



MAKALAH
PENDAMPING

BIOKIMIA
(Kode : H-05)

ISBN : 979363167-8

AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN KANDUNGAN FITOKIMIA EKSTRAK DAUN WARU LENGIS (*Hibiscus tiliaceus L.*) SEBAGAI BAHAN DASAR PEMBUATAN SAMPO

Kesi Lusiana *, Hartati Soetjipto, Dewi K.A.K.Hastuti

Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Kristen Satya Wacana,
Salatiga, Indonesia

* Keperluan korespondensi, telp: 085641177331, email: kekes_arrrr@yahoo.com

ABSTRAK

Skrining fitokimia dan uji antibakteri dilakukan terhadap daun waru lengis (*Hibiscus tiliaceus L.*) untuk dimanfaatkan sebagai salah satu bahan dasar pembuatan sampo. Tujuan penelitian ini yaitu melakukan skrining fitokimia ekstrak daun waru lengis, menentukan efek aktivitas antibakteri ekstrak daun waru lengis pada konsentrasi 0%; 5%; 7,5% ;10% ;12,5% ;15% ;17,5% dan 20%, serta membuat sampo dengan tambahan ekstrak daun waru lengis. Metode maserasi digunakan untuk mengekstrak daun waru lengis sedangkan senyawa fitokimia ekstrak daun waru lengis ditentukan dengan uji skrining fitokimia, dan uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap bakteri *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) dan *Escherichia coli* (ATCC 00911FO). Aktivitas antibakteri akan dianalisis dengan Rancangan Acak Kelompok (RAK) 8 perlakuan dan 4 ulangan. Rata-rata diameter daya hambat akan dibandingkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) pada tingkat kebermaknaan 5%. Rendemen ekstrak daun waru lengis yang diperoleh sebesar 12,12%. Hasil skrining fitokimia ekstrak daun waru lengis menunjukkan adanya kandungan senyawa golongan saponin, flavonoid, tanin dan polifenol. Rata-rata diameter daya hambat tiap konsentrasi sebesar: 0% (0±0) ; 5% (6,39±0,17) ; 7,5% (8,34±0,15) ; 10% (9,63±0,13) ; 12,5% (10,17±0,16) ; 15% (11,31±0,07) ; 17,5% (11,69±0,12) dan 20% (12,74±0,13) terhadap bakteri *Bacillus subtilis*, sedangkan terhadap bakteri *Escherichia coli* 0% (0±0) ; 5% (6,35±0,13) ; 7,5% (6,75±0,11) ; 10% (7,36±0,13) ; 12,5% (7,85±0,13) ; 15% (8,44±0,16) ; 17,5% (8,76±0,13) dan 20% (9,78±0,08). Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri tertinggi pada konsentrasi 20%.

Kata Kunci: antibakteri, ekstrak daun waru lengis, sampo, kandungan fitokimia,

PENDAHULUAN

Sampo merupakan salah satu produk perawatan rambut yang paling banyak digunakan oleh masyarakat. Berbagai macam produk sampo telah beredar di pasaran, mulai dari sampo bayi sampai sampo untuk orang dewasa. Menurut Badan Standarisasi Nasional Indonesia SNI

(1992), sampo adalah campuran dari bahan-bahan kimia tertentu yang dipergunakan untuk mencuci dan membersihkan rambut dan kulit kepala serta tidak membahayakan kesehatan pemakai [1,2].

Saat ini masyarakat cenderung mencari sampo dengan manfaat ekstra untuk kesehatan dan perawatan kulit

kepala serta rambutnya. Kebanyakan orang menginginkan cara cepat untuk memperoleh rambut yang indah, maka muncul bermacam-macam produk sampo dengan tambahan komponen tertentu dan biasanya bahan yang ditambahkan merupakan bahan sintetik karena efeknya terlihat lebih cepat dibandingkan menggunakan bahan alami [2].

Tanaman memiliki komponen kimia yang sangat kompleks. Sampai saat ini manfaat setiap komponennya belum terungkap semua dan masih perlu digali. Gerakan “*back to nature*” atau gerakan sehat kembali ke alam, sangat mendorong untuk penggunaan tanaman sebagai bahan obat dan kosmetik atau kebutuhan keluarga lainnya seperti sampo, sabun mandi, dan lotion. Hal ini didukung dengan potensi tanaman sebagai obat dan kosmetik yang tumbuh di Indonesia [3].

Bahan herbal relatif lebih aman digunakan dari pada bahan sintesis, maka sangat bagus jika kosmetik yang dipakai juga menggunakan bahan alam. Pencarian bahan alam yang dapat berperan sebagai bahan dasar untuk diaplikasikan dalam pembuatan sampo perlu dikembangkan lebih lanjut. Salah satu tanaman yang berpotensi untuk dapat dimanfaatkan yaitu daun waru lengis (*Hibiscus tiliaceus L.*).

Tanaman waru lengis (*H. tiliaceus L.*) sangat banyak, dan mudah ditemukan di Indonesia. Daunnya belum banyak dimanfaatkan hanya dibiarkan gugur begitu saja, padahal daun waru lengis memiliki kandungan senyawa fitokimia yaitu saponin, flavonoid, polifenol dan tannin. Polifenol dan turunannya banyak dikenal

memiliki efek antibakteri sehingga jika ekstrak daun waru lengis digunakan sebagai bahan pembuat sampo maka diharapkan diperoleh sampo yang memiliki efek antibakteri [2,4]

Berdasarkan latar belakang diatas maka tujuan penelitian ini adalah

1. Menentukan kandungan senyawa fitokimia dalam ekstrak daun waru lengis (*H.tiliaceus L.*)
2. Menentukan efek aktivitas antibakteri ekstrak daun waru lengis pada konsentrasi 0%; 5%; 7,5%;10%; 12,5%; 15% ;17,5% dan 20% terhadap bakteri *B.subtilis* (ATCC 6051) dan *E.coli* (ATCC 00911FO)
3. Membuat sampo dengan tambahan ekstrak daun waru lengis pada dosis efek antibakteri tertinggi

METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan adalah daun waru lengis (*H. tiliaceus L.*) yang diperoleh dari Getasan, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah.

Bahan kimia yang digunakan adalah etanol (derajat teknis), kloroform (derajat teknis), natrium klorida (Merck), sodium lauryl sulfat (Merck), Foam booster C-KD (Merck), *Coco amido propyl betaine* (Merck), *Pearl concentrate* (Merck), *ethylene diamine tetra acetic acid* (Merck), asam karboksilat (Merck) dan nipagin (Merck).

Bakteri yang digunakan yaitu bakteri *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) dan *Escherichia coli* (ATCC 00911FO).

Piranti yang digunakan antara lain *grinder* (Akira), *cabinet drying*, grinder,

rotary evaporator (Buchi R114), spektrofotometer (Shimadzu, UV mini 1240), pH Meter (Hanna HI9812, Romania), neraca analitik (Mettler H80), gelas ukur, seperangkat alat gelas.

METODE PENELITIAN

Persiapan Sampel

Sampel dibersihkan kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dalam almari pengering selama 24 jam, kemudian dihaluskan dengan *grinder*.

Ekstraksi sampel [5]

Lima puluh gram sampel dimaserasi dengan 500 ml etanol selama 24 jam. Kemudian disaring menggunakan kertas saring dan filtratnya disimpan. Selanjutnya residu dimaserasi kembali dengan 340 ml etanol selama 24 jam. Setelah dilakukan penyaringan, residu dimaserasi ulang satu kali lagi dengan 240 ml etanol. Ketiga filtrat yang dihasilkan digabung dan dikeringkan menggunakan *rotary evaporator*.

Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat daun waru lengis kering}} \times 100 \%$$

Skrining Fitokimia

Uji saponin [6]

Sebanyak 15 mg sampel ditambahkan 5 ml air panas $\pm 70^{\circ}\text{C}$, kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi dan dikocok kuat-kuat. Ekstrak positif mengandung saponin jika timbul busa dengan ketinggian 1-10 cm yang bertahan selama 10 menit.

Uji Triterpenoid dan Steroid (Uji Liberman-Burchard (LB)) [6]]

Setengah mili gram sampel ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi I, ditambah 5 ml CHCl_3 kemudian dipanaskan 5 menit diatas pemangas air sambil dikocok-kocok lalu didinginkan. Diambil 1 ml campuran dari tabung reaksi I dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi II. Kedalam tabung reaksi II diteteskan peraksi (LB) (1 ml Asam Asetat anhidrat dan 1 tetes Asam Sulfat Peekat). Kemudian perubahan yang timbul diamati sampai kira-kira 30 menit. Jika muncul warna coklat atau violet pada pembatas kedua lapisan pelarut maka saponin yang terkandung merupakan jenis triterpenoid, sedangkan jika warna yang timbul hijau kebiruan maka termasuk jenis saponin steroid.

Uji Flavonoid [7]

Setengah gram sampel dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah magnesium dan 5 ml HCl 2% kemudian dipanaskan, serta disaring, perubahan warna yang terjadi dapat diamati.

Uji Tanin dan Polifenol [7]

Sepuluh mili liter air panas ditambahkan kedalam sampel kemudian ditambahkan 5 tetes NaCl 10%, disaring dan dibagi menjadi 3 bagian. Tabung 1 sebagai kontrol, tabung 2 ditambah 3 tetes gelatin, jika terjadi endapan maka sampel tersebut positif mengandung polifenol. Kemudian ditambahkan 3 tetes FeCl ditambahkan pada tabung 3, jika terbentuk warna biru kehitaman maka sampel positif mengandung tanin.

Uji Aktifitas Antibakteri [8]

Larutan *nutrien agar* dimasukkan dalam cawan petri dan masing-masing

dicampur dengan 0,1 mL larutan bakteri *B. subtilis* (ATCC 6051) dan *E. coli* (ATCC 00911FO), kemudian dihomogenkan. Kertas cakram direndam dalam ekstrak selama 15 menit dengan variasi konsentrasi, Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C sampai muncul daerah hambatan selama 24 jam. Pengukuran zona hambatan dilakukan dengan mengukur diameter daerah jernih menggunakan jangka sorong.

Pembuatan sampo [9]

Empat koma delapan gram natrium klorida dilarutkan dalam 10 ml aquades, diambil setengah bagian dan dimasukkan dalam 14,4 gram sodium lauril sulfat diaduk sampai homogen. Dua koma empat mili *coco amido propyl betaine*, 2,4 gram *pearl concentrate* dan 0,3 gram nipagin ditambahkan kedalamnya sambil terus diaduk sampai homogen. Dilanjutkan dengan penambahan 0,048 gram asam karboksilat dalam 6 ml aquades dan 0,036 *ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA) dalam 24 ml air. Enam puluh mili liter air beserta sisa larutan garam dimasukkan perlahan sambil terus diaduk sampai cairan mengental, selanjutnya larutan ekstrak daun waru lengis (*H. tiliaceus L.*) ditambahkan, kemudian diaduk sampai homogen.

Analaisis Data [10]

Data diameter daya hambat terhadap bakteri *B.subtilis* (ATCC 6051) dan *E.coli* (ATCC 00911FO) dianalisis dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok, 8 perlakuan dan 4 kali ulangan. Sebagai perlakuan adalah konsentrasi ekstrak daun waru lengis (*H. tiliaceus L.*) dengan

konsentrasi 0%; 5%; 7,5%; 10%, 12,5%;15%;17,5% dan 20%. Sebagai kelompok adalah waktu uji. Untuk membandingkan purata diameter daya hambat antar berbagai konsentrasi ekstrak daun waru lengis (*H. tiliaceus L.*) digunakan Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan tingkat kebermaknaan 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari 1 kg daun waru lengis (*H. tiliaceus L.*) yang diekstrak, telah diperoleh ekstrak kasar berwarna hijau kecoklatan sebanyak 121,2 gram dan persen rendemen 12,12%.

Berdasarkan uji fitokimia terhadap ekstrak kasar daun waru lengis (*H. tiliaceus L.*) jenis senyawa yang terdapat pada ekstrak tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia dari Ekstrak Daun Waru Lengis

Jenis senyawa	Uji
Saponin	+
Steroid	+
Triterpenoid	-
Tannin	+
Polifenol	+
Flavonoid	+

Keterangan : + = Hasil uji positif
- = Hasil uji negatif

Pada uji saponin yang dilakukan menunjukkan hasil positif karena setelah proses pengocokan timbul busa yang stabil. Saponin merupakan metabolit sekunder yang mengandung gugus gula yang berikatan dengan suatu aglikon hidrofobik (sapogenin) berupa triterpenoid, steroid alkaloid. Terbentuknya busa disebabkan karena saponin bersifat polar dan dapat larut dalam pelarut air dan juga bersifat non

polare karena memiliki gugus hidrofob yaitu aglikon. Uji Lieberman-Burchard merupakan uji karakteristik untuk sterol tidak jenuh dan triterpen [11].

Uji steroid dan triterpenoid menggunakan metode Liberman-Burchard. Ekstrak dilarutkan dalam kloroform kemudian ditambahkan pereaksi Liberman-Burchard menunjukkan hasil positif triterpenoid, karena terbentuk warna kecoklatan pada batas kedua larutan. Senyawa triterpenoid berperan sebagai antitumor, antiinflamasi dan antimikrobia [12].

Pada uji tannin menunjukkan hasil positif yang ditunjukkan dengan pengendapan protein pada gelatin. Tanin bereaksi dengan gelatin membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air. Reaksi ini lebih sensitif dengan penambahan NaCl untuk mempertinggi penggambaran dari tanin-gelatin. apabila Tanin direaksikan dengan gelatin terbentuk adalah endapan putih karena gelatin merupakan salah satu jenis protein yang mampu diendapkan oleh tannin [6,12].

Pada uji polifenol memberikan hasil positif. Terbentuknya warna biru kehitaman yang terbentuk berupa besi (III) heksa fenolat. Reaksi pembentukan warna yang berperan adalah Fe^{3+} .

Uji flavonoid menunjukkan hasil positif karena pada saat sampel diberi logam magnesium dan asam klorida terbentuk warna merah.

Pada uji antibakteri ekstrak daun waru lengis (*H. tiliaceus L.*) digunakan bakteri *B.subtilis* (ATCC 6051) dan *E.coli* (ATCC 00911FO). Masing-masing mewakili

bakteri gram negatif dan bakteri gram positif. Penggunaan kedua bakteri tersebut bertujuan untuk mengetahui daya antibakteri pada setiap konsentrasi ekstrak daun waru lengis (*H. tiliaceus L.*).

Uji antibakteri dilakukan dengan metode uji cakram kertas. Uji antibakteri untuk ekstrak pekat (*H. tiliaceus L.*) terhadap bakteri *B.subtilis* (ATCC 6051), rata-rata diameter daya hambatnya dapat dilihat pada Tabel 2., dan cakram-cakram yang hanya ditetesi pelarut etanol 50% sama sekali tidak memiliki diameter daya hambat hal ini menunjukkan bahwa pelarut tidak memiliki pengaruh terhadap aktivitas antibakteri daun waru lengis (*H. tiliaceus L.*)

Tabel 2. Rata-rata Diameter Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri *B. subtilis* (mm)

Konsentrasi	Rata-rata Diameter Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri <i>B. subtilis</i> (mm)
Kontrol (+)	22,43
Kontrol (-)	0
5%	6.3875
7,5%	8.4375
10%	9.6375
12,5%	10.7375
15%	11.3125
17,5%	11.6875
20%	12.7375

Untuk antibakteri ekstrak pekat terhadap bakteri *E.coli* (ATCC 00911FO) diperoleh rata-rata diameter daya hambat tiap konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 3. dan cakram-cakram yang hanya ditetesi pelarut etanol 50% sama sekali tidak memiliki diameter daya hambat hal ini menunjukkan bahwa pelarut tidak memiliki pengaruh terhadap aktivitas antibakteri daun waru lengis (*H. tiliaceus L.*).

Tabel 3. Rata-rata Diameter Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri *E. coli* (mm)

Konsentrasi	Rata-rata Diameter Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri <i>E. coli</i> (mm)
Kontrol (+)	15,23
Kontrol (-)	0
5%	6.35
7,5%	6.75
10%	7.3625
12,5%	7.85
15%	8.4375
17,5%	8.7625
20%	9.775

Kriteria kekuatan daya antibakteri sebagai berikut : diameter zona hambat 5 mm atau kurang dikategorikan lemah, zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang, zona hambat 10-20 mm dikategorikan kuat dan zona hambat 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat. Berdasarkan kriteria tersebut, maka daya antibakteri ekstrak daun waru lengis (*H. tiliaceus L.*) terbukti memiliki aktivitas antimikroba kuat pada kelompok bakterik gram positif *B.subtilis* (ATCC 6051) dengan konsentrasi tertinggi pada konsentrasi 20% dengan rata-rata daya hambat sebesar 12,74 mm. Sedangkan pada bakteri gram negatif yaitu

E.coli (ATCC 00911FO) ekstrak daun waru lengis (*H. tiliaceus L.*) memiliki efek antibakteri kategori sedang dengan konsentrasi tertinggi pada konsentrasi 20% dengan rata-rata daya hambat sebesar 9,78 mm . Hal ini dikarenakan bakteri *E.coli* (ATCC 00911FO) lebih tahan (resisten) pada Ekstrakn daun waru lengis (*H. tiliaceus L.*), sedangkan Bakteri *B.subtilis* (ATCC 6051) merupakan bakteri yang sensitif (*rentan*) terhadap ekstrak (*H. tiliaceus L.*) [13].

Data diameter daya hambat terhadap bakteri *B.subtilis* (ATCC 6051) dan *E.coli* (ATCC 00911FO) dianalisis dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK). Purata hasil uji ($\bar{x} \pm SE$) untuk data diameter daya hambat terhadap bakteri *B.subtilis* (ATCC 6051) dengan uji BNJ 5% menunjukkan bahwa purata hasil uji efek antibakteri berbeda secara bermakna antar perlakuan, dapat dilihat pada Tabel 4., dan purata hasil uji ($\bar{x} \pm SE$) untuk data diameter daya hambat terhadap bakteri *E.coli* (ATCC 00911FO) dengan uji BNJ 5% menunjukkan bahwa purata hasil uji efek antibakteri berbeda secara bermakna antar perlakuan, dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 4. Purata hasil uji ($mm \pm SE$) untuk data diameter daya hambat terhadap bakteri *B.subtilis*

Konsentrasi (%)	0	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
$\bar{x} \pm SE$	0±0	6,39±0,17	8,34±0,15	9,63±0,13	10,17±0,16	11,31±0,07	11,69±0,12	12,74±0,13
W = 0,271	A	B	C	D	e	f	G	H

Keterangan: * Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan antar perlakuan tidak berbeda secara bermakna, sebaliknya angka yang diikuti oleh huruf yang tidak sama menunjukkan antar perlakuan berbeda bermakna.

Tabel 5. Purata hasil uji ($mm \pm SE$) untuk data diameter daya hambat terhadap bakteri *E. coli*

Konsentrasi (%)	0	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20
$\bar{x} \pm SE$	0 \pm 0	6,35 \pm 0,13	6,75 \pm 0,11	7,36 \pm 0,13	7,85 \pm 0,13	8,44 \pm 0,16	8,76 \pm 0,13	9,78 \pm 0,08
W= 0,221	a	B	C	D	E	f	g	H

Keterangan: * Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan antar perlakuan tidak berbeda secara bermakna, sebaliknya angka yang diikuti oleh huruf yang tidak sama menunjukkan antar perlakuan berbeda bermakna.

KESIMPULAN

1. Ekstrak daun waru lengis (*H.tiliaceus L.*) mengandung senyawa golongan saponin, flavonoid, tanin dan polifenol
2. Rata-rata diameter daya hambat ekstrak daun waru lengis (*H.tiliaceus L.*) tiap konsentrasi sebesar: 0% (0 \pm 0); 5% (6,39 \pm 0,17); 7,5% (8,34 \pm 0,15); 10% (9,63 \pm 0,13); 12,5% (10,17 \pm 0,16); 15% (11,31 \pm 0,07); 17,5% (11,69 \pm 0,12) dan 20% (12,74 \pm 0,13) terhadap bakteri *B.subtilis* (ATCC 6051), sedangkan terhadap bakteri *E.coli* (ATCC 00911FO) 0% (0 \pm 0); 5% (6,35 \pm 0,13); 7,5% (6,75 \pm 0,11); 10% (7,36 \pm 0,13); 12,5% (7,85 \pm 0,13); 15% (8,44 \pm 0,16); 17,5% (8,76 \pm 0,13) dan 20% (9,78 \pm 0,08).
3. Sampo dibuat dengan tambahan ekstrak daun waru lengis pada dosis efek antibakteri tertinggi yaitu dosis 20 %.

DAFTAR RUJUKAN

- [1] SNI No. 06-2692-1992. 1992. *Shampoo*. Badan Standarisasi Nasional Indonesia, Jakarta.
- [2] Rohman, Apriana. 2011. *Formulasi dan Evaluasi Sediaan Shampoo*. Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- [3] Herdiani, Elvina. 2012. *Potensi Tanaman Obat Indonesia*. Balai Besar Pelatihan Pertanian, Lembang.
- [4] Kinho, Julianus, Diah Irawati Dwi Arini, D.I.D., Tabba S., Kama H., Kafiar Y., Sabri, S., Karundeng M. C. 2011. *Tumbuhan Obat Tradisional di Sulawesi Utara*. Balai Penelitian Kehutanan, Manado.
- [5] Kristianingsih, 2005, *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Triterpenoid dari Akar Tanaman Kedondong Laut (Polyscias Fruticosa)*, Skripsi Mahasiswa Jurusan Kimia, F-MIPA, Universitas Brawijaya.
- [6] Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penentuan cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. ITB, Bandung.
- [7] Budiarti, Rini. 2007. *Pemanfaatan Lengkuas Merah (Alpinia purpurata K. Schum) Sebagai Bahan Antijamur dalam Sampo*. Skripsi. IPB, Bogor.
- [8] Faradisa, Maria. 2008. *Uji Efektifitas Antimikroba Senyawa Saponin Dari Tanaman Blimbing Wuluh (Averrhoa Bilimbi Linn)*, skripsi-UIN Malang, Malang.
- [9] Soetjipto, Hartati. 2010. *Petunjuk Praktikum Produk Kosmetika*.

- Universitas Kristen Satyawacana,
Salatiga.
- [10] Steel, R.G.D dan JH.Torrie.1980.
Prinsip dan Prosedur Statistika suatu Pendekatan Biometrik. Gramedia, Jakarta.
- [11] Santos, A.F., B.Q. Guevera, A.M. Mascardo, and C.Q.Estrada. 1978.
Phytochemical, Microbiological and Pharmacological, Screening of Medical Plants. Manila:Research Center University of Santo Thomas.
- [12] Savitry, E. 2008. *Khasiat Tanaman Obat Dalam Prespektif Islam*. Malang: UINPress.
- [13] Davis, W.W and Stout, T.R. 1971. Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay. *Microbiology*. 22(4): 659-665