000000	9000000	6000000	4242640,687	94,8	6,8
1	3,8	1000000	4000000	2500000	2121320,344	97,9	6,4

Jumlah Koloni Pelarut Air *Streptococcus mutans* dalam CFU/ml ( $10^5$ )

ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah Koloni (CFU/ml)		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni
		U1	U2				
0	0,0	130000000	189000000	159500000	41719300,09	0	8,2
0,2	0,4	65000000	136000000	100500000	50204581,46	37,0	8,0
0,4	0,9	41000000	95000000	68000000	38183766,18	57,4	7,8
0,6	1,3	24000000	78000000	51000000	38183766,18	68,0	7,7
0,8	1,8	10000000	43000000	26500000	23334523,78	83,4	7,4
1	2,2	6000000	27000000	16500000	14849242,4	89,7	7,2

3. Kurva Probit Penghambatan Pertumbuhan *Streptococcus mutans* (Etanol)

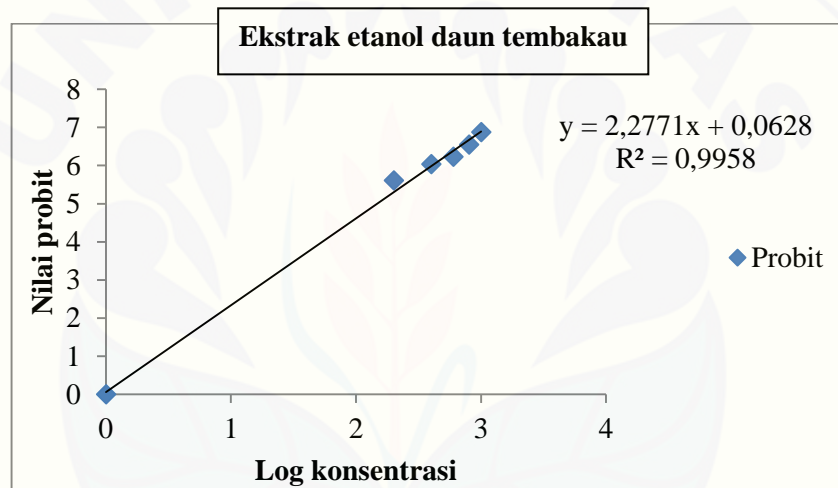
Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah Koloni/100 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni	% pertumbuhan	Log C	Probit
	U1	U2							
0,0	132000000	101000000	1,17E+08	21920310	0	0,0	100	0	0
0,8	28000000	34000000	3,10E+07	4242640,7	73,4	7,5	56,4516129	2,30103	5,61
1,5	12000000	23000000	1,75E+07	7778174,6	85,0	7,2	71,42857143	2,60206	6,04
2,3	8000000	17000000	1,25E+07	6363961	89,0	7,1	48	2,778151	6,23
3,0	3000000	9000000	6,00E+06	4242640,7	94,0	6,8	41,66666667	2,90309	6,55
3,8	1000000	4000000	2,50E+06	2121320,3	97,0	6,4	0	3	6,88

Kurva Probit Penghambatan Pertumbuhan *Streptococcus mutans* (Air)

Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah Koloni/100 µl		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni	% pertumbuhan	Log C	Probit
	U1	U2							
0,0	130000000	189000000	159500000	41719300	0	8,2	100	0	0
0,4	65000000	136000000	100500000	50204581	37,0	8,0	67,66169154	2,30103	4,67
0,9	41000000	95000000	68000000	38183766	57,0	7,8	75	2,60206	5,18
1,3	24000000	78000000	51000000	38183766	68,0	7,7	51,96078431	2,778151	5,47
1,8	10000000	43000000	26500000	23334524	83,4	7,4	62,26415094	2,90309	5,92
2,2	6000000	27000000	16500000	14849242	89,7	7,2	0	3	6,28

Table 3.2 Transformation of percentages to probits

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



$$y = 2,277x + 0,062$$

$$5 = 2,277x + 0,062$$

$$5 - 0,062 = 2,277x$$

$$4,938 = 2,277x$$

$$x = \text{Log } C_{50} = 4,938/2,277 = 2,16864$$

$$\text{LOG } C_{50} = 2,16864$$

$$\text{IC } 50 = 147,45 \mu\text{g/ml} = 0,147 \text{ mg/ml}$$

$$y = 2,277x + 0,062$$

$$6,28 = 2,277x + 0,062$$

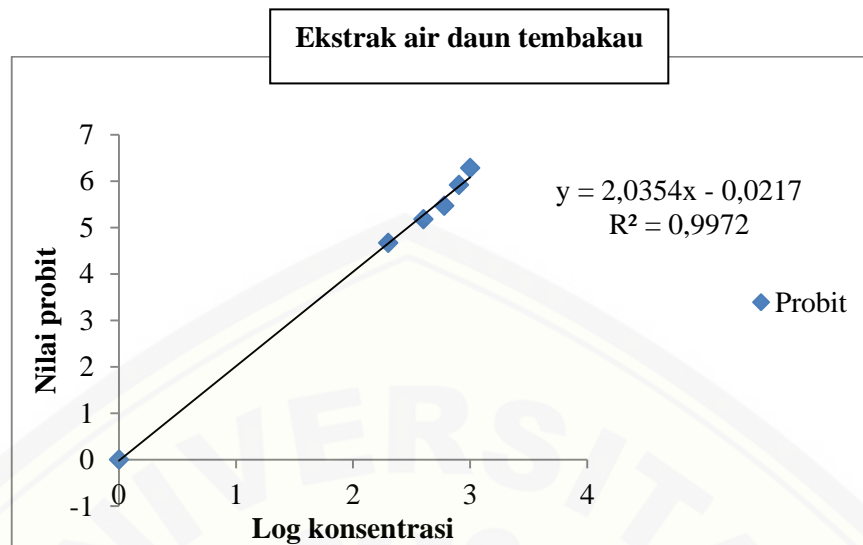
$$6,28 - 0,062 = 2,277x$$

$$6,218 = 2,277x$$

$$x = \text{Log } C_{90} = 6,218/2,277 = 2,730786$$

$$\text{Log } C_{90} = 2,730786$$

$$\text{IC } 90 = 538 \mu\text{g/ml} = 0,538 \text{ mg/ml}$$



$$Y = 2,035x - 0,021$$

$$5 = 2,035x - 0,021$$

$$5 + 0,021 = 2,035x$$

$$5,021 = 2,035x$$

$$x = \text{Log } C_{50} = 5,021/2,035 = 2,467322$$

$$\text{Log } C_{50} = 2,467322$$

$$\text{IC}_{50} = 293,31 \mu\text{g/ml} = 0,293 \text{ mg/ml}$$

$$Y = 2,035x - 0,021$$

$$6,28 = 2,035x - 0,021$$

$$6,28 + 0,021 = 2,035x$$

$$6,301 = 2,035x$$

$$x = \text{Log } C_{90} = 6,301/2,035 = 3,0963145$$

$$\text{Log } C_{90} = 3,0963145$$

$$\text{IC}_{90} = 1248,29 \mu\text{g/ml} = 1,248 \text{ mg/ml}$$

*Candida albicans*

1. Jumlah Koloni *Candida albicans* (Perlakuan Menggunakan Pelarut Etanol)

ekstrak (ml)	Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	Jumlah koloni / 100 $\mu\text{l}$		Rata-rata	SD
		U1	U2		
0	0,0	156	109	132,5	33,23
0,2	0,8	54	45	49,5	6,36
0,4	1,5	43	30	36,5	9,19
0,6	2,3	20	16	18	2,83
0,8	3,0	7	7	7	0,00
1	3,8	2	1	1,5	0,71

Jumlah Koloni *Candida albicans* (Perlakuan Menggunakan Pelarut Air)

ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah koloni / 100 $\mu\text{l}$		Rata-rata	SD
		U1	U2		
0	0,0	137	160	148,5	16,26
0,2	0,4	67	108	87,5	28,99
0,4	0,9	53	87	70	24,04
0,6	1,3	44	53	48,5	6,36
0,8	1,8	26	44	35	12,73
1	2,2	19	28	16,5	14,85



2. Jumlah Koloni Pelarut Etanol *Candida albicans* dalam CFU/ml ( $10^5$ )

ekstrak (ml)	Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	Jumlah Koloni (CFU/ml)		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni
		U1	U2				
0	0,0	156000000	109000000	132500000	33234019	0	8,1
0,2	0,8	54000000	45000000	49500000	6363961	62,6	7,7
0,4	1,5	43000000	30000000	36500000	9192388	72,5	7,6
0,6	2,3	20000000	16000000	18000000	2828427	86,4	7,3
0,8	3,0	7000000	7000000	7000000	0	94,7	6,8
1	3,8	2000000	1000000	1500000	707106,8	98,9	6,2

Jumlah Koloni Pelarut Air *Candida albicans* dalam CFU/ml ( $10^5$ )

ekstrak (ml)	Konsentrasi (mg/ml)	Jumlah Koloni (CFU/ml)		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni
		U1	U2				
0	0,0	137000000	160000000	148500000	16263456	0	8,2
0,2	0,4	67000000	108000000	87500000	28991378	41,1	7,9
0,4	0,9	53000000	87000000	70000000	24041631	52,9	7,8
0,6	1,3	44000000	53000000	48500000	6363961	67,3	7,7
0,8	1,8	26000000	44000000	35000000	12727922	76,4	7,5
1	2,2	19000000	28000000	23500000	6363961	84,2	7,4

3. Kurva Probit Penghambatan Pertumbuhan *Candida albicans* (Etanol)

Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	Jumlah Koloni/100 $\mu\text{l}$		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni	% pertumbuhan	Log C	Probit
	U1	U2							
0,0	222000000	109000000	165500000	79903066	0	8,2	100	0	0
0,8	56000000	45000000	50500000	7778175	62,6	7,7	76,23762376	2,30103	5,33
1,5	47000000	30000000	38500000	12020815	72,5	7,6	71,42857143	2,60206	5,61
2,3	39000000	16000000	27500000	16263456	86,4	7,4	25,45454545	2,778151	6,08
3,0	7000000	7000000	7000000	0	94,7	6,8	28,57142857	2,90309	6,64
3,8	3000000	1000000	2000000	1414214	98,9	6,3	0	3	7,33

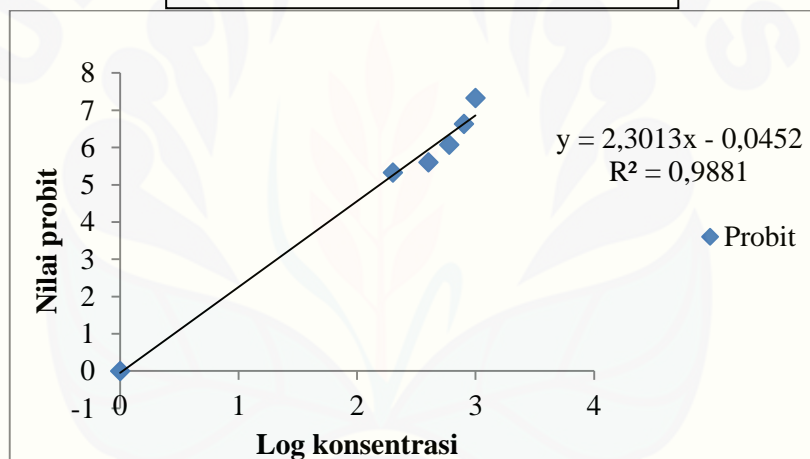
Kurva Probit Penghambatan Pertumbuhan *Candida albicans* (Air)

Konsentrasi ( $\text{mg/ml}$ )	Jumlah Koloni/100 $\mu\text{l}$		Rata-rata	SD	% penghambatan	Log Koloni	% pertumbuhan	Log C	Probit
	U1	U2							
0,0	137000000	160000000	1.49E+08	16263456	0	8,2	100	0	0
0,4	67000000	108000000	87500000	28991378	41,1	7,9	80	2,30103	4,77
0,9	53000000	87000000	70000000	24041631	52,9	7,8	69,28571429	2,60206	5,08
1,3	44000000	53000000	48500000	6363961	67,3	7,7	72,16494845	2,778151	5,44
1,8	26000000	44000000	35000000	12727922	76,4	7,5	67,14285714	2,90309	5,71
2,2	19000000	28000000	23500000	6363961	84,2	7,4	0	3	5,99

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

## Ekstrak etanol daun tembakau



$$y = 2,301x - 0,045$$

$$5 = 2,301x - 0,045$$

$$5 + 0,045 = 2,301x$$

$$5,045 = 2,301x$$

$$x = \text{Log } C_{50} = 5,045/2,301 = 2,192524989$$

$$\text{Log } C_{50} = 2,192524989$$

$$IC_{50} = 155,78 \mu\text{g/ml} = 0,155 \text{ mg/ml}$$

$$y = 2,301x - 0,045$$

$$6,28 = 2,301x - 0,045$$

$$6,28 + 0,045 = 2,301x$$

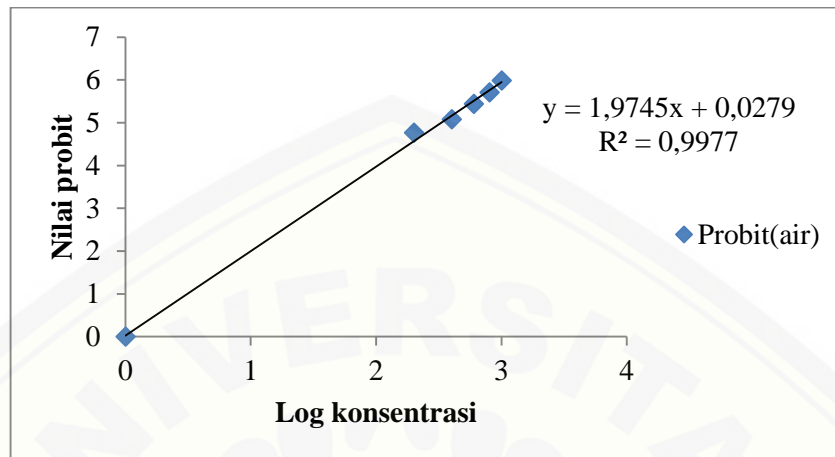
$$6,325 = 2,301x$$

$$x = \text{Log } C_{90} = 6,325/2,301 = 2,748805$$

$$\text{Log } C_{90} = 2,748805$$

$$IC_{90} = 560,80 \mu\text{g/ml} = 0,560 \text{ mg/ml}$$

Ekstrak air daun tembakau



$$y = 1,974x + 0,027$$

$$5 = 1,974x + 0,027$$

$$5 - 0,027 = 1,974x$$

$$4,973 = 1,974x$$

$$x = \text{Log } C_{50} = 4,973 / 1,974 = 2,51925$$

$$\text{Log } C_{50} = 2,51925$$

$$\text{Log } 50 = 330,56 \mu\text{g/ml} = 0,330 \text{ mg/ml}$$

$$y = 1,974x + 0,027$$

$$6,28 = 1,974x + 0,027$$

$$6,28 - 0,027 = 1,974x$$

$$6,253 = 1,974x$$

$$x = \text{Log } C_{90} = 6,253 / 1,974 = 3,167679838$$

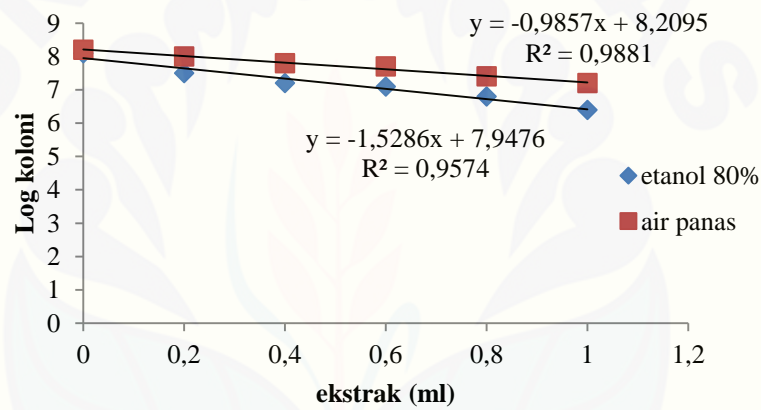
$$\text{Log } C_{90} = 3,167679838$$

$$\text{Log } 90 = 1471,23 \mu\text{g/ml} = 1,471 \text{ mg/ml}$$

**Lampiran 4.5 Perhitungan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan IC<sub>50</sub> menggunakan kurva linier**

*Streptococcus mutans*

ekstrak (ml)	etanol 80%	air panas
0	8.1	8.2
0.2	7.5	8
0.4	7.2	7.8
0.6	7.1	7.7
0.8	6.8	7.4
1	6.4	7.2



Air panas

Kons. Polifenol (mg/ml)		
5	3.258	1.015
4	4.273	
5	3.258	2.030
3	5.288	
5	3.258	2.030
3	5.288	



<b>IC<sub>50</sub></b>		<b>Polifenol (mg/ml)</b>	
<b>Y1 = 1 x 10<sup>8</sup></b>	<b>Log Y1 = 8,000</b>	<b>X1 =</b>	0,212
<b>Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10<sup>7</sup></b>	<b>Log Y2 = 7,699</b>	<b>X2 =</b>	0,518
		<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>0,306</b>
<b>IC<sub>90</sub></b>		<b>Polifenol (mg/ml)</b>	
<b>Y1 = 1 x 10<sup>8</sup></b>	<b>Log Y1 = 8,000</b>	<b>X1 =</b>	1,227
<b>Y2 = 90% (Y1) = 9 x 10<sup>7</sup></b>	<b>Log Y2 = 6,000</b>	<b>X2 =</b>	2,243
		<b>IC<sub>90</sub></b>	<b>1,015</b>

Etanol 80%

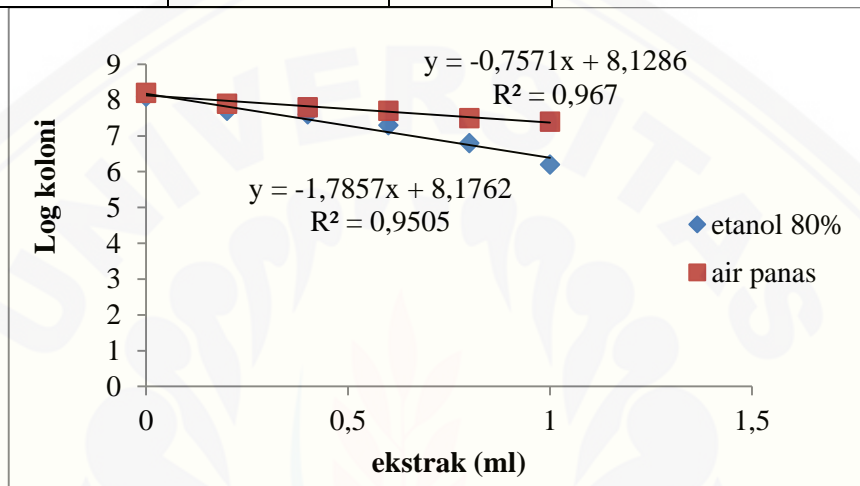
<b>Kons. Polifenol (mg/ml)</b>		
5	1,929	0,654
4	2,583	
5	1,929	1,309
3	3,238	
5	1,929	1,309
3	3,238	

<b>IC<sub>50</sub></b>		<b>Polifenol (mg/ml)</b>	
<b>Y1 = 1 x 10<sup>8</sup></b>	<b>Log Y1 = 8,000</b>	<b>X1 =</b>	-0,035
<b>Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10<sup>7</sup></b>	<b>Log Y2 = 7,699</b>	<b>X2 =</b>	0,162
		<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>0,197</b>
<b>IC<sub>90</sub></b>		<b>Polifenol (mg/ml)</b>	
<b>Y1 = 1 x 10<sup>8</sup></b>	<b>Log Y1 = 8,000</b>	<b>X1 =</b>	0,620
<b>Y2 = 90% (Y1) = 9 x 10<sup>7</sup></b>	<b>Log Y2 = 6,000</b>	<b>X2 =</b>	1,274
		<b>IC<sub>90</sub></b>	<b>0,654</b>

Kons. Polif

*Candida albicans*

ekstrak (ml)	etanol 80%	air panas
0	8.1	8.2
0.2	7.7	7.9
0.4	7.6	7.8
0.6	7.3	7.7
0.8	6.8	7.5
1	6.2	7.4



Air panas

Kons. Polifenol (mg/ml)		
5	4,132	1,321
4	5,453	
5	4,132	2,642
3	6,774	
5	4,132	2,642
3	6,774	

<b>IC<sub>50</sub></b>		<b>Polifenol (mg/ml)</b>	
<b>Y1 = 1 x 10<sup>8</sup></b>	<b>Log Y1 = 8,000</b>	<b>X1 =</b>	0,169
<b>Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10<sup>7</sup></b>	<b>Log Y2 = 7,699</b>	<b>X2 =</b>	0,567
		<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>0,398</b>
<b>IC<sub>90</sub></b>		<b>Polifenol (mg/ml)</b>	
<b>Y1 = 1 x 10<sup>8</sup></b>	<b>Log Y1 = 8,000</b>	<b>X1 =</b>	1,490
<b>Y2 = 90% (Y1) = 9 x 10<sup>7</sup></b>	<b>Log Y2 = 6,000</b>	<b>X2 =</b>	2,811
		<b>IC<sub>90</sub></b>	<b>1,321</b>

Etanol 80%

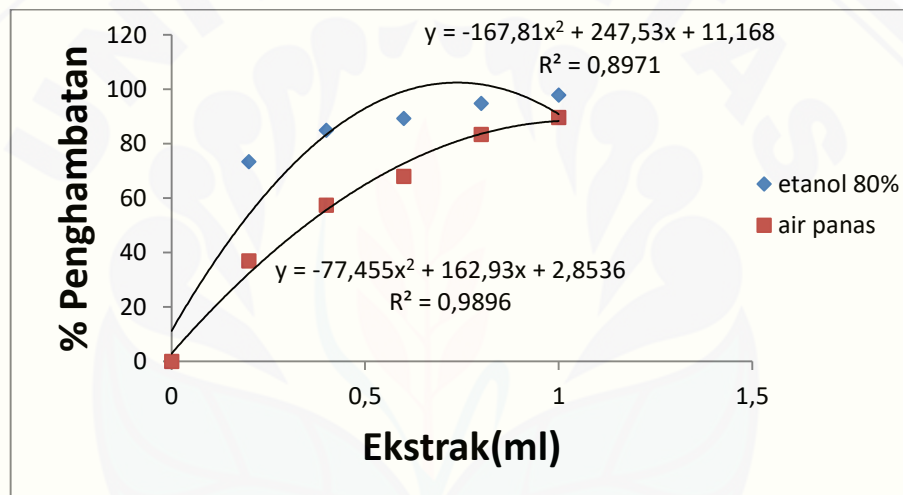
<b>Kons. Polifenol (mg/ml)</b>		
5	1,779	0,560
4	2,339	
5	1,779	1,120
3	2900	
5	1,779	1,120
3	2900	

<b>IC<sub>50</sub></b>		<b>Polifenol (mg/ml)</b>	
<b>Y1 = 1 x 10<sup>8</sup></b>	<b>Log Y1 = 8,000</b>	<b>X1 =</b>	0,099
<b>Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10<sup>7</sup></b>	<b>Log Y2 = 7,699</b>	<b>X2 =</b>	0,267
		<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>0,169</b>
<b>IC<sub>90</sub></b>		<b>Polifenol (mg/ml)</b>	
<b>Y1 = 1 x 10<sup>8</sup></b>	<b>Log Y1 = 8,000</b>	<b>X1 =</b>	0,659
<b>Y2 = 90% (Y1) = 9 x 10<sup>7</sup></b>	<b>Log Y2 = 6,000</b>	<b>X2 =</b>	1,219
		<b>IC<sub>90</sub></b>	<b>0,560</b>

**Lampiran 4.6 Perhitungan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan IC<sub>50</sub> menggunakan kurva polynomial**

*Streptococcus mutans*

ekstrak (ml)	etanol 80%	air panas
0	0	0
0.2	73.4	37
0.4	85	57.4
0.6	89.3	68
0.8	94.8	83.4
1	97.9	89.7



etanol 80%

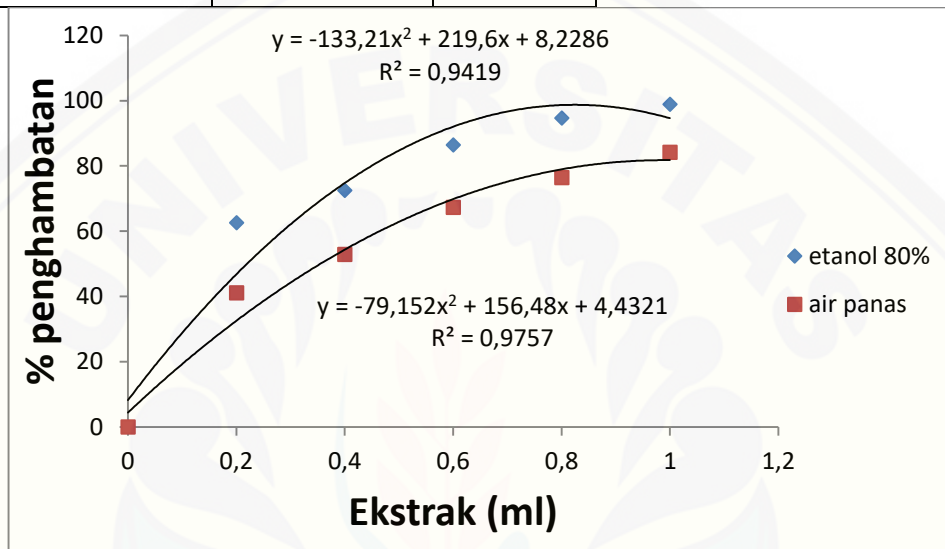
$y = -167,8x^2 + 247,5x + 11,16$ 50% = $-167,8x^2 + 247,5x + 11,16$ 0,5 = $-167,8x^2 + 247,5x + 11,16$ $0 = x^2 + 1,47x - 0,06$ $0 = (x - 0,042) (x + 1,48)$ $x_1 = 0,042$ mg/ml $x_2 = -1,48$ mg/ml	$y = -167,8x^2 + 247,5x + 11,16$ 90% = $-167,8x^2 + 247,5x + 11,16$ 0,9 = $-167,8x^2 + 247,5x + 11,16$ $0 = x^2 + 1,47x - 0,06$ $0 = (x - 0,040) (x + 1,515)$ $x_1 = -0,040$ mg/ml $x_2 = 1,515$ mg/ml
--	--

Air panas

$y = -77,45x^2 + 162,9x + 2,853$ 50% = $-77,45x^2 + 162,9x + 2,853$ 0,5 = $-77,45x^2 + 162,9x + 2,853$ $0 = x^2 + 2,1x - 0,03$ $0 = (x - 0,014) (x + 2,118)$ $x_1 = 0,014$ mg/ml $x_2 = -2,118$ mg/ml	$y = -77,45x^2 + 162,9x + 2,853$ 90% = $-77,45x^2 + 162,9x + 2,853$ 0,9 = $-77,45x^2 + 162,9x + 2,853$ $0 = x^2 + 2,1x - 0,025$ $0 = (x + 0,012) (x - 2,115)$ $x_1 = -0,012$ mg/ml $x_2 = 2,115$ mg/ml
---	--

*Candida albicans*

ekstrak (ml)	etanol 80%	air panas
0	0.0	0.0
0.2	62.6	41.1
0.4	72.5	52.9
0.6	86.4	67.3
0.8	94.7	76.4
1	98.9	84.2



etanol 80%

$y = -133,2x^2 + 219,6x + 8,228$ 50% = $-133,2x^2 + 219,6x + 8,228$ 0,5 = $-133,2x^2 + 219,6x + 8,228$ $0 = x^2 + 1,65x - 0,058$ $0 = (x - 0,034) (x + 1,683)$ $x_1 = 0,034$ mg/ml $x_2 = -1,683$ mg/ml	$y = -133,2x^2 + 219,6x + 8,228$ 90% = $-133,2x^2 + 219,6x + 8,228$ 0,9 = $-133,2x^2 + 219,6x + 8,228$ $0 = x^2 + 1,65x - 0,055$ $0 = (x + 0,033) (x - 1,681)$ $x_1 = -0,033$ mg/ml $x_2 = 1,681$ mg/ml
---	---

Air panas

$y = -79,15x^2 + 156,4x + 4,432$ 50% = $-79,15x^2 + 156,4x + 4,432$ 0,5 = $-79,15x^2 + 156,4x + 4,432$ $0 = x^2 + 1,97x - 0,049$ $0 = (x - 0,025) (x + 2)$ $x_1 = 0,025$ mg/ml $x_2 = -2$ mg/ml	$y = -79,15x^2 + 156,4x + 4,432$ 90% = $-79,15x^2 + 156,4x + 4,432$ 0,9 = $-79,15x^2 + 156,4x + 4,432$ $0 = x^2 + 1,97x - 0,044$ $0 = (x + 0,022) (x - 1,998)$ $x_1 = -0,22$ mg/ml $x_2 = 1,998$ mg/ml
---	--

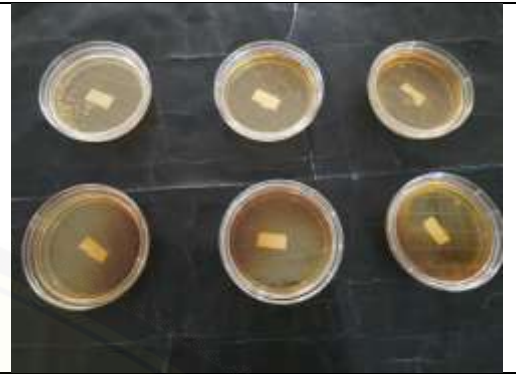


**Lampiran 4.7 Dokumentasi Foto Penelitian**

	
<p>Pengambilan daun afkir <i>Na-Oogst</i></p>	<p>Pengecilan ukuran daun tembakau</p>
	
<p>Ekstraksi daun tembakau <i>Na-Oogst</i></p>	<p>Proses evaporasi ekstrak</p>
	
<p>Isolat bakteri</p>	<p>Ekstrak daun tembakau</p>
	
<p>Proses pembuatan media</p>	<p>Uji aktivitas antiosidan</p>



Proses inkubasi mikroba selama  
24 jam



Uji aktivitas antijamur  
(*Candida albicans*)

