

MICROENCAPSULATION OF *Cytrus hystrix* OIL AND ITS ACTIVITY TEST AS AN ANTIMICROBIAL AGENT

¹Warsito, ²Noorhamdani, ³Sukardi, ¹Suratmo dan ¹Rissa Dwi Susanti

¹Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

²Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

³Program Studi Teknologi Agroindustri, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya

^{1,3}Institut Atsiri, Universitas Brawijaya

Email: ¹warsitoub88@yahoo.com, suratmoub@gmail.com, rissadwisusanti.work@gmail.com,
³kardios26@yahoo.com

ABSTRACT

Microencapsulation Kaffir lime oil (*C. hystrix* DC.) has advantages such as capable of controlling the evaporation process, oxidation by air or oxygen and release the active ingredient is stable, thus providing a constant concentration over long periods of therapy. In this research microencapsulation of kaffir lime oil from leaves (MJP-D) and rind (MJP-KB) using chitosan to crosslinking with glutaraldehyde (ratio 2:1). Characterization of kaffir lime oil use Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), characterization of microcapsule use FTIR and particle size analyzer, while analysis of essential oil content in the microcapsules with UV-Vis spectroscopy. Composition of MJP-D consist of citronellal (85,07%), linalool (3,47%), citronellil acetate (2,77%) and sabinene (2,79%), while MJP-KB consist of citronellal (20,91%), terpinen-4-ol (11,93%), α -pinene (21,44%) and limonene (12,59%). Microcapsul MJP-D and MJP-KB has a distinctive absorption crosslinking results on 1558 cm^{-1} ($\text{C}=\text{N}$) and particle size 340,43-404,90 nm. The effectiveness microencapsulation of MJP-D and MJP-KB 37,5% and 86,88% with each zone of inhibition against *Pseudomonas aeruginosa* bacteria is 12,8 mm and 17,1 mm.

Keywords: *microcapsul, kaffir lime oil, antimicrobial P. aeruginosa*

1. PENDAHULUAN

Minyak atsiri adalah cairan berminyak yang memiliki aroma khas dan bersifat kurang stabil atau mudah menguap. Minyak atsiri merupakan hasil dari jalur metabolisme yang kompleks dengan tujuan untuk melindungi tanaman dari mikroorganisme patogen,

mengusir serangga yang merupakan vektor wabah dan memberikan rasa tidak enak pada tanaman sehingga mengurangi nafsu makan beberapa herbifora [1].

Minyak atsiri sudah umum digunakan dalam industri, seperti halnya industri makanan, minuman, farmasi, pemberi aroma dan rasa, parfum, pewarna dan lain-lain [2]. Bioaktivitas dari minyak atsiri juga telah dilaporkan oleh beberapa penelitian, seperti aktivitas antibakteri, antivirus, anti-inflamasi, anti jamur, antimutagenik, anti kanker, dan antioksidan [1].

Minyak jeruk purut merupakan salah satu minyak atsiri yang menarik dan menjanjikan untuk diaplikasikan dalam industri. Minyak jeruk purut disebut sebagai kaffir lime oil dalam perdagangan internasional. Di Indonesia, minyak jeruk purut diproduksi dalam jumlah besar per tahunnya dan memiliki harga jual sebesar 65,00-75,00 USD per kilogram [2]. Minyak atsiri jeruk purut dapat diperoleh menggunakan metode destilasi uap [3].

Minyak atsiri jeruk purut tersusun dari beberapa senyawa kimia yaitu sabinen, β -pinen, β -miceren, α -cimen, (-)-limonen, trans- β -ocimen, γ -terpinen, linalool oksida, L-linalol, β -sitronelal, (-)-isopulegol, 4-terpeneol, 1-dodekin-4-ol, β -sitronelol, rodinol (keprol), cis-linalol osida, sitronellil asetat, geronil asetat, trans- β -karyopilen, dan nerodinol [4]. Minyak atsiri jeruk purut memiliki beberapa kandungan senyawa kimia utama, yaitu sitronelal sebesar 81,49%, sitronelol 8,22%, linalool 3,69% dan geraniol 0,31% [5].

Senyawa aktif yang terkandung dalam minyak jeruk purut telah dilaporkan dapat menghambat aktivitas pertumbuhan dari

Staphylococcus aureus, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, dan *Escherichia coli* [6], [7].

Minyak jeruk purut terdiri dari berbagai macam komponen zat penyusun yang memiliki titik didih berbeda dan memiliki sifat tidak stabil atau mudah menguap [1], [2], serta mudah teroksidasi oleh adanya panas, udara (oksigen), kelembaban, serta dikatalisis oleh cahaya dan beberapa harus dikatalisis oleh logam [8]. Kondisi seperti ini menjadi kendala utama dari minyak jeruk purut ketika diaplikasikan secara langsung.

Mikroenkapsulasi adalah suatu proses penyalutan secara tipis oleh bahan penyalut [9], [10]. Mikrokapsul yang dihasilkan berukuran 15.000 μm . Teknik mikroenkapsulasi digunakan untuk meng-endalikan proses pelepasan senyawa aktif dan melindungi senyawa aktif dari efek yang tidak diinginkan akibat pengaruh dari cahaya, kelembaban dan oksigen [9]. Pecarski, dkk [11] juga menyatakan bahwa teknik enkapsulasi merupakan cara tepat untuk mempertahankan sifat fungsional dari minyak atsiri sehingga dapat dicapai keadaan yang diinginkan.

Berdasarkan uraian diatas, menarik untuk dikaji sejauh mana minyak jeruk purut hasil mikroenkapsulasi dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

2. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

2.1. Bahan Penelitian

Bahan sampel dan kimia yang digunakan meliputi daun, ranting, dan kulit buah jeruk purut, MgSO_4 MERCK, kitosan, asam asetat, paraffin, Tween 80, etanol 95%, akuades, glutaraldehyd 25%, n-heksana, nutrient agar, nutrient broth. Jenis bakteri uji adalah kultur *Pseudomonas aeruginosa* dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

2.2. Destilasi minyak jeruk dari purut daun dan kulit buah jeruk purut

Penyulingan minyak jeruk purut menggunakan destilasi uap, dengan cara menyuling daun dan kulit buah jeruk purut berturut-turut sebanyak 6 dan 11,4 kg selama 5-6 jam.

2.3. Analisis Komponen Minyak Jeruk Purut dengan GC-MS

Sampel minyak jeruk purut 0,05 gram dilarutkan dalam 2 mL n-heksana, selanjutnya diinjeksikan kedalam instrumen GC-MS Shimadzu QP2010S, kolom kapiler Restrex Rtx-5 (30 eter), suhu kolom 70-220°C, suhu injektor 310,00 °C. Masing masing puncak yang diperoleh discan untuk memperoleh spektra massa.

2.4. Pembuatan Mikrokapsul

Mikropartikel kitosan sebagai bahan penyalut minyak atsiri dibuat menggunakan metode cross-linking. Model mikropartikel kitosan dibuat dengan mencampurkan kitosan 1% dan glutaraldehyd 1% dengan perbandingan volume 1:2. Minyak atsiri yang digunakan meliputi minyak daun dan minyak kulit buah jeruk purut dengan variasi volume masing-masing 1,6 ; 3,2 ; 6,4 μl . Dicampurkan minyak dengan 37,5 ml parafin dan 12,5ml Tween 80 2%. Kemudian ditambahkan 10ml larutan kitosan 1%. Fasa ini diaduk menggunakan pengaduk magnetik (selama 60 menit pada 1200 rpm) hingga bercampur dengan homogen. Setelah itu 20ml glutaraldehyd 1% (sebagai agen cross-linking) ditambahkan dibawah kondisi pengadukan 1500 rpm dan dilakukan pengadukan selama 24 jam. Dilakukan sentrifugasi selama 10 menit, diambil lapisan bawah dan dibekukan. Dilakukan freeze drying selama 2 kali 24 jam untuk memperoleh mikrokapsul yang kering (bebas dari air). Dilakukan penimbangan dan dicatat massa mikrokapsul yang diperoleh.

2.5. Karakterisasi Mikrokapsul Spektrofotometer FTIR

Sampel mikrokapsul minyak jeruk purut disiapkan sebanyak 1mg, kemudian dicampur dengan 750 mg kalium bromida (KBr). Campuran sampel dan KBr di kompres menjadi lapisan tipis. Pelet discan pada resolusi 4 cm^{-1} dengan 10 scan dalam range spectra dari 4000 – 500 cm^{-1} [14].

Karakterisasi dengan PSA

Mikrokapsul dengan berbagai model yang telah dibuat (A1-A3 dan B1-B3) disiapkan. Sampel dilakukan karakterisasi untuk mengetahui distribusi ukuran partikel mikrokapsul yang terbentuk menggunakan indtrumen PSA yang berada di Laboratorium

Kimia Fisik Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

2.6. Penentuan Efisiensi Mikrokapsul dengan Spektrofotometer UV-Vis

Mikrokapsul sebanyak 0,1 gram dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL. n-Heksan 10 mL ditambahkan ke dalam gelas kimia yang berisi mikrokapsul dan diaduk menggunakan pengaduk magnetic selama 30 menit. Larutan dipisahkan dari mikrokapsul menggunakan kertas saring, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer Uv-Vis. Penentuan efisiensi dilakukan untuk semua mikrokapsul (A dan B).

2.7. Uji Aktivitas Antibakteri Peremajaan dan Penginokulasian Bakteri

Media nutrient agar steril dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5ml. Tabung reaksi diletakkan pada kemiringan 30-45 °C dan ditunggu hingga memadat. Kultur bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diambil sebanyak 1 ose menggunakan jarum ose, kemudian digoreskan secara zig-zag pada permukaan media agar miring dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 hari (24 jam) [15].

Pembuatan Suspensi Bakteri

Nutrient broth yang sudah steril disiapkan dalam tabung reaksi. Bakteri dari media agar miring diambil sebanyak 1 ose, dicelupkan ke dalam media nutrient broth hingga tidak ada bakteri yang menempel pada jarum ose dan diinkubasi selama 1 hari (24 jam). Suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dihitung dibawah mikroskop menggunakan haemocytometer hingga diperoleh jumlah koloni 10^5 - 10^8 CFU/ml [15].

Penentuan Zona Hambat dengan Metode Difusi Sumuran

Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah metode difusi sumuran. Uji aktivitas antibakteri ini dilakukan menggunakan mikrokapsul minyak jeruk purut, etanol 95% sebagai kontrol positif dan akuades sebagai kontrol negatif terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* [15]. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi sumuran dilakukan dengan 2 model mikrokapsul dengan konsentrasi minyak yang berbeda-beda (A1-A3; B1-B3) dan pengamatan dilakukan setelah waktu inkubasi

selama 24 jam (1x24 jam), 48 jam (2x24 jam) dan 72 jam (3x24 jam). Sebanyak 12 cawan petri yang sudah steril disiapkan. Media yang sudah steril dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptis dan ditunggu hingga memadat. Suspensi bakteri dimasukkan sebanyak 0,1 ml pada permukaan agar menggunakan mikropipet dan diratakan menggunakan spreader. Pembuatan sumuran dilakukan menggunakan cawan bor sebanyak 5 lubang sumuran. 5 lubang sumuran diisi dengan mikrokapsul minyak jeruk purut, kontrol positif (+) dan kontrol negatif (-), kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam dan dilakukan pemantauan untuk waktu 48 dan 72 jam [15]. Zona bening yang terbentuk diamati sebagai luas zona hambat.

3. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

3.1. Penyulingan Minyak Jeruk Purut

Dari hasil penyulingan didapat rendemen dari minyak daun jeruk purut hampir sama dengan minyak kulit buah jeruk purut yaitu 0,68 dan 0,66%. Secara garis besar minyak atsiri jeruk purut mengandung campuran kompleks dari monoterpen hidrokarbon (MH) dan monoterpen yang mengandung oksigen (MHO). Sejumlah 28 senyawa telah diidentifikasi dari beberapa minyak jeruk purut dan secara struktural baik komponen MH atau MHO dalam bentuk isomer. Sedikitnya terdapat 7-8 komponen (Gambar 5.1) yang menyusun minyak atsiri jeruk purut, baik MJP-R, MJP-RD dan MJP-D dengan persentase yang beragam.

Komponen MH dalam MJP-R, MJP-RD dan MJP-D lebih rendah (4.73 – 12.19%) dibanding MHO (87.81 – 95.27%), sedangkan dalam MJP-KB, komponen tersebut berada pada tingkat yang sama (rasio 50.10% : 49.90%). Tiga komponen utama MH yang menyusun MJP-KB, meliputi sabinene (9.21%), β -pinene (21.44%), limonene (12.59%), sebaliknya citronellal yang merupakan komponen paling dominan dalam ketiga sampel MJP-R, MJP-RD dan MJP-D mencapai (46.40 – 85.07%).

3.2. Mikrokapsul Minyak Jeruk Purut

Sediaan mikrokapsul berbasis minyak jeruk purut daun (MJP-D) dan kulit buah

(MJP-KB), dalam penelitian dilakukan dengan menyalutkan minyak dalam mikrokapsul hasil cross-linking antara larutan kitosan dengan larutan glutaraldehid dan emulsigator Tween 80. Meskipun gugus aldehid dalam glutaraldehid bersifat sangat reaktif bereaksi dengan gugus amina dalam kitosan, namun karena pengaduk magnet hanya menggunakan kecepatan 1500 rpm maka dalam penelitian ini proses pengadukan dilakukan selama 24 jam agar terjadinya reaksi cross-linking kitosan-glutaraldehid berlangsung sempurna. Proses pembentukan mikrokapsul dimulai dengan terbentuknya kabut putih yang makin lama pengadukan kabut makin menebal. Fenomena ini mengindikasikan jumlah mikrokapsul yang terbentuk semakin banyak sejalan dengan lama pengadukan.

Hasil reaksi reaksi cross-linking kitosan-glutaraldehid ketika menyalut minyak jeruk purut menghasilkan mikrokapsul yang memiliki warna putih hingga kuning. Pemisahan partikel-partikel hasil mikroenkapsulasi minyak jeruk purut terhadap cairan yang tidak bereaksi dan emulsigator tween 80 dilakukan melalui (1) sentrifugasi dengan kecepatan putaran 6000 rpm, (2) pencucian dengan etanol dan (3) freeze drying untuk menghilangkan sisa air yang masih bercampur. Hasil reaksi antara larutan 1% kitosan dengan larutan 3 % glutaraldehid dengan rasio mol 1 : 1, diperoleh massa mikroenkapsulasi minyak jeruk purut disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Massa Mikrokapsul Minyak Jeruk Purut

Sampel minyak jeruk purut	Konsentrasi minyak atsiri (ppm)*	Massa Mikrokapsul (g)
MJP-KB	42,67	0,93
	85,33	1,98
	170,67	1,06
DMJP-D	42,67	2,40
	85,33	1,94
	170,67	1,63

3.3. Ukuran partikel dan profil spektrum FTIR mikrokapsul

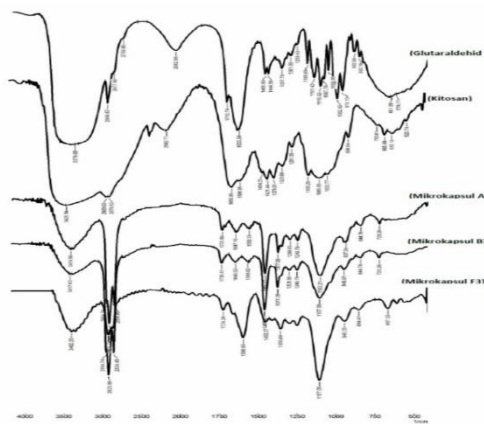
Hasil analisis ukuran partikel mikroenkapsulasi minyak jeruk purut disajikan pada Tabel 2, sedangkan profil spektrum FTIR disajikan dalam Gambar 1.

Tabel 2. Ukuran partikel mikrokapsul MJP-D, MJP-KB dan MJP-F

Jenis minyak atsiri	Rata-rata ukuran partikel mikrokapsul (nm) minyak jeruk purut (dalam persen populasi)		
	10%	50%	90%
MJP-D	17,76	168,51	340,93
MJP-KB	23,71	220,05	404,90

Dalam profil spektrum FTIR dari bahan dasar kitosan, glutaraldehid dan mikrokapsul disajikan pada Gambar 1. Tampak pita utama kitosan antara lain ditunjukkan oleh pita pada daerah 3425 cm^{-1} (vibrasi ulur N-H dan O-H), 2920 cm^{-1} (vibrasi ulur simetri CH_3), 1650 cm^{-1} (vibrasi ulur C = O), 1421 cm^{-1} (vibrasi ulur C-N), 1379 cm^{-1} (vibrasi tekuk CH_3), 1155 cm^{-1} (vibrasi tekuk C-O-C), dan 1085 cm^{-1} (vibrasi ulur C-OH), sedangkan aldehid dua pita utama pada daerah 2759 cm^{-1} (vibrasi ulur -CHO aldehid), 1710 cm^{-1} (vibrasi ulur -C=O). Namun, beberapa perubahan besar telah diamati dalam spektrum mikrokapsul.

Spektrum FTIR mikrokapsul menunjukkan bahwa vibrasi ulur N-H dan O-H pada 3425 cm^{-1} bergeser ke 3419 cm^{-1} , vibrasi simetris CH_3 di daerah 2920 cm^{-1} bergeser ke 2923 cm^{-1} , vibrasi ulur C = O pada 1666 cm^{-1} bergeser ke 1647 cm^{-1} , vibrasi ulur C-N pada 1421 cm^{-1} bergeser ke 1377 cm^{-1} , dan vibrasi ulur C-OH pada 1073 cm^{-1} bergeser ke 1103 cm^{-1} . Selanjutnya, vibrasi tekuk CH_3 pada 1379 cm^{-1} dan vibrasi C-O-C tekuk pada 1155 cm^{-1} pada kitosan menjadi tidak muncul pada mikrokapsul. Sebaliknya, pita di 1558 cm^{-1} (amida, C=N) yang dijumpai di FTIR mikrokapsul tidak dijumpai pada kitosan.



Gambar 1. Spektrum FTIR mikrokapsul minyak jeruk purut dan fraksi (A. Mikrokapsul MJP-D, B. Mikrokapsul MJP-KB, F. Mikrokapsul MJP-F)

3.4. Hasil Penentuan Efisiensi Mikroenkapsulasi Minyak Jeruk Purut

Efisiensi proses mikroenkapsulasi ditentukan dengan membandingkan jumlah minyak jeruk purut yang dicampurkan terhadap jumlah minyak jeruk purut yang dapat disalutkan dalam mikrokapsul hasil metode cross-linked kitosan-glutaraldehyd. Persentase minyak yang disalutkan (mikroenkapsulasi minyak jeruk purut) disajikan dalam Tabel 3a dan 3b.

Tabel 3a. Persentase mikroenkapsulasi minyak jeruk purut

Jenis Minyak Jeruk purut	Konsentrasi yang ditalutkan (µl/mL)	Massa mikroenkapsulasi (g)
MJP-D	1,6	0,93
	3,2	1,98
	6,4	1,06
MJP-KB	1,6	2,40
	3,2	1,94
	6,4	1,63

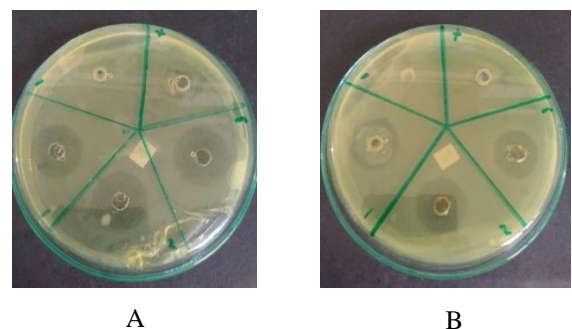
Tabel 3b. Persentase mikroenkapsulasi minyak jeruk purut

Jenis Minyak Jeruk purut	Konsentrasi minyak dalam mikrokapsul (µl/mL)	% Efisiensi Proses Mikroenkapsulasi
MJP-D	0,6	37,5
	1,21	37,8
	0,54	8,4
MJP-KB	1,39	86,88
	1,71	53,44
	0,98	15,31

Proses penyalutan minyak jeruk purut daun dan kulit buah dalam mikrokapsul hasil *cross-linked* kitosan-glutaraldehyd ptimum pada konsentrasi 1,6 µL/mL dengan persen penyalutan 37,5 % (MJP-D) dan 86,88 % (MJP-KB). Perbedaan nilai persen minyak yang tersalutkan yang cukup signifikan dapat dikaitkan dengan komposisi kimia MJP-D dan MJP-KB sedikit berbeda. Dalam MJP-D didominasi sitronelal mencapai (85,07%), sedangkan dalam MJP-KB tersusun oleh lima molekul dominan meliputi sabinen, β-pinen, sitronelal dan terpinen-4-ol (Warsito, 2015). Komponen-komponen tersebut memiliki kontribusi besar untuk berinteraksi dengan gugus fungsional (*site active*) dalam mikrokapsul, sehingga proses mikroenkapsul MJP-KB berlangsung lebih efisien.

3.5. Hasil penentuan nilai zone inhibition mikrokapsul minyak jeruk purut

Dalam Gambar 2 tampak zone inhibisi yang ditunjukkan oleh mikrokapsul MJP-D maupun MJP-KB terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*. Fakta menunjukkan bahwa zone sediaan mikrokapsul jauh lebih besar dibanding dalam minyak atsiri sediaan larutan, yaitu 2,05 mm (MJP-D) dan 14,02 mm (MJP-KB) (Warsito, 2015). Perbedaan lain yang mendasar dari kemasan mikrokapsul minyak jeruk purut ini bahwa meskipun mulai muncul bakteri koloni baru, namun pada pengamatan 48 jam setelah inkubasi mikrokapsul masih menunjukkan aktivitas dengan penurunan zone inhibisi yang relatif kecil. Hal ini mengindikasikan bahwa dalam kemasan mikrokapsul minyak jeruk purut dilepas tidak secara spontan, tetapi pelan-pelan (*slow release*) sehingga aktivitasnya lebih lama.



Gambar 2. Hasil uji zone hambatan mikrokapsul minyak jeruk purut (A. Zone hambatan MJP-D, B. Zone hambatan MJP-KB)

Tabel 4. Diameter zona hambat mikrokapsul minyak jeruk purut

Jenis Mikrokapsul	Rerata Diameter zona hambat (mm) dengan lama inkubasi		
	24 jam	48 jam*	72 jam
MJP-D	10,8	7,4	0
	12,8	10,8	0
	10	9,2	0
MJP-KB	17,1	4,2	0
	15,9	15,9	0
	10,3	10,3	0

*= muncul koloni baru

4. KESIMPULAN

Dengan demikian maka mikrokapsul minyak jeruk purut dapat dibuat dengan metode cross-linked kitosan dan glutaraldehid dengan emulsigator tween 80, pengadukan dengan kecepatan 1500 rpm selama 24 jam. Partikel-partikel mikrokapsul berukuran 340,93 – 404,90 nm, karakter pita FTIR di daerah 1558 cm⁻¹ dan 1649 cm⁻¹ (vibrasi ulur C=N) dengan efisiensi mikroenkapsulasi MJP-D sebesar 37,5 % dan MJP-KB sebesar 86,88 %. Aktivitas antioksidan mikrokapsul MJP-D memiliki nilai IC₅₀ 1,79 µg/mL dan mikrokapsul MJP-KB IC₅₀ 1,79 µg/mL, sedangkan aktivitas terhadap antimikroba mikrokapsul MJP-D dan MJP-KB terhadap bakteri *P. aeruginosa* memiliki nilai MIC 1,6 µL/mL.

5. DAFTAR PUSTAKA

CHANTHAPHON, S., CHANTHACHUM, S., & HONGPATTARAKERE, T., 2008, Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. against food-related microorganisms. *Sonklanakarin Journal of Science and Technology*, Vol. 30(1), 125-131.

DUBEY, R., SHAMI, T. C., & RAO K. U. B., 2009, Microencapsulation technology and applications, *Defence Science Journal*, Vol. 59(1), 82-95.

KUMBAR, S. G., KULKARNI, A. R., & AMINABHAVI, T. M., 2002, Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium:

effect of crosslinking agent, *Journal of microencapsulation*, Vol. 19(2), 173-180.

KUSUMA, ARIA W., PULUNGAN, MAIMUNAH H., WARSITO, 2013, Pemisahan Komponen Utama dari Minyak Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C.) Menggunakan Teknik Destilasi Fraksinasi (Kajian Rasio Refluks Dan Tekanan Vakum), *Proyek Penelitian, Universitas Brawijaya, Malang*.

LI, B., SHAN, C. L., ZHOU, Q., FANG, Y., WANG, Y. L., XU, F., HAN, L. R., IBRAHIM, M., GUO, L. B., XIE, G. L., & SUN, G. C., 2013, Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of CrossLlinked Chitosan-Glutaraldehyde, *Marine drugs*, Vol. 11(5), 1534-1552.

MUNAWAROH, S., & HANDAYANI, P. A., 2010, EKSTRAKSI MINYAK Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* DC) Dengan Pelarut Etanol dan N-Heksana, *Jurnal Kompetensi Teknik*, Vol. 2 (1), 73-78.

MAYASARI, D., WIBOWO, M. A., & JAYUSKA, A., 2013, Pengaruh Variasi Waktu Dan Ukuran Sampel Terhadap Komponen Minyak Atsiri Dari Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* DC.), *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, Vol. 2(2), 74-77.

MIRZAEI B, E., RAMAZANI SA, A., SHAFIEE, M., & DANAEI, M., 2013, Studies on Glutaraldehyde Crosslinked Chitosan Hydrogel Properties for Drug Delivery Systems, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, Vol. 62(11), 605-611.

NUGRAHANI, V. A., 2009, Uji Aktivitas Gel Minyak Atsiri Bunga 28 Kenanga (*Canarium odoratum* (Lmk.) Hook. & Thoms) sebagai Repelan terhadap Nyamuk *Anopheles aconitus* Betina, *Skripsi, Fakultas Farmasi, Univerversitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta*.

NUGRAHANI, A., YUNARTO, N., & SULISTYANINGRUM, N., 2015,

- Optimasi Formula Mikroenkapsulasi Ekstrak Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dengan Penyalut Berbasis Air, *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, Vol. 5(2), 98-105.
- PECARSKI, D., KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z., DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ, S., MIHAJLOVSKI, K., & JANK OVIĆ, S., 2014, Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan microparticles with thyme essential oil, *Hemijska industrija*, Vol. 68(6), 721-729.
- RISTI, F. E. A., 2016, Pengaruh Aktivitas Antibakteri Minyak Jeruk Purut (*Citrus hystrix* DC) Terhadap Penghambatan *Salmonella typhimurim*, Skripsi, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang.
- SÃO PEDRO, A., SANTO, I., SILVA, C., DETONI, C., & ALBUQUERQUE, E., 2013, The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity, *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them* (Méndez-Vilas, A., ed.) Formatex Research Center Publisher, 2, 1364-1374.
- SUKARDI, QORDHOWI, Y., PULUN GAN, M. HINDUN, MULYADI, ARIE F., 2013, Penerapan Perlakuan Awal PEF (Pulsed Electric Field) pada Destilasi Minyak Atsiri Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C.) (Kajian Besar Tegangan dan Jarak Anoda-Katoda), Proyek Penelitian BOPTN, Universitas Brawijaya, Malang.
- YULIANI, R., INDRAYUDHA, P., & RAHMI, S.S., 2011, Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Pharmacon*, Vol. 12 (2), 50-54.