

Antibacterial Activity of Endophyte Fungi from Moringa Leaves (*Moringa oleifera*) in Gastrointestinal Infection

Sri Seminarwati¹, Siska Nuryanti¹, Rusli¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, 90231, Indonesia.

Article info Received: 25/07/2023	ABSTRACT <i>Moringa leaves (Moringa oleifera) have potential as an antibacterial because they contain tannins, steroids, triterpenoids, flavonoids, saponins, alkaloids, where these compounds can damage bacterial cell membranes. This study aims to determine the isolates of leaf endophytic fungi (Moringa oleifera) which have antibacterial activity against digestive tract infection bacteria using the agar diffusion method. The results of the isolation of the endophytic fungi of Moringa leaves (Moringa oleifera) obtained 6 isolates which were continued with purification and macroscopic examination. The pure isolates obtained were subjected to screening tests on the test bacteria. The isolate with the IFDK-05 code as the most active isolate, were then fermented. The fermented products were then filtered to separate the supernatant and mycelia. This supernatant was then tested for antibacterial activity using agar diffusion. The results of testing the antibacterial activity of moringa leaf endophytic fungi isolate using the diffusion method in order to obtain the diameter of the inhibition zone for Escherichia coli bacteria (9,01 mm), Salmonella thypi (10,70 mm), Shigella disentryae (9,13 mm), and Vibrio cholerae (-10,95mm). Based on the results of this study, isolates of endophytic fungi of Moringa leaves (Moringa oleifera) have antibacterial activity</i>
Available online: 31/03/2024	
Corresponding Author: Sri Seminarwati Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, Indonesia email: 15020190205@umi.ac.id	
Keyword:	<i>Agar Diffusion, Antibacterial, Digestive Tract Infections, Moringa oleifera,</i>



Copyright ©2024 by Author

Journal Microbiology Science by Faculty of Pharmacy Universitas Muslim Indonesia is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi masih merupakan jenis penyakit yang paling banyak diderita oleh penduduk di negara berkembang, termasuk Indonesia. Infeksi merupakan keadaan dimana mikroorganisme seperti bakteri, virus dan jamur masuk ke dalam tubuh, berkembang biak dan menyebabkan penyakit¹. Penyakit diare merupakan salah satu penyakit infeksi saluran pencernaan yang menjadi masalah kesehatan di dunia termasuk Indonesia. Menurut WHO dan

UNICEF, terjadi sekitar 2 milyar kasus diare dan 1,9 juta anak balita meninggal karena diare di seluruh dunia setiap tahun. Penggunaan obat antibakteri untuk pengobatan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri sekarang sudah cukup banyak, namun masalah yang dihadapi sekarang adalah terjadinya efek samping bagi penggunaannya, seperti diare, alergi, hingga bahaya toksik lainnya, serta konsumsi biaya perawatan yang tinggi². Salah satu alternatif yaitu penggunaan obat

herbal dikarenakan obat herbal memiliki efek samping yang lebih sedikit dari obat sintetis³.

Daun kelor (*Moringa oleifera*) memiliki senyawa-senyawa aktif yang memiliki manfaat sebagai zat antibakteri seperti saponin, flavonoid, alkaloid dan tanin, dimana senyawa tersebut memiliki kemampuan merusak membran sel bakteri⁴. Daun kelor yang sudah banyak dikenal orang ini mengandung senyawa yang bersifat antijamur, antivirus, antidepresan, serta anti-inflamasi. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan menyatakan bahwa hasil uji aktivitas antibakteri metode difusi menunjukkan bahwa waktu inkubasi selama 10 jam menunjukkan diameter zona hambat tertinggi terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* berturut-turut sebesar 7.5 mm dan 1.8 mm. Terbentuknya zona hambat mengindikasikan adanya senyawa metabolit sekunder dari bakteri endofit daun kelor yang memiliki efek antibakteri⁵.

Daun kelor memiliki zat fitokimia yaitu tanin, steroid, triterpenoid, flavonoid, saponin, alkaloid, dan gula pereduksi. Senyawa-senyawa tersebut memiliki kemampuan sebagai obat, salah satunya antibakteri⁶. Berdasarkan hasil Penelitian menggunakan daun kelor terhadap antibakteri pernah dilakukan oleh Nasution dan Yusuf melakukan penelitian dengan ekstrak metanol daun kelor terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan variasi

konsentrasi ekstrak daun kelor 5%; 7,5%; dan 10% adalah yang terbaik dengan kategori zona hambat kuat dengan diameter 11,25 mm; 12,2 mm; dan 12,25 mm⁷.

Beberapa penelitian di atas menunjukkan bahwa daun kelor dapat digunakan sebagai antibakteri terhadap berbagai bakteri penyebab infeksi saluran pencernaan, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri endofit dari daun kelor dan menguji aktivitas antibakterinya. Maka dilakukan uji aktivitas antibakteri isolat fungi daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap bakteri penyebab infeksi saluran pencernaan dengan menggunakan metode Difusi Agar.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan yang digunakan

Alat yang digunakan adalah autoklaf (All American Model 25x- 2^o), disc blank, ose bulat, gelas Erlenmeyer, rotary shaker, cawan petri (Normax) , spektrofotometer, oven (Memmert^o), lampu spiritus, inkubator (Memmert^o), tabung reaksi, timbangan analitik (Chyco^o).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest steril, etanol 70%, Medium *Nutrient Agar*, medium *Maltosa Yeast Broth* (MYB), etil asetat, NaCl fisiologis 0,9%, *Potato Dextrosa Agar* (PDA), air, natrium hipoklorit (NaOCl) 5,25%, bakteri uji *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, *Shigella disentryae*, *Vibrio cholerae*, dan sampel daun kelor (*Moringa oleifera*).

Pengambilan dan penyiapan sampel

Pada pengambilan sampel ini, dilakukan pemisahan pada bagian daun dan tangkainya. Sampel daun kelor yang diambil adalah yang masih segar tidak cacat atau rusak yang disebabkan oleh hama atau penyakit.

Sampel daun kelor (*Moringa oleifera*) dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel dan dipotong 1 cm. Sterilisasi permukaan dilakukan dengan cara direndam dalam etanol 70% selama 30 detik kemudian direndam dalam larutan natrium hipoklorit (NaOCl) 5,25% selama 30 detik. Sampel daun dibilas dengan air suling steril sebanyak 3 kali kemudian dikeringkan⁸.

Isolasi fungi endofit

Sampel daun kelor (*Moringa oleifera*) dipotong 1 cm. Potongan sampel yang telah kering ditanam pada media PDAC dan diinkubasi pada suhu kamar (25°C) selama 7 hari⁸.

Pemurnian kultur fungi endofit

Fungi yang telah tumbuh diambil menggunakan ose bulat dan dipindahkan ke medium *Potato Dextrosa Agar* (PDA) yang baru. Kemudian diinkubasi pada suhu 25 °C selama 3 hari⁹. Fungi yang telah tumbuh diambil menggunakan ose bulat dan dipindahkan ke medium *Potato Dextrosa Agar* (PDA) yang baru kemudian diinkubasi pada suhu 25 °C selama 3 hari⁹.

Pemeriksaan makroskopik

Pengamatan secara makroskopis meliputi permukaan koloni, bentuk koloni, tepi dan sudut elevasinya¹⁰. Jamur endofit yang telah diinkubasi kemudian diidentifikasi berdasarkan ciri-ciri makroskopik secara langsung langsung dengan melihat bentuk dan warna koloni jamur endofit⁸.

Pembuatan stok dan suspensi bakteri uji

Bakteri uji masing-masing diambil satu ose lalu diinokulasikan dengan cara digoreskan pada medium *Nutrient Agar* (NA) miring lalu linkubasi pada suhu 37 °C selama 1x24 jam. Setelah itu dapat digunakan sebagai bakteri uji¹¹.

Bakteri uji hasil peremajaan disuspensikan menggunakan larutan NaCl fisiologis 0,9% kemudian diukur kekeruhannya menggunakan spektrofotometer hingga diperoleh trasmittansi kekeruhan 25%. Pada panjang gelombang 580 nm menggunakan bakteri uji¹¹.

Uji skrining isolat fungi

Isolat murni fungi endofit diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi medium *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 15 ml yang masing-masing telah diinokulasikan dengan bakteri uji dimana isolat tersebut diletakkan di atas permukaan medium. Kemudian diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37 °C lalu diamati zona hambat yang terbentuk¹².

Fermentasi isolat aktif

Isolat yang memiliki zona hambat paling besar pada uji skrining selanjutnya akan difermentasi pada medium *Maltosa Yeast Broth* (MYB). Isolat aktif kemudian diambil dengan menggunakan ose bulat dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 200 mL medium cair *Maltosa Yeast Broth* (MYB), selanjutnya dilakukan fermentasi menggunakan rotary shaker dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 25 °C selama 14 hari. Fermentat yang diperoleh diekstraksi dengan menggunakan pelarut etil asetat hingga diperoleh ekstrak etil asetat¹³.

Uji aktivitas antibakteri isolat fungi daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan metode Difusi Agar

Medium *Nutrien Agar* yang telah di panaskan dan di sterilkan kemudian didinginkan hingga suhu 40-50°C, tuang secara aseptis ke dalam masing- masing cawan petri sebanyak 7 ml dibiarkan hingga memadat. Cawan petri menjadi tiga bagian lalu dimasukkan pencadang ditengah-tengah cawan petri. Kemudian dimasukkan

3 mL medium ke dalam vial steril dan ditambahkan 1 ose suspensi bakteri, homogenkan dan dimasukkan kedalam cawan petri, dibiarkan memadat. Selanjutnya diangkat pencadang dan dimasukkan masing-masing sampel sebanyak 0,5 mL. Diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C dan diamati zona hambat yang terbentuk¹⁴.

HASIL DAN PEMBAHASAN



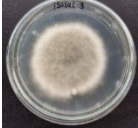



Pada penelitian ini digunakan isolat fungi endofit daun kelor (*Moringa oleifera*) yang bertujuan untuk menentukan aktivitas antibakteri isolat fungi endofit daun kelor terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, *Shigella disentryae*, dan *Vibrio cholerae*.

Penelitian ini diawali dengan mengisolasi fungi endofit daun kelor, isolasi tujuannya untuk memisahkan suatu mikroorganisme dari lingkungannya sehingga diperoleh kultur murni atau biakan murni. Di inokulasi pada Medium *Potato Dextrosa Agar + chloramfenicol* (PDAC), PDA (*Potato Dextrosa Agar*) memiliki

Tabel 1. Hasil isolasi isolate fungi endofit daun kelor (*Moringa oleifera*).

No	Kode isolate	Keterangan
1	IFDK 1	Isolat fungi endofit daun kelor ke-1
2	IFDK 2	Isolat fungi endofit daun kelor ke-2
3	IFDK 3	Isolat fungi endofit daun kelor ke-3
4	IFDK 4	Isolat fungi endofit daun kelor ke-4
5	IFDK 5	Isolat fungi endofit daun kelor ke-5
6	IFDK 6	Isolat fungi endofit daun kelor ke-6

Tabel 2. Hasil Pengamatan makroskopik isolat fungi endofit pada daun kelor (*Moringa oleifera*)

Kode fungi	Warna	Foto fungi	Bentuk	Tepi	Elevasi
IFDK 1	Hijau putih		<i>L-Form</i>	<i>Smooth</i>	<i>Convex</i>
IFDK 2	Hitam putih		<i>L-Form</i>	<i>Smooth</i>	<i>Convex</i>
IFDK 3	Putih abu-abu		<i>Filliform</i>	<i>Wavy</i>	<i>Hilly</i>
IFDK 4	Orange putih		<i>Round with raised margin</i>	<i>Wavy</i>	<i>Raised</i>
IFDK 5	Putih kuning coklat		<i>Round</i>	<i>Smooth</i>	<i>Umbonate</i>
IFDK 6	Putih cream kuning		<i>concentric</i>	<i>Smooth</i>	<i>Raised</i>

sumber karbohidrat, dan dextrosa sebagai sumber karbon untuk menunjang pertumbuhan jamur endofit¹⁵, Sedangkan *chlorampenikol* antibiotik dengan spektrum luas yang dapat menghambat atau membunuh pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif¹⁶. Selanjutnya di inkubasi pada suhu ruang 25° selama 3 hari, setelah itu akan terlihat pertumbuhan jamur disekitar daun. Hasil isolasi fungi endofit daun kelor (*Moringa oleifera*) diperoleh 6 koloni fungi endofit dengan pencirian yang berbeda, dapat dilihat pada tabel 1.

Kemudian dilakukan pemurnian, yang bertujuan untuk memisahkan hasil inokulasi yang terdiri dari banyak koloni sehingga

didapatkan koloni murni yang selanjutnya dilakukan pengujian makroskopik untuk dilihat morfologinya yaitu bentuk, tepi, warna, elevasi dan permukaan koloni yang dapat dilihat pada tabel 2.

Kemudian dilakukan uji skrining yang bertujuan untuk melihat seberapa besar kemampuan fungi endofit dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengamati zona bening pada daerah sekitar isolat yang telah ditanam pada medium. Adapun bakteri uji yang digunakan yaitu bakteri penyebab infeksi saluran pencernaan diantaranya *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, *Shigella disentryae*, *Vibrio*.

Tabel 3. Hasil uji skrining dan pengukuran zona hambat isolat fungi endofit daun kelor (*Moringa oleifera*)

No	Isolat fungi endofit	Diameter zona hambat (mm)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. thypi</i>	<i>S. disentryae</i>	<i>V. cholerae</i>
1	IFDK 1	0	0	0	0
2	IFDK 2	8,94	8,99	9,12	8,12
3	IFDK 3	0	0	9,54	8,20
4	IFDK 4	0	0	0	0
5	IFDK 5	20,47	20,40	16,17	18,25
6	IFDK 6	0	0	0	0

Hasil dari uji skrining dapat dilihat pada tabel 3.

Dari hasil uji skrining di dapatkan hasil pada isolat dengan kode IFDK 5 yang memiliki zona bening yang paling besar diantara ke-enam isolat tersebut dengan diameter zona hambat terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, *Shigella disentryae*, dan *Vibrio cholerae* masing-masing sebesar 20,47 mm; 20,40 mm; 16,17 mm dan 18,25 mm yang kekuatan antibakterinya dikategorikan sangat kuat. Dimana menurut Susanto dkk, (2012) mengategorikan diameter zona hambat kategori lemah memiliki diameter zona hambat ≥ 5 mm, kategori sedang memiliki diameter zona hambat sekitar antara 6-10 mm, diameter zona hambat yang kuat

sekitar antara 11-20 mm, dan diameter zona hambat >20 mm dikategorikan sangat kuat¹⁷.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri fermentat isolat fungi endofit daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan metode difusi agar terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, *Shigella disentryae*, dan *Vibrio cholerae* memiliki zona hambatan yang berbeda-beda. Zona hambat merupakan zona bening yang terbentuk disekitar disk yang mengindikasikan tidak adanya pertumbuhan bakteri¹⁹. Zona hambat terbentuk akibat dari sampel uji yang digunakan diserap oleh disk blank lalu disk blank yang ditempelkan ke medium berdifusi pada medium sehingga menghasilkan zona hambat. Hasil uji

Tabel 4. Hasil uji aktivitas antibakteri isolat fungi endofit daun kelor (*Moringa oleifera*).

Isolat fungi endofit	Diameter zona hambat (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. thypi</i>	<i>S. disentryae</i>	<i>V. cholerae</i>
IFDK 5	9,01	10,70	9,13	10,95

aktivitas dengan metode difusi agar dapat dilihat pada tabel 4.

Berdasarkan pada tabel 4. bahwa IFDK 5 dapat memberikan aktivitas antibakteri pada semua bakteri uji *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, *Shigella disentryae*, dan *Vibrio cholerae* yang ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar disk blank. Pengukuran diameter zona bening dilakukan sebanyak tiga kali replikasi pada setiap bakteri uji kemudian dirata-ratakan. Pada bakteri *Escherichia coli* zona hambat yang terbentuk 9,01 mm, pada bakteri *Salmonella thypi* zona hambat yang terbentuk yaitu 10,70 mm, pada bakteri *Shigella disentryae* zona hambat yang terbentuk yaitu 9,13 mm dan pada bakteri *Vibrio cholerae* zona hambat yang terbentuk yaitu 10,95 mm.

Menurut Susanto *et al.*, (2012) mengategorikan diameter zona hambat kategori lemah memiliki diameter zona hambat ≥ 5 mm, kategori sedang memiliki diameter zona hambat sekitar antara 6-10 mm, dan diameter zona hambat yang kuat sekitar antara 11-20 mm, diameter zona hambat >20 mm dikategorikan sangat kuat. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diperoleh bahwa isolat dengan kode IFDK 5 fermentat isolat fungi endofit daun kelor (*Moringa oleifera*) memiliki aktivitas terhadap bakteri uji *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, *Shigella disentryae*, dan *Vibrio cholerae* dan memiliki potensi sedang

sebagai antibakteri dengan diameter zona hambat berkisar 6-10 mm¹⁷.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa:

Hasil isolasi fungi endofit daun kelor (*Moringa oleifera*) diperoleh 6 isolat dan isolat yang memiliki aktivitas antibakteri paling besar adalah isolat dengan kode IFDK 5 memiliki potensi sedang sebagai antibakteri dengan diameter zona hambat berkisar 6-10 mm.

Isolat fungi endofit daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan kode IFDK 5 memberikan aktivitas sebagai antibakteri dengan ukuran diameter zona hambat terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, *Shigella disentryae*, dan *Vibrio cholerae* masing-masing sebesar 9,01 mm; 10,70 mm; 9,13 mm dan 10,95 mm yang kekuatan antibakterinya dikategorikan sedang sebagai antibakteri dengan diameter zona hambat berkisar 6-10 mm.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sugiharti rizky juwita, Halimah L, Mahendra I, et al. Evaluasi Spesifisitas Radiofarmaka 99mTc-Ketokonazol pada Infeksi yang disebabkan oleh *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *J Sains dan Teknol Nukl Indones* 17 2016; 17: 71–82.
2. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. 26th ed. Philadelphia: McGraw-Hill Company Inc, 2013.

3. Hanuatami B, Budiman A. Review Artikel: Penggunaan Teknologi Nano pada Formulasi Obat Herbal. *Farmaka* 2017; 15: 29–41.
4. Widiani PI, Pinatih KJP. Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). *Med Udayana* 2020; 9: 22–28.
5. Sadikin NAN, Bintari SH, Widiatningrum T, et al. Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Aktivitas Antibakteri dari Bakteri Endofit Daun Kelor (*Moringa oleifera*). *Life Sci* 2021; 10: 109–119.
6. Agustie AWD, Samsumaharto RA. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Maserasi Daun Kelor (*Moringa oleifera*, Lamk) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *J Biomedika* 2013; 6: 1–6.
7. Nasution, Yusuf R. Uji Aktivitas Antibakteri *Staphylococcus epidermis* Sediaan Salep Ekstrak Metanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Terhadap Penyembuhan Luka Sayat pada Mencit.
8. Kursia S, Aksa R, Nolo MM. Potensi Antibakteri Isolat Jamur Endofit dari Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.). *Pharmauho J Farm Sains, dan Kesehat* 2018; 4: 30–33.
9. Elviasari J, Rusli R, Ramadhan A M. Isolasi Jamur Endofit Daun Beluntas (*Pluchea indica* (L.) LESS) Jessie. *J sains dan Kesehat*; 1.
10. Widowati T, Bustanussalam, Sukiman H, et al. Isolasi Dan Identifikasi Kapang Endofit dari Tanaman Kunyit (*Curcuma longa* L.) Sebagai Penghasil Antioksidan. *Biopropal Ind* 2016; 7: 9–16.
11. Deponda RA, Fitriana, Nuryanti S, et al. Isolasi Fungi Endofit Kulit Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) yang Berpotensi Sebagai Antibakteri Secara Metode Klt - Bioautografi. *J Ilm As-Syifaa* 2019; 11: 147–153.
12. Pratiwi RE. Uji Aktivitas Antibakteri Fermentat Isolat Daun Iler (*Coleus atropurpureus* L. Benth). *CV Jakad Media Publ.*
13. Istiqamah AN. Aktivitas Antibakteri Fermentat Isolat Fungi Endofit pada Daun Kedondong (*Spondias dulcis*) Terhadap Bakteri *Burkholderia pseudomallei* Secara Klt- Biautografi. Universitas Muslim Indonesia, 2015.
14. Mansyur S. Uji Aktivitas Antimikroba Madu Asli Asal Bima Provinsi Nusa Tenggara Barat Terhadap Beberapa Mikroba Uji Secara Difusi Agar. Universitas Muslim Indonesia, 2014.
15. Fitriana & Nursithya E. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Isolat Fungi Endofit dari Akar Mangrove (*Rhizophora apiculata* Blume) secara Klt-Biautografi. *J As-syifaa* 2017; 27–36.
16. Asnita A, Herwin H, Kosman R and, et al. Isolasi dan Identifikasi Fungi Endofit Batang (*Euphorbia antiquorum* L.) Sebagai Penghasil Antibakteri dengan Metode Klt-Bioautografi. *J Ilm As-Syifaa* 2020; 12: 144–149.
17. Susanto dkk. Studi Kandungan Bahan Aktif Tumbuhan Meranti Merah (*Shorea leprosula* Miq) Sebagai Sumber Senyawa Antibakteri. *Mulawarmnan Sci* 2012; 181–190.
18. Hung AJ, Stanbury MG, Shanabrough M, et al. *Estrogen, Synaptic Plasticity and Hypothalamic Reproductive Aging. Exp Gerontol* 2003; 38: 53–59.
19. Utomo SB, Fujiyanti M, Lestari WP, et al. Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa C-4-Metoksifenilkaliks [4] Resorsinarena Termodifikasi Hexadecyltrimethylammonium-Bromide Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia*

coli. *JKPK (Jurnal Kim dan Pendidik Kim*
2018; 3: 201–209.