



Efek Perlindungan Madu Terhadap Kerusakan Lambung Tikus yang Diberi Etanol

Muhartono¹, Fiana DN¹, Kurrahman GN²

¹Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

²Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

Abstrak

Madu digunakan sejak dahulu sebagai obat pada berbagai penyakit, termasuk penyakit lambung. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek madu terhadap perbaikan kerusakan mukosa lambung tikus yang diinduksi etanol. Penelitian merupakan penelitian eksperimental laboratorik ini menggunakan rancangan acak terkontrol menggunakan 25 tikus jantan dewasa galur *Sprague Dawley*, berat 200-250 gr, dibagi secara acak menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 5 tikus; kelompok 1 (K1), diberikan akuades; Kelompok 2 (K2), diberikan etanol (0,01 ml/grBB) secara oral selama 14 hari. Kelompok 3 (K3), 4 (K4), dan 5 (K5) masing-masing diberikan etanol (0,01 ml/grBB) dan madu (0,0018 ml/grBB, 0,0054 ml/grBB, dan 0,016 ml/grBB) secara oral selama 14 hari. Pada K3, K4, dan K5, etanol diberikan 1,5 jam setelah pemberian madu. Setelah 14 hari, sampel lambung diambil untuk pemeriksaan histopatologi. Hasilnya menunjukkan etanol menimbulkan kerusakan mukosa lambung dibandingkan kelompok kontrol. K4 dan K5 menunjukkan penurunan signifikan kerusakan akut mukosa lambung dibandingkan kelompok etanol ($p < 0,001$). K5 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik dibandingkan kelompok kontrol ($p > 0,050$). Simpulan, madu memiliki efek terhadap perlindungan kerusakan lambung tikus yang diberi etanol. [Medula Unila.2013;1(2):52-62]

Kata kunci: etanol, lambung, madu.

The Protective Effect of Honey On Ethanol-Induced Stomach Injury in Rats

Muhartono¹, Fiana DN¹, Kurrahman GN²

¹Department of Pathology Anatomy Medical Faculty Lampung University
Student of Medical Faculty Lampung University

Abstract

Honey used as medicine in various disorders, including stomach lesions, since long time ago. The aim of this study was to investigate the effect of honey on the improvement of ethanol-induced acute gastric mucosal damage in rats. This experimental laboratory study used randomized controlled design. Twenty five male adult Sprague Dawley rats, weighing 200-250 gram, were randomly divided into 5 groups of five rats. Group 1 (control): Sterile water was given. Group 2: Ethanol (0,01 ml/g b.wt) was given orally for 14 days. Group 3, 4, and 5: Ethanol (0,01 ml/g b.wt) and honey (0,0018 ml/g b.wt, 0,0054 ml/g b.wt, and 0,016 ml/g b.wt) were given orally for 14 days. In group 3, 4, and 5, ethanol was given at 1,5 hours after honey administration. After 14 days, gastric samples were taken for histopathological examination. The results show that ethanol induced acute gastric mucosal damage compared to control group. Group 4 and 5 show significantly decreased acute gastric mucosal damage compared to ethanol group ($p < 0,001$). Group 5 doesn't show a statistically significant difference on acute gastric mucosal damage score compared to control group ($p > 0,050$). It could be concluded that honey has effect on improvement of ethanol-induced stomach injury in rats. [Medula Unila.2013;1(2):52-62]



Key words: ethanol, gastric, honey.

Pendahuluan

Madu adalah cairan kental manis yang dihasilkan oleh lebah madu (*Apis mellifera*) menggunakan nektar bunga. Madu mengandung 70-80% gula, terutama dari fruktosa dan glukosa. Bangsa Mesir Kuno, Assyria, Cina, Romawi dan Yunani telah menggunakan madu sebagai obat tradisional untuk penyembuhan luka, penyakit kulit dan berbagai penyakit lainnya (Lutz *et al.*, 2007).

Madu juga memiliki efek terapi terhadap infeksi dan gangguan pada saluran cerna (Bukhari *et al.*, 2006). Madu dapat meningkatkan pH lambung karena mengandung mineral seperti Mg, K, Na, dan Ca yang bersifat basa dan berfungsi sebagai *buffer* (Suranto, 2004), selain itu madu mempunyai aktivitas antioksidan karena kandungan flavonoidnya yang tinggi sehingga dapat mengikat radikal bebas (Mabrouk *et al.*, 2004). Aktifitas antioksidan pada madu juga mampu mengatasi gangguan inflamasi, termasuk inflamasi di mukosa lambung (Jaganathan & Masitosh, 2009).

Kerusakan mukosa lambung dapat disebabkan oleh etanol. Etanol atau yang dikenal sebagai alkohol di masyarakat menjadi masalah sosial (Brunton *et al.*, 2008). Jumlah total kematian akibat konsumsi etanol di dunia diperkirakan sekitar 2,25 juta pada tahun 2004 (WHO, 2011). Etanol dapat meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* dan menurunkan kadar antioksidan selular (Fernandez-Checa and Kaplowitz, 2005; Haet *et al.*, 2010), sehingga dapat merusak sawar mukosa lambung. Etanol cepat berpenetrasi ke dalam mukosa lambung dengan cara melepaskan radikal bebas dan meningkatkan permeabilitas mukosa sehingga memungkinkan difusi balik HCl (Suleyman *et al.*, 2001).

Madu dapat digunakan untuk pencegahan dan pengobatan gangguan gastrointestinal seperti sebagai tukak lambung dan gastritis (Bukhari *et al.*, 2006; Bogdanov *et al.*, 2008). Pada penelitian eksperimental tikus yang diinduksi indometasin dan alkohol, madu dapat memperbaiki mukosa lambung akibat efek stimulasi pada sensorik saraf di perut yang merespon capsaicin (Bogdanov *et al.*, 2008) dan madu sebagai antioksidan (Mabrouk *et al.*, 2004; Bogdanov *et al.*,



2008). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek madu terhadap perbaikan kerusakan mukosa lambung tikus yang diinduksi etanol

Metode

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dan dilaksanakan tahun 2012. Penelitian ini menggunakan metode rancangan acak terkontrol dengan menggunakan 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa galur *Sprague Dawley* berumur 3-4 bulan yang dipilih secara *random* yang dibagi menjadi 5 kelompok, dengan pengulangan sebanyak 5 kali, akan digunakan sebagai subjek penelitian; sesuai dengan rumus Frederer $t(n-1) > 15$. Kelompok 1 (K1) diberi air *ad libitum*. Kelompok 2 (K2) diberikan etanol 50% 0,01 ml/grBB. Kelompok 3 (K3) diberikan etanol 50% 0,01 ml/grBB ditambah larutan madu 50% dosis 0,0018 ml/grBB, kelompok 4 (K4) dengan dosis larutan madu 50% sebanyak 0,0054 ml/grBB, dan kelompok 5 (K5) dengan dosis larutan madu 50% sebanyak 0,016 ml/grBB, dimana larutan madu dan etanol 50% tersebut akan diberikan sebanyak 1 kali/hari. Masing-masing diberikan secara per oral selama 14 hari. Setelah 14 hari, perlakuan diberhentikan. Lima tikus jantan dari tiap kelompok kemudian dinarkosis dengan kloroform. Lalu dilakukan laparotomi, diambil lambung tikus. Sampel lambung ini lalu difiksasi dengan formalin 10%. Selanjutnya, sampel diproses histopatologi untuk pembuatan sediaan mikroskopis jaringan lambung.

Metode teknik pembuatan preparat histopatologi: (1) organ yang telah dipotong secara representatif dan telah difiksasi formalin 10% 3 jam; (2) Bilas dengan air mengalir 3-5 kali; (3) Dehidrasi dengan: alkohol 70% selama 0,5 jam, alkohol 96% selama 0,5 jam, alkohol 96% selama 0,5 jam, alkohol 96% selama 0,5 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol absolut selama 1 jam, alkohol xylol 1:1 selama 0,5 jam; (4) *Clearing*: xylol II selama 1 jam, xylol II selama 1 jam; (5). Impregnasi dengan parafin selama 1 jam dalam oven suhu 65°C; (6). Pembuatan blok parafin: sebelum dilakukan pemotongan blok parafin didinginkan dalam lemari es. Pemotongan menggunakan *rotary*



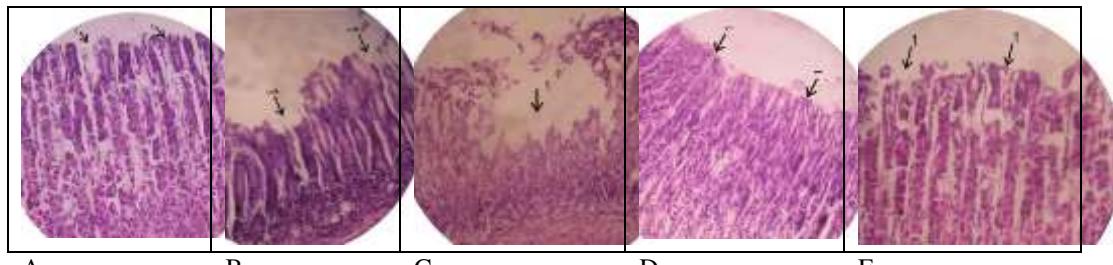
microtome dengan menggunakan *disposable knife*. Pita parafindimekarkan pada *water bath* dengan suhu 60°C. Selanjutnya dilakukan pewarnaan hematoksilin eosin (HE).

Prosedur pulasan HE: (1) Dilakukan deparafinisasi dalam: larutan *xylol* I selama 5 menit, larutan *xylol* II selama 5 menit, etanol absolut selama 1 jam (2) *Hydrasi* dalam: alkohol 96% selama 2 menit, alkohol 70% selama 2 menit, air selama 10 menit (3) Pulasan inti dengan: haris hematoksilin selama 15 menit, air mengalir, eosin selama maksimal 1 menit, (4) Dehidrasi: alkohol 70% selama 2 menit, alkohol 96% selama 2 menit, alkohol absolut 2 menit, (5) Penjernihan: *xylol* I selama 2 menit, *xylol* II selama 2 menit; (6). *Mounting* dengan entelan dan tutup dengan deck glass.

Hasil penelitian dianalisis: (1) Uji normalitas Shapiro-Wilk untuk menilai distribusi normal, karena jumlah sampel ≤ 50 . (2) Uji Levene untuk mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data memiliki varians yang sama ($p > 0,05$) atau tidak; (3) Jika varians data berdistribusi normal dan homogen, akan dilanjutkan dengan metode uji parametrik *one way* ANOVA; (4) Bila tidak memenuhi syarat uji parametrik, akan digunakan uji nonparametrik Kruskal-Wallis. Hipotesis akan dianggap bermakna bila $p < 0,05$. Jika pada uji *one way* ANOVA atau Kruskal-Wallis menghasilkan nilai $p < 0,05$ maka akan dilanjutkan dengan melakukan analisis *post hoc* LSD untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.

Hasil

Hasil pengamatan mikroskopis kelompok perlakuan terlihat pada gambar 1. Perhitungan skor gambaran kerusakan akut mukosa lambung tikus diperoleh rata-rata pada K1 adalah 8%, K2 adalah 92%, K3 adalah 90%, K4 adalah 56%, dan K5 adalah 20%.

**Gambar 1.**

Mikroskopis (A) K1 mempunyai kerusakan minimal 8% (B) K2 mempunyai kerusakan 92%; (C) K3 mempunyai kerusakan 90%; (D) K4 mempunyai kerusakan 56%; (E) K5 mempunyai kerusakan 20%

Dari data hasil pengamatan gambaran kerusakan mukosa lambung tikus untuk masing-masing kelompok, didapat rata-rata skor yang tersaji dalam tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata skor gambaran kerusakan akut mukosa lambung.

Kelompok Perlakuan	Rata-rata skor gambaran histopatologi (X±SD)
K1	8±8,37
K2	92±8,37
K3	90±7,07
K4	56±15,17
K5	20±7,07

Persentase rata-rata skor gambaran kerusakan akut mukosa lambung selanjutnya diuji normalitasnya dengan uji Shapiro-Wilk. Hasil analisis Shapiro-Wilk dari data di atas tersaji dalam tabel 2.

Tabel 2. Analisis Shapiro-Wilk gambaran kerusakan akut mukosa.

KELOMPOK UJI	p - VALUE
K1	0,881
K2	0,881
K3	0,883
K4	0,803
K5	0,883

Dari tabel di atas didapatkan distribusi data normal ($p>0,05$). Kemudian dilakukan uji Levene untuk mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data memiliki varians yang sama ($p>0,05$) atau tidak. Hasil uji Levene didapat nilai $P=0,068$ yang artinya dua atau lebih kelompok data mempunyai varian yang sama. Karena distribusi data normal serta varians dua atau lebih kelompok sama,



akan dilanjutkan dengan metode uji parametrik *one way* ANOVA. Hasil uji parametrik *one way* ANOVA diperoleh nilai $p=0,000$ ($p<0,05$), yang artinya terdapat perbedaan bermakna pada paling tidak 2 kelompok perlakuan. Analisis data dilanjutkan menggunakan analisis *post hoc* LSD untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan. Hasil analisis *post hoc* LSD tersaji dalam tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji statistik perbandingan antar kelompok (analisis *post hoc*)

KELOMPOK UJI		p - VALUE
K1	K2	0,000*
	K3	0,000*
	K4	0,000*
	K5	0,064
	K3	0,748
K2	K4	0,000*
	K5	0,000*
	K3	0,748
K3	K4	0,000*
	K5	0,000*
K4	K5	0,000*

Keterangan:

* = $p < 0,001$ (perbedaan sangat signifikan); ** = $p < 0,050$ (perbedaan signifikan).

Dari analisis *post hoc* didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara K1 dengan K2 ($p<0,001$), K1 dengan K3 ($p<0,001$), K1 dengan K4 ($p<0,001$). Terdapat juga perbedaan yang signifikan antara K2 dengan K4 ($p<0,001$), K2 dengan K5 ($p<0,001$). Perbedaan yang signifikan juga terlihat pada hubungan antara K3 dengan K4 ($p<0,001$), K3 dengan K5 ($p<0,001$), serta K4 dengan K5 ($p<0,001$). Sementara itu, hubungan antar kelompok yang tidak menunjukkan perbedaan dapat dilihat dari hubungan antara K1 dengan K5 ($p>0,050$), dan K2 dengan K3 ($p>0,748$).

Pembahasan

Dari hasil pengamatan, K1 atau kelompok kontrol normal memiliki persentase rata-rata skor kerusakan mukosa sebesar 8%. Hal ini menunjukkan



persentase kerusakan mukosa lambung K1 adalah yang paling rendah, dan memiliki perbedaan secara statistik dengan kelompok lain, kecuali dengan K5.

Aquadest bukan merupakan oksidan sehingga hasil pengamatan dominan menunjukkan tidak adanya perubahan patologis pada mukosa lambung tikus. Namun, beberapa hasil pengamatan menunjukkan inflamasi akut yang ditandai dengan edema mukosa dan infiltrat peradangan neutrofil. Hal ini bisa disebabkan kondisi awal lambung tikus yang memang sudah rusak dan stres. Stres terutama ditimbulkan oleh perangsangan hipotalamus yang akan menyebabkan pencetusan simpatis secara besar-besaran dengan salah satu efeknya adalah konstriksi pembuluh darah abdominal yang menyebabkan iskemia sel mukosa. Iskemia merupakan salah satu penyebab gastritis akut (Robbinet *et al.*, 2007).

Kelompok 2 atau kelompok kontrol patologis memiliki skor kerusakan akut mukosa lambung yang paling besar, yaitu 92% karena kelompok ini hanya diberi etanol. Pada pemeriksaan mikroskopis terlihat gambaran mulai dari edema, sebukan sel radang, sampai erosi sel mukosa lambung. Menurut Price and Wilson (2006), etanol dapat merusak mukosa lambung dan mengubah permeabilitas sawar epitel sehingga memungkinkan difusi balik asam klorida yang mengakibatkan kerusakan jaringan. Etanol menginduksi stres oksidatif intrasel dan menyebabkan transisi permeabilitas mitokondria dan depolarisasi mitokondria yang menyebabkan kematian sel di sel mukosa lambung.

Kerusakan ini akan memicu aktivasi fagositosis yang hasil sampingannya akan melepaskan radikal bebas yang berasal dari oksigen, termasuk O_2^- , H_2O_2 , HOCl, dan NO. Radikal bebas sangat reaktif karena radikal bebas mencoba untuk berpasangan dengan atom atau molekul lain, atau bahkan elektron tunggal, untuk menciptakan senyawa yang stabil (Repetto and Llesuy, 2002). Hasil pada K2 ini sejalan dengan penelitian Khazei and Hussein (2006) yang memberikan etanol 50 % (v/v) secara oral pada hari ke-2 dengan dosis 10 ml/kg BB sebagai penginduksi kerusakan mukosa lambung setelah 1,5 jam pemberian ekstrak *Vulgaria vulgaris*.

Kelompok 3 memperlihatkan hasil berupa tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan K2 dari uji statistik. Pada pemeriksaan mikroskopis juga masih

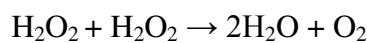


memperlihatkan gambaran erosi pada mukosa lambung tikus perlakuan dengan dosis ini. Hal ini disebabkan dosis madu yang diberikan kepada K3 merupakan dosis terendah sehingga belum terlihat efek gastroprotektifnya. Kerusakan pada lambung terjadi apabila terdapat gangguan keseimbangan antara faktor defensif dan faktor agresif. Madu yang berperan sebagai faktor defensif pada K3 ini masih belum dapat melawan efek agresif etanol. Hasil ini sejalan dengan penelitian Ali and Al-Swayeh (2003) yang memberikan madu kepada tikus yang diinduksi kerusakan lambungnya dengan etanol 0.5 ml/100 gr per oral. Dalam penelitian tersebut, efek protektif madu dalam melindungi lambung bergantung pada dosis.

Kelompok 4 menunjukkan perbedaan kerusakan akut mukosa lambung yang signifikan dibandingkan dengan K3. Kelompok 4 juga menunjukkan penurunan persentase kerusakan yang lebih besar dibandingkan K3, yaitu dari 90% menjadi sebesar 56%. Hal ini menunjukkan madu pada K4 sudah efektif melindungi lambung. Hal ini sejalan dengan penelitian Kamelet *et al.* (2002) yang menunjukkan madu isotonik menghasilkan pengurangan 70% dari luas lesi yang disebabkan oleh etanol.

Kelompok 5 menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan K1. Hal ini menunjukkan gambaran histopatologi lambung pada K5 hampir sama dengan K1 yang merupakan kelompok kontrol normal. Hal ini disebabkan K5 diberikan dosis madu paling tinggi, yaitu 0,016 ml/grBB. Hal ini sejalan dengan penelitian Mubarok-Ali (2003) dimana pemberian oral madu 30 menit sebelum amonium hidroksida 1% dosis 1 ml secara intragastrik dapat mengurangi keparahan lesi mukosa lambung.

Efek gastro protektif madu ini disebabkan oleh tingginya kandungan antioksidan madu, yaitu flavonoid, vitamin E, asam askorbat, dan katalase. Katalase merupakan salah satu contoh antioksidan enzimatik. Katalase mengkatalisis reduksi H_2O_2 yang merupakan radikal bebas, seperti pada reaksi berikut:





Selain antioksidan enzimatik, madu juga mengandung beberapa antioksidan nonenzimatik. Antioksidan nonenzimatik adalah molekul biologis yang dapat bertindak sebagai antioksidan dengan menghambat radikal bebas secara langsung atau tidak langsung. Contoh antioksidan nonenzimatik dalam madu adalah:flavonoid, vitamin.E, vitamin C, dan beta karoten(La Casa *et al.*, 2000).

Flavonoid yang mengandung substitusi OH multipel memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dalam melawan radikal peroksil. Aktivitas antioksidan flavonoid adalah efisien dalam menjebak anion superokksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH^-), peroksil (ROO^-), dan alkohoksil (RO^-). Selain itu, flavonoid juga menstabilisasi membran dan mempengaruhi beberapa proses metabolisme intermediet dan menginhibisi peroksidasi lipid. Beberapa flavonoid juga meningkatkan kandungan prostaglandin mukosa dan mukus di mukosa lambung, menunjukkan efek sitoprotektif. Beberapa mekanisme antioksidan flavonoid selain menangkap radikal bebas adalah mengikat ion logam transisi, inhibisi enzim oksidan/produksi radikal bebas oleh sel, dan regenerasi α -*tokoferol* dari radikal α -*tokoferoksil*. Flavonoid mendorong pembentukan mukosa lambung, mengurangi sekresi asam mukosa, inhibisi produksi pepsinogen, dan menurunkan lesi ulserogenik (La Casa *et al.*, 2000). Simpulan, madu dapat memberikan efek proteksi pada lambung tikus yang diinduksi dengan etanol.

Daftar Pustaka

- Ali ATTM, Al-Swayeh OA. 2003. Honey potentiates the gastric protection effects of sucralfate against ammonia-induced gastric lesions in rats. Saudi Journal of Gastroenterology.9(3):117–23.
- Brunton L, Parker K, Blumenthal D, Buxton I. 2008. Goodman and Gilman's manual of pharmacology and therapeutics. New York: McGraw-Hill. pp.1230-1.
- Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. 2008. Honey for Nutrition and Health: a Review. American Journal of the College of Nutrition. 27: 677–689.
- Bukhari MH, Khalil J, Qamar S, Qamar Z, Zahid M, Ansari N, Bakhshi IM. 2011. Comparative gastroprotective effects of natural honey,Nigella sativa and cimetidine against acetylsalicylic acid induced gastric ulcer in albino rats. Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan. 21(3):151-6.



- Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N. 2005. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol. Applied Pharm.* 204:263-73.
- Ha H, Shin HJ, Feitelson MA, Yu DY. 2010. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 16(48):6035-43.
- Jaganathan SK, Mahitosh M. 2009. Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols. *Jurnal Biomed Biotechnol.* 1:1-14.
- Khazaei M, Hussein S. 2006. Protective effect of *Falacaria vulgaris* extract on ethanol induced gastric ulcer in rat. *Iranian Jurnal of Pharmacology and Therapeutics.* 5:43-6.
- La Casa C, Villegas I, De La Lastra CA, Motilva T, Calero MJM, 2000. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol.* 71:45-53.
- Lutz S, Churana S, Kennedy R. 2007. Literature Review of Honey and Health Benefits. Canada:Alberta Agreiculture and food. pp. 1-10.
- Kamel G, Amira S, Gharzouli A, Khennouf, S. 2002. Gastroprotective effects of honey and glucose-fructose-sucrose-maltose mixture against ethanol-, indomethacin-, and acidified aspirin-induced lesions in the rat. *Journal of Experimental and Toxicologic Pathology.Experimental and Toxicologic Pathology.* 54(3):217-21.
- Mubarok-Ali ATT. 2003. Prevention of ammonia-induced gastric lesions in rats by natural honey. *Journal of Nutritional and Environmental Medicine.* 13(4):239-46.
- Mabrouk GM, Zohny SF, Ali EMM, Ismail EF, Moselhy SS. 2004. Bee honey and *Nigella sativa* inhibit nitric oxide mediated cytochrome C release and down-regulation of connexin 43 induced by methyl nitrosourea in hepatic tissues of sprague dawley rats. *Egypt J. Biochem.* 22:73-87.
- Price S, Wilson L. 2006. Patofisiologi konsep klinis proses-proses penyakit, edisi ke-6. Jakarta:EGC. hlm. 351.
- Repetto MG and Llesuy SF. 2002. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcer. *Braz J Med Biol Res.* 35(5): 523-34.
- Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. 2007. Robbins buku ajar patologi, edisi ke-7. Jakarta:EGC. hlm. 900.
- Suranto A. 2007. Terapi Madu. Jakarta:Penebar Swadaya. Hlm. 26-40.
- Suleyman H, Mehmet EB, Koruk M. 2001. The effects of *Hippophae rhamnoides* L. extract on ethanol induced gastric lesion and gastric tissue glutathione level in rats: A comparative study with melatonin and omeprazole. *Indian Journal of*



Pharmacology. 33: 77-81.

World Health Organization. 2011. *Global status report on alcohol and health*. WHO. Switzerland. pp. 85.