

Penapisan Fitokimia dan Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia*) (Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of *Citrus aurantifolia* Leaves Ethanolic Extract

SAFIRA NAFISA*, GREESTY FINOTORY SWANDINY, ERLINDHA GANGGA,
YULIANITA ARIEFYANTY ZAENUDIN

Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta Selatan, 12640, Indonesia

Diterima 2021, Disetujui 2021

Abstrak: Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) merupakan salah satu tanaman obat tradisional yang digunakan secara luas untuk berbagai penyakit termasuk infeksi. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas ekstrak etanol 70% dan 96% daun *Citrus aurantifolia* terhadap mikroba penyebab infeksi pada manusia, antara lain *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans* secara in vitro. Penapisan fitokimia dilakukan untuk memprediksi metabolit sekunder yang berperan dalam aktivitas antimikroba daun *Citrus aurantifolia*. Aktivitas antimikroba ditentukan menggunakan metode difusi agar dengan kertas cakram dan metode difusi sumuran. Penapisan fitokimia menunjukkan bahwa baik serbuk simplisia, ekstrak etanol 70%, dan ekstrak etanol 96% dari daun *Citrus aurantifolia* mengandung metabolit sekunder flavonoid, kumarin, saponin, tanin, steroid/triterpenoid, dan minyak atsiri. Ekstrak etanol 70% dan 96% daun *Citrus aurantifolia* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, dan *Escherichia coli*. Dengan demikian dapat disimpulkan ekstrak etanol daun *Citrus aurantifolia* berpotensi dikembangkan sebagai produk antibakteri.

Kata kunci: *Citrus aurantifolia*, ekstrak etanol, aktivitas antimikroba.

Abstract: *Citrus aurantifolia* S. is a traditional medicinal plant that is widely used for various diseases including infections. This study aims to test the in vitro antimicrobial activity of 70% and 96% ethanolic extract of *Citrus aurantifolia* leaves to microbes that cause infection in humans, including *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans*. Phytochemical screening was carried out to predict secondary metabolites that play a role in the antimicrobial activity of *Citrus aurantifolia* leaves. The antimicrobial activity was determined using agar diffusion method with disc paper and well diffusion method. Phytochemical screening showed that simplicia powder, 70% ethanol extract, and 96% ethanol extract from *Citrus aurantifolia* leaves contained flavonoids, coumarin, saponins, tannins, steroids / triterpenoids, and essential oils. This study showed that 70% and 96% ethanol extract of *Citrus aurantifolia* leaves can inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, and *Escherichia coli* bacteria. It can be concluded that the ethanol extract of *Citrus aurantifolia* leaves is potential to be developed as an antibacterial product.

Keywords: *Citrus aurantifolia*, ethanolic extract, antimicrobial activity.

*Penulis korespondensi
Email: safira.nafisa@univpancasila.ac.id

PENDAHULUAN

JERUK nipis (*Citrus aurantifolia* S.) merupakan tanaman yang dimanfaatkan baik untuk bumbu masakan maupun sebagai obat tradisional⁽¹⁾. Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa berbagai bagian tanaman *Citrus aurantifolia* (daun, batang, akar, kulit kayu) dapat digunakan sebagai antipiretik, antiradang, antibakteri, antijamur, antidiabetik, antioksidan, antihipertensi, antilipidemik, atau penyakit kardiovaskular⁽²⁻⁸⁾. Jeruk nipis juga digunakan dalam industri makanan, obat-obatan, dan kosmetik karena khasiat dan aromanya. Obat-obatan herbal, termasuk yang berasal dari daun *Citrus aurantifolia*, telah digunakan secara luas karena efek sampingnya yang rendah. Obat herbal dan tradisional relatif murah, mengandung senyawa aktif biologis yang tinggi, dan dapat mencegah resistensi bakteri⁽⁹⁾. Penggunaan tradisional dan farmakologis tanaman *Citrus aurantifolia* L. dikaitkan dengan adanya kandungan metabolit sekunder^(10,11).

Prevalensi infeksi pada manusia merupakan masalah utama dan telah meningkat secara signifikan di seluruh dunia. Infeksi sering terjadi di daerah tropis seperti Indonesia karena keadaan udara yang kotor serta temperatur yang hangat dan lembab sehingga mikroba dapat tumbuh subur. Bagi negara berkembang timbulnya strain mikroba yang resisten terhadap antibiotik pada penyakit infeksi merupakan masalah penting. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas ekstrak etanol 70% dan 96% daun *Citrus aurantifolia* secara tradisional terhadap mikroba penyebab infeksi pada manusia, antara lain *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans* secara in vitro. Penapisan fitokimia dilakukan untuk memprediksi metabolit sekunder yang berperan dalam aktivitas antimikroba daun *Citrus aurantifolia*.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) Etanol 70% dan 96%, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 12228, Media Nutrient Agar (NA), Media Nutrient Broth (NB), *Potato Dextrose Broth* (PDB), *Potato Dextrose Agar* (PDA), paper disk, dimetilsulfoksida (DMSO), kloramfenikol, dan nistatin.

METODE. Pembuatan Ekstrak. Daun *Citrus aurantifolia* yang digunakan dideterminasi oleh Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Daun *Citrus aurantifolia* dibersihkan, dirajang, dan dikeringkan dengan oven pada suhu 40-50 °C selama 48-72 jam. Daun kering kemudian dihaluskan menggunakan grinder dan dilewatkan ayakan no 4 dan 18. Serbuk simplisia kemudian diekstraksi dengan cara ekstraksi dingin yaitu maserasi kinetik menggunakan pelarut etanol 70% dan 96%. Ekstrak yang didapat disaring, dikumpulkan, lalu dikentalkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 45 °C sehingga diperoleh ekstrak kental.

Penapisan Fitokimia. Uji pendahuluan dan konfirmasi senyawa metabolit sekunder pada ekstrak etanol 70% dan 96% daun *Citrus aurantifolia* meliputi identifikasi flavonoid, kumarin, alkaloid, saponin, tanin, kuinon, steroid / triterpenoid, dan minyak atsiri^(12,13). Flavonoid dideteksi dengan uji reduksi (Mg-HCl / amilalkohol), kumarin dengan uji fluoresensi, alkaloid dengan uji Dragendorff dan uji Mayer, saponin dengan uji busa, tanin dengan gelatin dan besi (III) klorida, kuinon dengan pereaksi NaOH, steroid/triterpenoid dengan uji Liebermann-Burchard, serta minyak atsiri dengan uji bau.

Pembiakkan Kultur Bakteri. Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan mengambil sejumlah bakteri dari biakan persediaan dengan jarum ose kemudian ditanam dalam tabung berisi 5 mL kaldu pepton steril untuk *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, dan *Escherichia coli*, serta *Potato Dextrose Broth* (PDB) untuk *Candida albicans*. Biakan bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam sedangkan fungi pada suhu 20-25°C selama 3-5 hari. Kekeruhan yang terbentuk diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 580 nm untuk bakteri dan 530 nm untuk fungi, kemudian diatur hingga inokula mempunyai transmittan 25% terhadap blanko (10^8 CFU/mL)⁽¹⁴⁾.

Aktivitas Antibakteri. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% dan 96% daun *Citrus aurantifolia* dievaluasi terhadap bakteri patogen Gram positif dan negatif. Aktivitas antibakteri ditentukan menggunakan metode difusi agar dengan kertas cakram dan metode difusi sumuran menggunakan media nutrient agar. Pada metode difusi agar, cakram steril (diameter 6 mm) diresapi ekstrak dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, dan 12,5%, kemudian ditempatkan pada permukaan media nutrient agar yang mengandung mikroba uji. Pada metode difusi sumuran, dibuat lubang (sumur) pada media nutrient agar yang mengandung mikroba uji dengan diameter 6 mm, kemudian dimasukkan ekstrak dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, dan 12,5% pada sumur tersebut. Kloramfenikol (30 µg/mL) digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan DMSO 20% digunakan sebagai kontrol negatif. Cawan kemudian diinkubasi pada suhu 37 ± 2 °C

selama 24 jam. Hasil berupa Diameter Daerah Hambat (DDH) dimana daerah bening di sekitar kertas cakram atau sumur menunjukkan adanya zona hambat yang dibentuk mikroba uji^(6,15).

Aktivitas Antifungi. Aktivitas antifungi ekstrak etanol 70% dan 96% daun *Citrus aurantifolia* ditentukan menggunakan metode difusi agar dengan kertas cakram dan metode difusi sumuran menggunakan media *potassium dextrose agar* (PDA). Pada metode difusi agar, cakram steril (diameter 6 mm) diresapi ekstrak dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, dan 12,5%, kemudian ditempatkan pada permukaan media PDA yang mengandung mikroba uji. Pada metode difusi sumuran, dibuat lubang (sumur) pada media PDA yang mengandung mikroba uji dengan diameter 6 mm, kemudian dimasukkan ekstrak dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, dan 12,5% pada sumur tersebut. Nistatin (50 µg/mL) digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan DMSO 20% digunakan sebagai kontrol negatif. Cawan kemudian diinkubasi pada suhu 20-25 °C selama 3-5 hari. Hasil berupa Diameter Daerah Hambat (DDH) dimana daerah bening di sekitar kertas cakram atau sumur menunjukkan adanya zona hambat yang dibentuk mikroba uji⁽⁶⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan Organoleptik. Kandungan fitokimia seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, minyak atsiri dan beberapa senyawa aromatik merupakan metabolit sekunder pada tumbuhan yang bertanggung jawab dan berfungsi sebagai mekanisme pertahanan terhadap banyak mikroorganisme dan serangga. Bagian tumbuhan yang mengandung metabolit tersebut merupakan kandidat potensial untuk pengembangan agen antimikroba dari produk herbal. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa

Tabel 1. Hasil Penapisan Fitokimia Daun *Citrus aurantifolia*.

| Penapisan fitokimia | Serbuk | Ekstrak 96% | Ekstrak 70% |
|---------------------|--------|-------------|-------------|
| Alkaloid | - | - | - |
| Flavonoid | + | + | + |
| Saponin | + | + | + |
| Tanin : | + | + | + |
| Kuinon | - | - | - |
| Steroid | + | + | + |
| Triterpenoid | + | + | + |
| Minyak atsiri | + | + | + |
| Kumarin | + | + | + |

Keterangan: (+) mengandung golongan senyawa
(-) tidak mengandung golongan senyawa

baik dalam serbuk simplisia maupun ekstrak, daun *Citrus aurantifolia* memiliki kandungan golongan senyawa metabolit sekunder yang sama. Hasil ini menunjukkan bahwa proses ekstraksi yang dilakukan efektif sehingga senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk tersari sempurna. Penapisan fitokimia menunjukkan bahwa serbuk simplisia, ekstrak etanol 70%, dan ekstrak etanol 96% dari daun *Citrus aurantifolia* mengandung metabolit sekunder flavonoid, kumarin, saponin, tanin, steroid / triterpenoid, dan minyak atsiri (Tabel 1).

Sifat lipofilik dari minyak atsiri berperan penting dalam aktivitasnya sebagai antimikroba dengan cara berinteraksi dan mengubah permeabilitas membran sel mikroorganisme sehingga menyebabkan kematian. Pada penelitian lain diketahui bahwa daun *Citrus aurantifolia* mengandung d-limonene sebagai konstituen kimia utama yang berkontribusi pada aroma dan aksinya sebagai antibakteri^(10,16). Tanin bekerja dengan mengikat protein kaya prolin dan mengganggu sintesis protein⁽¹⁷⁾. Flavonoid yang merupakan zat fenolik terhidroksilasi diketahui disintesis oleh tanaman sebagai respon terhadap infeksi mikroba⁽¹⁸⁾. Kumarin juga dikenal mampu melawan bakteri Gram positif dan umum diproduksi dalam wortel sebagai respons terhadap infeksi jamur⁽¹⁷⁾. Saponin dapat menyebabkan kebocoran protein dan enzim tertentu dari sel. Saponin dapat menjadi antibakteri karena zat aktif permukaannya mirip detergen, sehingga saponin akan menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri dan merusak permeabilitas membran⁽¹⁹⁾. Beberapa penelitian menunjukkan steroid memiliki sifat antibakteri dengan menyebabkan kebocoran liposom⁽²⁰⁾.

Aktivitas antimikroba dari ekstrak daun *Citrus aurantifolia* diuji pada empat mikroba patogen diantaranya *Salmonella typhi* yang dapat menginfeksi intestinal dan darah serta menyebabkan demam tifoid; *Staphylococcus aureus* yang menyebabkan endocarditis dan septiceimia; *Escherichia coli* yang menyebabkan penyakit gastroenteritis dan diare; serta *Candida albicans* yang menyebabkan infeksi genital atau oral⁽¹⁷⁾. Dari 4 mikroba uji, 3 spesies menunjukkan aktivitas antimikroba dengan membentuk zona inhibisi baik pada metode difusi agar dengan cakram maupun pada difusi sumuran (Tabel 2).

Zona hambat yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% dan 96% daun *Citrus aurantifolia* memiliki aktivitas antibakteri secara in vitro terhadap bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*) dan bakteri Gram negatif (*Salmonella typhi* dan *Escherichia coli*), namun tidak dapat menghambat pertumbuhan khamir *Candida albicans*. Hal ini sejalan dengan penelitian lain yang menunjukkan ekstrak

Tabel 2. Hasil diameter daerah hambat pada uji aktivitas antimikroba ekstrak daun *Citrus aurantifolia*.

| Mikroba uji | Ekstrak etanol | Metode difusi | Diameter daerah hambat (mm) | | | | |
|------------------------------|----------------|---------------|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | | 100% | 50% | 25% | 12,5% | K(+) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 70% | Cakram | 8,48 ± 0,23 | 0 | 0 | 0 | 35,72 ± 0,15 |
| | | Sumuran | 24,40 ± 0,88 | 18,81 ± 0,62 | 14,85 ± 0,31 | 7,42 ± 0,34 | 39,52 ± 0,23 |
| | 96% | Cakram | 9,52 ± 0,21 | 7,18 ± 0,11 | 0 | 0 | 35,44 ± 0,42 |
| | | Sumuran | 25,41 ± 0,22 | 17,87 ± 0,76 | 11,11 ± 0,21 | 0 | 37,73 ± 0,71 |
| <i>Salmonella typhi</i> | 70% | Cakram | 8,93 ± 0,47 | 7,41 ± 0,11 | 0 | 0 | 25,71 ± 0,20 |
| | | Sumuran | 26,61 ± 0,64 | 23,72 ± 0,62 | 16,55 ± 0,15 | 0 | 35,15 ± 0,29 |
| | 96% | Cakram | 8,85 ± 0,42 | 7,32 ± 0,17 | 0 | 0 | 25,33 ± 0,24 |
| | | Sumuran | 20,45 ± 0,19 | 18,32 ± 0,14 | 13,36 ± 0,31 | 0 | 35,44 ± 0,30 |
| <i>Escherichia coli</i> | 70% | Cakram | 9,85 ± 0,66 | 0 | 0 | 0 | 30,63 ± 0,02 |
| | | Sumuran | 22,38 ± 0,12 | 19,68 ± 0,45 | 17,93 ± 0,57 | 0 | 35,90 ± 2,86 |
| | 96% | Cakram | 11,03 ± 0,67 | 8,01 ± 0,40 | 0 | 0 | 30,96 ± 0,42 |
| | | Sumuran | 26,93 ± 0,29 | 22,37 ± 1,70 | 18,91 ± 0,72 | 14,85 ± 1,42 | 35,83 ± 3,45 |
| <i>Candida albicans</i> | 70% | Cakram | 0 | 0 | 0 | 0 | 19,31 ± 1,71 |
| | | Sumuran | 0 | 0 | 0 | 0 | 30,07 ± 1,17 |
| | 96% | Cakram | 0 | 0 | 0 | 0 | 19,58 ± 0,24 |
| | | Sumuran | 0 | 0 | 0 | 0 | 30,11 ± 1,61 |

daun *Citrus aurantifolia* memiliki aktivitas antibakteri yang baik pada *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, dan *Escherichia coli*^(6,21). Hasil penelitian menunjukkan bahwa zona hambat pada kontrol negatif DMSO 20% yang merupakan pelarut fraksi uji tidak terbentuk. Hal ini menggambarkan bahwa DMSO 20% tidak mempengaruhi hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap sampel uji.

Menurut David dan Stout, kriteria kekuatan antibakteri dapat digolongkan menjadi beberapa golongan yaitu antibakteri yang tergolong lemah (zona hambat <5 mm), sedang (zona hambat antara 5-10 mm), kuat (zona hambat antara 10-20 mm), dan tergolong sangat kuat (zona hambat >20mm)⁽²²⁾. Hasil uji aktivitas antimikroba *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, dan *Escherichia coli* menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% dan 96% daun *Citrus aurantifolia* dengan konsentrasi 100% menggunakan metode sumuran seluruhnya menghasilkan zona inhibisi lebih dari 20 mm sehingga dapat dikatakan ekstrak merupakan antibakteri yang sangat kuat. Pada metode difusi cakram, zona inhibisi yang terbentuk cenderung memiliki nilai yang lebih rendah. Selain ekstrak 96% pada bakteri *Escherichia coli* yang tergolong pada kategori kuat, seluruh zona hambat yang terbentuk oleh ekstrak konsentrasi 100% dengan metode cakram memberikan inhibisi pada kategori sedang.

Setiap strain bakteri memiliki derajat kepekaan yang berbeda terhadap ekstrak daun *Citrus*

aurantifolia. Di antara tiga spesies bakteri, ekstrak etanol 96% menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi pada *Escherichia coli*. Sebagian besar ekstrak etanol 96% memiliki nilai zona inhibisi yang sedikit lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol 70%⁽²³⁾. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan senyawa yang berperan sebagai antibakteri lebih banyak terekstraksi menggunakan etanol 96% yang memiliki polaritas lebih rendah dibandingkan etanol 70%. Dengan demikian dapat dikatakan daun *Citrus aurantifolia* memiliki sifat antibakteri pada sebagian besar mikroba uji.

SIMPULAN

Penapisan fitokimia menunjukkan bahwa baik serbuk simplisia, ekstrak etanol 70%, dan ekstrak etanol 96% dari daun *Citrus aurantifolia* mengandung metabolit sekunder flavonoid, kumarin, saponin, tanin, steroid/triterpenoid, dan minyak atsiri. Ekstrak etanol 70% dan 96% daun *Citrus aurantifolia* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, dan *Escherichia coli* namun tidak dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih pada Universitas Pancasila yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Şeker Karatoprak G, Yücel Aşık Ç, Çakır A, Köngül Şafak E. In vitro pharmacological screening of antioxidant, cytotoxic and enzyme inhibitory activities of *Citrus aurantifolia* Linn. Dried fruit extract. Int J Environ Health Res. 2020;
2. Balogun SO, Da Silva IF, Colodel EM, De Oliveira RG, Ascêncio SD, De Oliveira Martins DT. Toxicological evaluation of hydroethanolic extract of *Helicteres sacarolha* A. St.- Hil. et al. J Ethnopharmacol. 2014;157:285–91.
3. Ibrahim FA, Usman LA, Akolade JO, Idowu OA, Abdulazeez AT, Amuzat AO. Antidiabetic Potentials of *Citrus aurantifolia* Leaf Essential Oil. Drug Res (Stuttg). 2019;69(4):201–6.
4. Josephine OEO, Ngozi CG. Comparative effects of peel extract from Nigerian grown citrus on body weight, liver weight and serum lipids in rats fed a high-fat diet. African J Biochem Res. 2015;9(9):110–6.
5. Loizzo MR, Tundis R, Bonesi M, Menichini F, De Luca D, Colica C, et al. Evaluation of *Citrus aurantifolia* peel and leaves extracts for their chemical composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities. J Sci Food Agric. 2012;92(15):2960–7.
6. Pathan R khan, Gali PR, Pathan P, Gowtham T, Pasupuleti S. In vitro Antimicrobial Activity of *Citrus aurantifolia* and its Phytochemical screening. Asian Pacific J Trop Dis. 2012;2(SUPPL.1).
7. Roko OG, Dougnon V, Hounkpatin A, Klotóé JR, Baba-Moussa L. Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Properties of Ethanolic Extracts of Three Plants of Beninese's Pharmacopoeia: *Euphorbia hirta*, *Citrus aurantifolia* and *Heterotis rotundifolia*. Asian J Biol. 2020;1–8.
8. Sunday Enejoh O, Oladejo Ogunyemi I, Smart Bala M, Sotonye Oruene I, Musa Suleiman M, Folorunsho Ambali S. Ethnomedical Importance of *Citrus Aurantifolia* (Christm) Swingle. Pharma Innov J. 2015;4(8):1–6.
9. Ali S, Bansal S, Mishra RP. *Fumaria indica* (L), a famous medicinal herb of tribal regions of Jabalpur, Madhya Pradesh: Broad spectrum antibacterial and phytochemical profiling against some pathogenic microorganisms. Pharmacogn J. 2020;12(3):619–23.
10. Al-Aamri MS, Al-Abousi NM, Al-Jabri SS, Alam T, Khan SA. Chemical composition and in-vitro antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil of *Citrus aurantifolia* L. leaves grown in Eastern Oman. J Taibah Univ Med Sci. 2018;13(2):108–12.
11. Sandoval-Montemayor NE, García A, Elizondo-Treviño E, Garza-González E, Alvarez L, Del Rayo Camacho-Corona M. Chemical composition of hexane extract of *Citrus aurantifolia* and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of some of its constituents. Molecules. 2012;17(9):11173–84.
12. Farida Y, Azela W, Lestari ME, Pratami DK. The quality parameters, total flavonoids determination and antioxidant activity compound of andaliman fruit andaliman fruit (*Zanthoxylum acanthopodium* dc.) extract. Int J Appl Pharm. 2021;13(special issue 2):34–40.
13. Farnsworth NR. Biological and phytochemical screening of plants. J Pharm Sci. 1966;55(3):225–76.
14. Salni S, Marisa H, Mukti R. Isolasi Senyawa Antibakteri Dari Daun Jengkol (*Pithecolobium lobatum* Benth) dan Penentuan Nilai KHM-nya. J Penelit Sains. 2011;14(1):168193.
15. Sinaga NI, Hanafi M, Yantih N. Identification of chemical compounds and antibacterial activity of 96% ethanol extract from *moringa oleifera* lam. Leaves against mrsa (methicillin resistant staphylococcus aureus). Int J Appl Pharm. 2021;13(Special Issue 2):111–4.
16. Raut JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. Vol. 62, Industrial Crops and Products. 2014. p. 250–64.
17. Mohamed Sham Shihabudeen H, Hansi Priscilla D, Thirumurugan K. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of selected Indian folk medicinal plants. Int J Pharma Sci Res. 2010;1(10):430–4.
18. Xie Y, Yang W, Tang F, Chen X, Ren L. Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. Curr Med Chem. 2014;22(1):132–49.
19. Khan MI, Ahhmed A, Shin JH, Baek JS, Kim MY, Kim JD. Green Tea Seed Isolated Saponins Exerts Antibacterial Effects against Various Strains of Gram Positive and Gram Negative Bacteria, a Comprehensive Study in Vitro and in Vivo. Evidence-based Complement Altern Med. 2018;2018.
20. Epand RF, Savage PB, Epand RM. Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). Biochim Biophys Acta - Biomembr. 2007;1768(10):2500–9.
21. Akinnibosun F, Edionwe O. Evaluation of the Phytochemical and Antimicrobial potential of the Leaf Extracts of *Bryophyllum pinnatum* L. and *Citrus aurantifolia* Sw. and their Synergy. J Appl Sci Environ Manag. 2016;19(4):611.
22. David, Stout. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Essay. J Microbiol. 1971;22(4).
23. Wendakoon C, Calderon P, Gagnon D. Evaluation of Selected Medicinal Plants Extracted in Different Ethanol Concentrations for Antibacterial Activity against Human Pathogens. J Med Act Plants. 2012;1(2):60–8.