

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI TEMU KUNCI terhadap
Pseudomonas aerugenose DAN APLIKASINYA
DALAM FILM EDIBLE PATI SAGU**

**Miksusanti¹, BettySri Laksmi J, Bambang Ponco, Rizal Syarief
Gatot Tri Mulyadi ,Setiawati Yusuf**

Abstrak : Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisa keaktifan anti bakteri dari minyak esensial Temu Kunci, penerapannya sebagai film antibakterial agent tepung sago yang dapat dimakan (edible film). Keaktifan minyak esensial Temu Kunci dianalisa kemampuannya sebagai pembocor *Pseudomonas aerugenose* dan mengubah morfologinya. Fenomena membocorkan dimonitor dengan Metoda Spektrometri Penyerapan Atom (AAS) dan Spektrofotometri Ultra violet. MBC minyak esensial Temu Kunci adalah 0.15v/v and 0.5(v/v) . Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa minyak esensial dapat membocorkan ion-ion anorganik Ca, Mg dan K dari bakteri dan mengubah morfologi dari bakteri tersebut. Penerapan dari minyak esensial ke film tepung Sagu sebagai antibakteria film yang dapat dimakan. Uji kualitatif keaktifan antibakteria dari film-film ditunjukkan dengan daerah inhibisi pada disk. Film menunjukkan daerah kontak yang positif dengan konsentrasi minyak lebih dari 10% (ml/g). Daerah hambatan yang ditunjukkan terjadi apabila konsentrasi minyak pada film adalah 25% (ml/g).

Kata kunci : *Pseudomonas aerugenose*, MIC, MBC, ion pembocor, Perubahan morfologi antibakteria edible film, tepung sago.

Abstract : The objective of this research are to analyze antibacterial activity of Temu Kunci essential oil and applicant the oil as antibacterial agent in sago starch edible film. Activity of antibacterial essential oil are analyzed through it's ability to leakage *Pseudomonas aerugenose* and to alter the morphology of them. Leakage phenomena were monitored with Atomic Adsorption Spectrometry (AAS) method and ultraviolet Spectrophotometry (UV). MBC Temu Kunci essential oil were 0.15v/v) and 0.5(v/v) respectively. The result shows that the essential oil can leakage the inorganic ion Ca, Mg and K from the bacteria and alter the morphology of the bacteria. Application of the oil into sago starch film can turn the film to be antibacterial edible film. The qualitative test for antibacterial activity of the films were performed with disk inhibition zone assays. The film showed positive contact area with concentration oil more than 10% (ml/g). Inhibitory zone were showed when the concentration of oil in the film was 25% (ml/g).

Key words : *Pseudomonas aerugenose*, MIC, MBC, ion leakage, morphology alteration antibacterial edible film, sago starch.

PENDAHULUAN

Peningkatan terjadinya penyakit yang ditularkan lewat makanan (*food borne disease*), diikuti terjadinya implikasi dibidang sosial dan ekonomi, mengharuskan kita untuk terus berusaha menghasilkan makanan yang aman. Salah satu cara yang dapat dilakukan adalah terus mengembangkan zat anti-mikroba alami.

Berdasarkan hal tersebut masih perlu dikaji terus metoda baru/zat baru atau modifikasi kombinasi dengan metoda yang telah ada untuk mereduksi atau mengeliminasi patogen yang menyebar lewat makanan. Metabolit sekunder yang biasanya sangat potensial sebagai antimikroba adalah minyak atsiri. Metabolit sekunder dari tanaman ini umumnya diperoleh dari tanaman dengan cara destilasi uap air. Minyak atsiri adalah campuran dari senyawa-senyawa yang mempunyai karakteristik menimbulkan aroma atau flavor yang umumnya diperoleh dari rempah, herbal aromatik, buah-buahan dan bunga. Analisis dari minyak atsiri menunjukkan bahwa dari sekian banyak komponen penyusunnya, terpenoid adalah yang paling banyak melimpah dan berada dalam bentuk hemiterpen, monoterpen, atau seskuiterpen dan turunan masing-masing senyawa. Kandungan monoterpen yang tinggi dari dalam tanaman dapat menolak berbagai predator, tetapi juga banyak yang berperan untuk menarik hewan-hewan lainnya, misalnya beberapa monoterpen terlibat dalam interaksi antar tanaman (Carson CF *et al* 2005).

Indonesia kaya akan tumbuhan yang

dapat menghasilkan minyak atsiri, salah satunya adalah minyak atsiri dari akar rimpang Temu Kunci. Minyak atsiri Temu Kunci mempunyai sifat antibakteri yang paling kuat dibandingkan minyak atsiri dari umbi lainnya seperti Jahe, Lengkuas, Kencur, Kunyit, Temu Lawak dan Temu Ireng (Dewi P dkk, 2002). Perlu dianalisa lebih lanjut fenomena antibakteri dari minyak ini dalam membocorkan dinding sel bakteri, merubah morfologi sel, dan konsentrasi terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan sebesar satu log (MIC) dan konsentrasi terkecil yang dapat membunuh semua bakteri (MBC). Analisis terhadap mekanisme ini sangat penting dilakukan karena fenomena ini berimplikasi terhadap sifat toksik minyak tersebut pada mikroba patogen dan kemungkinan terjadinya resistensi pada mikroba patogen tersebut terhadap minyak atsiri.

Selain langsung dicampurkan ke makanan, pengawet makanan juga bisa dikombinasikan dengan pengemas makanan, sehingga menghasilkan pengemas makanan yang berfungsi ganda. Sebagai *active agent* dalam *edible film*, pengawet dapat berperan mencegah masuknya mikroba dari lingkungan ke dalam makanan yang masih steril ataupun menghambat pertumbuhan mikroba yang telah terlanjur mengkontaminasi makanan. Baik untuk sistem pertama maupun sistem kedua dianjurkan zat pengawet yang diimobilisasi dalam *edibel film* tidak cepat terlepas ke dalam makanan. Pada penelitian ini film edible pati sagu dicampur dengan minyak

atsiri Temu Kunci untuk menghasilkan film edible antimikroba.

METODOLOGI

A. Bahan-bahan

Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah akuades, etanol 70%, etil asetat, aseton, spiritus, natrium bisulfit, *Nutrient Broth* (NB), *Nutrient Agar* (NA), EMBA (*Eosin Methylene Blue Agar*), NaCl 0,85%, kertas saring, membran filter steril 0,2 μm , buffer fosfat, etil asetat pa, akuabides (DDH_2O), pati sagu, gliserol, karbosimetil selulose, etanol (p.a) dan etanol teknis dan zat lainnya. Bahan baku yang akan digunakan adalah umbi Temu Kunci yang berasal dari Sukabumi. Kultur mikroba yang digunakan adalah *Pseudomonas aeruginosa*.

Alat-alat yang digunakan adalah autoklaf, Gas kromatografi - Spektroskopi Massa, Spektrofotometer UV-Vis, Spektrofotometer Serapan Atom, cawan petri, tabung reaksi, inkubator 37°C, sentrifuse, vorteks, neraca analitik, pH meter, inkubator Laminar hood, mikropipet 100-1000 μm , Bunsen, ose, syringe, alat pengujian *Tensile Strength*, alat pengujian *water vapor transmission rate bergelahr*, *Lab-blender 400 stomacher*, *distillation flask*, pompa vakum, alat penyulingan *water and steam distillation* dan alat-alat lainnya.

B. Metodologi Penelitian

Ekstraksi Minyak Atsiri serta Penentuan Komponen Kimianya

Temu Kunci dipotong melebar dan dikeringanginkan. Minyak atsiri diekstrak dari bahan tersebut dengan cara destilasi uap 100- 105°C selama 8 jam. Minyak dan air yang terdestilasi dipisahkan dengan natrium bisulfit, sehingga didapat fraksi air dan fraksi minyak. Minyak atsiri yang didapat ditentukan kandungan komposisi kimianya dengan alat Gas Kromatografi Spektrometri Massa (GC-MS).

Penentuan Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri dengan Metode Campur Untuk Penetapan MIC dan MBC (Kubo *et al*, 1992)

Penentuan MIC dilakukan berdasarkan metoda campur (*microdillution broth*). Minyak atsiri dengan konsentrasi tertentu dicampur dengan kultur bakteri uji dalam inkubator bergoyang dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Setelah itu, sebanyak 1 mL cairan kultur bakteri tersebut dicampur dengan 12 mL nutrient agar cair dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Semua pengerjaan dibuat tiga kali ulangan. Nilai MIC adalah konsentrasi minimum ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji sebanyak 90% selama 24 jam. Nilai MBC diperoleh dengan menentukan konsentrasi terendah dari 14 seri tabung uji yang menunjukkan penurunan pertumbuhan bakteri uji secara drastis (> 99,9%) setelah diinkubasi 48 jam dibandingkan dengan jumlah bakteri uji awal (nol jam).

Analisis Kebocoran Protein dan Asam Nukleat

Suspensi bakteri uji yang telah ditumbuhkan selama 24 jam dalam media nutrisi broth sebanyak 10 mL diambil dan disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 20 menit. Filtrat dibuang lalu pelet dalam tabung dicuci dengan buffer fosfat pH 7,0 sebanyak 2 kali, kemudian disuspensikan didalam 10 mL buffer fosfat pH 7,0. Selanjutnya ditambahkan minyak atsiri Temu Kunci dengan dosis 1 MIC, 2 MIC dan kontrol, diinkubasi dalam inkubator goyang selama 24 jam. Suspensi disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit, lalu disaring dengan tujuan untuk memisahkan supernatan dari sel. Cairan supernatan diambil dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dengan menggunakan spektrofotometer.

Kebocoran Ion-Ion Logam

Untuk analisa kebocoran ion-ion diukur dalam bentuk ion Ca^{2+} dan K^+ yang dilepaskan oleh sel bakteri akibat pemberian minyak atsiri Temu Kunci. Analisis kebocoran ion dilakukan pada pelet bakteri yang dipersiapkan seperti pada pengukuran kebocoran protein dan asam nukleat. Kebocoran dinyatakan dengan terukurnya ion – ion logam yang terdapat pada bakteri uji setelah dikontakkan dengan minyak atsiri Temu Kunci pada berbagai tingkat MIC. Kebocoran ion-ion K^+ dan Ca^{2+} dideteksi dengan menggunakan AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*). Larutan sel hasil kontak

dengan minyak atsiri Temu Kunci diambil untuk diukur kandungan logamnya.

Pembuatan Edible Film Antimikroba Dari Pati Sagu

Tepung sagu yang akan digunakan dalam penelitian ini dikeringkan sampai dengan kadar air kurang lebih 13% kemudian diayak dengan saringan 80 Mesh. Selanjutnya dikemas dalam kantong plastik dan disimpan dalam lemari pendingin, jika akan digunakan, maka tepung sagu dikeluarkan dari lemari pendingin dalam keadaan tertutup, dan dibiarkan di suhu ruang sampai suhunya konstan. Kemudian sampel dikeluarkan dari kantong plastik dan siap digunakan untuk penelitian.

Cara pembuatan edible film adalah sebagai berikut: Sebanyak 1 bagian tepung sagu dari persiapan tepung sagu dicampur dengan 10 bagian air destilasi dan diaduk dengan mixer skala 1 sampai homogen selama 10 menit dan disaring dengan kain saring. Suspensi pati dimasukkan ke dalam gelas piala 1000 mL dan dipanaskan diatas hot plate sambil diaduk dengan mixer skala 1 sampai mencapai suhu $\pm 65^{\circ}\text{C}$ (± 20 menit). Setelah mencapai suhu $\pm 65^{\circ}\text{C}$, ditambahkan 0,5% karboksimetilselulosa (dari volume suspensi pati) sedikit demi sedikit sambil terus dipanaskan dan diaduk dengan mixer skala 2 sampai homogen (± 5 menit). Kemudian ditambahkan 3% gliserol (dari volume suspensi pati) sedikit demi sedikit sambil

terus dipanaskan dan diaduk dengan mixer skala 1 sampai suspensi pati mengental ($\pm 72^{\circ}\text{C}$, ± 10 menit).

Suspensi pati yang sudah mengental tersebut masih banyak mengandung gas terlarut sehingga perlu dilakukan penghilangan gas menggunakan oven vakum pada tekanan 80 kPa sampai gas terlarutnya hilang (± 20 menit). Setelah semua gas terlarut hilang, suspensi yang telah mengental tersebut ditambah minyak atsiri Temu Kunci dengan volume tertentu serta diaduk dengan batang pengaduk selama 5 menit dan dituang ke pelat kaca pencetak film dan diratakan dengan pelat kaca perata film sampai membentuk lembaran yang tipis dan rata. Kemudian dibiarkan kering diudara biasa dan dimasukkan ke dalam oven ventilasi pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ selama 6 jam.

Setelah selesai pengovenan edible film dilepas dari cetakan dan diatur -nya (aw) dalam desikator sampai mencapai nilai aw kurang dari 0,6. Kemudian edible film diletakkan diatas plastik dan dimasukkan kedalam kantong plastik berkelim, serta siap untuk digunakan dalam penelitian selanjutnya.

Analisis Antimikroba edible film yang Mengandung Minyak Atsiri (Seydim A.C and G.Sarikus 2006)

Aktivitas antibakteri dari edible film diuji dengan cara penempelan edible film pada permukaan agar yang telah ditumbuhi mikroba patogen seperti yang dilakukan oleh Seydim A.C. *et al* dan Pranoto *et al* (2005). Edible film yang telah diisi dengan minyak

atsiri Temu Kunci dipotong bulat menjadi ukuran diameter 17 mm. Potongan ini ditempelkan pada cawan petri yang telah berisi media agar. Media agar tersebut sebelumnya diinokulasi dengan 0,1 mL inokulum yang mengandung 10^5 - 10^6 CFU/mL bakteri-bakteri yang akan diujikan dan diinkubasi selama 24 jam, 37°C . Edible film yang ditempelkan pada permukaan media agar diinkubasi selama 24 jam pada 37°C . Kontak area dan zona penghambatan disekitar edible film diamati dan diukur. Perlakuan dan pengamatan/pengukuran zona hambatan ini dilakukan sebanyak tiga kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstraksi dan Identifikasi Kandungan Kimia Minyak Atsiri Temu Kunci

Hasil analisa kandungan minyak atsiri Temu Kunci hasil ekstraksi dengan cara destilasi uap diberikan pada tabel 1 dibawah ini :

Tabel 1. Kandungan Minyak Atsiri Temu Kunci Hasil Ekstraksi Dengan Destilasi Uap

No.	Kandungan Kimia	RI±SD	%w/w
1.	Mirsen	7.592±0.03	4.58
2.	Kamphor	8.475±0.02	1.42
3.	Sineol	9.567±0.01	14.97
4.	Osimen	9.975±0.11	20.18
5.	Linalol	11.150±0.14	2.42
6.	Borneol	12.675±0.05	1.07
7.	Terpineol	13.142±0.05	1.52
8.	Geraniol	14.408±0.01	22.28
9.	Asam sinamat	16.925±0.03	6.06

Data GC-MS tersebut diatas menunjukkan bahwa minyak atsiri Temu Kunci terdiri dari senyawa hidrokarbon siklik dengan berat molekul rendah, senyawa hidrokarbon siklik berat molekul rendah dengan gugus fungsi hidroksil dan senyawa yang mempunyai gugus karboksilat.

Berdasarkan struktur kimianya kandungan komponen terbanyak minyak atsiri Temu Kunci tersebut adalah monoterpen hidrokarbon (mirsen, osimen), monoterpen teroksigenasi (kamphor, sineol, linalol, borneol, terpineol, geraniol), dan turunan benzen (asam sinamat). Diantara monoterpen teroksigenasi tersebut, sineol, linalol, borneol, terpineol, dan geraniol adalah senyawa monoterpen yang mengandung gugus hidroksil. Gugus ini dapat berikatan hidrogen dengan gugus hidroksil senyawa lainnya seperti alkohol. Adanya sebagian besar senyawa monoterpen dengan gugus ini membuat minyak atsiri tersebut bersifat semi polar, sehingga tidak larut dalam air, tetapi

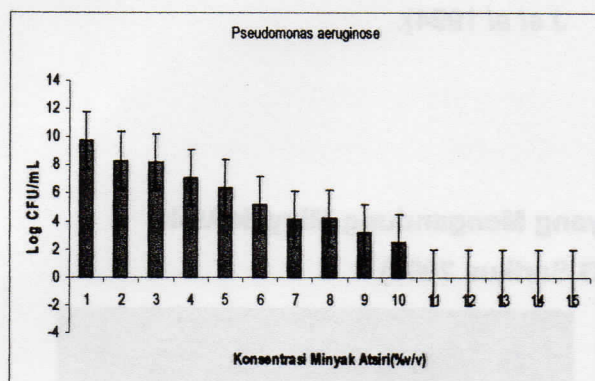
larut baik dalam alkohol (Ruberto G *et al* 2000).

Asam sinamat termasuk kelompok asam lemah, yang dapat melepaskan protonnya (H^+) dalam keadaan sedikit H^+ dan menangkap H^+ dalam kondisi kelebihan H^+ . Geraniol juga merupakan senyawa yang dapat bertindak sebagai asam yang sangat lemah, hal ini terjadi bila ikatan rangkap dalam senyawa tersebut berkonyugasi (Fessenden R and Fessenden J, 1997).

Penentuan Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri dengan Metode Campur untuk Penetapan MIC dan MBC (Kubo *et al*, 1992)

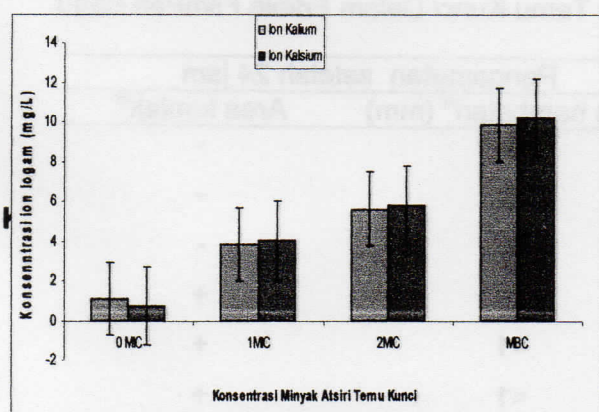
Pada umumnya minyak atsiri dikenal sebagai GRAS (Aman dikonsumsi secara berulang dalam konsentrasi tertentu). Sifat minyak atsiri yang mempunyai flavour agak menyengat, membuat penggunaannya sebagai pengawet makanan terbatas pada

konsentrasi tertentu. Berdasarkan hal tersebut, diperlukan data yang akurat tentang nilai konsentrasi minimum (efektif) dari minyak atsiri (MIC/MBC) agar ada keseimbangan antara sifat antimikroba dan flavour yang dibawanya (Mirjana Skocibusic, *et al* 2006).



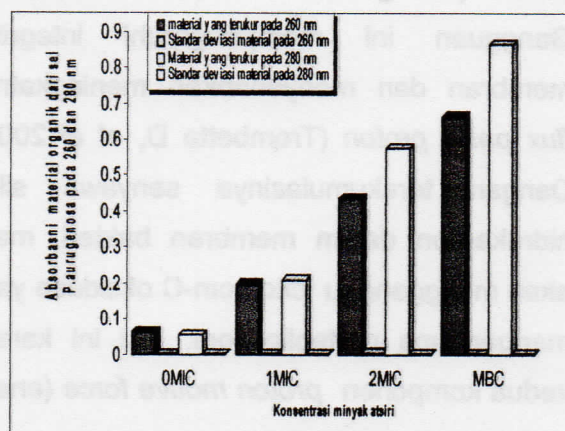
Gambar 1. Nilai variasi konsentrasi minyak atsiri dan nilai CFU/mL bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Nilai MIC dan MBC minyak atsiri Temu Kunci terhadap *Pseudomonas aeruginosa* adalah 0,01% (v/v) dan 0,2% (v/v). Minyak atsiri Temu Kunci mempunyai nilai berat jenis 25,09 g/mL, jadi MIC dan MBC minyak ini terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dalam satuan berat adalah 0,003% (b/b) dan MBC 0,064% (b/b).



Gambar 3. Kurva Kebocoran Ion logam Kalium dan Kalsium dari *Pseudomonas aeruginosa*.

Analisis Kebocoran Protein dan Asam Nukleat



Gambar 4. Kurva Kebocoran Protein dan Asam Nukleat dari *Pseudomonas aeruginosa*

Senyawa monoterpen yang teroksidasi dalam bentuk aldehid dapat menyebabkan gangguan pada bagian lipid dari membran plasma, menyebabkan perubahan sifat permeabilitas membran plasma dan menyebabkan kebocoran material intraseluler dari membran. Senyawa aldehid tersebut dapat masuk melewati sel membran masuk ke bagian dalam membran sel, berinteraksi dengan senyawa-senyawa penting intraseluler sel, sehingga kerja normal sel terganggu. (Trombetta D, *et al* 2002). Senyawa siklik hidrokarbon (terpen) yang juga merupakan salah satu komponen penyusun minyak atsiri, menunjukkan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri. Senyawa ini juga dapat mengganggu membran. Tergantung pada sifat hidrofobisitas senyawa dan membran bakteri, siklik hidrokarbon dapat masuk dan terakumulasi dalam membran. Terakumulasinya molekul hidrokarbon menyebabkan terjadinya *swelling* pada membran bilayer.

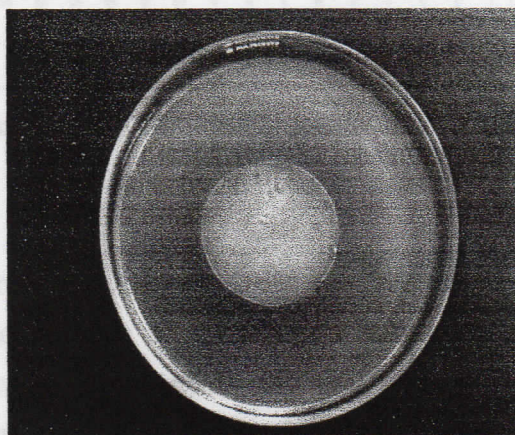
Seiring dengan ekspansi membran, terjadi pula peningkatan fluiditas membran. Gangguan ini mempengaruhi integritas membran dan menyebabkan meningkatnya *flux pasiv proton* (Trombetta D, *et al* 2005). Dengan terakumulasinya senyawa siklik hidrokarbon dalam membran bakteri, maka akan mengganggu citokrom-C oksidase yang mengandung proteoliposom. Hal ini karena kedua komponen *proton motive force* (energi

gerak proton) yaitu gradient pH dan potensial listrik terganggu. Secara umum senyawa golongan minyak atsiri menghambat bakteri dengan cara interaksi hidrofobik dengan membran, sehingga mempengaruhi fungsi membran dan membran yang mengikat protein (Sikkema J *et al* 1994).

Analisis Antimikroba *edible film* yang Mengandung Minyak Atsiri (Seydim A.C and G.Sarikus 2006)



Gambar 5. Edible sagu yang tidak berisi temu kunci pada *Pseudomonas aeruginosa*



Gambar 6. Edible sagu yang berisi temu kunci pada *Pseudomonas aeruginosa*

Tabel 2. Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Temu Kunci Dalam Edible Film Pati Sagu

Bakteri	Minyak Atsiri % (v/v=ml/g)	Pengamatan setelah 24 jam	
		Zona hambatan ^A (mm)	Area kontak ^B
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 (kontrol)	0	-
	2.5%	0	-
	5%	0	-
	10%	0	+
	20%	<1	+
	25%	<1	+

Dari hasil yang diperoleh, film edible antibakteri yang dihasilkan tidak pernah menunjukkan zona penghambatan > 1 mm. Fenomena ini menunjukkan bahwa minyak atsiri Temu Kunci terperangkap dengan baik didalam film edible pati sagu, sehingga tidak mudah keluar untuk menghambat pertumbuhan bakteri disekitarnya.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Minyak atsiri Temu Kunci mempunyai aktivitas antibakteri yang sangat baik terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Hal ini dibuktikan dengan rendahnya konsentrasi MIC dan MBC serta fenomena terjadinya kebocoran ion dan protein/asam nukleat. Perubahan morfologi yang terjadi juga mendukung daya aktivitas minyak atsiri Temu Kunci terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Aplikasi minyak atsiri ini dalam film edible pati sagu menghasilkan film yang bersifat antibakteri. Konsentrasi minimal yang membuat film edible mempunyai area kontak yang positif adalah 5% (mL/g) dan pada konsentrasi 25% (mL/g) film edible dapat menunjukkan zona hambatan. Zona hambatan yang diperoleh dari film edible tidak pernah >1mm menunjukkan bahwa minyak atsiri Temu Kunci terperangkap sangat baik kedalam film edible pati sagu.

Saran

Perlu dilanjutkan penelitian untuk mengamati perubahan genetik sel bakteri *Pseudomonas aeruginosa* akibat aktivitas

minyak atsiri Temu Kunci dan kemungkinan terjadinya resistensi bakteri terhadap minyak tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Carson CF, Brian JMee, and Thomas V.Riley. 2002, Mechanism of Action of Tea Tree Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Timen-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 6: 1914-1920.
- Dewi P, Lotulung N, Lenny S. 2002. Antimicrobial activity of several Zingiberacea essential oil, *Proceding National Seminar V "Chemsitry in Development"*, 0854-4778 Yogyakarta
- Fessenden R.J. Fessenden J.S. 1997 Kimia Organik, Penerbit Erlangga Jakarta edisi 3.
- JEOL, 1995, Specimen Preparation Methods for Scanning Electron Microscope, JEOL application Note.Tokyo. 23 p.
- Kubo A, Lunde CS, Kubo I. 1993. Antimicrobial activity of the olive oil flavour compounds. *J.Agric Food Chem* 6:999-1003.
- Mirjana Skocibusic, Nada Bezic, Alerija Dunkic. 2006, Phytochemical composition and antimicrobial activities of essential oils from *Satureja subspicata* Vis.growing in Croatia, *Food Chemistry* 96, 20-28.
- Pranoto Y, Vilas M, Salokhe Sudip K, Rakshit. 2005. Physical and Antibacterial Properties of Alginate-base Edible Film Incorporated with Garlic Oil. *Food Research International* 38:267-272.
- Ruberto, G., & Baratta,M.T(2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, 69, 167-174.

Seydim A.C and G.Sarikus. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International* 39:639-644.

Sikkema J, Jan AM de Bont, and Bert Poolman, 1994, Interaction of Cyclic Hydrocarbons with Biological Membranes, *Journal of Biological Chemistry* , 269,11,8022-8028.

Trombetta D *et al.* 2002, Study on the mechanisms of the antibacterial action of some plant α , β - unsaturated aldehydes. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 285-290.

Trombetta D *et al.* 2005, Mechanisms of Antibacterial Action of Three monoterpenes. *Antimicrobial Agent and Chemoterapy*, 49,6, 2474-2478.