



**ZONA HAMBAT RESINOID  
DAUN TEMBAKAU KASTURI TERHADAP  
BAKTERI *Streptococcus mutans* DAN *Staphylococcus aureus***

**SKRIPSI**

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter Gigi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh:

**Karelina Amarta**

**161610101035**

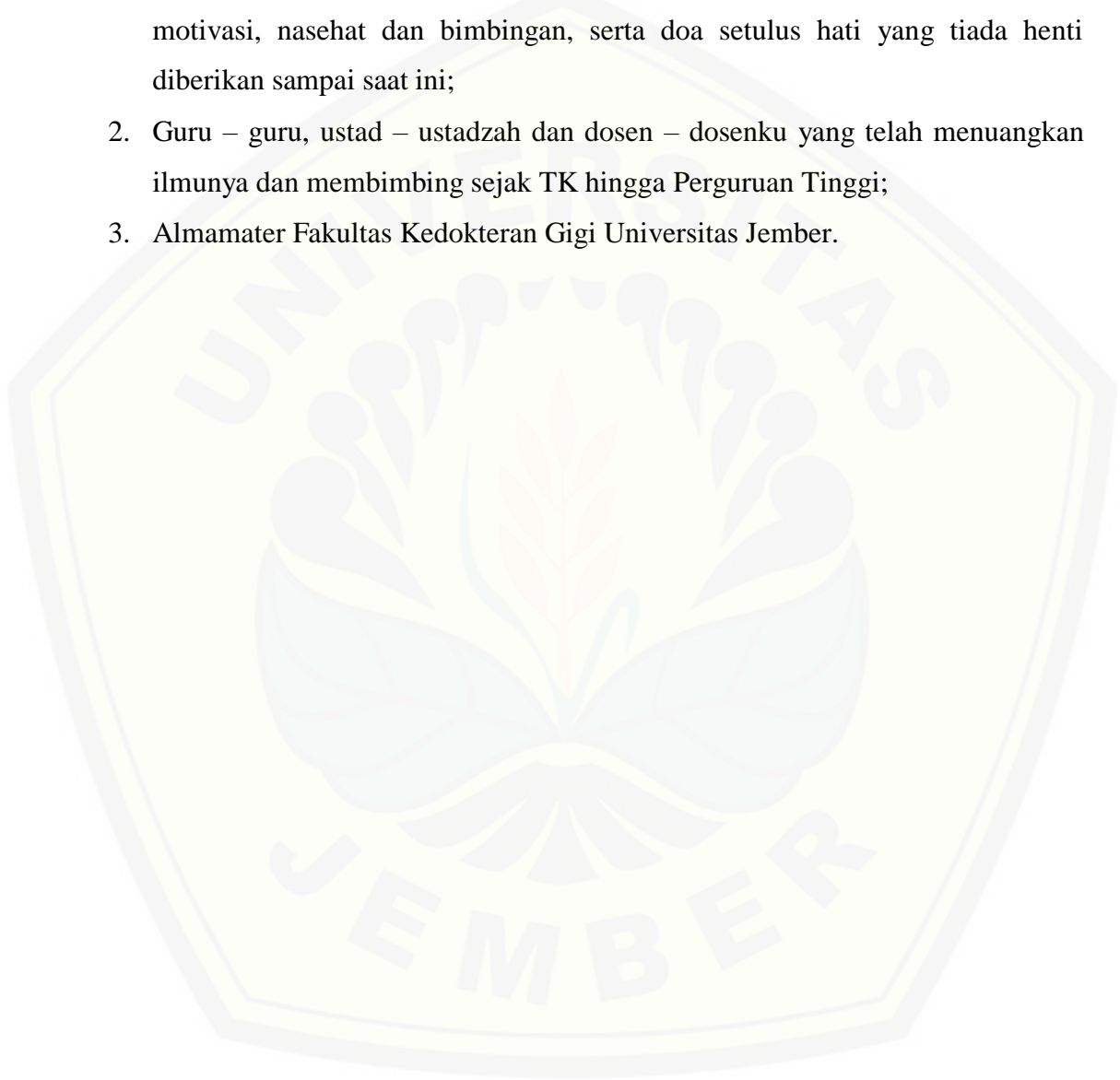
**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2020**

### **PERSEMBAHAN**

Dengan setulus hati skripsi ini saya persembahkan untuk:

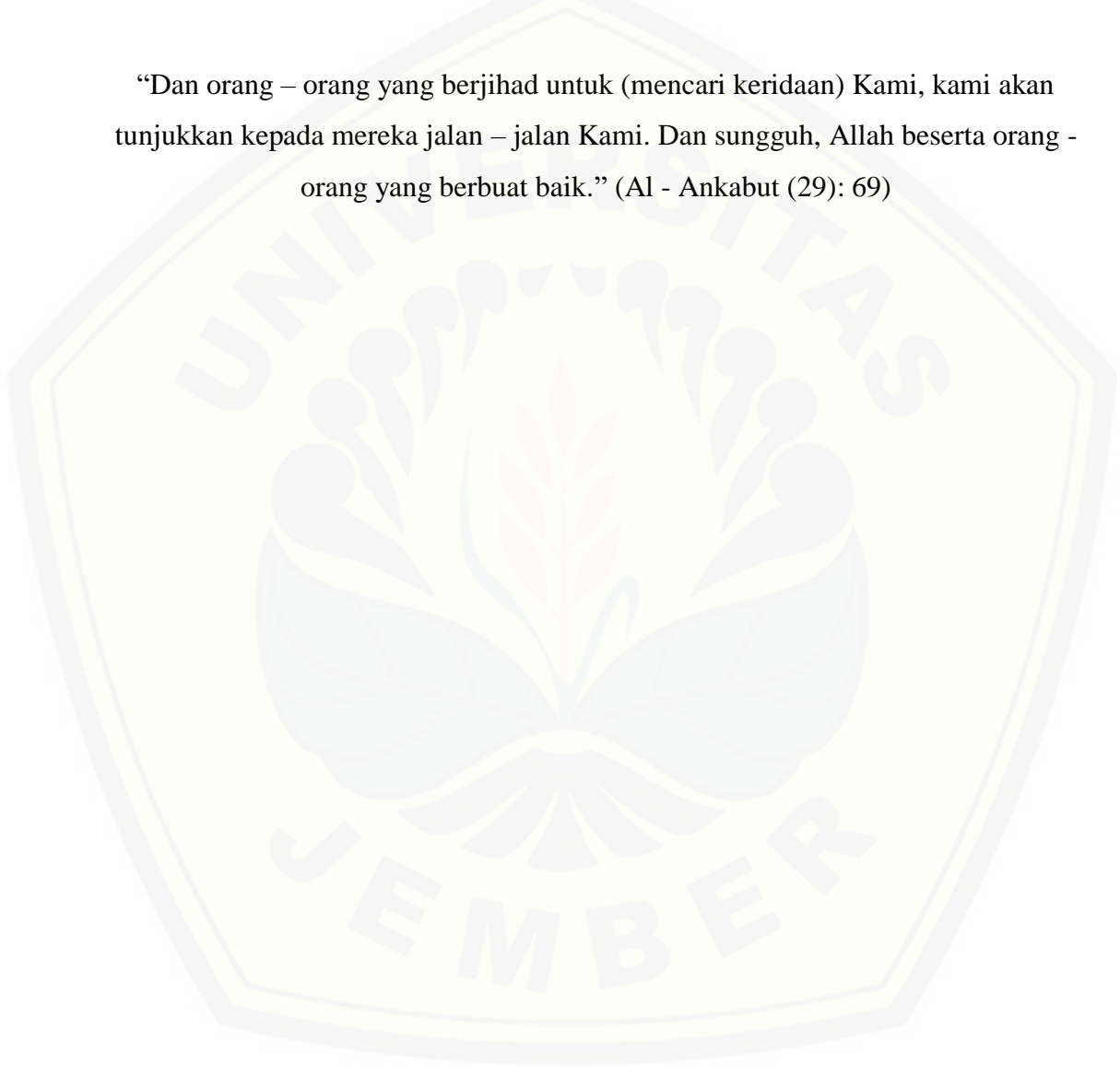
1. Papa Ns. Sobirin, S. Kep, Mama Puji Astuti, Amd. Keb, dan Adikku tersayang Muhammad Izzeldin Izzeta. Terimakasih atas segala dukungan, kasih sayang, motivasi, nasehat dan bimbingan, serta doa setulus hati yang tiada henti diberikan sampai saat ini;
2. Guru – guru, ustad – ustadzah dan dosen – dosenku yang telah menuangkan ilmunya dan membimbing sejak TK hingga Perguruan Tinggi;
3. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



**MOTTO**

“Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan; Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan” (QS. Al – Insyirah: 5-6)

“Dan orang – orang yang berjihad untuk (mencari keridaan) Kami, kami akan tunjukkan kepada mereka jalan – jalan Kami. Dan sungguh, Allah beserta orang - orang yang berbuat baik.” (Al - Ankabut (29): 69)



**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Karelina Amarta

NIM : 161610101035

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Zona Hambat Resinoid Daun Tembakau Kasturi Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada 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 bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 28 Juli 2020

Yang menyatakan,

Karelina Amarta

NIM 161610101035

SKRIPSI

**ZONA HAMBAT RESINOID DAUN TEMBAKAU KASTURI TERHADAP  
BAKTERI *Streptococcus mutans* DAN *Staphylococcus aureus***

Oleh

**Karelina Amarta**

**NIM 161610101035**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. drg. Tecky Indriana, M.Kes

Dosen Pembimbing Pendamping : Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes.

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Zona Hambat Resinoid Daun Tembakau Kasturi Terhadap Bakteri *Streptococcus Mutans* Dan *Staphylococcus Aureus* ” ini telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada:

Hari : Selasa

Tanggal : 28 Juli 2020

Dosen Penguji Utama,

Dosen Penguji Anggota

drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes

NIP. 197608092005012002

Dr. drg. Didin Erma Indahyani, M.Kes

NIP. 196903031997022001

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

Dr. drg. Tecky Indriana, M.Kes

NIP. 196811261997022001

Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes

NIP. 197005091999032001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost

NIP. 196901121999601001

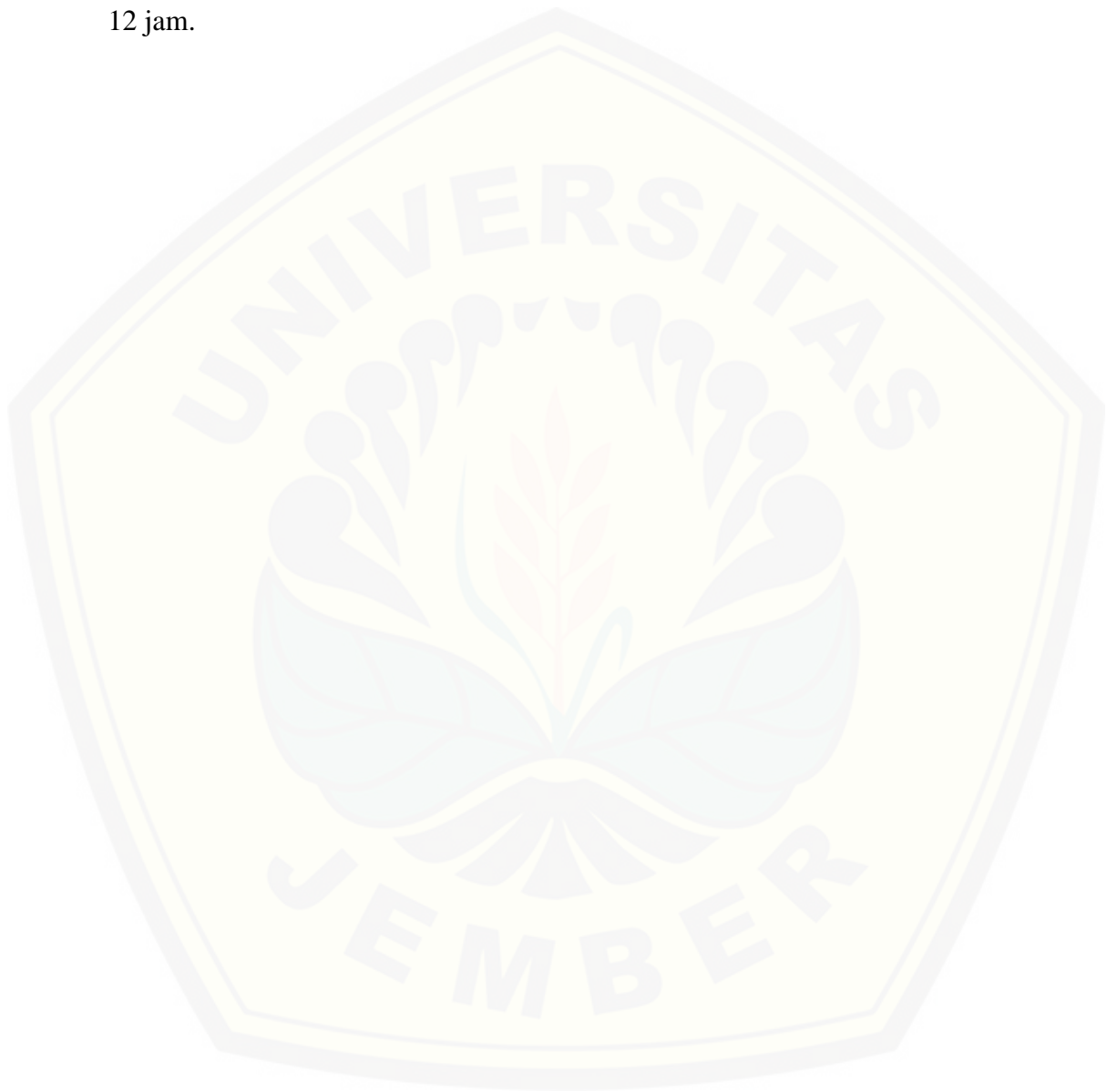
## RINGKASAN

**Zona Hambat Resinoid Daun Tembakau Kasturi Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus***; Karelina Amarta; 161610101035: 2020: 85 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Karies merupakan salah satu penyakit pada struktur gigi yang ditandai dengan rusaknya jaringan enamel, dentin, dan sementum yang disebabkan oleh bakteri penyebab karies. *S. mutans* dan *S. aureus* merupakan bakteri penyebab karies. Upaya pencegahan dan pengobatan karies dilakukan, akan tetapi pemberian terapi antibakteri yang digunakan memiliki efek samping yang merugikan. Sehingga, perlu adanya pemanfaatan bahan alami dengan efek samping minimal, salah satunya tanaman tembakau. Tanaman tembakau merupakan tanaman komoditas perkebunan terbesar di kabupaten Jember yang memiliki produk aromatik dengan berbagai senyawa aktif didalamnya, yaitu resinoid tembakau. Resinoid tembakau merupakan massa berwarna coklat tua yang diperoleh melalui proses ekstraksi menggunakan pelarut polar. Salah satu senyawa aktif yang terkandung dalam resinoid tembakau adalah terpenoid. Terpenoid memiliki aktivitas biologis salah satunya antibakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui zona hambat resinoid daun tembakau Kasturi terhadap bakteri *S. mutans* dan *S. aureus*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan dan dikembangkan sebagai acuan dalam pembuatan bahan antibakteri terhadap karies.

Ekstraksi resinoid daun tembakau Kasturi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut methanol, kemudian ditambahkan pelarut n-heksan. Ekstrak resinoid diberikan HCL 10% untuk menghilangkan kadar nikotin dan kemudian diuji *Dragendorff*. Ekstrak yang telah bebas nikotin dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dan dilakukan fraksinasi. Hasil fraksinasi dilakukan uji GC-MS. Uji antibakteri dilakukan pada bakteri *S. mutans* dan *S. aureus* dengan metode *Kirby-Bauer Disc Diffusion*. Pengukuran diameter zona hambat resinoid daun tembakau Kasturi menggunakan jangka sorong dan selanjutnya dilakukan analisis data.

Hasil penelitian menunjukkan resinoid daun tembakau Kasturi memiliki kemampuan antibakteri terhadap bakteri *S. mutans* pada konsentrasi 12 mg/ml waktu inkubasi 6 jam. Resinoid daun tembakau Kasturi memiliki kemampuan antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 8 mg/ml waktu inkubasi 12 jam.





## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Zona Hambat Resinoid Daun Tembakau Kasturi Terhadap Bakteri *Streptococcus Mutans* Dan *Staphylococcus Aureus*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Papa Ns. Sobirin, S. Kep, Mama Puji Astuti, Amd. Keb, Muhammad Izzeldin Izzeta, dan Mas Fergyansa Wiguna Adhiyaksa S.KG yang tidak pernah berhenti memberikan segala macam dukungan, kasih sayang, do’a, dan semangat dalam penyelesaian skripsi ini.
2. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
3. Dr. drg. Tecky Indriana, M.Kes., selaku dosen pembimbing utama dan Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes, selaku dosen pendamping penelitian dan dosen pembimbing pendamping.
4. drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes dan Dr. drg. Didin Erma Indahyani, M. Kes, selaku dosen penguji skripsi.
5. drg. Dyah Indartin Setyorini, M. Kes selaku dosen pembimbing akademik.
6. Sahabat – sahabat penelitian Nurhalimah, Mbak Larissa, Mbak Dea, Qonita, Atul, Dinda, Nadhila, Galuh, dan Deri.
7. Sahabat – sahabat ‘Penari’, Elfrida Maya Agustina, Atha Ramadhona Yaniar, dan Salsabila Qotrunnada.
8. Sahabat – sahabat satu DPA ku.
9. Ibu Wayan selaku staf laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Jember, Ibu Widi serta Mbak Parka selaku staf Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember, dan Ibu Indri selaku staf Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
10. Seluruh teman – teman seperjuangan FKG angkatan 2016 ‘DEXTRA’.

11. Seluruh pihak yang telah membantu kegiatan penelitian; atas perhatian, perkenaan, dan bantuan yang telah diberikan hingga tersusunnya skripsi ini.

Penulis juga menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pendidikan khususnya dibidang kesehatan serta menjadi upaya dalam meningkatkan mutu kesehatan masyarakat.

Jember, 28 Juli 2020

Penulis

DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>SKRIPSI</b> .....	<b>i</b>
<b>PERSEMBAHAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>MOTTO</b> .....	<b>iii</b>
<b>PERNYATAAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	<b>v</b>
<b>PENGESAHAN</b> .....	<b>vi</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>PRAKATA</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xv</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>3</b>
1.1 Latar Belakang.....	3
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan.....	5
1.4 Manfaat.....	5
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>6</b>
2.1 Karies.....	6
2.1.1 Definisi Karies .....	6
2.1.2 Etiologi Karies .....	7
2.1.3 Mekanisme terjadinya karies .....	8
2.2 Tembakau .....	9
2.2.1 Klasifikasi Tanaman Tembakau .....	10
2.2.2 Tembakau Kasturi.....	11
2.2.3 Daun Tembakau.....	12
2.3 Resinoid.....	14
2.4 <i>Streptococcus mutans</i> .....	15

2.4 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
2.5 Kerangka Konsep .....	20
2.6 Hipotesa.....	21
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	22
3.2 Tempat Penelitian.....	22
3.3 Waktu Penelitian .....	22
3.3.1 Variabel Penelitian.....	22
3.4 Definisi Operasional.....	23
3.5 Sampel Penelitian .....	23
3.5.1 Pengelompokan Sampel.....	23
3.5.2 Jumlah Sampel.....	24
3.5.2 Kriteria Sampel.....	24
3.6 Alat dan Bahan Penelitian .....	25
3.6.1 Alat Penelitian.....	25
3.6.2 Bahan Penelitian .....	26
3.7 Prosedur Penelitian.....	26
3.8 Analisis Data .....	32
3.9 Bagan Alur Penelitian.....	33
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>34</b>
4.1 Hasil Penelitian dan Analisa Data .....	34
4.1.1 Zona Hambat Bakteri <i>S. mutans</i> .....	36
4.1.2 Zona Hambat Bakteri <i>S. aureus</i> .....	39
4.2 Pembahasan .....	41
<b>BAB 5. PENUTUP.....</b>	<b>47</b>
5.1 Kesimpulan.....	47
5.2 Saran.....	47
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>48</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>57</b>

**DAFTAR TABEL**

**Halaman**

Tabel 2.1 Karakteristik Tembakau Kasturi 1 dan 2 di Kabupaten Jember.....	12
Tabel 4.1 Rata – rata diameter zona hambat <i>Streptococcus mutans</i> .....	36
Tabel 4.2 Rata – rata diameter zona hambat <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39



DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1 Karies gigi.....	6
Gambar 2.2 Tahapan karies gigi.....	7
Gambar 2.3 Jenis Tembakau Kasturi.....	11
Gambar 2.4 Klasifikasi letak daun tembakau.....	13
Gambar 2.5 Koloni bakteri <i>Streptococcus mutans</i> .....	16
Gambar 2.6 Koloni bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
Gambar 3.1 Pengukuran diameter zona hambat.....	30
Gambar 3.2 Pengukuran diameter zona hambat saling bertumpuk.....	31
Gambar 3.3 Pengukuran diameter zona hambat berbentuk lonjong.....	31
Gambar 4.1 Hasil indentifikasi resinoid menggunakan Uji GC-MS.....	34
Gambar 4.2 Identifikasi 4,8,13-Cyclotetradecatriene-1,3-diol.....	35
Gambar 4.3 Senyawa teridentifikasi dalam resinoid tembakau.....	35
Gambar 4.4 Grafik diameter zona hambat <i>Sreptococcus mutans</i> .....	37
Gambar 4.5 Grafik diameter Zona Hambat <i>Staphylococcus aureus</i> .....	40

**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran A Surat Keterangan Identifikasi Tanaman.....	57
Lampiran B <i>Ethical Clearance</i> .....	58
Lampiran C Surat Izin Penelitian.....	59
Lampiran D Penghitungan pengenceran.....	63
Lampiran E Alat dan Bahan.....	65
Lampiran F Prosedur penelitian.....	71
Lampiran G Pengukuran diameter zona hambat.....	79
Lampiran H Analisa Data.....	87

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Berdasarkan data RISKESDAS tahun 2018 terdapat 57,6% masyarakat di Indonesia memiliki masalah kesehatan gigi dan mulut, salah satunya karies (RISKESDAS, 2018; Widayati, 2014). Karies adalah penyakit pada struktur gigi ditandai dengan rusaknya jaringan enamel, dentin, dan sementum yang disebabkan oleh aktivitas metabolisme bakteri penyebab karies (Bebe *et al*, 2018). Bakteri penyebab karies diantaranya ialah *S. mutans* dan *S. aureus* (Veiga *et al*, 2016; Yadav *et al*, 2017). Berbagai macam pencegahan dan pengobatan karies dilakukan, tetapi terapi yang digunakan memiliki efek samping yang merugikan. Sehingga, diperlukan adanya pemanfaatan bahan alami dengan efek samping minimal. Salah satunya adalah tanaman tembakau yang telah diketahui memiliki kandungan bahan alami yang bermanfaat.

Tembakau merupakan komoditas tanaman perkebunan yang banyak dibudidayakan di Kabupaten Jember, salah satunya Tembakau Kasturi (Statistik Perkebunan Indonesia, 2017). Pemanenan tembakau Kasturi hanya mengambil daun dengan kualitas baik sebagai bahan baku rokok kretek, sedangkan daun yang kualitasnya buruk tidak digunakan dan menjadi limbah (Nurnasari *et al*, 2018). Hal ini menyebabkan potensi limbah daun tembakau semakin meningkat seiring dengan tingginya jumlah produksi dan panen tembakau (Nurnasari *et al*, 2018). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun tembakau memiliki senyawa aktif seperti terpenoid, flavonoid, alkaloid, isoprenoid, solanesol, dan minyak atsiri yang bermanfaat bagi manusia (Putri *et al*, 2014; Nurnasari *et al*, 2018; Banozic *et al*, 2020). Resinoid tembakau merupakan salah satu produk aromatik dalam tanaman tembakau (Popova *et al*, 2019).

Resinoid didapatkan dari hasil ekstraksi daun tembakau menggunakan pelarut polar, seperti methanol atau ethanol (Popova *et al*, 2020). Resinoid berupa massa semi solid berwarna kecoklatan dan memiliki bau tembakau yang sangat khas serta memiliki kemampuan sebagai antibakteri (Popova *et al*, 2019). Hasil penelitian oleh Popova *et al* (2019) didapatkan bahwa resinoid tembakau memiliki



kemampuan antibakteri yang lebih efektif terhadap bakteri Gram positif dan jamur dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Hal ini dikarenakan resinoid daun tembakau Kasturi karena memiliki kandungan senyawa aktif didalamnya salah satunya adalah senyawa terpenoid yang diketahui memiliki kemampuan sebagai antibakteri (Priyatmoko *et al*, 2018). Menurut hasil penelitian terpenoid sebagai antibakteri bekerja dengan cara bereaksi dengan porin (protein transmembran) dan membentuk ikatan polimer yang kuat mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri yang mengakibatkan sel bakteri akan kekurangan nutrisi sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Wahdaningsih *et al*, 2014).

Uji kemampuan antibakteri suatu bahan dapat dilakukan menggunakan beberapa metode, yaitu metode difusi cakram dan metode pengenceran atau dilusi (Khusuma *et al*, 2019). Uji antibakteri dengan metode difusi cakram merupakan metode yang banyak digunakan karena secara teknis lebih mudah dilakukan dan tidak memerlukan peralatan khusus daripada metode pengenceran (Khusuma *et al*, 2019). Sehingga, pada penelitian ini uji antibakteri resinoid daun tembakau Kasturi menggunakan metode difusi cakram dimana kemampuan antibakteri resinoid terlihat dengan adanya zona hambat atau daerah jernih di sekeliling kertas cakram yang dihasilkan (Soleha, 2015). Zona hambat pada penelitian ini digunakan untuk mengetahui kemampuan antibakteri resinoid daun tembakau Kasturi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* dan *S. aureus*. Hal ini berdasarkan klasifikasi Popova *et al* (2019) tentang resinoid sebagai antibakteri, bahwa resinoid memiliki kemampuan antibakteri yang kuat (sensitif) apabila diameter zona hambat yang dihasilkan lebih dari 18 mm, cukup sensitif apabila diameter zona hambat yang dihasilkan berkisar 12- 18 mm, dan resisten apabila diameter zona hambat yang dihasilkan kurang dari 12 mm. Sehingga, kemampuan antibakteri resinoid dapat diketahui dengan cara mengukur diameter zona hambat yang dihasilkan (Popova *et al*, 2019).

Berdasarkan uraian diatas, maka peneliti ingin mengetahui bagaimana zona hambat resinoid daun tembakau Kasturi terhadap bakteri *S. mutans* dan *S. aureus*.

### **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang diatas, maka rumusan masalah yang dapat diambil, yaitu:

1. Bagaimana zona hambat resinoid daun tembakau Kasturi terhadap pertumbuhan bakteri *S. mutans*?
2. Bagaimana zona hambat resinoid daun tembakau Kasturi terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*?

### **1.3 Tujuan**

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui zona hambat resinoid daun tembakau Kasturi terhadap pertumbuhan bakteri *S. mutans*.
2. Mengetahui zona hambat resinoid daun tembakau Kasturi terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

### **1.4 Manfaat**

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. Dapat memberikan dan melengkapi informasi mengenai pemanfaatan resinoid daun tembakau Kasturi dalam bidang kedokteran gigi, khususnya sebagai pengembangan obat terhadap karies dengan efek samping minimal.
2. Dapat digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut tentang pengaruh resinoid daun tembakau Kasturi terhadap mikroorganisme khususnya bakteri didalam rongga mulut.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Karies

#### 2.1.1 Definisi Karies

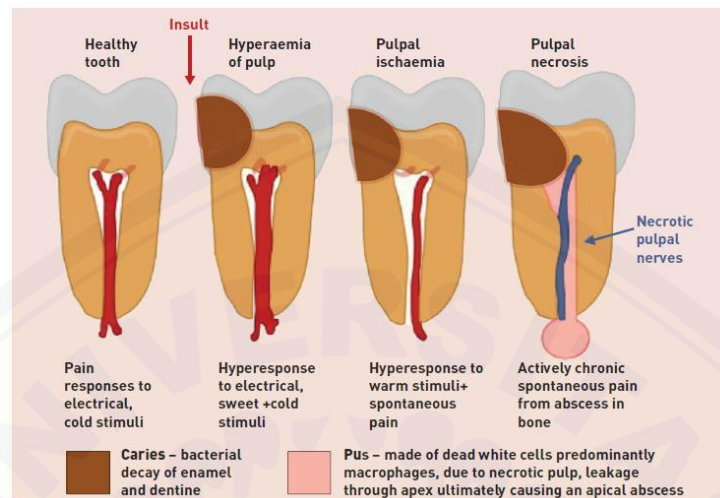
Karies adalah kerusakan pada struktur gigi disebabkan oleh hasil metabolisme bakteri penyebab karies berupa produk sampingan yang bersifat asam (Yadav *et al*, 2016; Ramayanti *et al*, 2013). Karies merupakan penyakit yang merusak struktur gigi ditandai adanya demineralisasi jaringan keras gigi (Rahman *et al*, 2018). Karies merupakan penyakit progresif dan bila tidak dirawat menyebabkan kerusakan struktur gigi dan jaringan di sekitarnya (Rapp *et al*, 2019). Jaringan keras gigi terus mengalami proses demineralisasi dan remineralisasi (Joshi *et al*, 2018). Penurunan pH di dalam rongga mulut menyebabkan demineralisasi struktur gigi yang apabila dibiarkan dalam waktu lama mengakibatkan terjadinya karies (Joshi *et al*, 2018). Enamel gigi terdemineralisasi pada pH 5,5, dentin terdemineralisasi pada pH 6,5, dan sementum terdemineralisasi pada pH 6,7 (Rapp *et al*, 2019).



Gambar 2.1 Karies gigi (Sumber: Yadav *et al*, 2016; Yadav *et al*, 2017)

Karies ditandai dengan rasa sakit pada gigi, diawali sakit ringan karena minuman dingin atau panas, kemudian berkembang menjadi sakit spontan bila kerusakan struktur gigi terus berlanjut (Nakano, 2014). Apabila karies telah mencapai pulpa dan tidak dilakukan perawatan akan terbentuk abses pada ujung akar gigi dan berkembang menjadi kista radikular (Nakano, 2014). Karies primer dapat mengenai bagian aproksimal yaitu area kontak diantara gigi dan bagian

oklusal yaitu pit dan fisur (Yadav *et al*, 2017). Karies sekunder merupakan karies pada tepi restorasi akibat adanya *mikroleakage* (Yadav *et al*, 2017).



Gambar 2.2 Tahapan karies gigi (Sumber: British Journal of General Practice, 2016)

### 2.1.2 Etiologi Karies

Karies merupakan penyakit yang berkembang melalui interaksi banyak faktor, yaitu bakteri penyebab karies, karbohidrat yang terfermentasi, faktor host yaitu gigi dan saliva, dan waktu (Yadav *et al*, 2016; Veiga *et al*, 2016). Bakteri penyebab karies diantaranya bakteri *S. mutans* dan *S. aureus*. *S. mutans* disebut 'bakteri asidogenik' dan dianggap sebagai bakteri utama penyebab karies karena kemampuannya bertahan dalam plak gigi, menghasilkan produk asam dari proses metabolisme karbohidrat sehingga pH rongga mulut rendah, mengakibatkan mineral – mineral gigi terlepas dan larut dalam rongga mulut, dan membentuk karies (Yon *et al*, 2019; Quock, 2015).

Asupan karbohidrat mempengaruhi kolonisasi bakteri penyebab karies dan pembentukan plak dalam rongga mulut (Yon *et al*, 2019). Frekuensi asupan karbohidrat yang tinggi, terutama sukrosa mampu mempercepat terjadinya karies (Yon *et al*, 2019). Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Diaz-Garrido *et al* (2016) bahwa peningkatan frekuensi asupan sukrosa setiap hari meningkatkan kariogenisitas biofilm *S. mutans*. Sukrosa dapat meningkatkan aktivitas metabolisme koloni bakteri serta sintesis protein dan enzim untuk membentuk plak menjadi *mature* (Diaz-Garrido *et al*, 2016).

Faktor host yaitu gigi dan saliva meliputi morfologi gigi, letak gigi dalam rongga mulut, kedalaman pit dan fisur, jumlah aliran saliva, serta kualitas dan kuantitas saliva (Yon *et al*, 2019). Penelitian yang telah dilakukan oleh Sanchez-Perez *et al* (2019) didapatkan bahwa terdapat hubungan antara kedalaman pit dan fisur dengan terjadinya karies. Aliran saliva yang rendah dapat meningkatkan faktor terjadinya karies. Berdasarkan penelitian oleh Shetty *et al* (2013) bahwa aliran saliva memiliki peran penting dalam mencegah karies. Aliran saliva yang normal mampu melakukan *self-cleansing* di dalam rongga mulut sehingga resiko terjadinya karies dapat berkurang (Shetty *et al*, 2013).

Faktor resiko karies meliputi faktor klinis (riwayat karies, morfologi dan letak gigi, dan penggunaan denture), tingkat kebersihan rongga mulut dan plak, faktor biokimia (kuantitas dan kualitas saliva, protein saliva, laju aliran saliva), status sosial-ekonomi (tingkat pendidikan, latar belakang keluarga, strata sosial, pendapatan), dan faktor gaya hidup (diet, kebiasaan dan perilaku) (Yon *et al*, 2019; Veiga *et al*, 2016).

### 2.1.3 Mekanisme terjadinya karies

Permukaan gigi akan dilapisi oleh *acquired pellicle salivary* yang mengandung glikoprotein, *acidic proline-rich* protein, musin, albumin, *bacterial cell debris*, dan *sialic acid* setelah dibersihkan. Bakteri penyebab karies terutama *S. mutans* akan menempel pada *acquired pellicle salivary* di permukaan gigi. Tahap ini disebut tahap adhesi karena bakteri *S. mutans* mengeluarkan protein bakteri disebut ‘adhesin’ yang akan berikatan dengan ‘proline’ kaya protein yang terkandung pada *acquired pellicle*, sehingga terjadi suatu ikatan antara keduanya (Yadav *et al*, 2017).

Di dalam rongga mulut terdapat karbohidrat yang berasal dari makanan ataupun minuman yang dikonsumsi. Bakteri *Streptococcus mutans* akan memetabolisme glukosa atau sukrosa menjadi glukosa oleh enzim glukosiltransferase dan fruktosa menjadi fruktan oleh enzim fruktosiltransferase, sehingga menghasilkan suatu polisakarida ekstraseluler (EPS). Polisakarida ekstraseluler akan memperkuat perlekatan bakteri ke permukaan gigi, pH rongga

mulut semakin menurun dan ketebalan plak bertambah (Forssten *et al*, 2010; Yadav *et al*, 2017).

Hasil metabolisme karbohidrat oleh bakteri penyebab karies menyebabkan pH rongga mulut menurun dan kondisi menjadi asam. Kondisi rongga mulut yang asam akan melarutkan struktur kristal hidroksiapatit pada enamel gigi. Lesi awal terjadinya karies ditandai dengan adanya ‘*white spot lesion*’ yaitu pada permukaan gigi berwarna ‘*chalky-white*’ dan tidak terasa sakit. Jika demineralisasi terus terjadi akan terbentuk suatu kavitas atau lubang pada gigi (Yadav *et al*, 2017; Yadav *et al*, 2016; Ramayanti *et al*, 2013).

## 2.2 Tembakau

Tembakau digunakan sebagai bahan baku dalam pembuatan rokok, cerutu, pestisida organik, dan obat – obatan. Berdasarkan iklim, tanaman tembakau di Indonesia digolongkan menjadi dua jenis, yaitu tembakau Na – Oogst dan tembakau Voor – Oogst (Tirtosastro *et al*, 2016). Tembakau Na – Oogst adalah tembakau yang ditanam saat musim kemarau dan dipanen pada musim hujan. Tembakau Na – Oogst sebagai bahan baku cerutu dan di ekspor ke Eropa, Amerika, dan Afrika. Contoh tembakau Na – Oogst adalah besuki no, vorstenlanden, dan deli (Tirtosastro *et al*, 2016). Tembakau Voor – Oogst merupakan tembakau yang ditanam pada musim hujan dan dipanen saat musim kemarau. Pada saat panen daun tembakau tidak boleh terkena air oleh karena air akan melarutkan lapisan – lapisan lilin serta rambut – rambut pada permukaan daunnya (*trichome*) yang menciptakan aroma khas tembakau. Tembakau Voor – Oogst digunakan sebagai bahan baku rokok dan kebutuhan pasar dalam negeri dan yang termasuk jenis tembakau vo adalah tembakau Virginia, tembakau Jawa, tembakau Burley, tembakau Madura, tembakau Paiton, dan tembakau Kasturi (Tirtosastro *et al*, 2016).

Berdasarkan bentuk fisik, tembakau di Indonesia dipasarkan dalam dua bentuk, yaitu:

1. Rajangan (*Slicing type*)

Tembakau rajangan hanya ada di Indonesia. Sebelum dipasarkan, tembakau terlebih dahulu dirajang sedemikian rupa kemudian dikeringkan menggunakan

sinar matahari. Berdasarkan tipe ukuran rajang, dibagi menjadi dua yaitu: rajangan kasar dan sedang (*broad cut*) serta rajangan halus (*fine cut*). Berdasarkan warnanya, dibagi menjadi rajangan kuning dan rajangan hitam (Menteri Pertanian, 2012).

## 2. Krosok (*Leaf type*)

Tembakau krosok dipasarkan berupa lembaran – lembaran daun tembakau setelah melalui proses pengeringan daun (Menteri Pertanian, 2012).

### 2.2.1 Klasifikasi Tanaman Tembakau

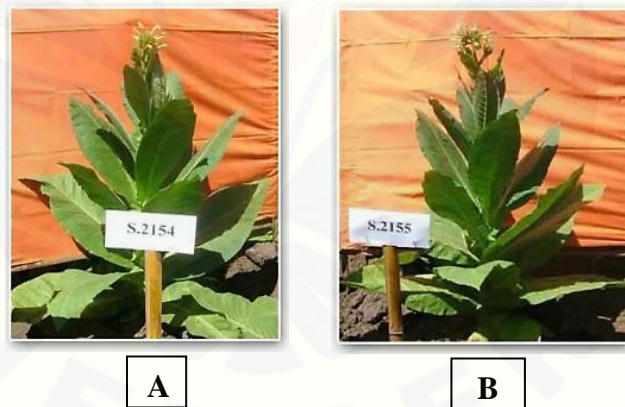
Klasifikasi tanaman tembakau sebagai berikut (Matnawi, 1997) :

- Kelas : *Dicotyledoneae*
- Ordo : *Personatae*
- Familia : *Solanaceae*
- Sub familia : *Nicotianae*
- Genus : *Nicotiana*
- Spesies : *Nicotiana tabaccum L.* dan *Nicotiana rustica*

Tembakau termasuk dalam famili *Solanaceae* dengan genus *Nicotiana* terdiri dari spesies *Nicotiana rustica L.* dan *Nicotiana tabacum L.* *Nicotiana rustica L.* memiliki kandungan nikotin yang tinggi (max n = 16%) biasanya digunakan untuk membuat abstrak alkaloid (bahan baku pembuatan obat dan insektisida), jenis ini banyak ditemukan di Rusia dan India. Tembakau dengan spesies *Nicotiana tabacum L.* memiliki kadar nikotin yang rendah (min n = 0,6%), tembakau jenis ini biasanya memiliki ketinggian lebih kurang 1,8 meter dan besar daunnya melebar dan meruncing dapat mencapai hingga 30 sentimeter.

### 2.2.2 Tembakau Kasturi

Tembakau Kasturi merupakan salah satu tanaman tembakau lokal *voor oogst* (VO) yang diolah secara krosok (*leaf type*) berupa lembaran – lembaran daun dan digunakan sebagai bahan campuran untuk rokok kretek. Tembakau Kasturi banyak dibudidayakan di Jember dan Bondowoso (Susilowati, 2006). Dari seluruh hasil produksi nasional tembakau Kasturi, sebanyak 11,36% diekspor dengan label Besuki VO dan sebanyak 88,64% dikonsumsi dalam negeri sebagai bahan baku rokok kretek. Sejak tahun 1997, dilakukan pemuliaan untuk memperbaiki varietas lokal yang ada. Seleksi terhadap varietas lokal menghasilkan dua varietas yang diputihkan/dilepas pada tahun 2006 berdasarkan SK Mentan No: 132/Kpts/SR.120/2/2007 dan No: 133/Kpts/SR.120/2/2007 yaitu Kasturi 1 dan Kasturi 2. Luas areal penanaman tembakau Kasturi pada dua daerah pengembangan yaitu Jember dan Bondowoso mencapai 3,197 hektar dengan rata – rata produktivitas petani mencapai 985 kilogram krosok/hektar atau senilai Rp. 12.805.000,00 (Ballitas, 2014).



Gambar 2.3 (A) Gambar Tembakau Kasturi 1; (B) Gambar Tembakau Kasturi 2 (Sumber: Balittas, 2014).



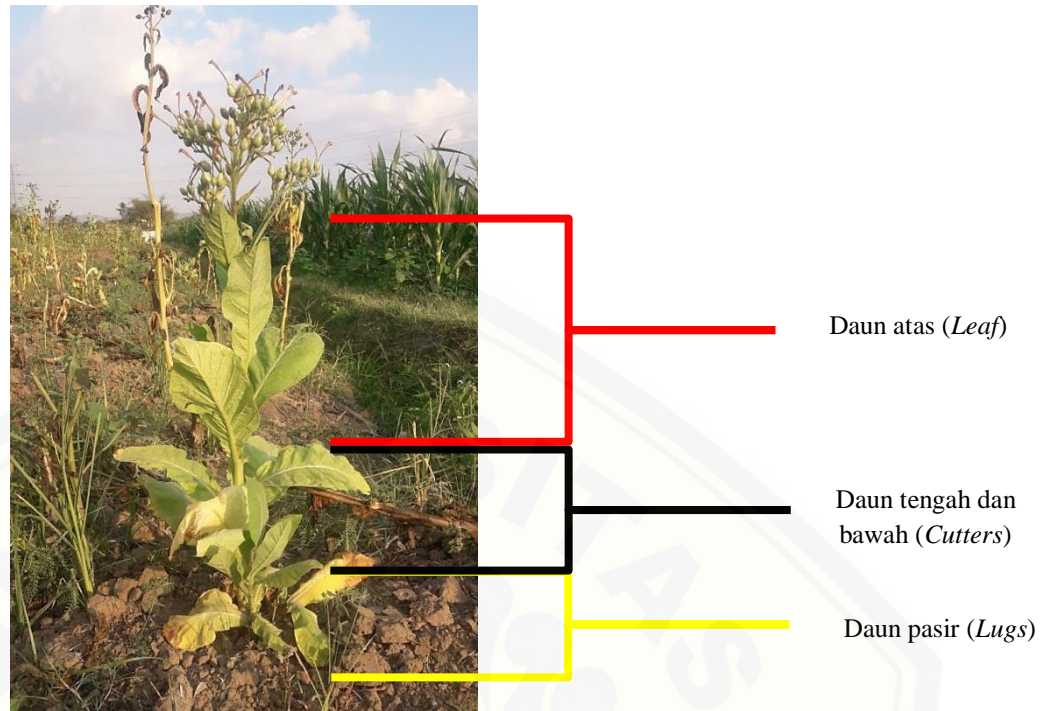
Tabel 2.1 Karakteristik Tembakau Kasturi 1 dan Kasturi 2 di Kabupaten Jember

Karakteristik	Kasturi 1	Kasturi 2
Asal varietas	Seleksi massa positif Kasturi Mawar, jember	Seleksi massa positif Kasturi Ledokombo
Bentuk daun	Lonjong	Lonjong
Ujung daun	Meruncing	Meruncing
Tepi daun	Rata	Licin
Permukaan daun	Rata	Rata
Phylotaxi	2/5, putar ke kiri	2/5, putar ke kiri
Indeks daun	0,486	0,529
Jumlah daun	16-19 lembar	17-19 lembar
Produksi	1,75 ton krosok/ha	1,75 ton krosok/ha
Indeks mutu	81,75 + 0,98	82,40 + 1,03
Kadar nikoton	3,21 + 0,08	3,54 + 0,04

### 2.2.3 Daun Tembakau

Tanaman tembakau memiliki daun tunggal, bertangkai, berwarna hijau. Bentuk daun tanaman tembakau ialah bulat lonjong (oval) atau bulat, tergantung pada setiap varietas. Daun yang berbentuk bulat lonjong ujungnya meruncing, sedangkan pada daun yang berbentuk bulat ujung daunnya tumpul. Tulang – tulang daun tembakau menyirip, bagian tepi daun sedikit bergelombang dan berurat. Lapisan daun tembakau terdiri dari lapisan *palisade parenchyma* pada bagian atas daun dan lapisan *spongy parenchyma* di bagian bawah daun (Orokundu *et al*, 2015; Siregar, 2016).

Daun tembakau diklasifikasikan berdasarkan letak daun pada batang dengan urutan dari bawah keatas, yaitu: daun pasir (*zand blad/lugs*), daun kaki (*voet blad/cutters*), daun tengah (*midden blade/leaf*), dan daun atas (*topblade/tips*) (Susilowati, 2006). Daun tembakau bagian atas dan tengah mengandung alkaloid, terpenoid, dan steroid. Sedangkan, daun tembakau bagian bawah mengandung alkaloid, dan terpenoid (Rusli *et al*, 2011). Daun tembakau dapat berperan sebagai tanaman obat yang dimanfaatkan sebagai antibakteri dan antijamur (Putri *et al*, 2014).



Gambar 2.4 Tanaman tembakau dan klasifikasi daun tembakau berdasarkan letak daun pada batang (Sumber: dokumen pribadi)

Hasil penelitian oleh Anumudu *et al* (2019) bahwa ekstrak daun tembakau konsentrasi 200 mg/ml memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. pyogenes* dengan diameter zona hambat sebesar 15 mm. Penelitian yang dilakukan oleh Orokundu *et al* (2015) bahwa ekstrak daun tembakau konsentrasi 1 mg/ml memiliki kemampuan antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dengan diameter zona hambat 2,3 cm. Penelitian oleh Putri *et al* (2014) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun tembakau memiliki daya antibakteri terhadap *S. mutans* dan *P. gingivalis* serta memiliki daya antijamur terhadap *C. albicans*.

Selain itu, daun tembakau mengandung senyawa aktif seperti terpenoid, alkaloid, fenolik, isoprenoid, dan minyak atsiri (Popova *et al*, 2019; Jassbi *et al*, 2017; Putri *et al*, 2014). Terpenoid sebagai antibakteri bekerja dengan cara bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri yang mengakibatkan sel bakteri

akan kekurangan nutrisi sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Wahdaningsih *et al*, 2014). Alkaloid sebagai antibakteri akan merusak komponen penyusun peptidoglikan sel bakteri sehingga dinding sel bakteri lisis dan menyebabkan kematian sel (Putri *et al*, 2014). Minyak atsiri memberikan aroma khas tanaman tembakau (Yan *et al*, 2019). Flavonoid sebagai antibakteri akan berinteraksi dengan dinding sel bakteri, merusak permeabilitas dinding sel bakteri, lisosom, serta mikrosom, dan mendenaturasi protein sel bakteri (Putri *et al*, 2014). Flavonoid berperan sebagai antijamur dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri, mengakibatkan perubahan komposisi sel bakteri, dan fungsi membran sel bakteri terganggu (Putri *et al*, 2014).

### 2.3 Resinoid

Resinoid merupakan produk aromatik tembakau yang didapatkan melalui proses ekstraksi menggunakan pelarut polar yaitu methanol, etanol, atau aseton (Popova *et al*, 2020). Resinoid berupa massa semi solid berwarna kecoklatan dan memiliki bau khas tembakau (Popova *et al*, 2019). Produk aromatik ini biasa digunakan sebagai bahan parfum dan pemberi rasa pada rokok dan produk tembakau lainnya (Popova *et al*, 2019).

Resinoid merupakan suatu massa yang memiliki senyawa bioaktif didalamnya, yaitu terpenoid (diterpenoid dan triterpenoid), alkaloid, *aliphatic hydrocarbon*, dan *oxygenated aliphatic* (Popova *et al*, 2015). Senyawa *aliphatic hydrocarbon* mempengaruhi tampilan dan warna resinoid (massa semi solid berwarna kecoklatan), sedangkan senyawa *oxygenated aliphatic* dan diterpenoid mempengaruhi aroma resinoid (Popova *et al*, 2019). Perbedaan komposisi kualitas dan jumlah resinoid dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu jenis dan varietas tembakau, kondisi iklim wilayah penanaman tembakau, serta proses pengolahan dan ekstraksi tembakau (Popova *et al*, 2019).

Penelitian oleh Popova *et al* (2015) mengenai kandungan resinoid pada tiga jenis tanaman tembakau yang berbeda, yaitu tembakau Virginia, tembakau Burley, dan tembakau Oriental dan diketahui bahwa resinoid pada tembakau Burley terkandung lebih sedikit (14,87%) dibandingkan dengan tembakau

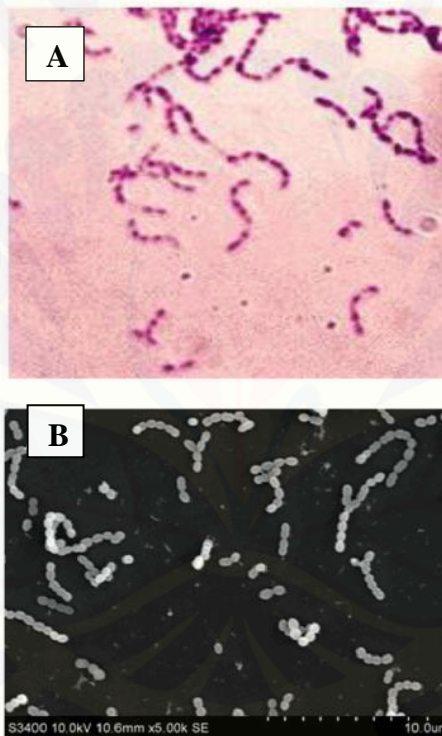
Virginia (29,77%) dan tembakau Oriental (25,65%). Selain itu, penelitian yang telah dilakukan oleh Popova *et al* (2019) diketahui bahwa senyawa aktif yang paling banyak terkandung dalam resinoid tembakau adalah *aliphatic hydrocarbon*, *oxygenated aliphatic*, terpenoid, dan alkaloid. Dari ketiga jenis tembakau, tembakau burley mengandung lebih banyak terpenoid (dieterpenoid 18,63% dan triterpenoid 4,55%) dibandingkan dengan tembakau Virginia (dieterpenoid 11,11% dan triterpenoid 6,92%) dan tembakau Oriental (dieterpenoid 10,02% dan triterpenoid 6,23%) (Popova *et al*, 2019). Kemudian, hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Popova *et al* (2019) didapatkan bahwa kemampuan antibakteri resinoid tembakau lebih efektif terhadap bakteri Gram positif dan jamur dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Kemampuan antibakteri resinoid dikarenakan adanya senyawa terpenoid yang terkandung didalamnya. Senyawa terpenoid ini telah diketahui memiliki kemampuan sebagai antibakteri dengan target pada membran sel bakteri (Priyatmoko *et al*, 2018).

#### **2.4 *Streptococcus mutans***

*S. mutans* merupakan bakteri Gram-positif anaerob fakultatif (Farkash *et al*, 2019). Bakteri *S. mutans* berbentuk kokus dan membentuk koloni berpasangan atau berantai (Sandi *et al*, 2015). Hasil uji katalase bakteri *S. mutans* adalah negatif karena bakteri ini tidak memiliki enzim katalase (Susanti *et al*, 2018). Uji katalase digunakan untuk membedakan bakteri Gram positif antara Genus *Streptococcus* dengan Genus *Staphylococcus* (Susanti *et al*, 2018). Bakteri *S. mutans* bersifat non motil berdasarkan hasil uji motilitas karena bakteri ini tidak memiliki flagela (Susanti *et al*, 2018). Hasil uji pewarnaan Gram bakteri *S. mutans* berwarna ungu (Susanti *et al*, 2018). *S. mutans* dapat tumbuh secara optimal pada suhu sekitar 18°C – 40°C dan pada pH saliva 4,5-5,5 (Sandi *et al*, 2015).

Klasifikasi bakteri *Streptococcus mutans* adalah sebagai berikut (Fatmawati, 2011) :

Kingdom	: <i>Monera</i>
Divisio	: <i>Firmicutes</i>
Class	: <i>Bacili</i>
Order	: <i>Lactobacilalles</i>
Family	: <i>Streptococcaceae</i>
Genus	: <i>Streptococcus</i>
Species	: <i>Streptococcus mutans</i>



Gambar 2.5 (A) Koloni bakteri *Streptococcus mutans* secara mikroskopik; (B) Koloni bakteri *Streptococcus mutans* dengan Scanning Electron Microscope (SEM) (Sumber: Daboor *et al*, 2015; Melok *et al*, 2018).

*S. mutans* memiliki tiga potensi kariogenik utama, yaitu: (i) mampu menyintesis polimer ekstraselular glukon dari hasil metabolisme sukrosa sehingga meningkatkan perlekatan, kolonisasi, dan akumulasi biofilm pada permukaan gigi; (ii) mampu memetabolisme karbohidrat menjadi asam organik (*acidogenicity*); dan (iii) mampu berkembang dan bertahan dalam rongga mulut pada pH rendah

(*aciduricity*) (Lemos *et al*, 2019). *S. mutans* berperan penting dalam pembentukan karies gigi (Rahman *et al*, 2018). *S. mutans* memiliki *surface protein antigen peptide* (SpaP) yang akan berikatan dengan reseptor pelikel di permukaan gigi (Rahman *et al*, 2018). Perlekatan *S. mutans* pada permukaan gigi dipengaruhi pula oleh enzim *glucosyltransferase* (GTF) yang mampu mengubah sukrosa menjadi glukukan. Glukan memainkan peran penting dalam memfasilitasi perlekatan bakteri pada permukaan gigi sehingga akumulasi plak meningkat dan menginisiasi terjadinya karies (Rahman *et al*, 2018).

*S. mutans* bersifat asidogenik karena mampu menghasilkan polisakarida ekstraselular (EPS) dengan cara metabolisme fruktosa menjadi fruktans oleh enzim fruktosiltransferase (FTF) dan metabolisme glukosa dan sukrosa menjadi glukukan oleh enzim glukosiltransferase (GTF) (Farkash *et al*, 2019). Adanya EPS akan meningkatkan perlekatan bakteri pada permukaan gigi, plak yang terbentuk semakin bertambah, serta pH dalam rongga mulut semakin menurun (Daboor *et al*, 2015; Yadav *et al*, 2017; Farkash *et al*, 2019).

*S. mutans* merupakan bakteri Gram positif (Rahman *et al*, 2017). Dinding sel bakteri Gram positif tersusun oleh 40-80% peptidoglikan (Rahman *et al*, 2017). Pada bakteri Gram positif terdapat asam teikoid yang dihubungkan dengan peptidoglikan melalui ikatan kovalen. Asam teikoid bersifat hidrofilik (larut dalam air) dan berfungsi sebagai media transport ion bermuatan positif untuk keluar masuk ke dinding sel. Sifat larut air menyebabkan dinding sel bakteri Gram positif bersifat lebih polar sehingga senyawa antibakteri akan lebih mudah menembus dinding sel bakteri Gram positif (Rahman *et al*, 2017).

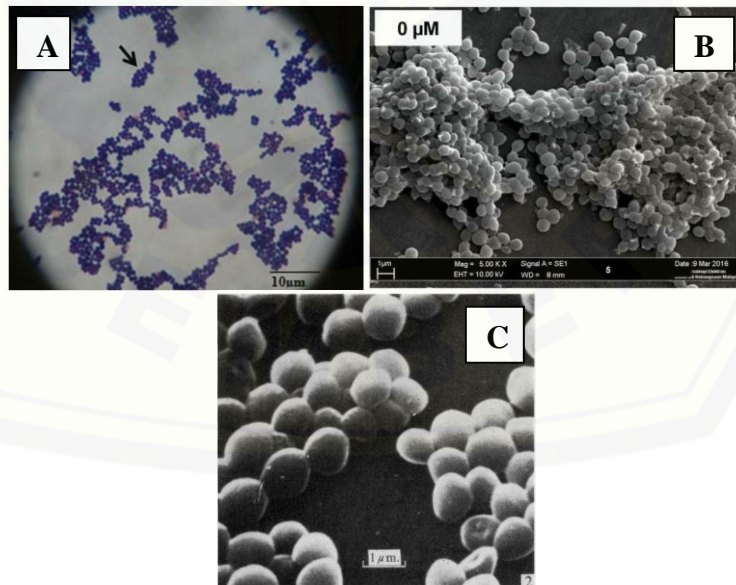
#### **2.4 *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* merupakan bakteri gram-positif, anaerob fakultatif, dan berbentuk kokus (Arbi *et al*, 2019). *S. aureus* dapat tumbuh pada suhu 6°C - 48°C dengan suhu optimal 37°C (Arbi *et al*, 2019). Koloni bakteri *S. aureus* berdiameter 0,6 µm – 1 µm, berwarna kuning keemasan dan berkilauan pada media biakan padat setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Missiakas *et al*, 2013; Vitko *et al*, 2013). Media biakan *S. aureus* meliputi *Mueller Hinton*

Agar (MHA), *Brain Heart Infusion (BHI) Agar*, *Tryptic Soy Agar (TSA)*, *Todd Hewitt Agar (THA)*, *Luria-Bertani Agar (LBA)*, dan *Blood Agar* (Vitko *et al*, 2013). Hasil uji pewarnaan Gram bakteri *S. aureus* berwarna ungu (Arbi *et al*, 2019). *S. aureus* bersifat katalase positif ditandai dengan terbentuknya gelembung – gelembung udara berdasarkan hasil uji katalase (Arbi *et al*, 2019). Bakteri *S. aureus* menghasilkan enzim katalase yang dapat menguraikan  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$  sehingga menghasilkan gelembung (Susanti *et al*, 2018). Uji katalase digunakan untuk membedakan bakteri *S. aureus* dengan bakteri Gram positif lainnya seperti *S. mutans* (Missiakas *et al*, 2013).

Klasifikasi bakteri *S. aureus* adalah sebagai berikut (Foster *et al*, 2015):

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Filum	: <i>Firmicutes</i>
Kelas	: <i>Bacilli</i>
Ordo	: <i>Bacillales</i>
Famili	: <i>Staphylococcaceae</i>
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>



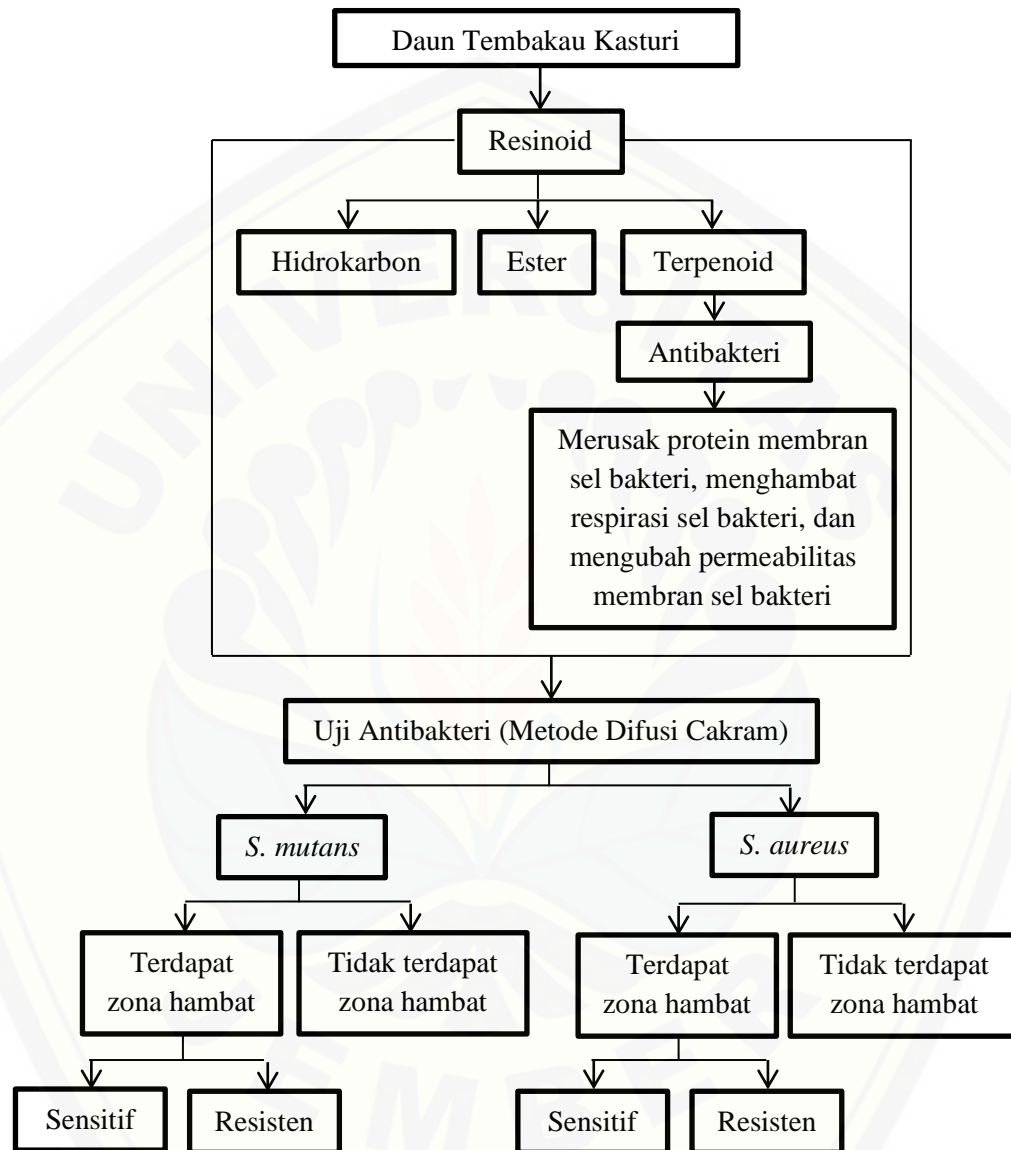
Gambar 2.6 (A) Koloni bakteri *S. aureus* secara mikroskopik (Jahan *et al*, 2015); (B) dan (C) Koloni bakteri *S. aureus* dengan Scanning Electron Microscope (SEM) (Sumber: Jahan *et al*, 2015; Greenwood *et al*, 1972; Kong *et al*, 2017)

Penelitian oleh Yadav *et al* (2015) bahwa bakteri *S. aureus* merupakan bakteri terbanyak kedua sebesar 28,92% yang ditemukan pada lesi karies setelah bakteri *S. mutans* (40%) (Yadav *et al*, 2015). Penelitian oleh Endriani *et al* (2020) bahwa pada plak gigi yang karies penderita diabetes mellitus ditemukan bakteri *S.aureus* sebesar 5,3%. Bakteri *S.aureus* dapat menyebabkan manifestasi klinis meliputi osteomyelitis, endokarditis, *angular cheilitis*, mukositis, *facial space infection*, infeksi implan gigi, infeksi kulit dan jaringan lunak, septikemia, dan merupakan bakteri penyebab karies (Patil *et al*, 2013; Wang *et al*, 2017; Garbacz *et al*, 2018). *S. aureus* mampu berkolonisasi dan membentuk biofilm. Biofilm bakteri ini dilapisi oleh polisakarida ekstraseluler yang tebal dan fibrin pada permukaan selnya sehingga tahan terhadap antibiotik dan lebih resisten dibandingkan bakteri *S. mutans* (Pambayun *et al*, 2008). *S. aureus* merupakan bakteri Gram positif yang memiliki struktur dinding terdiri atas lapisan peptidoglikan yang tebal (90%), lapisan lipid (1-4%), tanpa adanya *outer membrane*. lapisan peptidoglikan yang tebal menyebabkan agen antibakteri menjadi sulit masuk kedalam sel bakteri (Priyatmoko *et al*, 2018).

Penelitian oleh Putri *et al* (2014) bahwa ekstrak etanol daun tembakau memiliki kemampuan antibakteri terhadap bakteri *S. mutans* pada konsentrasi 80% dan *P. gingivalis* pada konsentrasi 100%, serta memiliki kemampuan sebagai antijamur terhadap *C. albicans* pada konsentrasi 100%. Selain itu, penelitian yang telah dilakukan oleh Duangsri *et al* (2012) bahwa ekstrak daun tembakau konsentrasi 50%, 80%, dan 100% mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli*. Selain itu, penelitian yang telah dilakukan oleh Popova *et al* (2015) bahwa kemampuan antibakteri resinoid daun tembakau jenis Burley, Virginia, dan Oriental lebih efektif terhadap bakteri Gram positif dan jamur dibandingkan dengan bakteri Gram negatif yaitu pada konsentrasi *minimum bactericidal concentration* (MBC) sebesar 0,2% pada bakteri *S. aureus*.



## 2.5 Kerangka Konsep



Keterangan:

Sensitif: Diameter zona hambat > 18 mm

Resisten: Diameter zona hambat < 12 mm

(Popova *et al*, 2019)

## 2.6 Hipotesa

Hipotesis dari penelitian ini, yaitu:

Resinoid daun tembakau Kasturi memiliki kemampuan antibakteri terhadap bakteri *S. mutans* dan *S. aureus* terlihat adanya zona hambat.



### BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *post test control group design*.

#### 3.2 Tempat Penelitian

- a. Pengeringan daun tembakau Kasturi dan pembuatan resinoid daun Tembakau Kasturi dilakukan di Laboratorium Kimia dan laboratorium *Drug Utilization and Discovery Research Group* (DUDRG) Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- b. Uji aktivitas antibakteri di Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember dan Laboratorium CDAST Universitas Jember.

#### 3.3 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2019 – Juli 2020.

##### 3.3.1 Variabel Penelitian

- a. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah resinoid daun tembakau Kasturi konsentrasi 6 mg/ml, 8 mg/ml, 10 mg/ml, 12 mg/ml dan waktu inkubasi yaitu 3 jam, 6 jam, 12 jam, dan 24 jam.

- b. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah diameter zona hambat bakteri *S. mutans* dan *S. aureus*.

- c. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah diameter kertas cakram (6 mm), suhu inkubasi ( $37^{\circ}\text{C}$ ), limbah daun tembakau Kasturi berasal dari Kecamatan Ledokombo Kabupaten Jember dan sterilisasi alat bahan.

### 3.4 Definisi Operasional

- a. Resinoid daun tembakau Kasturi merupakan produk aromatik daun tembakau Kasturi berasal dari Kecamatan Ledokombo, Kabupaten Jember, Jawa Timur yang diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol dan fraksinasi menggunakan pelarut metanol, n-heksan, dan etil asetat. Konsentrasi resinoid yang digunakan adalah 6 mg/ml, 8 mg/ml, 10 mg/ml, 12 mg/ml.
- b. Diameter zona hambat adalah daerah jernih yang tampak di sekeliling kertas cakram dan diukur menggunakan jangka sorong dalam skala milimeter untuk mengetahui kekuatan daya hambat resinoid daun tembakau Kasturi terhadap pertumbuhan *S. mutans* dan *S. aureus*. Diameter zona hambat ditandai dengan terbentuknya daerah bening di sekeliling kertas cakram pada waktu pengamatan 3 jam, 6 jam, 12 jam, dan 24 jam.
- c. *S. mutans* merupakan bakteri Gram positif, anaerob fakultatif, berbentuk kokus, koloni berantai, dan teridentifikasi pada pewarnaan Gram berwarna ungu.
- d. *S. aureus* merupakan bakteri Gram positif, anaerob fakultatif, berbentuk kokus, koloni bergerombol 'seperti buah anggur', dan teridentifikasi pada pewarnaan Gram berwarna ungu.

### 3.5 Sampel Penelitian

#### 3.5.1 Pengelompokan Sampel

Terdapat dua jenis bakteri sebagai subjek penelitian, yaitu *S. mutans* dan *S. aureus*. Sampel dibagi menjadi 8 kelompok yaitu 4 kelompok kontrol negatif dan 4 kelompok perlakuan. Tiap kelompok berjumlah empat kertas cakram, yaitu:

- a. Kelompok Kontrol pelarut 1 : dimetil sulfoksida (DMSO) 0,8%
- b. Kelompok Kontrol pelarut 2 : dimetil sulfoksida (DMSO) 1,6%
- c. Kelompok Kontrol pelarut 3 : dimetil sulfoksida (DMSO) 3,2%
- d. Kelompok Kontrol pelarut 4 : dimetil sulfoksida (DMSO) 6,4%
- e. Kelompok M1 dan A1 : Resinoid konsentrasi 6 mg/mL
- f. Kelompok M2 dan A2 : Resinoid konsentrasi 8 mg/mL

- g. Kelompok M3 dan A3 : Resinoid konsentrasi 10 mg/mL  
 h. Kelompok M4 dan A4 : Resinoid konsentrasi 12 mg/mL

Sehingga jumlah sampel kertas cakram yang akan digunakan pada penelitian adalah 64 kertas cakram dan dilakukan penghitungan oleh 3 pengamat.

### 3.5.2 Jumlah Sampel

Jumlah sampel pada penelitian ini dihitung menggunakan penghitungan jumlah sampel dengan rumus Federer, sebagai berikut:

$$t(r-1) > 15$$

Keterangan:

t: Jumlah kelompok perlakuan dan kelompok kontrol

r: Jumlah ulangan

$$t(r-1) > 15$$

$$8(r-1) > 15$$

$$8r - 8 > 15$$

$$8r > 15 + 8$$

$$6r > 23$$

$$r > \frac{23}{6}$$

$$r > 3,8$$

Berdasarkan hasil penghitungan menggunakan rumus, jumlah pengulangan sampel minimal yang dapat digunakan yaitu diatas 3. Sehingga, pada penelitian ini penulis menggunakan 4 kali pengulangan sampel untuk setiap kelompok. Kelompok yang digunakan sebanyak 8 kelompok.

### 3.5.2 Kriteria Sampel

Sampel daun tembakau Kasturi yang digunakan pada penelitian ini adalah keseluruhan bagian daun tembakau koseran, berwarna kuning kecoklatan, daun berlubang atau rusak, dan terletak di bagian paling bawah dari tanaman tembakau. Limbah daun tembakau Kasturi dipanen dari ladang sawah milik petani di Desa Ledokombo, Kabupaten Jember.

### 3.6 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.6.1 Alat Penelitian

Alat untuk membuat resinoid daun tembakau Kasturi, yaitu:

- a. Blender
- b. Labu erlenmeyer
- c. Beaker glass
- d. Corong pisah dan kertas saring
- e. Magnetic stir
- f. Rotary evaporator
- g. Pipet
- h. Timbangan
- i. Gelas ukur

Alat untuk uji anti bakteri, yaitu:

- a. Tabung *Erlenmeyer*
- b. *Petridish* tidak bersekat
- c. Ose
- d. Bunsen
- e. Tabung reaksi
- f. Jangka sorong
- g. Mikropipet
- h. *Blue mikrotipe*
- i. *Yellow mikrotipe*
- j. Kompor listrik
- k. *Laminar flow*
- l. Inkubator
- m. *Autoclave*
- n. Sterilisator panas kering (Oven),
- o. Pinset
- p. *Spreader*
- q. *Vortex*

### 3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian, yaitu:

- a. Daun tembakau Kasturi diperoleh dari Kecamatan Ledokombo, Kabupaten Jember, Jawa Timur
- b. Bakteri *S. mutans*
- c. Bakteri *S. aureus*
- d. Media *Mueller-Hinton Agar*
- e. DMSO 0,8%, 1,6%, 3,2%, dan 6,4%
- f. HCl 10%
- g. Metanol
- h. Etil asetat
- i. *N-hexane*
- j. *Aquadest*
- k. Reagen uji *dragendorff*
- l. *Blank disc* 6 milimeter
- m. spirtus
- n. Spidol dan kertas label
- o. Masker dan sarung tangan

### 3.7 Prosedur Penelitian

- a. Tahap persiapan

Persiapan penelitian dimulai dengan menyiapkan *ethical clearence* dan surat ijin penelitian.

- b. Ekstraksi resinoid daun tembakau Kasturi

Daun tembakau dicuci bersih dan dikeringkan dengan cara kering angin pada suhu kamar. Daun tembakau yang sudah kering dihaluskan dengan menggunakan blender. Serbuk daun tembakau Kasturi sebanyak 100 gram dimaserasi dengan menggunakan pelarut metanol perbandingan 1 (sampel): 6 (pelarut) untuk menarik senyawa polar dan non polar, kemudian stir *overnight* dan didiamkan selama 10 menit. Ekstrak metanol disaring menggunakan corong *Buchner* hingga larutan berwarna jernih. Ekstrak methanol hasil saring

ditambahkan n-heksan untuk menarik senyawa non polar dan di *stirrer* selama 20 menit. Hasilnya terdapat dua fase yaitu lapisan bawah (metanol) dan lapisan atas (n-heksan) yang memiliki massa jenis lebih rendah dari metanol. Ekstrak n-heksan ditambahkan HCL 10% untuk menghilangkan nikotin dan di *stirrer* selama 30 menit. Kemudian, dilakukan uji *dragendorff* untuk mengetahui ada atau tidaknya kandungan nikotin dalam larutan. Setelah larutan *free* nikotin, larutan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator*.

Ekstrak hasil evaporasi kemudian dimasukkan kedalam kolom kromatografi yang sudah diisi dengan silika gel. Selanjutnya, diberi pelarut n-heksan 100%; n-heksan 50% : DCM (*Dichloromethan*) 50%; DCM 100%; DCM 50% : ethyl asetat 50%, dan ethyl asetat 100% secara bertahap. Fraksinasi dengan kromatografi kolom gravitasi bertujuan untuk mendapatkan fraksinasi resinoid. Kromatografi kolom gravitasi memiliki prinsip yang sama dengan kromatografi kolom cair vakum yaitu sampel dielus eluen yang memiliki tingkatan kepolaran tinggi. Fase diam berupa silika G<sub>60</sub> merek. Proses elusi dengan metode bergradien, sehingga elusi diawali dengan eluen tunggal n-heksan yang bersifat non polar. Kemudian, divariasi eluen yang bersifat lebih polar. Fase gerak dibiarkan mengalir melalui kolom yang disebabkan oleh gaya dorong gravitasi dengan pita senyawa terlarut akan bergerak dengan laju yang berbeda, memisah dan dikumpulkan berupa fraksi ketika keluar dari kolom. Selanjutnya, 5 fraksi dievaporasi untuk dilakukan uji GC-MS (Zhou *et al*, 2016).

c. Pengenceran resinoid daun tembakau Kasturi

Penelitian ini menggunakan resinoid daun tembakau kasturi yang diencerkan menggunakan DMSO. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan rumus:

$$V1.M1 = V2.M2$$

Ket:

V1: Volume awal resinoid daun tembakau

M2: Konsentrasi awal resinoid daun tembakau

V2: Volume akhir resinoid daun tembakau

M2: Konsentrasi akhir resinoid daun tembakau



d. Pembuatan Media Kultur

1. Media Kultur Bakteri *S. mutans*

Pada penelitian ini digunakan media kultur *Mueller-Hinton Agar* yang telah dikemas dalam *petridish*. Media kultur *Mueller-Hinton Agar* digunakan untuk pertumbuhan bakteri *S. mutans*.

2. Media Kultur Bakteri *S. aureus*

Pada penelitian ini digunakan media kultur *Mueller-Hinton Agar* yang telah dikemas dalam *petridish*. Media kultur *Mueller-Hinton Agar* digunakan untuk pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

e. Pembuatan suspensi bakteri

1. Suspensi *S. mutans*

Tahap pembuatan suspensi *S. mutans* dilakukan dalam *laminar flow* agar steril. Suspensi dibuat dengan mengambil 1 ose *S. mutans* dari sediaan biakan serta dilarutkan dalam *brain heart infusion broth* (BHIB) cair pada tabung reaksi hingga mencapai 0,5 *Mc-Farland* atau sebanding dengan jumlah bakteri  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL.

2. Suspensi *S. aureus*

Tahap pembuatan suspensi *S. aureus* dilakukan dalam *laminar flow* agar steril. Suspensi dibuat dengan mengambil 1 ose bakteri *S. aureus* dari sediaan biakan dan dilarutkan dalam *brain heart infusion broth* (BHIB) cair pada tabung reaksi hingga mencapai 0,5 *Mc-Farland* atau sebanding dengan jumlah bakteri  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL.

f. Inokulasi bakteri

Inokulasi bakteri *S. mutans* dan bakteri *S. aureus* dilakukan menggunakan teknik *spread plate* pada media kultur *Mueller-Hinton Agar*. Suspensi bakteri sebanyak 100  $\mu$ l diambil menggunakan mikropipet (Bereksi *et al.*, 2018). Kemudian, diteteskan di atas permukaan media kultur dan diratakan menggunakan *spreader* (Wassel and Khattab, 2017). Tahapan inokulasi dilakukan di dalam *laminar flow*.

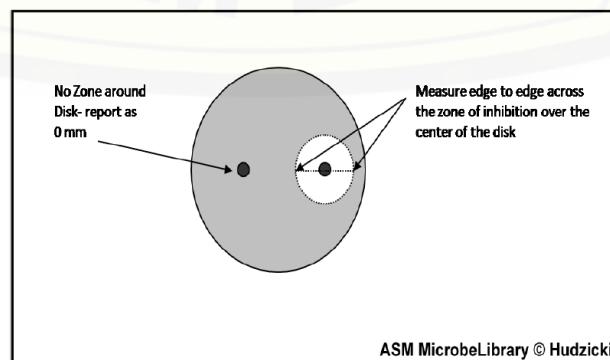
g. Uji daya hambat antibakteri

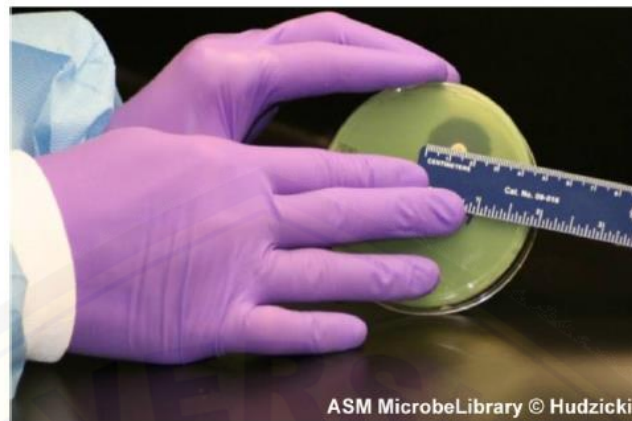
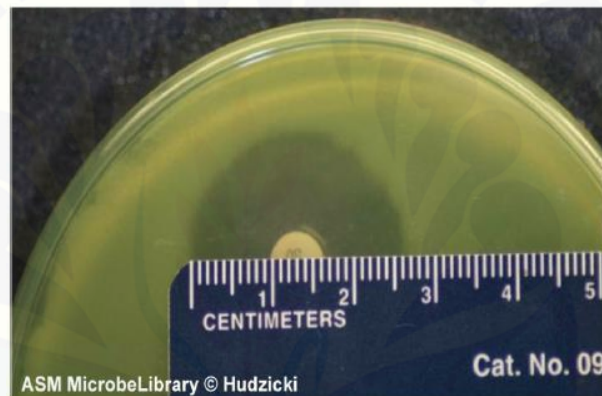
Uji daya hambat antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode *disc-diffusion* pada media kultur *Mueller-Hinton Agar*. Kertas cakram steril ditetaskan resinoid daun tembakau Kasturi konsentrasi 6 mg/ml, 8 mg/ml, 10 mg/ml, 12 mg/ml sebanyak 20 $\mu$ L tiap cakram (Radji *et al.*, 2013). Kertas cakram steril ditetesi dengan DMSO konsentrasi 0,8%, 1,6%, 3,2%, 6,4% sebagai kontrol pelarut. Kertas cakram didiamkan selama satu menit hingga menyerap. Kemudian, kertas cakram ditempelkan pada masing - masing permukaan media kultur yang telah diinokulasi dengan biakan bakteri menggunakan pinset steril dan ditekan secara perlahan agar menempel dengan baik. Tahapan uji antibakteri dilakukan di dalam *laminar flow*. Media kultur dibalik supaya uap pada permukaan tutup media kultur tidak jatuh mengenai permukaan media kultur. Kemudian, dilakukan inkubasi selama 3 jam, 6 jam, 12 jam, dan 48 jam pada suhu 37° C.

h. Pengukuran Zona Hambat

Pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* dan *S. aureus* dilakukan menggunakan jangka sorong sebanyak 3 kali oleh 3 orang pengamat yang berbeda. Pengukuran dilakukan setelah inkubasi bakteri selama 3 jam, 6 jam, 12 jam, dan 24 jam. Zona hambat adalah daerah atau wilayah jernih yang tampak di sekeliling kertas cakram.

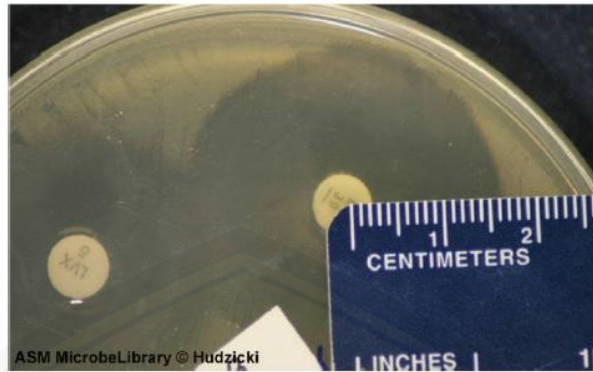
Pengukuran zona hambat menggunakan jangka sorong (*caliper*). Pengukuran dilakukan dengan mengukur diameter dari zona hambat (dari tepi ke tepi zona hambat), termasuk diameter kertas cakram (Hudzicki, 2016). Jika tidak ada zona hambat atau zona hambat yang terbentuk diameternya sama dengan diameter kertas cakram maka dianggap sebagai 0 mm.



**B****C**

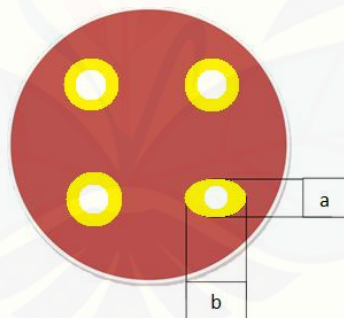
Gambar 3.1 (A) Pengukuran zona hambat dengan cara menghitung diameter zona hambat, (B) Pengukuran diameter zona hambat menggunakan penggaris atau jangka sorong (caliper), (C) Hasil pengukuran diameter zona hambat (Sumber: Hudzicki, 2016).

Apabila zona hambat saling bertumpuk (*overlap*), pengukuran diameter zona hambat dilakukan dengan mengukur radius zona hambat. Caranya adalah pengukuran dilakukan dari tengah kertas caram ke tepi zona hambat yang terlihat jelas. Hasil pengukuran ini kemudian dikalikan 2 untuk mengetahui diameter zona hambat yang sebenarnya (Hudzicki, 2016). Contoh: apabila diketahui radius zona hambat adalah 16 mm maka dikalikan 2 sehingga diameter zona hambatnya adalah 32 mm.



Gambar 3.2 Zona hambat tampak saling bertumpuk (overlap). Pengukuran dilakukan dengan menghitung radius zona hambat kemudian dikalikan 2 untuk mengetahui diameter zona hambat yang sebenarnya (Sumber: Hudzicki, 2016).

Apabila zona hambat berbentuk lonjong, maka pengukuran dilakukan pada diameter zona hambat yang panjang (misal  $a$  mm) dan diameter zona hambat yang pendek (misal  $b$  mm) kemudian keduanya dijumlah dan dibagi dua. Rumus perhitungan diameter zona hambatnya =  $\frac{a+b}{2}$  (Majidah, 2014).

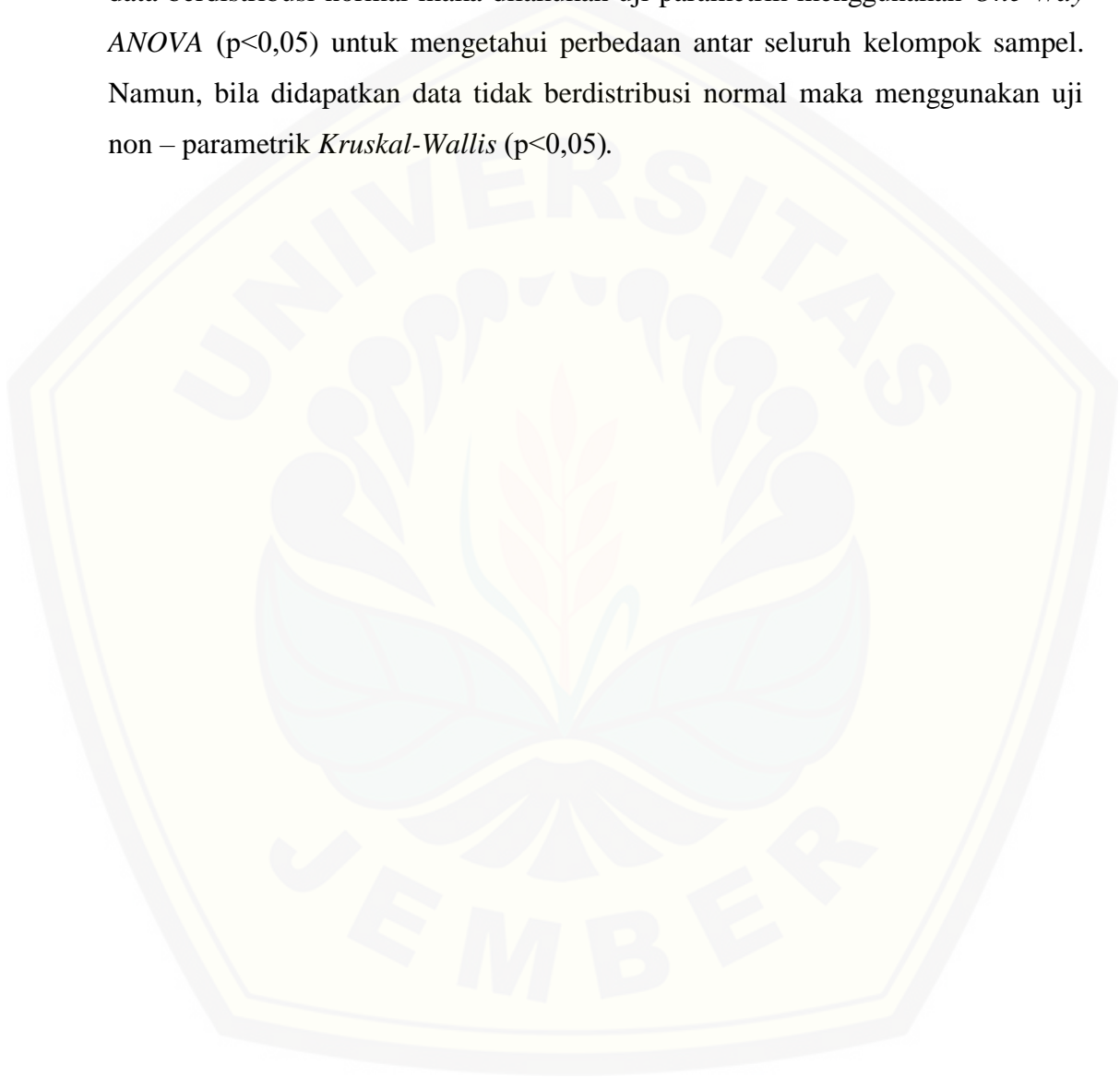


Gambar 3.3 a. diameter terpendek, b. diameter terpanjang, warna putih menunjukkan kertas cakram ukuran 6 mm, warna kuning menunjukkan zona hambat, warna merah menunjukkan media Mueller – Hinton Agar.

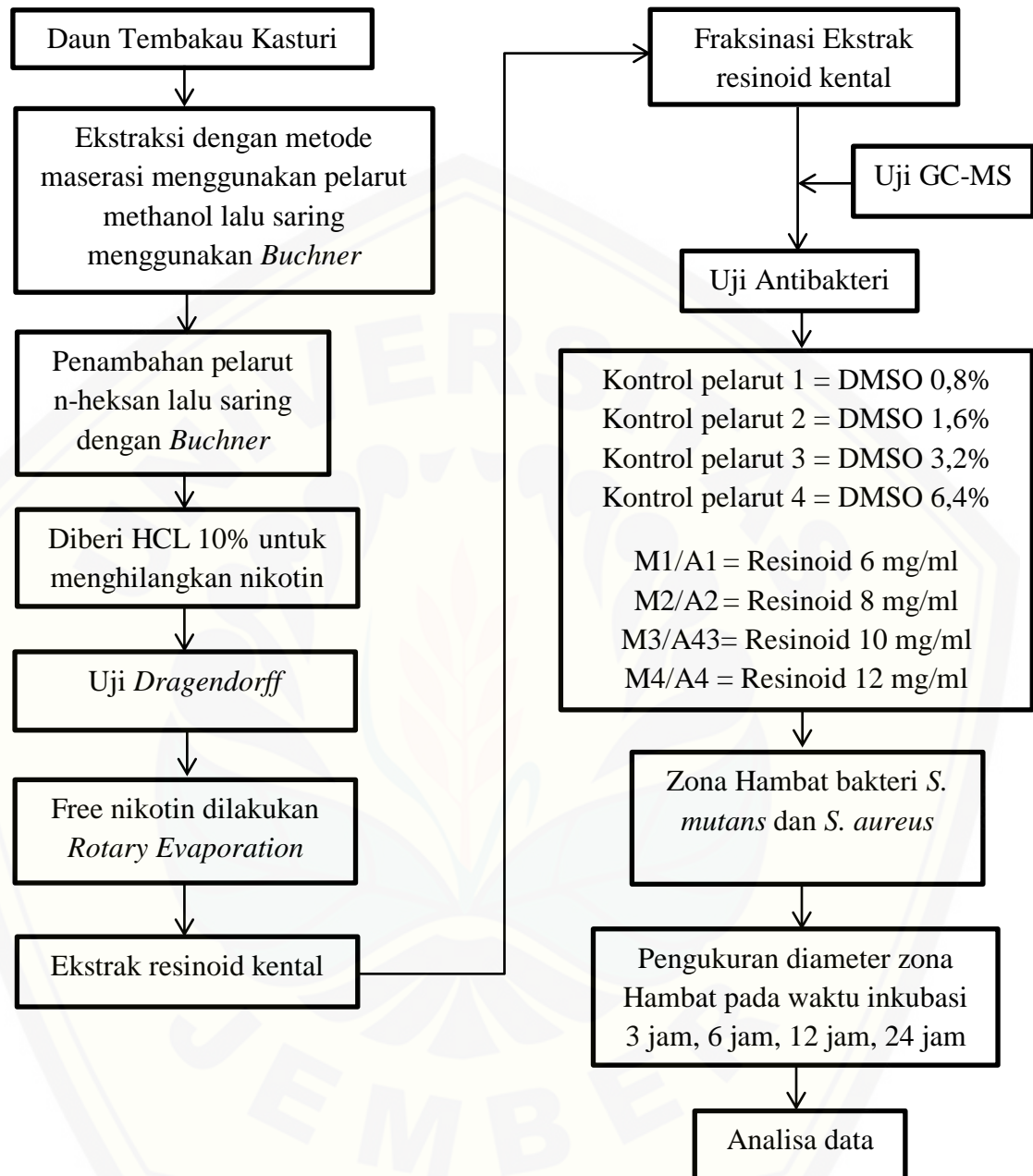
Hasil pengukuran diameter zona hambat resinoid daun tembakau Kasturi dikelompokkan dalam klasifikasi oleh Popova *et al* (2019), yaitu bakteri *S. mutans* dan *S. aureus* dikatakan sensitif terhadap resinoid daun tembakau Kasturi apabila diameter zona hambat lebih dari 18 mm, cukup sensitif apabila diameter zona hambat 12 – 18 mm, dan resisten apabila diameter zona hambat yang dihasilkan kurang dari 12 mm (Popova *et al*, 2019).

### 3.8 Analisis Data

Pada penelitian ini, data yang didapat dianalisis menggunakan uji normalitas *Kolmogorov Smirnov* ( $p > 0,05$ ) dan uji homogenitas *Levene*. Apabila didapatkan data berdistribusi normal maka dilakukan uji parametrik menggunakan *One Way ANOVA* ( $p < 0,05$ ) untuk mengetahui perbedaan antar seluruh kelompok sampel. Namun, bila didapatkan data tidak berdistribusi normal maka menggunakan uji non – parametrik *Kruskal-Wallis* ( $p < 0,05$ ).



### 3.9 Bagan Alur Penelitian



## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Resinoid daun tembakau Kasturi memiliki zona hambat terhadap bakteri *S. mutans* pada konsentrasi 12 mg/ml dengan waktu inkubasi 6 jam. Sedangkan, zona hambat terhadap bakteri *S. aureus* terjadi pada resinoid konsentrasi 8 mg/ml dengan waktu inkubasi 12 jam.

### 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka saran yang dapat diberikan adalah sebagai berikut:

1. Perlu adanya penelitian lanjutan untuk dapat menentukan fase – fase pertumbuhan bakteri *S. mutans* dan *S. aureus* yang lebih akurat sehingga resinoid daun tembakau Kasturi mampu memiliki kemampuan sebagai antibakteri yang baik.
2. Perlu dilakukan uji untuk menghilangkan senyawa non aktif seperti hidrokarbon sehingga resinoid daun tembakau Kasturi lebih efektif sebagai antibakteri.
3. Perlu adanya penelitian lanjutan berupa penambahan uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) untuk mengetahui konsentrasi minimum resinoid daun tembakau Kasturi yang masih mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* dan *S. aureus* dan uji MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) untuk mengetahui konsentrasi daya bunuh minimal terhadap bakteri *S. mutans* dan *S. aureus*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Al-Shahwany, AW. 2014. Alkaloid and Phenolic Compound Activity Of *Piper Nigrum* against Some Human Pathogenic Bacteria. *Biomedicine and Biotechnology*. 2(1) : 20 – 28.
- Agustin, BA., Puspawati, N., Rukmana, RM. 2018. Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Metanolik Daun Beluntas (*Pluchaea indica* Less.) dan Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Biomedika*. 11(2) : 79 – 87.
- Anggono, FD., Kuswandari, S. 2017. Comparison of Antibacterial Activity Inhibitory of Black Cumin (*Nigella sativa*) oil, Cresophene, and Calcium Hydroxide. *Padjadjaran Journal Of Dentistry*. 29(1) : 38 – 43.
- Aqil, F., Zahin, M., El Sayed, KA., Ahmad, I., Orabi, KY., Arif, JM. 2011. Antimicrobial, Antioxidant, And Antimutagenic Activities Of Selected Marine Natural Product And Tobacco Cembranoid. *Drug And Chemical Toxicology*. 34(2) : 167 – 179.
- Arbi, TA., Noviyandri, PR., Valentina, NV. 2019. Gambaran Perlekatan Bakteri *Staphylococcus aureus* Pada Berbagai Benang Bedah (Studi Kasus Pada Tikus Wistar). 11(1): 48 – 57.
- Balittas. 2014. Tembakau Kasturi. <http://balittas.deptan.go.id>. Diakses pada tanggal 8 april 2016.
- Banozic, M., Babic, J., jokic, S. 2020. Recent Advances in Extraction of Bioactive Compounds From Tobacco Industrial Was A Review. *Elsevier Industrial Crops and Product*. 144: 1 – 11.
- Barboza, JN., Filho, CSMB., Silva, RO., Medeiros, JVR., Pergentino de Sousa, D. 2018. An Overview On The Anti-inflammatory Potential and Antioxidant Profile Of Eugenol. *Journal of Hindawi*. 1 – 15.
- Bebe, ZA., Susanto, HS., Martini. 2018. Faktor Resiko Kejadian Karies Gigi Pada Orang Dewasa Usia 20-39 Tahun Di Kelurahan Dadapsari, Kecamatan Semarang Utara, Kota Semarang. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. 6(1) : 365 – 374.
- Bereksi, M. S. *et al.* (2018) 'Evaluation of antibacterial activity of some medicinal plants extracts commonly used in algerian traditional medicine against some pathogenic bacteria', *Pharmacognosy Journal*, 10(3), pp. 507–512. doi: 10.5530/pj.2018.3.83.



- Daboor, SM., Syed Masood, FS., Al-Azab, MS., Nori, EE. 2015. A Review On Streptococcus Mutans With Its Diseases Dental Caries, Dental Plaque And Endocarditis. *Indian Jurnal Microbiology*. 2(2) : 76 – 82.
- Dewi, ZY., Nur, A., Hertriani, T. 2015. Efek Antibakteri dan Penghambatan Biofilm Ekstrak Sereh (*Cymbopogon nardus L.*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*. 1(2) : 136 – 141.
- Duan, S., Du, Y., Hou, X., Yan, N., Dong, W., Mao, X., Zhang, Z. 2016. Chemical Basis Of The Fungicidal Activity Of Tobacco Extract Against *Valsa mali*. *Molecules*. 21(1743) : 1 – 14.
- Duangri P, Juntarapun K, Sathirapipathkul C. The tabacco leaf extract and antibacterial activity in textile. *RMUTP International Conference: Textiles & Fashion 2012 July 3-4*. 2012. Bangkok Thailand.
- Fatimah, IA. 2016. Pengaruh Ekstrak Flavonoid Rendah Nikotin Limbah Daun Tembakau Kasturi (*Nicotiana Tabacum L.*) Terhadap Pertumbuhan Mikroba Rongga Mulut. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Farkash, Y., Feldman, M., Ginsburg, I., Steinberg, D., Shalish, M. 2019. Polyphenol Inhibits *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* Biofilm Formation. *Dentistry Journals*. 7: 1 – 10.
- Fatkhurrohman, F., Medawati, A. 2013. Efektivitas Ekstrak Etanol Kayu Siwak (*Salvadora persica L.*) dengan Metode Perkulasi Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Isolat 248 yang Resisten Multiantibiotik. *IDJ*. 2(2): 34 – 41.
- Forssten, SD., Bjorklund, M., Ouwehand, AC. 2010. Streptococcus mutans, Caries, and Simulation Models. *Nutrients*. 2: 290 – 298.
- Foster, T., Geoghegan, J. 2015. *Staphylococcus aureus*. *Molecular Medical Microbiology*. 6: 655 – 674.
- Garbacz, K., Jarzembowski, T., Kwapisz, E., Daca, A., Witkowski, J. 2018. Do The Oral Staphylococcus aureus Strains From Denture Wearers Have A Greater Pathogenicity Potential?. *Journal of Oral Microbiology*. 11(1) : 1 – 4.
- Gheorghiu, IM., Suci, I., Marian, VC., Bodnar, D., Chirila, M., Naicu, V., Stoian, IM. 2014. Biological Effect Of Endodontic Medication Of Human Fibroblast Cell Culture. *The Publishing House of The Romanian Academy*. 16(1) : 33 – 37.

- Gonzales-Lara, A., Ruiz-Rodriguez, MS., Pierdant-Perez, M., Garrocho-Rangel, JA., Pozoz-Guillen, AJ. 2014. Zinc Oxide-Eugenol Pulpotomy in Primary Teeth: A 24 Month Follow-Up. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 40(2): 107 – 112.
- Greenwood, D., and O'grady, F. 1972. Scanning Electron Microscopy of *Staphylococcus aureus* exposed to Some Common Anti-staphylococcal Agents. *Journal of General Microbiology*. 70: 263 – 270.
- Hidayah, N., Mustikaningtyas, D., Bintari, SH. 2017. Aktivitas Antibakteri Infusa Simplisia *Sargassum muticum* Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Life Science*. 6(2): 49 – 54.
- Houdkova, M., Rondevaldova, J., Duskocil, I., Kokoska, L. 2017. Evaluation Of Antibacterial Potential And Toxicity Of Plant Volatile Compounds Using New Broth Microdilution Volatilization Method And Modified MTT Assay. *Fitoterapia*.
- Hudzicki, J. 2016. Kirby – Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society for Microbiology*. 1 – 23.
- Jahan, M., Rahman, M., Parvej, S., Chowdury, S., Haque, E., Talukder, AK., Ahmed, S. 2015. Isolation And Characterization Of Staphylococcus Aureus From Raw Cow Milk In Bangladesh. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. 2(1) : 49 – 55.
- Jassbi, AR., Zare, S., Asadollahi, M., Schuman, MC. 2017. Ecological Roles and Biological Activities of Specialized Metabolites from the Genus *Nicotiana*. *American Chemical Society*. 117: 12227 – 12280.
- Joshi, SR., Pendyala, G., Viddyasagar, M., Padmawar, N., Nara, A., Joshi, P. 2018. Remineralizing Agents in Dentistry: A Review. *International Journal of Applied Dental Sciences*. 4(2): 198 – 199.
- Katrin, D., Idiawati, N., Sitorus, B. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Dari Daun Malek (*Litsea graciae* Vidal) Terhadap Balteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *JKK*. 4(1): 7 – 12.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2018. *Riset Kesehatan Dasar*. Jakarta.
- Khusuma, A., Safitri, Y., Yuniarni, A., Rizki, K. 2019. Uji Teknik Difusi Menggunakan Kertas Saring Media Tampung Antibiotik Dengan *Escherichia coli* Sebagai Bakteri Uji. *Jurnal Kesehatan Prima*. 13(2): 151 – 155.
- Kong, C., Chee, C., Richter, K., Thomas, N., Rahman, N., Nathan, S. Suppression of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation And Virulence By A Benzimidazole Derivative, UM-C162. *Scientific Reports*. 8: 1 – 16.

- Lake, W. K. *et al.* (2019) 'Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak n-Heksana dan Kloroform Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro', *Jurnal Medik Veteriner*, 2(1), p. 60. doi: 10.20473/jmv.vol2.iss1.2019.60-65.
- Lemos, JA., Palmer, SR., Zeng, L., Wen, ZT., Kajfasz, JK., Abranches, J., Brady, LJ. 2019. The Biology of *Streptococcus mutans*. 7(1): 1 – 25.
- Lingga, AR., Pato, U., Rossy, E. 2016. Uji Antibakteri Ekstrak Batang Kecombrang (*Nicolaia speciosa* Horan) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *JOM Faperta*. 3(1): 1 – 15.
- Mahmudah, FL., Atun, S. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Dari Ekstrak Metanol Temukunci (*Boesenbergia pandurata*) Terhadap Bakteri S. Mutans. *Jurnal Penelitian Saintek*. 22(1) : 59 – 66.
- Majidah D., Fatmawati D.W.A., dan Gunadi, A. 2014. Daya Anti Bakteri Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens* L.) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans* sebagai Alternatif Obat Kumur. Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa.
- Maradati, AA., Zafar, MS., Sammani, AMN., Mandorah, AO., Bani-Younes, HA. 2017. Preference and Usage Of Intracanal Medications During Endodontic Treatment. *Saudi Med J*. 38(7) : 755 – 763.
- Martinez-Herrera, A., Pozos-Guillen, A., Ruiz-Rodriguez, S., Garoccho-Rangel, A., Vertiz-Hernandez, A., Escobar-Garcia, DM. 2016. Effect of 4-Allyl-1-hydroxyl-2-methoxybenzene (Eugenol) on Inflammatory and Apoptosis Processes in Dental Pulp Fibroblast. *Journal Of Hindawi*. 1 – 7.
- Matnawi, H. 1997. *Budidaya Tembakau Bawah Naungan*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Melok, AL., Lee, LH., Mohammed Yussof, SA., Chu, T. 2018. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate-Stearate Inhibits The Growth of *Streptococcus mutans*. 6: 1 – 8.
- Menteri Pertanian Republik Indonesia. 2012. Pedoman Penanganan Pascapanen Tembakau. 6 – 57.
- Missiakas, DM., Schneewind, O. 2013. Growth and Laboratory Maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Curr Protoc Microbiol*. 9: 1 – 12.
- Mohammadi Nejad, S., Ozgunes, H., Basaran, N. 2017. Pharmacological And Toxicological Properties Of Eugenol. *Turk J Pharm Sci*. 14(2) : 201 – 206.
- Muhtar, R., Fatimawali, Bodhi, W. 2017. Identifikasi dan Uji Sensitivitas Bakteri Pada Plak Gigi Pasien Di Puskesmas Ranotana Weru Manado Terhadap

- Antibiotik Golongan Penisilin dan Kuinolon. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 6(3) : 37 – 45.
- Nakano, M. 2014. Dental Caries. *Reference Module in Biomedical Research 3<sup>rd</sup> Edition Elsevier*.
- Nurnasari, E., Subiyakto. 2018. Diversifikasi Produk Tembakau Non Rokok. *Perspektif*. 17(1): 40 – 51.
- Nurnasari, E., Sri Wijayanti, K. and Riset, A. (2019) ‘Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Tembakau terhadap Pertumbuhan Bakteri Escherichia coli dan Staphylococcus aureus Antibacterial Activities of Tobacco Leaf Essential Oil Against Escherichia coli and Staphylococcus aureus’, *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 9(1), pp. 48–56. doi: 10.22435/jki.v9i1.1219.
- Novita, W. (2016) ‘Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Sirih (*Piper Betle L*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Streptococcus Mutans Secara in Vitro’, *Jmj*, 4(2), pp. 140–155.
- Ngazizah, F. N., Ekowati, N. and Septiana, A. T. (2016) ‘Potensi Daun Trembilungan (*Begonia hirtella Link*) sebagai Antibakteri dan Antifungi’, *Biosfera*, 33(3), p. 126. doi: 10.20884/1.mib.2016.33.3.309.
- Nofrizal, Prihantini, A., Nugroho, DW., Prastyo, TR., Ikono, R., Bambang, WW., Sukarto, A., Siswanto, Rochman, NT. 2012. Sintesis dan Karakterisasi Semen Gigi Berbasis Nanopartikel Zinc Oxide. *Jurnal Sains Materi Indonesia*. 11 – 14.
- Orokundu, SI., Orokundu, MMO., Oranusi, SC. 2015. Antimicrobial Effect Of Nicotiana Tabacum (Tobacco) Leaf Extract On *Staphylococcus Aureus* And *Escherichia Coli*. *Nigerian Journal of Microbiology*. 29: 3049 – 3061.
- Pambayun, R., Gardjito, M., Sudarmaji, S., Kapti, RK. 2008. Sensitivitas Bakteri Gram Positif Terhadap Katekin Yang Diekstraksi Dari Gambir (*Uncaria gambir*). *Agritech*. 28: 174 – 179.
- Patil, S., Rao, RS., Sanketh, DS., Amrutha, N. 2013. Microbial Flora in Oral Disease. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 14(6) : 1202 – 1208.
- Putri, RH., Barid, I., Kusumawardani, B. 2014. Daya Hambat Ekstrak Daun Tembakau terhadap Pertumbuhan Mikroba Rongga Mulut. *Stomatognatic (J.K.G Unej)*. 11(2): 27-31.
- Popova, V., Gochev, V., Girova T., Iliev, I., Ivanova, T., Stoyanova, A. 2015. Extraction Products From Tobacco – Aroma and Bioactive Compounds And Activities. *Current Bioactive Compounds*. 11: 31 – 37.

- Popova, V., Tumbarski, Y., Ivanova T., Hadjikinova R., Stoyanova A. 2019. Tobacco Resinoid (*Nicotiana tabacum* L.) As An Active Ingredient Of Cosmetic Gels. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 9(9): 111 – 118.
- Popova, V., Ivanova, T., Stoyanova, A., Nikolova, V., Docheva, M., Hrizteva, T., Damyanova, S., Nikolov, N. 2020. Chemical Constituents in Leaves and Aroma Product of *Nicotiana rustica* L. Tobacco. *International Journal of Food Studies*. 9: 146 – 159.
- Prijatmoko, D., Syafira, NL., Lestari, PE. 2018. Antibacterial Activity of Essential Oil Extract From *Curcuma xanthorrhiza* roxb. Rizhomes Against Bacteria Causing Pulp Necrosis. *Journal of Dentomaxillofacial Science*. 3(3): 144 – 148.
- Purwantiningsih, TI., Suranindyah, YY., Widodo. 2014. Aktivitas Senyawa Fenol Dalam Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Sebagai Antibakteri Alami Untuk Penghambatan Bakteri Penyebab Mastitis. *Buletin Pertenakan*. 38(1): 59 – 64.
- Quock, R. 2015. Dental Caries: A Current Understanding And Implications. *Journal of nature and Science*. 1(1): 1 – 4.
- Rahmawati, F., Bintari, SH. 2014. Studi Aktivitas Antibakteri Sari Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) Terhadap Pertumbuhan *Bacillus cereus* dan *Salmonella enteritidis*. *Unnes Journal of Life Science*. 3(2): 103 – 111.
- Radji, M. *et al.* (2013) 'Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(8), pp. 663–667. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60133-1.
- Rahman, F., Haniastuti, T., Utami, T. 2017. Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) pada *Streptococcus mutans* ATCC 35668. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*. 3(1): 1 – 7.
- Rahman, F., Haniastuti, T., Utami, T. 2018. The Effect Of Ethanol Extract of Soursop Leaf (*Annona muricata* L.) on Adhesion of *Streptococcus mutans* ATCC 35668 to Hydroxyapatite Disc. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*. 4(1): 1 – 5.
- Ramayanti, S., Purnakarya, I. 2013. Peran Makanan Terhadap Kejadian Karies Gigi. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. 7(2) : 89 – 93.

- Rapp, L., Maret, D., Diemer, F., Lacoste Ferre, MH. 2019. Dental Caries in Geriatric Denstistry: An Update For Clinicians. *International Journal of Oral and Dental Health*. 5(1): 1 – 6.
- Rauha, Jussi-Pekka, Remes, Susanna, Heinonen, Marin, Hopia Anu, Ka”hko”nen Marja, Kujula Tytti, Pihlaja Kalevi, Vuorela Heiki, Vuorela Pia. 2000. Antimicrobial Effects of finish plant Extracts containing flavonoid and other compounds. *Int J Food Microbiol*. 56: 3-12.
- Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS). 2018. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- Ristiati, NP. 2015. Uji Bioaktivitas Forbazol E Terhadap Hambatan Pertumbuhan Pada *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Sains dan Teknologi*. 4(1): 566 – 578.
- Rusli, MS., Suryani., Puspita, PE. 2011. Antibacterial Activity of Temanggung Tobacco Extract Variety Genjah Kemloko. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sanchez-Perez, L., Irigoyen-Camacho, M., Molina-Frechero, N., Zepeda-Zepeda, M. 2019. Fissure Depth and Caries Incidence in First Permanent Molars: A Five Years Follow-Up Study in Schoolchildren. *International Journal of Enviromental Research and Public Health*. 16: 1 – 10.
- Sandi, IM., Bachtiar, H., Hidayati. 2015. Perbandingan Efektivitas Daya Hambat Dadih dengan Yogurt Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans*. 2(2): 88 – 94.
- Sanla-Ead, N., Jangchud, A., Chonchenchob, V., Suppakul, P. 2012. Antimicrobial Activity Of Cinnamaldehyde And Eugenol And Their Activity After Incorporation Into Cellulose-Based Packaging Films. *Packaging Technology and Science*. 25: 7 – 17.
- Shetty, C., Hedge, M., Devadiga, D. 2013. Correlation Between Dental Caries With Salivary Flow, Ph, and Buffering Capacity in Adult South indian Population: An in-Vitro Study. 4(2): 219 – 223.
- Sinarsih, NK., Rita, WS., Puspawati, NM. 2016. Uji Efektivitas Ekstrak Daun Trembesi (*Samanea saman Merr*) Sebagai Antibakteri *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Cakra Kimia (Indonesia E-Journal of Applied Chemistry)*. 4(2): 129 – 136.
- Siregar, AZ. 2016. Literasi Inventarisasi Hama Dan Penyakit Tembakau Deli Di Perkebunan Sumatera Utara. *Jurnal Pertanian Tropik*. 3(3) : 2016 – 213.
- Statistik Perkebunan Indonesia. 2017. Tembakau. Direktorat Jenderal Perkebunan Kementrian Perkebunan. 1 – 37.

- Soleha, TU. 2015. Uji Kepekaan Terhadap Antibiotik. *Juke Unila*. 5(9): 119 – 123.
- Suardi, HN. 2014. Antibiotik Dalam Dunia Kedokteran Gigi. *Cakradonya Dental Jurnal*. 6(2) : 678 – 744.
- Sui, J., Wang, C., Liu, X., Fang, N., Liu, Y., Wang, W., Yan, N., Zhang, HB., Du, Y., Liu, X., Lu, T., Zhang, Z., Zhang, H. 2018. Formation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Cembratriene-Diols in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Is Regulated by Jasmonate-Signaling Components via Manipulating Multiple Sembranoid Synthetic Genes. *Molecules*. 23(2511) : 1 – 14.
- Susanti, L., Rusmiyanto, E., Kurniatuhadi, R. 2018. Aktivitas Biologis Asap cair Batang Manggis (*Garcinia mangostama* L.) Terhadap Viabilitas *Streptococcus* sp. 7(3) : 1 – 8.
- Susilowati, EY. 2006. “Identifikasi Nikotin dari Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum*) Kering dan Uji Efektifitas Ekstrak Daun Tembakau sebagai Insektisida Penggerak Batang Padi (*Scirpophaga innonata*)”. *Skripsi*. Semarang: Universitas Negeri Semarang.
- Tirtosastro, S., Sasongko, P. 2016. Penerapan Teknik Budidaya Untuk Menurunkan Kadar Nikotin Tembakau. *Buana Sains*. 16(1) : 25 – 32.
- Vitko, NP., Richardson, AR. 2013. Laboratory Maintenance of MRSA. *Curr Protoc Microbiol*. 1 – 21.
- Veiga, N., Aires, D., Douglas, F., Pereira, M., vaz, A., Rama, L., Silva, M., Vanessa, M., Pereira, F., Vidal, B., Plaza, J., Bexiga, F. 2016. Dental Caries: A Review. *Journal Of Dental and Oral Health*. 2(5) : 1 – 3.
- Wahdaningsih, S., Untari, EK., Fauziah, Y. 2014. Antibakteri fraksi n-Heksana Kulit *Hylocereus polyrhizus* Terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Propionibacterium acnes*. *Pharm Sci Res*. 1(3) : 180 – 193.
- Wang, H., Ren, D. 2017. Controlling Streptococcus Mutans And Staphylococcus Aureus Biofilms With Direct Current And Chlorhexidine. *AMB Express*. 7(204) : 1 – 9.
- Wassel, M. O. and Khattab, M. A. (2017) ‘Antibacterial activity against Streptococcus mutans and inhibition of bacterial induced enamel demineralization of propolis, miswak, and chitosan nanoparticles based dental varnishes’, *Journal of Advanced Research*. Cairo University, 8(4), pp. 387–392. doi: 10.1016/j.jare.2017.05.006.
- Widayati, N. 2014. Faktor Yang Berhubungan Dengan Karies Gigi Pada Anak Usia 4-6 Tahun. *Jurnal Berkala Epidemiologi*. 2(2) : 196 – 205.

- Yadav, K., Prakash S., Khanal S., Singh, JK. 2015. Prevalence Of Dental Caries Among Adolescence Of Dhanusha District Nepal. *Janaki Medical College Journal Of Medical Sciences*. 3(2) : 29 – 37.
- Yadav, K., Prakash S., Yadav NP., Sah, RS. 2015. Multi-drug Resistance Of Bacterial Isolates Among Dental Caries Patient. *Janaki Medical College Journal Of Medical Sciences*. 3(1) : 37 – 44.
- Yadav, K., Prakash, S. 2016. Dental Caries: A Review. *Asian Journal Of Biomedical And Pharmaceutical Sciences*. 6(53) : 1 – 7.
- Yadav, K., Prakash, S. 2017. Dental Caries: A Microbiological Approach. *Journal Of Clinical Infectious Diseases and Practice*. 2(1) : 1 – 15.
- Yan, N., Du, Y., Liu, X., Zhang, H., Liu, Y., Zhang, P., Gong, D., Zhang, Z. 2015. Chemical Structures, Biosynthesis, Bioactivities, Biocatalysis and Semisynthesis of Tobacco Sembranoids: *An Overview*. *Industrial Crops*
- Yan, N., Du, Y., Liu, X., Zhang, H., Liu, Y., Zhang, Z. 2019. A Review on Bioactivities of Tobacco Cembranoid Diterpenes. *Biomolecules*. 9(30) : 1 – 9.
- Yamlean, PVY., Lolo, WA. 2016. Aktivitas Antibakteri Salep Ekstrak Daun Kembang Sepatu (*Hibiscus rosa sinensis L.* ) terhadap luka yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* Pada Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 5(4) : 298 – 304.
- Yuliana, N. 2008. Kinetika Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Isolat T5 Yang Berasal dari Tempoyak. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*. 13(2): 108–116.
- Yon, M., Gao, S., Chen, K., Duangthip, D., Lo, E., Chu, C. 2019. Medical Models in Caries Management. *Dentistry Journal*. 7(37): 1 – 8.
- Zhou, Y., Yang, Y., Li, XL., Chen, ZY., Liu, QB., Yang, J. 2016. Determination of Cembrenediol in Tobacco By Gass Chromatography-Mass Spectrometry-Selected Ion Monitoring With Precolumn Derivatization. *ActaChromatographica*. 28(4):513–524.



LAMPIRAN

A. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman

 **LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA**  
**(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)**  
**UPT BALAI KONSERVASI TUMBUHAN**  
**KEBUN RAYA PURWODADI**  
Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65 Purwodadi - Pasuruan 67163  
Telp. (+62 343) 615033, (+62 341) 426046, Faks. (+62 343) 615033, (+62 341) 426046  
website: <http://www.krpurwodadi.lipi.go.id>

---

**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI**  
**No. 1207 /IPH.6/HM/IX/2015**

Kepala UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi dengan ini menerangkan bahwa material tanaman yang dibawa oleh :

**drg. Agustin Wulan Suci D, MDSC NIP : 197908142008122003**  
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, datang di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi pada tanggal 10 September 2015, berdasarkan buku PROSEA ( Plants Resources of South-East Asia ) No 16; Stimulants, editor H.A.M. van der Vossen dan M. Wessel, tahun 2000, halaman 91 nama ilmiahnya adalah :

Genus : *Nicotiana*  
Species : *Nicotiana tabacum L.*

Adapun menurut buku An Integrated System of Classification of Flowering plants, karangan Arthur Cronquist tahun 1981, halaman XVII, klasifikasinya adalah sebagai berikut :

Divisio : *Magnoliophyta*  
Class : *Magnoliopsida*  
Subclass : *Asteridae*  
Ordo : *Solanales*  
Family : *Solanaceae*

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 14 September 2015  
An. Kepala  
Kepala Seksi Konservasi Ex-situ,

  
Deden Mudiana, S.Hut, M.Si

## B. Surat Keterangan *Ethical Clearance*

 <p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)          FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER          (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH          FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)</p>	
<p><b>ETHIC COMMITTEE APPROVAL</b>  <u>No.936/UN25.8/KEPK/DL/2020</u></p>	
<p>Title of research protocol : "Inhibition Zona of Resinoid Kasturi Tobacco Leaves Against <i>Streptococcus Mutans</i> and <i>Staphylococcus Aureus</i>"</p>	
Document Approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Karelina Amarta
Member of research	: -
Responsible Physician	: Karelina Amarta
Date of approval	: Juni 2020-Selesai
Place of research	: 1. Laboratorium Drug Utilisation and Discovery Research Group (DUDRG) Fakultas Farmasi UNEJ 2. Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UNEJ 3. Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi UNEJ 4. Laboratorium Biomedik FKG UNEJ 5. Laboratorium Bioscience RSGM UNEJ
<p>The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember States That the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.</p>	
<p>Jember, June 29<sup>th</sup> 2020</p>	
<p>Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember</p>  <p>(drg. R. Rahardyan P. M. Kes, Sp. Pros.)</p>	<p>Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember</p>  <p>(drg. Dr. drg.) Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si.)</p>

**C. Surat Izin Penelitian**

 Drug Utilisation and Discovery Research Group (DUDRG)  
Faculty of Pharmacy University of Jember  
Jalan Kalimantan 1/2 Kampus Tegalboto, Jember 68121, ID  
<http://ddrg.farmasi.unej.ac.id> | [arisatia@unej.ac.id](mailto:arisatia@unej.ac.id)

**SURAT PERMOHONAN IZIN MASUK LAB. RISET DUDRG**

Kepada Koordinator Kenis DUDRG  
Fakultas Farmasi Universitas Jember

Dengan hormat,  
Saya bermaksud mengajukan permohonan izin menggunakan Lab. Riset DUDRG untuk keperluan penelitian dengan keterangan sebagai berikut.

Periset: Karelina Amarta  
Instansi: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  
NIM: 161610101035  
Judul Riset: Uji Antibakteri Sembranoid Daun Tembakau Kasturi Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus*

Pembimbing: Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes

Alasan pemohon menggunakan Lab. Riset DUDRG:\*

*Join Research:*

*Lainnya:* Penelitian Tugas Akhir

Demikian dan terima kasih atas kerja samanya.

Jember, 6 November 2019

Pembimbing Pemohon/Periset

  
Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes

  
Karelina Amarta

\*silakan centang salah satu dan cantumkan judul atau keterangannya

 Template surat

 Form izin masuk lab



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎ (0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 792/UN25.8.TL/2019  
Perihal : Izin Penelitian Pembuatan Sembranoid Ekstrak Daun Tembakau Kasturi

03 DEC 2019

Kepada Yth  
Kepala Laboratorium Kimia  
Fakultas Farmasi Universitas Jember  
Di Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan izin penelitian membuat sembranoid ekstrak daun tembakau Kasturi kami dibawah ini:

- |    |                        |  |
|----|------------------------|--|
| 1  | Nama                   | : Karelina Amarta  |
| 2  | NIM                    | : 161610101035   |
| 3  | Semester/Tahun         | : 2019/2020  |
| 4  | Fakultas               | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  |
| 5  | Alamat                 | : Jl. Baturaden 8 no. 49 Jember, Jawa Timur  |
| 6  | Judul Penelitian       | : Uji Antibakteri Sembranoid Daun Tembakau Kasturi Terhadap Bakteri <i>Streptococcus mutans</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 7  | Lokasi Penelitian      | : Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Jember   |
| 8  | Data/alat yg di pinjam | : Tabung elenmeyer, beaker glass, magnetic stir, orbital shaker rotary evaporator  |
| 9  | Waktu                  | : Desember 2019 s/d Selesai  |
| 10 | Tujuan Penelitian      | : Untuk mendapatkan fraksi sembranoid ekstrak daun tembakau Kasturi  |
| 11 | Dosen Pembimbing       | : 1. drg. Tecky Indriana, M.Kes<br>: 2. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes   |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



Dr. drg. Musnifri Novita, M.Kes., Sp. OF(K)  
NIP. 196811251999032001



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 791 /UN25.8.TL/2019  
Perihal : Penelitian

03 DEC 2019

Kepada Yth  
Ketua Bagian Biomedik  
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  
Di Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan izin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini:

- |    |                        |  |
|----|------------------------|--|
| 1  | Nama                   | : Karelina Amarta  |
| 2  | NIM                    | : 161610101035   |
| 3  | Semester/Tahun         | : 2019/2020  |
| 4  | Fakultas               | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  |
| 5  | Alamat                 | : Jl. Baturaden 8 no. 49 Jember, Jawa Timur  |
| 6  | Judul Penelitian       | : Uji Antibakteri Sembranoid Daun Tembakau Kasturi Terhadap Bakteri <i>Streptococcus mutans</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i>                   |
| 7  | Lokasi Penelitian      | : Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas jember  |
| 8  | Data/alat yg di pinjam | : Petridish tidak bersekat, oven, bunsen, incubator, tabung Erlenmeyer, autoclave  |
| 9  | Waktu                  | : Desember 2019 s/d Selesai  |
| 10 | Tujuan Penelitian      | : Menguji aktivitas antibakteri sembranoid ekstrak daun tembakau Kasturi pada bakteri <i>Streptococcus mutans</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 11 | Dosen Pembimbing       | : 1. drg. Tecky Indriana, M.Kes<br>: 2. Dr.drg. Banun Kusumawardani, M. Kes  |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



Dr. drg. Masfari Novita, M.Kes., Sp. OF(K)  
NIP. 196811251999032001



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, DAN KEBUDAYAAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

Jalan Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto Kotak Pos 359 Jember 68121  
Telepon (0331) 333536, 331743 Faksimili (0331) 331991  
Laman : [fg.unej.ac.id](http://fg.unej.ac.id)

Nomor : 1086 /UN25.8/SP/2020  
Perihal : Ijin Penelitian

02 APR 2020

Kepada Yth  
Direktur RSGM Universitas Jember  
Di  
Jember

Dalam rangka penelitian maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan Ijin Penelitian bagi Mahasiswa kami :

- |    |                          |   |  |
|----|--------------------------|---|--|
| 1  | Nama                     | : | Karelina Amarta  |
| 2  | NIM                      | : | 161610101035   |
| 3  | Semester/Tahun Akademik  | : | Genap 2019/2020  |
| 4  | Fakultas                 | : | Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  |
| 5  | Alamat                   | : | Jl Baturaden 8/49 Jember   |
| 6  | Judul Penelitian         | : | Zona Hambat <i>Sembranoid</i> Daun Tembakau Kasturi Terhadap Bakteri <i>Streptococcus Mutans</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i>                  |
| 7  | Lokasi Penelitian        | : | Laboratorium Bioscience RSGM Universitas Jember  |
| 8  | Data/ alat yang dipinjam | : | Satu set Alat Uji Antibakteri  |
| 9  | Waktu                    | : | April 2020 s/d Selesai   |
| 10 | Tujuan Penelitian        | : | Untuk Mengetahui Zona Hambat <i>Sembranoid</i> Daun Tembakau Kasturi Terhadap Bakteri <i>Streptococcus Mutans</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 11 | Dosen Pembimbing         | : | 1. Dr. drg Tecky Indriana, M.Kes<br>2. Dr. drg Banun Kusumawardani, M.Kes  |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



Dr. Rihardyan Parnaadji, M. Kes., Sp. Pros.

NIP 196901121996011001

**D. Penghitungan Pengenceran**

- i) Pembuatan stok resinoid daun tembakau Kasturi

Setelah proses ekstraksi dan fraksinasi didapatkan resinoid sebanyak 100 mg. resinoid yang didapat dilarutkan menggunakan 800µl DMSO 100% sehingga diperoleh konsentrasi stok 125.000 µg/ml.

- ii) Pembuatan DMSO konsentrasi 6,4% untuk resinoid konsentrasi 12000 µg/ml

$$\begin{aligned} V_1 \cdot N_1 &= V_2 \cdot N_2 \\ 100 \mu\text{l} \cdot 12000 \mu\text{g/ml} &= V_2 \cdot 125000 \mu\text{g/ml} \\ 6,4 \mu\text{l} &= V_2 \end{aligned}$$

$$\text{Konsentrasi DMSO} = \frac{6,4\%}{100 \mu\text{l}} \times 100\% = 6,4\%$$

Pengenceran DMSO menggunakan *serial dilution* digunakan untuk mendapat DMSO konsentrasi 3,2%, 1,6%, dan 0,8%.

- iii) Pembuatan resinoid konsentrasi 12.000 µg/ml

$$\begin{aligned} V_1 \cdot N_1 &= V_2 \cdot N_2 \\ 700 \mu\text{l} \cdot 12000 \mu\text{g/ml} &= V_2 \cdot 125000 \mu\text{g/ml} \\ 67,2 \mu\text{l} &= V_2 \end{aligned}$$

Sehingga untuk mendapatkan resinoid daun tembakau Kasturi konsentrasi 12.000 µg/ml dibutuhkan 67,2 µl resinoid daun tembakau Kasturi dengan ditambah 632,8 µl aquadest.

- iv) Pembuatan resinoid konsentrasi 10.000 µg/ml

$$\begin{aligned} V_1 \cdot N_1 &= V_2 \cdot N_2 \\ 700 \mu\text{l} \cdot 10000 \mu\text{g/ml} &= V_2 \cdot 125000 \mu\text{g/ml} \\ 56 \mu\text{l} &= V_2 \end{aligned}$$

Sehingga untuk mendapatkan resinoid daun tembakau Kasturi konsentrasi 10.000 µg/ml dibutuhkan 56 µl resinoid daun tembakau Kasturi dengan ditambah 644 µl aquadest.

- v) Pembuatan resinoid konsentrasi 8.000 µg/ml

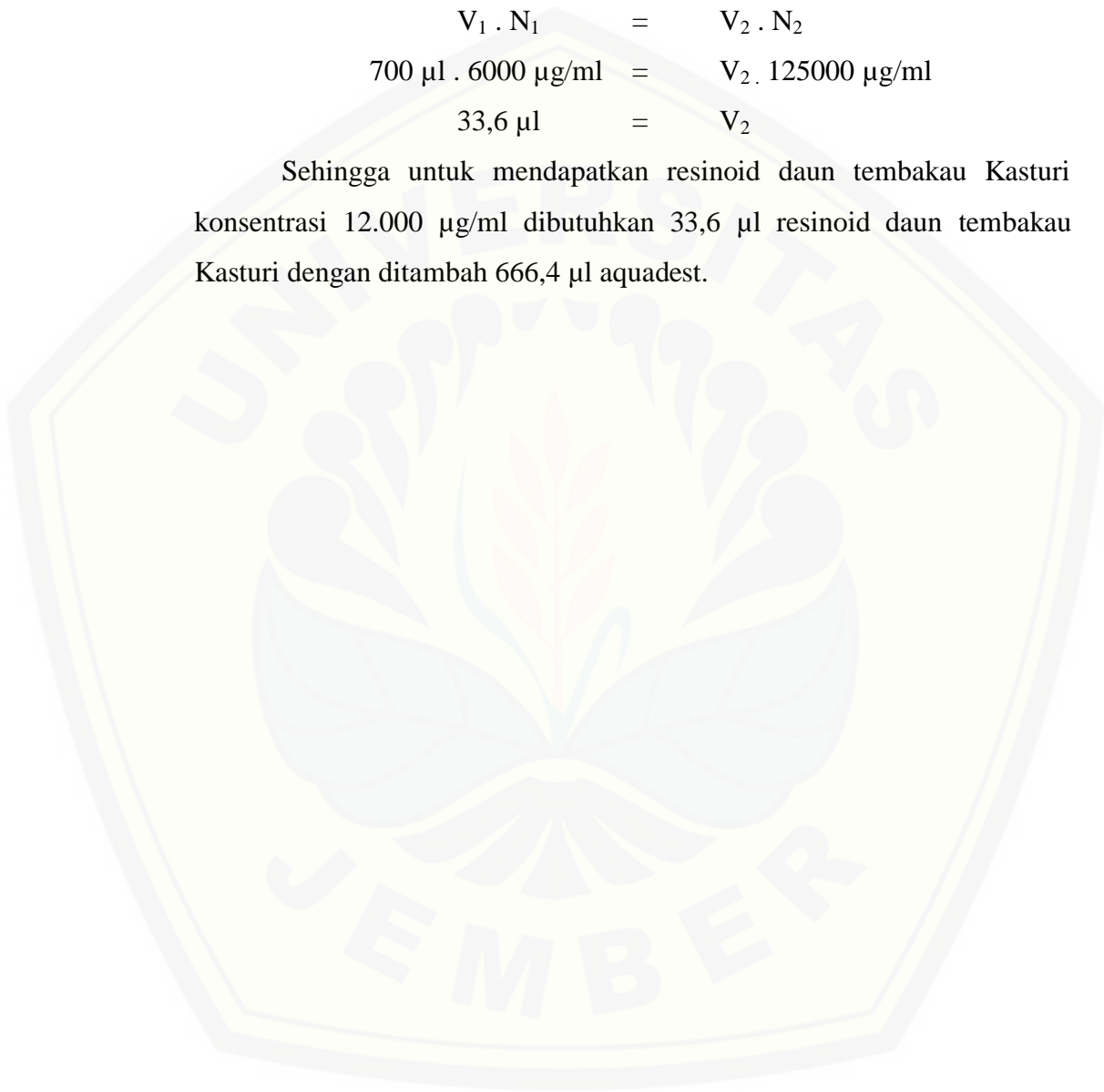
$$\begin{aligned} V_1 \cdot N_1 &= V_2 \cdot N_2 \\ 700 \mu\text{l} \cdot 8000 \mu\text{g/ml} &= V_2 \cdot 125000 \mu\text{g/ml} \\ 44,8 \mu\text{l} &= V_2 \end{aligned}$$

Sehingga untuk mendapatkan resinoid daun tembakau Kasturi konsentrasi 12.000  $\mu\text{g/ml}$  dibutuhkan 44,8  $\mu\text{l}$  resinoid daun tembakau Kasturi dengan ditambah 655,2  $\mu\text{l}$  aquadest.

vi) Pembuatan resinoid konsentrasi 6.000  $\mu\text{g/ml}$





$$\begin{aligned}V_1 \cdot N_1 &= V_2 \cdot N_2 \\700 \mu\text{l} \cdot 6000 \mu\text{g/ml} &= V_2 \cdot 125000 \mu\text{g/ml} \\33,6 \mu\text{l} &= V_2\end{aligned}$$

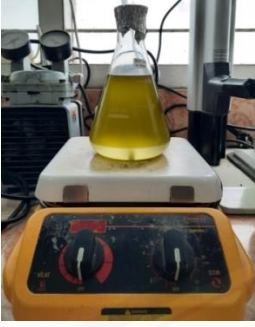




Sehingga untuk mendapatkan resinoid daun tembakau Kasturi konsentrasi 12.000  $\mu\text{g/ml}$  dibutuhkan 33,6  $\mu\text{l}$  resinoid daun tembakau Kasturi dengan ditambah 666,4  $\mu\text{l}$  aquadest.

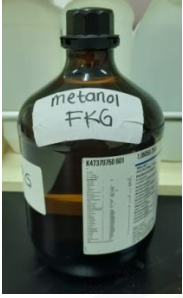
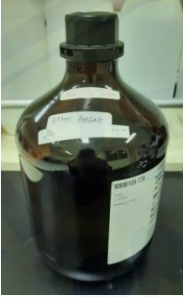
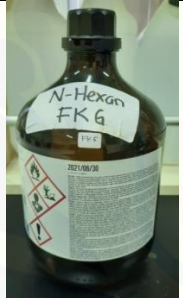
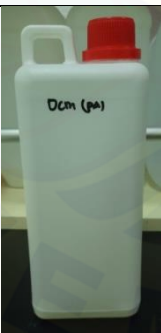




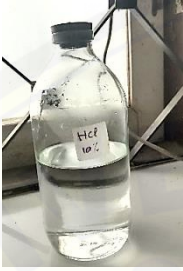


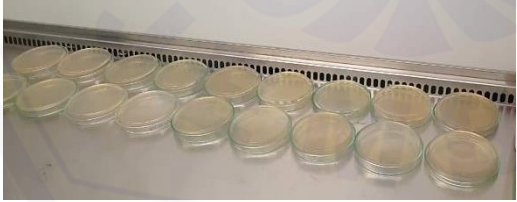









**E. Gambar Alat dan Bahan Penelitian**

No	Gambar	Keterangan
1.		Blender
2.		Timbangan
3.		Destilator
4.		Corong pisah

5.		<i>Magnetic Stirrer</i>
6.		<i>Rotary Evaporator</i>
7.		Kolom Kromatografi
8.		Daun Tembakau Kasturi Kering
9.		Serbuk daun Tembakau Kasturi

10.		Metanol
11.		Etil Asetat
12.		N-heksan
13.		DCM
11.		DMSO 0,8%, 1,6%, 3,2%, 6,4%

12.		Resinoid 6 mg/ml, 8 mg/ml, 10 mg/ml, 12 mg/ml
13.		HCl 10%
14.		Reagen <i>Dragendorff</i>
15.		<i>Silica Gel</i>
16.		Media Agar MHA
17.		<i>Beaker Glass</i> dan <i>Erlenmeyer Glass</i>

18.		Pipet Tetes
19.		Ose dan <i>spreader</i>
20.		Mikropipet
21.		Bunsen
22.		Tabung reaksi dan <i>stand</i>
23.		Kertas cakram

24.		Inkubator
25.		Pinset
26.		Jangka Sorong
27.		Autoklaf
28.		<i>Vortex</i>

**F. Dokumentasi Prosedur Penelitian****A) Pembuatan Resinoid Limbah Daun Tembakau Kasturi**

Gambar 3.1 Pengambilan limbah daun Tembakau Kasturi



Gambar 3.2 Pengeringan (kering angin) limbah daun Tembakau Kasturi



Gambar 3.3 Penghalusan limbah daun Tembakau Kasturi



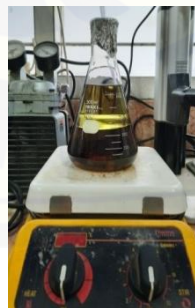
Gambar 3.4 Penimbangan serbuk limbah daun Tembakau Kasturi



Gambar 3.5 Penambahan methanol dan maserasi dengan *magnetic stirrer* selama 24 jam



Gambar 3.6 Penyaringan ekstrak dengan *Buchner*

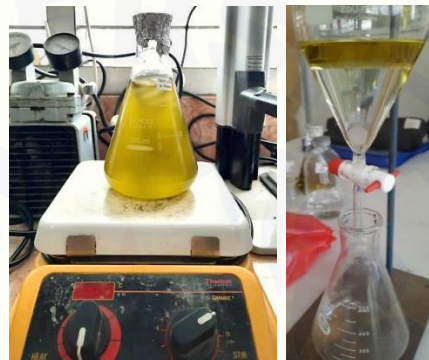


Gambar 3.7 Penambahan larutan n – Heksan dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 30 menit





Gambar 3.8 Pemisahan ekstrak n - Heksan dengan corong pisah



Gambar 3.9 Penambahan HCL 10% dan di stir dengan *magnetic stirrer* selama 30 menit serta pemisahan HCL 10% dengan corong pisah



Gambar 3.10 Uji *dragendorff* untuk melihat ada atau tidaknya nikotin



Gambar 3.11 Ekstrak telah *free* nikotin



Gambar 3.12 Dilakukan *Rotary Evaporation* untuk mendapatkan ekstrak kental



Gambar 3.13 Fraksinasi ekstrak menggunakan kolom kromatografi



Gambar 3.14 Hasil fraksinasi 5 pelarut



Gambar 3.15 Uji GC-MS

**B) Uji Antibakteri Resinoid Daun Tembakau Kasturi**

Gambar 3.16 Sterilisasi alat dan bahan



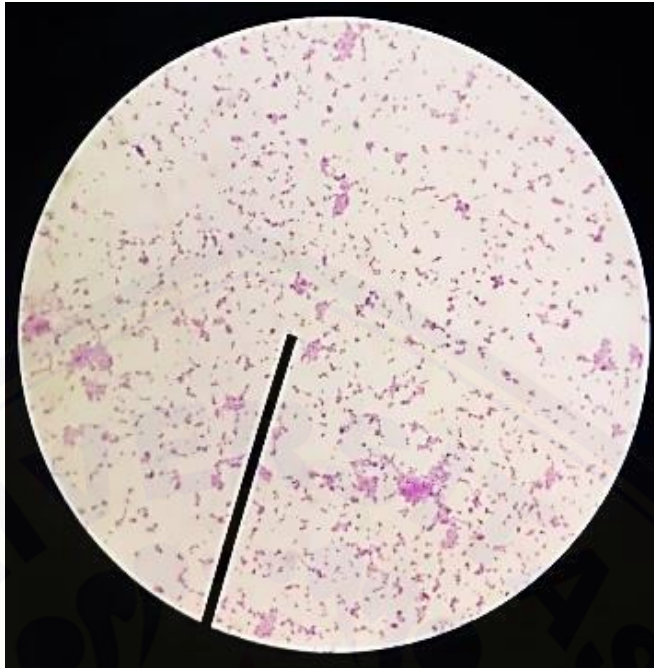
Gambar 3.17 Pembuatan media agar MHA



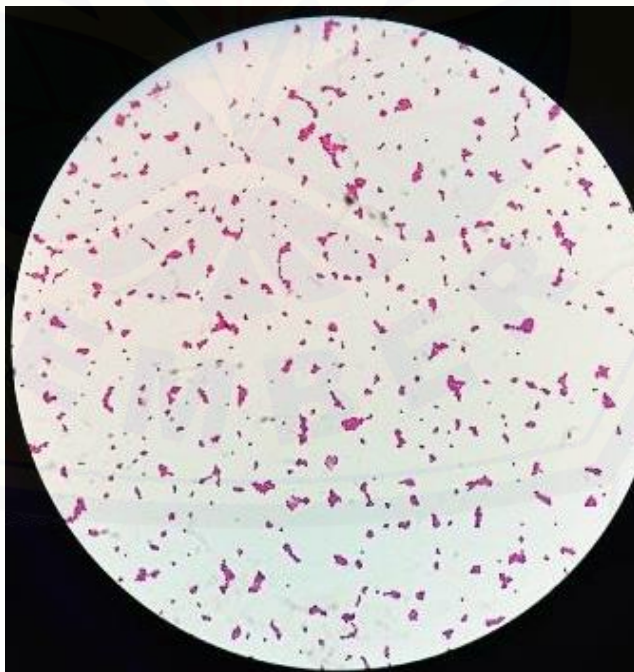
Gambar 3.18 Regenerasi bakteri



Gambar 3.19 Dilakukan pengecatan Gram pada hasil regenerasi dan pengamatan menggunakan mikroskop



Gambar 3.20 Hasil Identifikasi Pewarnaan Gram adalah bakteri *S. aureus* yaitu koloni berbentuk kokus atau bulat, bergerombol, dan berwarna ungu



Gambar 3.21 Hasil Identifikasi Pewarnaan Gram adalah bakteri *S. mutans* yaitu koloni berbentuk kokus atau bulat, berantai, dan berwarna ungu



Gambar 3.22 Pembuatan Konsentrasi DMSO 0,8%, 1,6%, 3,2%, 6,4% dan konsentrasi Resinoid 6 mg/ml, 8 mg/ml, 10 mg/ml, 12 mg/ml



Gambar 3.23 Penetesan masing-masing konsentrasi DMSO dan Resinoid sebanyak 20ul keatas cakram menggunakan mikropipet



Gambar 3.24 Pembuatan suspensi bakteri disesuaikan dengan standard 0,5

*McFarland*



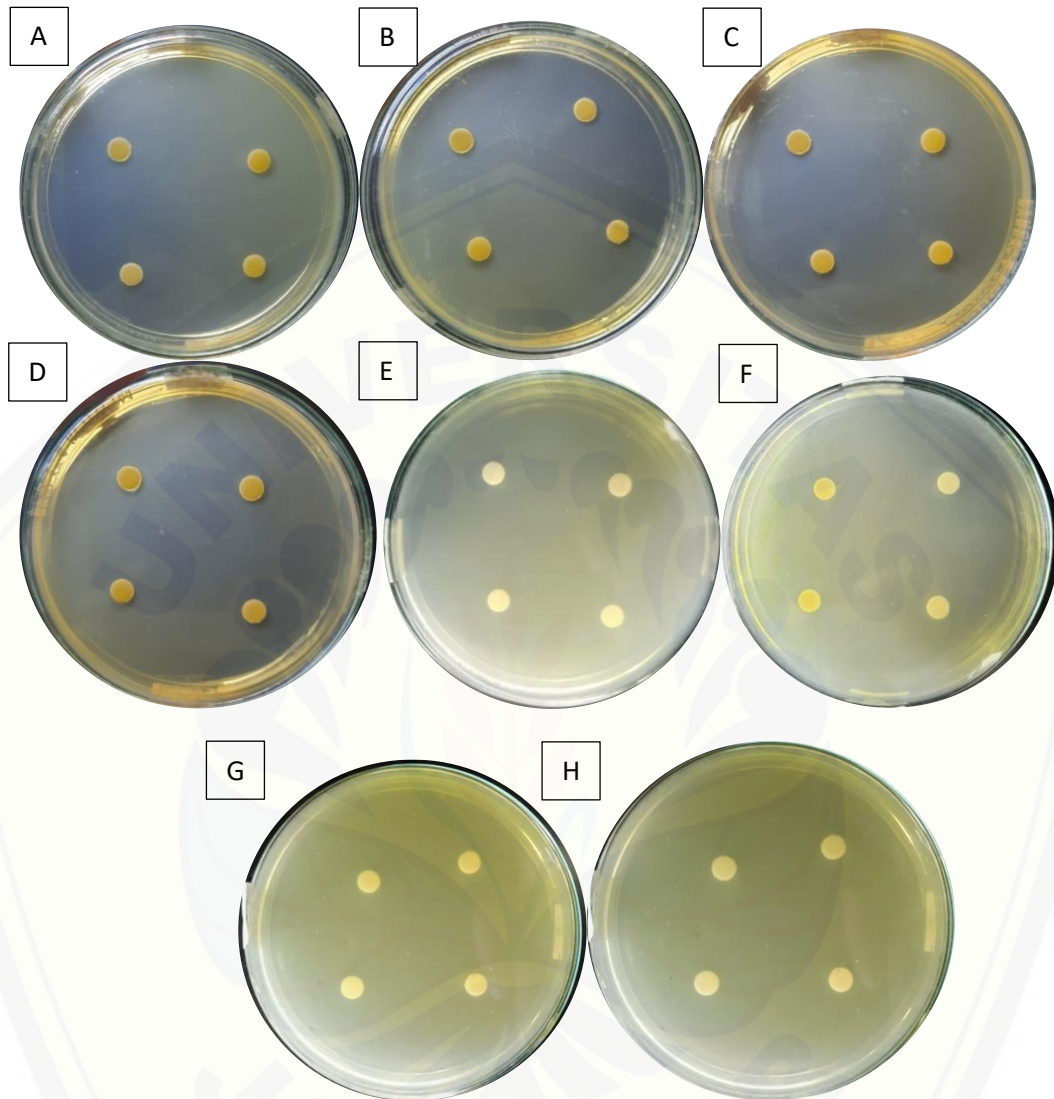
Gambar 3.25 Suspensi bakteri sebanyak 100 $\mu$ l diteteskan keatas media MHA menggunakan mikropipet



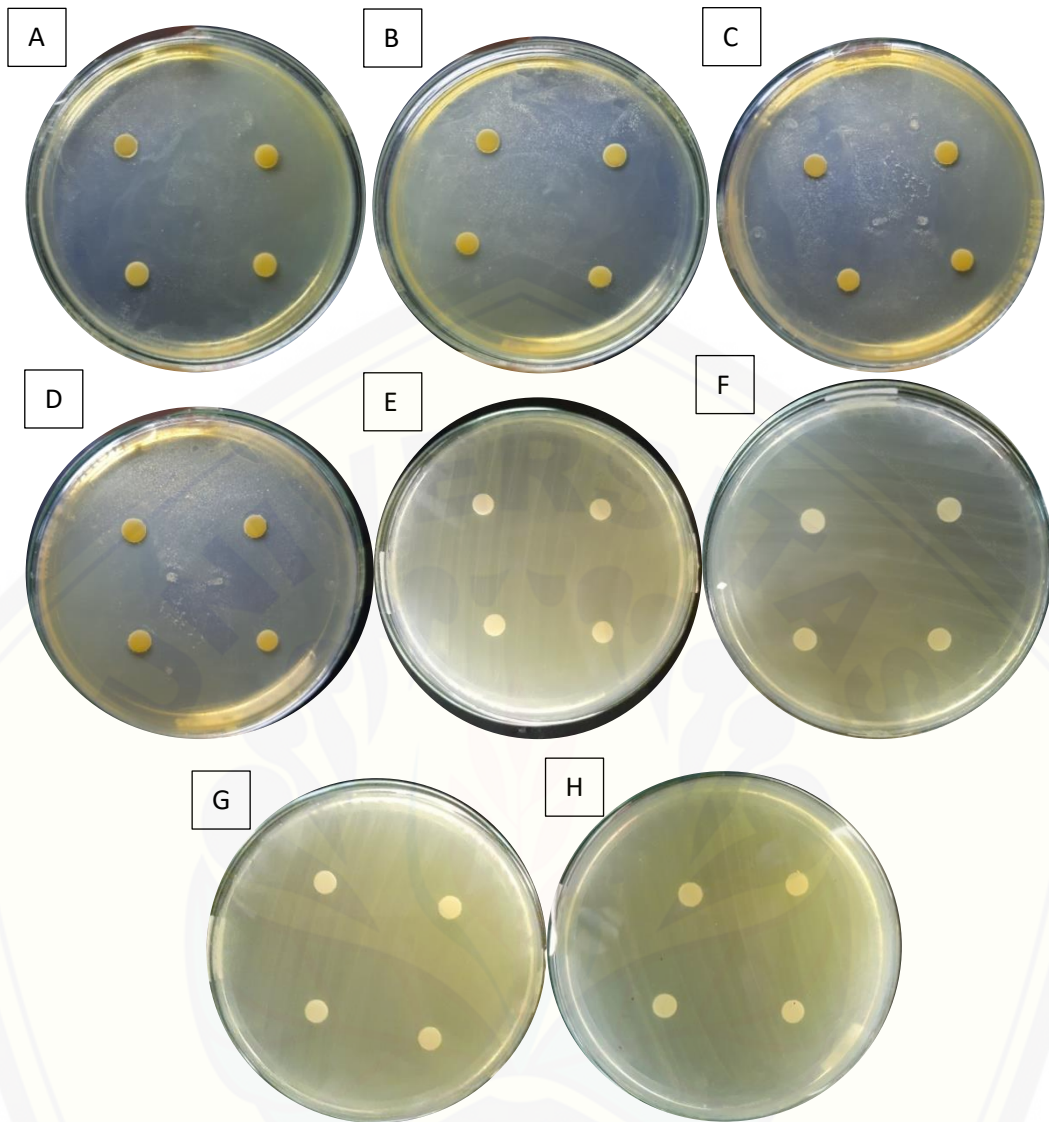
Gambar 3.26 Suspensi bakteri diratakan menggunakan *Spreader*



Gambar 3.27 Peletakan kertas cakram pada media MHA

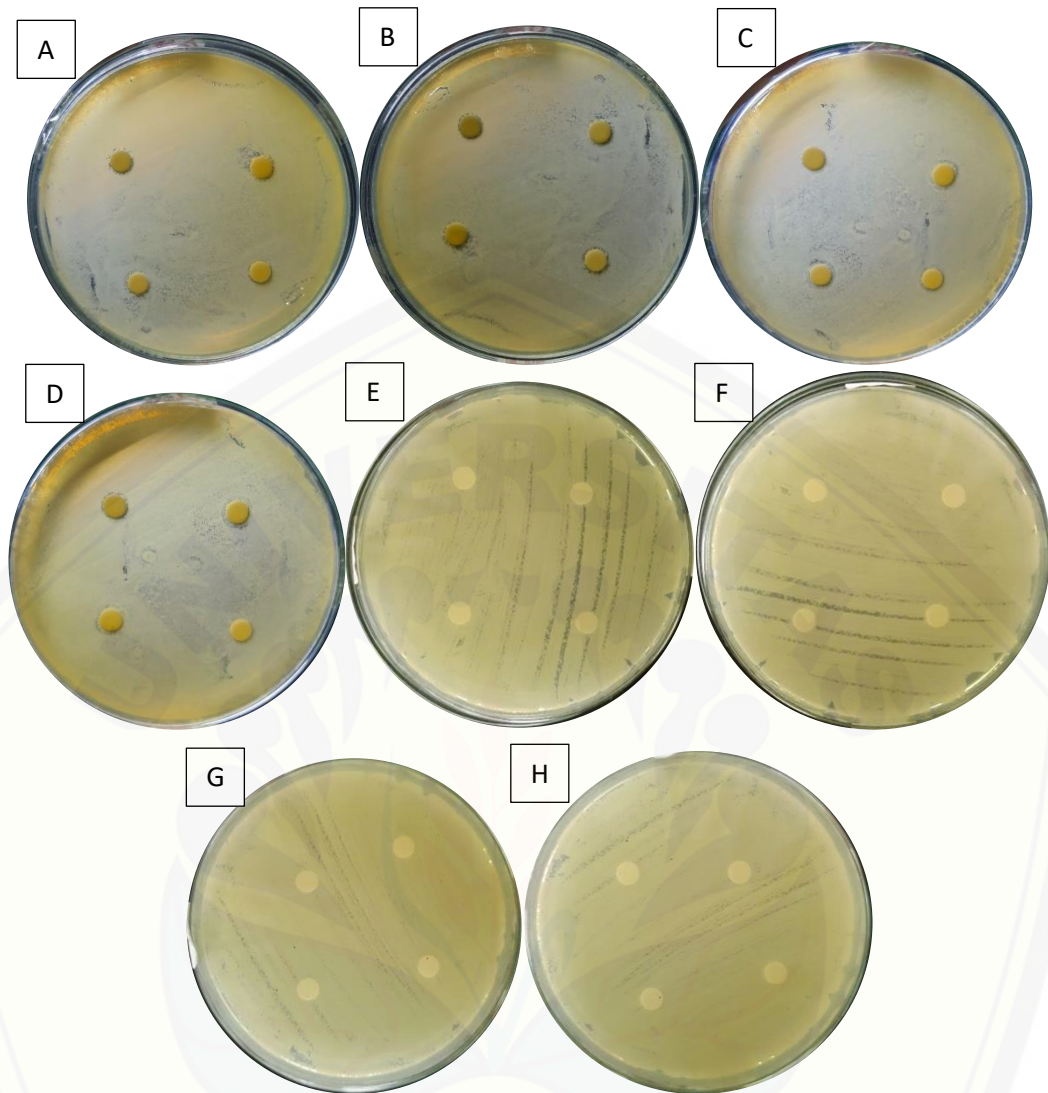
**G. Hasil Diameter Zona Hambat Resinoid Daun Tembakau Kasturi**

Gambar 4.1 Hasil diameter zona hambat bakteri *S. mutans* pada waktu inkubasi 3 jam yang diberi perlakuan resinoid 6 mg/ml (A), resinoid 8 mg/ml (B), resinoid 10 mg/ml (C), resinoid 12 mg/ml (D), DMSO 0,8% (E), DMSO 1,6% (F), DMSO 3,2% (G), DMSO 6.4% (H)

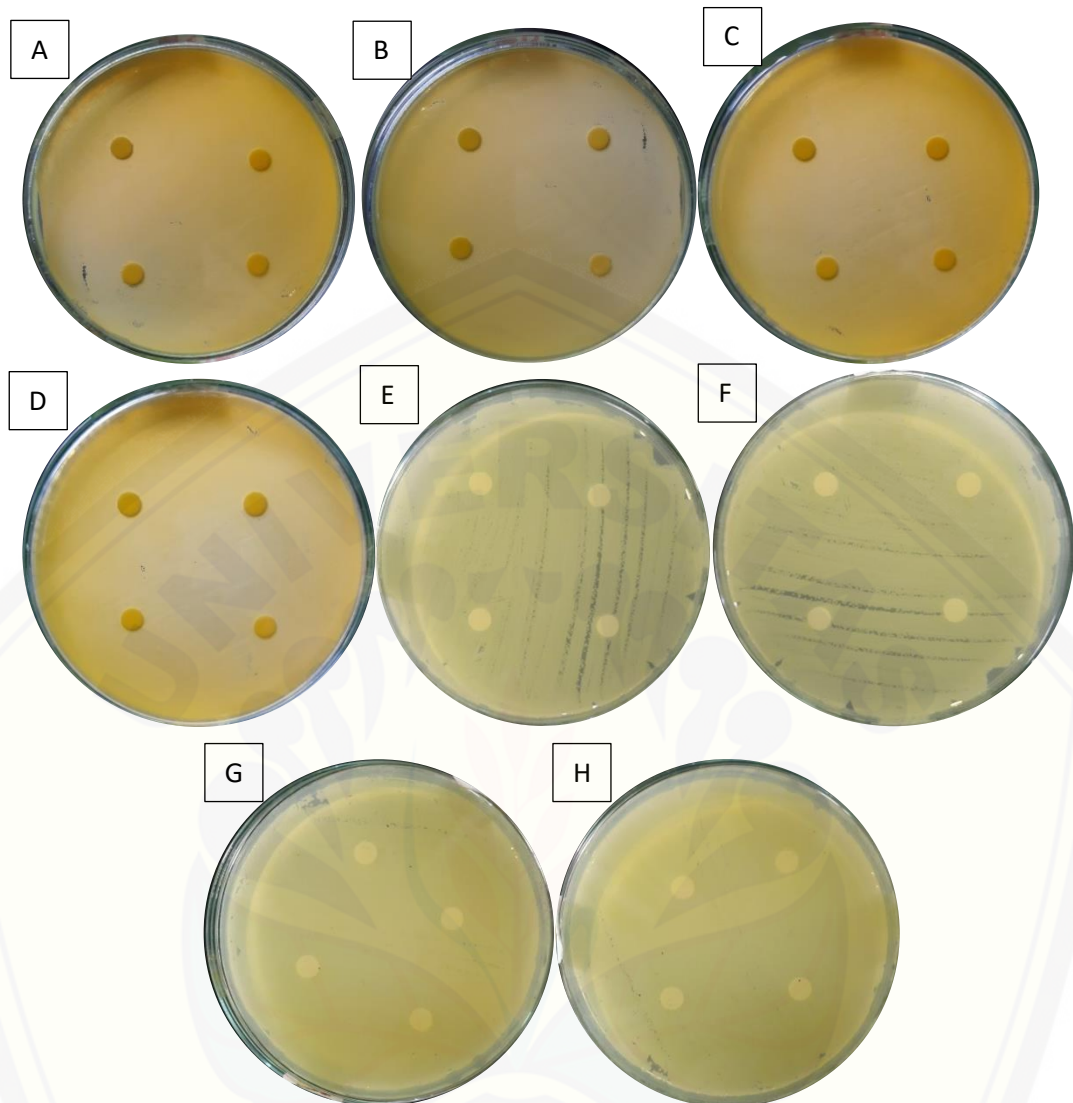


Gambar 4.2 Hasil diameter zona hambat bakteri *S. mutans* pada waktu inkubasi 6 jam yang diberi perlakuan resinoid 6 mg/ml (A), resinoid 8 mg/ml (B), resinoid 10 mg/ml (C), resinoid 12 mg/ml (D), DMSO 0,8% (E), DMSO 1,6% (F), DMSO 3,2% (G), DMSO 6.4% (H)

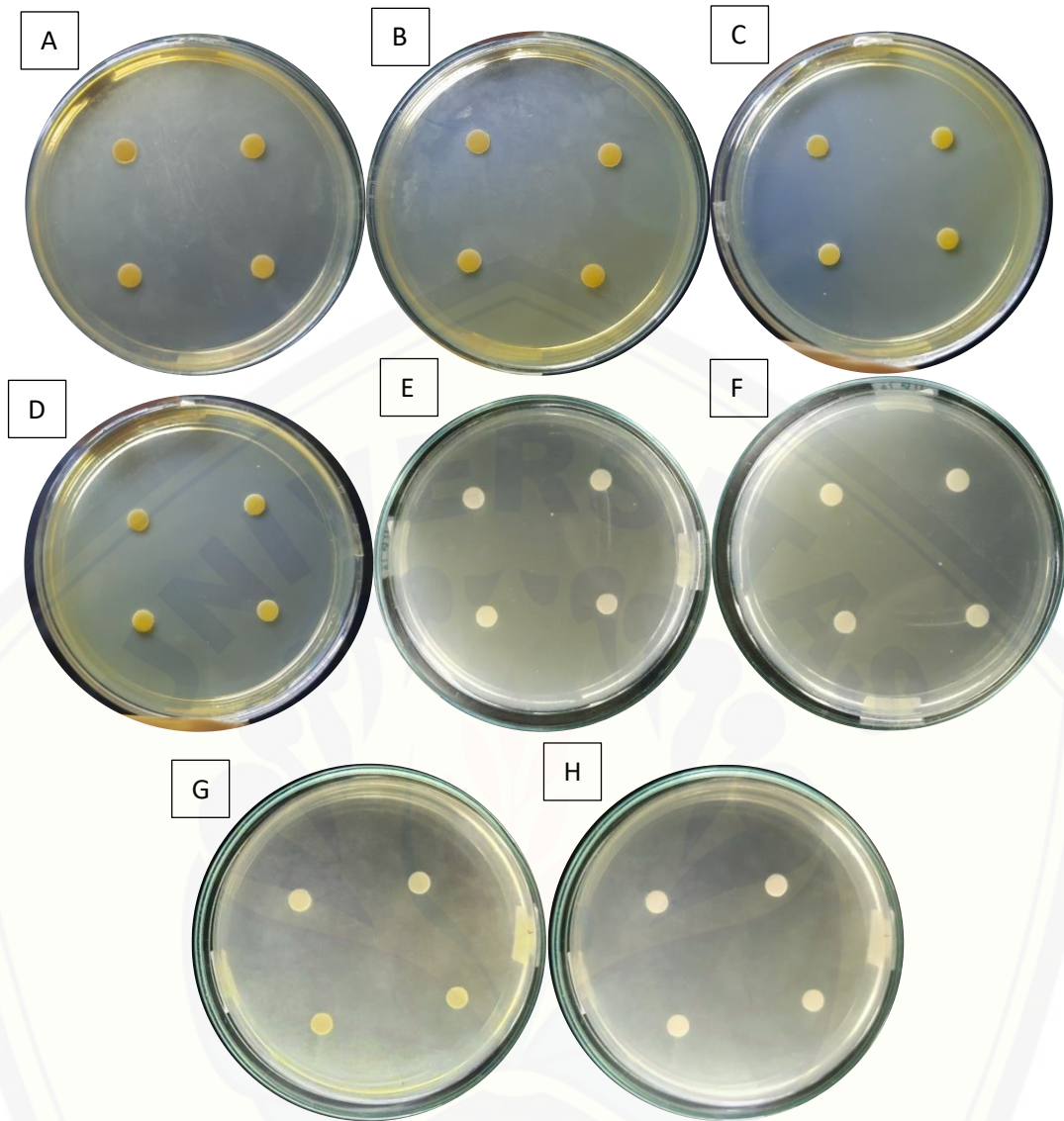




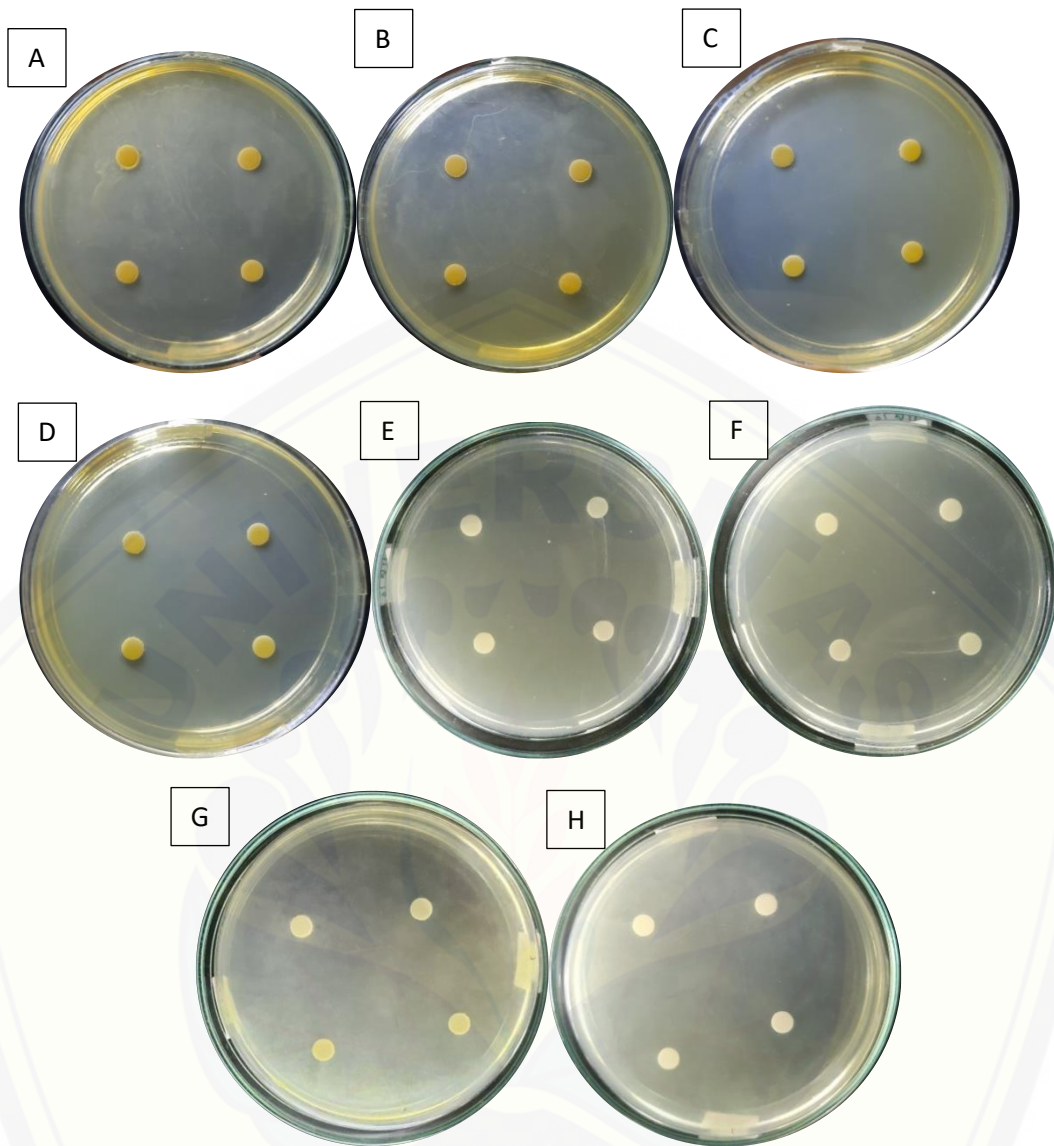
Gambar 4.3 Hasil diameter zona hambat bakteri *S. mutans* pada waktu inkubasi 12 jam yang diberi perlakuan resinoid 6 mg/ml (A), resinoid 8 mg/ml (B), resinoid 10 mg/ml (C), resinoid 12 mg/ml (D), DMSO 0,8% (E), DMSO 1,6% (F), DMSO 3,2% (G), DMSO 6,4% (H)



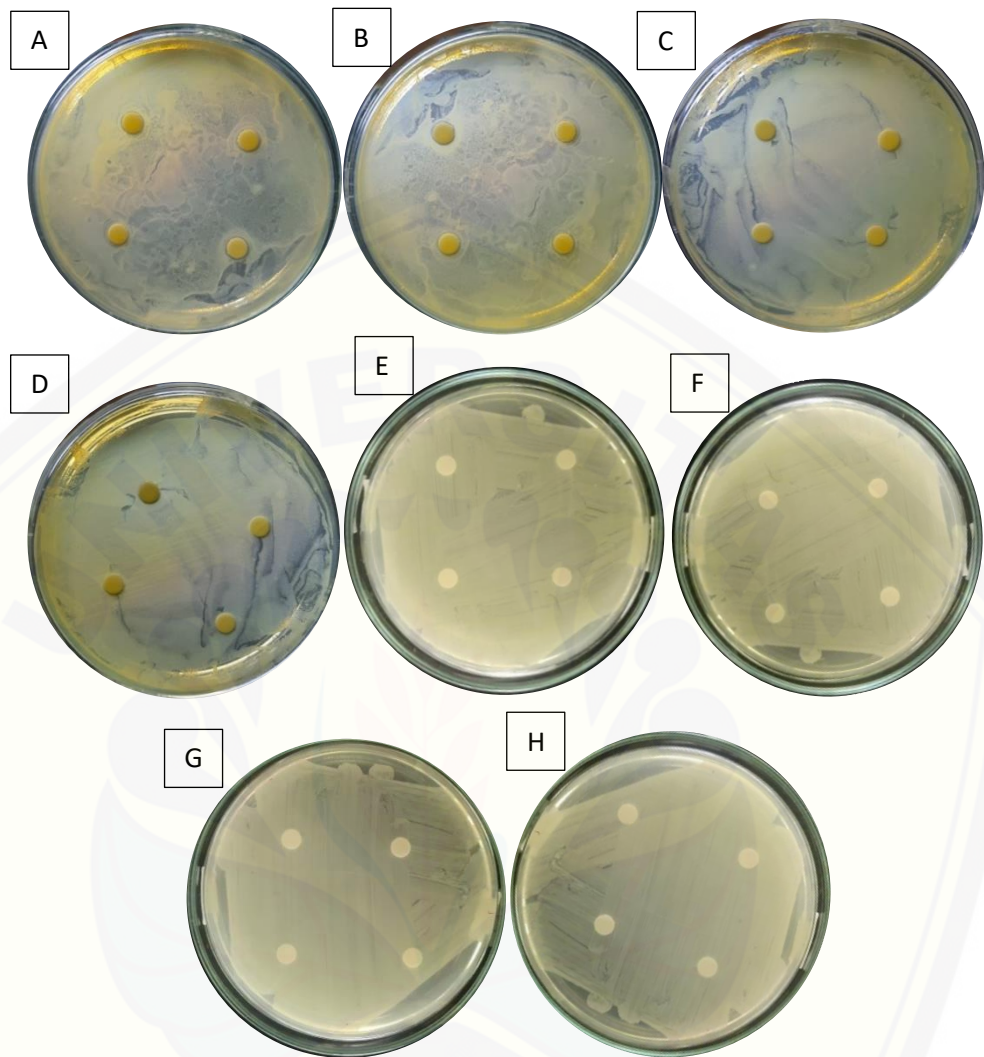
Gambar 4.4 Hasil diameter zona hambat bakteri *S. mutans* pada waktu inkubasi 24 jam yang diberi perlakuan resinoid 6 mg/ml (A), resinoid 8 mg/ml (B), resinoid 10 mg/ml (C), resinoid 12 mg/ml (D), DMSO 0,8% (E), DMSO 1,6% (F), DMSO 3,2% (G), DMSO 6,4% (H)



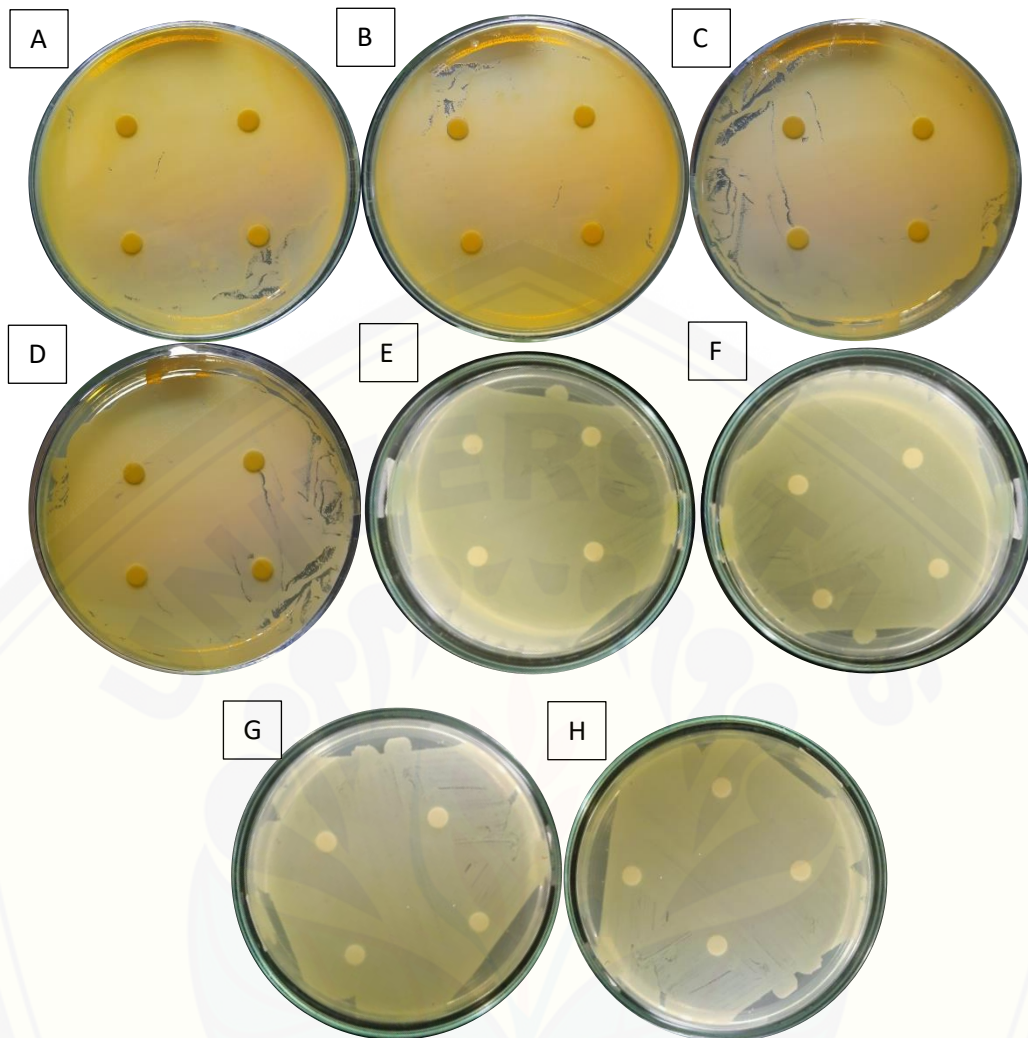
Gambar 4.5 Hasil diameter zona hambat bakteri *S. aureus* pada waktu inkubasi 3 jam yang diberi perlakuan resinoid 6 mg/ml (A), resinoid 8 mg/ml (B), resinoid 10 mg/ml (C), resinoid 12 mg/ml (D), DMSO 0,8% (E), DMSO 1,6% (F), DMSO 3,2% (G), DMSO 6,4% (H)



Gambar 4.6 Hasil diameter zona hambat bakteri *S. aureus* pada waktu inkubasi 6 jam yang diberi perlakuan resinoid 6 mg/ml (A), resinoid 8 mg/ml (B), resinoid 10 mg/ml (C), resinoid 12 mg/ml (D), DMSO 0,8% (E), DMSO 1,6% (F), DMSO 3,2% (G), DMSO 6.4% (H)



Gambar 4.7 Hasil diameter zona hambat bakteri *S. aureus* pada waktu inkubasi 12 jam yang diberi perlakuan resinoid 6 mg/ml (A), resinoid 8 mg/ml (B), resinoid 10 mg/ml (C), resinoid 12 mg/ml (D), DMSO 0,8% (E), DMSO 1,6% (F), DMSO 3,2% (G), DMSO 6.4% (H)



Gambar 4.8 Hasil diameter zona hambat bakteri *S. aureus* pada waktu inkubasi 24 jam yang diberi perlakuan resinoid 6 mg/ml (A), resinoid 8 mg/ml (B), resinoid 10 mg/ml (C), resinoid 12 mg/ml (D), DMSO 0,8% (E), DMSO 1,6% (F), DMSO 3,2% (G), DMSO 6,4% (H)

## H. Analisis Data

### H.1 Hasil Uji Normalitas menggunakan *Kolmogorov-Smirnov*

#### Pada Bakteri *S. mutans*

		ZonaHambat
N		32
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	6.3972
	Std. Deviation	.95364
	Absolute	.443
Most Extreme Differences	Positive	.443
	Negative	-.339
Kolmogorov-Smirnov Z		2.504
Asymp. Sig. (2-tailed)		.000

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

#### Pada Bakteri *S. aureus*

		ZonaHambat
N		32
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	6.0525
	Std. Deviation	.17463
	Absolute	.493
Most Extreme Differences	Positive	.493
	Negative	-.382
Kolmogorov-Smirnov Z		2.790
Asymp. Sig. (2-tailed)		.000

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## H.2 Hasil Uji Non-parametrik *Kruskal-Wallis* Bakteri *S. mutans*

**Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank
	R1	4	20.38
	R2	4	21.00
	R3	4	17.50
	R4	4	21.13
ZonaHambat	K-1	4	13.00
	K-2	4	13.00
	K-3	4	13.00
	K-4	4	13.00
	Total	32	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	ZonaHambat
Chi-Square	9.265
df	7
Asymp. Sig.	.234

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Perlakuan

**Ranks**

	Waktu	N	Mean Rank
	3 jam	8	13.00
	6 jam	8	21.75
ZonaHambat	12 jam	8	18.25
	24 jam	8	13.00
	Total	32	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	ZonaHambat
Chi-Square	9.577
df	3
Asymp. Sig.	.023

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Waktu



### H.3 Hasil Uji Non-parametrik *Kruskal-Wallis* Bakteri *S. aureus*

**Ranks**

	Perlakuan	N	Mean Rank	
ZonaHambat	R1	4	22.25	
	R2	4	22.75	
	R3	4	14.50	
	R4	4	14.50	
	K-1	4	14.50	
	K-2	4	14.50	
	K-3	4	14.50	
	K-4	4	14.50	
	Total		32	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	ZonaHambat
Chi-Square	13.229
df	7
Asymp. Sig.	.067

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Perlakuan

**Ranks**

	Waktu	N	Mean Rank
ZonaHambat	3 jam	8	14.50
	6 jam	8	14.50
	12 jam	8	18.75
	24 jam	8	18.25
	Total		32

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	ZonaHambat
Chi-Square	4.438
df	3
Asymp. Sig.	.218

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Waktu

