

## **PERBANDINGAN EFEKTIVITAS AIR PERASAN JERUK NIPIS (*CITRUS AURANTIFOLIA SWINGLE*) DENGAN KETOKONAZOL 2% SEBAGAI ANTIJAMUR *MALASSEZIA FURFUR* SECARA *IN VITRO***

Yosia Iskandar<sup>1</sup>, Budhi Surastrri Soejoto<sup>2</sup>, Purnomo Hadi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Program Studi S-1 Ilmu Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

<sup>2</sup> Staf Pengajar Ilmu Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

<sup>3</sup> Staf Pengajar Ilmu Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro  
JL. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang-Semarang 50275, Telp. 02476928010

### **ABSTRAK**

**Latar belakang:** *Malassezia furfur* adalah salah satu jamur yang menjadi penyebab penyakit-penyakit yang tersebar di seluruh dunia. Ketokonazol 2% merupakan salah satu obat imidazol antifungal sintetik yang ditetapkan untuk penyakit infeksi kulit termasuk penyakit dengan penyebab *Malassezia furfur*. Air perasan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia Swingle*) memiliki kandungan limonen yang sudah diteliti sebelumnya memiliki efek penghambatan pertumbuhan pada *Malassezia furfur*.

**Tujuan:** Mengetahui perbandingan efektivitas air perasan jeruk nipis dengan ketokonazol 2% sebagai antijamur *Malassezia furfur* secara *in vitro*.

**Metode:** Penelitian ini adalah eksperimental dengan *Post test only control group design*. Sampel penelitian adalah biakan jamur *Malassezia furfur* pada media Sabouraud Dextrose Agar *olive oil* dengan jumlah sampel 5 untuk setiap perlakuan. Terdapat 8 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol. Pertumbuhan koloni *Malassezia furfur* dinilai selama 2-5 hari setelah penanaman pada suhu 25°C dilanjutkan pemeriksaan mikroskopik. Hasil data penelitian dilakukan uji hipotesis penelitian dengan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan uji *Mann-Whitney*.

**Hasil:** Uji *Kruskal-Wallis* seluruh perlakuan didapatkan  $p=0,00$ . Dari uji *Mann-Whitney* didapatkan perbedaan tidak bermakna antara perlakuan ketokonazol dengan air perasan jeruk nipis 100% ( $p=1,00$ ) dan perbedaan bermakna antara ketokonazol 2% dengan air perasan jeruk nipis konsentrasi yang lain ( $p=0,008$ )

**Kesimpulan:** Air perasan jeruk nipis (konsentrasi 100%) dan ketokonazol memiliki efek sebagai antijamur *Malassezia furfur* yang setara.

**Kata kunci:** *Malassezia furfur*, air perasan jeruk nipis, ketokonazol, pertumbuhan *Malassezia furfur*

### **ABSTRACT**

#### **THE COMPARISON OF EFFECTIVENESS BETWEEN LIME JUICE AND KETOCONAZOLE 2% AS AN ANTIFUNGAL AGAINST MALASSEZIA FURFUR IN VITRO**

**Background :** *Malassezia furfur* causes fungal diseases that spread throughout the world. Ketoconazole 2% is a synthetic antifungal imidazole drugs prescribed for skin infections, including diseases caused by *Malassezia furfur*. In the previous studies, lime juice contains limonene that has an inhibitory effect on the growth of *Malassezia furfur*.

**Aim :** To compare the efficacy of lime juice and ketoconazole 2% as an antifungal against *Malassezia furfur* in vitro.

**Methods:** This study was an experimental Post test only control group design. The samples were *Malassezia furfur* cultured on Sabouraud Dextrose Agar supplemented by olive oil with a sample of five for each group. There were eight intervention groups consisting lime juice

with concentration of 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13%, 1.56% respectively and two control groups. Colony growth of *Malassezia furfur* was evaluated for 2-5 days after being planted at 25°C, followed by microscopic examination. Data were analysed by Kruskal-Wallis test. Mann-Whitney test was performed to determine the significant differences between groups.

**Results:** Kruskal-Wallis test showed that  $p = 0.00$ . Mann-Whitney test found no significant difference ( $p = 1.00$ ) between ketoconazole and lime juice with concentration 100% and found significant differences between ketokonazole 2% and lime juice with other concentration.

**Conclusion:** The efficacy of lime juice concentration of 100% as an antifungal against *Malassezia furfur* in vitro is comparable with that of ketokonazole 2%.

**Keywords:** *Malassezia furfur*, lime juice, ketokonazole, growth of *Malassezia furfur*

## PENDAHULUAN

*Malassezia furfur* adalah *lipid-dependent* yeast yang biasanya ditemukan pada kulit dari anak remaja maupun orang dewasa dan merupakan penyebab dari *Pityriasis versicolor*.

*M. furfur* sendiri merupakan organisme dimorfik dan lipofilik yang berkembang secara *in vitro* dengan adisi dari asam lemak C12-C14 seperti *olive oil* dan *lanoline*.<sup>1</sup> *Pityriasis versicolor* merupakan penyakit yang tersebar di seluruh dunia. Sekitar 50% merupakan prevalensi terjadinya *Pityriasis versicolor* pada daerah tropis bersuhu hangat serta lembap. Di Semarang sendiri, angka kejadian *Pityriasis versicolor* pada polisi lalu lintas Semarang adalah 17,5%.<sup>2</sup>

Ketokonazol, derivat imidazol dengan spektrum fungisidal luas yang efektif terhadap banyak jamur pada media *in vivo* dan *in vitro*. Ketokonazol sendiri merupakan obat imidazol antifungal sintetik yang ditetapkan untuk penyakit infeksi kulit termasuk untuk penyakit dengan penyebab *Malassezia furfur*. Ketokonazol merupakan pesaing utama untuk menjadi obat yang paling efektif untuk *Malassezia furfur*.<sup>3</sup>

Indonesia memiliki beragam varian tumbuhan dan buah yang digunakan oleh penduduk sebagai obat herbal untuk mengatasi penyakit. Salah satu tanaman dan buah yang dipercaya memiliki khasiat antijamur adalah jeruk nipis. Melalui penelitian sebelumnya, didapatkan hasil bahwa ekstrak tumbuhan jeruk nipis memberikan dampak yang cukup signifikan bagi pertumbuhan *Malassezia furfur*.<sup>4</sup> Setelah diteliti lebih lanjut, komponen limonen yang terdapat dalam ekstrak tersebut memiliki efek cukup signifikan pada pertumbuhan *Malassezia furfur*.<sup>5</sup> Air perasan jeruk nipis memiliki kandungan limonen.<sup>6</sup> Hingga sekarang, belum dilakukan penelitian tentang perbandingan efektivitas air perasan jeruk nipis dengan ketokonazol 2% sebagai antijamur *Malassezia furfur*. Untuk itu, peneliti merasa tertarik untuk melanjutkan penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya.

## METODE

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Maret hingga Juni 2016. Kegiatan penelitian seperti pembuatan air perasan jeruk nipis serta media *sabouraud dextrose agar* (SDA) dan penanaman biakan jamur *Malassezia furfur* serta perlakuan pada isolat *Malassezia furfur* telah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Univeritas Diponegoro-Rumah Sakit Nasional Diponegoro. Sampel yang digunakan adalah biakan jamur *Malassezia furfur* pada media *Saboraud Dextrose Agar olive oil* di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro-Rumah Sakit Nasional Diponegoro diinkubasi pada suhu 25°C selama 3 hari. Penentuan jumlah subjek minimal ditentukan berdasarkan rumus Federer yaitu  $(t-1)(n-1) \geq 15$ , bahwa  $t$  merupakan jumlah perlakuan, sedangkan  $n$  merupakan banyak pengulangan pada tiap perlakuan, sehingga didapatkan  $n \geq 2,7$ . Penelitian ini menggunakan pengulangan tiap perlakuan sebanyak 5 kali pengulangan.

$$\begin{aligned} \text{Formula Federer} &= (T-1)(N-1) > 15 \\ \text{Singkatan} &: T &: \text{Jumlah perlakuan} \\ &N &: \text{Jumlah pengulangan tiap perlakuan} \\ &= (10-1)(N-1) > 15 \\ &= 9N-9 > 15 \\ &= N > 2,7 \end{aligned}$$

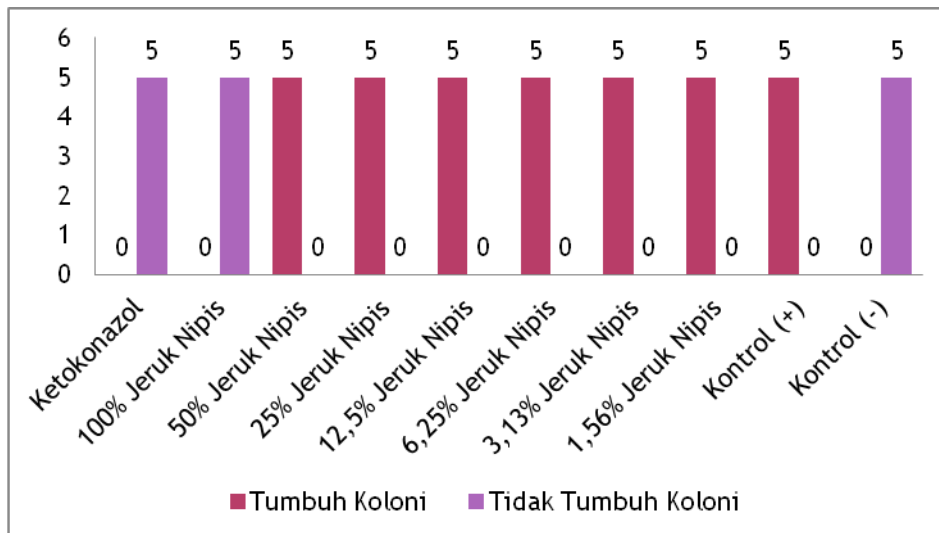
Variabel bebas pada penelitian ini adalah air perasan jeruk nipis dan ketokonazol 2%, sedangkan variabel terikat penelitian ini adalah pertumbuhan koloni *Malassezia furfur*. Cara kerja penelitian adalah pembuatan media *saboraud dextrose agar olive oil*, Pembuatan media *saboraud dextrose agar olive oil* dengan air perasan jeruk nipis dalam berbagai konsentrasi, penanaman sampel, pengamatan sampel hasil penelitian, dan penentuan konsentrasi hambat minimal. Analisis data pada penelitian ini meliputi uji normalitas data dan uji hipotesis. Uji normalitas data pada penelitian ini menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Kemudian dilanjutkan dengan uji hipotesis penelitian dengan menggunakan uji yaitu dengan uji *Kruskal-Wallis* jika  $p < 0,05$ , maka terdapat minimal 2 kelompok yang memiliki perbedaan bermakna. Untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan, maka dilakukan analisis *Post Hoc* yaitu uji *Mann-Whitney*.

**HASIL**

**Analisis Sampel**

Penelitian ini menggunakan sampel biakan jamur *Malassezia furfur* pada media *Sabouraud Dextrose Agar olive oil*. Sampel diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro- Rumah Sakit Nasional Diponegoro. Besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus *Federer* dan didapatkan penelitian dengan banyak pengulangan tiap perlakuan sebanyak 5 kali pengulangan. Sampel dibagi secara acak ke dalam 10 kelompok, yaitu kelompok kontrol positif dan negatif, kelompok perlakuan dengan pemberian konsentrasi 100% jeruk nipis, kelompok perlakuan dengan pemberian konsentrasi 50% jeruk nipis, kelompok perlakuan dengan pemberian konsentrasi 25% jeruk nipis, kelompok perlakuan dengan pemberian konsentrasi 12,5% jeruk nipis, kelompok perlakuan dengan pemberian konsentrasi 6,25% jeruk nipis, kelompok perlakuan dengan pemberian konsentrasi 3,13% jeruk nipis, kelompok perlakuan dengan pemberian konsentrasi 1,56% jeruk nipis, dan kelompok perlakuan dengan pemberian ketokonazol 2%. Pertumbuhan koloni *Malassezia furfur* dinilai selama 3-5 hari dalam suhu inkubasi 25°C lalu dilanjutkan pemeriksaan mikroskopik.

**Analisis Deskriptif**



**Gambar 1.** Grafik pertumbuhan *Malassezia furfur* pada media SDA *olive oil* dengan air perasan jeruk nipis, media SDA *olive oil* dengan ketokonazol, dan media kontrol

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran konsentrasi hambat minimal dari air perasan jeruk nipis terhadap pertumbuhan *Malassezia furfur* berdasarkan konsentrasi minimal yang dapat menghambat pertumbuhan *Malassezia furfur* dalam agar. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, hasil yang didapatkan adalah konsentrasi air perasan jeruk nipis 100%

merupakan konsentrasi hambat minimal air perasan jeruk nipis terhadap pertumbuhan *Malassezia furfur* dalam agar. Pada konsentrasi air perasan jeruk nipis selain 100%, didapatkan seluruhnya ada pertumbuhan jamur *Malassezia furfur* dalam media agar.

Pada penelitian ini juga ditemukan bahwa pertumbuhan *Malassezia furfur* pada media SDA dengan *olive oil* yang mengandung 100% jeruk nipis terdapat 5 tabung yang tidak ada pertumbuhan *Malassezia furfur*, sedangkan pada media SDA dengan *olive oil* yang mengandung ketokonazol 2% terdapat 5 tabung yang tidak ada pertumbuhan *Malassezia furfur*.

**Analisis Kemaknaan**

Dari hasil penelitian yang telah didapatkan, data dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan didapatkan bahwa data konstan. Selanjutnya, data dianalisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan didapatkan bahwa  $p=0,00$  yang berarti bahwa minimal ada 2 kelompok yang perbedaan bermakna. Data hasil penelitian kemudian dikerjakan dengan uji *Mann-Whitney* untuk menemukan kelompok yang memiliki perbedaan bermakna.

**Tabel 1.** Hasil uji statistik *Mann-Whitney*

|          | Keto | 100% JN | 50% JN | 25% JN | 12,5% JN | 6,25% JN | 3,13% JN | 1,56% JN |
|----------|------|---------|--------|--------|----------|----------|----------|----------|
| Keto     |      | 1,00    | 0,008  | 0,008  | 0,008    | 0,008    | 0,008    | 0,008    |
| 100% JN  |      |         | 0,008  | 0,008  | 0,008    | 0,008    | 0,008    | 0,008    |
| 50% JN   |      |         |        | 1,00   | 1,00     | 1,00     | 1,00     | 1,00     |
| 25% JN   |      |         |        |        | 1,00     | 1,00     | 1,00     | 1,00     |
| 12,5% JN |      |         |        |        |          | 1,00     | 1,00     | 1,00     |
| 6,25% JN |      |         |        |        |          |          | 1,00     | 1,00     |
| 3,13% JN |      |         |        |        |          |          |          | 1,00     |
| 1,56% JN |      |         |        |        |          |          |          |          |

Keterangan : - JN :Jeruk Nipis

- Keto :Ketokonazol 2%

- Signifikan  $p < 0,05$

Dari tabel di atas ditemukan bahwa perlakuan SDA *olive oil* dengan ketokonazol 2% memiliki perbedaan tidak bermakna dengan SDA *olive oil* dengan air perasan jeruk nipis konsentrasi 100% ( $p>0,05$ ). Perlakuan SDA *olive oil* dengan ketokonazol 2% dan SDA *olive oil* dengan air perasan jeruk nipis konsentrasi 100%, memiliki perbedaan yang bermakna dengan kelompok perlakuan konsentrasi air perasan jeruk nipis yang lain ( $p<0,05$ ), yaitu perlakuan SDA *olive oil* dengan air perasan jeruk nipis konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%,

3,13%, 1,56%.

Dari hasil penelitian ini didapatkan hasil penelitian yaitu tidak ada koloni *Malassezia furfur* yang tumbuh pada SDA *olive oil* yang mengandung ketokonazol 2% dan SDA *olive oil* yang mengandung konsentrasi 100% air perasan jeruk nipis, sedangkan pada SDA *olive oil* yang mengandung konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56% ada koloni *Malassezia furfur* yang tumbuh. Berdasarkan hasil tersebut, menunjukkan bahwa ketokonazol merupakan obat yang efektif dalam menghambat pertumbuhan dari *Malassezia furfur*. Setelah dilakukan pengolahan data secara statistik dengan program computer SPSS versi 23 dengan uji *Kruskal-Wallis* sebelumnya pada seluruh perlakuan dan dilanjutkan uji *Mann-Whitney* untuk menemukan kelompok yang berbeda bermakna, ditemukan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara SDA *olive oil* yang mengandung ketokonazol 2% dengan SDA *olive oil* yang mengandung konsentrasi 100% air perasan jeruk nipis dalam menghambat pertumbuhan *Malassezia furfur*. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada konsentrasi 100% air perasan jeruk nipis memiliki zat efek antijamur *Malassezia furfur* yang cukup efektif. Kejadian tersebut disebabkan karena adanya minyak atsiri, flavonoid, dan saponin dalam air perasan jeruk nipis yang memiliki efek antijamur. Ini sesuai dengan penelitian sebelumnya di Korea yaitu minyak atsiri jeruk nipis yang terdiri atas limonen,  $\gamma$ -terpinen, dan terpinolen serta komponen lain memiliki efek yang menarik terhadap aktivitas penghambatan jamur *Malassezia furfur*.<sup>6</sup> Pada penelitian di Nigeria juga menyebutkan bahwa saponin pada air perasan jeruk nipis memiliki kecenderungan menghambat pertumbuhan mikroba yang membuat saponin menjadi kandidat yang baik sebagai antijamur.<sup>7</sup> Menurut penelitian sebelumnya di India, flavonoid disebutkan dapat berfungsi sebagai antioksidan dan memiliki kemampuan untuk menghambat proliferasi sel jamur.<sup>8</sup> Mekanisme kerja dari jeruk nipis adalah dengan menghambat formasi zoosporangia dan germinasi dari zoospora patogen sehingga akan membatasi pertumbuhan miselium.<sup>9</sup> Pada penelitian ini, pengaruh pH rendah dari jeruk nipis dihilangkan dengan pembuatan pH media 5,5 - 6.

Pada SDA *olive oil* dengan konsentrasi air perasan jeruk nipis 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, dan 1,56% ditemukan adanya pertumbuhan koloni *Malassezia furfur*. Setelah dilakukan pengolahan data statistik dengan menggunakan uji *Mann-Whitney*, ditemukan perbedaan bermakna antara SDA yang diberikan konsentrasi jeruk nipis 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, dan 1,56% dengan ketokonazol menunjukkan bahwa konsentrasi-konsentrasi tersebut tidak memiliki khasiat antijamur yang cukup untuk menghambat pertumbuhan *Malassezia furfur* pada media agar. Maka dari itu, konsentrasi hambat minimal air perasan

jeruk nipis yang dapat menghambat pertumbuhan dari *Malassezia furfur* secara *in vitro* adalah konsentrasi 100%.

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa air perasan jeruk nipis dapat dipertimbangkan sebagai salah satu obat herbal antijamur *Malassezia furfur*. Dengan adanya penelitian ini tidak berarti bahwa air perasan jeruk nipis dapat segera digunakan secara langsung untuk menjadi obat penyakit-penyakit kulit yang disebabkan oleh jamur *Malassezia furfur* karena penelitian ini hanya melakukan penelitian secara *in vitro* dan perlu dilakukan penyesuaian pH dari sangat asam menjadi pH 5,5-6 terhadap media agar SDA *olive oil*. Hal ini penting untuk dikaji lebih lanjut berkaitan dengan besarnya potensi yang dimiliki air perasan jeruk nipis sebagai antijamur *Malassezia furfur*.

Keterbatasan dari penelitian ini adalah tempat inkubasi. Menurut penelitian sebelumnya, temperature optimum untuk menumbuhkan *Malassezia furfur* pada media *Sabouraud Dextrose Agar* adalah  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ .<sup>10</sup> Pada penelitian ini, peneliti menggunakan suhu  $25^\circ\text{C}$  sebagai suhu inkubasi hal ini dikarenakan berdasarkan penelitian sebelumnya,  $25^\circ\text{C}$  merupakan suhu yang mendekati  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  serta tidak tersedianya inkubator dengan suhu  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  pada Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro-Rumah Sakit Nasional Diponegoro. Keterbatasan lain yang dialami peneliti adalah ketokonazol murni. Penelitian ini tidak menggunakan ketokonazol bubuk murni dan diganti dengan ketokonazol tablet dikarenakan tidak tersedianya ketokonazol bubuk.

## **SIMPULAN DAN SARAN**

### **Simpulan**

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan kesimpulan bahwa perbandingan efektivitas air perasan jeruk nipis konsentrasi 100% dengan ketokonazol 2% sebagai antijamur *Malassezia furfur* secara *in vitro* adalah setara. Air perasan jeruk nipis konsentrasi 100% dan ketokonazol terbukti efektif sebagai antijamur *Malassezia furfur*.

### **Saran**

Pada penelitian selanjutnya diharapkan untuk melakukan penelitian menggunakan air perasan jeruk nipis terhadap pertumbuhan jamur *Malassezia furfur* dengan konsentrasi 50% hingga 100% untuk menentukan apakah ada konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan *Malassezia furfur* di bawah konsentrasi 100%. Selain itu, diperlukan juga penelitian lebih lanjut mengenai air perasan jeruk nipis yaitu uji toksisitas dari konsentrasi air perasan jeruk nipis. Mengingat pada penelitian ini ada beberapa hal seperti suhu, sterilitas,

maupun pH yang dapat diatur karena dikerjakan secara *in vitro*, penelitian ini tidak dapat segera digunakan untuk penggunaan terapi penyakit dengan penyebab *Malassezia furfur*. Saran lain yang dapat diberikan adalah dengan menggunakan media lain sebagai media dari *Malassezia furfur*. Standar dalam mencari konsentrasi hambat minimal seharusnya menggunakan media *Mueller-Hinton* cair. Hal ini dikarenakan pada media *Mueller-Hinton* terdapat elektrolit yang lebih sedikit dan dapat mempengaruhi pertumbuhan dari jamur *Malassezia furfur*.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Wolff K, Goldsmith A. L, Katz I. S, Gilchrest A. B, Paller S. A, Leffell J. D. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. Seventh. United States of America: McGraw-Hill Companies, Inc; 2008.
2. Mustofa A, Budiastuti A, Farida H. Prevalensi dan Faktor Resiko Terjadinya Pityriasis Versicolor pada Polisi Lalu Lintas Kota Semarang. Faculty of Medicine Diponegoro University; 2014.
3. Prabhmanju M. Herbal vs. chemical substances as antidandruff ingredients: which are more effective in the management of Dandruff? - An overview. 2009;5(2):1-8.
4. Lee J-H, Lee J-S. Chemical Composition and Antifungal Activity of Plant Essential Oils against *Malassezia furfur*. Kor J Microbiol Biotechnol. 2010;38(3):315-21.
5. Lee J-H, Lee J-S. Cytotoxicity and Anti-*Malassezia* Activity. Kor J Microbiol Biotechnol. 2011;39(4):387-9.
6. Lawal OA, Ogunwande IA, Owolabi MS, Giwa-Ajeniya AO, Kasali AA, Abudu FA, et al. Comparative Analysis of Essential Oils of *Citrus aurantifolia* Swingle and *Citrus reticulata* Blanco, From Two Different Localities of Lagos State, Nigeria. Am J Essent Oils Nat Prod [Internet]. 2014;2(2):08-12. Available from: [www.essencejournal.com](http://www.essencejournal.com)
7. Okwu DE, Emenike IN. Evaluation of The Phytonutrients and Vitamins Content of Citrus Fruits. Int J Mol Med Adv Sci. 2006;2(1):1-6.
8. Dhanavade JM, Jalkute BC, Ghosh SJ, Sonawane DK. Study Antimicrobial Activity of Lemon (*Citrus lemon* L.) Peel Extract. Br J Pharmacol Toxicol. 2011;2(3):119-22.
9. Okwu DE, Awurum AN, Okoronkwo JI. Phytochemical Composition and In Vitro Antifungal Activity Screening of Extracts from Citrus Plants against *Fusarium oxysporum* of Okra Plant (*Hibiscus esculentus*). Glob Sci Books. 2007;1(2):145-8.
10. Saravanamuthu R, Vijayakumar R, Muthukumar C, Kumar T. Characterization of *Malassezia Furfur* and its control by using plant extracts. Indian J Dermatol [Internet]. 2006;51(2):145. Available from: <http://www.e-ijd.org/text.asp?2006/51/2/145/26942>