



Antimicrobial Activity of Ethyl Acetate Extract of Endophytic Fungus *Schizophyllum commune*

Fitra Romadhonsyah^{1,4}, Baiq M. Gemantari^{1,5}, Arief Nurrochmad², Subagus Wahyuono³, Puji Astuti^{3*}

¹Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

²Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinis, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

³Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

⁴Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta, Indonesia

⁵Departemen Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Hamzanwadi, Selong, Indonesia

Submitted 15 February 2024; Revised 05 August 2024; Accepted 05 August 2024; Published 03 September 2024

*Corresponding author: puji_astuti@ugm.ac.id

Abstract

Coleus amboinicus Lour. is a medicinal plant that has been reported for antimicrobial activities. Endophytic fungi in plant tissues produced active compounds similar to their host plants. *Schizophyllum commune* is an endophytic fungus isolated from the leaves of *C. amboinicus*. This study aimed to examine antimicrobial activity of ethyl acetate extract derived from the endophytic fungus *S. commune*. The production of secondary metabolites from *S. commune* was carried out by fermentation method using Potato Dextrose Broth (PDB). Testing of antimicrobial activity was conducted using microdilution method against *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*. Microbial cell viability and IC₅₀ values were analyzed to characterize the antimicrobial activity. TLC-bioautography to determine the inhibitory potential compounds within the extract against microbial growth. The best IC₅₀ values were observed against *B. subtilis* and *C. albicans* (239.23 ± 20.86 and 143.05 ± 37.03 µg/mL, respectively). TLC-bioautography showed inhibition spots against *B. subtilis* and *C. albicans*. The active compounds showed the presence of terpenoids. The ethyl acetate extract of the endophytic fungus *S. commune* has potential as an antimicrobial.

Keywords: Antimicrobial, *Coleus amboinicus* Lour, Endophytic fungi, *Schizophyllum commune*.

Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etil Asetat Fungi Endofit *Schizophyllum commune*

Abstrak

Coleus amboinicus Lour. merupakan tanaman obat yang memiliki aktivitas sebagai antimikroba. Fungi endofit dalam tanaman mampu memproduksi senyawa aktif yang serupa dengan tanaman inangnya. *Schizophyllum commune* merupakan fungi endofit yang berasal dari daun *C. amboinicus*. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat dari fungi endofit *S. commune*. Produksi metabolit sekunder dari *S. commune* dilakukan dengan metode fermentasi menggunakan Potato Dextrose Broth (PDB). Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode mikrodilusi menggunakan mikroba *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albicans*. Nilai viabilitas sel mikroba dan IC₅₀ dianalisis untuk karakterisasi aktivitas antimikroba. KLT bioautografi untuk mendeteksi potensi penghambatan kandungan senyawa dalam ekstrak terhadap pertumbuhan mikroba. Ekstrak etil asetat *S. commune* menunjukkan aktivitas antimikroba yang rendah. Nilai IC₅₀ terbaik ditemukan terhadap *B. subtilis* dan *C. albicans* (239,23 ± 20,86 dan 143,05 ± 37,03 µg/mL). KLT bioautografi menunjukkan bahwa terdapat spot penghambatan pada *B. subtilis* dan *C. albicans*. Analisis senyawa aktif menunjukkan bahwa ekstrak mengandung senyawa terpenoid. Ekstrak etil asetat dari fungi endofit *S. commune* berpotensi sebagai antimikroba.

Kata Kunci: Antimikroba, *Coleus amboinicus* Lour, Fungi endofit, *Schizophyllum commune*.

1. Pendahuluan

Mikroba endofit merupakan organisme hidup yang dapat berupa bakteri ataupun fungi yang memiliki ukuran mikroskopis dan hidup di dalam jaringan tanaman (xilem dan floem) batang, daun, buah, akar, dan bunga. Mikroba endofit, khususnya jenis fungi endofit dapat hidup di jaringan tanaman tanpa menimbulkan gejala penyakit.¹ Interaksi fungi endofit dengan tanaman akan menimbulkan keseimbangan sinergisme. Hal ini terkait dengan fungi endofit yang dapat menghasilkan metabolit sekunder sebagai sistem pertahanan dari serangan senyawa patogen, serangga, nematoda, dan hewan herbivora.² Fungi endofit menghasilkan berbagai metabolit sekunder seperti alkaloid, terpenoid, fenolik, flavonoid dan lain sebagainya. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa metabolit sekunder yang diisolasi dari fungi endofit memiliki aktivitas sebagai antioksidan, sitotoksik, dan antimikroba.^{3,4} Beberapa fungi endofit memiliki kemampuan sebagai antimikroba dan memproduksi metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inangnya. Sebagai contoh adalah fungi endofit *Penicillium canescens* yang diisolasi dari daun *Olea eurooa* L. dapat memproduksi senyawa *1-Octen-3-ol* yang berfungsi sebagai antimikroba terhadap *C. glabrata*, *B. cereus*, *S. aureus*, dan *P. aeruginosa*.^{5,6} Fungi endofit *Sanguinaria canadensis* yang diisolasi dari *Macleaya cordata* (Willd) R.Br. juga dapat memproduksi senyawa yang serupa dengan tanaman inangnya yaitu sanguinarine, suatu alkaloid yang dikenal memiliki aktivitas antimikroba terhadap methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.⁷

Daun bangun-bangun (*C. amboinicus* L.) merupakan tanaman obat dari famili *Lamiaceae* yang memiliki kandungan metabolit sekunder berupa minyak atsiri. Daun bangun-bangun memiliki aktivitas farmakologi sebagai anti-inflamasi, anti-alergi, anti-asma, dan batuk.⁸ Selain itu, beberapa penelitian menyebutkan tanaman bangun-bangun memiliki aktivitas sitotoksik, antioksidan dan antibakteri yang baik.^{9,10} Ekstrak metanol dan air dari daun bangun-bangun mampu menghambat bakteri

Klebsiella pneumonia, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Staphylococcus aureus*.^{11,12} Proses ekstraksi, fraksinasi, dan isolasi senyawa aktif umumnya membutuhkan jumlah simplisia yang besar serta lahan yang cukup untuk budidaya sehingga perlu dilakukan cara lain yang lebih efektif dan efisien, salah satunya adalah melakukan penelusuran fungi endofit dari tanaman inang yang memiliki potensi aktivitas farmakologi.¹³ Penelitian sebelumnya telah berhasil melakukan isolasi beberapa jenis fungi endofit dari bagian daun dan kulit batang bangun-bangun yaitu *Schizophyllum commune*,¹⁴ *Eutypa linearis*,⁴ *Arthrrium rasikravindrae*,¹⁵ dan *Syncephalastrum racemosum*.¹⁶ Dalam penelitian ini menggunakan etil asetat sebagai pelarut ekstraksi media kultur karena merupakan pelarut semi polar yang dapat menyari senyawa volatil serta senyawa bersifat semi polar ke polar seperti terpenoid, flavonoid, fenolik, antosianin, dan karotenoid. Adanya potensi tanaman bangun-bangun sebagai antimikroba, penelitian ini difokuskan untuk menelusuri potensi fungi endofit *S. commune* yang diisolasi dari tanaman tersebut untuk menghasilkan senyawa antimikroba.

2. Metode

2.1. Alat

Alat yang digunakan yaitu *rotary evaporator* (Heidolph Hei-Vap), timbangan analitik (Mettler toledo), *beaker glass* (Iwaki), lemari *shaker*, *biosafety cabinet*, *ELISA reader* (SLT 240 ATC, Bio Rad®, Jepang), *microplate* (biologix), *TLC chamber* (Camag), lemari asam, inkubator, *UV box*, dan *autoclave*.

2.2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah Kultur fungi *S. commune* merupakan koleksi fungi dari Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada yang diisolasi dari daun *C. amboinicus*. Kultur mikroba yang digunakan adalah *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Candida albicans* (ATCC 10231).

Media *Mueller Hinton Broth* (MHB) (Oxoid), media *Brain Heart Infusion* (BHI) (Oxoid), media *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Oxoid), media *Potato Dextrose Broth* (PDB) (Oxoid), etil asetat, kloroform p.a (Merck), streptomisin (TCI America), nistatin, *TLC silica gel* 60 GF254 (Merck), media *Nutrient Agar* (NA) (Oxoid), media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) (Oxoid).

2.3. Prosedur rinci

2.3.1. Sumber kultur fungi

Kultur fungi *S. commune* merupakan koleksi fungi dari Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada yang diisolasi dari daun *C. amboinicus*. Fungi ini telah dikonfirmasi jenisnya berdasarkan kode identifikasi : 244/Mol-03/F/11/2019 yang dikeluarkan oleh Pusat Penelitian Biologi LIPI dengan melakukan identifikasi secara makroskopis, mikroskopis, serta molekuler dengan analisis *Internal Transcribed Spacer* (ITS) menggunakan pasangan primer ITS 4: 5'--TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3' dan ITS 5: 5' - GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3'.

2.3.2. Sumber mikroba uji

Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan menggunakan satu bakteri gram negatif yaitu *P. aeruginosa*, dua bakteri gram positif yaitu *B. subtilis* dan *S. aureus*, dan satu fungi yaitu *C. albicans*. Bakteri dan fungi yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari stok kultur yang dikembangkan oleh Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada. Bakteri diinokulasikan dalam media MHB dan fungi diinokulasikan dalam media BHI.

2.3.3. Fermentasi dan Ekstraksi Media Kultur Fungi

Fungi endofit *S. commune* dikultur dalam media PDA dengan suhu 25°C selama 14 hari pada kondisi gelap.¹⁴ Proses fermentasi fungi dilakukan dengan menginokulasikan kultur PDA sebanyak 4 plug berukuran diameter 5 mm ke dalam 500 ml labu erlenmeyer yang berisi 200 ml media PDB.

Sterilisasi dilakukan dengan metode panas basah menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 20 menit. Selanjutnya media diinkubasi pada suhu ruangan di dalam lemari shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 2 minggu dan kondisi gelap.^{14,17} Miselium fungi dan filtrat media yang sudah diinkubasi selama 2 minggu selanjutnya dipisahkan dengan penyaringan. Filtrat media diekstraksi dengan etil asetat (1:1 v/v) menggunakan corong pisah dan diambil fase larut etil asetat. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali. Larutan etil asetat dikeringkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C, kecepatan 60 rpm, dan tekanan 200 mbar.

2.3.4. Skrining Aktivitas Antimikroba

Penentuan aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode mikrodilusi.¹⁸ Spesimen uji bakteri dan fungi *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, dan *C. albicans* diinokulasikan ke dalam media kultur. Selanjutnya media dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 12 jam lalu atur kekeruhannya mencapai 0,5 unit McFarland (108 CFU/mL) pada OD600 nm. Sampel uji ekstrak etil asetat *S. commune* dibuat dalam beberapa konsentrasi yaitu 15,625 - 250 µg/mL, kontrol positif dalam uji antibakteri yaitu streptomisin dengan konsentrasi akhir 500 µg/mL, dan kontrol positif untuk uji antifungi menggunakan nistatin dengan konsentrasi akhir 2,5 µg/mL. Sebanyak 100 µL bakteri atau fungi dimasukkan ke dalam *microplate* dan ditambahkan 100 µL sampel uji atau kontrol positif. *Microplate* selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C semalaman. Semua pengujian dilakukan sebanyak tiga kali replikasi dan nilai viabilitas bakteri didapatkan dari nilai absorbansi yang dianalisis dengan ELISA reader pada panjang gelombang 600 nm untuk bakteri dan 530 nm untuk fungi.¹⁹ Persentase viabilitas bakteri atau fungi dihitung dengan rumus:

$$\frac{(A - B)}{(C - D)} \times 100\%$$

Keterangan:

A = Absorbansi sampel atau kontrol positif

B = Absorbansi blanko atau kontrol ekstrak

C = Absorbansi kontrol negatif
D = Absorbansi media

Perhitungan IC_{50} didapatkan dengan cara memasukkan angka 50 sebagai Y dalam persamaan regresi linier yang diperoleh dari grafik konsentrasi dengan persentase sel hidup.

2.3.5. Uji KLT-Bioautografi

Pengujian KLT-bioautografi dilakukan dengan metode *indirect* atau kontak dengan sedikit modifikasi.^{20,21} Ekstrak etil asetat *S. commune* dielusi pada plat KLT silica gel 60 GF254 berukuran 8 x 1,5 cm. Plat KLT dielusikan pada fase gerak kloroform : etil asetat (1:1 v/v). Plat KLT dikeringkan untuk menghilangkan pelarut organik. Mikroba uji untuk pengujian KLT-bioautografi dipilih berdasarkan hasil terbaik dari uji mikrodilusi. Sebanyak 10 mL media NA untuk bakteri dan media SDA untuk fungi dicampur dengan 100 μ L suspensi bakteri atau fungi dalam cawan petri steril dan didiamkan hingga memadat. Plat KLT yang sudah dielusi selanjutnya ditempelkan pada permukaan media agar dan didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya, plat KLT dipisahkan dari media agar dan dilakukan inkubasi pada media agar ke dalam inkubator pada suhu $37 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 24 jam. Diamati adanya zona penghambatan pada media agar NA dan SDA. Kontrol negatif yang digunakan adalah pelarut ekstrak (kloroform:etil asetat 1:1). Analisis senyawa secara visual dilakukan dengan pengamatan dibawah sinar UV 254 nm, 366 nm, dan diberikan pereaksi semprot anisaldehyd-asam sulfat.

2.3.6. Analisis Statistika

Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan sebanyak tiga replikasi dan hasil dinyatakan sebagai rata-rata dengan standar deviasi ($\pm$ SD). Analisis statistik dilakukan dengan uji parametrik ANOVA dan uji lanjutan Tukey untuk membandingkan antara pasangan kelompok. Nilai $p < 0,05$ dianggap signifikan secara statistik. Kurva konsentrasi-sel hidup di plot dan nilai IC_{50} (konsentrasi sampel dapat menghambat 50% pertumbuhan

bakteri atau fungi) dihitung menggunakan analisis regresi linier.

3. Hasil

3.1. Hasil Ekstraksi Media Kultur Fungi

Rerata bobot ekstrak etil asetat yang dihasilkan pada proses fermentasi dari total volume 1000 mL adalah $90,31 \pm 8,37$ mg dengan rendemen sekitar 0,090%b/v.

3.2. Hasil Skrining Antimikroba

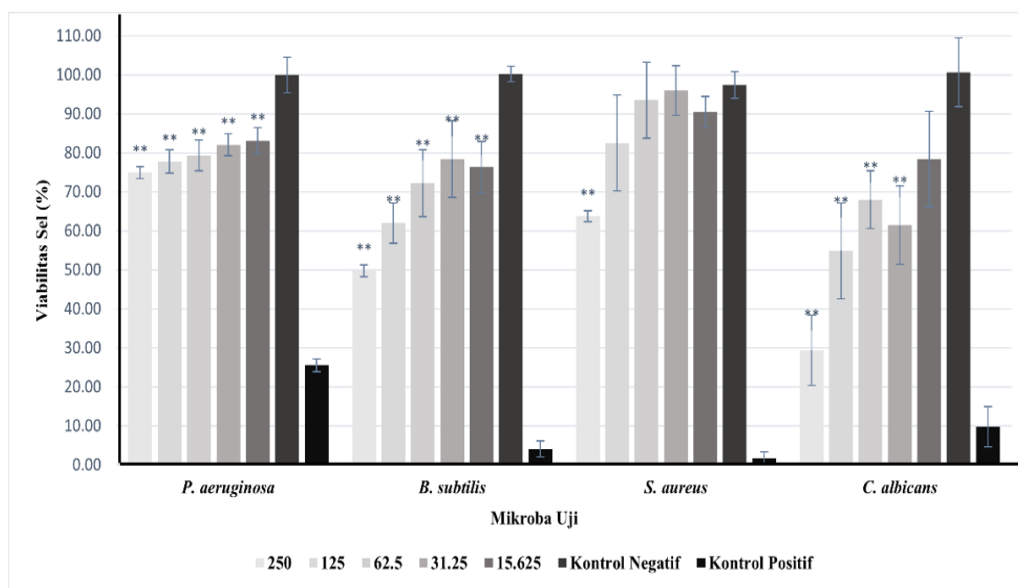
Hasil persen viabilitas pengujian antimikroba dari ekstrak etil asetat *S. commune* terhadap bakteri *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, dan fungi *C. albicans* dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil tersebut kemudian dilanjutkan dengan pembuatan grafik pola poin dan ditentukan regresi liniernya untuk mendapatkan nilai IC_{50} . Hasil perhitungan nilai IC_{50} ekstrak etil asetat terhadap bakteri dan fungi yang diteliti dapat dilihat pada Tabel 1.

3.3. Hasil Analisis Statistika Uji Antimikroba

Pengujian statistika terhadap hasil antimikroba dari ekstrak etil asetat *S. commune* terhadap bakteri *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, dan fungi *C. albicans* dilakukan dengan menggunakan uji parametrik ANOVA. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat *S. commune* memiliki perbedaan signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok uji terhadap kontrol. Pengujian dilanjutkan dengan uji Tukey dan data dapat dilihat pada Gambar 1 dengan adanya tanda (*) pada setiap konsentrasi uji yang menandakan kelompok tersebut terdapat perbedaan signifikan dibanding kontrol ($p < 0,05$).

3.4. Hasil Pengujian KLT-Bioautografi

Berdasarkan hasil skrining aktivitas antimikroba dari ekstrak etil asetat *S. commune* terhadap empat jenis mikroba tersebut, dilanjutkan pengujian KLT-Bioautografi terhadap dua jenis mikroba dengan nilai IC_{50} terbaik yaitu bakteri *B. subtilis* ($239,23 \pm 20,86$ $\mu\text{g/mL}$) dan fungi *C. albicans* ($143,05 \pm 37,03$ $\mu\text{g/mL}$). Hasil uji KLT-Bioautografi



Gambar 1. Hasil statistika aktivitas antimikroba terhadap tiga sel bakteri dan satu sel fungi. ** $p < 0,05$ dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (media + bakteri). Kontrol positif menggunakan Streptomisin 500 $\mu\text{g/mL}$ dan nistatin 2,5 $\mu\text{g/mL}$ ($n=3$).

terhadap dua jenis mikroba disajikan dalam Gambar 2.

4. Pembahasan

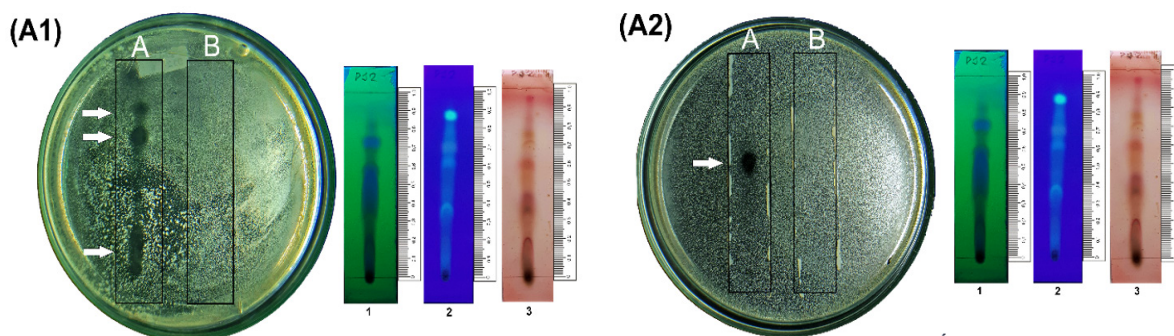
Berdasarkan hasil skrining antimikroba diketahui bahwa ekstrak etil asetat *S. commune* memiliki potensi yang cukup baik dalam menekan pertumbuhan bakteri gram negatif dan positif serta fungi patogen. Hasil analisis statistika lanjutan Tukey memperlihatkan bahwa ekstrak etil asetat *S. commune* pada konsentrasi 250–15,625 $\mu\text{g/mL}$ dapat menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* dan *B. subtilis*, konsentrasi 250–31,25 $\mu\text{g/mL}$ dapat menghambat pertumbuhan *C. albicans*, serta konsentrasi 250 $\mu\text{g/mL}$ dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (Gambar 1).

Analisis lebih lanjut dengan KLT bioautografi pada Gambar 2 menunjukkan bahwa senyawa pada $R_f = 0,15$; $0,75$; dan $0,88$ mampu menghambat pertumbuhan

bakteri *B. subtilis* dan pada Gambar 2B menunjukkan bahwa senyawa pada $R_f = 0,53$ mampu menghambat pertumbuhan fungi *C. albicans* dengan terlihatnya zona hambatan. Deteksi dengan pereaksi semprot anisaldehyd-asam sulfat menunjukkan bahwa senyawa tersebut termasuk dalam golongan terpenoid dengan tampak warna merah muda pada spot tersebut.¹⁴ Berdasarkan analisis KLT bioautografi, senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etil asetat *S. commune* adalah golongan terpenoid. Pada penelitian lain menunjukkan bahwa tanaman inangnya yaitu *C. amboinicus* juga dapat memproduksi senyawa terpenoid.²² Hal ini menyatakan bahwa fungi endofit dapat memproduksi metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inangnya. Telah dilaporkan dalam beberapa studi bahwa senyawa dalam golongan terpenoid terutama pada daun *C. amboinicus* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *B. subtilis* dan fungi *C. albicans*.^{23,24} Senyawa terpenoid

Tabel 1. Hasil pengujian aktivitas antimikroba dari ekstrak etil asetat *S. commune*

Sel Bakteri	IC50 $\pm$ SD ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 250
<i>Staphylococcus aureus</i>	> 250
<i>Bacillus subtilis</i>	239,23 $\pm$ 20,86
Sel Fungi	IC50 $\pm$ SD ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Candida albicans</i>	143,05 $\pm$ 37,03



Gambar 2. KLT-Bioautografi terhadap (A1) *Bacillus subtilis* dan (A2) *Candida albicans*. (A) Plat KLT Sampel Ekstrak Etil Asetat *S. commune*; (B) Plat KLT Kontrol Negatif; 1. Visual Sinar UV 254 nm; 2. Visual Sinar UV 366 nm; 3. Pereaksi Semprot Anisaldehyd-Asam Sulfat.

memiliki beberapa mekanisme dalam menghambat mikroba antara lain dengan cara penghambatan suplai oksigen dan fosforilasi oksidatif. Mikroba aerob membutuhkan oksigen dalam pembentukan energi untuk tumbuh. Penurunan kadar oksigen akan membuat kecepatan pertumbuhan bakteri akan menurun.²⁵ Selain itu, terpenoid dapat mempengaruhi proses fosforilasi oksidatif dimana proses ini penting dalam proses respirasi sel di membran sitoplasma.²⁶

Kemampuan antibakteri dari *S. commune* juga memiliki kesamaan dengan aktivitas antibakteri dari tanaman inangnya yaitu *C. amboinicus*. Hal ini didasari dari penelitian yang dilakukan oleh Swamy et al (2017) bahwa daun *C. amboinicus* memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *B. subtilis* dan *C. albicans*.²⁷ Hal ini dapat memperkuat penjelasan bahwa fungi endofit memiliki kesamaan aktivitas dibandingkan dengan tanaman induknya.

5. Kesimpulan

Ekstrak etil asetat dari *S. commune* memiliki aktivitas antimikroba yang cukup baik karena memiliki nilai $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ terhadap bakteri *B. subtilis* dan fungi *C. albicans*. Hasil penelitian ini menjadi potensi yang bisa dikembangkan lebih lanjut untuk mencari senyawa aktif terhadap antimikroba. Studi penentuan aktivitas antimikroba terhadap ekstrak ini dapat menambah informasi terkait penelusuran potensi fungi endofit sebagai sumber senyawa bioaktif.

Referensi

1. Jia M, Chen L, Xin H-L, Zheng C-J, Rahman K, Han T, et al. A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. *Front Microbiol.* 2016;7(906):1-14
2. Fitriarni D, Kasiamdari RS. Isolation and Identification of Endophytic Fungi from Leave and Stem of *Calopogonium mucunoides*. *J Trop Biodivers Biotechnol.* 2018;3(1): 30–36.
3. Ancheeva E, Daletos G, Proksch P. Bioactive Secondary Metabolites from Endophytic Fungi. *Curr Med Chem.* 2020;27(11): 1836–1854.
4. Gemantari BM, Romadhonsyah F, Nurrochmad A, Wahyuono S, Astuti P. Bioactivity Screening of Endophytic Fungus *Eutypa linearis* Isolated from *Coleus amboinicus* (Lour.). *Indonesian Journal of Pharmacy.* 2021;32(1):86-95.
5. Dursun A, Güler Z, Özkan D, Bozdoğan Konuşkan D. Identification of Volatile Compounds (VCs) in the Leaves Collected from “Gemlik”, “Halhali” and “Sarı Hasebi” Olive Tree Varieties. *International Journal of Secondary Metabolite.* 2017;4(3): 195–204.
6. Malhadas C, Malheiro R, Pereira JA, de Pinho PG, Baptista P. Antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree leaves. *World J Microbiol Biotechnol.* 2017;33(3):1-12.
7. Wang X-J, Min C-L, Ge M, Zuo R-H. An Endophytic Sanguinarine-Producing Fungus from *Macleaya cordata*, *Fusarium proliferatum* BLH51. *Curr Microbiol.*

- 2014;68(3):336–341.
8. Rai V, Pai V, Kedilaya P. A preliminary evaluation of anticancer and antioxidant potential of two traditional medicinal plants from Lamiaceae - *Pogostemon heyneanus* and *Plectranthus amboinicus*. *J Appl Pharm Sci*. 2016;6(8):73–78.
9. Damanik RM, Kustiyah L, Hanafi M, Iwansyah AC. Evaluation Lactogenic Activity of Ethyl Acetate Fraction of Torbangun (*Coleus amboinicus* L.) Leaves. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2017;101:012007.
10. Lipin MS, Menon DB. Essential Oil Extracted from *Plectranthus amboinicus* Induces Apoptosis in the Lung Cancer Cells via Mitochondrial Pathway. *Drugs R D*. 2017;9(2):83-89.
11. Ismayil S, Nimila P. Antimicrobial Activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Against Gram Negative Bacteria *Klebsiella pneumoniae* and *Shigella flexneri* and their Phytochemical Tests. *International Journal of Health Sciences and Research*. 2019;9(5):304–311.
12. Sivaranjani D, Saranraj P, Manigandan M, Amala K. Antimicrobial activity of *Plectranthus amboinicus* solvent extracts against Human Pathogenic Bacteria and Fungi. *JDDT*. 2019;9(3):36–39.
13. Gopi K, Jayaprakashvel M. Endophytic Fungi as Novel Bioresource for Biomedical Applications. *Res J Pharm Technol*. 2017;10(11):4114–4115.
14. Romadhonsyah F, Gemantari BM, Nurrochmad A, Wahyuono S, Astuti P. Antioxidant, Cytotoxic Activities and Characterization of Secondary Metabolites of Endophytic Fungus *Schizophyllum commune* isolated from *Coleus amboinicus* (Lour.) Leaves. *Res J Pharm Technol*. 2022;15(1):357-364.
15. Eltivitasari A, Rahmawati, Gemantari BM, Romadhonsyah F, Nurrochmad A, Wahyuono S, et al. Effect of light exposure on secondary metabolites production of an endophytic fungus *Arthrrium rasikravindrae* and its antioxidant and anticancer activities. *Biodiversitas*. 2021;22(6):3156-3163.
16. Rahmawati, Eltivitasari A, Romadhonsyah F, Gemantari BM, Nurrochmad A, Wahyuono S, et al. Effect of Light Exposure on Secondary Metabolite Production and Bioactivities of *Syncephalastrum racemosum* Endophyte. *Trop J Nat Prod Res*. 2021;5(2):312-318.
17. Astuti P, Sudarsono S, Nisak K, Nugroho GW. Endophytic Fungi Isolated from *Coleus amboinicus* Lour Exhibited Antimicrobial Activity. *Adv Pharm Bull*. 2014;4 (Suppl 2):599–605.
18. Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016;6(2):71–79.
19. Gemantari BM, Romadhonsyah F, Nurrochmad A, Wahyuono S, Astuti P. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etil Asetat Fungi Endofit *Eutypa linearis*. *Majalah Farmasetik*. 2021;18(3):241-246.
20. Sukmawati IK, Rakhmawati D, Yuniarto A. Antifungal Activity of Extract and Fraction of *Auricularia auricular* on *Candida albicans*, *Microsporum gypseum*, and *Aspergillus flavus*. *Asian J Pharm Clin Res*. 2018;11(13):141-145.
21. Valle DL, Puzon JJM, Cabrera EC, Rivera WL. Thin Layer Chromatography-Bioautography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Antimicrobial Leaf Extracts from Philippine Piper betle L. against Multidrug-Resistant Bacteria. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016;2016:1–7.
22. Mohan B, Ramalingam S, Saravanan R, Dheeba. In Vitro antioxidant and anti-proliferative activity of *Plectranthus amboinicus* leaves extract on MCF-7 cell line. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*. 2016;8(12):1–9.
23. Gejalakshmi S, Senthilraj R, Tanisha BA, Sruthi S, Tharun Kumar M, Pooja G. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of *Azadirachta indica* and *Plectranthus amboinicus* extract. *Int J Curr Pharm Res*. 2020;12(1):14–17.
24. Swamy MK, Arumugam G, Kaur R,

- Ghasemzadeh A, Yusoff MM, Sinniah UR. GC-MS Based Metabolite Profiling, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Different Solvent Extracts of Malaysian *Plectranthus amboinicus* Leaves. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017;2017:1-10.
25. Mahizan NA, Yang S-K, Moo C-L, Song AA-L, Chong C-M, Chong C-W, et al. Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens. *Molecules*. 2019;24(14):1-21.
26. Zengin H, Baysal AH. Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oil Terpenes against Pathogenic and Spoilage-Forming Bacteria and Cell Structure-Activity Relationships Evaluated by SEM Microscopy. *Molecules*. 2014;19(11):17773–17798.
27. Swamy MK, Arumugam G, Kaur R, Ghasemzadeh A, Yusoff MM, Sinniah UR. GC-MS Based Metabolite Profiling, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Different Solvent Extracts of Malaysian *Plectranthus amboinicus* Leaves. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017;2017:1-10.