

## HEPATOPROTECTIVE AND NEPHROPROTECTIVE EFFECTS OF AVOCADO SEEDS AGAINST CARBON TETRACHLORIDE IN RATS

### EFEK HEPATOPROTEKTIF DAN NEFROPROTEKTIF BIJI ALPUKAT PADA TIKUS TERINDUKSI KARBON TETRAKLORIDA

Phebe Hendra\*, Gidion Krisnadi, Ni Luh Putu Dian Perwita, Ike Kumalasari and Yuditha Anggarhani Quraisyin

Faculty of Pharmacy, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta, Indonesia

#### ABSTRACT

The aim of this research to investigate the hepatoprotective and nephroprotective effects of Avocado seeds against carbon tetrachloride in rats. The rats was treated with the infusion and decoction of avocado seeds at doses 360,7, 642,1, 1142,9 mg/kg per oral once in a day for 6 days and carbon tetrachloride (2mL/kg) was given on the 7<sup>th</sup> day. Blood sample from all groups was obtained by sinus orbitalis after 24 hours application for the serum transaminase and creatinine. The increasing of serum transaminase and creatinine in carbon tetrachloride-treated rats, were significantly decreased ( $p<0.05$ ) with both pretreatment of infusion and decoction of avocado seeds. Based on the research, it can be concluded that infusion and decoction of avocado seeds have a potent protective action upon carbon tetrachloride-induced hepatic and renal damage in rats.

Key words: avocado, protective, infusion, carbon tetrachloride

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek hepatoprotektif dan nefroprotektif dari biji alpukat pada tikus terinduksi karbon tetraklorida. Sejumlah tikus diberikan infusa dan dekokta biji alpukat dengan dosis berturut-turut 360,7; 642,1 dan 1142,9 mg/kg sekali sehari selama 6 hari berturut-turut kemudian pada hari ke-7 diberi karbon tetraklorida dosis hepatotoksin. Pengambilan darah tikus dilakukan setelah 24 jam melalui sinus orbitalis mata, lalu diukur aktivitas enzim transaminase dan kadar kreatinin. Kenaikan serum transaminase dan kreatinin pada tikus terinduksi karbon tetraklorida dapat diturunkan secara signifikan ( $p<0,05$ ) baik dengan perlakuan ekstrak infusa dan dekokta. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa infusa dan dekokta biji alpukat mempunyai efek protektif pada hepar dan ginjal tikus jantan terinduksi karbon tetraklorida.

Kata kunci: alpukat, protektif, infusa, karbon tetraklorida

#### PENDAHULUAN

Hepar dan ginjal merupakan organ yang mempunyai peranan penting bagi manusia. Hepar memiliki fungsi utama sebagai pusat metabolisme dan juga sebagai organ yang mampu mendetoksifikasi obat dan zat berbahaya (Wibowo *et al.*, 2009; Nurachman *et al.*, 2011). Sel hepar mendapat suplai darah yang kaya makanan, tidak mengandung oksigen dan kadang-kadang toksik melalui *vena portae hepatis*, sehingga menjadi lebih rentan terhadap kerusakan dan penyakit (Wibowo *et al.*, 2009). Ginjal melakukan fungsi vital sebagai pengatur komposisi dan volume kimia darah dengan mengekskresikan solut dan air secara selektif yang dikontrol oleh filtrasi

glomerulus, reabsorpsi, dan sekresi tubulus. Sebagai bagian dari sistem urin, ginjal berfungsi menyingkirkan kotoran dari darah dan membuangnya bersama dengan air dalam bentuk urin (Junqueira *et al.*, 2007). Sebagian besar produk sisa buangan yang dikeluarkan melalui urin diantaranya kreatinin. Peningkatan kadar kreatinin dalam darah merupakan indikasi rusaknya fungsi ginjal (Sacher *et al.*, 2004)

Karbon tetraklorida ( $CCl_4$ ) merupakan salah satu senyawa model hepatotoksin dan nefrotoksin (Timbrell, 2008). Induksi karbon tetraklorida dapat merangsang terjadinya sirosis pada tikus dan menghasilkan stress oksidatif pada ginjal melalui peroksidasi lipid dan protein (Manna *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2009). Pemberian  $CCl_4$  dapat meningkatkan kadar kreatinin urin, protein dan urobilinogen dan secara histopatologis dapat

\*Corresponding author : Phebe Hendra  
E-mail: phebehendra@yahoo.com

mengakibatkan terjadinya steatosis, nekrosis sentrilobular, dan sirosis di hati serta akut tubuler nekrosis di ginjal. Terjadinya akumulasi lipid di hati ini disertai perubahan biokimia pada darah, yang dapat dilihat dari perubahan aktivitas alanin aminotransferase (ALT) dan aspartat aminotransferase (AST) pada serum (Hodgson, 2010).

Penelitian obat yang berasal dari bahan alam untuk mengatasi kerusakan hati dan ginjal di Indonesia sampai saat ini masih terbatas, oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian mengenai obat baru dari kekayaan alam Indonesia. Alpukat (*Persea americana* Mill.) merupakan buah tropis yang kaya akan senyawa fitokimia yang aktif secara biologis. Namun biji alpukat yang merupakan limbah, dilaporkan mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi (Malanggi *et al.*, 2012). Biji alpukat mengandung senyawa saponin, tannin, flavonoid, alkaloid, dan fenol. Senyawa fenol memiliki kemampuan sebagai antiinflamasi, antikoagulan, antioksidan, serta peningkat sistem imun (Arukwe *et al.*, 2012). Aktivitas farmakologi dari senyawa flavonoid adalah sebagai antialergi, antiviral, antiinflamasi, hepatoprotektif, antioksidan, antitrombotik, vasodilator dan antikarsinogenik (Seyoum *et al.*, 2006). Konsinska *et al.*, (2012) melaporkan biji alpukat dapat dimanfaatkan sebagai bahan tambahan antioksidan berkaitan dengan kandungan senyawa fenolik yang dapat memberikan aktivitas menangkal radikal terhadap DPPH. Adanya aktivitas antioksidan dari biji alpukat, diharapkan dapat menghambat terjadinya oksidasi dari karbon tetraklorida. Adapun penelitian *invivo* menggunakan biji alpukat belum banyak dilakukan, sehingga menjadi peluang untuk dilakukan eksplorasi.

Bentuk sediaan infusa dan dekokta merupakan bentuk sediaan yang menyerupai pemakaian bahan alam di masyarakat. Perbedaan keduanya adalah pada lama pemanasan, dimana pada infusa dipanaskan selama 15 menit, sedangkan dekokta selama 30 menit. Pada penelitian ini akan dilihat pengaruh proteksi infusa biji alpukat dan dekokta biji alpukat terhadap hepar dan ginjal tikus jantan yang terinduksi karbon tetraklorida.

## METODOLOGI

### Bahan dan alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah biji alpukat, aquades, tikus putih jantan galur Swiss, karbon tetraklorida, *olive oil*. Alat yang digunakan adalah timbangan analitik, alat gelas, alat suntik dan jarum oral, penci infusa.

### Pembuatan infusa biji alpukat

Sebanyak 8,0 g serbuk kering ditimbang dan ditambahkan 16,0 mL pelarut aquades, selanjutnya ditambahkan lagi 100 mL, selanjutnya dipanaskan pada suhu 90°C selama 10 menit. Campuran disaring dengan menggunakan kain flanel, dan ditambahkan air panas secukupnya melalui ampas hingga 100mL.

### Pembuatan dekokta biji alpukat

Sebanyak 8,0 g serbuk kering ditimbang dan ditambahkan 16,0 mL pelarut aquades, selanjutnya ditambahkan lagi 100 mL, selanjutnya dipanaskan pada suhu 90°C selama 30 menit. Campuran disaring dengan menggunakan kain flanel, dan ditambahkan air panas secukupnya melalui ampas hingga 100mL.

### Penentuan peringkat dosis perlakuan

Peringkat dosis yang digunakan pada penelitian ini baik pada sediaan infusa maupun dekokta, berdasarkan pada pengobatan yang biasa digunakan pada masyarakat, yaitu  $\pm 2$  sendok makan (4 g) serbuk biji alpukat yang direbus dengan 250 mL air, sehingga diperoleh dosis 4 g/70 kgBB manusia. Konversi dosis tikus (manusia 70 kg ke tikus 200g) = 0,018. Dosis untuk 200 g tikus =  $0,018 \times 4\text{ g} = 0,72\text{ g}/200\text{ g BB} = 360\text{ mg/kgBB}$ , yang digunakan sebagai acuan dosis rendah. Dosis tertinggi yang digunakan yaitu 1142,9 mg/KgBB yang ditentukan berdasarkan dosis maksimal untuk bentuk sediaan yang dapat dibuat yaitu 8 g/100 mL.

### Perlakuan hewan uji

Sebanyak 40 ekor tikus dibagi secara acak ke dalam 8 kelompok perlakuan. Kelompok I (kontrol negatif) diberi *olive oil* dosis 2 mL/kg secara intraperitoneal (i.p.). Kelompok II (kontrol hepatotoksin) diberi larutan karbon tetraklorida 2 ml/kg secara i.p. (Janakat *et al.*, 2002; Panjaitan *et al.*, 2007). Kelompok III-V berturut-turut diberi infusa biji alpukat secara oral dengan dosis berturut-turut 360,7; 642,1; 1142,9 mg/kg sekali sehari selama 6 hari berturut-turut kemudian pada hari ke-7 diberi karbon tetraklorida (2 mL/kg secara i.p.). Kelompok VI- VIII berturut-turut diberi dekokta biji alpukat secara oral dengan dosis berturut-turut 360,7; 642,1; 1142,9 mg/kg sekali sehari selama 6 hari berturut-turut kemudian pada hari ke-7 diberi karbon tetraklorida (2 mL/kg secara i.p.). Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari *The Medical and Health Research Ethics Committee (MHREC) Fac. of Medicine Gadjah Mada University*.

### Pemeriksaan ALT, AST dan kreatinin

Pengambilan darah tikus dilakukan setelah 24 jam pemberian karbon tetraklorida melalui *sinus orbitalis* mata, lalu diukur aktivitas transaminase (ALT dan AST), selanjutnya pada jam-48 diambil darah untuk pengukuran kadar kreatinin. Data aktivitas ALT, AST dan kadar kreatinin dianalisis dengan analisis variansi pola searah (*One Way ANOVA*) dengan taraf kepercayaan 95% dan dilanjutkan dengan uji *Scheffe*.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian infusa biji alpukat dan dekokta biji alpukat terhadap efek hepatoprotektif dan nefroprotektif pada tikus terinduksi karbon tetraklorida. Pemberian infusa dan dekokta biji alpukat diberikan selama 6 hari berturut-turut bertujuan untuk memberikan efek proteksi pada hepar dan ginjal tikus. Adapun efek hepatoprotektif yang diamati berdasarkan penurunan aktivitas serum transaminase, alanin transaminase (ALT) dan aspartat transaminase (AST), sedangkan efek nefroprotektif diamati berdasarkan penurunan kadar kreatinin.

Janakat *et al.* (2012) melaporkan pemberian 2 ml/kg BB dari karbon tetraklorida dengan pelarut *olive oil* (1:1) merupakan dosis optimum untuk menginduksi kerusakan hepar tikus tanpa menyebabkan kematian pada tikus. Febrianti (2013) melaporkan bahwa pada pemberian *olive oil* 2ml/kgBB jam ke -0 dan 24 memberikan perbedaan aktivitas serum ALT dan AST yang tidak bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa *olive oil* sebagai kontrol pelarut hepatotoksin tidak mempengaruhi peningkatan aktivitas serum ALT dan AST sehingga nantinya akan dipakai sebagai dasar bagi nilai aktivitas serum ALT dan AST normal dalam penelitian ini.

Pada kelompok hepatotoksin karbon tetraklorida terjadi peningkatan aktivitas ALT-serum hingga  $183,2 \pm 5,1$  U/L atau 4 kali lipat nilai normal dibanding nilai kontrol negatif *olive oil* (Tabel 1). Hal serupa juga terjadi pada aktivitas AST-serum mencapai  $476,8 \pm 14,3$  U/L atau 4 kali lipat nilai normal. Hal ini menunjukkan telah terjadi kerusakan pada hati tikus. Kadar kreatinin pada tikus yang diinduksi karbon tetraklorida menunjukkan peningkatan hampir dua kali lipat ( $1,00 \pm 0,06$  mg/dL) dibandingkan nilai normal ( $0,58 \pm 0,02$  mg/dL). Ini berarti telah terjadi kerusakan pada ginjal tikus akibat pemberian karbon tetraklorida.

Kelompok perlakuan dosis infusa biji alpukat 360,7; 642,1 dan 1142,9 mg/kgBB memberikan penurunan aktivitas ALT dan AST

yang berbeda bermakna terhadap kontrol hepatotoksin ( $p < 0,05$ ). Hal ini berarti pemberian infusa biji alpukat pada ketiga peringkat dosis mampu memberikan efek protektif pada hepar tikus yang diinduksi dengan karbon tetraklorida. Penurunan kadar kreatinin secara signifikan akibat pemberian karbon tetraklorida juga terlihat pada pemberian infusa biji alpukat dengan tiga peringkat dosis. Ini menunjukkan selain dapat memproteksi hepar, infusa biji alpukat juga dapat memproteksi ginjal tikus terinduksi karbon tetraklorida. Pada dosis terkecil (360,7 mg/kgBB) infusa biji alpukat memberikan efek protektif terhadap hepar dan ginjal yang lebih baik dibandingkan dosis lainnya. Hal ini dimungkinkan karena kandungan senyawa antioksidan yang tersari pada infusa pada dosis terkecil sudah mampu memberikan efek protektif.

Dekokta biji alpukat dosis 360,7; 642,1 dan 1142,9 mg/kgBB mampu memberikan penurunan aktivitas ALT dan AST yang berbeda bermakna terhadap kontrol hepatotoksin ( $p < 0,05$ ). Ini menunjukkan pada pemberian dekokta biji alpukat semua peringkat dosis mampu memberikan efek protektif pada hepar tikus yang diinduksi dengan karbon tetraklorida. Hal yang sama juga terlihat terjadinya penurunan kadar kreatinin secara signifikan akibat pemberian dekokta biji alpukat akibat karbon tetraklorida. Dekokta biji alpukat mampu memberikan efek proteksi pada hepar dan ginjal tikus terinduksi karbon tetraklorida.

Dekokta biji alpukat dosis terbesar (1142,9 mg/kgBB) mampu memberikan efek protektif yang terbesar dibandingkan dosis lainnya. Hasil ini berbeda dengan bentuk sediaan infusa, dimana dosis terkecil infusa biji alpukat yang memberikan efek protektif yang baik. Hal ini menunjukkan bahwa penyiaran senyawa antioksidan dalam waktu lama (dekokta selama 30 menit) membutuhkan dosis yang lebih besar untuk mendapatkan efek yang lebih baik. Berdasarkan hal tersebut, dapat diketahui bahwa dengan cara pembuatan yang berbeda dapat memberikan efek yang berbeda. Hal ini dimungkinkan karena senyawa yang tersari berbeda pada setiap cara pembuatan yang berbeda, dalam hal ini ditentukan oleh lamanya pembuatan. Oleh karena itu perlu penelitian lebih lanjut senyawa yang tersari dan yang bertanggung jawab dalam menimbulkan efek proteksi pada hepar dan ginjal tikus.

Hasil metabolisme karbon tetraklorida oleh enzim sitokrom P-450 di hepar berupa metabolit reaktif triklorometil dapat merangsang terjadinya peningkatan hidroperoksida dan malondialdehid. Lebih lanjut hal ini dapat menurunkan glutation di dalam jaringan hepar secara signifikan (Bashandy

Tabel I. Pengaruh pemberian biji alpukat terhadap aktivitas transaminase serum dan kadar kreatinin pada tikus terinduksi karbon tetraklorida (n=5)

| Kelompok | Perlakuan  | ALT (U/L)<br>(rerata ± SE*) | AST (U/L)<br>(rerata ± SE*) | Kreatinin (mg/dL)<br>(rerata ± SE*) |
|----------|--|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| I        | Kontrol <i>olive oil</i> (2 mL/kg)                                 | 46,7 ± 2,0 <sup>b</sup>     | 60,2 ± 2,4 <sup>b</sup>     | 0,58 ± 0,02 <sup>b</sup>            |
| II       | Kontrol karbon tetraklorida 2 mL/kg                                | 183,2 ± 5,1 <sup>a</sup>    | 476,8 ± 14,3 <sup>a</sup>   | 1,00 ± 0,06 <sup>a</sup>            |
| III      | Infusa biji alpukat (360,7 mg/kgBB) + karbon tetraklorida 2 mL/kg  | 49,2 ± 3,5 <sup>b</sup>     | 100,4 ± 5,3 <sup>a,b</sup>  | 0,58 ± 0,02 <sup>b</sup>            |
| IV       | Infusa biji alpukat (642,1 mg/kgBB) + karbon tetraklorida 2mL/kg   | 99,8 ± 1,8 <sup>a,b</sup>   | 185,8 ± 14,2 <sup>a,b</sup> | 0,66 ± 0,03 <sup>b</sup>            |
| V        | Infusa biji alpukat (1142,9 mg/kgBB) + karbon tetraklorida 2mL/kg  | 65,2 ± 3,9 <sup>a,b</sup>   | 148,2 ± 9,9 <sup>a,b</sup>  | 0,74 ± 0,09 <sup>b</sup>            |
| VI       | Dekokta biji alpukat (360,7 mg/kgBB) + karbon tetraklorida 2mL/kg  | 96,0 ± 6,0 <sup>a,b</sup>   | 152,2 ± 12,0 <sup>a,b</sup> | 0,58 ± 0,04 <sup>b</sup>            |
| VII      | Dekokta biji alpukat (642,1 mg/kgBB) + karbon tetraklorida 2mL/kg  | 87,0 ± 6,4 <sup>a,b</sup>   | 193,2 ± 8,9 <sup>a,b</sup>  | 0,62 ± 0,04 <sup>b</sup>            |
| VIII     | Dekokta biji alpukat (1142,9 mg/kgBB) + karbon tetraklorida 2mL/kg | 50,8 ± 3,8 <sup>b</sup>     | 125,2 ± 12,5 <sup>a,b</sup> | 0,78 ± 0,04 <sup>a,b</sup>          |

\*SD: Standar eror; a: p<0,05 menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kelompok *olive oil*. b: p<0,05 menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kelompok karbon tetraklorida.

*et al.*, 2011). Kejadian ini akan berdampak akan terjadinya perubahan di dalam hepar seperti perubahan lemak, degenerasi melemak (Nirmala *et al.*, 2012) serta infiltrasi sel inflamasi, yang berdampak terjadinya steatosis dan pelepasan enzim transaminase (Timbrell, 2008; Zimmerman, 1999).

Peningkatan kadar kreatinin urin, protein dan urobilinogen serta histopatologis berupa steatosis, nekrosis sentrilobular, dan sirosis di hati serta akut tubuler nekrosis di ginjal juga terlihat pada pemejanan karbon tetraklorida. Pemberian infusa dan dekokta biji alpukat mampu mengurangi aktivitas ALT, AST serta kreatinin pada tikus yang terinduksi karbon tetraklorida. Hal ini dapat terjadi kemungkinan karena adanya senyawa antioksidan pada biji alpukat. yang

mampu melindungi hati dan ginjal yang terinduksi karbon tetraklorida. Malangngi *et al.*, (2012) melaporkan biji alpukat memiliki kandungan antioksidan yang tinggi. Adanya kandungan senyawa fenolik di dalam biji alpukat juga memberikan aktivitas terhadap menangkat radikal terhadap DPPH (Konsinska *et al.*, 2012). Senyawa antioksidan dalam biji alpukat mampu berikatan dengan senyawa-senyawa radikal dari hasil oksidasi karbon tetraklorida. Hal ini dapat menghambat terjadinya ikatan antara senyawa radikal peroksi dengan asam lemak yang terdapat di hati yang menyebabkan terjadinya peroksida lipid. Dengan demikian, rangkaian peristiwa yang menimbulkan *steatosis* bisa diminimalisasi atau bahkan dihentikan.

**KESIMPULAN**

Pemberian infusa dan dekokta biji alpukat mampu memberikan efek proteksi pada hepar dan ginjal tikus terinduksi karbon tetraklorida.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Arukwe, U., Amadi, B.A., Duru, M.K.C., Agomuo, E.N., Adindu, E.A., Odika, P.C., 2012, Chemical Composition of *Persea americana* leaf, fruit and seed. *IJJRAS* 11: 346-348.
- Bashandy, S.A., AlWasel, S.H., 2011, Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: protective role of vitamin C. *J. Pharmacol. Toxicol.*, 6(3): 283-292.
- Febrianti, C.H., 2012, Efek Hepatoprotektif Jangka Waktu Enam Jam Ekstrak Etanol Daun *Macaranga tanarius* L. Terhadap Aktivitas ALT-AST Pada Tikus Jantan Terinduksi Karbon Tetraklorida, *Skripsi*, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.
- Hodgson, E., 2010, *A Textbook of Modern Toxicology*, 4<sup>th</sup> Ed., John Wiley & Sons, Inc., New Jersey: 168, 277-289.
- Janakat, S., Al-Merie, H., 2002, Optimization of the dose and route of injection, and characterization of the time course of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat, *J. Pharm. Tox. Methods*, 48: 41-44.
- Junqueira, L.E., Carneiro, J., Kelley, R.O., 2007, *Basic Histology*, 11<sup>st</sup> Ed. Mc Graw-Hill, Boston: 373-390.
- Khan, M.R., Rizvi, W., Shaheen, S., 2009, Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in rats: Protective role of *Digera muricata*, *J. Ethnopharmacology*, 122: 91-99.
- Konsinska, A., Karamec, M., Estrella, I., Hernandez, T., Bartolome, B., Dykes, G.A., 2012, Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of *Persea americana* Mill. Peels and Seeds of two varieties, *J. of Agric. Food Chem.*, 60: 4613-4619.
- Malangngi, L., Meiske, S., Jessy, J., 2012, Penentuan Kandungan Tanin dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill). *Jurnal MIPA UNSRAT*, 1 (1): 5-10.
- Manna, P., Sinha, M., Sil, P.C., 2006, Aqueous extract of *Terminalia arjuna* prevents carbon tetrachloride induced hepatic and renal disorders, *BMC Complementary Alternative Med.*, 6: 33-33.
- Nirmala, M., Girija, K., Lakshman, K., Divya, T., 2012, Hepatoprotective activity of *Musa paradisiaca* on experimental animal models, *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*: 11-15.
- Nurachman, E., Angriani, R., 2011, *Dasar-dasar Anatomi dan Fisiologi*, Salemba Medika, Jakarta: 192-196.
- Panjaitan, R.G.P., Handharyani, E., Chairul, Masriani, Zakiah, Z., Manalu, W., 2007, Pengaruh Pemberian Karbon Tetraklorida terhadap Fungsi Hati dan Ginjal Tikus, *Makara Kesehatan*, 11 (1): 11-16.
- Sacher, R.A., McPherson, R.A., 2004, *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium*, EGC, Jakarta: 291-293.
- Seyoum, A., Asres, K., El-Ficky, F.K., 2006, Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids, *Phytochemistry*, 67: 2058-2070.
- Timbrell, J.A., 2008, *Principles of Biochemical Toxicology*, 4<sup>th</sup> Ed., Informa Healthcare, New York: 308-311.
- Wibowo, D.J., Paryana W., 2009, *Anatomi Tubuh Manusia*. Graha Ilmu, Bandung: 347-352.
- Zimmerman, H.J., 1999, *Hepatotoxicity*, 2<sup>nd</sup> Ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia: 195-210.