

Efek Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) dalam Menghambat Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus* secara *In Vitro*

The Effect of Basil Leaves Ethanol Extract (Ocimum sanctum) in Inhibiting The Establishment of Staphylococcus aureus biofilms with In Vitro Method

Putu Sri Maharani Utami¹, Noorhamdani², Masruroh Rahayu³

¹Program Studi Sarjana Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

²Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

³Departemen Neurologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

e-mail korespondensi: aulani@ub.ac.id

Abstrak

Biofilm merupakan salah satu mekanisme pertahanan bakteri terhadap antimikroba yang dapat menyebabkan resistensi. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri penghasil biofilm yang menjadi penyebab tersering infeksi kulit dan jaringan lunak. Oleh karena itu, diperlukan upaya untuk mencegah pembentukan biofilm *S. aureus*. Daun kemangi (*Ocimum sanctum*) merupakan tanaman herbal yang mengandung senyawa eugenol dan tanin yang diduga dapat menghambat pembentukan biofilm. Penelitian ini adalah penelitian *true experimental-post test only group* yang bertujuan membuktikan pengaruh ekstrak etanol daun kemangi terhadap terbentuknya biofilm *S. aureus* dengan metode *in vitro* dan mengetahui konsentrasi hambat biofilm minimal (KHBM) yang diperlukan. Pada penelitian ini, digunakan metode tabung dengan 7 konsentrasi berbeda. Bentuk cincin biofilm diukur secara kuantitatif menggunakan *Mean Gray Value* pada Adobe Photoshop CS6. Dari hasil penelitian, diketahui bahwa kenaikan konsentrasi ekstrak berbanding lurus dengan penipisan cincin biofilm pada tabung dengan KHBM pada konsentrasi 30%. Uji korelasi *Pearson* menunjukkan korelasi sangat kuat dan signifikan ($r=0,898$, $p=0,000$) dan uji komparasi *Oneway ANOVA* menunjukkan perbedaan signifikan pada nilai rerata tiap kelompok perlakuan ($p=0,000$). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun kemangi mampu menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* pada uji *in vitro*.

Kata Kunci: biofilm, *Staphylococcus aureus*, *Ocimum sanctum*

Abstract

Biofilm is a mechanism of bacterial defense against antimicrobials that can cause resistance. *Staphylococcus aureus* is a biofilm-producing bacteria, and the most often cause of skin and soft tissue infections. Therefore, efforts are needed to prevent the formation of *S. aureus* biofilms. Basil leaves (*Ocimum sanctum*) are herbal plants that contain eugenol and tannin compounds to inhibit the formation of biofilms. This research is an experimental laboratory study that aims to prove the effect of basil leaves ethanol extract on the establishment of *S. aureus* biofilms with *in vitro* method and determine the minimum inhibitory biofilm concentration needed. In this study, we used the tube method with seven different concentrations. The biofilm ring formation obtained was quantitatively measured using *Mean Gray Value* in Adobe Photoshop CS6. The results found that the increase in extract concentration was directly proportional to the thinning of the biofilm ring on the tube with a minimum inhibitory concentration of biofilm at a concentration of 30%. The *Pearson* correlation test showed a very strong and significant correlation ($r=0.898$, $p=0.000$), and the *Oneway ANOVA* comparison test showed a significant difference among the mean of each group ($p = 0.000$). We can conclude that the ethanol extract basil leaves can inhibit the formation of *S. aureus* biofilms *in vitro*.

Keywords: biofilm, *Staphylococcus aureus*, *Ocimum sanctum*

Pendahuluan

Hingga saat ini, penyakit infeksi masih merupakan kontributor besar morbiditas di berbagai negara. Penyakit infeksi justru memiliki sebuah permasalahan baru seiring dengan semakin maraknya insiden resistensi. Bakteri dapat tumbuh hampir di setiap permukaan, membentuk sebuah komunitas yang secara arsitektur sangat kompleks yang disebut biofilm (Putra *et al.*, 2014).

Salah satu bakteri yang dapat membentuk biofilm dan merupakan mikroorganisme patogen penyebab infeksi terbanyak adalah *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* dapat membentuk biofilm pada berbagai media terutama pada penggunaan alat-alat kesehatan yang mengenai atau memasuki tubuh manusia (Otto, 2008). Berdasarkan penelitian yang dilakukan RSCM Jakarta pada tahun 2013, 47% pasien infeksi kulit dan jaringan lunak terinfeksi *S. aureus* (Putra *et al.*, 2014).

S. aureus berada pada hampir 50% hidung manusia, bersifat invasif dan pathogen (Brooks *et al.*, 2014). *S. aureus* merupakan bakteri patogen yang dapat menyebabkan berbagai jenis infeksi klinis seperti bakterimia dan endokarditis, infeksi osteoartikular dan jaringan lunak kulit, *pleuropulmonary infection*, dan infeksi nosocomial (Tong *et al.*, 2015).

Biofilm *S. aureus* dibentuk oleh perlekatan awal pada permukaan jaringan biotik maupun abiotik. *S. aureus* mengekspresikan MSCRAMMs yang memiliki kapasitas untuk berikatan dengan matriks protein pada manusia dan dapat pula menggabungkan matriks protein yang berbeda. Proses ini diikuti oleh ekspresi PIA, *teichoic acid*, dan *Accumulation Associated Protein* (Aap) yang berperan dalam proses agregasi dari sel-sel bakteri. Akhirnya, kumpulan sel tersebut akan mengalami fase pelepasan yang difasilitasi oleh ekspresi dari PSM *peptide* yang sangat penting dalam produksi struktur tiga dimensi dari biofilm (Bhattacharya *et al.*, 2015).

Pembentukan biofilm pada *S. aureus* memiliki peran penting pada terjadinya resistensi. Adanya biofilm yang terbentuk dapat mencegah zat antimikroba mencapai sel target dengan membatasi terjadinya difusi. Selain itu, fisiologi spesifik dari biofilm juga dapat membatasi efikasi antibiotik yang menargetkan pada proses sel aktif dan subpopulasi spesifik dari sel yang resisten (Otto, 2008). Saat ini, diperkirakan hanya 20% dari populasi *S. aureus* yang masih sensitif terhadap terapi antibiotik golongan penicillin. Berdasarkan penelitian Hasan pada tahun 2016, 11 dari 29 strains *S. aureus* yang diteliti resisten terhadap vancomycin (Hasan *et al.*, 2016).

Oleh karena itu, diperlukan sebuah usaha untuk mencegah terbentuknya biofilm dari infeksi bakteri *S. aureus* (Bal dan Gould, 2005). Salah satunya adalah dengan memanfaatkan tanaman yang berpotensi mencegah terbentuknya biofilm bakteri patogen. Beberapa tahun terakhir, telah banyak penelitian terhadap tanaman kemangi atau tulus (*Ocimum sanctum*) yang digunakan sebagai agen antimikroba. Analisis kandungan bioaktif pada daun kemangi menunjukkan berbagai zat bioaktif seperti *eugenol*, *caryophyllene*, dan *tannin* yang memiliki fungsi sebagai antimikroba (Al-Temimi dan Al-Mashhedy, 2015).

Eugenol merupakan senyawa fenol yang bersifat hidrofobik dapat menghambat ekspresi gen *lcaD*, *seA*, dan *sarA* yang berperan penting dalam pembentukan biofilm (Al-Temimi dan Al-Mashhedy, 2015). Tannin merupakan senyawa polifenol yang dapat menghambat pembentukan fibrin yang diproduksi oleh *S. aureus*, yang merupakan salah satu komponen penting pada struktur biofilm (Akiyama *et al.*, 2001).

Berdasarkan uraian di atas maka terdapat kemungkinan bahwa daun kemangi memiliki efek antimikroba dan dapat mencegah terbentuknya biofilm bakteri *S. aureus*. Melalui penelitian ini, penulis ingin membuktikan bahwa daun kemangi dapat menjadi alternatif dalam mencegah pembentukan biofilm *S. aureus* yang dapat menimbulkan berbagai permasalahan baru dalam penyebaran dan penanganan infeksi.

Metode

Studi dilaksanakan dengan rancangan eksperimen laboratorium, menggunakan uji hambat biofilm metode tabung, dengan tujuan mengetahui pengaruh ekstrak etanol terhadap pembentukan biofilm *S. aureus* melalui metode *in vitro*.

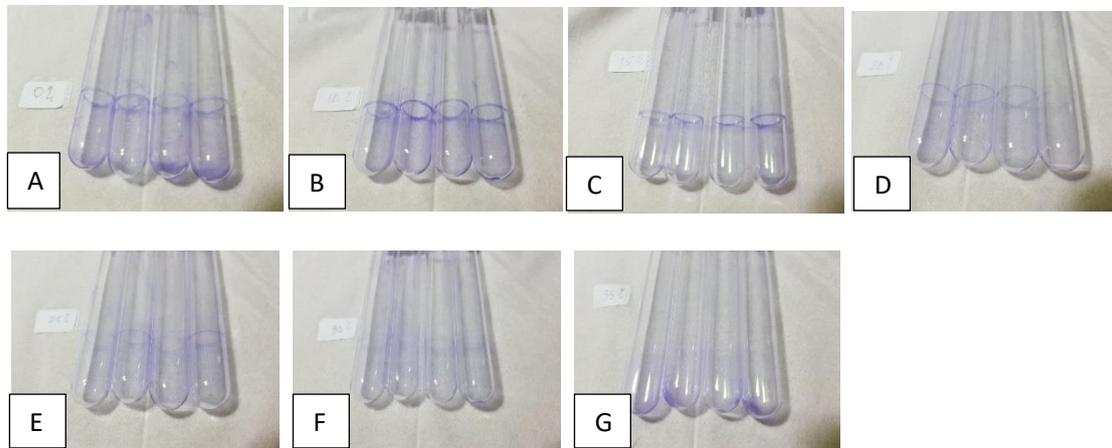
Proses identifikasi bakteri dilakukan melalui beberapa tahapan di antaranya pewarnaan gram, uji katalase, uji koagulase, dan pembiakan pada medium *Mannitol Salt Agar*. Bakteri diperoleh dari stok kultur bakteri Laboratorium Mikrobiologi FKUB.

Bahan utama penelitian berupa daun kemangi yang diperoleh dari Materia Medica Batu dan melalui proses ekstraksi di Polinema, Malang. Daun kemangi kemudian dikeringkan, diekstraksi, dan dievaporasi. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96%.

Pada penelitian ini, digunakan 7 konsentrasi ekstrak berbeda dengan 1 kontrol (konsentrasi 0%). Konsentrasi yang digunakan adalah 10%, 15%, 20%,

25%, 30%, dan 35%, dengan 4 kali pengulangan. Adapun penentuan kisaran dan jarak konsentrasi dilakukan berdasarkan hasil penelitian pendahuluan. Hasil bentukan cincin biofilm yang didapatkan dikuantifikasi menggunakan *Mean Gray Value* pada aplikasi Adobe Photoshop CS6 (Gambar 1).

pengukuran intensitas cincin biofilm dengan *Mean Gray Value* tertera melalui Tabel 1.



Gambar 1. Tabung Uji Hambat Pembentukan Biofilm dengan 4 kali pengulangan dengan pemberian ekstrak: A. Konsentrasi 0%, B. Konsentrasi 10%, C. Konsentrasi 15%, D. Konsentrasi 20%, E. Konsentrasi 25%, F. Konsentrasi 30%, G. Konsentrasi 35%.

Proses pengolahan data dilakukan dengan memanfaatkan program SPSS untuk *windows* versi 23. Uji statistik yang digunakan adalah (1) uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk Test*. Data terdistribusi normal jika nilai signifikansi $> 0,05$; (2) uji homogenitas varian menggunakan *Levene Test*. Data memiliki variasi normal jika nilai signifikansi $< 0,05$; (3) uji komparasi menggunakan *One-way ANOVA* untuk mengetahui tingkat perbedaan nilai rerata suatu kelompok data dengan kelompok data lain; (4) uji *Post Hoc Multiple Comparison* dilakukan untuk mengetahui perbandingan rerata tiap kelompok secara signifikan antara satu kelompok data dengan lainnya; (5) uji korelasi *Pearson* dilakukan untuk mengetahui kategori keeratan dan bentuk hubungan antara dua variabel. Hubungan yang signifikan ditunjukkan dengan $p < 0,05$; (6) uji regresi dilakukan untuk mencari tahu besarnya pengaruh variabel independen terhadap variabel dependen.

Hasil

Pada studi ini, didapatkan bahwa pada konsentrasi 30% biofilm yang terbentuk telah semakin menipis, sedangkan pada konsentrasi 0%, didapatkan pembentukan cincin biofilm yang paling tebal, dan pada konsentrasi 35% didapatkan pembentukan cincin biofilm yang nyaris tidak terlihat. Hasil

Data hasil pengamatan pada konsentrasi 0% hingga 35% menunjukkan adanya kenaikan rata-rata *Mean Gray Value* yang berbanding lurus dengan kenaikan konsentrasi dari ekstrak etanol daun kemangi (Gambar 2). Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kemangi, semakin tinggi nilai *Mean Gray Value*, yang menandakan bahwa semakin tipis intensitas cincin yang terbentuk pada *airfluid border* tabung, semakin kuat penghambatan pembentukan biofilm yang terjadi.

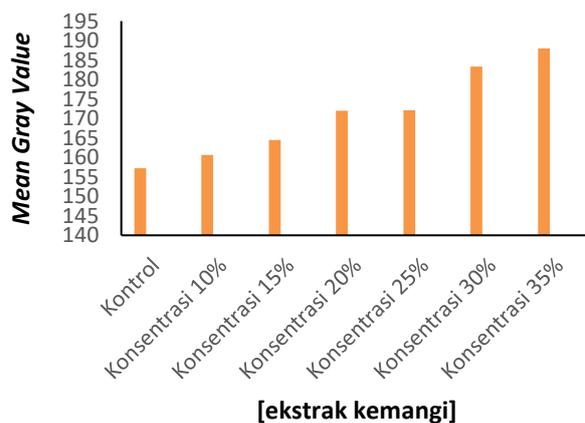
Konsentrasi terkecil yang memiliki hasil *Mean Gray Value* 10% di bawah *Mean Gray Value* tabung kosong merupakan Konsentrasi Hambat Biofilm Minimal (KHBM). Pada penelitian ini, didapatkan bahwa 10% dari *Mean Gray Value* tabung kosong bernilai 179,11. Nilai tersebut telah tercapai pada konsentrasi 30% sehingga didapatkan Kadar Hambat Biofilm Minimal adalah pada konsentrasi 30%.

Hasil uji normalitas diketahui menunjukkan nilai $p = 0,161$ yang menunjukkan bahwa hasil memiliki sebaran yang normal. Hasil uji homogenitas *Levene* memberikan hasil $p = 0,335$ yang menunjukkan bahwa data hasil memiliki varian homogen. Dengan demikian, dapat dilakukan uji statistik parametrik.

Hasil pengujian *Oneway ANOVA* menunjukkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) yang berarti bahwa terdapat perbedaan signifikan antara nilai rerata tiap kelompok. Hasil Uji perbandingan *Post Hoc Tukey*

menunjukkan perbedaan tidak signifikan antara dua kelompok hasil yang berdekatan. Namun, terdapat perbedaan nilai *Mean Gray Value* yang signifikan antara dua kelompok konsentrasi tertinggi, yaitu konsentrasi 30% dan 35% dengan kelima konsentrasi terendah lainnya.

Hasil pengujian korelasi *Pearson* menggambarkan nilai korelasi (r) = 0,898, yang menandakan korelasi antara konsentrasi ekstrak daun kemangi dengan *Mean Gray Value* atau ketebalan biofilm sangat kuat. Hasil uji regresi menunjukkan bahwa 80,6% hambatan pembentukan biofilm dipengaruhi oleh ekstrak daun kemangi.



Gambar 2. Grafik Hasil Pengukuran *Mean Gray Value*

Pembahasan

Pada uji pendahuluan, konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 0%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; dan 100%. Hasil uji pendahuluan menunjukkan bahwa pada konsentrasi 25% dan 50% telah tidak ditemukan pembentukan cincin biofilm pada daerah *airfluid border* secara visual. Selanjutnya, ditentukan konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian inti, yaitu 0%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, dan 35%. Konsentrasi 0% berperan sebagai kontrol bakteri yang terdiri atas NaCl tanpa pemberian ekstrak daun kemangi. Pada penelitian inti, didapatkan hasil bahwa cincin biofilm telah mulai menghilang pada konsentrasi 30%. Pada konsentrasi 0% didapatkan pembentukan cincin biofilm yang paling tebal dan pada konsentrasi 35% didapatkan pembentukan cincin biofilm yang nyaris tidak terlihat.

Data hasil pengamatan pada konsentrasi 0% hingga 35% menunjukkan adanya peningkatan rata-rata *Mean Gray Value* yang sebanding dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol kemangi. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kemangi,

semakin tipis intensitas cincin yang terbentuk pada tabung yang berarti semakin kuat pula penghambatan pembentukan biofilm. Pada penelitian ini, didapatkan 10% dari MGV tabung kosong bernilai 179,11 yang tercapai pada konsentrasi 30%. Dengan demikian, didapatkan KHBM pada konsentrasi 30%.

Hasil penelitian ini diketahui selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Lalitya (2017) mengenai pengaruh ekstrak daun kemangi terhadap penghambatan terbentuknya biofilm bakteri *Burkholderia cepacia* menggunakan metode tabung. Penelitian tersebut menemukan bahwa terjadi hubungan yang berbanding lurus antara peningkatan konsentrasi ekstrak daun kemangi terhadap peningkatan nilai *Mean Gray Value* yang menunjukkan penipisan intensitas cincin biofilm seiring peningkatan konsentrasi ekstrak. Pada penelitian tersebut digunakan 6 konsentrasi sebagai perlakuan, yaitu 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa cincin biofilm telah tidak terbentuk pada konsentrasi 30%.

Ditemukan pula penelitian Bhavani dan Sivasubramanian (2014) yang mengemukakan bahwa ekstrak daun kemangi dapat menghambat terbentuknya biofilm Methicillin Resistant *S. aureus* pada titik konsentrasi ekstrak 128 $\mu\text{g/ml}$ dengan metode *tissue culture plate*. Adanya perbedaan hasil tersebut dapat dipengaruhi oleh perbedaan metode dan pelarut ekstrak yang digunakan. Pada penelitian tersebut dibuktikan bahwa ekstrak etanol kemangi lebih efektif dalam menghambat pembentukan biofilm MRSA dibandingkan ekstrak metanol. Hal ini menjadi alasan penggunaan etanol 96% sebagai pelarut dalam penelitian ini.

Penelitian Ratthawongjirakul dan Thongkerd (2016) menunjukkan bahwa pembentukan biofilm *S. aureus* dapat dihambat oleh ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) pada KHBM 8,192 $\mu\text{g/ml}$. Berdasarkan hasil analisis RT-PCR kuantitatif, diketahui bahwa mekanisme penghambatan biofilm *S. aureus* adalah dengan penghambatan ekspresi gen *icaA* dan *agr* sehingga sintesis protein bakteri, proses *attachment*, dan aktivasi *quorum sensing* menjadi terhambat.

Berdasarkan penelitian Mishra *et al.* (2011) disebutkan bahwa adanya aktivitas antibakteri ekstrak daun kemangi disebabkan oleh kandungan eugenol yang merupakan sebuah senyawa fenol, senyawa terbesar penyusun ekstrak daun kemangi. Selain itu, senyawa lain yang memiliki efek antibakteri adalah tanin, flavonoid, caryophyllene, alkaloid hingga steroid.

Tabel 1. Hasil Pengukuran *Mean Gray Value* kelompok perlakuan menggunakan Adobe Photoshop CS6

Konsentrasi	Pengulangan				Mean \pm SD
	I	II	III	IV	
0%	165,57	153,23	152,48	157,42	157,18 \pm 6,00
10%	160,06	162,85	155,03	164,72	160,67 \pm 4,21
15%	163,38	165,33	159,59	169,29	164,40 \pm 4,04
20%	172,33	166,31	166,06	183,1	171,95 \pm 7,97
25%	171,11	170,7	176,05	170,47	172,08 \pm 2,66
30%	188,76	182,28	182,89	179,33	183,32 \pm 3,95
35%	187,74	186,99	186,38	190,79	187,98 \pm 1,96
Mean Gray Value	199,01				

Menurut Marchese *et al.* (2017), eugenol dalam ekstrak daun kemangi dapat menghambat pertumbuhan biofilm melalui penghambatan ekspresi gen *IcaD* dan *sarA*. Gen *IcaD* berfungsi dalam membentuk PIA sebagai komponen utama proses perlekatan biofilm, sedangkan gen *sarA* berfungsi untuk mencegah terjadinya degradasi DNA dan protein ekstraseluler biofilm. Akiyama *et al.* (2001) juga menyebutkan bahwa kandungan tannin dapat menghambat pembentukan biofilm melalui penghambatan pembentukan fibrin yang diproduksi oleh *S. aureus* yang merupakan komponen penting pembentuk biofilm. Diketahui bahwa dengan menurunnya kandungan fibrin, daya tahan biofilm terhadap efek fisik maupun kimia akan menurun.

Keterbatasan penelitian ini adalah pengamatan terhadap perkembangan biofilm dan perlakuan yang hanya diberikan setelah masa inkubasi selesai, tidak dilakukan dari waktu ke waktu sepanjang masa inkubasi. Oleh karena itu, belum dapat diketahui perubahan yang terjadi pada setiap waktu efek perlakuan terhadap biofilm yang terbentuk. Karena keterbatasan metode dan bahan, studi ini juga belum dapat menggambarkan secara spesifik zat aktif daun kemangi yang memiliki potensi menghambat pembentukan biofilm. Selain itu, belum diketahui pula efek lama penyimpanan ekstrak terhadap kandungan dan efektivitas zat aktif yang terkandung di dalamnya sehingga perlu dilakukan eksplorasi metode lebih lanjut.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian pengaruh ekstrak etanol daun kemangi terhadap pembentukan biofilm *S. aureus*, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun kemangi dapat menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* secara *in vitro*. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi, semakin tinggi penghambatan pembentukan biofilm *S. aureus*. KHBH ekstrak etanol daun kemangi terhadap pembentukan biofilm *S. aureus* adalah pada konsentrasi 30%.

Daftar Pustaka

- Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K. 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. Oct 1; 48(4): 487-91.
- Al-Temimi SS, Al-Mashhedy LA. 2015. Estimation of the Phytochemical Constituents and Biological Activity of Iraqi *Ocimum sanctum* L Extracts. *Int J Pharma Bio Sci*. 6: 999-1007.
- Bal AM, Gould IM. 2005. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and its relevance in therapy. *Expert opinion on pharmacotherapy*. Oct 1; 6(13): 2257-69.
- Bhattacharya M, Wozniak DJ, Stoodley P, Hall-Stoodley L. 2015. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Expert review of anti-infective therapy*. Dec 2; 13(12): 1499-516.
- Bhavani T., Sivasubramanian M. 2014. Anti-biofilm efficacies of *Ocimum sanctum*, *Punica granatum* and *Solanum nigrum* extracts against Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Indian Journal of Applied Microbiology*. 17 (2): 55-64.
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. 2014. *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg-26*. AMGH Editora Mar 1.
- Hasan R, Acharjee M, Noor R. 2016. Prevalence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) in methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strains isolated from burn wound infections. *Tzu Chi Medical Journal*. Jun 1; 28(2): 49-53.
- Lalitya, W. 2017 *Efek Ekstrak Etanol Daun Kemangi (Ocimum Sanctum) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm Burkholderia Cepacia Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak

dipublikasikan, Fakultas Kedokteran
Universitas Brawijaya Malang.

- Marchese A, Barbieri R, Coppo E, Orhan IE, Daglia M, Nabavi SF, Izadi M, Abdollahi M, Nabavi SM, Ajami M. 2017. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical Reviews in Microbiology*. Nov 2; 43(6): 668-89.
- Mishra P, Mishra S. 2011. Study of antibacterial activity of *Ocimum sanctum* extract against gram positive and gram negative bacteria. *Am J Food Technol*. 6(4): 336-41.
- Otto M. 2008. Staphylococcal biofilms. In *Bacterial biofilms*. Springer, Berlin, Heidelberg p.207-228.
- Putra MI, Suwanto S, Loho T, Abdullah M. 2014. Faktor Risiko Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* pada Pasien Infeksi Kulit dan Jaringan Lunak di Ruang Rawat Inap. *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia*. Jul 31; 1(1): 3-14.
- Ratthawongjirakul P, Thongkerd V. 2016. Fresh garlic extract inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation under chemopreventive and chemotherapeutic conditions. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*. Jul 1; 38(4).
- Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*. Jul 1; 28(3): 603-61.