

PERBANDINGAN AKTIVITAS ANTIMIKROBA ISOPROPANOL, CHLOROXYLENOL, DAN TRICLOSAN TERHADAP *Escherichia coli* IN VITRO

Fanny Rahardja¹, Winsa Husin², Natasha Setiawan³

1. Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha
2. Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha
3. Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha

Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha
Jl. Prof. drg. Suria Sumantri MPH no.65 Bandung 40164 Indonesia

Abstrak

Berbagai penyakit ditularkan melalui tangan, salah satunya adalah diare. Salah satu penyebab diare tersering adalah infeksi *Escherichia coli*. Penyebaran *Escherichia coli* dapat dicegah dengan mencuci tangan menggunakan antiseptik. Tujuan penelitian ini untuk membandingkan aktivitas antimikroba isopropanol, *chloroxylenol*, dan *triclosan* terhadap *Escherichia coli*.

Desain penelitian berupa eksperimental laboratorik sungguhan. Aktivitas antimikroba diuji dengan metode *disc diffusion*. Cakram kosong steril dicelupkan masing-masing ke dalam isopropanol 62%, *chloroxylenol* 4,8%, dan *triclosan* 0,05%, kemudian diletakkan pada *Müller Hinton Agar* yang sebelumnya telah diinokulasikan 100µl *Escherichia coli*. *Müller Hinton Agar* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Data yang diukur adalah diameter (mm) zona inhibisi yang terbentuk. Analisis data menggunakan ANAVA satu arah, yang dilanjutkan dengan uji *multiple comparison Fisher's LSD* dengan $\alpha=0,05$, kemaknaan ditentukan berdasarkan nilai $p<0,05$.

Hasil uji *multiple comparison Fisher's LSD*, rerata diameter (mm) zona inhibisi isopropanol (14,94±1,39) dan *triclosan* (14,69±1,43) berbeda sangat bermakna ($p<0,01$) dari *chloroxylenol* (32,39±2,18), sementara rerata diameter zona inhibisi isopropanol dan *triclosan* tidak bermakna ($p>0,05$).

Simpulan penelitian isopropanol, *chloroxylenol*, dan *triclosan* memiliki aktivitas antimikroba. Potensi antimikroba isopropanol dan *triclosan* sama namun lebih rendah dari *chloroxylenol*.

Kata kunci : diare, *Escherichia coli*, antiseptik, isopropanol, *chloroxylenol*, *triclosan*.

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY COMPARISON OF
ISOPROPANOL, CHLOROXYLENOL, AND TRICLOSAN
AGAINST *Escherichia coli* IN VITRO**

Fanny Rahardja¹, Winsa Husin², Natasha Setiawan³

1. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Maranatha Christian University

2. Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Maranatha Christian University

3. Faculty of Medicine, Maranatha Christian University

Faculty of Medicine, Maranatha Christian University
Jl. Prof. drg. Suria Sumantri MPH no.65 Bandung 40164 Indonesia

Abstract

Many diseases can be spread by hands, such as diarrhea. *Escherichia coli* is the most common cause of diarrhea. Transmission of *Escherichia coli* can be prevented by washing hand using antiseptics. The purpose of this study is to compare antimicrobial activity of isopropanol, chloroxylenol, and triclosan.

Real laboratory experimental design was conducted. Antimicrobial activity was tested using disc diffusion method. Paper discs were dipped each into isopropanol 62%, chloroxylenol 4.8%, and triclosan 0.05%, then placed into Müller Hinton Agar inoculated by 100µl *Escherichia coli*. Müller Hinton Agar was then incubated at 37°C for 24 hours. Antimicrobial activity was assessed by measuring diameter (mm) of inhibition zone. Antimicrobial activity was analyzed using one-way ANOVA, followed by multiple comparison Fisher's LSD with $\alpha=0.05$, level of significance at $p<0.05$.

There were highly significant differences ($p<0.01$) between average diameter (mm) of inhibition zone of isopropanol and triclosan ($14,94\pm 1.39$ and $14,69\pm 1.43$, consecutively) compared to chloroxylenol ($32,39\pm 2.18$). But there were no differences ($p>0.05$) between average diameter (mm) of inhibition zone of isopropanol compared to triclosan.

It is concluded that isopropanol, chloroxylenol, and triclosan have antimicrobial activity to *Escherichia coli*. Isopropanol and triclosan have the same potency but weaker than chloroxylenol.

Keyword : diarrhea, *Escherichia coli*, antiseptic, isopropanol, chloroxylenol, triclosan.

Pendahuluan

Menjaga kebersihan tangan merupakan salah satu cara untuk mencegah penyebaran infeksi melalui jalan *fecal-oral*, seperti diare. Diare didefinisikan sebagai buang air besar dengan konsistensi cair atau lebih lembek dari biasanya dan berlangsung lebih dari sama dengan 3 kali per hari, disebut akut bila kejadian diare kurang dari 14 hari dan kronis apabila lebih dari 14 hari¹.

Diare merupakan salah satu penyebab kematian pada anak-anak terutama di negara berkembang karena kebersihan yang buruk², antara lain karena kurangnya pengetahuan mengenai cuci tangan yang benar. Di negara berkembang, anak-anak kurang dari 5 tahun menderita diare sebanyak 3 kali per tahun³. *World Health Organization* (WHO) memperkirakan lebih dari 2 juta manusia meninggal akibat diare setiap tahunnya⁴. 90% penyebab diare akut adalah infeksi oleh mikroba, seperti *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, rotavirus, dan adenovirus.

Escherichia coli adalah bakteri batang Gram negatif, termasuk famili Enterobacteriaceae. *Escherichia coli* merupakan flora normal pada traktus gastrointestinal manusia dan hewan. Kebanyakan jenis *Escherichia coli* tidak berbahaya untuk usus manusia, namun ada 4 jenis *Escherichia coli* yang dapat menyebabkan infeksi saluran cerna. Keempat jenis ini masing-masing memiliki faktor virulensi yang spesifik, yaitu kemampuan untuk mengeluarkan toksin, kemampuan untuk menempel pada sel epitel, dan kemampuan untuk menginvasi. Salah satu jenis *Escherichia coli* yang

dapat menyebabkan infeksi adalah Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) yang menyebabkan diare dengan mengaktivasi *adenylyl cyclase* sehingga terjadi peningkatan *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) yang mengakibatkan hipersekresi air dan klorida serta menghambat reabsorpsi natrium^{5,6}.

Diare dapat dicegah dengan antara lain dengan menjaga kebersihan tangan yang dapat mengurangi risiko diare hingga 47%⁷. Mencuci tangan dapat dilakukan dengan memakai air bersih dan sabun. Sabun dapat menghentikan aktivitas mikroorganisme dan secara mekanik menghilangkannya dari tangan dengan bantuan air⁸

Selain sabun, dapat juga digunakan antiseptik berbasis alkohol dan bukan alkohol. Antiseptik ini dapat mengurangi jumlah mikroorganisme pada tangan dengan lebih baik daripada sabun biasa. Keuntungan lain penggunaan antiseptik adalah dapat membunuh bakteri lebih cepat dan memiliki spektrum antimikroba yang lebih luas^{8,9,10}.

Alkohol yang digunakan sebagai antiseptik adalah isopropanol, *n*-propanol, dan etanol. Berdasarkan penelitian secara *in vivo*, mencuci tangan dengan menggunakan isopropanol 60-70% dapat mengurangi jumlah bakteri aerobik gram negatif dari tangan. Penularan bakteri melalui tangan dapat dicegah dengan baik dengan mencuci tangan menggunakan isopropanol. Sampai saat ini belum ada bukti mengenai resistensi terhadap alkohol. Alkohol dinilai sebagai antiseptik yang paling aman untuk manusia¹¹. Namun, mencuci

tangan dengan antiseptik yang berbasis alkohol tidak dapat dilakukan pada tangan yang terlihat kotor secara kasat mata¹⁰.

Ada berbagai jenis bahan kimia bukan alkohol yang berfungsi sebagai antiseptik, contohnya adalah *chloroxymenol* dan *triclosan*. Antiseptik ini dapat mengurangi jumlah mikroorganisme pada tangan dengan baik, namun dapat berisiko menimbulkan resistensi pada bakteri serta dapat menyebabkan iritasi pada kulit⁸. *Chloroxymenol* dengan konsentrasi 0,5-4% memiliki sifat antimikroba dengan deaktivasi enzim bakteri dan merusak dinding sel bakteri. Pada konsentrasi kecil, *triclosan* bersifat bakteriostatik, namun pada konsentrasi besar bersifat bakterisidal¹¹.

Maksud dan Tujuan

Maksud

Maksud penelitian adalah untuk mencari alternatif pembersih tangan yang lebih efektif dalam mencegah diare.

Tujuan

Tujuan Penelitian :

1. Menilai aktivitas antimikroba isopropanol, *chloroxymenol*, dan *triclosan*.
2. Menilai potensi antimikroba isopropanol, *chloroxymenol*, dan *triclosan* terhadap *Escherichia coli*.

Metodologi Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik sungguhan. Metode yang digunakan adalah *disc diffusion* dengan mengukur zona inhibisi yang dihasilkan oleh isopropanol, *chloroxymenol*, dan *triclosan* untuk melihat efek antimikroba terhadap

Escherichia coli. Pada penelitian ini digunakan *Müller Hinton Agar* dan cakram yang telah diberi isopropanol, *chloroxymenol*, dan *triclosan*.

Analisis data menggunakan ANAVA satu arah, dilanjutkan dengan *multiple comparisons Fisher's LSD* dengan bantuan program SPSS 21. Kemaknaan ditentukan berdasarkan nilai $p < 0,05$.

Bahan, Alat, Objek Penelitian, Mikroba Uji, dan Cara Kerja

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari *Müller Hinton Agar*, *Mac Conkey Agar*, Akuades steril, NaCl 0,9%, dan Standar 0,5 Mc Farland.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah:

- Jarum ose
- *Spreader*
- Cakram kosong steril
- Cawan Petri
- Mikropipet 100-1000 μ l
- Labu Erlenmeyer
- Tabung reaksi
- *Beaker glass*
- Otoklaf
- Oven
- *Bunsen burner*
- Inkubator 37°C
- Jangka sorong

Objek Penelitian

Objek penelitian ini adalah :

- Isopropanol 62%
- *Chloroxymenol* 4,8%
- *Triclosan* 0,05%

Mikroba Uji

Mikroba uji pada penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli*.

Cara Kerja

Pada *Müller Hinton Agar*, diinokulasikan 100 µl mikroba uji - yang telah distandardisasi kerapatannya - dengan menggunakan metode *spread plate*. Kemudian diletakkan cakram yang masing-masing telah direndam dalam cairan isopropanol, *chloroxylenol*, dan *triclosan* selama 5 detik pada *Müller Hinton Agar*. Setelah itu, cawan Petri diinkubasi pada suhu 37^o selama 24 jam. Setelah 24 jam, zona inhibisi yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong. Pengukuran zona

inhibisi dilakukan dua kali dengan arah tegak lurus kemudian diambil rata-ratanya.

Hasil dan Pembahasan

Hasil

Pengamatan aktivitas antimikroba isopropanol, *chloroxylenol*, dan *triclosan* terhadap *Escherichia coli* dilakukan dengan cara mengukur besar diameter zona inhibisi (mm) yang terbentuk pada *Müller Hinton Agar*. Replikasi dilakukan sebanyak 9 kali. Data hasil penelitian dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Diameter zona inhibisi isopropanol, *chloroxylenol*, dan *triclosan* terhadap *Escherichia coli*

| Replikasi (r=9) | Diameter zona inhibisi (mm) | | |
|--------------------|-----------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| | Kel. I Isopropanol | Kel. II <i>Chloroxylenol</i> | Kel. III <i>Triclosan</i> |
| 1 | 15,94 | 33,60 | 14,75 |
| 2 | 15,17 | 34,04 | 17,19 |
| 3 | 15,41 | 30,59 | 16,29 |
| 4 | 14,59 | 34,47 | 14,76 |
| 5 | 12,27 | 28,04 | 12,27 |
| 6 | 14,95 | 32,59 | 13,63 |
| 7 | 16,69 | 34,85 | 13,96 |
| 8 | 16,09 | 31,28 | 14,90 |
| 9 | 13,32 | 32,04 | 14,44 |
| Rerata | 14,94 | 32,39 | 14,69 |

Keterangan :

Kel. I : Isopropanol 62%

Kel. II : *Chloroxylenol* 4,8%

Kel. III : *Triclosan* 0,05%

Rerata diameter zona inhibisi antar kelompok akan diuji dengan ANAVA satu arah. Untuk ANAVA, syaratnya data yang diuji harus homogen dan berdistribusi normal.

Hasil uji homogenitas data ditampilkan pada Tabel 2. Dari hasil tes homogenitas, diperoleh nilai $p > 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa data yang diuji homogen.

Tabel 2 Hasil uji homogenitas

| <i>Levene statistic</i> | df1 | df2 | <i>sig.</i> |
|-------------------------|-----|-----|-------------|
| 1.285 | 2 | 24 | 0,295 |

Normalitas data diuji menggunakan tes Shapiro-Wilk, yang hasilnya ditampilkan pada Tabel 3. Dari hasil tes normalitas, untuk semua kelompok perlakuan

diperoleh nilai $p > 0,05$. Hal ini berarti data yang diuji berdistribusi normal. Karena data yang diuji homogen dan berdistribusi normal, maka ANAVA dapat dilakukan.

Tabel 3 Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk

| Kelompok perlakuan | Statistik | df | <i>p</i> |
|------------------------------|-----------|----|----------|
| Kel. I Isopropanol | 0,935 | 9 | 0,532 |
| Kel. II <i>Chloroxylonol</i> | 0,933 | 9 | 0,506 |
| Kel. III <i>Triclosan</i> | 0,961 | 9 | 0,814 |

Analisis data rerata diameter zona inhibisi yang telah didapatkan

diolah menggunakan uji analisis varians atau ANAVA (Tabel 4).

Tabel 4 Hasil ANAVA rerata diameter zona inhibisi

| Kelompok perlakuan | Kel. I Isopropanol | Kel. II <i>Chloroxylonol</i> | Kel. III <i>Triclosan</i> |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Rerata diameter zona inhibisi | 14,94 | 32,39 | 14,69 |
| Standar deviasi | 1,39 | 2,18 | 1,43 |
| F_{hitung} | | 317,387 | |
| <i>p</i> | | 0,000 | |

Hasil ANAVA diperoleh nilai $F=317,387$ dan $p=0,000$. Hal ini menunjukkan terdapat perbedaan rerata diameter zona inhibisi pada minimal sepasang kelompok perlakuan. Pengolahan data

dilanjutkan dengan uji *post-hoc* yaitu menggunakan uji *multiple comparison Fisher's LSD* untuk mengetahui kebermaknaan perbedaan rerata diameter zona inhibisi antar kelompok perlakuan (Tabel 5).

Tabel 5 Hasil uji *multiple comparison Fisher's* LSD rerata diameter zona inhibisi

| Kelompok perlakuan (n=9) | Diameter zona inhibisi (mm) | | |
|-----------------------------|-----------------------------|------------------|-------------------|
| | Kel. I 14,94 | Kel. II 32,39 | Kel. III 14,69 |
| Kel. I 14,94 | | ** | NS |
| Kel. II 32,39 | | | ** |
| Kel. III 14,69 | | | |

Keterangan :

Kel. I : Isopropanol 62%

Kel. II : *Chloroxilenol* 4,8%

Kel. III : *Triclosan* 0,05%

** : sangat bermakna ($p < .01$)

NS : tidak bermakna ($p > .05$)

Pembahasan

Penelitian aktifitas antimikroba isopropanol, *chloroxilenol*, dan *triclosan* terhadap *Escherichia coli* telah dilakukan dengan tiga kelompok perlakuan. Kelompok I diberi perlakuan isopropanol 62%, kelompok II *chloroxilenol* 4,8%, dan kelompok III *triclosan* 0,05%.

Baik isopropanol, *chloroxilenol*, maupun *triclosan* sama-sama membentuk zona inhibisi pada *Müller Hinton Agar*. Hal ini menunjukkan bahwa ketiganya memiliki efek antimikroba terhadap *Escherichia coli*. Efek antimikroba isopropanol disebabkan karena kemampuannya mendenaturasi protein bakteri. *Chloroxilenol* menyebabkan deaktivasi pada enzim bakteri serta merusak dinding sel bakteri. Sementara *triclosan* dapat memasuki dinding sel bakteri dan mengganggu sintesis RNA dan protein bakteri^{9,12}.

Hasil uji homogenitas dan normalitas menunjukkan ketiga kelompok perlakuan mempunyai nilai $p > 0,05$, artinya data homogen dan berdistribusi normal sehingga analisis data dapat dilanjutkan dengan ANAVA.

Perbedaan diameter zona inhibisi antar kelompok dapat dilihat melalui ANAVA. Hasil ANAVA menunjukkan nilai $F=317,387$ dan $p=0,000$. Artinya terdapat perbedaan rerata diameter zona inhibisi yang sangat bermakna ($p < 0,01$) pada minimal sepasang kelompok perlakuan. Untuk melihat kelompok yang berbeda diameter zona inhibisi, dilanjutkan dengan uji *multiple comparisons Fisher's* LSD.

Hasil uji *multiple comparisons Fisher's* LSD didapatkan kelompok I (14,94 mm) dan kelompok III (14,962 mm) memiliki perbedaan rerata diameter zona inhibisi yang sangat bermakna ($p < 0,01$) terhadap kelompok II (32,393 mm), sementara kelompok I dan kelompok III berbeda tidak bermakna ($p > 0,05$) secara statistik. Hal ini berarti *chloroxilenol* memiliki efek antimikroba yang lebih baik dibandingkan dengan isopropanol dan *triclosan* terhadap *Escherichia coli*, sementara isopropanol dan *triclosan* memiliki efek antimikroba yang sama.

Isopropanol bersifat bakterisidal mulai dari konsentrasi 30% dan sifatnya berbanding lurus dengan

peningkatan konsentrasi, namun kembali menurun di atas konsentrasi 90%. Berdasarkan penelitian secara *in vivo*, mencuci tangan dengan menggunakan isopropanol 60-70% dapat mengurangi jumlah bakteri aerobik gram negatif dari tangan dan penularan bakteri melalui tangan dapat dicegah dengan baik dengan mencuci tangan menggunakan isopropanol. Sampai saat ini belum ada bukti mengenai resistensi bakteri terhadap isopropanol, etanol, maupun *n*-propanol. Selain itu, alkohol juga dinilai sebagai antiseptik yang paling aman untuk manusia¹¹.

Triclosan yang bekerja dengan memasuki dinding sel juga memerlukan bantuan bahan kimia lain agar dapat dengan mudah memasuki dinding sel, seperti surfaktan yang menurunkan tegangan permukaan sel (Marsik, 2007).

Berdasarkan penelitian sebelumnya, didapatkan bahwa pada konsentrasi kecil *triclosan* hanya berefek bakteriostatik sementara efek bakterisidal baru didapatkan pada konsentrasi besar. Selain itu, *triclosan* juga didapatkan memiliki efek lebih baik terhadap bakteri gram positif dibandingkan dengan bakteri gram negatif¹¹.

Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa mencuci tangan dengan *triclosan* dengan konsentrasi 0,1% selama 1 menit mengurangi jumlah bakteri di tangan sebanyak 2,8 log₁₀ unit. Sementara pada konsentrasi 1% selama 5 menit dapat mengurangi bakteri sebanyak 0,8 log₁₀ unit. Hal ini menunjukkan efek *triclosan* yang tidak jauh berbeda dengan sabun tanpa antiseptik. Dari penelitian

tersebut juga didapatkan bahwa *triclosan* berefek baik pada MRSA, namun kurang berefek pada bakteri gram negatif¹¹.

Perbedaan hasil dari penelitian yang sudah disebutkan di atas, dibandingkan dengan penelitian yang penulis lakukan dapat disebabkan oleh berbagai faktor, yaitu kualitas dan sumber antiseptik yang digunakan, cara pengerjaan, serta mikroba uji. Kualitas antiseptik ditentukan oleh kadar, penyimpanan, dan persiapan. Cara pengerjaan mencakup adanya kontaminan serta ketelitian pengerjaan.

Simpulan

Simpulan dari penelitian ini adalah :

1. Isopropanol, *chloroxylonol*, dan *triclosan* memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Escherichia coli*.
2. Potensi antimikroba *chloroxylonol* lebih baik daripada isopropanol dan *triclosan* terhadap *Escherichia coli*.

Saran

Saran dari penelitian ini adalah :

1. Dilakukan penelitian membandingkan antiseptik dengan kontrol positif yaitu antibiotik dan kontrol negatif yaitu akuades steril.
2. Penelitian ini perlu dilanjutkan secara *in vivo* menggunakan *glove juice method*.
3. Dapat digunakan mikroba uji lain seperti *Staphylococcus aureus*.
4. Dapat juga dilanjutkan untuk mencari *minimum inhibitory concentration* (MIC) dan *minimum bactericidal*

concentration (MBC) masing-masing zat.

5. Dapat dilakukan penyuluhan mengenai cara mencuci tangan yang benar serta penggunaan isopropanol, *chloroxylonol*, dan *triclosan* untuk mencegah diare.

Daftar Pustaka

1. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Buku saku petugas kesehatan : Lintas diare. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2011. h.2.
2. Ahlquist DA, Camilleri M. Diarrhea and constipation. In : Kasper, Braunwald, Fauci, Hauser, Longo, Jameson, editors. Harrison's principles of internal medicine. 16th ed. USA : McGraw-Hill Companies; 2005. p.224-33.
3. Guandalini S, Frye RE, Tamer MA. Diarrhea. 2013 [cited December 4th, 2013]. Available from : emedicine.medscape.com/article/928598_overview.
4. Burton M, Cobb E, Donachie P, Judah G, Curtis V, Schmidt W. The effect of handwashing with water or soap on bacterial contamination of hands. 2011 [cited December 2nd, 2013]. Available from : www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3037063/.
5. Brooks GF, Carroll KC. Enteric gram-negative rods (Enterobacteriaceae). In : Geo F Brooks, Karen C Carroll, Janet S Butel, Stephen A. Morse, editors. Jawetz, Melnic, and Adelberg's medical microbiology. 24th ed. USA : McGraw-Hill Companies; 2007. p.249-62.
6. Papaconstantinou HT, Thoas JS. Bacterial Collitis. Clinics in colon and rectal surgery, 2007; 1 : 18-27.
7. Curtis V, Craincross S. Effect of washing hands with soap on diarrhoea risk in the community : a systemic review. 2003 [cited December 4th, 2013]. Available from : www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12726975.
8. Langley J. From soap and water, to waterless agents : update on hand hygiene in healthcare setting. 2002 [cited December 4th, 2013]. Available from : www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2094883.
9. Katz JD. Hand washing and hand disinfection : more than your mother taught you. Anesthesiology clin n am, 2004; 22 : 457-471.
10. Centers for Disease Control and Pervation. Handwashing : clean hands save lives. 2013 [cited December 4th, 2013]. Available from : cdc.gov/handwashing/.
11. Kampf G, Kramer A. Epidemiologic background of hand higiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. Clin microbiol rev, 2004; 4 : 863-93.
12. Marsik FJ, Jackson MM. Control of microorganism. In : Connie R Mahon, Donald C Lehman, George Manuselis, editors. Textbook of diagnostic microbiology. 3rd ed. China : Elsevier; 2007. p.73-91.