NILAI KOEFISIEN FENOL DAN JUMLAH KOLONI BAKTERI *Escherichia coli* PADA PERLAKUAN EKSTRAK KOMBINASI KULIT BUAH *Citrus aurantifolia Swingle* DAN *Citrus hystrix DC*

Ghina Salsabila[1], Lia Yulia Budiarti[2], Husnul Khatimah[3]

[1]Program Studi Kedokteran Program Sarjana, Fakultas Kedokteran, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, Indonesia
[2]Departemen Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, Indonesia
[3]Departemen Mikrobiologi dan Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, Indonesia

Email Korespondensi : salsabilaghina110@gmail.com

Abstract: Citrus aurantifolia Swingle (C.aurantifolia) and Citrus hystrix DC (C.hystrix) contain various antibacterial compounds that have potential as alternative antiseptics. *The effectiveness of a good antiseptic has a phenol coefficient (KF) ≥1. This study aims to analyze the antibacterial activity of the combined extracts of C.aurantifolia and C.hystrix fruit peels (Ca+Ch) against Escherichia coli in vitro, based on the parameter value of the phenol coefficient and the number of bacterial colonies. This posttest-only study design with control group design used the dilution test method to test the combination treatment of Ca+Ch extract and control in inhibiting the growth of E.coli. The results of the phenol coefficient test, obtained an average value of KF = 1.0667 in the combination of fruit peel extract Ca + Ch and KF = 1.0337 in 70% alcohol; this KF value is equivalent to 5% phenol. The results of the One Way-Anova test, combined fruit peel extract treatment (Ca+Ch) at combination variations of 25% 50%, 75%, 100% (ratio 1:1) for the number of E.coli colonies, obtained an average number of E.coli colonies significantly different in the Ca100%+Ch100% treatment with the other treatments (p> 0.05). Based on Duncan's post-hoc analysis, the number of E.coli colonies from the Ca75%+Ch100%=35.0 cfu/ml treatment was not significantly different from the antiseptic alcohol 70% (34.0 cfu/ml); combined Ca100%+Ch100% extract produced the best effectiveness against the number of E.coli colonies (32.0 cfu/ml). In conclusion, the combined extract of C.aurantifolia and C.hystrix fruit peels has antibacterial activity against E.coli and has effectiveness as an antiseptic.*

Keywords: *Citrus aurantifolia Swingle, Citrus hystrix DC, Alcohol 70%, Phenol coefficient 5%, Colony count, Extract combination*

Abstrak: ***Citrus aurantifolia Swingle (C.aurantifolia)*** **dan** ***Citrus hystrix DC (C.hystrix)*** **mengandung berbagai senyawa antibakteri yang berpotensi sebagai antiseptik alternatif.** Efektivitas antiseptik yang baik mempunyai nilai koefisien fenol (KF) ≥1. Penelitian ini bertujuan menganalisis aktivitas antibakteri ekstrak kombinasi kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix* (*Ca+Ch*) terhadap *Escherichia coli in vitro*, berdasarkan parameter nilai koefisien fenol dan jumlah koloni bakteri. Rancangan penelitian *posttest-only with control group design* ini menggunakan metode uji dilusi untuk uji perlakuan kombinasi ekstrak *Ca+Ch* dan kontrol dalam menghambat pertumbuhan *E.coli*. Hasil uji koefisien fenol, diperoleh rerata nilai KF=1,0667 pada kombinasi ekstrak kulit buah *Ca+Ch* dan KF=1,0337 pada alkohol 70%; nilai KF ini setara dengan fenol5%. Hasil uji *One Way-Anova,* perlakuan ekstrak kombinasi kulit buah *(Ca+Ch)* pada variasi kombinasi 25% 50%, 75%, 100% (ratio 1:1) terhadap jumlah koloni *E.coli*, didapatkan rerata jumlah koloni *E.coli* berbeda bermakna pada perlakuan *Ca*100%+*Ch*100% dengan perlakuan lainnya (p> 0,05). Berdasarkan analisi *pos-hoc Duncan,* jumlah koloni *E.coli* dari perlakuan *Ca*75%+*Ch*100%=35,0 cfu/ml tidak berbeda bermakna dengan antiseptik alcohol 70% (34,0 cfu/ml); ekstrak kombinasi *Ca*100%+*Ch*100% menghasilkan efektivitas terbaik terhadap jumlah koloni *E.coli* (32,0 cfu/ml). Simpulan penelitian, ekstrak kombinasi

kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E.coli* dan miliki efktivitas sebagai antiseptik.

Kata-kata kunci: *Citrus aurantifolia Swingle, Citrus hystrix DC,* nilai koefisien fenol, Jumlah koloni, ombinasi ekstrak

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi bakterialis yang disebabkan *Escherichia coli* (*E.coli*), masih menjadi permasalahan kesehatan masyarakat di Indonesia, termasuk di wilayah lahan basah seperti di Kalimantan Selatan. Bakteri *E. coli* merupakan bakteri gram negatif yang berperan sebagai flora normal usus, tetapi bersifat patogen opertunis yang sering menimbulkan kelainan berupa infeksi saluran pencernaan, diare, sepsis, menigitis dan infeksi saluran kemih nosomial. [1,2.] *Escherichia coli* merupakan penyebab utama diare akut yang dapat terjadi pada semua golongan usia.[3] Prevalensi diare di Indonesia, berdasarkan diagnosis tenagakesehatan dan gejala pada tahun 2018 adalah sebesar 8% dan prevalensi diare di Kalimantan Selatan sebesar 6%. Penularan *E.coli* umumnya melalui cemaran pada air, pada peralatan rumah sakit, atau melalui tangan.[3]

Penularan infeksi oleh *E.coli* dapat dicegah dengan penggunaan antiseptik kulit. Kandungan utama antiseptik ini adalah berbasis alkohol. Alkohol memiliki kemampuan aktivitas bakterisida yang luas baik terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Menurut *Center for Disease Control* (CDC) antiseptik kandungan alkohol 70% memiliki efek anti mikroba lebih baik. Namun, alkohol memiliki sifat mudah terbakar dan penggunaan alkohol dalam jangka lama dapat menimbulkan kelainan seperti iritasi atau luka pada kulit.[4] Dampak negatif dari penggunaan alkohol, menjadikan pengembangan bahan alami yang bersifat antibakteri. Zat antibakteri alternatif dapat berperan lebih aman dan efektif, serta lebih murah dibandingkan obat sintesis.[5]

Keefektifan dari suatu zat antiseptik dalam menghambat kolonisasi pertumbuhan bakteri, dapat diukur berdasarkan uji koefesien fenol. Pada uji koefisien fenol, nilai koefesien dibandingkan dengan fenol 5% sebagai pembanding yang telah diketahui keefektifannya sebagai zat desinfeksi. Nilai koefesien fenol yang baik adalah setara 1 (satu); keefektifan makin baik bila nilai koefisien fenol ≥1. Bakteri standar laboratorium yang dapat digunakan pada uji koefesien fenol, diantaranya adalah *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa,* dan *Salmonella typhi*.[6] Pengujian koefisien fenol juga dapat diaplikasikan pada sediaan herbal yang memiliki aktivitas antibakteri.[6] Hasil uji perlakuan kombinasi infus bunga *Cananga odorata* dan buah *Averrhoa bilimbi* terhadap *Stahphylococcus aureus* dan terhadap *Salmonella typhi* menghasilkan besaran pengambatan dan nilai koefisien fenol yang berbeda.[7]

Tanaman buah jeruk seperti *Citrus aurantifolia Swingle (C.aurantifolia)* dan *Citrus hystrix DC (C.hystrix)* telah dimanfaatkan masyarakat sebagai obat. Perasan buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix* dapat digunakan untuk mengatasi batuk, obat kumur, serta sebagai bahan antiseptik. Bagian kulit buah *Citrus* yang umumnya merupakan limbah, juga diketahui memiliki khasiat sebagai antibakteri.[8] Hasil uji fitokimia, pada kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix* mengandung berbagai senyawa sekunder yang bersifat antibakteri, berupa minyak atsiri sitronelol, limonen, dan geraniol; serta flavonoid, fenolik, terpenoida alkaloid, dan tanin.[9, 10,11]

Pada bentuk perlakuan sediaan tunggal, baik kulit buah *C.aurantifolia* maupun *C.hystrix* mampu menghambat berbagai bakteri uji termasuk terhadap *E.coli*. [9, 10,11] Pada konsentrasi 25%, perasan kulit *C.aurantifolia* sudah mulai menghambat pertumbuhan *E. Coli*. [12] Hasil uji ekstrak etanol 96% kulit *C.hystrix* pada perlakuan 100%, dapat menghambat *E.coli* dengan zona hambat sebesar 10,67 mm[14], tetapi zona hambat yang dihasilkan masih dibawah kontrol positif disk antibiotik.[15] Budiarti dkk menyebutkan efek perlakuan infus kulit buah *C.hystrix* 100% dapat menurunkan jumlah bakteri *S.aureus* dan *E.coli*, tetapi efeknya masih belum setara perlakuan alkohol 70%, Upaya meningkatkan efek antibakteri selain menggunakan pelarut yang sesuai pada

sediaan ekstraksi, semisal etanol atau metanol serta juga dengan menggunakan sediaan herbal dalam bentuk kombinasi/campuran.[8]

Hasil uji kombinasi perasan *C.aurantifolia* 20% dan getah Jatropha curcas. L 20 % memberikan penghambatan pertumbuhan paling baik terhadap bakteri *P.aeruginosa* dan *S. aureus*.[16] Perlakuan kombinasi ekstrak *Eleutherine palmifolia* dan kulit buah *Citrus limon*(12:8), menghasilkan penghambatan terbesar terhadap *S.aureus* dan *E.coli* .[17] Hasil uji sediaan hand sanitizer kombinasi ekstrak daun *Ocimum basilicum* 75% dan ekstrak kulit *C.hystrix DC* 25%, memperlihatkan daya antiseptik yang efektif dalam menurunkan jumlah bakteri uji dibandingkan formula lainnya.[18]

Ketersediaan limbah kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix DC* dimasyarakat cukup banyak, tetapi pemanfaatannya sebagai sediaan antiseptik dalam bentuk kombinasi belum banyak diinformasikan. Hasil-hasil penelitian sebelumnya menjadi landasan untuk meneliti aktivitas antibakteri perlakuan ekstrak etanol kombinasi kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix* terhadap *E.coli* ATCC 25922 secara in vitro. Aktivitas antibakteri diamati berdasarkan pada parameter nilai koefeisien fenol ekstrak kombinasi kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix* dengan zat pembanding larutan fenol 5%, serta parameter jumlah koloni *E.coli* pada perlakuan kombinasi ekstrak dan antiseptik kontrol alkohol 70%.

METODE PENELITIAN

Penelitian eksperimental (*true experimental*) ini menggunakan rancangan *posttest only with control group design*. Kelompok perlakuan kombinasi yang diujikan adalah ekstrak *C.aurantifolia* pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%(b/v), *C.hystrix DC* pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% (b/v), fenol 5% (pembanding uji koefesien fenol) dan alkohol 70%(kontrol positif) dan Dimethyl sulfoxide (DMSO) 1% (kontrol negatif), dengan Parameter yang diamati adalah nilai koefesien fenol dan jumlah koloni bakteri uji *E. coli* yang tumbuh pada media isolasi bakteri *Nutrient Agar* (NA).

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini yaitu alat tulis, tisu, kapas, stiker label, selotip, handscoon, masker, cawan petri (Pyrex Brand®), tabung reaksi (Pyrex Brand®), rak tabung reaksi, penjepit tabung, *autoclave* (All American®), inkubator aerob (Carbolite®), meja *laminary flow* (Labconco®), gelas Erlenmeyer (IWAKI®), pisau steril (*stainless*), penangas air (*waterbath*), blender (National™), kertas saring, lampu spiritus, ose steril, pipet tetes, pipet ukur, pipet volume, mikropipet, bulp, neraca analitik, *Hot plate*, *stopwatch*, aluminium foil, batang pengaduk, gelas beker, dan gelas ukur.

Bahan yang diperlukan adalah bakteri *E. coli* 25922 yang tumbuh pada media NA, kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix DC*, bullyon, nutrient agar, fenol 5%, alkohol 70%, spiritus, media nutrient broth/kaldu, aquades steril, larutan standar Mc Farland 0,5 (setara $1{,}5x10^8$ CFU/ml), dan DMSO 1%. Persiapan peralatan sebelum digunakan alat-alat dicuci dengan air mengalir hingga bersih dbungkus aluminium foil. Setelah itu disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121℃ pada tekanan 2 Atm selama 15 menit. Persiapan pembuatan ekstrak: Bahan herbal uji yaitu kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix* disiapkan kemudian dipilih, masing masing sebanyak 1 kg dengan kriteria yaitu bagian kulit buah jeruk yang utuh, tidak rusak, tidak berjamur, dan berwarna hijau tua. Bahan herbal uji dicuci dan dipotong hingga menjadi bentukan yang lebih kecil.Bahan herbal dikeringkan pada suhu ruang dan kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix* yang telah kering dimasukkan ke oven selama 24 jam dengan suhu 60^{o}C. Kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix* diblender dan diayak hingga menjadi serbuk simplisia sebanyak 100 gram. Simplisia dimasukkan kedalam alat ekstraktor untuk dilakukan proses maserasi

sebanyak 10 gram dan ditambahkan etanol 96% sebanyak 2 liter selama 3 x 24 jam sambil diaduk dengan bantuan shaker. Hal ini bertujuan supaya senyawa aktif yang terkandung dalam kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix* dapat larut dalam etanol 96%. Larutan disaring dengan kertas saring WH40 sehingga diperoleh cairan jernih kecoklatan. Pelarut diuapkan menggunakan Vaccum Rotary Evaporator dengan tekanan rendah pada suhu 50-60oC selama 4-6 jam, kemudian dipanaskan di atas waterbath sampai keseluruhan pelarutnya menguap sehingga diperoleh masing-masing sediaan maserasi 10 gram ekstrak murni kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix* masing-masing 100%. Uji bebas etanol dengan beberapa tetes kalium dikromat (K2Cr2O7) dimasukkan kepada 3 ml sampel ekstrak etanol kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix*, apabila tidak terjadi perubahan warna pada sampel maka tidak terdapat kandungan etanol pada sampel tersebut.[19,20]

Persiapan bakteri uji: Isolat murni bakteri *E.coli* disiapkan dan diambil sebanyak 1 ose. Selanjutnya dimasukkan ke dalam media BHI untuk dibuat suspensi biakan bakteri uji. Bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan ditambahkan akuades steril sehingga didapatkan kekeruhan yang sama dengan larutan standar 0,5 Mc Farland (setara 1,5 X 10^6 cfu/mL).

Pembuatan larutan stok fenol dan alkohol 70%: 5-gram kristal fenol dilarutkan dengan 100 ml akuades steril, maka didapat larutan fenol dengan konsentrasi 5%. Sedangkan alkohol 70% dibuat sebagai pembanding zat antiseptik kombinasi infus tanaman uji yaitu diambil 5 ml sebagai stok.[21]

Pengenceran larutan fenol 5%, ekstrak kombinasi kulit buah *C.aurantifolia*-*C.hystrix*, dan alkohol 70%: 26 tabung steril disiapkan dengan diberi nomor 1-26. Tabung 1-13 diberi larutan fenol 5% masing-masing sebanyak 2 ml. Kemudian ditambahkan akuades steril dari tabung 1-13 berturut-turut yaitu 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 18 dan 23 ml. Masing-masing tabung dihomogenkan. Selanjutnya memindahkan campuran larutan fenol 5% dengan akuades tadi ke tabung 14-26 masing-masing sebanyak 2 ml. Didapat pengenceran larutan fenol 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:110, 1:150, 1:200, 1:250. Lalu dilakukan juga pengenceran pada ekstrak kombinasi kulit buah *C.aurantifolia*-*C.hystrix* dan alkohol 70% dengan cara yang sama seperti pengenceran fenol 5%.[22]

Uji koefisien fenol: Siapkan rak tabung dan tabung reaksi steril yang berisi NB yang sudah diberi label sesuai dengan pengenceran (1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:110, 1:150, 1:200, 1:250) beserta waktu kontak (5, 10, 15 menit). Untuk membuat suspensi bakteri uji, caranya dengan menginokulasikan bakteri dari isolat bakteri di NA ke NB. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37˚C selama 24 jam. Kemudian pipet 0,5 ml suspensi bakteri uji ke masing-masing tabung steril (ekstrak kombinasi kulit buah *C.aurantifolia* 100%-*C.hystrix* 100%, alkohol 70% dan fenol 5%) mulai dari tabung pengenceran 1:20 sampai 1:250. Lalu dihomogenkan. Setelah 5 menit, ambil ose dari masing-masing tabung pengenceran (ekstrak kombinasi kulit buah *C.aurantifolia* 100%-*C.hystrix* 100%, alkohol 70% dan fenol 5%) ke tabung reaksi yang berisi NB pada rak label waktu kontak 5 menit. Cara ini dilakukan juga pada waktu kontak 10 dan 15 menit. Selanjutnya seluruh tabung tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam lalu diamati kekeruhannya. Diperkirakan bahan dari antiseptik tersebut memiliki daya antibakteri. Adanya pertumbuhan bakteri (+) ditandai dengan medium menjadi keruh, dan tidak adanya pertumbuhan bakteri (-) ditandai medium tetap bening.[21] Rumus nilai koefisien fenol dapat dilihat sebagai berikut:

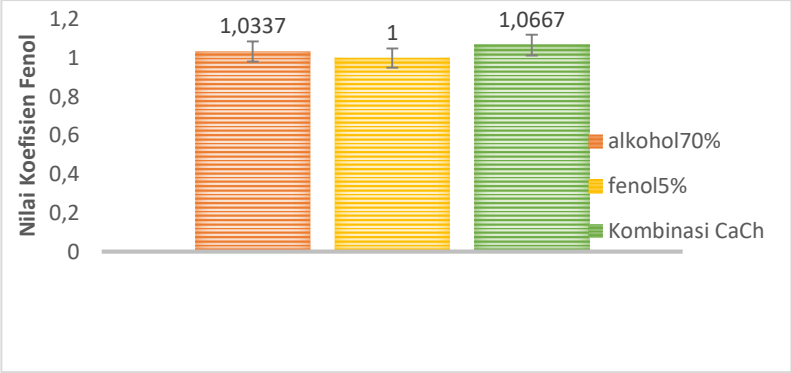
$$\text{Koefisien fenol} = \frac{\left\{\frac{\text{Pengenceran fenol terendah yang mematikan bakteri}}{\text{Pengenceran antiseptik terendah yang mematikan bakteri}}\right\}}{\left\{\frac{\text{Pengenceran fenol tertinggi yang mematikan bakteri}}{\text{Pengenceran antiseptik tertinggi yang mematikan bakteri}}\right\}}$$

Pengujian aktivitas antibakteri: Perlakuan uji berupa *C.aurantifolia* (konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100% dan ekstrak kulit *C.hystrix DC* (konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100%), alkohol 70% (sebagai kontrol +), DMSO 1% (sebagai kontrol -). , Ekstrak kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix DC* (1:1) diambil masing-masing sebanyak 10 tetes atau 0,5 ml. Sedangkan alkohol 70% diambil sebanyak 20 tetes atau 1 ml. Kemudian ditambahkan 1 tetes suspensi bakteri ke dalam tabung. Setelah itu masukkan ke dalam cawan petri steril dan ditambahkan media NA sampai menutupi seluruh permukaan cawan petri. Kemudian cawan petri digoyangkan, dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Untuk pengujian kontaminasi menggunakan akuades steril, caranya dengan akuades diambil sebanyak 20 tetes atau 1 ml, lalu masukkan ke dalam cawan petri steril dan ditambahkan media NA sampai menutupi seluruh permukaan cawan petri. Kemudian cawan petri digoyangkan, dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Jumlah koloni dihitung dengan menggunakan *colony counter*.[22,23]

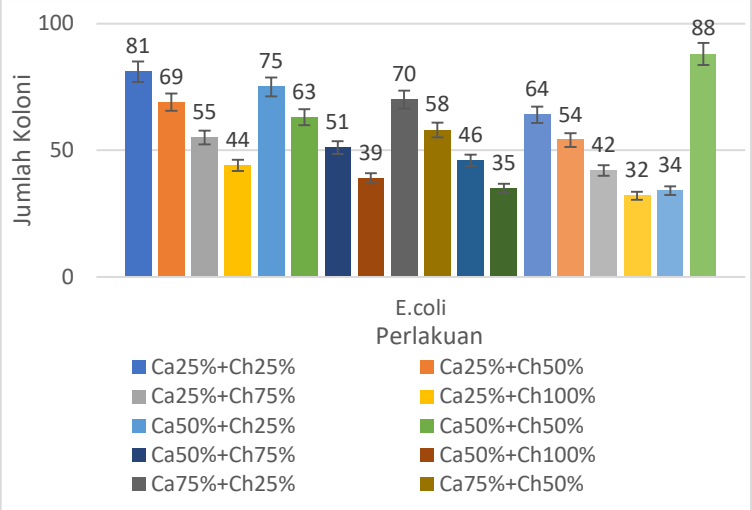
Data penelitian ini berupa nilai koefisien fenol dan jumlah koloni dari perlakuan ekstrak kombinasi *C.aurantifolia-C.hystrix* dan alkohol 70% yang dianalisis dengan uji normalitas *Shapiro wilk*. Hasil analisis data terdistribusi normal maka dilanjutkan uji *One-way Anova* pada tingkat kepercayaan 95% (α = 0,05) dan dilakukan uji lanjutan menggunakan uji *Post Hoc Duncan*, sehingga dapat diketahui salah satu perlakuan yang berbeda bermakna diantara perlakuan lainnya.[24]

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini telah dinyatakan laik etik oleh komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat dengan nomor 228/KEPK-FK ULM/EC/VIII/2022 dan telah dilakukan uji determinasi tanaman di Laboratorium FMIPA Universitas Lambung Mangkurat dengan nomor 157/LB.DASAR/VIII/2022 dan 158/LB.LABDASAR/VIII/2022.Berdasarkan hasil pengamatan pada tabung reaksi setelah perlakuan, didapatkan nilai rerata nilai koefisien fenol setelah perlakuan ekstrak kombinasi *C.aurantifolia-C.hystrix* dan alkohol 70% terhadap *E.coli* seperti pada gambar 1.



Gambar 1. Rerata Nilai Koefisien Fenol Ekstrak Kombinasi Kulit Buah *Citrus aurantifolia (Ca)* dan *Citrus hystrix (Ch)* terhadap *Escherichia coli*



Gambar 2 Jumlah Koloni Pada Ekstrak Kombinasi Kulit Buah *C.aurantifolia (Ca)* dan *C. hystrix (Ch)* terhadap *Escherichia coli*

Gambar 1 menunjukkan bahwa rerata nilai koefisien fenol pada setiap perlakuan terhadap *E.coli*, dari ekstrak kombinasi kulit buah *Citrus aurantifolia* dan *Citrus hystrix* (*Ca+Ch*) yaitu sebesar 1,0667, dari kontrol antiseptik alkohol 70% sebesar 1,0337. Nilai koefisien yang dihasilkan perlakuan ekstrak dan alkohol sedikit lebih tinggi daripada nilai koefisien fenol 5%. Berdasarkan hasil ini, dapat menandakan bahwa ekstrak kombinasi kulit buah *Ca* dan *Ch* memiliki aktivitas sebagai zat antiseptik seperti halnya dengan alkohol.

Pada uji koefisien fenol diketahui bahwa keefektifkan sebagai suatu antiseptik yang baik adalah mempunyai nilai koefsien fenol ≥1 , sedangkan nilai koefsien fenol yang <1 menunjukkan aktivitas dari antiseptik lebih rendah dari fenol.58 Mekanisme kerja fenol yaitu dengan cara meningkatkan permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan kebocoran komponen intraseluler dan koagulasi sitoplasma sehingga terjadi lisis sel. Senyawa fenol merupakan antibakteri yang bersifat bakterisidal. Senyawa fenol memiliki aktivitas antimikroba berspektrum luas terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif sehingga senyawa fenol secara intensif dapat digunakan sebagai desinfektan.[25] Hasil rerata nilai koefisien fenol pada ekstrak kombinasi kulih buah *Ca+Ch* rhadap *E.coli* adalah >1, yang berarti bahwa ekstrak kombinasi kulit buah *Ca+Ch* memiliki efektivitas sebagai zat antiseptic relative lebih baik dari fenol 5%. Efektivitas yang dihasilkan ekstrak kombinasi kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix* dipengaruhi oleh kandungan zat antibakteri pada kedua jenis jeruk ini dan sifat dari bakteri yang diujikan.[26]

Gambar 2, memperlihatkan bahwa perlakuan kontrol DMSO tidak memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan *E.coli*. Perlakuan alkohol 70% sebagai antiseptik dapat menghambat pertumbuhan *E.coli* dan jumlah rerata sebanyak 34,0 CFU. Mekanisme kerja alkohol, yaitu merusak membran sel dari bakteri, sehingga komponen intraseluler akan keluar. Alkohol juga bekerja dengan cara mendenaturasi protein-protein yang berada dalam sel bakteri, sehingga kinerja dari enzim bakteri akan terhambat, mengakibatkan proses metabolisme terganggu.[27] Perlakuan kombinasi ekstrak kulit buah *C.aurantfiolia* dan *C.hystrix* (*Ca+Ch*) dapat menghambat pertumbuhan *E.coli* dengan jumlah bakteri yang bervariasi sesuai dengan variasi konsentrasi kombinasi ekstrak yang diberikan tampak jumlah koloni sebagai efek pemberian ekstrak kombinasi kulit buah *C.aurantfiolia*

dan *C.hystrix* (*Ca*+*Ch*) pada perlakuan *Ca*75%+*Ch*100% dan *Ca*75%+*Ch*100%, tidak berbeda jauh dengan efek antiseptik alkohol 70%. Rerata jumlah koloni *E.coli* setelah perlakuan ekstrak kombinasi kulit buah *Ca*100%+*Ch*100% memberikan efek pada rerata jumlah koloni *E.coli* yang paling sedikit dibandingkan dengan perlakuan kombinasi ekstrak lainnya. Peningkatan konsentrasi pada ekstrak kombinasi kulit buah *Ca* dan *Ch* dapat meningkatkan efek penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri *E.coli.*

Penghambatan terhadap pertumbuhan *E.coli* yang dihasilkan setelah perlakuan ekstrak *Ca*100%+*Ch*100% (32,0 CFU/ml) relative lebih baik daripada pada perlakuan alkohol 70% (34,0 CFU/ml). Hasil ini sesuai dengan nilai koefisien fenol yang dihasilkan pada perlakuan ekstrak *Ca*100%+*Ch*100% yang juga relative lebih tinggi daripada alkohol 70%. Hal ini dapat menunjukkan bahwa aktivitas antiseptik yang dihasilkan dari ekstrak kombinasi kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix*, dipengaruhi oleh mekanisme kerjanya sebagai antibakteri dalam menghambat pertumbuhan *E.coli*. Hal ini juga sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan kombinasi memperlihatkan daya antiseptik yang efektif.[18]

Data jumlah koloni *E.coli* pada perlakuan ekstrak kombinasi kulit buah (EKKB) *C.aurantifolia* dan *C.hystrix* (*Ca*+*Ch*) dan kontrol memiliki sebaran normal (nilai p > 0,05); hasil uji normalitas menggunakan uji *Levene* diperoleh p > 0,05 tercantum pada Lampiran 10. Analisis selanjutnya adalah mengetahui ada tidaknya perbedaan efek pada kelompok perlakuan yang dianalisis dengan uji *One-Way* ANOVA (lampiran 11); didapatkan nilai p < 0,0% (p<0,05), artinya didapatkan perbedaan efek yang bermakna. pada tiap kelompok perlakuan yang diujikan terhadap *E.coli*. Selanjutnya untuk mengatahui perbandingan efek tiap kelompok perlakuan EKKB dan kontrol mana yang berbeda atau tidak berbeda secara bermakna terhadap jumlah koloni bakteri *E.coli*, maka dilakukan uji *Post hoc Duncan*.

Tabel 1 Rerata+SD Jumlah Koloni *Escherichia coli* pada Tiap Kelompok Perlakuan Berdasarkan Uji *Post hoc Duncan* (α = 0,05)

No.	Perlakuan	Rerata+SD Jumlah Koloni E.coli (CFU/ml)
1	Kontrol DMSO 1%	88 ±8,54^{k}
2	EKKB *Ca*25%+*Ch* 25%	81±5,58^{jk}
3	EKKB *Ca*50%+*Ch*25%	75 ±5,00^{ij}
4	EKKB *Ca*75%+*Ch*25%	70±6,55^{hij}
5	EKKB *Ca*25%+*Ch*50%	69±5,56^{ghi}
6	EKKB *Ca*100%+*Ch*25%	64±4,58^{fghi}
7	EKKB *Ca*50%+*Ch*50%	63±4,58^{fgh}
8	EKKB *Ca*75%+*Ch*50%	58±9,84^{efg}
9	EKKB *Ca*25%+*Ch*75%	55±6,24^{def}
10	EKKB *Ca*100%+*Ch*50%	54±4,00^{def}
11	EKKB *Ca*50%+*Ch*75%	51±8,18^{cde}
12	EKKB *Ca*75%+*Ch*75%	46±13,22^{bcd}
13	EKKB *Ca*25%+*Ch*100%	44±4,00^{abcd}
14	EKKB *Ca*100%+*Ch*75%	42±1,00^{abc}
15	EKKB *Ca*50%+*Ch*100%	39±6,55^{ab}
16	EKKB *Ca*75%+*Ch*100%	35±3,60^{ab}
17	Kontrol Alkohol 70%	34±1,00^{ab}
18	EKKB *Ca*100%+*Ch*100%	32±5,29^{a}

Keterangan: rerata dan standar deviasi dengan notifikasi huruf superskrip yang berbeda (a/b/c/d/e/f/g/h/i/j/k) menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dengan kontrol (p>0.05)

Perlakuan ekstrak kombinasi kulit buah *Ca+Ch* yang menunjukkan efek penghambatan berbeda dan tidak berbeda bermakna terhadap jumlah koloni *E.coli*. Tampak ekstrak kombinasi kulit buah (EKKB) *C.aurantfiolia* dan *C.hystrix* (*Ca+Ch*) pada perlakuan *Ca*100%+ *Ch*100% menghasilkan efek berbeda bermakna dengan perlakuan lainnya dan dengan kontrol alkohol 70%; perlakuan *Ca*75%+*Ch*100%, dan *Ca*50%+*Ch*100% tidak berbeda bermakna dengan kontrol antiseptik alkohol 70%. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak kulit buah *C.aurantfiolia* dan *C.hystrix* (Ca+Ch) pada kadar *Ca*75%+*Ch*100% sudah memiliki efek antibakteri/antiseptik yang optimum efektivitasnya setara dengan alkohol 70% dan efektivitasnya meningkat pada *Ca*100%+*Ch*100%. Hasil ini dipengaruhi oleh banyaknya senyawa sekunder yang dapat terlarut pada penggunaan konsentrasi yang meningkat; peningkatan konsentrasi ekstrak tanaman uji dapat meningkatkan aktivitas antibakteri.[28] Pemberian zat antibakteri antiseptic pada kosnsentrasi optimum dapat mempengaruhi virulensi bakteri uji. Faktor virulensi yang dimiliki oleh *E.coli*. Bakteri *E.coli* yaitu P fimbriae dan hemolisin A.[29,30] Pada penelitian Kusuma Y dkk mengatakan penggunaan antiseptik kombinasi pada bakteri *Escherichia coli* hanya memiliki nilai signifikan jika dibandingkan dengan alkohol.[27]

Beberapa faktor yang mempengaruhi kelarutan senyawa bioaktif pada ekstrak yaitu motede ekstraksi dan jenis pelarut yang digunakan. Penelitian ini menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode ekstraksi berupa maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi dengan proses perendaman bahan dengan pelarut yang sesuai dengan senyawa aktif yang akan diambil dengan pemanasan rendah atau tanpa adana proses pemanasan. Etanol 96% merupakan pelarut universal; dapat menarik senyawa-senyawa polar dan semi polar, serta beberapa senyawa non polar.[6] senyawa sekunder pada kedua jenis kulit jeruk yaitu. Saponin, flavanoid, alkaloid, dan tanin. Kandungan senyawa sekunder ini sesuai dengan penelitian sebelumnya; juga disebutkan bahwa aktivitas antibakteri yang diperlihatkan oleh kulit buah *C.arantifolia* dan *C.hystrix* berasal dari senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada kedua jenis kulit buah jeruk ini (*C.aurantifolia* dan *C.hystrix).* [31,32,6]

Kandungan saponin yang terdapat pada kulit buah *Citrus* bekerja dengan menghambat dan mematikan bakteri dengan cara merusak membran sel serta mengganggu proses metabolisme bakteri.[31] Flavonoid pada kulit buah Citrus mempunyai fungsi sebagai antioksidan yang kuat. Mekanisme flavonoid, seperti quercetin sebagian besar disebabkan oleh penghambatan DNA gyrase. *Sophoraflavone* G dan (-)-*epigallocatechin gallate* telah diusulkan dapat menghambat fungsi membran sitoplasma, sedangkan licochalcones A dan C dapat menghambat metabolisme energi sehingga bakteri tersebut mati.[33,25,34] Flavanoid juga dapat mendepolarisasi membran sel dan menghambat sintesis DNA, RNA maupun protein.[33] Senyawa alkaloid bekerja sebagai antibakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan terjadinya kematian sel.[35] Dan juga menghambat proses replikasi DNA menyebabkan bakteri tidak dapat melakukan pembelahan sel.[36] Selain itu, tanin sebagai antibakteri bekerja berdasarkan kemampuannya mempresipitasi protein, karena tanin mempunyai efek yang sama dengan fenolik. Mekanisme cara kerjanya dengan menghambat enzim reverse transkiptase dan DNA topoimerase sehingga akan menyebabkan sel bakteri tidak dapat terbentuk, dan juga memiliki kemampuan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel dengan menginaktifkan adhesi sel mikroba dan menginaktifkan enzim transport protein.[37]

Pada penelitian ini hanya menganalisis efektivitas ekstrak kombinasi kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix* pada E.coli saja, sehingga perlu kelanjutan untuk mengetahui aktivitasnya pada bakteri patogen lainnya. Pada penelitian ini hanya menggunakan metode in vitro, sehingga belum diketahui koefisien fenol dan jumlah koloni ekstrak kombinasi kulit buah *C.aurantifolia* dan *C.hystrix* secara in vivo yang menggunakan keseluruhan organisme hidup seperti pada hewan dan manusia. Uji toksisitas terhadap ekstrak etanol kulit buah *Ca* dan *Ch* juga perlu dilakukan setelah metode in vivo, untuk mengetahui keamanan kandungan ekstrak kulit buah *C.aurantifolia*. dan *C.hystrix* yang dapat digunakan sebagai bahan fitofarmaka sehingga data yang diperoleh dapat memberikan informasi dosis terapi, dosis toksik, efek samping, dan efek toksiknya.Tahapan pengembangan sediaan/formulasi dapat dilakukan sebagai uji lanjutan agar mengetahui bentuk sediaan ekstrak etanol kulit buah *C.aurantifolia*. dan *C.hystrix* yang memenuhi syarat mutu, keamanan dan estetika untuk pemakaian pada manusia serta selanjutnya dilakukan tahapan uji klinisi.[38] Uji organoleptik pada penelitian antiseptik juga diperlukan untuk pengukuran daya dan penerimaan terhadap produk agar dapat dimanfaatkan dimasyarakat luas.[39]

PENUTUP

Kesimpulan dari hasil penelitian ini yaitu ekstrak kombinasi kulit buah *C.aurantifola* (*Ca*) dan *C.hystrix* (*Ch*) terhadap bakteri *E.coli* secara *in vitro* dan memiliki efektivitas sebagai antiseptik.

Penelitian berikutnya dapat menggunakan mikroorganisme lainny, dan dilakukan uji lanjutan, uji toksisitas, dan aktivitas antibakteri ekstrak kombinasi *C.aurantifolia* dan *C.hystrix* secara *in vivo* terhadap hewan coba agar sediaan antiseptik serta uji organoleptik yang berasal dari ekstrak kombinasi kulit buah C.aurantifolia dan C.hystrix dapat digunakan sebagai antiseptik alternatif untuk meminimalisir efek yang ditimbulkan oleh alkohol 70%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Carrol KC, Butel J, Mietzner, T Jawetz, Melnick, Adelberg's. Medical microbiology. 27th Edition. New York: McGraw Hill Education; 2016.
2. Yuwono. Flora normal. Dalam: Mikrobiologi penyakit infekksi. Palembang: Universitas Negeri Sriwijaya. 2012;p.13-6.
3. Balitbang Kemenkes RI. Riset Kesehatan Dasar; RISKESDAS. Jakarta:Balitbang Kemenkes RI: 2018.
4. Rini EP, Nugraheni ER. Uji daya hambat berbagai merek hand sanitizer gel terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Journal Of Pharmaceutical Science And Clinical Research. 2018:1:18-26.
5. Wardani R, Jekti DSDD, Sedijani P. Uji aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia Swingle*) terhadap pertumbuhan bakteri isolat klinis. 2018;5(1):10-11.
6. Budiarti LY, Nurikhwan PW, Muthmainah N. Metode pencegahan infeksi. 2021. Banjarmasin CV. Sarimulia Indah; 2021.
7. Budiarti LY, Wydiamala E, Ulfa N. Phenol coefficient test combination infusion of *Cananga odorata – Averrhoa bilimbi L. Against Staphylococcusaureus* and *Salmonella typhi* in Vitro. 2021;4(1):23-25.
8. Budiarti LY, Yasmina A, Nurikwan PW, Prayudi MOS, Firisa MR and Kangsudarmanto Y. Antibacterial activity of infused peel of *kaffir lime, manurun banana,* and *pineapple* against the number of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* colonies. 2022:2-3.
9. Irwan A, Mustikasari K, Ariyani D. Pemeriksaan pendahuluan kimia daun, Kulit dan buah limau kuit: jeruk lokal Kalimantan Selatan. Sains dan Terapan Kimia. 2017;11:71-79.

10. Irwan A, Junaidi AB. Kajian awal metabolomik pada ekstrak metanol daging buah limau kuit dengan analisis Gc-Ms tidak tertarget. Prosiding Seminar Nasional Lingkungan Lahan Basah. 2020;5:27-31.
11. Lee JH, Cho S, Choi CW, Nam KT, Hwang SG, Kim SK. Investigation on bacterial and antioxidant activities, phenolic and flavonoid contents of some thai edible plant as an alternative for antibiotics. Asian-Australasian. 2014;27(10):1462-1464.
12. Sari ID, Wahjuni SR, Praja NR, Utomo B, Fikri F, Wibawati AP. Perasankulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia, Swingle*) menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* secara in vitro. 2021;4(1):63-71.
13. Lauma SW, Damajanty HCP, Bernart SPH. Uji efektivitas perasan air jeruk nipis (*citrus aurantifolia s*.) terhadap pertumbuhan bakteri *staphylococcus aureus* secara in vitro. 2015;4(4):9-12.
14. Ariyani H, Nazemi M, Hamidah H, Kurniati M. Uji efektivitas antibakteri ekstrak kulit limau kuit (*Cytrus hystrix Dc*) terhadap beberapa bakteri. JCPS (Journal of Current Pharmaceutical Sciences). 2018;2(1):136-141.
15. Prayudi OM. Aktivitas antibakteri ekstrak air kulit limau kuit (*Citrus hytrix DC*) terhadap jumlah koloni *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. 2017:3-49.
16. Fitriana, Rusli. Pengaruh variasi konsentrasi kombinasi perasaan jeruk nipis*(Citrus aurantifolia. S)* dan getah jarak pagar *(Jatropha curcas. L)* terhadap aktivitas antibakteri. As-Syifaa 4(02):176-189,ISSN:2085-4714.
17. Meilaningrum AN, Putri NEK, Sastyarin Y. Uji aktivitas antibakteri ekstrak kombinasi umbi bawangtiwai dan kulit buah lemon terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. 2021. 13th Proceding. Mul. Pharm.Conf.2021.e-ISSN:2614-4778 05-07.
18. Dewi I, Yunianto B. Uji efektivitas sediaan hand sanitizer kombinasi ekstrak daun kemangi *(Ocimum Sanctum L)* dan ekstrak kulitjeruk purut *(Citrus Hystrix).* Jurnal Kebidanan Dan Kesehatan Tradisional. 2016:1(2), 130-135.
19. Kusnah B. Efektifitas variasi perasaan jeruk nipis *(Citrus aurantifolia)* terhadap pertumbuhan *Candida albicans* secara in vitro. 2016;8.
20. Awol M, Berhanu Y, Alemnesh T, Solomon T . In vitro antimicrobial activity of essential oil of *Thymus schimperi, Matricaria chamomilla, Eucalyptus globulus, and Rosmarinus officinalis*. 2015:2-3.
21. Almasyhuri A, Sundari D. Uji aktivitas antiseptik ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle* Linn.) dalam obat kumur terhadap *Staphylococcus aureus* secara in vitro. J Kefarmasian Indonesia. 2019;9(1):10–8
22. Dhavesia V. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix DC*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidemidis*. 2017:6-11.
23. Jamaluddin N, Pulungan MH, Warsito. Uji aktivitas antibakteri minyak atsiri jeruk purut (*Citrus hystrix DC)* terhadap Klebsuella pneumoniae ATCC. 2017 ;6(2):61-66.
24. Lestari RK, Amalia E, Yuwono. Efektivitas jeruk nipis *(Citrus aurantifolia swingle)* sebagai zat antiseptik pada cuci tangan. Jurnal Kedokteran Kesehatan. 2018;5(2):55-65.
25. Sudarmi K, Darmayasa UBG, Muksin IK. Uji fitokimia dan daya hambat ekstrak daun juwet (*Syzygium cumini*) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* ATCC. 2017;1(2):47-51.
26. Ancela RL, Usman P, Evy R. Uji antibakteri ekstrak batang kecombrang (*Nicolaia Speciosa Horan*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Jom Faperta.

2016;3(1):4-5.
27. Kusuma Y, Pinatih KJP, Hendrayana MA. Efek sinergis kombinasi cholorhexidine dan alkohol terhadap daya hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. 2019;8(3):1-4.
28. Alfiah RR, Khotimah S, Turnip M. Efektivitas ekstrak metanol daun sembung rambat (*Mikania micrantha Kunth*) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*. 2015;4(1):52-57.
29. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. 8th Edition. Canada: Elsevier; 2016.
30. Khusnan, Purnomo A. Deteksi faktor virulensi secara fenotip pada *Escherichia coli* isolat susu mentah sapi perah. 2022;23(1):42-54.
31. Ishak NI, Kasman, Chandra. Efektivitas ekstrak kulit buah limau kuit (*Citrus Amblycarpa*) sebagai larvasida *Aedes Aegypti* instar III. 2019;15(3):302-209.
32. Hindun S, Rusdiana T, Abdasah M, Hindritiani R. Potensi limbah kulit jeruk nipis (*Citrus auronfolia*) sebagai inhibitor tirosinase. 2017;4(2):64-68.
33. Berlian Z, Fatiqin A, Agustina E. Penggunaan perasan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* pada bahan pangan. 2016;2(1):51-55.
34. Suteja IKP, Rita WS, Gunawan IWG. Identifikasi dan uji senyawa flavanoid dari ekstrak daun trembesi (*Albizia sama (Jacq.).Merr*) sebagai antibakteri *Escherichia coli*. 2016;10(1):141-148.
35. Amalia A, Sari I, Nursanty R. Aktivitas antibakteri ekstrak etil asestat dan sembung (*blumea balsamifera(L.)DC*.) terhadap pertumbuhan bakteri. 2017;1(1).387-390.
36. Sari AN, Asri MT. Aktivitas antibakteri ekstrak kulit jeruk nipis (*Citurs aurantifolia*) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae.* 2022;11(3):441-446.
37. Huda C, Putri AE, Sari DW. Uji aktivitas antibakteri fraksi dari maserat *Zibethinus folium* terhadap *Escherichia coli*. 2019;3(1):7-12
38. Sari AA, Saleh C, Erwin. Uji fitokimia, toksisitas dan aktivitas antibakteri ekstrak berbagai fraksi daun mara (*Macarangatanarius* (L.) M.A) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli.* Jurnal Kimia Mulawarman. 2015; 12(2): 53-58.
39. Staff Pengajar Program Studi Teknologi Pangan UNIMUS. Pengujian Organoleptik; 2013.