

PERBANDINGAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI DAUN, TANGKAI BUNGA DAN BUNGA CENGKEH BALI (*Syzygium aromaticum* L.) TERHADAP BAKTERI *Propionibacterium acne* DENGAN METODE DIFUSI DISK

I.P.S.T. Lova, W. A. Wijaya, N.L.P.V. Paramita*, dan A. A. R. Y. Putra

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

**E-mail: vidya_paramita@unud.ac.id*

ABSTRAK

Propionibacterium acnes adalah bakteri anaerob gram positif yang merupakan bakteri paling dominan pada lesi jerawat. Minyak atsiri telah dibuktikan memiliki aktivitas antibakteri gram positif maupun bakteri gram negatif. Selain bunga cengkeh, minyak atsiri juga dapat diperoleh dari bagian tangkai bunga dan daun dari tanaman cengkeh. Oleh karena pemanfaatan bunga cengkeh masih terhitung mahal, maka pada penelitian ini peneliti ingin melihat potensi aktivitas antibakteri minyak atsiri dari tangkai bunga dan daun cengkeh. Tujuan penelitian ini adalah untuk membandingkan aktivitas antibakteri minyak atsiri dari bagian bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh terhadap bakteri *P.acnes*. Minyak atsiri dari bunga, tangkai bunga dan daun diperoleh dengan menggunakan metode destilasi air. Konsentrasi larutan uji yang digunakan 200 µl/mL dengan metode uji difusi disk, kontrol negatif etanol 96% v/v, kontrol positif doksisisiklin 30µg/disk, media uji MHA, dan suspensi bakteri *P. acnes* sebesar 0,5 McFarland. Aktivitas antibakteri ditentukan berdasarkan diameter zona hambat yaitu daerah bening diantara latar keruh setelah diinkubasi selama 24 jam. Analisis data dilakukan dengan menggunakan analisis deksriptif untuk melihat klasifikasi respon hambatan berdasarkan NCCLS dan analisis statistik menggunakan ANOVA *one way*. Aktivitas antibakteri minyak atsiri bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh terhadap bakteri *P. acnes* berbeda signifikan secara statistik dengan taraf kepercayaan >95%. Minyak atsiri bunga cengkeh menghasilkan aktivitas antibakteri terbesar yaitu 25,85 mm - 26,75 mm sedangkan minyak atsiri tangkai bunga menghasilkan aktivitas dengan zona hambat 20,60 mm - 21,20 mm dan minyak atsiri daun cengkeh menghasilkan zona hambat sebesar 18,04 mm - 18,58 mm. Hal ini membuktikan bahwa minyak atsiri dari bunga cengkeh memiliki aktivitas yang paling baik terhadap *P.acnes* dibandingkan dengan minyak atsiri dari tangkai bunga dan daun cengkeh. Dengan demikian, minyak atsiri dari tangkai bunga dan daun cengkeh belum sebanding dengan yang berasal dari bunga cengkeh apabila dimanfaatkan sebagai anti bakteri *P. Acnes*.

Kata kunci: antibakteri, cengkeh, difusi disk, minyak atsiri, *Propionibacterium acnes*, *Syzygium aromaticum* L

ABSTRACT

Propionibacterium acnes is a gram-positive anaerobic bacterium that is the most dominant bacteria in acne lesions. Essential oil has been shown to have both gram-positive and gram-negative antibacterial activities. Besides from the flowers of clove, the essential oils can also be obtained from the flower and leaf stalks of the clove plants. Because of that the utilization of clove flowers is still expensive, so that in this study the researchers would like to find out the antibacterial activity potency of the essential oils from the flower stalks and leaves of the clove. The purpose of this study was to compare the antibacterial activity of the essential oils extracted from three parts of the clove plant, namely the flowers, flower stalks and clove leaves. to *P.acnes* bacteria. The essential oils of flowers, flower stalks and leaves were obtained by water distillation technique. The concentration of the test solution used was 200 µl/mL with disk diffusion test method, the negative control was ethanol of 96% v/v, positive control was doxycycline of 30 µg/disk, MHA test media and bacterial suspension was of 0.5 McFarland. Antibacterial activity is determined by the diameter of the inhibit zone (clear zone between cloudy setting) 24 hour after incubation. The data were analyzed using descriptive analysis to see the inhibitory response classification based on NCCLS and statistical analysis using one way ANOVA. The antibacterial activity of essential oils from flowers, flower stalks and leaves of cloves to *P. acnes* bacteria differed statistically with the level of confidence > 95%. The essential oils in clove flower showed the largest antibacterial activity which was about 25.85 mm – 26.75 mm, while in the flower stalks and clove leaves showed an activity with inhibition zone of 20.60 mm – 21.20 mm and 18.04 mm – 18.58 mm, respectively. This was an evident that the oil of clove flower had better activity against *P.acnes* compared to the

essential oil from flower stalks and leaves of clove. Therefore, the essential oil of the flower stalks and the leaves of clove are not comparable if it is used as the anti bacterial of *P. Acnes* bacterium.

Keywords: antibacterial, diffusion disk, essential oil, *Propionibacterium acnes*, *Syzygium aromaticum* L

PENDAHULUAN

Minyak atsiri merupakan senyawa yang berwujud cairan, yang diperoleh dari bagian tanaman, kulit, akar, daun, batang, biji, buah maupun dari bunga dengan cara penyulingan. Disamping itu juga, untuk mendapatkan minyak atsiri dapat dilakukan dengan menggunakan cara lain seperti ekstraksi menggunakan pelarut organik atau dengan cara dipres (Sastrohamidjojo, 2004). Aktivitas antibakteri minyak atsiri disebabkan karena minyak atsiri mengandung senyawa yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri (Kan, et al., 2006).

Propionibacterium acnes adalah bakteri anaerob Gram positif yang merupakan bakteri paling dominan pada lesi jerawat (Sylvia, 2010). *P. acnes* berperan dalam patogenesis *acne* dengan cara memecah komponen sebum yaitu trigliserida menjadi asam lemak bebas yang merupakan mediator pemicu terjadinya inflamasi (Vijayalakshmi et al., 2011).

Tanaman cengkeh dapat menghasilkan minyak atsiri. Minyak cengkeh dapat diperoleh dari bunga cengkeh (*Clove Bud Oil*), tangkai atau gagang bunga cengkeh (*Clove Stalks Oil*) dan dari daun cengkeh (*Clove Leaf Oil*). Sebagai sumber eugenol, minyak cengkeh dari bunga masih terhitung mahal, sementara pemanfaatan bagian cengkeh yang lainnya seperti daun dan tangkai bunga sampai saat ini masih jarang dimanfaatkan, dengan hal ini peneliti ingin membandingkan aktivitas minyak atsiri bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh sebagai anti jerawat terhadap bakteri *P.acnes*. Penelitian Luangnarumitchai S et al., (2007) menyatakan bahwa aktivitas minyak atsiri cengkeh terhadap bakteri *P.acnes* dengan metode difusi didapatkan hasil bahwa diameter hambat minyak astiri cengkeh sebesar 25,3 mm. Namun belum ada penelitian yang membandingkan aktivitas antibakteri terhadap *P.acnes* secara khusus dari bagian tanaman cengkeh yaitu bunga, tangkai dan daun yang memiliki komponen minyak atsiri.

Pada penelitian ini digunakan metode difusi *disk*. Pada metode difusi *disk*, minyak atsiri daun, tangkai bunga dan bunga cengkeh bali akan bekerja dengan berdifusi dari kertas cakram ke media agar yang telah ditumbuhi oleh bakteri *P. acnes*. Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas sebagai antibakteri apabila terbentuk zona bening (zona hambat) disekitar kertas cakram (Wanger, 2009). Diameter zona hambat selanjutnya dikatagorikan dalam katagori *susceptible*, *intermediate*, dan *resistant*. Suatu senyawa memiliki aktivitas antibakteri dalam kategori *susceptible* apabila memiliki daya hambat ≥ 21 mm pada pengujian menggunakan metode difusi *disk* (Coyle, 2005).

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini yaitu minyak atsiri daun, tangkai dan bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.), media Mueller Hinton Broth (MHB) (Oxoid®), Agar (Conda), alkohol 70% teknis (Brataco), Doksisisklin disk (Oxoid®), bakteri *P. acnes*, etanol p.a, standar Mc. Farland, akuades (Brataco), NaCl dan natrium sulfat anhidrat.

Peralatan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu seperangkat alat destilasi modifikasi, autoklaf (All American Model 1925X), Laminar air flow (Esco), inkubator (Memmert).

Cara Kerja

Determinasi Tanaman

Determinasi dan identifikasi tanaman bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel utuh cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) yang digunakan dalam penelitian. Hal ini berkaitan dengan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman cengkeh terhadap kepustakaan dan dibuktikan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), UPT

Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya “Eka Karya” Bali.

Pengambilan dan Preparasi Sampel

Sampel kering daun, tangkai bunga dan bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dikumpulkan dari daerah penghasil cengkeh yang tumbuh di Bali. Sampel segar disortir dan dikeringkan kemudian dirajang dengan ukuran yang kecil.

Penetapan Kadar Air dengan Metode Destilasi Toulana

Sampel kering bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) ditimbang masing-masing sebanyak 5 gram, dimasukkan ke dalam labu kering. Dimasukkan lebih kurang 200 mL toluen jenuh air ke dalam labu, pasang rangkaian alat. Dimasukkan toluen jenuh air ke dalam tabung penerima melalui pendingin sampai leher alat penampung. Labu dipanaskan hati-hati selama 15 menit dengan suhu 105°C. Setelah toluen mulai mendidih, atur penyulingan dengan kecepatan lebih kurang dari 2 tetes tiap detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian naikkan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima didinginkan sampai suhu ruang. Volume air dibaca setelah air dan toluen memisah sempurna. Percobaan yang sama diulang sebanyak dua kali. Kadar air dihitung dalam % v/b (Zainab, 2016; Isnawati, 2013).

Destilasi Minyak Atsiri Daun, Tangkai dan Bunga cengkeh

Sejumlah kurang lebih 2 kg daun, tangkai bunga dan bunga cengkeh yang masih segar dibersihkan dari kotoran dengan air mengalir, kemudian dikeringkan dan dirajang dengan ukuran kecil. Metode destilasi air dengan modifikasi yang digunakan dalam penelitian ini, disadur dari penelitian Parwata dkk (2009). Bunga cengkeh, tangkai cengkeh dan daun cengkeh yang telah dirajang dimasukan ke dalam labu yang telah berisi air dengan volume air sebanyak 4 liter (hingga sampel terendam seluruhnya), kemudian dipanaskan dengan suhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$. Air dialirkan ke kondensor dan dijaga agar air terus mengalir. Destilat diperoleh merupakan campuran minyak dengan air yang selanjutnya dipisahkan dalam

corong pisah. Destilat yang diperoleh ditambahkan serbuk natrium klorida kemudian diekstraksi cair-cair untuk memisahkan minyak dengan air. Fase minyak yang diperoleh kemungkinan masih bercampur dengan sedikit air, kemudian ditambahkan serbuk natrium sulfat anhidrat dan didekantasi. Minyak atsiri yang diperoleh disimpan pada suhu 4°C (dalam freezer) (Saxena *et al*, 2014).

Uji Aktivitas Antibakteri

Suspensi bakteri dipipet sebanyak 50 μL kemudian diteteskan pada media Mueller Hinton Agar (MHA). Media agar harus memiliki pH antara 7,2 dan 7,4 pada suhu kamar yang diukur menggunakan pH meter. Suspensi bakteri disebar dengan menggunakan bantuan spreader 42 yaitu hoky stick. Kertas cakram (paper disk) dibuat menggunakan kertas saring whatman no.1 berdiameter 6 mm. Konsentrasi larutan uji yang digunakan merupakan konsentrasi minyak atsiri bunga cengkeh yang menghasilkan daya hambat paling optimal terhadap bakteri *P. acnes*. Larutan uji dengan konsentrasi 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ diteteskan sebanyak 15 μL pada kertas cakram, begitu pula dengan kontrol negatif (etanol 96% v/v) diteteskan sebanyak 15 μL pada kertas cakram lainnya. Kertas cakram kemudian diangin-anginkan hingga seluruh etanol menguap (kertas cakram telah kering). Kertas cakram yang berisi larutan uji dan kontrol negatif serta kontrol positif doksisisiklin disk (30 $\mu\text{g}/\text{disk}$) kemudian ditempel diatas media yang berisi biakan bakteri dengan pinset steril. Biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan sebanyak 3 kali. Adanya aktivitas antibakteri dari sampel ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening disekitar kertas cakram pada media. Hasil 3 kali diameter zona hambat yang diperoleh kemudian dihitung nilai rata-ratanya.

Analisis Data

Data aktivitas minyak atsiri daun, tangkai dan bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) terhadap bakteri *P. acnes* berupa diameter zona hambat. Data penelitian ini dianalisis dengan analisis deskriptif dan analisis statistik menggunakan SPSS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Tanaman

Hasil determinasi menunjukkan bahwa sampel tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dari Famili Myrtaceae.

Penetapan Kadar Air dengan Destilasi Toulena

Berdasarkan hasil kadar air hasil destilasi menggunakan pelarut toluena pada bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh menghasilkan kadar air dibawah persyaratan normal kadar air simplisia yaitu dibawah 10% seperti dalam Tabel 1, karena jika melebihi 10% maka akan menjadi media yang baik untuk pertumbuhan jamur (Depkes RI, 1977).

Tabel 1 Hasil Penetapan Kadar Air Sampel Bunga, Tangkai Bunga dan Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) menggunakan Destilasi Toluena.

No.	Sampel	Kadar Air (Rata-Rata ± SD) (% v/b)
1	Bunga	4% v/b ± 0
2	Tangkai Bunga	3,4% v/b ± 0,89
3	Daun	4% v/b ± 0

Destilasi Minyak Atsiri Bunga, Tangkai Bunga dan Daun Cengkeh

Berdasarkan hasil destilasi tanaman cengkeh yang terdiri dari tiga bagian tanaman yaitu bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh, diperoleh persentase rendemen minyak atsiri seperti dalam Tabel 2. :

Tabel 2 Data Rendemen Minyak Atsiri Bunga, Tangkai Bunga dan daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dengan Metode Destilasi Air

No.	Sampel	Volume Rendemen	Presentase Rendemen
1	Bunga	3,1 mL	0,155% v/b
2	Tangkai Bunga	2,7 mL	0,135% v/b
3	Daun	2,5 mL	0,125% v/b

Dilihat dari Tabel 2 dapat diketahui bahwa jumlah rendemen minyak atsiri bunga cengkeh menunjukkan jumlah rendemen tertinggi dibandingkan rendemen minyak atsiri tangkai bunga dan daun cengkeh. Hasil rendemen yang diperoleh sesuai dengan pernyataan Nurdjannah (2004), yang menyebutkan bahwa kandungan minyak atsiri di dalam bunga cengkeh lebih banyak dibandingkan dengan bagian tangkai bunga dan daun.

Dilihat pada Tabel 3 di bawah menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri minyak atsiri bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh menghasilkan diameter zona hambat yang berbeda. Aktivitas antibakteri minyak atsiri bunga cengkeh menghasilkan zona hambat paling besar terhadap bakteri *P. acnes*. (25,85-26,75mm) dibandingkan dengan zona hambat minyak atsiri tangkai bunga dan daun cengkeh yaitu 20,60-21,20 mm dan 18,04-18,58 mm. Hal tersebut menunjukkan bahwa diameter zona hambat yang dihasilkan oleh minyak atsiri berbanding lurus dengan jumlah rendemen minyak atsiri yang dihasilkan oleh masing-masing bagian cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) (Tabel 2)

Tabel 3 Nilai Diameter Zona Hambat Uji Aktivitas Minyak Atsiri Bunga, Tangkai Bunga dan Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) terhadap bakteri *P. acnes*

No	Sampel	Konsentrasi (µL/Disk)	Rentang d Zona Hambat (mm)	Kategori Aktivitas
1	Bunga	200	25,85 - 26,75	Intermediete
2	Tangkai Bunga	200	20,60 - 21,20	Resistant
3	Daun	200	18,04 - 18,58	Susceptible
4	Etanol 96% (Kontrol -)	96% v/v	0	Susceptible
4	Doksisiklin Disk (Kontrol +)	30µg/Disk	45,15 - 45,45	Susceptible

Keterangan: *d* = diameter zona hambat

Uji Aktivitas Antibakteri

Perbedaan aktivitas antibakteri minyak atsiri bunga, tangkai dan daun cengkeh tersebut diduga karena perbedaan kandungan minyak atsiri dan kadar eugenol yang terkandung pada ketiga bagian cengkeh tersebut. Nurdjannah (2004) menyatakan bahwa cengkeh mengandung eugenol, saponin, flavonoid dan tanin. Selain itu Penelitian Tomaino A., et al (2005) menyatakan komponen utama minyak cengkeh terdiri dari eugenol, β -Caryophyllene, Eugenil asetat, komponen minyak cengkeh tersebut diketahui memiliki aktivitas terhadap bakteri *S.aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* dan *E.coli* (Jirovetz et al., 2006). Oleh karena itu aktivitas antibakteri terhadap *P.acnes* dari minyak atsiri cengkeh diduga berasal dari komponen utama minyak cengkeh tersebut. Menurut penelitian Nurdjannah, (2004) kadar eugenol bunga cengkeh antara 78-95% dengan minyak atsiri di dalam bunga cengkeh mencapai 21,3%, kadar eugenol dari tangkai atau gagang bunga antara 89-95%, dengan kandungan minyak atsiri mencapai 6% dan dari daun kadar eugenol antara 80-85% dengan kandungan minyak atsiri daun cengkeh mencapai 2-3%. Carvacrol, eugenol dan kavibetol merupakan isomer eugenol dan termasuk kedalam senyawa golongan fenol yang dilaporkan memiliki aktivitas paling kuat terhadap bakteri gram positif dan gram negatif.

Analisis Data

Berdasarkan tabel klasifikasi diameter zona hambat suatu antibakteri yang dinyatakan oleh Coyle (2005), aktivitas antibakteri minyak atsiri bunga cengkeh dan tangkai bunga termasuk dalam katagori *Susceptible* sedangkan aktivitas antibakteri daun cengkeh termasuk dalam katagori *Intermediete*. Kontrol positif (doksisiklin disk) termasuk dalam katagori *susceptible* dan kontrol negatif (etanol 96% v/v) tidak menunjukkan adanya aktivitas daya hambat, sehingga dapat disimpulkan bahwa pelarut etanol 96% v/v dalam minyak atsiri bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh yang digunakan tidak mempunyai dan mempengaruhi aktivitas antibakteri terhadap bakteri *P.acnes s*.

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan LSD menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri minyak atsiri bunga, tangkai dan daun cengkeh

memberikan aktivitas antibakteri yang berbeda signifikan ($P < 0,05$) terhadap bakteri *P. acnes*. Begitu pula aktivitas antibakteri minyak atsiri berbeda signifikan dengan kontrol positif yaitu doksisiklin disk dan kontrol negatif yaitu etanol 96% v/v.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan aktivitas terhadap bakteri *P.acnes s* minyak atsiri bunga, tangkai bunga dan daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) yang signifikan secara statistik. Pada konsentrasi minyak atsiri 200 μ L/mL aktivitas antibakteri terbesar dihasilkan oleh minyak atsiri bunga cengkeh dengan diameter zona hambat 25,85 mm – 26,75 mm dan selanjutnya minyak atsiri dari tangkai bunga dengan diameter zona hambat 20,6 mm – 21,2 mm yang termasuk dalam kategori *susceptible* dibandingkan dengan daun cengkeh dengan diameter zona hambat 18,04 mm – 18,58 mm yang termasuk dalam kategori *Intermediete*.

Saran

Adapun saran yang dapat di berikan setelah melakukan penelitian ini adalah perlu dilakukan penetapan kadar komponen penyusun minyak atsiri Bunga, Tangkai Bunga dan Daun Cengkeh dengan metode Gas Chromatography- Mass Spectrometri (GC-MS) dan dilakukan pengujian KLT-Bioautografi untuk melihat komponen senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acne*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih secara khusus kepada Direktorat Jenderal Pembelajaran dan Kemahasiswaan, Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi atas pendanaan terhadap sebagian dari penelitian ini dan semua pihak yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Coyle, M. B., 2005, *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*, American Society for Microbiology.

- Departemen Kesehatan R.I., 1977, *Materia Medika Indonesia, Jilid I*, Jakarta.
- Jirovetz, L., Eller, G., Buchbauer, G., Schmidt, E., Denkova, Z., Stoyanova, A. S., Nikolova, R., and Geissler, M., 2006, Chemical composition, antimicrobial activities and odor descriptions of some essential oils with characteristic floral-rosy scent and of their principal aroma compounds, *Recent Res Devel Agronomy Horticulture*, 2: 1-12.
- Khan, Z.Z., M. Assi., T.A Moore, 2009, Recurent Epidural Abcess Caused by Propionibacterium acnes, *Khansas Journal of Medicine*.
- Luangnarumitchai, S., S. Lamlerthon and W. Tiyafoonchai, 2007, Antimicrobial Activity of Essential Oils Against Five Strains of Propionibacterium acnes, *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34 (1-4): 60-64.
- Nurdjannah, N., 2004, Diversifikasi Tanaman Cengkeh, *J. Perspektif*, 3 (2).
- Satrohamidjojo, H, 2004, *Kimia Minyak Atsiri*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. Hal: 13-14.
- Saxena, M, N. K Khare, P. Saxena, K.V Syamsundar and S. K Srivastava, 2014, Antimicrobial Activity And Chemical Composition Of Leaf Oil In Two Varieties Of Piper Betle From Northern Plains Of India, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 73.
- Sylvia, L., 2010, Hubungan Antara Jenis Mikroorganisme yang Ditemukan Pada Lesi Akne dengan Be, *Tesis*, Padang: Program Pendidikan Dokter Spesialis Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.
- Tomaino, A., Cimino, F., Zimbalatti, V., 2005, Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils, *Food Chem*, 89: 49-54.
- Vijayalakshmi, A., A. Tripura and V. Ravichandiran, 2011, Development and Evaluation of Anti-acne Products from Terminalia arjuna Bark, *International Journal of ChemTech Research*, 3 (1): 320-327.
- Wanger, A., 2009, Antibiotic Susceptibility Testing in Goldman, and Green L, *Practical Handbook of Microbiology*, n^{sd} edition, New York: CRC. Press: 150-151.