

Kemampuan Isolat Fungi Endofit Tanaman Nilam (*Pogostemon cablin*) sebagai Penghasil Antimikroba terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Novi Alvita Pratama¹⁾, Endang Kusdiyantini¹⁾ dan Sri Pujiyanto¹⁾

¹⁾Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedharto, SH, Tembalang, Semarang, Indonesia
Email : novialvitap@gmail.com

Abstract

Pogostemon cablin is one of medicinal plants that can be used as an antibacterial because it can produce essential oils. *Pogostemon cablin* can also be used as a source of isolates of endophytic fungi which can be developed as an alternative producer of antibacterial compounds. This study aims to select endophytic fungi isolates from *Pogostemon cablin* which have potential as antimicrobials and to find out the antimicrobial activity of supernatants and endophytic fungi extracts from *Pogostemon cablin* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. This study used a completely randomized design. Testing the antimicrobial activity of the supernatant and endophytic fungi extracts (concentrations of 10 µg/disk, 30 µg/disk, and 50 µg/disk) were carried out on isolates E1, E2 and E3 against *E. coli* and *S. aureus*. The treatment was carried out three times. Data were analyzed using One Way Anova and Tukey continued testing. A total of 3 best isolates were selected from 14 isolates namely E1, E2, and E3. The results of antimicrobial activity test of the supernatant showed that the supernatant E2 gave the highest inhibition zone diameter to *E.coli* (20.7 mm) and *S. aureus* (19 mm) compared to the supernatant E1 and E3. Antimicrobial activity test results from extracts showed that E2 extract gave the highest inhibition zone diameter to *E.coli* (18.5 mm) and *S. aureus* (25.1 mm). Anova test results showed that each supernatant had a significantly different effect ($p < 0.05$) and each extract concentration on isolates E1 and Isolate E2 had a significantly different effect ($p < 0.05$) while extracts of isolates E3 did not have a significant different effect on the growth of *E.coli* and *S. aureus*.

Keywords: endophytic fungi, antimicrobial, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pogostemon cablin*

Abstrak

Nilam (*Pogostemon cablin*) merupakan salah satu tanaman obat yang dapat digunakan sebagai antimikroba karena dapat menghasilkan minyak atsiri. Nilam juga dapat digunakan sebagai sumber isolat fungi endofit yang dapat dikembangkan sebagai alternatif penghasil senyawa antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi isolat fungi endofit tanaman nilam yang berpotensi sebagai antimikroba serta mengetahui aktivitas antimikroba supernatan dan ekstrak fungi endofit tanaman nilam terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pengujian aktivitas antimikroba dari supernatan dan ekstrak fungi endofit (konsentrasi 10 µg/disk, 30 µg/disk, dan 50 µg/disk) dilakukan pada isolat E1, E2 dan E3 terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Perlakuan dilakukan tiga kali ulangan. Data dianalisis menggunakan *One Way Anova* dan uji lanjut Tukey. Sebanyak 3 isolat terbaik dipilih dari 14 isolat yaitu isolat E1, E2, dan E3. Hasil uji aktivitas antimikroba dari supernatan menunjukkan bahwa supernatan E2 memberikan diameter zona hambat paling besar terhadap *E.coli* (20.7 mm) dan *S. aureus* (19 mm) dibandingkan dengan supernatan E1 dan E3. Hasil uji aktivitas antimikroba dari ekstrak menunjukkan bahwa ekstrak E2 memberikan diameter zona hambat paling besar terhadap *E.coli* (18.5 mm) dan *S. aureus* (25.1 mm). Hasil uji Anova menunjukkan bahwa masing-masing supernatan terdapat pengaruh yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) dan masing-masing konsentrasi ekstrak pada isolat E1 dan Isolat E2 memiliki pengaruh yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) sedangkan ekstrak isolat E3 tidak memiliki pengaruh yang berbeda signifikan terhadap pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *S. aureus*.

Kata kunci: fungi endofi, antimikroba, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, nilam (*Pogostemon cablin*)

PENDAHULUAN

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengidentifikasi seyawa-senyawa bioaktif dari tumbuhan yang dapat dijadikan sebagai bahan baku obat. Penggunaan tumbuhan sebagai sumber obat meningkat seiring dengan meningkatnya resistensi bakteri penyebab infeksi terhadap jenis obat. Tanaman yang banyak digunakan oleh masyarakat tradisional sebagai bahan obat tradisional salah satunya ialah tanaman nilam. Nilam merupakan tanaman perdu wangi, berdaun halus dan berbatang segi empat. Daun kering tanaman nilam disuling untuk mendapatkan minyak yang digunakan sebagai salah satu bahan industri farmasi seperti pembuatan obat antiradang, antifungi, antiserangga serta antiinflamasi (Mangun *et al.*, 2012). Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa tanaman nilam menghasilkan minyak nilam yang memiliki efek antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dan memiliki prospek terapeutik yang lebih luas dalam infeksi bakteri (Yang *et al.*, 2013).

Fungi endofit merupakan kelompok mikroorganisme yang tumbuh secara intra dan interselular pada jaringan tanaman tanpa menyebabkan gejala penyakit pada tanaman inang. Fungi endofit dapat memproduksi produk metabolit alam yang dapat berguna bagi kesehatan, pertanian, dan kegunaan industri seperti antibiotik, antikanker, agen kontrol biologis dan senyawa bioaktif lainnya (Kumar, 2014).

Penyakit infeksi yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen merupakan salah satu penyakit terbesar di seluruh dunia (Mardiastuti *et al.*, 2007). Upaya mengobati infeksi tersebut digunakan antibiotik sebagai agen terapi. Namun dalam beberapa dekade adanya resistensi antibiotik telah menjadi ancaman terhadap pengobatan efektif dari berbagai infeksi yang disebabkan oleh bakteri, virus, parasit maupun jamur. Penyakit infeksi seperti saluran pernafasan dan diare salah satu penyebab kematian terbesar di dunia (Jayalakhsmi *et al.*, 2011) disebabkan oleh mikroba patogen seperti *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Selama ini penyakit infeksi diatasi dengan menggunakan antibiotika. Penggunaan antibiotika yang tidak rasional bisa membuat mikroba patogen menjadi resisten. Oleh sebab itu, diperlukan alternatif dalam mengatasi permasalahan tersebut dengan memanfaatkan bahan-bahan aktif antimikroba dari fungi endofit tanaman obat.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan meliputi aquades steril, NaCl fisiologis 0,9%, etil asetat, *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Nutrien Agar* (NA), *Potato Dextrose Broth* (PDB), standar McFarland 0,5, *dimetilsulfoksida* (DMSO), kertas cakram, kertas saring, *chloramphenicol*. Sampel yang digunakan adalah isolat fungi endofit daun tanaman nilam (Pratama, 2017). Bakteri uji yang digunakan adalah kultur bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Peremajaan Isolat Fungi Endofit

Sebanyak 14 isolat fungi endofit tanaman nilam diinokulasikan ke media PDA kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 4-7 hari.

Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* diinokulasikan masing-masing pada media NA dalam cawan petri, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C.

Pembuatan Inokulum Bakteri Uji

Sebanyak satu ose koloni bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* diinokulasikan dalam larutan NaCl fisiologis 0,9% sebanyak 5 ml dalam tabung reaksi. Kekeruhannya diseragamkan dengan menggunakan standar McFarland 0,5 (kepadatan bakteri $1,5 \times 10^8$) pada latar belakang hitam dan cahaya terang. Teknik inokulasi bakteri yang dilakukan dalam penelitian ini adalah menggunakan swab steril. Swab steril dicelupkan ke dalam campuran bakteri uji dengan NaCl fisiologis 0,9%, kemudian ditiriskan dengan cara ujung swab ditekan dan diputar pada dinding dalam tabung untuk membuang kelebihan cairan. Selanjutnya swab tersebut dioleskan ke permukaan media MHA dalam cawan petri sebanyak dua kali yaitu secara horizontal dan vertikal agar pertumbuhan bakteri merata.

Seleksi Fungi Endofit yang Berpotensi sebagai Antibakteri

Seleksi fungi endofit penghasil antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode blok agar. Potongan agar yang ditumbuhi fungi endofit yang berumur 4-7 hari kemudian diletakkan di atas media MHA yang telah mengandung bakteri uji. Isolat fungi dan agar dipotong membentuk cakram dengan menggunakan sedotan plastik steril. Kultur diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Aktivitas antibakteri fungi endofit dilihat dari zona

hambat yang terbentuk di sekitar potongan isolat fungi. Zona hambat diukur, dipilih isolat untuk dilakukan uji selanjutnya.

Uji Aktivitas Antimikroba dari Supernatan Hasil Fermentasi Fungi Endofit

Koloni fungi yang sudah dipilih dari hasil seleksi, diremajakan pada media PDA kemudian diambil 3 potongan biakan fungi berbentuk bulat dan diinokulasikan ke dalam media cair PDB sebanyak 50 ml botol kaca 250 ml. Setiap isolat dilakukan fermentasi secara triplo. Inkubasi dilakukan selama 9 hari secara statis. Kultur yang telah difermentasi kemudian disaring untuk memisahkan filtrat dan biomasnya. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung sentrifus steril ukuran 15 ml, kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 35 menit. Supernatan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri.

Uji aktivitas antimikroba dari supernatan fungi endofit dilakukan dengan metode cakram. Secara aseptik, supernatan diteteskan pada kertas cakram sebanyak 10 µl dan dibiarkan selama 2 menit agar kertas cakram menyerap supernatan tersebut, kemudian diletakkan di atas medium MHA yang telah mengandung mikroba uji. Kontrol positif yang digunakan adalah cakram kloramfenikol dan kontrol negatif adalah kertas cakram steril. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diukur diameter zona hambatnya.

Uji Aktivitas Antimikroba Ekstraksi Hasil Fermentasi Fungi Endofit

Koloni fungi endofit yang telah dikultur dalam media cair PDB selama 7 hari kemudian disaring menggunakan kertas saring untuk diambil media fermentasinya (filtrat). Filtrat diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan filtrat dan pelarut 1 : 3. Campuran digoyang dalam *separatory funnel* agar tercampur sempurna kemudian dibiarkan selama 5 menit sehingga membentuk 2 fase. Ekstraksi dengan etil asetat diambil fase bagian atas, yaitu bagian pelarut. Hasil ekstraksi lalu dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu kurang dari 30 °C. Bobot ekstrak diperoleh dari selisih antara bobot botol berisi ekstrak dan bobot botol kosong.

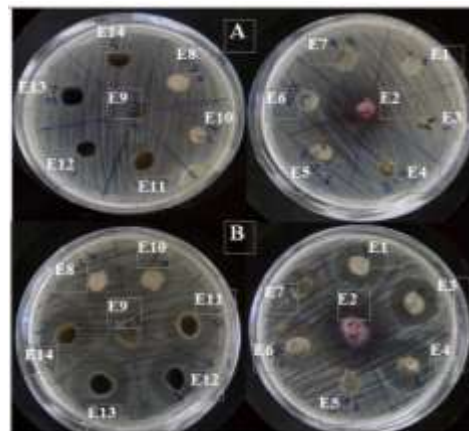
Masing-masing ekstrak fungi endofit kemudian dilarutkan kembali dengan pelarut organik menggunakan *dimetilsulfoksida* (DMSO) dibuat dalam konsentrasi 10 µg/disk, 30 µg/disk, dan 50 µg/disk. Kontrol positif yang digunakan yaitu cakram kloramfenikol dengan konsentrasi 30 µg/disk dan kontrol negatif yang digunakan adalah cakram steril yang diberi DMSO. Inkubasi

dilakukan selama 24 jam pada suhu 37°C. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi fungi endofit yang berpotensi sebagai antibakteri

Seleksi dilakukan pada 14 isolat fungi endofit tanaman nilam dengan menggunakan metode blok Agar atau difusi Agar. Aktivitas antibakteri dilihat dari zona bening yang terbentuk di sekitar potongan agar. Hal ini didukung oleh pendapat Nurainy *et al.*, (2008) bahwa metode difusi agar didasarkan pada kemampuan senyawa antimikroba pada isolat fungi endofit yang diuji untuk menghasilkan zona penghambatan di sekeliling potongan agar terhadap bakteri uji.

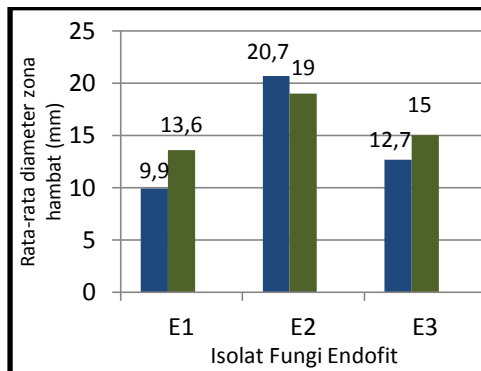


Gambar 1. Hasil uji aktivitas fungi endofit dengan blok agar terhadap *Escherichia coli* (A) dan *Staphylococcus aureus* (B)

Berdasarkan Gambar 1 bahwa zona hambat dari hasil uji antara fungi endofit dengan bakteri uji berbeda-beda. Hal ini diduga karena fungi endofit menghasilkan senyawa metabolit sekunder berbeda, selain itu konsentrasi zat bioaktif dan jenis zat yang dihasilkan oleh fungi endofit berbeda-beda pula dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Isolat E1, E2, E3, E4, E11, E12, E13, dan E14 menunjukkan zona hambat terhadap *Staphylococcus aureus* dan isolat E2 menunjukkan zona hambat terhadap *Escherichia coli*. Isolat yang menunjukkan zona bening di sekitar blok agar merupakan isolat yang berpotensi sebagai antibakteri. Sebanyak 3 isolat fungi endofit terpilih untuk diuji selanjutnya yaitu isolat E1, isolat E2 dan isolat E3 dipilih berdasarkan besarnya diameter zona hambat dan zona bening yang terbentuk secara sempurna.

Uji aktivitas antimikroba dari supernatan fermentasi fungi endofit

Sebanyak 3 isolat fungi endofit yang terpilih dari hasil seleksi diremajakan terlebih dahulu dalam media PDA kemudian dilakukan proses fermentasi dalam media PDB selama 9 hari. Filtrat (media hasil fermentasi) dipisahkan dengan biomasnya dan disentrifugasi untuk mendapatkan supernatan. Hasil pengukuran rata-rata diameter zona hambat dari aktivitas antimikroba supernatan fungi endofit dapat dilihat pada Gambar 2.



Keterangan: ■ *coli*, ■ *S. aureus*

Gambar 2. Grafik rata-rata diameter zona hambat dari aktivitas antimikroba supernatan isolat E1, E2, dan E3 terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

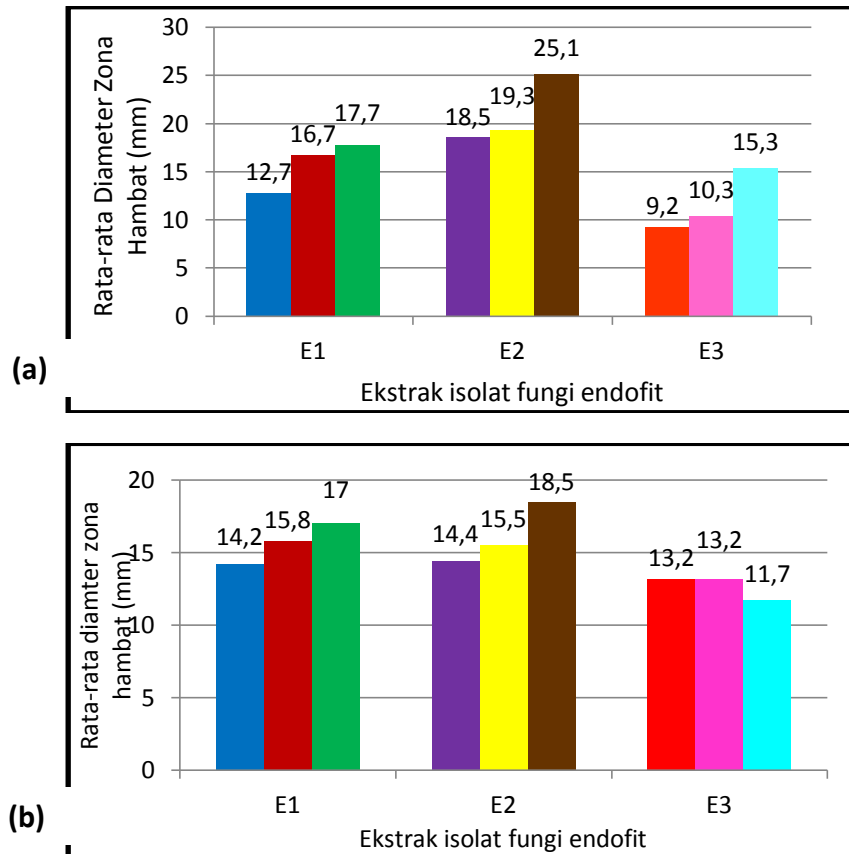
Gambar 2 menunjukkan bahwa supernatan isolat E2 menunjukkan rata-rata zona hambat paling besar dengan zona hambat terhadap *E. coli* sebesar 20,7 mm dan *S. aureus* sebesar 19 mm. Isolat E2 menunjukkan kemampuan zona hambat yang lebih besar dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dibandingkan dengan *S. aureus*. Hal ini diduga senyawa aktif yang menghambat bakteri gram negatif lebih besar dibandingkan dengan senyawa aktif terhadap gram positif. Selain itu, hal ini didukung oleh pendapat Adriana (2015) bahwa *E. coli* merupakan bakteri gram negatif, dinding selnya mengandung sedikit peptidoglikan sehingga sensitif terhadap senyawa antimikroba, dibandingkan dengan *S. aureus* yang merupakan bakteri gram positif dengan kandungan peptidoglikan yang tebal.

Hasil uji Anova pada nilai signifikansi menunjukkan perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$) di antara masing-masing supernatan fungi endofit.

Uji aktivitas antimikroba dari ekstrak fungi endofit

Media hasil fermentasi dipisahkan dengan biomassa fungsinya kemudian dilarutkan dengan etil asetat. Ekstraksi dilakukan dengan tujuan untuk menarik senyawa metabolit sekunder hasil fermentasi yang terdapat dalam fungi endofit. Etil asetat merupakan pelarut semipolar yang mudah menguap dan memiliki toksisitas rendah (Rowe, 2009). Hal ini didukung oleh pendapat Putri (2013) menyatakan bahwa etil asetat yang merupakan pelarut semi polar mampu menarik senyawa-senyawa dengan rentang polaritas lebar dari polar hingga nonpolar. Grafik rata-rata diameter zona hambat terdapat pada Gambar 3.

Diameter zona hambat terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* berbeda yang dikarenakan adanya perbedaan struktur dinding sel pada kedua bakteri, dimana gram negatif lebih kompleks dari gram positif. Kemampuan ekstrak etil asetat fungi endofit dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif disebabkan oleh metabolit sekunder yang dihasilkan. Metabolit sekunder atau senyawa antibakteri tersebut diduga bersifat semipolar, karena dapat terlarut dalam etil asetat yang bersifat semipolar. Perbedaan kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji pada masing-masing isolat fungi endofit menunjukkan adanya perbedaan senyawa bioaktif yang dihasilkan juga berbeda. Nithya dan Muthumary (2011) melakukan ekstraksi senyawa antimikroba kapang endofit *Phomopsis* sp. dari *Allamanda cathartica* Linn. menggunakan pelarut etil asetat dan metanol. Senyawa antimikroba tersebut teridentifikasi sebagai golongan senyawa terpena. Hal ini juga didukung oleh penelitian Bunrathep dkk., (2006) mengatakan bahwa daun nilam memiliki kandungan minyak atsiri, flavonoida, saponin, tanin, glikosida, terpenoid, dan steroid.



Gambar 3. Hasil uji antimikroba ekstrak fungi endofit E1, E2, E3 terhadap *Escherichia coli* (a) dan *Staphylococcus aureus* (b), ekstrak fungi endofit E1 konsentrasi 10 µg/disk, ekstrak fungi endofit E1 konsentrasi 30 µg/disk, ekstrak fungi endofit E1 konsentrasi 50 µg/disk, ekstrak fungi endofit E2 konsentrasi 10 µg/disk, ekstrak fungi endofit E2 konsentrasi 30 µg/disk, ekstrak fungi endofit E2 konsentrasi 50 µg/disk, ekstrak fungi endofit E3 konsentrasi 10 µg/disk, ekstrak fungi endofit E3 konsentrasi 30 µg/disk, I ekstrak fungi endofit E3 konsentrasi 50 µg/disk.

Gambar 3 menunjukkan bahwa variasi konsentrasi ekstrak pada isolat yang sama memiliki daya hambat berbeda-beda terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Ekstrak fungi endofit yang memiliki rata-rata zona hambat tertinggi adalah isolat E2 pada konsentrasi 50 µg/disk yaitu sebesar 25,1 mm terhadap *E. coli* dan 18,5 mm terhadap *S. aureus*. Berdasarkan penelitian untuk mengetahui aktivitas antimikroba dari ekstrak fungi endofit isolat E1, E2, dan E3 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin besar pula diameter zona hambatnya. Hal ini diperkuat oleh pendapat Maleki *et al.*, (2008) bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka jumlah senyawa antibakteri yang dilepaskan semakin besar, sehingga memudahkan penetrasi senyawa ke dalam sel.

Hasil statistik uji anova menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) antara masing-masing konsentrasi pada ekstrak E1 ($0,00 < 0,05$) dan ekstrak E2 ($0,001 < 0,05$), sedangkan ekstrak E3 ($0,031 > 0,05$) menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

Menurut Cappucino dan Sherman (1996), faktor-faktor yang mempengaruhi timbulnya zona hambat berupa kemampuan difusi bahan antimikroba ke dalam media dan interaksinya dengan mikroba yang diuji, jumlah mikroba yang diujikan, kecepatan tumbuh mikroba uji, dan tingkat sensitifitas mikroba terhadap bahan antimikroba.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa metabolit sekunder fungi endofit digunakan dari daun tanaman nilam (*Pogostemon cablin*) memiliki

potensi untuk dikembangkan menjadi senyawa antimikroba yang perlu dipurifikasi dan diproduksi skala besar, untuk mendapatkan metabolit sekunder murni yang dihasilkan oleh fungi endofit. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, untuk mengetahui senyawa aktif yang terkandung dalam isolat fungi endofit dari daun tanaman nilam (*Pogostemon cablin*) yang bersifat sebagai antimikroba dalam produksi skala besar maupun purifikasi.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah

1. Seleksi dari 14 isolat fungi endofit diperoleh 3 isolat terbaik yaitu isolat E1, isolat E2, dan isolat E3.
2. Supernatan fungi endofit isolat E2 menunjukkan rata-rata zona hambat paling besar terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dibandingkan dengan supernatan isolat E1 dan isolat E3.
3. Ekstrak fungi endofit isolat E2 menunjukkan rata-rata zona hambat paling besar terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dibandingkan dengan ekstrak fungi endofit isolat E1 dan isolat E3.

DAFTAR PUSTAKA

- Bunrathep, S., Lockwood, G. B., Songsak, T. and Ruangrunsi, N. 2006. Chemical Constituents from Leaves and Cell Cultures of *Pogostemon cablin* and Use of Precursor Feeding to Improve Patchouli Alcohol Level. *Science Asia* 32: 293-296.
- Cappucino, S. M. and Sherman, N. 1996. A Laboratory Manual. 4th Ed. Addison-Wesley Publishing Company, Boston.
- Jayalakshmi, B., K. A. Ravesha and K. N. Amruthes. 2011. Phytochemical Investigations and Antibacterial Activity of Some Medicinal Plants Against Pathogenic Bacteria. *Applied Pharmaceutical Science* 1(5): 124- 128.
- Kumar, S., R. P. Aharwal, H. Shukla and R. C. Rajak. 2014. Endophytic Fungi: As a Source of Antimicrobials Bioactive Compounds. *World Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences* (3): 1179-1197.
- Maleki, S., S. M. Seyyednejad, M. N. Damabi and H. Motamedi. 2008. Antibacterial Activity of the Fluid of Iranian *Torilis leptophylla* Against some Clinical Pathogen. *Journal of Biological Science* 11(9): 1286-1289.
- Mangun, H. M. S., Herdy, W., dan Agus, P.S. 2012. Nilam. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Mardiastuti, H. W., Karuniawati, A., Kiranasari, A., Ikaningsih dan Kadarsih, R. 2007. Emerging Resistance Pathogen: Situasi Terkini di Eropa, Amerika Serikat, Timur Tengah dan Indonesia. *Majalah Kedokteran Indonesia* 5(3).
- Nithya, K. and J. Muthumary. 2011. Bioactive Metabolite Produced by *Phomopsis* sp. an Endophytic Fungus in *Allamanda cathartica*. Linn. *Recent Research in Science and Technology* 3(3): 44-48.
- Nurainy, F., S. Rizal, dan Yudiantoro. 2008. Pengaruh Konsentrasi terhadap Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi Agar (Sumur). *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian* 13(2).
- Putri, W. S., Warditiani, N. K. dan Larasanty, L. P. F. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Skrripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana, Bali.
- Rowe, R. C., P. J. Shekey, and M. E. Quinn. 2009. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Sixth Edition. Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association, Washington.
- Yang, Xian., X. Zhang, S. Yang, and W. Liu. 2013. Evaluation of the Antibacterial Activity of Patchouli Oil. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 12(3): 307-316.