

Pengaruh Waktu Kneading Terhadap Efektivitas Enkapsulasi Molekul Minyak Esensial Daun Ruku-Ruku (*Ocinum tenuiflorum*) pada β -Siklodektrin (β -CD)

Elfanny Delvia, Sri Benti Etika*, Hesty Parbuntari

Chemistry Department, Universitas Negeri Padang
Jln. Prof. Dr. Hamka, Air Tawar, Padang, Indonesia

*sribentietika67@gmail.com

Abstract — The leaves of ruku-ruku (*Ocinum Tenuiflorum*) contain secondary metabolites in the form of essential oils which can be used as medicinal compounds. The essential oil of ruku-ruku (*Ocinum Tenuiflorum*) is useful as an aroma therapy, cosmetic ingredient, antibacterial, anti-inflammatory and as an anticancer, however essential oils are unstable, susceptible to high temperatures, and easily oxidized. For that we need encapsulation with a coating material that can provide a solution to these problems. β -cyclodextrin is a good coating for essential oil encapsulation. Research has been conducted to prevent the disruption of inclusion complexes with frying stirring time. FT-IR analysis showed that there was a shift in wavelength between the parent molecule β -cyclodextrin and the inclusion complex, namely an increase in the inclusion complex resulting in a widening of the absorbance band. The stability of the inclusion complexes formed can be seen from the melting point of the inclusion complex which is almost close to the melting of β - cyclodextrin ($> 290\text{ }^\circ\text{C}$), the melting point of the inclusion complex with variations in the stirring time of 15 minutes, 30 minutes, and 45 minutes respectively $287\text{ }^\circ\text{C}$, $280\text{ }^\circ\text{C}$ and $278\text{ }^\circ\text{C}$. This high melting points indicates a stable inclusion complex that does not break down easily.

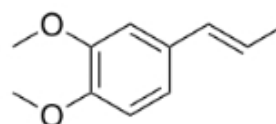
Keywords — Encapsulation, *Ocinum tenuiflorum*, β -cyclodextrin, kneading

I. PENDAHULUAN

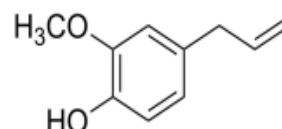
Minyak esensial adalah produk alami yang diproduksi oleh tanaman untuk kepentingan tanaman itu sendiri selain nutrisi (yaitu sebagai perlindungan atau daya tarik) oleh tumbuhan tersebut [1]. Minyak esensial adalah senyawa volatil aromatik alami yang mudah menguap, dikarakterisasi oleh dua atau tiga komponen utama pada konsentrasi yang cukup tinggi (20-70%) dibandingkan dengan komponen yang lain dalam jumlah sedikit. Aktivitas biologis minyak esensial yang utama disebabkan oleh adanya senyawa dengan konsentrasi tinggi. Karena senyawa-senyawa ini, minyak esensial telah banyak digunakan untuk aplikasi antibakteri, antijamur, antioksidan, dan antikanker yang terkenal [5]. Kemudian pada tanaman genus *Ocinum* konstituen kimia yang paling banyak ditemukan adalah eugenol, methyl isoeugenol, dan caryophyllene.

Tumbuhan ruku-ruku (*Ocinum tenuiflorum*) memiliki banyak khasiat seperti untuk memperlancar ASI (air susu ibu), pengharum badan, peluruh angin, perangsang nafsu makan, pencahar, ekspektoran, diaforetik, anti kanker, anti helmintik, analgesik dan tonik, sedangkan pada daun yang kering dapat digunakan untuk mengobati infeksi saluran pernafasan dan juga daun segar nya dapat dibuat menjadi juice yang dapat digunakan untuk mengatasi bronchitis dan penyakit kulit. namun minyak esensial daun ruku-ruku ini bersifat volatil atau mudah menguap, sensitif terhadap proses modifikasi kimia

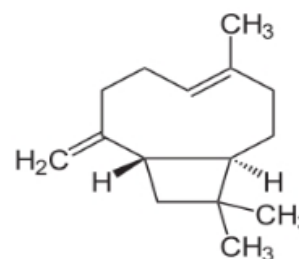
dan faktor-faktor eksternal seperti suhu [21]. yang menyebabkan komponen kimia minyak esensial menjadi tidak stabil.



Gambar 1. Struktur kimia eugenol



Gambar 2. Struktur methyl isoeugenol

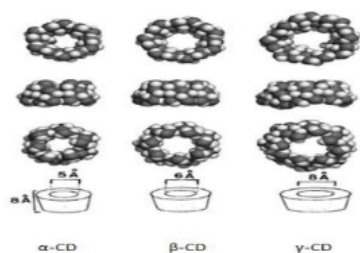


Gambar 3. Caryophyllene

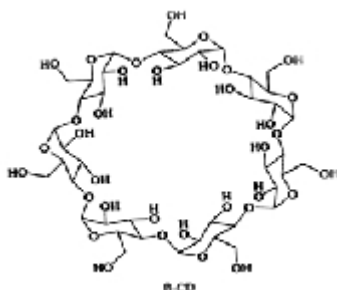
Minyak esensial memiliki sifat tidak stabil bila terjadi proses oksidasi, penguapan ataupun interaksi kimia, Salah satu metode untuk menjaga kestabilan senyawa adalah metode enkapsulasi. Enkapsulasi adalah senyawa penting yang dapat menjebak senyawa kedalam suatu senyawa berongga atau matriks [12], sehingga sifat dari minyak esensial dapat dipertahankan dengan merumuskan formulasi berbeda [11]. Enkapsulasi yang berfungsi untuk melindungi bahan inti berupa minyak ataupun enzim dari kerusakan dengan mengubah fase dari cair menjadi padat dengan menggunakan bahan penyalut [17].

Bahan penyalut yang pada umumnya dapat digunakan dalam metode enkapsulasi adalah siklodekstrin [2]. Siklodekstrin memiliki rongga berdiameter sekitar 5-8 Å, yang memungkinkan untuk dapat memasukan banyak senyawa organik untuk membentuk senyawa kompleks inklusi dalam keadaan padat atau dalam larutan, sehingga siklodekstrin memiliki struktur tiga dimensi dalam bentuk silinder kerucut atau toroidal [7]. Karakteristik khusus siklodekstrin adalah memiliki kemampuan untuk membentuk kompleks dengan berbagai molekul organik, melalui interaksi *host-guest* pada rongganya yang bersifat hidrofobik untuk menjebak senyawa non polar. Kompleks inklusi dari sistem ini terjadi pada berbagai interaksi seperti ikatan hydrogen, interaksi Van der Waals, interaksi hidrofobik, dan daya tarik elektrostatis [15]. Jenis ikatan yang terjadi pada kompleks inklusi dapat mengubah sifat fisikokimia dari molekul tamu, sehingga sifat fisika dan kimianya dapat dimodifikasi untuk meningkatkan beberapa sifat unggul dari molekul tamu [20].

Siklodekstrin terdiri dari berbagai macam jenis, salah satunya β -siklodekstrin merupakan bahan penyalut yang banyak digunakan pada proses enkapsulasi karena sudah tersedia dan mudah didapatkan, serta ukuran rongganya lebar, sehingga cocok untuk berbagai molekul tamu (*guest*) [4].



Gambar 4. Ilustrasi jenis-jenis Siklodekstrin



Gambar 5. Struktur β -siklodekstrin Dengan 7 Unit Glukosa

Ada banyak metode untuk mendapatkan kompleks inklusi seperti kneading, kopresipitasi, dry mixing (pencampuran kering), *slurry-complexation*, *freeze drying*, *spray drying*, dan evaporasi pelarut. Metode kneading adalah metode yang sederhana untuk minyak esensial karena tidak memerlukan proses pemanasan dan senyawa yang tidak larut dalam air akan dilarutkan secara perlahan untuk membentuk kompleks inklusi. Selain itu, metode ini sangat menguntungkan karena membutuhkan biaya yang rendah, memberikan hasil yang baik dari pembentukan kompleks inklusi, dan kemudahan proses pengerjaannya [6].

II. METODE PENELITIAN

A. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu minyak esensial daun ruku-ruku (*Ocinum tenuiflorum* L.), β -siklodekstrin (β -CD) dengan kemurnian 99% dan kualitas pro-analisis (Sigma Aldrich), dan Deionized Water (DW).

B. Alat

Peralatan yang dibutuhkan untuk enkapsulasi minyak esensial pada β -siklodekstrin yaitu botol vial, gelas kimia, pipet tetes, batang pengaduk, manetik stirrer, oven, gelas ukur, pipet ukur, pipet tetes, thermometer, corong Buchner, pompa vakum, botol semprot, spatula, *melting point apparatus*, *Ultrasonic Bath*, dan *Fourier Transform Infra Red* (FT-IR) (Perkin Elmer Frontier).

C. Prosedur Penelitian

1. Preparasi Kompleks Inklusi β -CD-Minyak Esensial

β -siklodekstrin (β -CD) sebanyak 0,75 gram (0,44 mmol) ditambahkan beberapa mL *Deionized Water* (DW) hingga membentuk pasta. Minyak esensial *Ocinum* sebanyak 1 mL (2,57 mmol) ditambahkan ke dalam pasta. Campuran disonikasi menggunakan *Ultrasonic Bath* dengan variasi waktu sonikasi yaitu 15 menit (A), 30 menit (B), dan 45 menit (C), masing-masing kompleks dioven vakum pada suhu 60 °C selama 10 menit, kompleks digerus dan pindahkan ke botol vial.

2. Karakterisasi Kompleks Inklusi β -CD-Minyak Esensial *Ocinum*

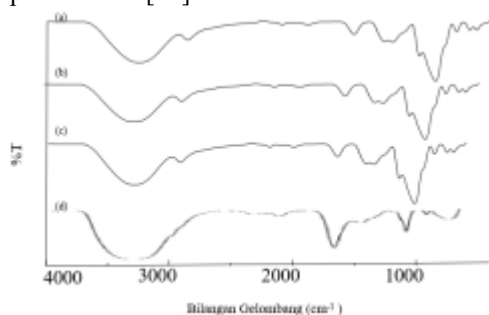
Kompleks inklusi β -CD-Minyak Esensial *Ocinum* dengan metode kneading dikarakterisasi dengan spektrofotometer *Fourier Transform Infra Red* (FT-IR) dan uji titik leleh menggunakan *melting point apparatus*.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Enkapsulasi minyak esensial *Ocinum* kedalam bahan penyalut β -siklodekstrin akan membentuk kompleks inklusi yang dibuktikan dengan karakterisasi kompleks dengan menggunakan instrument FT-IR dan sifat volatile dan kestabilan dari minyak esensial ini diharapkan dapat menjadi stabil dengan dibuktikan melalui pengujian titik leleh kompleks inklusi.

Analisis FT-IR digunakan untuk memperkirakan interaksi antara siklodekstrin dan molekul tamu (*guest*) serta

menentukan gugus fungsi suatu senyawa. Pita-pita siklodekstrin hanya berubah sedikit pada proses pembentukan kompleks inklusi[14].



Gambar 6. Spektrum FT-IR

Keterangan:

- β -siklodekstrin murni
- Penambahan minyak esensial *Ocimum tenuiflorum* 1 mL
- Penambahan minyak esensial *Ocimum tenuiflorum* 0,75 mL
- Penambahan minyak esensial *Ocimum tenuiflorum* 0,5 mL

Spektrum FT-IR dari pembuatan β -CD *Ocimum tenuiflorum* dengan menggunakan metoda kneading memiliki spektrum hampir mirip dengan β -siklodekstrin murni yang merupakan karakteristik utama dalam proses pembentukan kompleks inklusi host-guest, hasil ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan [4].

Terbentuknya kompleks inklusi ini dapat teramati dengan jelas pada bilangan gelombang 2800 cm^{-1} sampai dengan 3600 cm^{-1} pada masing-masing penambahan variasi volume minyak esensial, yang menunjukkan adanya pergeseran bilangan gelombang spektrum kompleks inklusi menuju bilangan gelombang yang lebih tinggi. Hal ini yang mengidentifikasi bahwa telah terjadinya interaksi antara β -siklodekstrin dengan molekul minyak esensial *Ocimum tenuiflorum* (telah terbentuk kompleks inklusi). Spektrum FT-IR dari β -siklodekstrin murni, hadir pada bilangan gelombang 3300 cm^{-1} menunjukkan perengangan vibrasi simetris dan asimetris pada gugus fungsi -OH dari ikatan hidrogen, bilangan gelombang lainnya pada 2924 cm^{-1} menunjukkan perengangan vibrasi pada CH_2 dan penyerapan pada bilangan gelombang 1645 cm^{-1} menunjukkan keberadaan C=O karbonil, sedangkan pada 1018 cm^{-1} menunjukkan C-H. Spectrum FT-IR yang berada didaerah sidik jari menunjukkan bahwa kompleks inklusi dengan metode kneading berbeda dari molekul β -siklodekstrin karena memiliki sinyal spektroskopi yang berbeda.

TABEL I

PERBANDINGAN ANTARA INTENSITAS B-SIKLODEKSTRIN DENGAN KOMPLEKS INKLUSI WAKTU KNEADING 15 MENIT

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm^{-1})		Perubahan ($\Delta\delta$)
	β -CD	Waktu kneading 15 menit	
(OH)	3300,86	3327,35	+26,49
(CH_2)	2924,13	2206,81	-717,32
(C=O)	1645,39	1644,01	-1,38
(C-H)	1018,75	1043,16	+24,41

TABEL III

PERBANDINGAN ANTARA INTENSITAS B-SIKLODEKSTRIN DENGAN KOMPLEKS INKLUSI WAKTU KNEADING 30 MENIT

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm^{-1})		Perubahan ($\Delta\delta$)
	β -CD	Waktu kneading 30 menit	
(OH)	3300,86	3316,82	+15,96
(CH_2)	2924,13	2304,88	-619,25
(C=O)	1645,39	1643,10	-2,29
(C-H)	1018,75	1044,19	+25,44

TABEL IIIII

PERBANDINGAN ANTARA INTENSITAS B-SIKLODEKSTRIN DENGAN KOMPLEKS INKLUSI WAKTU KNEADING 45 MENIT

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm^{-1})		Perubahan ($\Delta\delta$)
	β -CD	Waktu kneading 45 menit	
(OH)	3300,86	3315,98	+15,12
(CH_2)	2924,13	2321,96	-602,17
(C=O)	1645,39	1642,61	-2,78
(C-H)	1018,75	1044,72	+25,97

Spektrum FT-IR dari β -siklodekstrin murni, hadir pada bilangan gelombang 3300,86 cm^{-1} menunjukkan perengangan vibrasi simetris dan asimetris pada gugus fungsi -OH, sedangkan pada spectrum ketiga kompleks inklusi pada waktu kneading 15, 30 dan 45 menit menunjukkan adanya bilangan gelombang yang lebih tinggi dibandingkan dengan β -siklodekstrin murni, namun dalam waktu kneading yang berbeda terjadi penurunan bilangan gelombang setiap kompleks inklusi (3327,35 cm^{-1} , 3316,82 cm^{-1} , 3315,98 cm^{-1}) hal ini disebabkan karena berkurangnya molekul air dan masuknya minyak esensial *Ocimum* ke dalam rongga β -siklodekstrin. Seiring dengan bertambahnya waktu kneading bilangan gelombang dari ketiga kompleks inklusi dengan masing-masing waktu kneading mengalami kenaikan, begitupun dengan masing-masing waktu kneading 15, 30 dan 45 menit (1043,16 cm^{-1} , 1044,19 cm^{-1} , 1044,72 cm^{-1}). Peningkatan ini disebabkan oleh penyisipan molekul minyak esensial *Ocimum* dalam rongga yang kaya akan elektron β -siklodekstrin dan akan meningkatkan kepadatan awan elektron, yang akan mengarah pada peningkatan frekuensi pada panjang gelombang [18].

Penyerapan pada bilangan gelombang 1645 cm^{-1} menunjukkan keberadaan gugus fungsi C=O karbonil, pembentukan kompleks inklusi pada waktu kneading 15, 30 dan 45 menit terjadi penurunan bilangan gelombang (1644,01 cm^{-1} , 1643,10 cm^{-1} , 1642,61 cm^{-1}) penurunan frekuensi antara kompleks inklusi dan molekul penyusunnya adalah karena perubahan dalam lingkungan mikro yang mengarah pada pembentukan ikatan hidrogen dan kehadiran gaya Van der Waals selama interaksi untuk membentuk kompleks inklusi, hasil ini sesuai dengan observasi yang telah dilakukan oleh [18] [3].

Ketiga tabel menunjukkan beberapa peningkatan dan penurunan perubahan bilangan gelombang ($\Delta\delta$). peningkatan ini disebabkan oleh penyisipan molekul minyak esensial

Ocinum tenuiflorum, sedangkan penurunan frekuensi antara kompleks inklusi karena adanya ikatan hidrogen dan kehadiran gaya Van der Waals selama interaksi untuk membentuk kompleks inklusi. Dengan demikian, spektrum FTIR membuktikan pembentukan kompleks inklusi β -CD-Ocinum.

Pengujian titik leleh kompleks inklusi adalah salah satu pengujian stabilitas terhadap minyak esensial *Ocinum tenuiflorum*. Penggunaan β -siklodekstrin sebagai bahan penyalut minyak esensial dapat meningkatkan kestabilan minyak esensial *Ocinum tenuiflorum*, baik dari volatilitas, oksidasi, dehidrasi, hidrolisis, dan dekomposisi termal karena yang terbentuk adalah kompleks inklusi yang berbentuk padat atau kristal sehingga membuat titik leleh kompleks inklusi β -CD Ocinum hampir menyerupai titik leleh β -siklodekstrin murni yaitu (>290 °C).

TABEL IVV
PERBANDINGAN TITIK LELEH KOMPLEKS INKLUSI B-CD-OCINUM

Variasi Waktu Kneading	Titik Leleh Kompleks Inklusi
15 Menit	287°C
30 Menit	280°C
45 Menit	278°C

Perbedaan titik leleh dari ketiga kompleks inklusi berhubungan dengan jumlah molekul minyak esensial *Ocinum tenuiflorum* yang terperangkap didalam rongga β -siklodekstrin. Titik leleh kompleks inklusi pada waktu kneading 45 menit lebih rendah dari pada titik leleh kompleks inklusi pada waktu kneading 30 dan 15 menit, ini menunjukkan jumlah molekul minyak esensial daun ruku-ruku yang terperangkap lebih banyak dibandingkan dengan kompleks inklusi pada waktu kneading 30 dan 15 menit dan juga nilai titik leleh ini juga dipengaruhi oleh ikatan selama pembentukan kompleks inklusi.

Hasil ini dapat dibuktikan dengan data yang terdapat pada spektrum FT-IR, yang menunjukkan pergeseran bilangan gelombang yang cukup jauh bila dibandingkan dengan bilangan gelombang β -siklodekstrin. Perbedaan titik leleh dari ketiga kompleks inklusi juga disebabkan adanya ikatan hidrogen, gaya Van der Waals, ikatan kovalen antara β -siklodekstrin dengan molekul minyak esensial daun ruku-ruku. Efek endotermik pada ketiga variasi berhubungan dengan hilangnya gugus hidroksil pada kompleks inklusi β -CD Ocinum yang diperoleh sebagai titik leleh. Jenis perubahan dalam perilaku termal pada kompleks inklusi mengindikasikan kemungkinan interaksi antara β -siklodekstrin dan minyak Ocinum yang menyebabkan pembentukan kompleks inklusi yang lebih stabil [8] [19].

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa telah dilakukan pembentukan kompleks inklusi β -CD minyak esensial Ocinum yang telah dibuktikan dari hasil karakterisasi spektro inframerah (FT-IR) dimana:

- 1) Terdapat sedikit pergeseran spektrum dibandingkan dengan β -CD murni.

- 2) Stabilitas minyak esensial dapat dilihat dari titik leleh yang tinggi menunjukkan kompleks inklusi stabil dan tidak mudah rusak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Bapak dan Ibu Dosen Pembimbing dan rekan-rekan mahasiswa yang telah membantu dalam penulisan artikel ini.

Selanjutnya terimakasih kepada seluruh analis Laboratorium Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang atas sarana dan dukungannya.

REFERENSI

- [1] Baser, K. H.; (2010). Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications / K. Hüsni Can Baser, Gerhard Buchbauer. ISBN 978-1-4200-6315-8. Universitat Wien, Austria.
- [2] Duchène, Dominique. (2011). Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes dalam Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedicine: Current and Future Industrial Applications, First Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- [3] Hamidi, H.; Abderrahim, R.; Meganem, F.(2010). Spectroscopic studies of inclusion complex of β -cyclodextrin and benzidine diammonium dipicrate. Spectrochim. Acta A, 75, 32–36.
- [4] Lee, C.W., S.J. Kim., Y.S. Youn., E. Widjojokusumo., Y.H. Lee., J. Kim., Y.W. Lee., and R.R. Tjandrawinata. (2010). Preparation of Bitter Taste Masked Cetirizine Dihydrochloride / β -Cyclodextrin Inclusion Complex by Supercritical Antisolvent (SAS) Process. Journal of Supercritical Fluids. Vol. 55. Hal. 348–357. ISBN 0896-8446.
- [5] Majeed, Hamid., Y.Y. Bian., B. Ali., A.Jamil., U. Majeed., Q. F. Khan., K.J. Iqbal., C.F. Shoemaker and Z. Fanga. (2013). Essential Oil Encapsulations: Uses, Procedures, and Trends. The Royal Society of Chemistry Adv. 5, 58449–58463.
- [6] Marques, Cabral. Helena, M. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. Flavour Fragr. J. 2010, 25, 313–326.
- [7] Radhouan Maazaoui and Raoudha Abderrahim. 2015. Applications of cyclodextrins: formation of inclusion complexes and their characterization. Laboratory of Physics of Lamellaires Materials and Hybrids Nanomaterials. University of Carthage, Faculty of Sciences of Bizerte, Zarzouna 7021, Bizerte, Tunisia.
- [8] Roik, N. & Belyakova, L. (2011). IR Spectroscopy, X-ray diffraction and thermal analysis studies of solid ' β -cyclodextrin-para-aminobenzoic acid' inclusion complex. Phys. Chem. Solid State 1, 168–173
- [9] Rowe, C.R., Paul J Sheskey., and Mariam E Quinn. (2009). Handbook of Pharmaceutical Excipients Sixth Edition. America: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association.
- [10] Radhouan Maazaoui and Raoudha Abderrahim. 2015. Applications of cyclodextrins: formation of inclusion complexes and their characterization. Laboratory of Physics of Lamellaires Materials and Hybrids Nanomaterials. University of Carthage, Faculty of Sciences of Bizerte, Zarzouna 7021, Bizerte, Tunisia.
- [11] Sagiri, Sai Sateesh., Arfat Anis., and Kunal Pal. (2016). Review on Encapsulation of Vegetable Oils: Strategies, Preparation Methods, and Applications. Polymer -Plastics Technology and Engineering. Vol. 55, No. 3, Hal. 291–311.
- [12] Seo, Eun Ju., Min, Sang Gi., Choi, Mi Jun. (2010). Release Characteristics of Freeze-Dried Eugenol Encapsulated with β -cyclodextrin by Molecular Inclusion. Method. Journal of Microencapsulation. Vol.27 (6): 496–505.
- [13] Shirish S. Pingalea., Narayan P., Firke and Anil G. Markandeya. (2012). Therapeutic Activities of Ocinum tenuiflorum Accounted in Last Decade: A review. Journal of Pharmacy Research 2012, 5(4), 2215-2220
- [14] Singh, Ramnik., Nitin Bharti., Jyotsana Madan., S. N. Hiremath. (2010). Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes-A

- Review. Journal of Pharmaceutical Science and Technology. Vol. 2, Issue (3), Hal. 171-183.
- [15] Szejtli, J. (1998). Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. Chemical Reviews. Vol. 98, No. 5
- [16] Sri Budi Sulianti. (2008). Studi fitokimia *Ocimum* spp: Komponen Kimia Minyak Atsiri Kemangi Dan Ruku-Ruku. Cibinong Science Center-LIPI.
- [17] Supriyadi dan A. Sakha Rujita. (2013). Karakteristik Mikrokapsul Minyak Atsiri Lengkuas dengan Maltodekstrin sebagai Enkapsulan. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. Vol. 24 No. 2 ISSN: 1979-7788.
- [18] Tang, B.; Chen, Z.-Z.; Zhang, N.; Zhang J.; Wang, Y (2006). Synthesis and characterization of a novel cross-linking complex of β -cyclodextrin-o-vanilin furfaralhidrazon and highly selective spectrofluorimetric determination of trace gallium. Talanta, 68, 575–580.
- [19] Xu, J., Zhang, Y., Li, X. & Zheng, Y. (2017). Inclusion complex of nateglinide with sulfobutyl ether β -cyclodextrin: Preparation, characterization and water solubility. J. Mol. Struct. 1141, 328–334.
- [20] Zhu, Xiashi. Sun, Jing., Wu, Jun. (2007). Study on The Inclusion Interactions of B-Cyclodextrin and Its Derivative With Dyes by Spectrofluorimetry and Its Analytical Application. Talanta. Vol. 72. Hal. 237–242.
- [21] Zuidam, N and Heinrich, E. (2010). Encapsulation of Aroma dalam Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Unilever Research and Development: The Netherlands.
- [22] Zygadlo JA, Juliani HR Jr. (2000). Bioactivity of essential oil components. Curr Top Phytochem 3:203–211–3), 179–184.