



UNIVERSITAS GADJAH MADA

SERTIFIKAT

Diberikan kepada:

Yulianto Ade Prasetya, S.Si., M.Si.

sebagai

Pemakalah Oral

dalam acara

SEMINAR NASIONAL BIOTEKNOLOGI VI

"Bioteknologi untuk Indonesia Makmur Sejahtera"

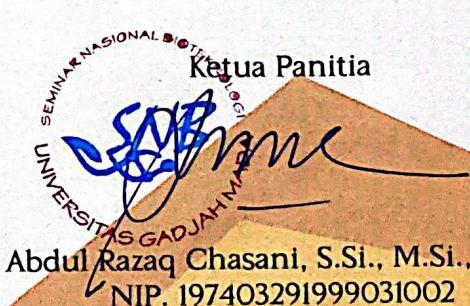
Program Studi Bioteknologi - Sekolah Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta, 2 November 2019

Dekan Sekolah Pascasarjana



Prof. Dr. Siti Malkhamah, M.Sc., Ph.D.
NIP. 196305021988032001

Ketua Panitia



Abdul Razaq Chasani, S.Si., M.Si., Ph.D.
NIP. 197403291999031002

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI NANOEMULSI MINYAK AGARWOOD BOUYA
(*Aquilaria agallocha*) TERHADAP BAKTERI MULTIRESISTEN**
**[Antibacteria Activity of Nanoemulsion of Agarwood Bouya (*Aquilaria agallocha*)
against Multidrug-resistant bacteria (MDR)]**

Yulianto Ade Prasetya[✉]

Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, STIKES Rumah Sakit Anwar Medika, Jalan Raya By Pass Krian Km.33 Sidoarjo, Jawa Timur
email : yuliantoadeprasetya@gmail.com

ABSTRACT

Multidrug-resistant bacteria are responsible for increased morbidity, mortality, and health care costs. Multidrug-resistant bacteria, such as Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBLs) producing *Escherichia coli*, and ESBLs producing *Klebsiella pneumoniae* are resistant to more than three classes of antibiotics. Therefore, alternative natural-based treatments are needed to prevent the spread of resistant. The aim of this research was to determine the antibacterial activity of agarwood bouya (*Aquilaria agallocha*) oil nanoemulsion against multidrug-resistant bacteria (MDR) and non-resistant antibiotics bacteria. Nanoemulsion was made by magnetic stirrer and sonicator with high energy method. The agarwood bouya oil was prepared in different concentrations: 1%, 5%, 10%, 15%, and 20%. The size of the nanoemulsion formed was analyzed using a particle size analyzer (PSA), while a UV-VIS spectrophotometer measured its clarity. The antibacterial activity of the agarwood bouya oil nanoemulsion was carried out by the disk diffusion method against *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 43300, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, and *K. pneumoniae* ATCC 8724. The results showed that agarwood bouya oil nanoemulsion with a concentration of 1% had the smallest size around 17.7 nm with a percent transmittance of 99.35%. The agarwood bouya oil nanoemulsion 20% was only able to inhibit ESBLs-producing *E. coli* ATCC 43300 by 3.3 mm. The non-resistant *E. coli* ATCC 25922 bacteria were able to inhibit with the inhibition zone at 13.3 mm actively, while the bacteria *S. aureus* ATCC 25923 and *K. pneumoniae* ATCC 8724 have inhibition zones of 2.6 mm and 3.3 mm, respectively. It is necessary to have a higher concentration of oil nanoemulsion to increase its inhibitory activity on multidrug resistant bacteria (MDR).

Keywords: Multidrug-resistant, Nanoemulsion, Bacteria, Agarwood Bouya, Nanotechnology

ABSTRAK

Multidrug resistant bacteria (MDR) bertanggungjawab terhadap peningkatan angka kesakitan, kematian, dan biaya perawatan kesehatan. Bakteri MDR seperti *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli* penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs), dan *Klebsiella pneumoniae* penghasil ESBLs memiliki sifat resisten terhadap lebih dari tiga golongan antibiotik, sehingga diperlukan alternatif pengobatan berbasis bahan alam untuk mencegah penyebaran gen resistensi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas nanoemulsi minyak agarwood bouya (*Aquilaria agallocha*) terhadap bakteri MDR dan non-MDR. Nanoemulsi dibuat dengan bantuan *magnetic stirrer* dan sonikator dengan metode berenergi tinggi. Variasi minyak agarwood bouya yang digunakan yakni 1%, 5%, 10%, 15%, dan 20%. Ukuran nanoemulsi yang terbentuk dianalisa dengan *Particle Size Analyzer* (PSA) sedangkan kejernihannya diukur dengan spectrophotometry UV-

VIS. Uji aktivitas nanoemulsi minyak agarwood bouya terhadap bakteri MDR dan non-MDR dilakukan dengan metode difusi cakram terhadap *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 43300, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, dan *K. pneumoniae* ATCC 8724. Hasil menunjukkan bahwa nanoemulsi minyak agarwood bouya konsentrasi 1% memiliki ukuran paling kecil yakni 17,7 nm dengan persen transmision sebesar 99,35%. Nanoemulsi minyak agarwood bouya 20% hanya mampu menghambat pada *E. coli* penghasil ESBLs (ATCC 35218) dengan zona hambat sebesar 3,3 nm sedangkan pada bakteri lain tidak menghambat. Pada bakteri *E. coli* ATCC 25922 mampu menghambat secara aktif dengan zona hambat mencapai 13,3 nm, sedangkan pada bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan *K. pneumoniae* ATCC 8724 secara berturut-turut memiliki zona hambat sebesar 2,6 mm dan 3,3 mm. Perlu konsentrasi nanoemulsi minyak yang lebih tinggi untuk meningkatkan aktivitas penghambatannya pada bakteri MDR.

Kata kunci: Multiresisten, Nanoemulsi, Bakteri, Agarwood Bouya, Nanoteknologi

PENDAHULUAN

Multidrug resistant bacteria (MDR) merupakan bakteri yang memiliki resistensi terhadap minimal satu jenis antibiotik dari lebih dari tiga golongan antibiotik (Pacios *et al.*, 2020). *Multidrug resistant bacteria ini* bertanggungjawab terhadap peningkatan angka morbiditas, mortalitas, penurunan efektifitas obat, dan biaya perawatan kesehatan di seluruh dunia (Pacios *et al.*, 2020). Angka kematian yang disebabkan oleh bakteri MDR di Amerika mencapai lebih dari 23.000 jiwa sedangkan di Eropa terdapat 33.000 kematian per tahun (Medina & Piepper, 2016). Angka ini akan terus meningkat tiap tahunnya di berbagai belahan dunia dan diperkirakan mencapai 10 juta jiwa pada tahun 2050 (Dye, 2014). Insidensi tertinggi pada infeksi yang disebabkan oleh bakteri MDR diantaranya adalah *Escherichia coli* penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs), *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dan *Klebsiella pneumoniae* penghasil ESBLs.

Escherichia coli merupakan bakteri Gram-negatif, mampu memfermentasi laktosa, menghasilkan enzim katalase, dan termasuk patogen oportunistik (Brooks *et al.*, 2019). Bakteri ini merupakan penyebab utama infeksi nosokomial di rumah sakit dengan prevalensi mencapai 35% dan penyebab bakterimia kedua pada pasien di rumah sakit (Pacios *et al.*, 2020). *E. coli* termasuk patogen oportunistik yang sering dan paling utama menyebabkan infeksi saluran kemih (ISK) dan infeksi saluran pencernaan di berbagai belahan dunia, termasuk Indonesia. Bakteri ini paling banyak menyebabkan infeksi saluran kemih pada perempuan sebesar 87.5% dibandingkan pada pria (71.3%). Bakteri ini menyebabkan infeksi saluran pencernaan pada 6-8 juta penduduk dengan 0,1 juta kasus pertahun sepsis di Amerika (Wolheim *et al.*, 2011). Selain *E. coli* bakteri penyebab ISK yang kedua terbanyak ditemukan adalah *K. pneumoniae* (Chander & Shrestha, 2016). *K. pneumoniae* termasuk Gram-negatif yang mampu memproduksi enzim katalase dan urease, serta mampu memfermentasi karbohidrat (glukosa, sukrosa, dan laktosa) (Brooks *et al.*, 2019). Kedua bakteri tersebut, baik *E. coli* dan *K. pneumoniae* resisten terhadap antibiotik karena kemampuan dalam memproduksi enzim ESBL. ESBL merupakan enzim yang disintesis oleh beberapa bakteri yang dapat menghidrolisis antibiotik golongan beta laktam generasi kedua dan ketiga serta monobaktam (Kuntaman *et al.*, 2019). Prevalensi *E. coli* penghasil ESBLs di berbagai belahan dunia cukup tinggi yang diperantara oleh gen CTX-M yakni sebesar 90% (Indonesia), 87.3% (Thailand), dan 93%

(Rusia). Berbeda dengan *E. coli* penghasil ESBLs, pada bakteri *K. pneumonia* prevalensi cukup bervariasi di berbagai kota di India yakni antara 8-80%, sedangkan di berbagai negara Eropa berkisar antara 9-13.6% (Canton & Xoque, 2008; Sarajomma & Ramakrishna, 2011). Selain ESBL, ditemukan bakteri resisten lain yang dikenal dengan nama MRSA. MRSA diperantarai oleh gen *mec-A* yang memiliki berat sebesar 76 kDa dan mampu mengekspresikan enzim *penicillin binding protein* (PBP2a), sehingga mampu menonaktifkan kebanyakan antibiotik golongan beta laktam. Hampir lebih dari sebelas juta penduduk dunia dilaporkan telah terinfeksi oleh MRSA yang berupa infeksi pada kulit dan jaringan lunak, saluran pencernaan dan pneumonia (Liu *et al.*, 2018). Bakteri MDR sangat sulit diobati, oleh karena itu diperlukan terapi berbasis bahan alam salah satunya minyak atsiri agarwood bouya dalam mencegah penyebaran gen resistensi.

Agarwood bouya (*Aquilaria agallocha*) merupakan minyak atsiri khas Indonesia yang dihasilkan dari batang pohon. Khasiat dari minyak atsiri ini dapat digunakan untuk antibakteri, antiasma, obat sakit perut, obat kanker, alergi, anti inflamasi, dan antidepresi (Bilia *et al.*, 2014). Spesies lain dari agarwood yakni *A. macrocarpa* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *Proteus mirabilis* (Sari *et al.*, 2017). Namun, belum banyak laporan penelitian berkaitan tentang manfaat *A. agallocha* sebagai antibakteri terutama pada bakteri MDR. Minyak atsiri baik dalam penggunaan maupun penyimpanan cenderung tidak stabil sehingga diperlukan alternatif dalam bentuk sediaan lain yakni dapat berupa nanoemulsi (Sharif *et al.*, 2017). Nanoemulsi merupakan sediaan berukuran nanometer (umumnya kurang dari 300 nm) yang merupakan dispersi minyak dan air yang distabilkan oleh surfaktan. Nanoemulsi memiliki keunggulan diantaranya mampu meningkatkan luas permukaan obat, penetrasi suatu obat, dan meningkatkan bioavailabilitasnya (Prasetya *et al.*, 2019). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa nanoemulsi mampu menghambat pertumbuhan sejumlah bakteri dan berpotensi sebagai agen antibakteri. Nanoemulsi minyak lengkuas mampu menghambat bakteri *Helicobacter pylori* (Prasetya *et al.*, 2019), nanoemulsi *Eucalyptus globulus* mampu menghambat pertumbuhan jamur *Candida* sp. (Quantrin *et al.*, 2017), dan nanoemulsi *Cymbopogon flexuosus* dapat digunakan sebagai antibakteri pada *Mycobacterium fortuitum*, *M. massiliensi*, dan *M. abcessus* (Rossi *et al.*, 2017). Belum terdapat penelitian tentang aktivitas nanoemulsi pada agarwood bouya terutama pada bakteri MDR. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas nanoemulsi minyak agarwood bouya pada bakteri MDR dan non-MDR.

BAHAN DAN CARA KERJA

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah sonikator, *hot plate*, *magnetic stirrer*, *Particle Size Analyzer* (PSA), *Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry* (GC-MS), *spectrophotometry* UV-Vis, Autoklaf dan *Laminar Air Flow*. Bahan yang dipergunakan untuk penelitian ini meliputi minyak Agarwood bouya, *Nutrient Broth* (NB), *Nutrient agar* (NA), *Mueller Hinton agar* (MHA), Tween 80, *dimethylsulfoxide* (DMSO), dan aquadest.

Sampel minyak agarwood bouya

Minyak agarwood bouya dibeli di CV. Nusaroma Depok Jawa Barat dan dilakukan karakterisasi terhadap kandungan senyawanya dengan menggunakan instrumen GC-MS di Laboratorium Pusat Penelitian Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Serpong,

Tangerang Selatan. Gas GC-MS terdiri dari fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan adalah Rxi-1MS (100% dimetilpoliksilosan) dengan kolom yang memiliki panjang 30 cm dan diameter 0,25 mm. Fase gerak berupa gas helium dikondisikan pada tekanan 37,1 kPa yang memiliki volume injeksi sebesar 5 μ l, suhu injektor 250°C, suhu sumber ion 230°C, suhu permukaan 230°C, dengan mode split 10. Kolom diatur pada suhu 70°C dan akan naik mencapai suhu 230°C dengan laju kenaikan 10°C/menit dan ditahan selama 3 menit dengan suhu akhir sebesar 270°C.

Kultur bakteri

Bakteri *multidrug resistant* (MDR) dan non-MDR yang digunakan merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi STIKES Rumah Sakit Anwar Medika Sidoarjo diantaranya *E.coli* penghasil ESBL ATCC 35218, MRSA ATCC 43300, *K. pneumoniae* penghasil ESBL ATCC 700603. Bakteri non-resisten yang digunakan adalah *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, dan *K. pneumoniae* ATCC 8724. Bakteri MDR ditumbuhkan dalam media *nutrient broth* (NB) dengan penambahan 10 mg sefotaksim sedangkan pada bakteri non-MDR tidak ditambahkan antibiotik sefotaksim. Kultur diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C menggunakan *rotatory shaker* dengan kecepatan \leq 100 rpm.

Pembuatan nanoemulsi minyak agarwood bouya

Nanoemulsi yang digunakan pada penelitian ini merupakan tipe minyak dalam air (w/o) sesuai dengan Quantrin *et al.* (2017) dengan modifikasi. Pada fase organik terdiri dari minyak agarwood bouya dengan rasio terhadap *dimethylsulfoxide* (DMSO) yang digunakan adalah 1%, 5%, 10%, 15% dan 20% yang telah dicampur dengan DMSO sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 10 menit dalam Erlenmeyer. Selanjutnya, Tween 80 dimasukkan sedikit demi sedikit selama 5 menit sambil dilakukan pengadukan. Fase minyak yang terbentuk kemudian dipindahkan ke dalam Erlenmeyer yang sudah berisi fase cair yakni aquadest kemudian dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* selama 15 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Nanoemulsi minyak agarwood bouya kemudian dilakukan sonikasi dengan frekuensi 50KHz selama 45 menit pada suhu ruang. Nanoemulsi minyak agarwood bouya yang terbentuk tidak berwarna dan jernih.

Karakterisasi nanoemulsi

Nanoemulsi minyak agarwood bouya yang telah terbentuk dilakukan karakterisasi ukuran dan kejernihannya. Ukuran droplet dianalisa menggunakan instrumen PSA di Pusat Penelitian Nanosains dan Nanoteknologi (PPNN), Institut Teknologi Bandung (ITB). PSA yang digunakan menggunakan teknik *dynamic light scattering* (DLS) yang terdiri dari pengukuran intensitas hamburan cahaya pada sudut tertentu saat mengenai partikel Brownian. Ukuran partikel nanoemulsi tersebut dilakukan dengan memasukkan data fluktuasi intensitas hamburan cahaya pada persamaan Stokes-Einstein. Partikel yang terdispersi dalam nanoemulsi akan mengikuti suatu pola pergerakan acak tertentu yang disebut Gerakan Brown. Persamaan Stokes-Einsten tersebut digunakan pada teknik DLS dengan cara memodelkan hubungan antara mobilitas partikel Brownian dengan ukuran partikel. Analisa kejernihan nanoemulsi dilakukan dengan bantuan instrumen *spectrophotometry* UV-VIS dengan panjang gelombang 630 nm

untuk mengukur persentase transmittan (%T). Dimana nanoemulsi yang baik memiliki %T mendekati air yakni 100%.

Uji aktivitas antibakteri

Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri pada bakteri *multidrug resistant* (MDR) dan non-MDR adalah Kirby- Bauer. Kultur bakteri (10^6 cfu/mL) yang telah diinkubasi kemudian dilakukan *swab* pada cawan Petri steril yang berisi media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Nanoemulsi minyak agarwood bouya sebanyak 50 μ L sesuai dengan masing-masing konsentrasi yang digunakan (1%, 5%, 10%, 15%, dan 20%) dimasukkan ke dalam plat tetes yang berisi cakram dan dibiarkan berdifusi selama satu jam pada suhu ruang. Cakram yang telah berdifusi selanjutnya dimasukkan pada cawan Petri yang sudah berisi kultur bakteri. Kultur dibiakkan dalam inkubator suhu 37°C selama 24 jam. Kontrol negatif yang digunakan yaitu *dimethylsulfoxide* (DMSO) dan kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik vankomisin 10 μ g. Zona hambat dihitung berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk dengan kriteria Resisten (R), Intermediet (I), Sensitif (S) dan kriteria sensitif untuk vankomisin menurut *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) adalah >15 mm. Pengulangan dilakukan sebanyak tiga kali.

Analisa data

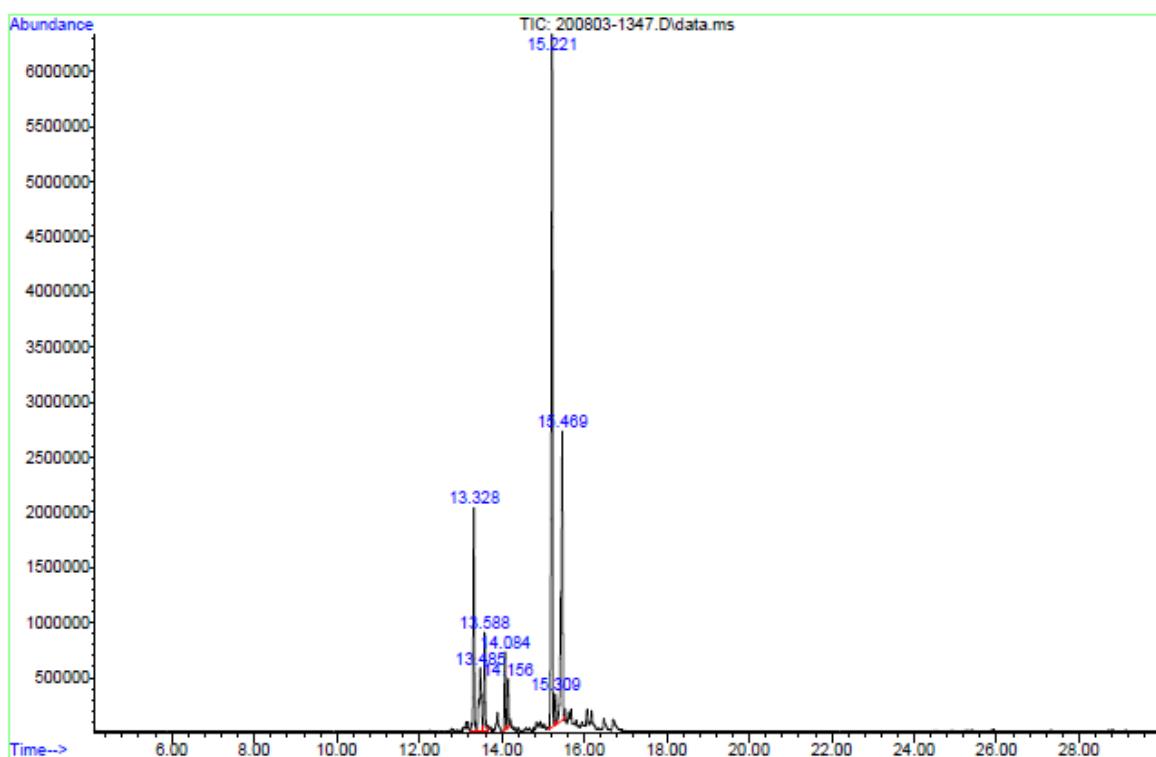
Penelitian ini dilakukan dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan *software Statistical Package for the Social Science* (SPSS) 16 dengan pendekatan deskriptif kualitatif untuk mengetahui variasi konsentrasi nanoemulsi minyak. Hasil data disajikan dalam bentuk gambar, grafik, dan tabel.

HASIL

Hasil analisa minyak agarwood bouya ditemukan dua data antara lain kromatogram yang berasal dari hasil analisa kromatografi gas (GC) dan *spectra massa* dari hasil analisa spektroskopi massa (MS). Kromatogram (Gambar 1) dari analisa GC menunjukkan tiga puncak senyawa yaitu selina-3,7(11)-diene, β -gurjunene, dan α -selina yang masing-masing terdapat pada waktu retensi 13.328, 15.221, dan 15.469 menit (Tabel 1). Nanoemulsi yang terbentuk dilakukan karakterisasi menggunakan PSA untuk mengetahui ukuran yang terbentuk dan untuk mengetahui kejernihannya diukur dengan *spectrophotometry UV-Vis* pada panjang gelombang 630 nm (Tabel 1). Berdasarkan analisa menggunakan PSA menunjukkan bahwa nanoemulsi minyak agarwood bouya terkecil sebesar 17.7 nm pada konsentrasi 1%. Pada konsentrasi 5%, 10%, 15%, dan 20% masing-masing didapatkan secara berturut-turut adalah 47 nm, 161.3 nm, 162 nm, dan 164.6 nm. Hasil kejernihan yang diperoleh dengan mengukur persentase transmitan (%T) menunjukkan hasil bahwa nanoemulsi yang didapatkan mendekati jernihnya air yaitu 99%.

Aktivitas antibakteri nanoemulsi agarwood bouya (Gambar 4) hanya mampu menghambat bakteri *multidrug resistant* (MDR) pada *E. coli* penghasil ESBLs ATCC 35218 dengan zona hambat mencapai 3.3 mm dan termasuk dalam kategori resisten pada konsentrasi 20% (Tabel 2). Sedangkan pada bakteri MDR seperti *S. aureus* ATCC 43300 dan *K. pneumoniae* ATCC 8724 memiliki zona hambat yang sama yakni 0,4 mm. Konsentrasi yang sama pada nanoemulsi agarwood bouya mampu menghambat bakteri non-MDR *E. coli* ATCC

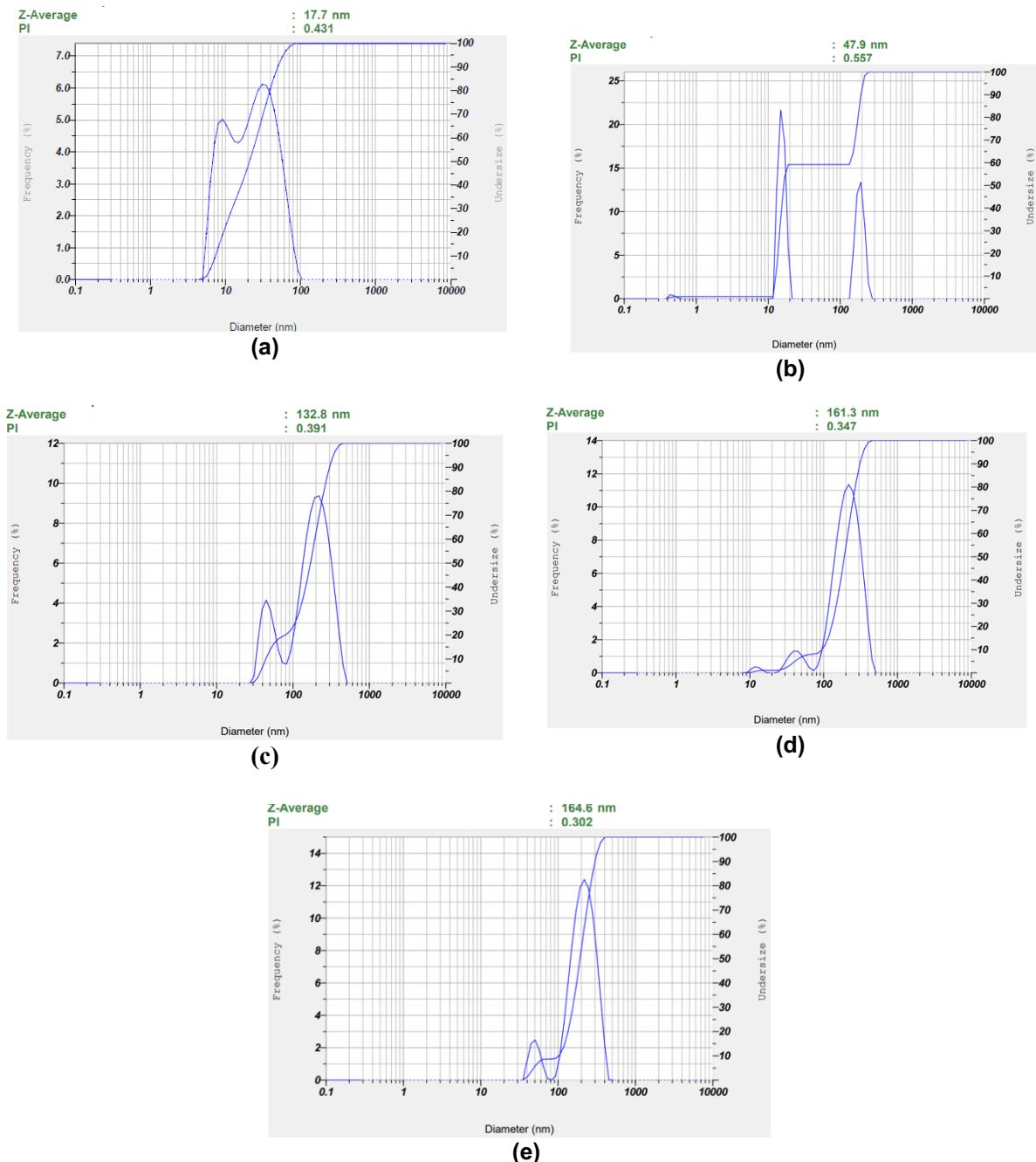
25922 engan zona hambat sebesar 13,3 mm dan masuk kategori aktif sedangkan pada *S. aureus* ATCC 25923 dan *K. pneumoniae* masing-masing memiliki zona hambat secara berurutan sebesar 2,6 mm dan 3,3 mm.



Gambar 1. Hasil kromatogram minyak agarwood bouya dengan instrumen GC-MS.

Tabel 1. Komponen minyak agarwood bouya dari hasil GCMS

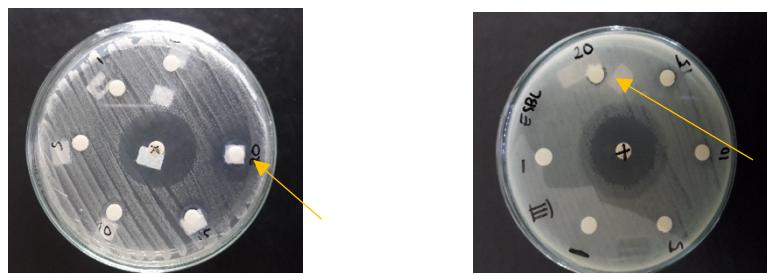
No	Waktu Retensi (menit)	Area (%)	Tinggi (%)	Komponen
1.	13.328	11,78	12,020	α -Selinene
2.	13.485	7,08	7,227	β -Selinene
3.	13.588	6,19	6,312	Eudesma-3,7(11)-diene
4.	14.084	1,97	4,268	α -Elemene
5.	14.156	4,18	2,599	β -Maaliene
6.	15.221	2,55	44,160	Selina-3,7(11)-diene
7.	15.309	43,29	1,641	γ -Eudesmol
8.	15.469	1,61	21,774	β -Gurjunene



Gambar 2. Gambar hasil ukuran nanoemulsi minyak agarwood bouya pada konsentrasi (a) 1%; (b) 5%; (c) 10%; (d) 15%; dan (e) 20%

Tabel 2. Persen transmitan, ukuran droplet dan *Polydispersity index* nanoemulsi agarwood bouya yang terbentuk

Rasio Minyak	Presentase Transmision (%)	Ukuran Droplet Nanoemulsi (nm)	Polydispersity Index (PI)
1%	99,350	17,7	0,431
5%	99,304	47,9	0,557
10%	99,261	132,8	0,391
15%	99,265	161,3	0,347
20%	99,349	164,6	0,302



Gambar 4. Hasil uji aktivitas nanoemulsi minyak agarwood bouya pada bakteri *E. coli* (kiri) dan *E. coli* penghasil ESBLs (kanan)

Tabel 3. Hasil uji aktivitas nanoemulsi minyak agarwood bouya terhadap bakteri *multidrug resistant* (MDR) dan non-MDR

Rasio Minyak	Rerata Zona Hambat ± SD (mm)					
	<i>Esherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Esherichia coli</i> ESBL ATCC 35218	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	MRSA ATCC 43300	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 8724	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL ATCC 700603
1%	-		-	-	-	-
5%	-		-	-	-	-
10%	-		-	-	-	-
15%	4,2 ± 0,11		-	-	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
20%	13,3 ± 0,17	3,3 ± 0,21	2,6 ± 0,15	0,4 ± 0,1	3,3 ± 0,32	0,4 ± 0,1
Kontrol (+)	23,8 ± 0,53	14,2 ± 0,75	5 ± 0,1	14 ± 0,95	10,9 ± 0,9	9 ± 0,95
Kontrol (-)	-	-	-	-	-	-

PEMBAHASAN

Minyak atsiri atau nama lain berupa minyak eteris/ minyak terbang (*ethereal oil, volatile oil*) merupakan minyak yang dihasilkan oleh tumbuhan. Minyak agarwood bouya sendiri dihasilkan dari tumbuhan *A. agallocha*, dimana minyak ini mudah menguap pada suhu kamar tanpa dekomposisi, mempunyai rasa getir, berbau wangi sesuai dengan bau tumbuhan penghasilnya, umumnya larut dalam pelarut organik dan tidak larut dalam air (Pratama *et al.*, 2016). Komponen minyak agarwood bouya yang ditemukan adalah selina-3,7(11)-diene dan β -gurjunene terbukti memiliki mekanisme kerja untuk menghambat bakteri patogen. Selina-3,7(11)-diene merupakan senyawa yang mempunyai mekanisme dalam melawan bakteri patogen seperti *Bacillus cereus* ATCC 10876, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella thypimurium* ATCC 14028, dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Rialita *et al.*, 2015). Sedangkan β -gurjunene termasuk dalam golongan Sequisterpenes yang merupakan senyawa metabolit sekunder dan golongan terpenoid. Senyawa ini memiliki aktivitas dalam melawan bakteri dengan cara merusak membran plasma. Penelitian dengan menggunakan pelarut ekstrak metanol kulit batang kecapi (*Sandoricum koetjape*) yang banyak mengandung gurjune dan mampu melawan jamur patogen *Candida albicans* dengan sangat kuat (Winarsih & Sunarto, 2011). Komponen lain pada minyak agarwood bouya dengan persentase sedikit diantaranya adalah eudesma, elemene, maaliene, dan eudesmol. Eudesma pada minyak agarwood bouya memiliki kandungan rendah yakni 6% dan paling tinggi komponen tersebut ditemukan pada tanaman *Commiphora molmol* dengan konsentrasi 15,99% yang merupakan minyak esensial dan mampu melawan empat bakteri MDR yakni MRSA, *E.coli*, *P. aeruginosa*, dan *K. pneumoniae* (Khalil *et al.*, 2020). Alpha elemen yang terkandung pada agarwood bouya sebesar

4,268% dan tidak memiliki fungsi sebagai antibakteri. Beta-elemen yang memiliki fungsi sebagai antibakteri dengan kandungan sebesar 47% yang berasal dari tanaman *Nigella damascena* L. yang mampu menghambat bakteri Gram-positif, Gram-negatif, jamur, dan *Mycobacterium tuberculosis* (Sieniawska *et al.*, 2018). Beta-maaliene yang terdapat pada minyak ini juga berfungi sebagai antibakteri pada Gram-positif dan Gram-negatif tetapi tidak pada *Listeria monocytogenes* (Barros *et al.*, 2012). Beta-maaline tersebut ditemukan pada bakteri *psychrotrophic* yang diisolasi dari mata air jernih di daerah Patagonian, Amerika Selatan (Barros *et al.*, 2012). Eudesmol merupakan kandung dari minyak atsiri yang selain terdapat pada agarwood bouya dengan kadar kecil (1,641%), namun dengan kadar besar (23,70%) yang terdapat pada minyak *Guatteriopsis friesiana* mampu menghambat sebelas spesies bakteri patogen (Costa *et al.*, 2008).

Nanoemulsi merupakan sediaan yang terdiri dari fase organik dan fase minyak yang terdispersi dengan bantuan surfaktan dalam skala nanometer (<300 nm) (Klang & Valenta, 2011; Pascual-Villalobos *et al.*, 2019). Nanoemulsi memiliki luas permukaan yang tinggi, lebih stabil, reaktivitasnya lebih spesifik untuk bahan obat dalam variasi dosis serta nanoemulsi ini mampu meningkatkan regulasi sistem penghantaran obat dalam tubuh (Iravani *et al.*, 2014). Nanoemulsi minyak agarwood bouya yang terbentuk memiliki karakteristik berupa cairan jernih dan bening. Pada konsentrasi yang lebih tinggi yakni 20% memiliki warna lebih kontras dibandingkan dengan konsentrasi nanoemulsi yang lain dengan konsentrasi kecil. Karakteristik ini kemudian dilanjutkan dengan mengukur *droplet* yang terbentuk menggunakan instrumen PSA yang menerapkan prinsip *Laser Diffraction* (LAS). Prinsip tersebut adalah melewatkannya partikel-partikel pada seberkas sinar dan cahaya yang dihamburkan oleh partikel tersebut kemudian dikumpulkan dengan melebihi rentang sudut yang berhadapan langsung. Distribusi dari intensitas yang dihamburkan oleh partikel-partikel tersebut (Anindya, 2018). Pada hasil analisa ukuran nanoemulsi yang terbentuk menunjukkan bahwa konsentrasi nanoemulsi minyak agarwood bouya 1% memiliki ukuran paling kecil dibandingkan konsentrasi yang lain yakni 17,7 nm. Konsentrasi nanoemulsi yang besar (20%) memiliki ukuran yang paling besar juga sebesar 164,6 nm. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi minyak atsiri yang digunakan sebanding dengan ukuran nanoemulsi yang terbentuk. Berdasarkan pengukuran dari nanoemulsi agarwood bouya menggunakan PSA juga didapatkan nilai *Polydispersity Index* (PI) yang masing masing dari konsentrasi 1%, 5%, 10%, 15%, dan 20% secara berurutan sebesar 0,43, 0,55, 0,39, 0,34 dan 0,30. Konsentrasi kecil yakni 1% dan 5% memiliki nilai PI lebih dari 0,3 yang menunjukkan partikel nanoemulsi yang heterogen sedangkan pada konsentrasi 10%, 15%, dan 20% memiliki nilai PI kurang dari atau mendekati 0 sehingga menunjukkan partikel nanoemulsi yang dihasilkan adalah homogen (Pegi *et al.*, 2011). Hal ini dapat disebabkan dari komposisi minyak dan air yang digunakan pada nanoemulsi, dimana pada komposisi minyak yang lebih rendah dibandingkan dengan komposisi air memiliki nilai PI yang besar sedangkan pada komposisi minyak yang hampir sama dengan komposisi air atau lebih banyak menyebabkan terdistribusinya komponen minyak dan air sehingga menghasilkan nanoemulsi yang memiliki nilai PI kurang dari 0 (homogen) (Danaei *et al.*, 2018). Perlu juga adanya variasi jumlah surfaktan yang diberikan, lama waktu pencampuran dan kecepatan pemutaran dengan *magnetic stirrer*, serta lama waktu sonifikasi untuk mendapatkan ukuran nanoemulsi yang memenuhi kriteria walaupun jumlah kadar minyak atsiri yang digunakan besar. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu, dimana

konsentrasi nanoemulsi minyak lengkuas (*Alpinia galanga* L. Willd) 1% memiliki ukuran paling kecil yakni 19,9 nm dibandingkan konsentrasi 5% sebesar 47,9 nm (Prasetya *et al.* 2019). Untuk mendapatkan ukuran nanoemulsi yang lebih kecil perlu penambahan jumlah surfaktan. Semakin meningkat jumlah surfaktan, maka semakin banyak persediaan *droplet* untuk membungkus suatu nanoemulsi (Agustinisari *et al.*, 2014). Walaupun demikian, nanoemulsi agarwood bouya masih dalam kriteria nanoemulsi yang diharapkan karena memiliki ukuran antara 50- 300 nm (Heissen *et al.*, 2013; Pascual-Villalobos *et al.*, 2019). Pemilihan surfaktan pada pembuatan nanoemulsi minyak agarwood bouya sudah tepat yakni Tween 80. Lebih jauh Azzeem *et al.* (2009) menyebutkan bahwa pemilihan surfaktan dan ko-surfaktan sangat berpengaruh terhadap nanoemulsi yang dihasilkan. Kriteria nanoemulsi dari surfaktan dan ko-surfaktan mempengaruhi bentuk globul dari nanoemulsi yang dihasilkan (dapat diterminasi dengan *photon correlation spectroscopy*), viskositas, dan pH. Selain pemilihan jenis surfaktan, konsentrasi surfaktan yang digunakan ikut berpengaruh terhadap ukuran nanoemulsi yang terbentuk. Penelitian terdahulu menyatakan bahwa Tween dan *Sodium Deodecyl Sulfat* (SDS) lebih efektif membentuk droplet dengan ukuran nano yang lebih kecil dibandingkan surfaktan yang berasal dari biopolimer seperti caseinat. Tween merupakan jenis surfaktan non-ionik yang berbeda dalam nilai *Hydrophylic Licophytic Balance* (HLB) yang umumnya digunakan untuk mengukur efisiensi emulgator yang digunakan. Nilai HLB Tween-80 lebih rendah dibandingkan Tween-20 (Agustinisari *et al.*, 2014). Tween-20 cenderung lebih larut dalam air, dimana semakin tinggi nilai HLB maka semakin besar kelarutannya dalam air. Jadi, selain jumlah surfaktan, penggunaan surfaktan dengan HLB yang lebih tinggi ikut berperan dalam menghasilkan *droplet* nanoemulsi yang terbentuk. Selain ukuran nanoemulsi, kejernihan juga penting untuk dianalisa terhadap nanoemulsi yang terbentuk (Agustinisari *et al.*, 2014). DMSO pada penelitian ini digunakan sebagai pelarut pada minyak agarwood bouya, dimana penelitian sebelumnya menyatakan bahwa DMSO mampu mendispersikan kandungan flavonoid pada minyak dan merupakan pelarut dipolar yang mampu berinteraksi dengan sifat *hydrophobic* pada minyak dan molekul air serta kemampuanya berinteraksi dengan protein globular (Sachin & Singh, 2019). DMSO termasuk pelarut yang sering digunakan pada pembuatan nanoemulsi karena sifatnya tidak toksik dan tidak memberikan pengaruh pada karakteristik fisiokimia (Primo *et al.*, 2008). Penelitian Chen *et al.* (2012) menunjukkan bahwa penggunaan nanoemulsi sebagai *anticancer drug-camptothecin* (CPT) lebih cepat diserap tubuh secara *in-vitro* sebesar 39,2% dalam waktu 48 jam dibandingkan *Phopsat Buffer Saline* (PBS) yang hanya diserap sebesar 6,9% dalam waktu yang sama. Selain ukuran nanoemulsi, kejernihan juga penting untuk dianalisa terhadap nanoemulsi yang terbentuk (Agustinisari *et al.*, 2014).

Karakterisasi kejernihan nanoemulsi minyak agarwood bouya yang terbentuk dilakukan dengan menggunakan instrumen *spectrophotometry* UV-Vis. *Spectrophotometry* UV-Vis umumnya digunakan untuk mendekripsi suatu senyawa baik padat maupun cair berdasarkan pada absorbansi foton dengan panjang gelombang antara 200-700 nm (Kock *et al.*, 2010). Trasmitan merupakan daya radiasi sinar yang diteruskan atau yang keluar dari kuvet dan daya radiasi sinar yang masuk dalam kuvet. Berbeda dengan absorbansi, dimana daya radiasi sinar yang diserap oleh larutan (Irawan, 2019). Oleh karena itu, untuk mengukur kejernihan suatu larutan digunakan persentase transmitan (%T). Nanoemulsi yang baik memiliki kejernihan sama seperti air dan tidak berwarna. Hasil analisa %T pada nanoemulsi

yang terbentuk hampir semuanya mendekati 100% baik pada nanoemulsi yang berkonsentrasi tinggi maupun rendah. Pada pembuatan nanoemulsi yang terbentuk keruh dapat ditambahkan surfaktan SDS yang akan menurunkan tingkat absorpsi dan meningkatkan transparansi. SDS dapat mengurangi ukuran partikel dan laju absorpsi yang berbanding lurus dengan ukuran partikel (Moradi & Barati, 2019). SDS merupakan surfaktan anionik yang dapat menurunkan tegangan permukaan pada larutan sedangkan Tween-80 merupakan surfaktan non-ionik, bersifat biokompatibel dan non-toksik (Moradi & Barati, 2019).

Aktivitas antibakteri nanoemulsi minyak agarwood bouya terhadap bakteri *E. coli* penghasil ESBLs ATCC 35218 memiliki aktivitas paling tinggi dibandingkan dengan bakteri MDR yang lain dengan diameter zona hambat sebesar 3,3 mm pada konsentrasi nanoemulsi 20%, namun masuk dalam katogeri resisten. Perlu konsentrasi yang lebih tinggi untuk dapat menghampat bakteri MDR yang diujikan. Uji aktivitas nanoemulsi pada bakteri non-resisten paling baik diperlihatkan oleh bakteri *E. coli* ATCC 25922 dengan diameter zona hambat sebesar 13,3 mm dan termasuk dalam kategori intermediet dibandingkan bakteri non MDR yang lain. Penelitian terdahulu dengan teknik *pour plate* pada nanoemulsi minyak timi dan *rosemary* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* (Moradi & Barati, 2019). Berdasarkan hasil tersebut maka nanoemulsi minyak agarwood bouya berpotensi sebagai agen antibakteri pada *E. coli* yang merupakan penyebab tertinggi infeksi saluran kemih dan infeksi saluran pencernaan. Mekanisme kerja nanoemulsi minyak agarwood bouya berkaitan dengan senyawa yang terkandung didalamnya yang mampu merusak membran sel bakteri yang memiliki sifat selektif permeabel (Quantrin *et al.*, 2017). Mekanisme kerja antibakteri ini berkaitan erat dengan toleransi instrinsik. Bakteri Gram-negatif dalam hal ini *E. coli* lebih sensitif dibandingkan dengan Gram-positif (*S. aureus*). Tebal tipisnya dinding sel dalam hal ini peptidoglikan memiliki peranan penting. Nanoemulsi yang memiliki luas permukaan yang luas dapat mendorong bakteri untuk berdifusi ke dalam sel sehingga mempengaruhi interaksi elektrostatik antara muatan positif pada kandungan senyawa nanoemulsi dengan muatan negatif pada dinding sel bakteri. Selain kandungan senyawa pada nanoemulsi agarwood bouya, mekanisme antibakteri juga dipengaruhi oleh surfaktan. Surfaktan mampu mempengaruhi kelarutan pada senyawa antimikroba pada minyak atsiri. Beberapa penggunaan nanoemulsi yang beredar masih dalam sediaan transdermal, suatu sediaan yang diberikan melalui kulit dan memberikan efek sistemik seperti *gamma tocopherol*, kafein, plasmid DNA, aspirin, metil salisilat, insulin, dan *nimesulide* (Simmonazzi *et al.*, 2018). Nanoemulsi agarwood bouya kedepannya dapat dibuat sediaan yang stabil baik secara oral maupun topikal yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri resisten penyebab infeksi lokal maupun sistemik.

KESIMPULAN

Nanoemulsi minyak agarwood bouya yang terbentuk paling kecil memiliki diameter 17,7 nm (konsentrasi 1%) dan paling besar yakni 164,6 (konsentrasi 20%). Pada konsentrasi nanoemulsi tertinggi sebesar 20% hanya mampu menghambat pada bakteri *multidrug resistant* (MDR) yakni *E. coli* penghasil ESBL ATCC 35218 dengan diameter zona hambat 3,3 mm, sedangkan pada bakteri MDR lain tidak terdapat aktivitas antibakteri. Pada bakteri non-MDR paling baik yakni *E. coli* ATCC 25922 dengan zona hambat sebesar 13,3 dan kategori intermediet.

SARAN

Saran untuk penelitian selanjutnya berupa pembuatan nanoemulsi minyak agarwood bouya dengan konsentrasi yang lebih tinggi dengan variasi dan jenis surfaktan yang berbeda tiap konsentrasinya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi STIKES Rumah Sakit Anwar Medika Sidoarjo yang telah memberikan dukungan terhadap kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustinisari, I., E.Y. Purwani, N. Harimurti, dan S. Yuliani. 2014. Aktivitas Antimikroba Nanoemulsi MInyak Biji Pala. *Jurnal Penelitian Pascapanen Pertanian*. 11(1): 1-8.
- Anindya, A. L. 2018. Particle size analyser: beberapa penggunaan instrumen hamburan cahaya. In *Seminar Nasional Instrumentasi, Kontrol dan Otomasi* (pp. 59-62).
- Azeem, A., Rizwan, M., Ahmad, F.J., Iqbal, Z., Khar, R.K., Aqil, M. and Talegaonkar, S., 2009. Nanoemulsion components screening and selection: a technical note. *Aaps Pharmscitech*, 10(1), pp.69-76.
- Bilia, A.R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., and Bergonzi, M.C. 2014. Essential Oils Loaded in nanosystems: a developing strategy for a succesful therapeutic approach. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2014: 1-14.
- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A. 2017. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Mikrobiologi Kedokteran* Edisi 27. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Canton, R and Coque, T. M. 2008. Prevalence and spread of Extended Spectrum Beta Lactamases producing Enterobacteria in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 14(1): 144-153
- Chander, A. and Shrestha, C.D. 2013. Prevalence of Extended Spectrum Beta Lactamase Producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae urinary isolates in a tertiary care hospital in Kathamndu, Nepal. *BMC Research Notes*. 6 (487): 1-6.
- Chen, Y., Gao, Y., Chen, H., Zeng, D., Li, Y., Zheng, Y., Li, F., Ji, X., Wang, X., Chen, F. and He, Q., 2012. Engineering inorganic nanoemulsions/nanoliposomes by fluoride-silica chemistry for efficient delivery/co-delivery of hydrophobic agents. *Advanced Functional Materials*, 22(8), pp.1586-1597.
- Costa, E. V., Teixeira, S. D., Marques, F. A., Duarte, M. C., Delarmelina, C., Pinheiro, M. L. B., & Maia, B. H. L. S. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon Guatteriopsis species. *Phytochemistry*, 69(9), 1895-1899.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S. and Mozafari, M.R., 2018. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), p.57.
- Dye, C. After 2015: Infectious disease in a new era of health and development. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*. 369: 20130426.

- Hessien, M., Singh, N., Kim, C. and Prouzet, E. 2011. Stability and tunability of O/W nanoemulsions prepared by phase inversion composition. *Langmuir*, 27(6), pp.2299-2307.
- Iravani S, H. Korbekandi, S.V. Mirmohammadi, B. Zolfaghari B. 2019. Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical, and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 9 (6): 385 – 406.
- Irawan, A. 2019. Kalibrasi Spektrofotometri Sebagai Penjaminan Mutu Hasil Pengukuran dalam Kegiatan Penelitian dan Pengujian. *Indonesian Journal of Laboratory*. 1(2): 1-9.
- Khalil, N., Fikry, S., & Salama, O. 2020. Bactericidal activity of Myrrh extracts and two dosage forms against standard bacterial strains and multidrug-resistant clinical isolates with GC/MS profiling. *AMB Express*, 10(1), 1-10.
- Klang, V. and Valenta, C. 2011. Lecithin-based nanoemulsions. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21(1), pp.55-76.
- Kuntaman, K., Santoso, S., Wahjono, H., Mertaniasih, N.M., Lestari, E.S., Farida, H., Hapsari, R., Firmanti, S.C., AS, N., Santosaningsih, D. and Purwono, P.B. 2012. The sensitivity pattern of extended spectrum beta lactamase-producing bacteria against six antibiotics that routinely used in clinical setting. *Journal of the Indonesian Medical Association*, 61(12).
- Liu, Y., Bai, P., Woiching, A.K., Charpin-El, Hamri, G., Ye, H., and Folcher, M. 2018. Immunomimetic Designer Cells Protect Mice from MRSA Infection. *MRSA*. 174(2): 259-270.
- Medina, E. and Pieper, D.H. 2016. Tackling Threats and Future Problems of Multidrug Resistance Bacteria. *Current Top Microbial Immunology*. 2016(398): 3-33.
- Moradi, S. and Barati, A. 2019. Essential Oils Nanoemulsions: Preparation, Characterization, and Study of Antibacterial Activity against Escherichia coli. *International Journal Nanoscience Nanotechnology*. 15k(3): 199-210.
- Pacios, O., Blasco, L., Bieriot, I., Fernande- Garcia, L., Gonzalez-Barcanda, M., Ambroa, A., Lopez, M., Bou, G., and Tomas, M. 2020. Strategies to Combat Multidrug-Resistant and Persistent Infectious Disease. *Antibiotics*. 9(65): 1-20.
- Pascual-Villalobos, M.J., Guirao, P., Díaz-Baños, F.G., Cantó-Tejero, M. and Villora, G., 2019. Oil in water nanoemulsion formulations of botanical active substances. In *Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives* (pp. 223-247). Academic Press.
- Pegi, A. G., Alenka, Z., Julijana, K., Polona, J. & Janez, K. 2011. Preparation of Nanoparticles by Using a Vibrating Nozzle Device. US: Patent Application.
- Pratama, A.Y., Bawa, I.G.A.G dan Gunawan, I.W.G. 2016. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Minyak Atsiri Tumbuhan Sembukan (*Paederia foetida* L.) dengan Metode Kromatografi Gas- Spektroskopi massa (GC-MS). *Jurnal Kimia*. 10(1): 149-154.
- Prasetya, Y. A., Nisyak, K., & Amanda, E. R. 2019. Aktivitas Antibakteri Nanoemulsi Minyak Lengkuas (*Alpinia galanga* L. Willd) dalam menghambat pertumbuhan *Helicobacter pylori*. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 7(3), 136-142.
- Pratiwi, S.T. 2008. Mikrobiologi Farmasi, Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Primo, F.L., Bentley, M.V. and Tedesco, A.C., 2008. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan®/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic

- therapy skin cancer treatment. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 8(1), pp.340-347.
- Quantrin P.M., Verdi, C.M., Souza, M.E., Gogol, S.N., Klein, B., Gundel, A., Wagner, R., Vaucher, R.D., Ourique, A.F., and Santos, R.C.V. 2017. Antimicrobial and antibiofilm activities of nanoemulsions containing Eucalyptus globulus oil against *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* sp. *Microbial Pathogenesis*. 112(XX): 230-242.
- Rialita, T., Rahayu, W.P., Nuraida, L., dan Nurtama, B. 2015. Aktivitas Antimikroba Minyak Esensial Jahe Merah (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*) dan Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) Terhadap Bakteri Patogen dan Perusak Pangan. *Agritech*. 35(1): 43-52.
- Rossi, G.G., Guterres, K.B., Bonez, P.C., Gundel, S.S., Aggertt, V.A., Siquiera, F.S., Ourique, A.F., Wagnerd, R., Klein, B., Santoz, R.C. V, and Campos, M.M.A. 2017. Anbtibiofilm activity of nanoemulsions of *Cymbopogon flexosus* against rapidly growing mycobacteria. *Micrrobial Pathogenesis*.113: 335-341.
- Sari, R., Muhami, M., and Fajriaty, I. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Gaharu (*Aquilaria microcarpa* Baill.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Proteus mirabilis*. *Pharmacy Science Research*. 4(3):143–154.
- Sachin, K.M. and Singh, M., 2019. Hydrophobics of C n TAB in an aqueous DMSO–BSA nanoemulsion for the monodispersion of flavonoids. *RSC advances*, 9(28), pp.15805-15835.
- Sarojamma, V and Ramakrishna, V. 2011. Prevalance of ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Tertiary Care Hospital. *International Scholarly Research Netowrk Microbiology*. 2011: 1-5.
- Sharif, H.R., Abbas, S., Majeed, H., Safdar, W., Shamoon, M., Khan, M.A., Shoaib, M., Raza, H. and Haider, J., 2017. Formulation, characterization and antimicrobial properties of black cumin essential oil nanoemulsions stabilized by OSA starch. *Journal of food science and technology*, 54(10), pp.3358-3365.
- Simonazzi, A., Cid, A.G., Villegas, M., Romero, A.I., Palma, S.D., Bermudex, J.M. 2018. Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems. Elsevier Inc. America.
- Sieniawska, E., Sawicki, R., Golas, J., Swatko-Ossor, M., Ginalska, G., & Skalicka-Wozniak, K. 2018. *Nigella damascena* L. essential oil—a valuable source of β-elemene for antimicrobial testing. *Molecules*, 23(2), 256.
- Winarsih, K.E. & Sunarto. 2011. Identifikasi Senyawa Antifungi Dari Kulit Batang Kecapi (*Sandoricum koetjape*) dan Aktivitasnya Terhadap *Candida albicans*. *Majalah Obat Tradisional*.16(3): 170-178.
- Wolheim, C., Guerra, I.M.F., Conte, V.D., Hoffman, S.P., Schreiner, F.J., Dalmare, A.P.I., Barth, A.I., Echeverrigaray, S. and Costa, S.O.P. 2011. Nosocomial and community infenctions due to class A extended spectrum beta lactamases (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* sp. In Southern Brazil. *Brazil Journal Infectious Disease*. 15(2): 138-143.