

Vol. 05 No. 02 Oktober 2009

ISSN 0216-9487

Jurnal Ilmiah

KONSERVASI HAYATI



Pontoscolex corethrurus F.Mull

DAFTAR ISI

	Halaman
Efektivitas Ekstrak Daun Ubi Jalar Merah (<i>Ipomoea batatas</i> Poir) Terhadap Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> Penyebab Penyakit Bisul Pada Manusia Welly Darwis, Putjha Melati, Eni Widiyati, Rochmah Supriati	1-6
Uji Efektivitas Campuran Ekstrak Daun Serai Wangi (<i>Andropogon nardus</i> L.) dan Minyak Atsiri Bunga Kenanga (<i>Cananga odorata</i> B.) Sebagai Bahan Aktif Repellen Terhadap Nyamuk <i>Aedes aegypti</i> L. Helmiyetti, Syalfinaf Manaf, Juliana H.S.	7-12
Pengaruh Pemberian Getah Buah Pepaya (<i>Carica papaya</i> L.) Terhadap Kemampuan Reproduksi Mencit (<i>Mus Musculus</i> BALB/C) Betina Rochmah Supriati, Ketut Ranti, Bhakti Karyadi	13-20
Studi Preferensi Jumlah Cacing Tanah Lokal (<i>Pontoscolex corethrurus</i>) Terhadap Beberapa Macam Media Pemeliharaan Elita Fitriani, Darmi, Rizwar	21-30
Uji Efektifitas Minyak Atsiri Dari Daun Urang Aring (<i>Eclipta prostrata</i> L.) Sebagai Bahan Aktif Losion Antinyamuk <i>Aedes aegypti</i> L. Syalfinaf Manaf, Morina Adfa, Lina Minora, Helmiyetti	31-37
Pemanfaatan Limbah Organik Serat Perasan Buah Sawit (<i>Elaeis guineensis</i> J.) Sebagai Media Pemeliharaan Beberapa Jenis Cacing Tanah Darmi, Rosi Afridarmi, Rizwar, Syarifuddin	38-44

**EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN UBI JALAR MERAH (*Ipomoea batatas* Poir)
TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus*
PENYEBAB PENYAKIT BISUL PADA MANUSIA**

Welly Darwis¹, Putjha Melati¹, Ani Widiyati², Rochmah Supriati¹

¹⁾ Jurusan Biologi FMIPA Jl. WR. Supratman, Gedung T UNIB Bengkulu

²⁾ Jurusan Kimia FMIPA Jl. WR. Supratman, Gedung T UNIB Bengkulu

e-mail: wellydtbgdsati@rocketmail.com

Accepted, April 25th 2009; Revised, June 05th 2009

ABSTRACT

The research has been done in the period of November 2008 to January 2009. This research was aimed to find out the effective concentration of *Ipomoea batatas* Poir leaves extract using n-hexana and methanol for inhibiting growth of *Staphylococcus aureus*. *Ipomoea batatas* Poir leaves were extracted by maseration method using n-hexana and methanol which divided into five levels concentration (2%; 3.5%; 5%; 6.5% and 8%) and then the antibacterial activity was tested by using paper disc diffusion method with three replications. As the result, leaves that extracted by using n-hexana has the largest diameter of inhibition at the concentration of 3.5% (9.9 mm), while the largest diameter of inhibition for methanol was at concentration of 2% and 8% (each of concentration 12.3 mm). Statistically test by ANOVA showed that each of concentration was non significantly difference. It could be concluded that *Ipomoea batatas* Poir leaves extract that extracted using methanol were not significantly influence to inhibit growth of *Staphylococcus aureus*. However, it could be also stated that *Ipomoea batatas* Poir leaves extract that extracted using methanol more influence in inhibiting growth of *Staphylococcus aureus* rather than Tetracycline.

Key words: *Ipomoea batatas* Poir, *Staphylococcus aureus*, abscess diseases

PENDAHULUAN

Dalam kehidupan sehari-hari manusia tidak pernah lepas dengan obat-obatan modern. Disamping mudah didapatkan dengan instan, obat-obatan modern cenderung memberikan efek yang cepat dalam mengobati dan mencegah penyakit yang diderita. Selain itu, obat-obatan modern banyak dijual bebas dan mudah didapatkan dengan harga yang bermacam-macam baik dari harga yang terjangkau oleh masyarakat menengah dan menengah ke atas. Akan tetapi, dewasa ini banyak masyarakat telah beralih kembali menggunakan obat tradisional dari beberapa tumbuhan obat

yang ada di sekitar lingkungannya. Hal ini dapat terjadi dikarenakan, pemakaian obat-obatan modern dengan jangka waktu yang lama dan terlalu sering dikonsumsi, kecenderungan memberikan efek samping. Sedangkan pemakaian obat tradisional dari tumbuhan obat, selain mudah didapatkan dan murah, obat tradisional dengan penggunaan yang tepat, sedikit sekali menimbulkan efek samping bahkan tidak menimbulkan efek samping.

Beberapa jenis penyakit pada manusia, telah banyak dilakukan pengobatan dengan menggunakan tumbuhan obat. Baik itu dari penyakit berat maupun penyakit ringan. Tumbuhan obat yang

digunakan pun merupakan tumbuhan obat yang mudah didapatkan dan tumbuh di sekitar lingkungan hidup masyarakat itu sendiri. Maka tak jarang kini masyarakat telah banyak menanam tumbuhan obat di pekarangan rumah mereka. Salah satu penyakit yang dapat diobati oleh tumbuhan, yaitu penyakit bisul.

Penyakit kulit seperti bisul dan eksim dapat disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* (Jawetz, 2008). Meskipun penyakit bisul sering dianggap sebagai penyakit biasa, namun dengan adanya bisul di bagian tubuh manusia, tetap mengganggu kesehatan dan aktivitas manusia. Bahkan jika tidak ditangani dengan serius dapat menimbulkan infeksi dan memperparah penyakit bisul tersebut.

Secara tradisional, tumbuhan obat yang diketahui pernah digunakan masyarakat di Bengkulu untuk mengobati penyakit bisul salah satunya yaitu daun dan umbi ubi jalar merah (*Ipomoea batatas* Poir). Ubi jalar ungu mengandung antosianin 519 mg/100 gram berat basah (Kumalaningsih, 2006). Pokorny, *et al.* (2001) menyatakan bahwa antosianin yang menyebabkan warna ungu pada ubi jalar ini. Warna ungu ini menyebar dari daun hingga umbi. Schmiege (2008) menyatakan bahwa bagian daun dan akar ubi jalar merah mengandung saponin, flavonoid, dan polifenol. Ubi merah mengandung vitamin C, vitamin E, betakaroten, vitamin B yaitu B6 dan asam folat, serat, karbohidrat kompleks, dan rendah kalori. Di duga karena kandungan bahan aktif yang terdapat pada daun dan akar ubi jalar merah itulah yang dapat mengobati penyakit bisul.

Staphylococcus aureus merupakan salah satu bakteri yang dapat menyebabkan bermacam-macam infeksi termasuk bisul dan jerawat. Selain bisul dan jerawat, bakteri ini juga dapat menyebabkan penyakit meningitis,

osteomielitis, pneumonia dan mastitis pada manusia dan hewan (Pratama, 2005). Pertumbuhan bakteri penyebab penyakit bisul ini diduga dapat diatasi dengan ekstrak daun ubi jalar merah karena kandungan kimia yang terdapat didalamnya, seperti yang sudah dilakukan secara tradisional oleh masyarakat di Bengkulu. Namun, sampai saat ini belum ada informasi ilmiah tentang konsentrasi yang efektif dari ekstrak daun ubi jalar merah dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* penyebab penyakit bisul tersebut. Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukan penelitian ini dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi yang efektif dari ekstrak daun ubi jalar merah (*Ipomoea batatas* Poir) dengan menggunakan pelarut n-heksana dan dengan metanol sebagai pengestrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* penyebab penyakit bisul pada manusia.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan bulan November 2008 sampai Januari 2009 di Laboratorium Mikrobiologi Basic Science Biologi FMIPA Universitas Bengkulu. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Beberapa alat yang digunakan antara lain cawan petri, tabung reaksi, gelas kimia, Erlenmeyer, pipet makro, jarum ose, incubator, autoclave, shaker, Rotary evaporator, penangas air, batang penyebar, kertas saring, kertas cakram, neraca analitik. Bahan-bahan yang digunakan antara lain aquades, pelarut metanol (Brand) dan n-Heksana (Brand), alkohol 70 % (Brand), daun ubi jalar merah (*Ipomoea batatas* Poir), isolat bakteri *Staphylococcus aureus*, media agar NA (Merck), dan Media NB (Nutrien Broth) (Difco). Baku pembanding Tetrasiklin.

Pembuatan ekstrak daun ubi jalar merah (*Ipomoea batatas* Poir)

Daun ubi jalar merah diambil sebanyak 3 kilogram, kemudian dicuci bersih. Daun dipotong-potong halus kemudian dikeringanginkan sampai layu. Setelah itu, sampel direndam dalam pelarut n-Heksana lalu disaring, metode ini disebut maserasi. Maserasi dilakukan dengan pengadukan sebanyak 12 kali selama 15 menit dengan tenggang waktu 5 menit antar pengadukan, dilanjutkan dengan perendaman selama 120 jam (5 hari), selanjutnya dilakukan penyaringan dengan corong dan kertas saring What-man 42 untuk memisahkan filtrat dari ampas. Hal yang sama dilakukan dengan menggunakan pelarut methanol. Ekstrak yang dihasilkan digunakan untuk pengujian selanjutnya yang dibuat dalam berbagai konsentrasi.

Uji awal penentuan *Inhibitor Concentration*

Pembuatan stok variabel konsentrasi stok konsentrasi yang divariasikan untuk ekstrak daun ubi jalar merah yang diekstrak dengan menggunakan n-heksana dan dengan menggunakan metanol adalah mulai dari 0% (kontrol), 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, dan 10% (kontrol) yang masing-masing keseluruhannya berjumlah 11 variabel (Pratama, 2005). Pembuatan konsentrasi tersebut dengan cara melakukan pengenceran. Pembuatan larutan uji konsentrasi 1%, dilakukan dengan cara mengambil 0,1 gram ekstrak kental daun ubi jalar merah yang diekstrak dengan n-heksana, kemudian dilarutkan menggunakan pelarut n-heksana sampai menjadi 10 ml. Sedangkan untuk ekstrak daun ubi jalar merah (*Ipomoea batatas* Poir) yang diekstrak dengan metanol dilarutkan menggunakan akuades sampai menjadi 10 ml, begitu seterusnya untuk pembuatan konsentrasi lainnya. Variasi konsentrasi larutan uji tersebut digunakan

untuk uji awal penentuan Inhibitor concentration terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Berdasarkan *Inhibitor Concentration* dari uji awal dapat ditentukan kisaran variasi ekstrak yang akan dibuat untuk mengujian lanjut (uji efektivitas) efektivitasnya terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Variasi konsentrasi uji efektivitas yang dibuat yaitu konsentrasi 2%; 3,5%; 5%; 6,5% dan 8%. Uji awal ini dilakukan 2 kali pengulangan dan untuk uji efektivitas dilakukan 10 perlakuan dengan 3 kali pengulangan.

Pembuatan larutan pembanding tetrasiklin 50 µg/ml

Tetrasiklin ditimbang sebanyak 50 mg, kemudian ditambahkan aquades sampai menjadi 200 ml, sehingga kadar yang didapat 0,25 mg/ml. Untuk melakukan uji, maka dipipet 1 ml larutan di atas dan kemudian ditambahkan aquades sampai menjadi 5 ml, sehingga diperoleh kadar 50 µg/ml, konsentrasi tersebut didapatkan berdasarkan *Standard Interpretive Antibiotic* (Zimbardo, *et al.*, 2009).

Uji efektivitas

Sebanyak 10 ml media NA steril dimasukkan dalam cawan petri dan dibiarkan memadat, kemudian dimasukkan 1 ml suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* lalu disebarkan dengan batang sebar agar suspensi tersebar merata pada media dan didiamkan kira-kira 10 menit agar suspensi terserap pada media. Setelah itu, setiap cawan petri tersebut diletakkan 1 buah kertas cakram berdiameter 6 mm dengan menggunakan pinset steril, yang sebelumnya kertas cakram tersebut telah dicelupkan ke dalam setiap jenis konsentrasi ekstrak daun ubi jalar merah baik yang diekstrak dengan n-heksana, maupun yang diekstrak dengan metanol. Pada saat meletakkan kertas cakram tersebut, kertas cakram sedikit

ditekan agar menempel pada permukaan agar. Perlakuan seperti di atas, juga dilakukan untuk pengujian pada larutan tetrasiklin sebagai pembanding, kertas cakram yang telah dicelupkan pada larutan tetrasiklin 50 µg/ml diletakkan di atas permukaan agar. Hal yang sama juga dilakukan untuk uji negatif dengan menggunakan larutan metanol. Kertas cakram dicelupkan ke dalam larutan metanol, setelah itu kertas cakram tersebut diletakkan di atas permukaan agar. Kemudian, semua media diinkubasi ke dalam inkubator. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian diukur diameter zona bening (*clear zone*) yang terbentuk setiap harinya selama 4 hari, dengan menggunakan penggaris milimeter (Pratama, 2005). Menurut Hadioetomo (1993), bahwa aktivitas antibakteri diperoleh dengan mengukur zona bening pada media yang padat yang menjadi petunjuk ada atau tidaknya bakteri yang tumbuh pada setiap perlakuan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji statistik ANOVA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seperti terlihat pada Tabel 1, pada ekstrak yang menggunakan pelarut methanol, konsentrasi 2% dan 8% memiliki daya

hambat tertinggi terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Sedangkan pada ekstrak yang menggunakan pelarut n-heksana daya hambat tertinggi ditunjukkan oleh konsentrasi 3,5%. Secara keseluruhan daya hambat ekstrak daun ubi jalar merah terhadap *Staphylococcus aureus* yang diekstrak dengan menggunakan metanol lebih besar dibandingkan daya hambat ekstrak daun ubi jalar merah yang menggunakan n-heksana. Hal ini diduga dikarenakan senyawa-senyawa antibakteri pada ekstrak daun ubi jalar merah yang diekstrak dengan menggunakan metanol yang bersifat polar seperti flavonoid, saponin dan polifenol, seperti juga yang pernah diungkapkan Alhera (1999) lebih kuat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, dibandingkan senyawa n-heksana yang bersifat non polar. Diameter daya hambat larutan uji pembanding tetrasiklin 50 µg/ml seperti terlihat pada Tabel 1, tidak lebih besar dari diameter daya hambat pada ekstrak daun ubi jalar merah yang diekstrak dengan menggunakan metanol. Dapat dikatakan bahwa ekstrak daun ubi jalar merah yang diekstrak dengan menggunakan metanol lebih efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dibandingkan dengan tetrasiklin.

Tabel 1. Diameter daya hambat ekstrak metanol dan n-heksana daun ubi jalar merah (*Ipomoea batatas* Poir) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*

Perlakuan (Konsentrasi g/ml)	*Diameter daya hambat (mm)	
	Ekstrak metanol	Ekstrak n-heksana
2 %	12,3	6,4
3,5 %	7,7	9,9
5 %	7	3,5
6,5 %	6	3,3
8 %	12,3	7,5
Pembanding (Tetrasiklin 50 µg/ml)	5,2	5,2

Keterangan : * = hasil rata-rata dari tiga kali pengulangan

Menurut Jawetz, *et al.* (2008), pertumbuhan bakteri yang terhambat atau kematian bakteri akibat suatu zat antibakteri dapat disebabkan oleh penghambatan terhadap sintesis dinding sel, penghambatan terhadap fungsi membran sel, penghambatan terhadap sintesis protein, atau penghambatan terhadap sintesis asam nukleat.

Di antara berbagai kerusakan yang dapat terjadi pada sel bakteri tersebut, yang mungkin terjadi pada bakteri *Staphylococcus aureus* akibat pemberian ekstrak daun ubi jalar merah (*Ipomoea batatas* Poir) adalah penghambatan terhadap sintesis dinding sel. Ini didasarkan pada adanya kandungan flavonoid yang merupakan senyawa fenol (Harborne, 1987 dalam Ajizah, *et al.*, 2007). Seperti yang diungkapkan Dwidjoseputro, (1994) dalam Ajizah, *et al.* (2007), senyawa fenol dapat bersifat koagulator protein. Protein yang menggumpal tidak dapat berfungsi lagi, sehingga akan mengganggu pembentukan dinding sel bakteri. Selain itu, flavonoid bersifat lipofilik sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan terlarut dengan dinding sel bakteri. Untuk polifenol dan saponin, mempunyai aktivitas yang sama dengan flavonoid, mekanisme kerjanya sebagai antibakteri berhubungan dengan interaksi pada dinding sel bakteri. Senyawa antibakteri tersebut terikat pada reseptor sel (beberapa diantaranya adalah enzim transpeptidase), kemudian terjadi reaksi transpeptidase sehingga sintesis peptidoglikan terhambat. Demikian juga mekanisme antibakteri dari tetrasiklin yaitu menghambat sintesis protein di dalam sel bakteri. Hal ini mencegah perpanjangan rantai polipeptida yang sedang tumbuh dan berakibat terhentinya sintesis protein.

Menurut Morin dan Gorman (1995) *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif. Dinding sel bakteri gram positif terdiri atas peptidoglikan

yang sangat tebal yang memberikan kekakuan untuk mempertahankan keutuhan sel. Proses pembentukan dinding sel bakteri diawali dengan pembentukan rantai peptida sehingga terbentuk dinding sel dengan susunan yang sempurna. Jika ada kerusakan pada dinding sel atau ada hambatan dalam pembentukannya, akan mengakibatkan terjadinya lisis pada sel bakteri sehingga bakteri segera kehilangan kemampuan untuk membentuk koloni dan diikuti dengan kematian sel bakteri. Hal yang sama terjadi pada bakteri *Staphylococcus aureus*, pemberian senyawa yang bersifat antibakteri terhadap bakteri tersebut dapat menghambat pembentukan dinding sel sehingga struktur dinding sel yang terbentuk menjadi lemah dan menyebabkan kematian bakteri.

Setiap senyawa yang menghalangi tahap apapun dalam sintesis peptidoglikan akan menyebabkan dinding sel bakteri menjadi lemah dan sel menjadi lisis (Jawetz, *et al.*, 2008). Terjadinya lisis pada sel bakteri tersebut dikarenakan tidak berfungsinya lagi dinding sel yang dapat mempertahankan bentuk dan melindungi bakteri yang memiliki tekanan osmotik dalam sel yang tinggi. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang memiliki tekanan osmotik dalam sel 3-5 kali lebih besar dari bakteri gram negatif, sehingga lebih mudah mengalami lisis (Jawetz dalam Katzung, 1989 dalam Ajizah, 2007). Tanpa dinding sel, bakteri tidak dapat bertahan terhadap pengaruh luar dan segera mati (Wattimena *et al.*, 1991). Oleh karena itu, diduga adanya gangguan atau penghambatan pada pembentukan dinding sel, serta lisisnya dinding sel merupakan efek dari penghambatan oleh ekstrak daun ubi jalar merah.

Pada Tabel 1, konsentrasi 2% memberikan daya hambat yang sama dengan konsentrasi 8%. Akan tetapi, konsentrasi 2% dinilai lebih efektif dan lebih baik dalam

menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dibandingkan konsentrasi 8%. Pemilihan konsentrasi yang lebih kecil dengan tingkat efektifnya lebih tinggi atau sama, itu lebih baik dibandingkan dengan konsentrasi yang tinggi dengan memberikan tingkat efektif yang sama. Berdasarkan analisis statistik menggunakan uji ANOVA diketahui bahwa nilai konsentrasi antar perlakuan yaitu antara konsentrasi 2%; 3,5%; 5%; 6,5%; dan 8% tidak berpengaruh nyata baik pada uji menggunakan ekstrak methanol maupun ekstrak n-heksana.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Ekstrak daun ubi jalar merah (*Ipomoea batatas* Poir) yang diekstrak dengan metanol memberikan daya hambat yang lebih besar terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dibandingkan dengan ekstrak daun ubi jalar merah (*Ipomoea batatas* Poir) yang diekstrak dengan n-heksana dan dengan pembanding Tetrasiklin. Konsentrasi yang efektif dari ekstrak daun ubi jalar merah (*Ipomoea batatas* Poir) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* penyebab penyakit bisul pada manusia yaitu konsentrasi 2% dari ekstrak daun ubi jalar merah (*Ipomoea batatas* Poir) yang diekstrak menggunakan metanol.

Saran

Disarankan pada peneliti selanjutnya untuk menguji daya antibakteri ekstrak daun ubi jalar merah (*Ipomoea batatas* Poir) yang diekstrak dengan metanol terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menaikkan interval konsentrasinya yang lebih besar.

DAFTAR PUSTAKA

Ajjazah, A. Thihana dan Mirhanuddin. 2007. Potensi Ekstrak Kayu Ulin (*Eusideroxylon zwageri* T et B) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri

- Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. *Jurnal Bioscientiae*. 4 (1): 37-42
- Alhera. 1999. Skrining Fitokimia dan Penetapan Konsentrasi Hambat Minimum Ekstrak Daun Bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *Skripsi* Sarjana S1 Universitas Sumatra Utara. Medan.
- Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Jawetz, E., J. Melnick, dan E. Adelberg. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi 23*. EGC. Jakarta.
- Kumalaningsih, Sri. 2006. *Antioksidan Alami*. Trubus Agrisarana. Surabaya
- Morin, R.B. dan M. Gorman. 1995. *Kimia dan Biologi Antibiotik β -Lactam*. Edisi 3. Diterjemahkan oleh S. Mulyani. IKIP Semarang Press. Semarang.
- Pokarny, J., N. Yanishlieva, dan M. Gordon. 2001. *Antioxidant in Food. Practical and Aplication*. CRC Press. New York.
- Pratama, M.R. 2005. Pengaruh Ekstrak Serbuk Kayu Siwak (*Salvadora persica*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus* dengan Metode Difusi Agar. *Skripsi*. Fakultas MIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya.
- Schmieg, Sebastian. 2008. Ubi Merah. <http://ccrcfarmasiugm.wordpress.com/>. (8 Juni 2008)
- Watimena, J.R., C.S. Nelly, B.W. Mathilda, Y.S. Elin, A.S. Adreanus, dan T.S. Anna. 1991. *Farmakodinami dan Terapi Antibiotik*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Zimbro, M.J., D.A. Power, S.M. Miller, G.E. Wilson, dan J.A. Johnson. 2009. *Difco and BBL Manual, Manual of Microbiological Culture Media. Second Edition*. Becton, Dickinson and Company. Maryland. America.