



STANDARISASI EKSTRAK ETIL ASETAT KAYU SANREGO (*Lunasia amara* Blanco)

Syariful Anam¹, Muhammad Yusran¹, Alfred Trisakti¹, Nurlina Ibrahim¹,
Ahmad Khumaidi¹, Ramadani², Muhammad Sulaiman Zubair^{1*}

¹ Program Studi Farmasi, Universitas Tadulako, Palu, Sulawesi Tengah, Indonesia

² Jurusan Biologi, Universitas Tadulako, Palu, Sulawesi Tengah, Indonesia

ABSTRACT

Lunasia amara Blanco is a popular medicinal plant which is known as aphrodisiac in South Sulawesi Province. Biological activity as antibacterial, anticancer dan antituberculosis were also scientifically reported. This study is to ascertain the safety and quality of the plant extract by standardization procedures mentioned in literature, including specific and non-specific parameters. The result showed that ethyl acetate wood extract of *L. amara* Blanco, which is brown viscous extract, astringent to the taste and characteristic odor, contain water-soluble extractive matters of $23,95 \pm 2,192$ %, ethanol-soluble extractive matters of $67,05 \pm 3,61$ %, water content of $5,33 \pm 0,407$ %, total ash content of $0,65 \pm 0,199$ %, acid-insoluble ash content of $0,58 \pm 0,225$ %, density of $0,7734 \pm 0,0016$ (5%) and $0,7957 \pm 0,0021$ (10%), total contaminant number of bacteria and fungus of each $< 1 \times 10^4$ colony/g, and Pb concentration of $10,59 \pm 0,239$ mg/kg. Ethyl acetate wood extract of *L. amara* Blanco has been qualified as standardized extract. Therefore, this study can be a reference for identification and control quality of the extract as a herb-medicine material

Key words : Sanrego, *Lunasia amara*, Standardization, Specific Parameter, Non Spesific Parameter

ABSTRAK

Kayu sanrego (*Lunasia amara* Blanco) telah dikenal penggunaannya sebagai jamu obat kuat lelaki di daerah Sulawesi Selatan. Selain itu, tanaman ini juga dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri, antikanker dan antituberculosis. Untuk dapat digunakan sebagai bahan aktif sediaan obat, perlu dilakukan standarisasi ekstrak untuk menjamin mutu dan keamanannya. Standarisasi ekstrak etil asetat kayu Sanrego (*L. amara* Blanco) telah dilakukan sesuai dengan metode standarisasi dari literatur, yang meliputi penentuan parameter spesifik dan non spesifik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat dengan karakteristik berupa ekstrak kental berwarna coklat tua, rasa sepat dan berbau khas, mengandung kadar senyawa yang larut dalam air sebesar $23,95 \pm 2,192$ %, kadar senyawa yang larut dalam etanol sebesar $67,05 \pm 3,61$ %, kadar air sebesar $5,33 \pm 0,407$ %, kadar abu sebesar $0,65 \pm 0,199$ %, kadar abu tidak larut asam sebesar $0,58 \pm 0,225$ %, berat jenis ekstrak sebesar $0,7734 \pm 0,0016$ (5%) dan $0,7957 \pm 0,0021$ (10%), total cemaran bakteri dan kapang masing-masing $< 1 \times 10^4$ koloni/g dan kadar logam timbal (Pb) sebesar $10,59 \pm 0,239$ mg/kg. Ekstrak etil asetat kayu sanrego telah memenuhi syarat sebagai ekstrak terstandar sehingga diharapkan dapat menjadi acuan dalam identifikasi dan kontrol kualitas ekstrak dalam penggunaannya sebagai bahan obat.

Kata kunci : Sanrego, *Lunasia amara*, Standarisasi, Parameter Spesifik, Parameter Non Spesifik

I. LATAR BELAKANG

Di Indonesia terdapat lebih dari 30.000 jenis tumbuhan dan lebih dari 1000 jenis tumbuhan obat yang telah dimanfaatkan dalam industri obat tradisional. Tumbuhan obat Indonesia telah semakin banyak dimanfaatkan baik sebagai obat tradisional Indonesia (jamu), obat herbal terstandar ataupun fitofarmaka. Berbagai penelitian dan pengembangan yang memanfaatkan kemajuan teknologi juga dilakukan sebagai upaya peningkatan mutu dan keamanan produk yang diharapkan dapat lebih meningkatkan kepercayaan terhadap manfaat obat bahan alam tersebut. Obat tradisional dibuat dalam bentuk ekstrak karena tanaman obat tidak lagi praktis jika digunakan dalam bentuk bahan utuh (simplesia). Ekstrak tersebut bisa dalam bentuk ekstrak kering, ekstrak kental dan ekstrak cair yang proses pembuatannya disesuaikan dengan bahan aktif yang dikandung serta maksud penggunaannya, apakah dibuat menjadi sediaan dalam bentuk kapsul, tablet, cairan obat dalam, pil, dan lain-lain. Ekstrak tersebut harus pula terstandarisasi untuk menjamin mutu dan keamanannya (Hariyati dkk, 2005).

Kayu sanrego (*Lunasia amara* Blanco) merupakan tanaman yang populer di Sulawesi Selatan sebagai afrodisiaka atau

obat kuat lelaki. Arnida dkk (2008) telah melaporkan aktivitas afrodisiaka dari ekstrak etil asetat Kayu sanrego. Selain itu, kayu sanrego juga telah diteliti memiliki aktivitas farmakologis yang lain seperti antibakteri dan antikanker (Prescott *et al.*, 2007) serta antituberculosis (Aguinaldo *et al.*, 2007; Macabeo and Aguinaldo, 2008). Agar khasiat dan kualitas ekstrak etil asetat kayu sanrego ini dapat terjamin, maka perlu dipenuhi suatu standar mutu produk/bahan ekstrak dengan melakukan standarisasi ekstrak. Standarisasi dilakukan agar dapat diperoleh bahan baku yang seragam yang akhirnya dapat menjamin efek farmakologi tanaman tersebut. Standardisasi merupakan proses penjaminan produk akhir (simplesia, ekstrak atau produk herbal) agar mempunyai nilai parameter tertentu yang konstan dan ditetapkan terlebih dahulu (Helmi dkk, 2006). Dari hasil penelusuran pustaka, belum ditemukan adanya laporan mengenai standarisasi ekstrak etil asetat kayu sanrego (*L. amara* Blanco), sehingga penelitian ini bertujuan untuk menentukan parameter standarisasi ekstrak etil asetat kayu sanrego yang meliputi parameter spesifik dan non spesifik

II. BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan Tanaman

Bahan tanaman (kayu sanrego) diambil dari desa Siawung, kabupaten Barru, Sulawesi Selatan pada bulan Juli 2013. Tanaman telah dideterminasi oleh Yayasan Keragaman Hayati Sulawesi (KHAS), Makassar, Indonesia

2.2 Bahan Kimia

Metanol (Merck), n-heksana (Merck), etil asetat (Merck), kloroform (Merck), Nutrien Agar (Merck), Potato Dextrose agar (PDA), H₂SO₄ pekat, HCl, HNO₃, dan HClO₄ (Merck), Etanol (Merck), dan Aquadest

2.3 Alat

Seperangkat alat ekstraksi refluks, rotary evaporator, neraca analitik, oven, tanur, krus silikat, cawan petri, cawan penguap, autoklaf, penangas air, desikator, inkubator, coloni counter, dan Spektrofotometer serapan atom (SSA)

2.4 Pembuatan ekstrak etil asetat

Kayu sanrego dibersihkan dan dikeringkan di bawah sinar matahari tidak langsung. Selanjutnya, kayu dipisahkan dari kulitnya dan dipotong kecil-kecil. Batang kayu lalu diekstraksi secara refluks dengan n-heksan selama 4 jam. Setelah filtrat disaring, residu kemudian dikeringkan beberapa saat. Residu kemudian diekstraksi kembali dengan etil asetat selama 4 jam. Proses ini diulangi sebanyak 2 kali. Filtrat dikumpulkan lalu diuapkan dengan evaporator hingga diperoleh ekstrak etil asetat kental. Penguapan selanjutnya dilakukan dalam

freeze drier untuk memastikan seluruh pelarut telah menguap maksimal. Ekstrak siap sebagai sampel untuk distandarisasi

2.5 Standarisasi Ekstrak (Departemen Kesehatan RI, 2000)

Penentuan parameter non spesifik

1. Penentuan kadar air

Sejumlah 0,1 g ekstrak ditimbang dalam krus porselen bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105⁰C selama 30 menit dan telah ditera. Diratakan dengan menggoyangkan hingga merupakan lapisan setebal 10 – 15 mm dan dikeringkan pada suhu penetapan hingga bobot tetap, tutupnya dibuka, dibiarkan krus dalam keadaan tertutup dan mendingin dalam desikator hingga suhu kamar, kemudian dicatat bobot tetap yang diperoleh untuk menghitung persentase susut pengeringannya

$$\text{Kadar Air} = \frac{\text{Berat sebelum pengeringan} - \text{Berat akhir}}{\text{Berat sebelum pengeringan}} \times 100\%$$

2. Penentuan kadar abu

Sejumlah 0,2 g ekstrak ditimbang dengan seksama dalam krus yang telah ditera, dipijarkan perlahan-lahan. Kemudian suhu dinaikkan secara bertahap hingga 600 ± 25⁰C sampai bebas karbon, selanjutnya didinginkan dalam desikator, serta ditimbang berat abu. Kadar abu dihitung dalam persen berat sampel awal. Abu

Standarisasi Ekstrak Etil Asetat Kayu Sanrego (*Lunasia amara Blanco*)
(Syariful Anam *et al.*)

yang diperoleh dari penetapan kadar abu, kemudian dididihkan dengan 25 ml asam klorida encer P selama 5 menit, bagian yang tidak larut asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, disaring dan ditimbang, ditentukan kadar abu yang tidak larut asam dalam persen terhadap berat sampel awal.

$$\text{Kadar Abu} = \frac{\text{Berat awal} - \text{Berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

3. Penentuan total bakteri dan total kapang

a. Penentuan total bakteri

Sejumlah 1 ml ekstrak dari pengenceran 10^{-4} dipipet dengan pipet steril, kemudian ditanamkan dalam medium NA, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian diamati dan dihitung jumlah koloni yang tumbuh dan dikalikan dengan faktor pengenceran. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

b. Penentuan total kapang

Sejumlah 1 ml ekstrak dari pengenceran 10^{-4} dipipet dengan pipet steril, kemudian ditanam dalam medium PDA, lalu diinkubasi pada suhu 25°C selama tiga hari. Kemudian diamati dan dihitung jumlah koloni yang tumbuh dan dikalikan dengan faktor pengenceran. Dilakukan replikasi sebanyak tiga kali.

4. Penentuan batas logam berat

Penentuan batas logam Pb di dalam ekstrak dilakukan secara destruksi basah

ekstrak dengan asam nitrat dan hydrogen peroksida, kadar Pb ditentukan dengan spektrofotometri serapan atom. Ditimbang teliti 0,799 g timbal nitrat $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ kemudian dilarutkan ke dalam labu ukur 500 ml dengan air suling, dicukupkan volumenya. Dibuat beberapa konsentrasi 1, 2, 4, 8, dan 10 ppm. Ditimbang teliti 45 mg sampel ekstrak kemudian dimasukkan ke dalam labu kjeldahl, ditambahkan 5 ml HNO_3 p.a. dan 1 ml HClO_4 p.a. lalu didestruksi pada suhu 200°C sampai diperoleh larutan jernih, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml, dicukupkan volumenya. Kadar logam Pb diukur menggunakan AAS pada λ 217 nm.

5. Penentuan bobot jenis

Bobot jenis ekstrak ditentukan terhadap hasil pengenceran ekstrak 5% dan 10% dalam pelarut etanol dengan alat piknometer. Digunakan piknometer bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25°C . Suhu diatur hingga ekstrak cair lebih kurang 20°C , lalu dimasukkan ke dalam piknometer. Diatur suhu piknometer yang telah diisi hingga suhu 25°C , kelebihan ekstrak cair dibuang dan ditimbang. Kurangkan bobot piknometer kosong dari bobot piknometer

yang telah diisi. Bobot jenis ekstrak cair adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air, dalam piknometer pada suhu 25°C

$$\text{Bobot jenis} = \frac{\text{Bobot pikno sampel} - \text{bobot pikno kosong}}{\text{Bobot pikno air} - \text{bobot pikno kosong}}$$

Penentuan parameter spesifik

1. Pemeriksaan organoleptik, meliputi bentuk, warna, rasa dan bau. Pegujian ini dilakukan dengan menggunakan panca indera langsung.
2. Penetapan kadar senyawa terlarut dalam pelarut tertentu.
 - a. Kadar senyawa yang larut dalam air.

Sejumlah 0,5 g ekstrak disari selama 24 jam dengan 10 ml air-kloroform LP, menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam, kemudian disaring. Diuapkan 2 ml filtrat hingga kering dalam cawan penguap, residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Dihitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air terhadap berat ekstrak awal.

- b. Kadar senyawa yang larut dalam etanol

Sejumlah 0,5 g ekstrak dimaserasi selama 24 jam dengan 10 ml etanol 95% menggunakan labu bersumbat sambil

berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Disaring cepat dengan menghindari penguapan etanol, kemudian diuapkan 2ml filtrat hingga kering dalam cawan penguap yang telah ditera, residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Dihitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol terhadap berat ekstrak awal.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, digunakan sampel kayu Sanrego (*L. amara* Blanco). Setelah kayu dibersihkan dan kulit kayunya dipisahkan, maka kayu dikeringkan-anginkan untuk mengurangi kadar air. Setelah itu, kayu dipotong kecil-kecil dengan tujuan untuk menambah luas permukaan sampel sehingga ketika diekstraksi, maka pelarut dapat terabsorpsi maksimal ke dalam kayu, sehingga hasil ekstraksi dapat optimal. Pada proses ekstraksi dilakukan dengan metode refluks karena tekstur kayu yang keras. Pelarut ekstraksi digunakan pelarut n-heksana dan etil asetat secara berturut-turut. Pelarut n-heksana digunakan pertama kali karena bersifat kurang polar dibandingkan etil asetat, sehingga dengan ekstraksi n-heksana terlebih dahulu maka akan menarik komponen kimia yang bersifat kurang polar, seperti lipid, lilin, dll. Setelah itu, residu kayu hasil ekstraksi n heksana dikeringkan beberapa menit lalu dilanjutkan dengan ekstraksi menggunakan etil asetat untuk menarik

komponen kimia yang bersifat lebih polar. Dari hasil ekstraksi kayu sanrego sebanyak 2,6 kg, diperoleh ekstrak n-heksana sebesar 2,04 g dan ekstrak etil asetat sebesar 4,06 g (0,15% dihitung terhadap berat awal).

Ekstrak etil asetat diperoleh setelah dilakukan penguapan pelarut dengan menggunakan rotary evaporator. Untuk memastikan seluruh pelarut telah menguap, maka ekstrak dikering-bekukan dalam *freeze drier*. Selanjutnya dilakukan pengujian standarisasi ekstrak etil asetat. Hasil pengujian standarisasi ekstrak etil asetat Kayu Sanrego (*Lunasia amara Blanco*) dapat dilihat pada tabel 1.

Kadar senyawa yang larut dalam air dan dalam etanol adalah masing-masing sebesar $23,95 \pm 2,192$ dan $67,05 \pm 3,61$. Hal ini berarti ekstrak lebih banyak terlarut didalam etanol daripada di dalam air. Kadar zat terlarut ini merupakan uji kemurnian ekstrak untuk mengetahui jumlah terendah kandungan kimia ekstrak yang terlarut dalam pelarut tertentu.

Kadar air dalam ekstrak sebesar $5,33 \pm 0,407$. Hasil ini telah sesuai dengan persyaratan dimana kadar air untuk ekstrak kental adalah antara 5 – 30%. Hal ini bertujuan untuk menghindari cepatnya

| Parameter | Nilai |
|----------------------------|--|
| Parameter spesifik : | |
| Organoleptik | kental, warna coklat, rasa sepat, bau khas |
| Kadar senyawa larut air | $23,95 \pm 2,192 \%$ |
| Kadar senyawa larut etanol | $67,05 \pm 3,61 \%$ |
| Parameter non-spesifik : | |
| Kadar air | $5,33 \pm 0,407 \%$ |
| Kadar abu | $0,65 \pm 0,199 \%$ |
| Kadar abu larut asam | $0,58 \pm 0,225 \%$ |
| Total cemaran bakteri | $< 1 \times 10^4$ |
| Total cemaran kapang | $< 1 \times 10^4$ |
| Bobot jenis | $0,7734 \pm 0,0016 (5\%)$ |
| | $0,7957 \pm 0,0021 (10\%)$ |
| Kadar logam berat | $10,59 \pm 0,239 \text{ mg/kg}$ |

Tabel 1. Hasil standarisasi ekstrak etil asetat Kayu Sanrego

Pada pemeriksaan organoleptik ekstrak, meliputi bentuk, bau, warna dan rasa, diperoleh hasil bahwa ekstrak berkonsistensi kental, berwarna coklat, berbau khas dan berasa sepat. Rasa sepat dari ekstrak disebabkan dari kadar alkaloid yang terdapat di dalam ekstrak.

pertumbuhan jamur dalam ekstrak (Saifuddin dkk, 2011).

Penentuan kadar abu bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal. Ekstrak dipanaskan pada suhu tinggi hingga senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap

hingga tersisa unsur mineral dan unsur anorganik saja. Diperoleh kadar abu dalam ekstrak sebesar $0,65 \pm 0,199$ %, sedangkan kadar abu tidak larut asam diperoleh sebesar $0,58 \pm 0,225$ %. Hal ini menunjukkan bahwa sisa unsur mineral dan anorganik dalam ekstrak sebesar $0,65 \pm 0,199$ %, dan unsur tersebut tidak larut dalam asam sebesar $0,58 \pm 0,225$ % (Helmi dkk, 2006).

Penentuan bobot jenis ditentukan dengan menggunakan piknometer. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak yang telah diencerkan dengan etanol 96% hingga menjadi konsentrasi 5% dan 10%. Ekstrak 5% memiliki bobot jenis sebesar $0,7734 \pm 0,0016$, sedangkan ekstrak 10% memiliki bobot jenis sebesar $0,7957 \pm 0,0021$. Hal ini menggambarkan besarnya massa per satuan volume untuk memberikan batasan antara ekstrak kental dan ekstrak cair. Bobot jenis juga berkaitan dengan kontaminasi dan kemurnian ekstrak (Departemen Kesehatan RI, 2000)

Pengujian cemaran bakteri dan kapang merupakan saah satu uji untuk kemurnian ekstrak. Uji ini mencakup penentuan jumlah mikroorganisme yang diperbolehkan dan untuk menunjukkan tidak adanya adanya bakteri atau kapang tertentu di dalam ekstrak. Hasil penelitian menunjukkan cemaran bakteri dan kapang dalam ekstrak

masing-masing $< 1 \times 10^4$ koloni/gram. Hasil ini memenuhi persyaratan batasan maksimum mikroba dalam makanan menurut SK Dirjen POM No. 03726/B/SK/VII/89 yaitu batas maksimum sebesar 10^6 koloni/gram. Tidak ditemukan pula pada biakan dalam medium PDA ciri mikroskopis biakan *Aspergillus flavus*, koloni yang tumbuh dengan karakteristik berwarna kuning muda dan hifa tidak bersekat, sehingga penentuan angka aflatoksin tidak dilanjutkan. Aflatoksin merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan jamur yang dapat menyebabkan toksigenik, mutagenik, teratogenik dan karsinogenik (Helmi dkk, 2006).

Pemeriksaan kadar logam berat (Pb) pada ekstrak bertujuan untuk menjamin bahwa ekstrak tidak mengandung logam berbahaya timbal melebihi batas yang ditetapkan karena dapat bersifat toksik pada tubuh manusia. Pada pengujian ini dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometri serapan atom (SSA) karena memiliki batas seleksi rendah dan lebih selektif dalam menentukan kadar logam dalam suatu sampel. Hasil penelitian menunjukkan kandungan logam Pb dalam ekstrak etil asetat kayu sanrego sebesar $10,59 \pm 0,239$ mg/kg. Hasil ini telah memenuhi persyaratan batas maksimum

cemaran logam timbal pada rempah-rempah sesuai SK Dirjen POM No.03725/B/SK/VII/89 yang menyatakan bahwa batas maksimum cemaran logam sebesar atau sama dengan 10 mg/kg (Helmi dkk, 2006, Haryani dkk, 2013).

Ekstrak etil asetat kayu sanrego (*Lunasia amara* Blanco) telah memenuhi persyaratan standarisasi yang meliputi parameter spesifik dan non spesifik sebagai bahan baku obat

IV. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada DP2M DIKTI yang telah membiayai penelitian ini melalui skema Hibah Bersaing Tahun 2012 dengan nomor kontrak 2851/UN28/DT/2013.

V. DAFTAR PUSTAKA

Arnida, Imono AD, Subagus W., (2003), Isolasi fraksi aktif afrodisiaka dari kayu Sanrego (*Lunasia amara* Blanco), *Majalah Farmasi Indonesian*, 14(4): 195-200

Aguinaldo A.M., Dalangin M.V., Macabeo A.P.G., Abe F, Yamauchi T, Franzblau S, & Byrne L.T., (2007), *Quinoline alkaloids from Lunasia amara inhibit Mycobacterium tuberculosis H37Rv in vitro*, *Int. J. Antimicrob Agents*, 29(6), pp. 744-6.

Departemen Kesehatan RI, (2000), *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Edisi I, Direktorat Jenderal

Pengawasan Obat dan Makanan, Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, Bakti Husada, Jakarta, 9 - 18

- Hariyati, S., (2005), *Standarisasi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia, Salah Satu Tahapan Penting dalam Pengembangan Obat Asli Indonesia*, *InfoPOM*, 6(4), 1-5
- Haryani Y, Muthmainah S, dan Sikumbang S., (2013), *Uji Parameter Non Spesifik dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol dari Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*)*, *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*, 1(2), 43-46
- Helmi, A, Nelmi A, Dian H, Roslinda R., (2006), *Standarisasi Ekstrak Etanol Daun Eugenia cumini Merr*, *J. Sains Tek. Far*, 11(2), 88-93
- Macabeo A.P.G., and Aguinaldo A.M., (2008), *Chemical and Phytomedicinal Investigations in Lunasia amara*, *Pharmacognosy Reviews*, 2(4), pp. 317-325.
- Prescott A.K., Maciver S.K., Sadler I.H., & Kiapranis R., (2007), *Lunacridine from Lunasia amara is a DNA intercalating topoisomerase II inhibitor*, *Journal of Ethnopharmacology*, 109, pp. 289-294.
- Saifuddin A, Rahayu V, Teruna HY, (2011), *Standarisasi Bahan Obat Alam*, Graha Ilmu, Yogyakarta

Standarisasi Ekstrak Etil Asetat Kayu Sanrego (*Lunasia amara* Blanco)
(Syariful Anam *et al.*)