

[ARTIKEL PENELITIAN]

Perbandingan Efek Pemberian Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum L.*) terhadap Daya Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* Secara *In Vitro*

Atika Threenesia¹, Muhammad Ricky Ramadhian²

¹Mahasiswa, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

²Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

Abstrak

Tingginya angka kematian akibat infeksi dan peningkatan resistensi antibiotik sehingga diperlukan terapi alternatif memanfaatkan bahan alami tanaman. Tanaman kemangi mengandung senyawa flavonoid, tannin dan minyak atsiri yang bersifat antibakteri. Untuk mengetahui efek pemberian ekstrak etanol daun kemangi terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri. Desain penelitian adalah analitik laboratorik dengan metode eksperimen perbandingan kelompok statis. Penelitian ini menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* yang diujikan dengan ekstrak etanol daun kemangi pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100% lalu diukur zona hambat yang terbentuk. Hasil penelitian ini menunjukkan rerata diameter zona hambat pada bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 14,96 mm dan *Salmonella typhi* sebesar 8,04 mm. Hasil analisis penelitian dengan menggunakan uji t tidak berpasangan didapatkan $p < 0,05$. Ekstrak daun kemangi memiliki aktifitas antibakteri pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi*. Dan ekstrak etanol daun kemangi tidak dapat melebihi kontrol positif pada penelitian.

Kata kunci: Ekstrak etanol daun kemangi, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*.

Compare The Effect of Giving The Ethanol Extract Basil Leaf (*Ocimum sanctum L.*) Has Growth Inhibitory *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi* with *In Vitro*

Abstract

High mortality due to infection and also increased resistance against antibiotics so it needs an alternative therapy utilizing natural ingredients of medicinal plants. Compounds containing basil plant flavonoids, tannins and essential oils which have an antibacterial effect. To measure the effect of giving the ethanol extract of basil against bacteria growth inhibitory power. This study is an analytic laboratory experimental with the comparison method static group. This study subjects using bacteria *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi*. The ethanol extract was tested with the basil leaves on the concentration 20%, 40%, 60%, 80%, and 100% and measured the inhibitory zone formed. Results showed the average diameter of inhibition zone on bacteria *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi* is 14,96 mm and 8,04 mm. Research analysis results using Independent T test obtained value $p < 0,05$. Basil leaf ethanol extract has antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi*. And basil leaf ethanol extract can't exceed the positive control.

Keywords: Basil leaf ethanol extract, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*.

Korespondensi : Atika Threenesia | Jl Landak No.32 Kedaton, Bandar Lampung | 087887253719 | a.threenesia@gmail.com

Pendahuluan

Tingginya angka kematian di dunia terutama di daerah tropis seperti Indonesia, salah satunya disebabkan oleh penyakit infeksi. Salah satu agen penyebabnya yaitu bakteri *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) dan *Salmonella typhi* (*S. typhi*). Bakteri *S. aureus* merupakan bakteri Gram positif. Bakteri *S. aureus* ini merupakan flora normal dalam tubuh manusia tetapi apabila jumlahnya berlebih dari ambang batas maka akan menyebabkan terjadinya infeksi. *S. aureus* dapat menyebabkan infeksi kulit, pneumonia, endokarditis, dan meningitis. *S. typhi*

merupakan bakteri Gram negatif. *S. typhi* dapat menyebabkan demam tifoid dan diare.¹

Penyakit infeksi di Indonesia kebanyakan diatasi dengan menggunakan antibiotik. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat menyebabkan peningkatan resistensi. Bila telah resistensi maka akan lebih sulit untuk melakukan upaya pengobatan. Maka, diperlukan terapi alternatif untuk mengobati infeksi yaitu dengan memanfaatkan bahan alami dari tanaman obat.²

Indonesia memiliki lebih dari 30.000 jenis tumbuhan, salah satu tanaman obat yang dikenal yaitu kemangi. Tanaman kemangi mudah tumbuh di Indonesia.^{3,4}

Tanaman kemangi memiliki efek antidiabetik, antibakteri dan antihiperlipidemik dan memiliki efektifitas antioksidan. Tanaman kemangi ini mengandung senyawa flavonoid, tannin, dan minyak atsiri yang bersifat antibakteri. Minyak atsiri menjadi kandungan paling utama dalam kemangi. Kandungan minyak atsiri dalam daun kemangi mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Candida albicans*, *Streptococcus alfa* dan *Bacillus subtilis*.^{5,6,7}

Pada penelitian sebelumnya didapatkan hasil minyak atsiri daun kemangi mempunyai aktivitas antibakteri dengan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dan *Candida albicans*. Ekstrak alkohol dari daun kemangi dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*.⁸

Berdasarkan uraian di atas maka peneliti akan melakukan penelitian untuk menguji khasiat dari ekstrak daun kemangi terhadap diameter zona hambat bakteri Gram negatif (*S. typhi*) dan Gram positif (*S. aureus*).

Metode Penelitian

Bahan penelitian ini menggunakan daun kemangi (*Ocimum sanctum L.*) yang dibeli di pasar tradisional yang berada di Bandar Lampung. Mikroba uji, di antaranya adalah bakteri Gram negatif (-) yaitu *S. typhi* dan bakteri Gram positif (+) yaitu *S. aureus*. Bakteri ini didapatkan dari UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Bandar Lampung. Media *Mannitol Salt Agar* (MSA) dan media agar MHA (*Muller Hinton Agar*). Ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum L.*) dalam tingkat konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%. Antibiotik ceftriakson dan penisilin sebagai kontrol positif dan akuades sebagai kontrol negatif.

Pada penelitian ini, untuk mendapatkan zat aktif daun kemangi, maka perlu dilakukan proses ekstraksi. Proses ekstraksi yang dilakukan adalah dengan menggunakan metode maserasi. Prinsip ekstraksi dengan metode maserasi adalah ekstraksi zat aktif yang dilakukan dengan cara merendam serbuk dalam pelarut yang sesuai selama beberapa hari pada temperatur kamar yang terlindung dari cahaya. Pelarut yang digunakan adalah etanol.⁹

Kemudian, sejumlah ekstrak daun kemangi akan diencerkan sehingga mendapat beberapa macam konsentrasi dalam tabung reaksi. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah sumuran, yakni dengan membuat lubang pada agar padat dengan diameter 6 mm pada media nutrient agar yang sudah tercampur dengan bakteri uji sebanyak 1 mL setiap cawan, lalu setiap cawan dibuat 4 sumuran, dan kemudian di tiap-tiap sumuran diberi ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum L.*) dengan masing-masing konsentrasi sebanyak 50 µl. Kemudian diamati kadar zona hambat dari pertumbuhan bakteri *S. typhi* dan *S. aureus*. Dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali.¹⁰

Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini, didapatkan hasil diameter zona hambat pada kedua bakteri uji. Pada bakteri *S. aureus* (tabel 1), secara deskriptif zona hambat yang terbentuk paling tinggi terdapat pada konsentrasi 100% dengan rerata 21,75 mm. Sedangkan pada *S. typhi* (tabel 2), secara deskriptif zona hambatan yang tertinggi pada konsentrasi 80% dengan rerata 6,25 mm. Dan pada analisis bivariat didapatkan hasil terdapat perbandingan bermakna secara statistik terhadap diameter zona hambat bakteri *S. aureus* dan *S. typhi*.

Tabel 1. Diameter Zona Hambat *Staphylococcus aureus*.

Permeabilitas	Diameter Zona Hambat (mm)					Kontrol Positif (Ceftriakson)	Kontrol Negatif (akuades)
	Ekstrak 20%	Ekstrak 40%	Ekstrak 60%	Ekstrak 80%	Ekstrak 100%		
1	11	10	11	14	24	39	0
2	10	10	11	13	25	43	0
3	4	10	10	10	35	44	0
4	5	7	9	15	23	45	0
Rerata	8,5	9	10	13,25	21,75	43,75	0

Tabel 2. Diameter Zona Hambat *Salmonella typhi*.

Permeabilitas	Diameter Zona Hambat (mm)					Kontrol Positif (Ceftriakson)	Kontrol Negatif (akuades)
	Ekstrak 20%	Ekstrak 40%	Ekstrak 60%	Ekstrak 80%	Ekstrak 100%		
1	6	6	6	11	8	12	0
2	-	0	5	6	7	29	0
3	8	-	-	8	9	35	0
4	-	0	5	-	-	31	0
Rerata	3,5	5	4	6,25	6	31,5	0

Baik *S. aureus* dan *S. typhi* menunjukkan peningkatan diameter zona hambat yang tidak selalu diikuti dengan peningkatan konsentrasi

ekstrak daun kemangi. Hal ini sesuai dengan penelitian yang menyebutkan diameter zona hambat tidak selalu naik sebanding dengan kenaikan konsentrasi ekstrak dan jenis ekstrak yang berbeda dapat memberikan zona hambat yang berbeda-beda. Rerata zona hambat yang terbentuk pada *S. aureus* tergolong tinggi dibandingkan dengan bakteri *S. typhi*. Karena, bila daya hambat yang terbentuk oleh ekstrak lebih dari 20mm yang berarti zona hambat ekstrak daun kemangi tersebut tergolong sangat kuat. Sedangkan zona hambat yang ukurannya 10mm-20mm tergolong kuat, 5-10mm tergolong sedang dan kurang dari 5mm tergolong lemah. Dan ini menunjukkan bahwa ekstrak daun kemangi lebih dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif yaitu *S. aureus* dibandingkan bakteri Gram negatif yaitu *S. typhi*.¹¹

Hal ini dapat disebabkan karena perbedaan dinding sel bakteri Gram positif memiliki struktur dinding sel yang lebih sederhana dibandingkan Gram negatif memiliki dinding sel bakteri yang sangat kompleks. Dinding sel bakteri Gram positif yakni hanya terdiri dari peptidoglikan dan asam teichoat, sedangkan bakteri Gram negatif terdiri dari peptidoglikan dan membran luar yang mengandung tiga komponen penting di luar peptidoglikan, yakni lipoprotein, lipopolisakarida, dan membran periplasma. Sehingga bakteri Gram positif lebih mudah dihambat pertumbuhannya daripada Gram negatif oleh antimikroba.¹²

Zona hambat yang terbentuk karena ekstrak daun kemangi memiliki senyawa metabolit yang bersifat antibakteri. Kandungan daun kemangi sendiri mengandung senyawa minyak atsiri, karbohidrat, fitosterol, alkaloid, fenol, tanin, lignin, pati, saponin, flavonoid, terpenoid, antrakuinon, minyak volatil termasuk metil sinamat, metil heptenon, metil nonilketon, kamfor, dan sitrat.⁸

Menurut Yuhana *et al.*,¹³ daun kemangi mengandung senyawa metabolit yaitu senyawa flavonoid dan fenol. Senyawa flavonoid bersifat lipofilik yang akan merusak membran bakteri. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Senyawa fenolik dapat memutuskan ikatan peptidoglikan ketika

melewati dinding sel.^{13,14}

Senyawa fenol/flavonoid (pinocembrin) bekerja dengan cara denaturasi protein, mengganggu metabolisme sel dan menyebabkan lisis sel bakteri. Senyawa alkaloid dapat menghambat pembentukan peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel pada sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel. Senyawa saponin dapat menghambat sintesis protein karena terakumulasi dan menyebabkan kerusakan komponen-komponen penyusun sel bakteri. Saponin termasuk ke dalam kelompok antibakteri yang bersifat bakterisidal. Hal ini didasari pada carakerja saponin yang berinteraksi dengan membran sterol sehingga membuat dinding sel bakteri rusak dan terjadi pelepasan komponen penting daridalam sel bakteri yang pada akhirnya sel bakteri mengalami lisis.^{15,16,17,18}

Etanol yang secara umum digunakan sebagai pelarut dalam proses ekstraksi merupakan senyawa yang bersifat semi polar yang digunakan sebagai pelarut karena bersifat netral, sulitnya kuman untuk tumbuh, tidak beracun, absorpsi baik, dan etanol dapat bercampur dengan segala perbandingan. Etanol juga secara selektif dapat menghasilkan sejumlah senyawa aktif yang optimal, serta panas yang dibutuhkan untuk pemekatan lebih sedikit.¹⁹

Etanol dapat melarutkan zat aktif dalam kemangi (flavonoid dan fenol) dengan baik namun etanol tidak mampu melarutkan lemak dengan baik. Hal ini menyebabkan terdapat perbedaan hasil rerata diameter yang dihasilkan terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *S. typhi* setelah diberikan ekstrak daun kemangi dengan pelarut etanol. Pada *Staphylococcus aureus* yang merupakan bakteri Gram positif, tidak memiliki lapisan lipopolisakarida yang tebal, sehingga zat aktif yang terlarut dalam etanol dapat bekerja secara optimal dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Pada *S. typhi* yang merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki lapisan lipopolisakarida yang tebal dan lapisan peptidoglikan yang tipis dibawah lipopolisakarida. Lapisan lipopolisakarida ini yang menghambat pertumbuhan *S. typhi* sehingga ekstrak etanol daun kemangi tidak bekerja secara optimal.^{9,20}

Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Rahmawati,²¹ dilakukan uji aktivitas antibakteri

ekstrak daun kemangi terhadap *S. aureus* dan *Escherichia coli*. Didapatkan hasil pada konsentrasi 80% didapatkan daya hambat paling tinggi pada bakteri *S. aureus* sedangkan pada *Escherichia coli* hampir tidak dapat dibedakan zona hambat yang terbentuk karena sangat sedikit zona hambat yang terbentuk. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan yaitu hasil yang didapatkan untuk diameter zona hambat pada bakteri Gram positif lebih besar dibanding Gram negatif.²¹

Penelitian lainnya oleh Angelina²² yang juga menguji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kemangi terhadap *S. aureus* dan *Escherichia coli*. Didapatkan hasil zona hambat yang meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak, yaitu zona paling kuat terbentuk pada konsentrasi 100% sebesar 18,9 mm pada *S. aureus* dan 10,26 mm pada *E. coli*. Sehingga dapat dilihat bahwa ekstrak etanol daun kemangi lebih poten terhadap bakteri Gram positif dibanding Gram negatif.²²

Namun, pada penelitian Khalil²³ didapatkan hasil uji ekstrak daun kemangi memiliki daya hambat lebih kuat terhadap bakteri *Escherichia coli* dibandingkan *S. aureus*. Yaitu sebesar 21 mm dan 16 mm. Hal diduga karena perbedaan prosedur pengeringan yang dilakukan. Pada penelitian ini dilakukan pengeringan langsung menggunakan cahaya matahari, sedangkan pada penelitian Khalil²³ dilakukan pengeringan dengan menggunakan oven. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hector²⁴ yang menyatakan bahwa suhu dan lama pengeringan dapat mempengaruhi kadar suatu zat pada proses pengeringan.^{23,24}

Ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi diameter zona hambat, antara lain konsentrasi mikroba pada media agar, nilai pH pada media agar. Namun selain itu pengaruh dari ekstrak etanol daun kemangi juga berpengaruh terhadap variasi diameter zona hambat.²⁵

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah penisilin pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan ceftriakson pada bakteri *S. typhi*. Kontrol positif diperlukan sebagai pembanding sama halnya dengan kontrol negatif. Hal ini digunakan untuk membandingkan perlakuan ekstrak dengan antibiotik murni (penisilin dan ceftriakson). Penisilin dan seftriakson merupakan antibiotika golongan betalaktam. Antibiotik golongan beta-laktam mempunyai mekanisme kerja anti

bakteri yang secara umum menyebabkan kerusakan dinding sel bakteri. Mekanisme dari beta-laktam (1) Perlekatan pada protein mengikat penisilin yang spesifik (PBPs) yang berlaku sebagai obat reseptor pada bakteri, (2) Penghambatan sintesis dinding sel dengan menghambat transpeptidasi dari peptidoglikan, dan (3) pengaktifan enzim autolitik di dalam dinding sel, yang menghasilkan kerusakan sehingga akibatnya bakteri mati. Pada penelitian ini rerata zona hambat yang dihasilkan penisilin 42,75 mm dan seftriakson 31,5 mm.

Selain faktor-faktor yang telah dijelaskan sebelumnya, dalam melakukan penelitian ini juga tidak terlepas dari adanya kelemahan, keterbatasan, dan kemungkinan bias lainnya yang tidak bisa dihindarkan walaupun telah diupayakan untuk mengatasinya. Di antaranya adalah kondisi lingkungan saat melakukan penelitian yang kurang mendukung (suhu lingkungan dan tingkat kontaminasi yang cukup tinggi).

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kemangi lebih efektif terhadap bakteri *S. aureus* dibandingkan dengan *S. typhi*.

Terdapat aktivitas antibakteri pada ekstrak etanol daun kemangi terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *S. typhi* dengan zona hambat tertinggi pada *S. aureus* pada konsentrasi 100% dengan hasil zona hambat 21,75mm dan *S. typhi* pada konsentrasi 80% dengan hasil zona hambat 6,25mm

Daftar Pustaka

1. Jawetz, Melnick, Adelberg. Mikrobiologi kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg 25th ed. Jakarta, Indonesia: EGC; 2010.
2. Ibrahim T, Opwale B, Oyoniloye J. Antibacterial activity of herbal extracts against multi drug resistant strains of bacteria from clinical original. Life Sciences Leaflets. 2011; 15:490–8.
3. Direktorat Jenderal POM. Standarisasi ekstrak tumbuhan obat indonesia, salah satu tahapan penting dalam pengembangan obat asli indonesia. InfoPOM. 2005; hlm. 1–12.
4. Tri AB. Bebas stress. Yogyakarta: Kanisius; 2009.

5. Ahmad IM, Kun H, Agus S. Pemanfaatan kemangi (*Ocimum sanctum*) sebagai substitusi aroma pada pembuatan sabun herbal antioksidan. 2010; hlm.13–7..
6. Mahmood K, Yaqoob U, Bajwa R. Antibacterial activity of essential oil of *Ocimum sanctum L.*, *Mycopath.* 2008; 6:hal.63–5.
7. Sudarsono et al. Tumbuhan obat II (hasil penelitian, sifat-sifat, dan penggunaannya), Jakarta, Indonesia: Pusat Studi Obat Tradisional Universitas Gadjah Mada; 2002.
8. Dhale D, Birari A, Dhulgande S. Preliminary screening of antibacterial and phytochemical studies of *ocimum americanum Linn.* *JEcobiotechnology.* 2012; 2:hal.11–3.
9. Mujahid R, Pkd A, Nita S. Maserasi sebagai alternatif ekstraksi pada penetapan kadar kurkuminoid simplisia temulawak (*Curcuma xanthoriza Roxb*): 2008. 18-23. Diakses pada: <http://publikasiilmiah.unwahas.ac.id/index.php/ilmuFarmasidanklinik/article/view/374/479>.
10. Ainurrochmah A, Ratnasari E, Lisdiana L. Efektivitas ekstrak daun binahong (*Anredera cordofolia*) terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* dengan metode sumuran. *JUnesa.* 2013; 2(3).
11. Rita W. Isolasi, identifikasi, dan uji aktivitas antibakteri senyawa golongan triterpenoid pada rimpang temu putih (*Curcuma zedoaria (Berg.) Roscoe*). *JKimia.* 2010; 4(1): hlm.20-6.
12. Lesage G, Bussey H. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisia.* *JMicrobiol Mol Biol.* 2006; 70:hlm. 317-43.
13. Yuhana SA, Kusdarwati R, Meles K, Daya antibakteri ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum L.*). [Skripsi]. Surabaya: Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga; 2013.
14. Pelczar MJ, Chan ECS, Dasar-dasar mikrobiologi I. Jakarta: Universitas Indonesia Press; 2008.
15. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2005; 26(5): hlm.343–56.
16. Siregar A, Sabdono A, Pringgenies D. Potensi antibakteri ekstrak rumput laut terhadap bakteri penyakit kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Micrococcus luteus*. *J marine research.* 2012; 1: hlm.152-60.
17. Brooks G, Butel J, Morse S, Mikrobiologi kedokteran, Jakarta, Indonesia: Salemba Medika; 2010.
18. Madigan T, Martinko J, Parker J. *Brock Biology microorganism.* Ed.12th. San Fransisco: Pearson/ Benjamin Cummings; 2009.
19. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawas Obat dan Makanan; 2002.
20. Dicky AKN. Perbandingan efek pemberian ekstrak temulawak (*Curcuma xanthoriza Roxb*) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *in vitro*. [Skripsi]. Bandar Lampung: Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung; 2016.
21. Rahmawati A. Uji aktivitas daya anti bakteri ekstrak daun kemangi (*Ocimum sactum L.*) terhadap bakteri *Escherichia coli ATCC 11229* dan *Staphylococcus aureus ATCC 6538* Secara *InVitro*. [Skripsi] Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Semarang; 2010.
22. Angelina M, Turnip M, Khotimah S. Uji aktivitas ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum L.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Protobiont.* 2015; 4(1): hlm.184–9.
23. Khalil A. Antimicrobial activity of ethanolic extracts of *Ocimum basilicum* leaf from saudi arabia. *J Biotechnology.* 2013; hlm.1-4.
24. Hector F. Optimal spray dryer of orange oil. *Proceeding of International Drying Symposium.* Brazil; 2004.
25. Greenwood D, Finch R, Davey P. Antibiotics sensitivity test, in antimicrobial and chemotherapy. USA: Oxford University Press; 2003.