

## Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etil Asetat Fungi Endofit *Eutypa linearis*

*Antimicrobial Activities of Ethyl Acetate Extract of Endophytic Fungus Eutypa linearis*

Baiq Maylinda Gemantari<sup>1,4</sup>, Fitra Romadhonsyah<sup>1,5</sup>, Arief Nurrochmad<sup>2</sup>, Subagus Wahyuono<sup>3</sup>, Puji Astuti<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

<sup>2</sup> Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinis, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

<sup>3</sup> Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

<sup>4</sup> Departemen Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Hamzanwadi

<sup>5</sup> Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia

Corresponding author: Puji Astuti; Email: puji\_astuti@ugm.ac.id

Submitted: 16-02-2021

Revised: 23-08-2021

Accepted: 30-08-2021

### ABSTRAK

Fungi endofit banyak dilaporkan mampu memproduksi senyawa metabolit yang memiliki beragam aktivitas biologis. Diisolasi dari salah satu tanaman berkhasiat Indonesia yang dikenal dengan nama tanaman jinten (*Coleus amboinicus* Lour.), pada penelitian ini dilakukan observasi aktivitas antimikroba fungi endofit *Eutypa linearis*. Ekstrak etil asetat dari media fermentasi *E.linearis* dalam beragam konsentrasi diujikan kepada beberapa mikroba bakteri dan fungi yakni *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, dan *Candida albicans*. Aktivitas antimikroba dievaluasi menggunakan metode mikrodilusi pada media *Mueller Hinton Broth* untuk kultur bakteri dan *Brain Heart Infusion Broth* untuk kultur fungi. Nilai *optical density* pada panjang gelombang 600 nm yang diperoleh dari penggunaan *microplate reader* digunakan untuk menghitung nilai  $IC_{50}$  ekstrak. Hasil penelitian menunjukkan nilai  $IC_{50}$  ekstrak etil asetat media fermentasi *E.linearis* pada *S.aureus* adalah sebesar 260,69  $\mu\text{g/mL}$ ; *P.aeruginosa* 359,32  $\mu\text{g/mL}$ ; *B.subtilis* 163,74  $\mu\text{g/mL}$ ; dan *C.albicans* 92,75  $\mu\text{g/mL}$ . Berdasarkan metode bioautografi kontak, diketahui senyawa aktif sebagai antimikroba tersebut merupakan kelompok senyawa yang polar.

**Kata kunci:** fungi endofit; antibakteri; antifungi; mikrodilusi; bioautografi

### ABSTRACT

Endophytic fungi was known to be one of promising new research object due to its capability to produce various metabolites with broad bioactivity. Focused on its antimicrobial activity of *Eutypa linearis*, a fungus isolated from medicinal herb Jinten (*Coleus amboinicus* Lour.) was the emphasize on this study. Ethyl acetate extract of broth fermentation medium of *E.linearis* was examined through microdilution method against several bacterial and yeast such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, dan *Candida albicans*. Microdilution method was performed in *Mueller Hinton Broth* for bacterial culture and *Brain Heart Infusion* broth for yeast culture. Microplate reader was used to examine optical density at 600 nm which then used to calculate  $IC_{50}$  value of the extract. The results showed that the ethyl acetate extract of *E.linearis* broth fermentation medium had  $IC_{50}$  260,69  $\mu\text{g/mL}$  on *S.aureus*; 359,32  $\mu\text{g/mL}$  on *P.aeruginosa*; 163,74  $\mu\text{g/mL}$  on *B.subtilis*; and 92,75  $\mu\text{g/mL}$  on *C.albicans*. The active compound responsible for those activity was polar compounds as confirmed by TLC-bioautography contact.

**Keywords:** endophytic fungus; antibacterial; antifungi; microdilution; bioautography

### PENDAHULUAN

Tanaman jinten (*Coleus amboinicus* Lour.) adalah salah satu tanaman herba aromatik yang tumbuh dan terdistribusi pada daerah tropis termasuk Indonesia. Bagian daun dari tanaman tersebut dapat digunakan untuk mengobati flu, asma, konstipasi, sakit kepala,

batuk, demam dan beberapa penyakit kulit (Arumugam *et al.*, 2016). Potensi aktivitas ekstrak daun tanaman jinten telah banyak dilaporkan sebagai antibakteri, antifungi (Rodrigues *et al.*, 2013; Sivaranjani *et al.*, 2019; Swamy *et al.*, 2017), antioksidan (Bhatt & Negi, 2012; Hasibuan *et al.*, 2019) dan aktivitas

sitotoksik pada beberapa model sel kanker (Hasibuan *et al.*, 2019; Laila *et al.*, 2020).

Endofit merupakan mikroorganisme berupa fungi maupun bakteri yang hidup dalam jaringan intrasel tanaman tanpa menimbulkan penyakit (Chen *et al.*, 2016; Porras-Alfaro & Bayman, 2011). Dengan inangnya endofit bersimbiosis memproduksi metabolit sekunder yang banyak memiliki aktivitas biologis. Beberapa golongan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh endofit yaitu alkaloid, terpenoid dan fenolik yang memiliki aktivitas antioksidan antikanker, antifungi dan sebagainya (Porras-Alfaro & Bayman, 2011; Strobel, 2003). Salah satu hasil penelitian yang memanfaatkan organisme endofit adalah ditemukannya endofit *Aspergillus fumigatus* yang diisolasi dari tanaman *Taxus sp.* Endofit tersebut memiliki kemampuan memproduksi Taxol dalam jumlah yang tinggi sebagai agen kemoterapi yang dibutuhkan dalam industri produksi obat sintesis (Kumar *et al.*, 2019).

Penelitian terkait fungi endofit yang diisolasi dari daun tanaman jinten melaporkan *Athelia rolfsii* memiliki fraksi yang aktif sebagai antibakteri. Aktivitas tersebut ditunjukkan pada bakteri Gram positif dan Gram negatif *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Dalam fraksi tersebut diketahui terdapat senyawa aktif antibakteri dengan kandungan struktur aromatis, gugus metil, hidroksi dan metoksi (Astuti *et al.*, 2021). Penelitian sebelumnya melaporkan adanya fungi endofit *Eutypa linearis* pada daun tanaman jinten. Fungi endofit tersebut dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan dan sitotoksik terhadap model sel kanker Hela, T47D, MCF-7, dan WiDr (Gemantari *et al.*, 2021). Pada pengembangannya, belum dilaporkan adanya pengujian aktivitas antimikroba dari fungi endofit tersebut. Pada penelitian ini dilakukan pengujian antimikroba fungi endofit *Eutypa linearis* yang diisolasi dari daun tanaman jinten.

## METODOLOGI

### Bahan

Kultur fungi endofit *Eutypa linearis* koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi UGM, kultur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, fungi *Candida albicans* ATCC 10231, Streptomisin, Nistatin, media *Potato*

*Dextrose Broth*, *Mueller Hinton Broth* (MHB), *Brain Heart Infusion Broth* (BHI), *Nutrient Agar* (NA) dan *Saboraud Dextrose Agar* (SDA), kloroform, etil asetat, dan plat *silica gel* 60 F254 yang masing-masing diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi UGM.

### Alat

Alat gelas, autoklaf (Hirayama, Hiclave HVE-50), *incubator shaker* (Stuart Orbital Incubator), inkubator (Sakura Incubator IF-2B), spektrofotometer (SP-3000 nano Optima), *LAF cabinet* (NUAIRE NU-126-400E), *microplate reader* (Corona Electric SH-1000Lab), *rotary evaporator* (Heidolph Hei-Vap), bunsen, ose, Eppendorf steril, mikropipet, *yellow tip*, *blue tip*, dan *microwell plate*.

### Jalannya Penelitian

Fermentasi dan ekstraksi

Proses fermentasi dilakukan berdasarkan modifikasi metode Astuti *et al.*, (2021). Dilakukan kultur fungi *Eutypa linearis* dalam media *potato dextrose broth* yang diinkubasi selama 14 hari pada suhu ruang dengan rotasi *shaker* 80 putaran per menit. Filtrat yang diperoleh dari filtrasi sebagai proses pemisahan terhadap biomassa dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* dan diekstraksi secara partisi cair-cair. Digunakan pelarut dengan perbandingan etil asetat: filtrat pekat (2:1). Ekstrak etil asetat pekat diperoleh dengan menguapkan pelarut menggunakan *rotary evaporator*.

Preparasi inokulum

Kultur bakteri disiapkan sesuai metode preparasi Farkas *et al.*, (2018). Koloni bakteri ditumbuhkan dalam media MHB, dan media BHI untuk pertumbuhan koloni fungi. Inkubasi dilakukan semalam pada suhu 37°C hingga diperoleh jumlah koloni yang setara dengan standar 0,5 McFarland. Dilakukan pengenceran menggunakan media MHB pada kultur bakteri dan media BHI pada kultur fungi untuk memperoleh jumlah koloni akhir dalam sumuran *microplate* sebesar  $5 \times 10^5$  CFU/mL.

Pengujian mikrodilusi

Stok ekstrak etil asetat dengan konsentrasi 100 mg/mL dibuat dengan melarutkan ekstrak pekat etil asetat menggunakan DMSO 100%. Dilakukan pengenceran untuk membuat seri konsentrasi dengan melarutkan larutan stok

dengan media MHB untuk pengujian bakteri dan media BHI untuk pengujian fungi. Seri konsentrasi dibuat dengan pengenceran bertingkat menghasilkan konsentrasi tertinggi dalam sumuran sebesar 250 µg/mL. Pengerjaan dilakukan secara aseptis dalam *Laminar Airflow Cabinet*. Dibuat beberapa kelompok perlakuan untuk memperoleh model perhitungan nilai IC<sub>50</sub>. Kelompok uji berisi masing-masing 100 µL ekstrak dan 100 µL suspensi mikroba. Dengan perbandingan volume yang sama, kontrol ekstrak berisi ekstrak dan media, kontrol negatif berisi suspensi mikroba dan media, kontrol positif berisi suspensi mikroba dan 500 µg/mL Streptomisin atau 2,5 µg/mL Nistatin serta kontrol media yang berisi 200 µL media MHB atau BHI. *Microplate* diinkubasi semalam pada suhu 37°C sebelum dilakukan pembacaan nilai *optical density* (OD) menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 600 nm untuk kultur bakteri dan 530 nm untuk kultur fungi. Nilai IC<sub>50</sub> diperoleh sebagai konsentrasi ekstrak uji yang menghasilkan 50% viabilitas sel mikroba dari perhitungan nilai *optical density*. Prosentase viabilitas dihitung menggunakan formula Santovito *et al.*, (2018) dengan modifikasi.

$$\% \text{viabilitas} = \frac{\text{OD kelompok uji} - \text{OD kontrol ekstrak}}{\text{OD kontrol negatif} - \text{OD kontrol media}} \times 100\%$$

#### Pengujian Bioautografi

Dilakukan metode bioautografi kontak atau bioautografi difusi agar sesuai dengan modifikasi metode Sakunpak dan Sueree (2018). Secara aseptis dalam *Laminar Airflow Cabinet*, sejumlah 5 µL ekstrak etil asetat dalam pelarut etil asetat dielusi pada sistem kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fase gerak kloroform:etil asetat (1:1) dan fase diam plat silika gel 60 F254. Nilai R<sub>f</sub> dihitung berdasarkan pengukuran jarak titik tengah diameter zona spot senyawa dari titik elusi dibandingkan dengan jarak elusi total fase gerak pada plat KLT yang digunakan. Ke dalam 10 mL media NA dan SDA ditambahkan masing-masing sebanyak 100 µL suspensi *B.subtilis* dan *C.albicans* dengan teknik *pour plate*. Suspensi bakteri atau fungi yang setara dengan standar kekeruhan 0,5 McFarland. Plat KLT dengan hasil pita elusi dikeringkan dan ditempelkan dengan sisi silika menempel pada permukaan media yang telah diinokulasikan kultur mikroba. Plat didiamkan selama 30 menit untuk memastikan kelompok senyawa yang

terpisahkan berupa spot yang dihasilkan dari proses elusi berdifusi ke dalam media agar. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C semalam setelah melepas plat KLT untuk melihat pembentukan zona inhibisi dari spot hasil elusi.

#### Analisis hasil

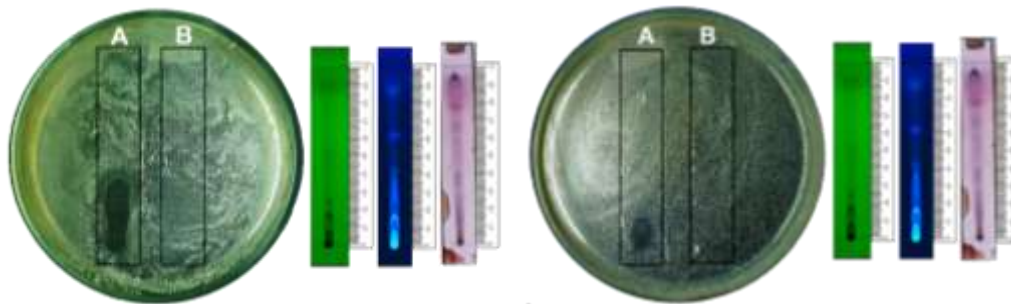
Respon viabilitas mikroba terhadap konsentrasi ekstrak dianalisis secara statistik menggunakan program SPSS 16 dengan taraf kepercayaan 95%. Nilai signifikansi dianalisis menggunakan *One way ANOVA* atau *Kruskal Wallis* sesuai nilai normalitas *Shapiro -Wilk*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Aktivitas antimikroba

Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat fungi endofit *Eutypa linearis* ditunjukkan pada Tabel I (Gemantari, 2021). Ekstrak memiliki aktivitas antimikroba sebagai antibakteri dan antifungi. Aktivitas antibakteri ditentukan dari nilai IC<sub>50</sub> pada kultur bakteri *S.aureus*, *P.aeruginosa*, dan *B.subtilis*. Aktivitas antifungi ditentukan sebagai nilai IC<sub>50</sub> ekstrak pada kultur fungi *C.albicans*. Diperoleh informasi bahwa mikroba fungi *Candida albicans* lebih rentan dibandingkan bakteri *B.subtilis*, *P.aeruginosa* dan *S.aureus* terhadap ekstrak etil asetat *E.linearis*. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai IC<sub>50</sub> yang lebih rendah. Sebagai korelasi aktivitas dengan tanaman inangnya, Swamy *et al.*, (2017) dan Sivaranjani *et al.*, (2019) melaporkan bahwa *Candida albicans* merupakan mikroba yang paling rentan terhadap ekstrak daun tanaman jinten. Hasil mikrodilusi menunjukkan ekstrak etil asetat pada penelitian ini memiliki nilai IC<sub>50</sub> terhadap *C.albicans* sebesar 92,75 µg/mL. Hasil tersebut menunjukkan potensi yang lebih baik dibandingkan dengan minyak atsiri tanaman jinten yang tumbuh di Malaysia dengan nilai MIC 12,5 x 10<sup>3</sup> µg/mL (Erny Sabrina *et al.*, 2014) terhadap *C.albicans*.

Nilai IC<sub>50</sub> menunjukkan bahwa urutan kerentanan bakteri uji terhadap ekstrak etil asetat fungi endofit *E. linearis* adalah *B. subtilis*, *S. aureus*, dan *P. aeruginosa*. Hal ini dapat dijelaskan dari struktur sel *B. subtilis* dan *S. aureus* yang tergolong bakteri Gram positif, dan *P. aeruginosa* sebagai bakteri Gram negatif. Bakteri Gram negatif memiliki membran luar yang lebih kompleks dibandingkan Gram positif. Hal ini menyebabkan dinding sel bakteri Gram



Atas: *B. subtilis*; Bawah: *C. albicans*. A: ekstrak etil asetat *E. linearis*; B: pelarut etil asetat. Analisis KLT kiri-kanan: UV 254 nm, UV366, pereaksi semprot anisaldehyd asam sulfat. Fase gerak kloroform:etil asetat (1:1), fase diam silica gel 60 F254.

Gambar 1. Hasil bioautografi ekstrak etil asetat *E. linearis* terhadap mikroba uji

Tabel I. Potensi aktivitas antimikroba *E. linearis*

Organisme	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Kontrol Viabilitas (%)	
		Streptomisin 500 µg/mL	Nistatin 2,5 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	260,69 ± 7,09	1,84 ± 0,46	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	359,32 ± 72,83	29,66 ± 0,68	-
<i>Bacillus subtilis</i>	163,74 ± 16,45	2,69 ± 0,52	-
<i>Candida albicans</i>	92,75 ± 11,84	-	8,18 ± 1,09

Data ditampilkan sebagai nilai rata-rata ± SD (n=3) P<0,05.

negatif lebih sulit tertembus sehingga kemampuan inhibisi ekstrak akan menunjukkan potensi yang lebih kecil (Allison & Gilbert, 2004). Sebagai bakteri yang paling rentan, *B. subtilis* memiliki nilai IC<sub>50</sub> yang paling rendah dibandingkan *S. aureus* dan *P. aeruginosa*. Konsentrasi ekstrak sebesar 163,74 µg/mL mampu menghambat sebesar 50% pertumbuhan bakteri *B. subtilis*.

#### Identifikasi komponen aktif

Komponen yang bertanggungjawab sebagai antimikroba dengan potensi yang ditunjukkan secara mikrodilusi dianalisis menggunakan metode bioautografi kontak. Bioautografi kontak atau disebut sebagai bioautografi difusi agar dilakukan dengan memanfaatkan proses difusi dari senyawa antimikroba dari kromatogram plat KLT ke plate media agar yang telah diinokulasikan dengan mikroba uji. Setelah diinkubasi, zona hambat akan muncul pada nilai Rf dimana komponen aktif antimikroba terelusi pada plat KLT yang kontak dengan agar (Balouiri et al., 2016; Marston, 2011).

Pada potensi aktivitas antimikroba paling baik, identifikasi komponen aktif dilakukan

terhadap *Candida albicans* dan *Bacillus subtilis*. Hasil yang diperoleh ditunjukkan pada Gambar 1. Komponen ekstrak etil asetat *Eutypa linearis* yang aktif sebagai antibakteri *B. subtilis* adalah senyawa yang terelusi pada nilai Rf 0-0,37 yang diperoleh dari pengukuran jarak zona jernih yang terbentuk pada media agar dari titik elusi dibandingkan dengan jarak elusi total fase gerak pada plat KLT yang digunakan. Komponen yang terelusi pada nilai Rf tersebut diketahui tidak memiliki aktivitas yang sama terhadap kultur fungi *C. albicans*. Pada bioautografi dengan sistem yang sama terhadap fungi *C. albicans*, diperoleh hasil bahwa komponen aktif terelusi pada nilai Rf 0-0,1 dari perhitungan dengan cara yang sama pada perlakuan bakteri *B. subtilis*. Pada sistem kromatografi lapis tipis menggunakan fase gerak kloroform: etil asetat, komponen aktif tersebut menunjukkan sifat kepolaran yang relatif tinggi sehingga terelusi pada nilai Rf yang rendah. Identifikasi komponen aktif tersebut menggunakan pereaksi semprot anisaldehyd-asam sulfat menunjukkan respon positif. Hal tersebut menunjukkan bahwa dimungkinkan komponen aktif merupakan senyawa dengan golongan fenolik, steroid, terpenoid maupun senyawa

gula (Jork, 1990). Hasil ini dimungkinkan berkorelasi dengan senyawa aktif antimikroba yang dihasilkan oleh fungi endofit *Athelia rolfsii* dari daun tanaman jinten berupa komponen dengan struktur *isoprene* (Astuti *et al.*, 2020) dan atau senyawa yang memiliki struktur hidroksil (Astuti *et al.*, 2021). Senyawa monoterpen fenolik yang dibentuk dari struktur *isoprene* dengan gugus hidroksil seperti *Carvacrol* dan *Thymol* merupakan senyawa dengan aktivitas antibakteri serta antifungi (Bnyan *et al.*, 2014; de Lira Mota *et al.*, 2012; Marino *et al.*, 1999; Pina-Vaz *et al.*, 2004). Kedua senyawa tersebut, dilaporkan merupakan senyawa mayor dalam minyak atsiri tanaman jinten *C. amboinicus* dengan persentase *Thymol* mencapai 88% dan 80% *Carvacrol* (DeBaggio & Tucker, 2009).

## KESIMPULAN

Ekstrak etil asetat fungi endofit *Eutypa linearis* memiliki aktivitas antimikroba sebagai antibakteri dan antifungi. Aktivitas tersebut ditunjukkan dengan nilai IC<sub>50</sub> masing-masing pada *S. aureus* (260,69 µg/mL), *P. aeruginosa* (359,32 µg/mL), *B. subtilis* (163,74 µg/mL) dan *C. albicans* (92,75 µg/mL). Komponen yang bertanggungjawab pada aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis* ditunjukkan pada hasil bioautografi dengan nilai Rf 0-0,37, dan nilai Rf 0-0,1 untuk komponen dengan aktivitas antifungi terhadap *C. albicans*. Komponen aktif dengan aktivitas tersebut dikonfirmasi sebagai golongan senyawa polar yang berespon positif terhadap pereaksi semprot anisaldehyd-asam sulfat.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi melalui program Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT) dengan nomor hibah 1764/UN1/DITLIT/DITLIT/PT/2020. Data yang dipublikasikan merupakan bagian dari tesis Baiq Maylinda Gemantari.

## DAFTAR PUSTAKA

Allison, D., & Gilbert, P. (2004). Bacteria. In *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology* (pp. 23–43). John Wiley & Sons, Ltd.

Arumugam, G., Swamy, M. K., & Sinniah, U. R. (2016). *Plectranthus amboinicus* (Lour.)

Spreng: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(4), 369.

- Astuti, P., Rollando, R., Pratoko, D. K., Wahyuono, S., & Nurrochmad, A. (2021). Antimicrobial and Cytotoxic Activities of A compound Produced by An Endophytic Fungus Isolated from The Leaves of *Coleus amboinicus* Lour. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 13(01), 2632–2644.
- Astuti, P., Rollando, R., Wahyuono, S., & Nurrochmad, A. (2020). Antimicrobial activities of isoprene compounds produced by an endophytic fungus isolated from the leaves of *Coleus amboinicus* Lour. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 8(4), 280–289.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.
- Bhatt, P., & Negi, P. S. (2012). Antioxidant and Antibacterial Activities in the Leaf Extracts of Indian Borage (*Plectranthus amboinicus*). *Food and Nutrition Sciences*, 3(2), 146–152.
- Bnyan, I. A., Abid, A. T., & Obied, H. N. (2014). Antibacterial Activity of Carvacrol against Different Types of Bacteria. *Journal of Natural Sciences Research*, 4(9), 13–16.
- Chen, L., Zhang, Q.-Y., Jia, M., Ming, Q.-L., Yue, W., Rahman, K., Qin, L.-P., & Han, T. (2016). Endophytic fungi with antitumor activities: Their occurrence and anticancer compounds. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(3), 454–473.
- de Lira Mota, K., de Oliveira Pereira, F., de Oliveira, W., Lima, I., & de Oliveira Lima, E. (2012). Antifungal Activity of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil and Its Constituent Phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: Interaction with Ergosterol. *Molecules*, 17(12), 14418–14433.
- DeBaggio, T., & Tucker, A. O. (2009). *The Encyclopedia of Herbs: A Comprehensive Reference to Herbs of Flavor and Fragrance*. Timber Press.
- Erny Sabrina, M. N., Razali, M., Mirfat, A. H. S., & Mohd Shukri, M. A. (2014). Antimicrobial activity and bioactive evaluation of *Plectranthus amboinicus* essential oil.

- American Journal of Research Communication*, 2(12), 121–127.
- Farkas, A., Pap, B., Kondorosi, É., & Maróti, G. (2018). Antimicrobial Activity of NCR Plant Peptides Strongly Depends on the Test Assays. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Gemantari, B. M. (2021). *Karakterisasi dan Skrining Potensi Aktivitas Fungi Endofit Eutypa linearis dari Daun Tanaman Jinten (Coleus amboinicus Lour.)* [Tesis]. Universitas Gadjah Mada.
- Gemantari, B. M., Romadhonsyah, F., Nurrochmad, A., Wahyuono, S., & Astuti, P. (2021). Bioactivity Screening of Endophytic Fungus *Eutypa linearis* isolated from *Coleus amboinicus* (Lour.). *Indonesian Journal of Pharmacy*, 32, 86–95.
- Hasibuan, P. A. Z. H., Sitorus, P., Satria, D., & Sibuea, R. D. (2019). Antioxidant Properties and Cytotoxic Activity of Ethyl Acetate Fraction of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Leaves on HeLa and T47D Cell Lines. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 10(1), 37–45.
- Jork, H. (Ed.). (1990). *Thin-layer chromatography: Reagents and detection methods*. VCH.
- Kumar, P., Singh, B., Thakur, V., Thakur, A., Thakur, N., Pandey, D., & Chand, D. (2019). Hyper-production of taxol from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus isolated from *Taxus* sp. Of the Northern Himalayan region. *Biotechnology Reports*, 24.
- Laila, F., Fardiaz, D., Yuliana, N. D., Damanik, M. R. M., & Nur Annisa Dewi, F. (2020). Methanol Extract of *Coleus amboinicus* (Lour) Exhibited Antiproliferative Activity and Induced Programmed Cell Death in Colon Cancer Cell WiDr. *International Journal of Food Science*, 2020, e9068326.
- Marino, M., Bersani, C., & Comi, G. (1999). Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection*, 62(9), 1017–1023.
- Marston, A. (2011). Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2676–2683.
- Pina-Vaz, C., Gonçalves Rodrigues, A., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Gonçalves, M. J., & Martinez-de-Oliveira, J. (2004). Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 18(1), 73–78.
- Porras-Alfaro, A., & Bayman, P. (2011). Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 291–315.
- Rodrigues, F. F. G., Costa, J. G. M., Rodrigues, F. F. G., & Campos, A. R. (2013). Study of the Interference between *Plectranthus* Species Essential Oils from Brazil and Aminoglycosides. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, e724161.
- Sakunpak, A., & Sueree, L. (2018). Thin-layer chromatography–contact bioautography as a tool for bioassay-guided isolation of anti- *Streptococcus mutans* compounds from *Pinus merkusii* heartwood. *Journal of Planar Chromatography*, 31(5), 355–359.
- Santovito, E., das Neves, J., Greco, D., D’Ascanio, V., Sarmiento, B., Logrieco, A. F., & Avantiaggiato, G. (2018). Antimicrobial properties of rosin acids-loaded nanoparticles against antibiotic-sensitive and antibiotic-resistant foodborne pathogens. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup3), S414–S422.
- Sivaranjani, D., Saranraj, P., Manigandan, M., & Amala, K. (2019). Antimicrobial activity of *Plectranthus amboinicus* solvent extracts against Human Pathogenic Bacteria and Fungi. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(3), 36–39.
- Strobel, G. A. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, 5(6), 535–544.
- Swamy, M. K., Arumugam, G., Kaur, R., Ghasemzadeh, A., Yusoff, M. Mohd., & Sinniah, U. R. (2017). GC-MS Based Metabolite Profiling, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Different Solvent Extracts of Malaysian *Plectranthus amboinicus* Leaves. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 2017.