

IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LIME FRUIT JUICE (*CITRUS AURENTIFOLIA*) ON *STAPHYLOCOCCUS AEREUS* BACTERIA

Weni Puspita, Hairunnisa, Putri Dwi Awaliah

Akademi Farmasi YARSI
Jl. Panglima Aim No. 2, Dalam Bugis, Pontianak, Kalimantan Barat

Corresponding author: Weni Puspita (weni.puspita.ap@gmail.com)

ARTICLE HISTORY

| Received: 2 December 2019

| Revised: 17 January 2020

| Accepted: 28 January 2020

Abstract

Lime (*Citrus aurantifolia*) contains several active compounds including alkaloids, flavonoids, steroids, triterpenoids, saponins, tannins and phenolics that can inhibit bacterial growth. The purpose of this study was to aimed evaluate the antibacterial effectiveness of lime juice in syrup preparations against *Staphylococcus aureus* bacteria in vitro with agar diffusion method. Testing the antibacterial effectiveness of lime syrup was determined to *Staphylococcus aureus* with 3 concentrations, 25%, 50%, 75%, and lime juice with 100% concentration and marketed lime syrup as a comparison. The results showed that the juice of lime (*Citrus aurantifolia*) with concentrations of 25%, 50%, and 75% could inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*. Lemon juice formulated into syrup preparations can improve the ability of lime as an antibacterial, where the higher the concentrate of lime syrup and the longer the contact with *Staphylococcus aureus* bacteria, the better the inhibitory power. The average inhibition zone of the concentration of lime syrup that is effective for inhibiting *Staphylococcus aureus* bacteria at a concentration of 75% with a inhibition zone of 13,5 mm with a strong category and showed an insignificant difference ($p>0,05$) compared to lime juice 100% concentration and marketed lime syrup with inhibition zone 14,167 mm and 14,0 mm. So that the formulation of lime syrup at a concentration of 75% is an effective formulation in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus*.

Key words : *Citrus aurantifolia*, *Staphylococcus aureus*, syrup

EFEKTIVITAS ANTIBAKTERI SEDIAAN SIRUP AIR PERASAN BUAH JERUK NIPIS (*CITRUS AURENTIFOLIA*) TERHADAP BAKTERI *STAPHYLOCOCCUS AEREUS* SECARA *IN VITRO*

Abstrak

Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) mengandung beberapa senyawa aktif yaitu alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid, saponin, tanin dan fenolik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas antibakteri air perasan buah jeruk nipis dalam sediaan sirup terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* dengan metode difusi agar. Pengujian

efektivitas antibakteri sirup buah jeruk nipis diujikan pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan 3 konsentrasi yaitu 25%, 50%, 75% serta air perasan buah jeruk nipis dengan konsentrasi 100% dan sirup jeruk nipis yang beredar di pasaran sebagai pembandingan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sirup air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan konsentrasi 25%, 50%, dan 75% dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Air perasan buah jeruk nipis yang diformulasikan menjadi sediaan sirup dapat meningkatkan kemampuan jeruk nipis sebagai antibakteri, dimana semakin tinggi konsentrasi sirup buah jeruk nipis dan semakin lama kontak dengan bakteri *Staphylococcus aureus* maka daya hambatnya semakin baik. Rata-rata zona hambat konsentrasi sirup buah jeruk nipis yang efektif untuk menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 75% dengan zona hambat 13,5 mm dengan kategori kuat dan menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($p>0,05$) dibandingkan air perasan buah jeruk nipis konsentrasi 100% dan sirup jeruk nipis yang beredar di pasaran dengan zona hambat 14,167 mm dan 14,0 mm. Sehingga formulasi sirup buah jeruk nipis pada konsentrasi 75% merupakan formulasi yang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Kata Kunci : *Citrus aurantifolia*, *Staphylococcus aureus*, sirup

Pendahuluan

Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) adalah salah satu tanaman herbal yang banyak mengandung vitamin C, dimana sebagai obat herbal alami jeruk nipis berkhasiat untuk menghilangkan obat batuk, peluruh dahak (mukolitik), peluruh kencing (diuretik) dan keringat, membantu proses pencernaan, serta sebagai antipiretik dan antibakteri.¹ Bagian tanaman yang sering dipakai sebagai antibakteri adalah ekstrak kulit buah, ekstrak daun, ekstrak biji serta air perasannya.^{2,3} Secara empiris, masyarakat menggunakan buah jeruk nipis sebagai obat herbal untuk mengatasi radang tenggorokan dengan cara tiga buah jeruk nipis yang sudah dicuci, lalu dibelah dan diperas, kemudian air perasannya diseduh dengan setengah cangkir air panas.⁴

Pemanfaatan jeruk nipis sebagai obat herbal karena terdapat senyawa kimia antara lain alkaloid, flavonoid, tanin, fenol dan saponin yang bersifat antimikroba.⁵ Menurut Ashok et al⁶ tanin merupakan salah satu senyawa kimia yang bersifat antibakteri terdapat di setiap tumbuhan hijau, dimana tanin merupakan senyawa polifenol yang memiliki mekanisme mengikat dan menyusutkan protein, menghambat sintesis dinding sel bakteri dan sintesis protein sel bakteri gram positif dan gram negatif dengan cara mengendapkan gelatin dari larutan, bersifat toksik untuk bakteri, jamur berfilamen dan juga ragi. Selain itu terdapat senyawa kimia yang sama pada akar, batang, daun dan kulit buahnya, disertai minyak atsiri, asam sitrat, kalsium, fosfor, besi, vitamin A, B1, dan C.^{7,8}

Berdasarkan penelitian Abdul Razak et al⁹ konsentrasi air perasan buah jeruk nipis pada konsentrasi 100% menghasilkan daya hambat yang paling efektif terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dibandingkan dengan konsentrasi 25%, 50% dan 75%. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang ditemukan pada saluran pernapasan atas, muka, tangan, rambut dan vagina berkisar 20-75%.¹⁰ Infeksi bakteri ini pada saluran pernafasan atas dapat menimbulkan penyakit *tonsillitis* (radang amandel), pada kondisi amandel, sel-sel darah putih dari sistem kekebalan tubuh melancarkan sebuah serangan yang membantu menghancurkan virus atau bakteri, sehingga menyebabkan infeksi di tenggorokan dan demam.⁴

Secara empiris penggunaan buah jeruk nipis di masyarakat yaitu dengan cara di peras, akan tetapi cara ini masih memiliki kelemahan, karena rasa alami dari buah jeruk

nipis yang berasa asam dan masa simpan yang pendek, sehingga sediaan sirup dipilih karena sirup merupakan larutan oral yang mengandung sukrosa atau gula lain yang berkadar tinggi. Sirup mengandung sukrosa berkisar 64%-66% yang dapat memberikan rasa manis dan memperpanjang masa simpan.¹¹ Sehingga penelitian ini bertujuan untuk memformulasikan sediaan sirup ekstrak perasan buah jeruk nipis dan mengukur daya hambatnya terhadap pertumbuhan *Streptococcus aureus* secara in vitro.

Metode

Alat

Alat-alat pada penelitian ini antara lain : Inkubator (Mettler®) dari Jerman, Neraca Analitik (Ohaus®), Oven (Mettler®) dari Jerman, Autoklaf (Hirayama®) dari Jepang, Cawan Petri, Jarum Ose, Batang Pengaduk, Tabung Reaksi (Pyrex®), Erlenmeyer (Pyrex®), Gelas Ukur (Pyrex®), Beaker Glass (Pyrex®), Mikropipet, Pisau Stainless, Pinset, Pemeras Jeruk dan Lampu Spiritus.

Bahan

Bahan yang digunakan adalah aquadest steril, NaCl 0,9%, Gula, buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*), sirup buah jeruk nipis yang beredar di pasaran, kultur murni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Nutrient Agar (Oxoid®).

Prosedur Rinci

1. Rancangan Penelitian

Penelitian tentang Uji efektivitas antibakteri Sediaan Sirup buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Akademi Farmasi YARSI Pontianak. Penelitian ini bersifat eksperimental dengan desain *Postest Only Control Group Design*. Variabel adalah sirup air perasan buah jeruk nipis dengan berbagai konsentrasi yaitu 25%, 50%, 75%, air perasan buah jeruk nipis 100% dan sirup buah jeruk nipis yang beredar dipasaran sebagai pembanding, serta bakteri *Staphylococcus aureus*. Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistik menggunakan analisis *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan derajat kepercayaan 95% (=0,05). Formula pembuatan sirup buah jeruk nipis dapat dilihat pada tabel I.

Tabel I. Rancangan Formula Pembuatan Sirup Buah Jeruk Nipis

Bahan	Formula			
	I 25%	II 50%	III 75%	IV 100%
Sari Jeruk Nipis	15 ml	30 ml	45 ml	60 ml
Sirup Simplek	45 ml	30 ml	15 ml	-
Dibuat	60 ml	60 ml	60 ml	60 ml

Ket : sirup simplek (65 bagian gula dalam 100 bagian air) untuk tiap formula, pembanding yang digunakan sari jeruk nipis 100% dan sirup jeruk nipis yang beredar di pasaran

2. Determinasi Tanaman

Bagian tanaman yang digunakan sebagai sampel yaitu buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang masih segar diperoleh di Pontianak, Kalimantan Barat. Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Pertanian Laboratorium Biologi Universitas Tanjungpura Pontianak. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

3. Metode Pembuatan Sirup Buah Jeruk Nipis

Formulasi konsentrasi 25%, 50%, dan 75% dibuat dengan cara diperas buah jeruk nipis, kemudian ditambahkan dengan sirup simplek (dilarutkan 65 bagian gula dalam 100 bagian air) aduk homogen, setelah itu dimasukkan kedalam wadah bersih. Untuk formulasi dengan konsentrasi 100% dibuat dengan cara diperas buah jeruk nipis setelah itu di masukkan kedalam wadah bersih dan formulasi sirup jeruk nipis yang beredar di pasaran sebagai pembandingan.

4. Pembuatan Medium Pembenihan

Cara pembuatan medium *nutrient* agar (NA) instan adalah dengan melarutkan 11,5 gr *nutrient* agar (NA) instant ke dalam 500 ml aquadest. Kemudian dipanaskan hingga larut dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

5. Peremajaan Bakteri

Peremajaan kultur murni bakteri uji *Staphylococcus aureus* sebanyak 1 ose steril pada medium Agar miring (NA) instant dalam tabung reaksi dengan cara digoreskan zig zag secara aseptik. Kemudian diinkubasikan ke dalam inkubator selama 18-24 jam pada suhu 35°C - 37°C.

6. Pembuatan Suspensi Kultur Murni Bakteri Uji

Bakteri uji *Staphylococcus aureus* hasil peremajaan disuspensikan dengan larutan NaCl steril dengan cara diambil 1 ose yang disterilkan. Bakteri yang telah diremajakan dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 10 ml NaCl steril. Sampel sejumlah 3 cawan petri yang akan dijadikan media pertumbuhan *Staphylococcus aureus* berdasarkan standar 0,5 McFarland dengan perkiraan densitas sel sebesar $1,5 \times 10^8$ cfu/ml, sehingga jumlah seluruh sampel $1,5 \times 10^8$ cfu/ml $\times 3 = 4,5 \times 10^8$ cfu/ml.

7. Pengujian Efektivitas Antibakteri

Pengujian efektivitas antibakteri sirup buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dilakukan dengan metode difusi menggunakan cakram disc. Disiapkan medium NA *instant* yang telah dipanaskan dan didinginkan hingga suhu mencapai 40°C - 45°C, dimasukkan 1 ml suspensi biakkan bakteri *Staphylococcus aureus* secara aseptik ke dalam cawan petri, kemudian masukkan sebanyak 10 ml medium NA *instant* dan digoyang-goyang hingga tercampur homogen, lalu dibiarkan sampai membeku. Kertas cakram yang telah direndam dalam sirup jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) selama 15 menit dengan masing-masing konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%, dan sirup jeruk nipis yang beredar dipasaran, kemudian kertas cakram diletakkan di atas permukaan medium Agar NA *instant* yang telah berisi uji *Staphylococcus aureus*, kemudian diinkubasikan ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 - 48 jam dengan meletakkan cawan petri secara terbalik. Zona bening yang terbentuk di sekitar cakram disk diukur dengan jangka sorong lalu dicatat.⁹

Hasil

Tabel II. Diameter rata-rata zona hambat sirup buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*

Perlakuan	Replikasi			Jumlah (mm)	Rata-rata (mm)
	I	II	III		
Sirup buah jeruk nipis 25 %	8	8,5	8	24,5	8,167±0,03
Sirup buah jeruk nipis 50%	10,5	10,5	10	31	10,33±0,15
Sirup buah jeruk nipis 75%	13,5	13,0	14,0	40,5	13,5±0,12
Perasan buah jeruk nipis 100% (pembanding 1)	14,5	13,5	14,5	42,5	14,167±0,13
Sirup buah jeruk nipis di pasaran (pembanding 2)	13,5	14,5	14,0	42	14,0±0,15



Gambar 1. Hasil uji diameter daya hambat sirup buah jeruk nipis terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*

Tabel III. Data stasitik diameter zona hambat sirup buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan *Mann Whitney Test*

Variabel	Konsentrasi	Konsentrasi lainnya	P	
Konsentrasi sirup buah jeruk nipis	25%	50%	0,015	
		75%	0,012	
		100%	0,006	
	50%	Sirup buah jeruk nipis di pasaran	0,012	
		75%	0,015	
		100%	0,012	
		Sirup buah jeruk nipis di pasaran	0,006	
		75%	100%	0,105
			Sirup buah jeruk nipis di pasaran	0,072

Pembahasan

Penelitian ini bertujuan mengetahui efektivitas antibakteri sirup buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan mengukur daya hambatnya terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* dengan metode difusi agar. Daya hambat adalah kemampuan suatu substansi atau zat untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme, dimana dalam penelitian ini digunakan sampel bakteri *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* adalah bakteri yang dapat menyebabkan infeksi pada saluran pernafasan atas, dimana dapat menimbulkan penyakit *tonsillitis* (radang amandel), dengan mekanisme kerja sel-sel darah putih dari sistem kekebalan tubuh melancarkan sebuah serangan yang membantu menghancurkan virus atau bakteri, dan juga menyebabkan peradangan di tenggorokan dan demam.¹⁰ Penelitian efektivitas antibakteri sediaan sirup air perasan buah jeruk nipis terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ini dilakukan menggunakan metode *disc diffusion* (tes Kirby-Bauer), dimana kelebihan dari metode ini adalah mudah dilakukan, tidak memerlukan peralatan khusus dan relatif murah.¹²

Berdasarkan penelitian Abdul Razak⁹ menyatakan bahwa air perasan buah jeruk nipis dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100% dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.⁹ Selain itu, menurut Cut Nurkalimah menyatakan bahwa air perasan jeruk nipis memiliki efek antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *S.aureus* dan *E.coli* dengan metode difusi cakram.¹³ Berdasarkan uji fitokimia yang telah dilakukan, terdapat beberapa senyawa kimia metabolit sekunder yang bersifat sebagai antibakteri pada air perasan buah jeruk nipis yaitu alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid, saponin, tanin dan fenolik.²

Mekanisme antibakteri pada senyawa kimia tanaman dipengaruhi oleh keberadaan metabolit sekunder yang terkandung didalamnya, dimana mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk. Selain itu, tanin mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna yang menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati. Aktivitas antibakteri flavonoid yaitu membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Aktivitas antibakteri saponin yaitu menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan

keluar. Mekanisme terpenoid sebagai antibakteri yaitu melalui proses pemecahan membran oleh komponen-komponen lipofilik sehingga merusak membran sel bakteri²

Hasil pengujian sediaan sirup buah jeruk nipis dapat dilihat pada Tabel II. Berdasarkan tabel didapatkan bahwa formulasi sirup dari air perasan buah jeruk nipis dengan konsentrasi berbeda memiliki daya hambat yang berbeda pula terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Data diameter rata-rata zona hambat sirup buah jeruk nipis terlebih dahulu dilakukan uji distribusi normal dengan *Kolmogorof-Smirnov* dan dilanjutkan dengan uji homogenitas dengan melakukan uji *Levene*. Hasil menunjukkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$) tetapi tidak homogen ($p < 0,05$). Analisa statistik dilanjutkan dengan statistik non-parametrik menggunakan *Kruskal Wallis* dilanjutkan dengan *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan masing-masing perlakuan. Hasil uji *Kruskal Wallis* diketahui bahwa terdapat perbedaan signifikan ($p \leq 0,05$) pada kelima perlakuan yaitu sirup buah jeruk nipis konsentrasi 25%, 50%, 75%, serta 100% air perasan buah jeruk nipis dan sirup buah jeruk nipis yang beredar di pasaran sebagai pembanding.

Hasil penelitian menunjukkan diameter rata-rata zona hambat sirup buah jeruk nipis terendah adalah pada konsentrasi 25% (8,167 mm), sedangkan diameter rata-rata zona hambat tertinggi terlihat pada konsentrasi 75% (13,5 mm). Hal ini disebabkan karena adanya perbedaan kadar zat antibakteri yang memiliki perbedaan bermakna antara tiap konsentrasi, tetapi pada tabel 3, terdapat perbedaan yang tidak signifikan ($p > 0,05$) antara diameter rata-rata zona hambat sirup buah jeruk nipis konsentrasi 75% (13,5 mm) dengan konsentrasi 100% air perasan jeruk nipis dan sirup buah jeruk nipis yang beredar di pasaran sebagai pembanding. Hal ini disebabkan adanya penambahan sukrosa atau gula pada sirup jeruk nipis yang dapat memberikan rasa manis dapat berpengaruh pada hasil karena menurut Buckle, dkk mengatakan bahwa daya larut yang tinggi dari gula dan daya mengikatnya air merupakan sifat-sifat yang menyebabkan gula sering digunakan dalam pengawetan bahan pangan. Konsentrasi gula yang cukup tinggi pada olahan pangan dapat mencegah pertumbuhan mikrobia, sehingga meningkatkan kemampuan antibakteri dan dapat berperan sebagai pengawet serta memperpanjang masa simpan.¹⁴

Berdasarkan hasil pengujian, semakin besar konsentrasi air perasan buah jeruk nipis pada sediaan sirup dan semakin lama kontakannya dengan kuman, maka daya hambat sirup air perasan buah jeruk nipis terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* semakin baik. Menurut Abdul Razak, dkk dalam penelitiannya menyatakan bahwa rata-rata zona hambat pada air perasan buah jeruk nipis konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100% adalah 5,167; 6,167; 7,5; dan 10,5 mm.⁹ Sedangkan hasil pengujian pada tabel II, diameter rata-rata zona hambat sirup buah jeruk nipis pada konsentrasi 25%, 50% dan 75% meningkat menjadi 8,167; 10,33; dan 13,5 mm, dimana sirup jeruk nipis pada konsentrasi 75% memberikan diameter daya hambat tertinggi yaitu 13,5 mm yang dikategorikan sampel tersebut memiliki kekuatan antibakteri yang bersifat kuat karena daerah hambatan berkisar 10-20 mm.¹⁵ Sehingga formulasi air perasan jeruk nipis menjadi sediaan sirup dapat meningkatkan kemampuan jeruk nipis sebagai antibakteri bahkan dapat memperpanjang masa simpan yang dapat menghasilkan sediaan dengan penggunaan dan penyimpanannya menjadi lebih praktis.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa sirup air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan konsentrasi 25%, 50%, dan 75% dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara in vitro dengan metode difusi agar. Air perasan buah jeruk nipis yang diformulasikan menjadi sediaan sirup dapat meningkatkan kemampuan jeruk nipis sebagai antibakteri, dimana semakin tinggi konsentrasi sirup buah jeruk nipis dan semakin lama kontak dengan bakteri

Staphylococcus aureus maka daya hambatnya semakin baik. Rata-rata zona hambat konsentrasi sirup buah jeruk nipis yang efektif untuk menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 75% dengan zona hambat 13,5 mm dengan kategori kuat dan menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($p>0,05$) dibandingkan air perasan buah jeruk nipis konsentrasi 100% dan sirup buah jeruk nipis yang beredar di pasaran dengan zona hambat 14,167 mm dan 14,0 mm.

Daftar Pustaka

1. Fajriani, Mahrum. Effectiveness of lime (*Citrus Aurantifolia*) extract solution in inhibiting bacteria *Streptococcus Mutans* case of early childhood caries. *Donnish Journal of Dentistry and Oral Hygiene*. *Donnish J Dent Oral Hyg*. 2015;1(4):16-20.
2. Oikeh EI, Oriakhi K, Omoregie ES, Oviasogie FE, Oriakhi K. Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juice concentrates. *Food Sci Nutr*. 2014;4(1):103-9. DOI: 10.1002/fsn3.268.
3. Camacho-Corona MR, et al. Activity against drug resistant-tuberculosis strains of plants used in Mexican traditional medicine to treat tuberculosis and other respiratory diseases. *Phytother Res*. 2008 22(1): 82–5. DOI :10.1002/ptr.2269 17.
4. Sarwono, B. Khasiat & manfaat jeruk nipis. Jakarta: Agro Media Pustaka; 2001.
5. Okwu DE. Citrus fruits: a rich source of phytochemicals and their roles in human health. *Int J Chem Sci*. 2008;6(2); 451-71.
6. Ashok PK, Upadhyaya K. Tannins are Astringent. *J Pharmacog and Phytochem* [internet]. 2012;1(4). Available from: <http://www.phytojournal.com/archives/2012/vol1issue3/PartA/8.1.pdf>.
7. Astarini et al. Minyak atsiri dari kulit buah *Citrus grandis*, *Citrus aurantium* (L.) dan *Citrus aurantifolia* (Rutaceae) sebagai senyawa antibakteri dan insektisida. In: *Prosiding Kimia FMIPA*. Surabaya: ITS; 2010.
8. Okwu DE et al. Phytochemical composition and in vitro antifungal activity screening of extracts from citrus plants against fusarium oxysporum of okra plant (*Hibiscus esculentus*). *Pest Technol* [internet]. 2007;1(2). Available from: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOonline/images/0712/PT_1\(2\)/PT_1\(2\)145-148o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOonline/images/0712/PT_1(2)/PT_1(2)145-148o.pdf).
9. Razak A, Djamal A, Revilla G. Uji daya hambat air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* s.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara in vitro. *J Kesehat Andalas*. 2013; 2(1).
10. Usman-Chatib Warsa. Kokos positif gram. In: *Buku ajar mikrobiologi kedokteran*. revisi. Jakarta: Bina Rupa Aksara; 1993. p103-11.
11. Syamsuni H.A. Ilmu resep. Jakarta: EGC; 2006.
12. Pratiwi ST. Mikrobiologi farmasi. Yogyakarta: Erlangga; 2008.
13. Nurkalimah C. Daya antibakteri air jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang diuji secara in vitro [Skripsi]. Sumatera Utara:USU; 2011.
14. Buckle K. A. Ilmu pangan. Jakarta: *Universitas Indonesia*; 2007.
15. Pathan RK, Gali PR, Pathan P, Gowtham T, Pasupuleti S. In vitro antimicrobial activity of *Citrus aurantifolia* and its phytochemical screening. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2010;2(1):328-31.