

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN SITOTOKSIK
SERTA PENETAPAN KADAR SENYAWA FENOL TOTAL
EKSTRAK DAUN, BUNGA, DAN RIMPANG KECOMBRANG (*Etlingera elatior*)**

**ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTIVITIES,
TOTAL PHENOLIC CONTENT OF LEAVE, FLOWER, AND RHIZOME
EXTRACTS OF TORCH GINGER (*Etlingera elatior*)**

Herni Kusriani^{1,2}, Anas Subarnas¹, Ajeng Diantini¹,
Yoppi Iskandar¹, Shinta Marpaung², Mega Juliana², Fransiska Silalahi²

¹Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Jatinangor –Sumedang

²Sekolah Tinggi Farmasi Bandung, Jl. Sukarno Hatta 754 Bandung 40625

Email: herni.kusriani@stfb.ac.id (Herni Kusriani)

ABSTRAK

Kecombrang (*Etlingera elatior*) merupakan tanaman suku Zingiberaceae yang memiliki potensi sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan sitotoksik terhadap larva udang dari ekstrak daun, bunga, dan rimpang kecombrang, serta menetapkan kadar senyawa fenol totalnya. Sampel daun, bunga, dan rimpang kecombrang dimaserasi dengan pelarut etanol 70% selama 3x24 jam dalam suhu ruangan. Ekstrak yang didapat selanjutnya dievaporasi pada suhu 50 °C sehingga menghasilkan ekstrak kental. Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode peredaman radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrihidrazil (DPPH), dan uji sitotoksik menggunakan metode BSLT (*Brine Scrimp Lethality Test*). Penetapan kadar fenol total dengan standar asam galat menggunakan reagen Folin Ciocalteu yang diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 765 nm. Aktivitas antioksidan dari ekstrak daun, bunga, dan rimpang kecombrang ditunjukkan oleh nilai IC₅₀ masing-masing 52,05; 457,54; dan 310,69 ppm. Aktivitas sitotoksik yang dinyatakan dalam nilai LC₅₀ dari ketiga bahan tersebut berturut-turut adalah 859,039; 418,022; dan 1261,202 ppm. Kadar senyawa fenol total ekstrak daun, bunga, dan rimpang kecombrang dihitung sebagai asam galat ekuivalen berturut-turut sebesar 0,339% ± 0,006; 0,144% ± 0,024; dan 0,074% ± 0,018. Ekstrak daun kecombrang menunjukkan aktivitas antioksidan yang paling baik dan kadar fenol total paling tinggi dibandingkan ekstrak bunga dan rimpang kecombrang. Ekstrak daun dan bunga kecombrang menunjukkan potensi sebagai agen antikanker karena menunjukkan nilai LC₅₀ ≤ 1000 ppm.

Kata kunci: kecombrang (*Etlingera elatior*), kadar senyawa fenol, aktivitas antioksidan, sitotoksik.

ABSTRACT

Torch ginger (Etlingera elatior) is a Zingiberaceae plant that is considered to be potential as the source of natural antioxidant and anticancer. This research was conducted to determine the activities of antioxidant and cytotoxic of the extract of leave, flower, and rhizome of torch ginger, and also to determine their total phenolic compounds. Leaves, flower, and rhizome of torch ginger were macerated with 70% ethanol (3x24 hours) at room temperature and then the solvent is evaporated at 50 °C under pressure so that resulting concentrated extract. The whole extracts were tested for their antioxidant and cytotoxic activity activities and total phenolic contents. The antioxidant activity was evaluated with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method, while cytotoxic activity was determined using BSLT (Brine Scrimp Lethality) method. Determination of total phenolic content was carried out using Folin Ciocalteu reagent with gallic acid as standard and measured by spectrophotometer at wavelength of λ 765 nm. The IC_{50} of leave, flower, and rhizome extracts of torch ginger were 52.05; 457.54; and 310.69 ppm, respectively. The cytotoxic activity showed LC_{50} of those three extracts were 859.039; 418.022; and 1261.202 ppm, respectively. The total phenolic contents were $0.339\% \pm 0.006$, $0.144\% \pm 0.024$, and $0.074\% \pm 0.018$, respectively. Leave extract of torch ginger showed the best antioxidant activity and the highest at total phenolic content. Leave and flower extracts of torch ginger have a potency as anticancer agent with LC_{50} value ≤ 1000 ppm.

Key words: torch ginger (*Etlingera elatior*), antioxidant, total phenolic content, cytotoxic.

Pendahuluan

Penyakit degeneratif merupakan penyakit yang prevalensinya paling tinggi di Asia Tenggara. Berdasarkan data WHO tahun 2008, angka kematian di Asia Tenggara sekitar 14,5 juta, yaitu sekitar 55% (7,9 juta) disebabkan oleh penyakit degeneratif. Angka kematian akibat penyakit ini diprediksi akan meningkat 21% pada tahun 2018 (WHO, 2010). Penyakit degeneratif disebabkan oleh radikal bebas yang terbentuk melalui proses radiasi maupun oksidasi yang menghasilkan senyawa beracun yang dapat merusak sel sehingga fungsi organ menjadi sangat berkurang. Radikal bebas merupakan suatu atom atau molekul yang mengandung elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya, bersifat tidak stabil dan sangat reaktif. Radikal dengan kereaktifan yang tinggi menyebabkan reaksi berantai sehingga dapat merusak sel-sel penting dalam tubuh (Badarinath *et al.*, 2010). Radikal bebas dapat diatasi dengan penggunaan antioksidan (Mandal *et al.*, 2009).

Antioksidan adalah substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan

lemak (Vaya dan Aviram, 2001). Antioksidan dalam menghambat jalannya reaksi oksidasi dapat melalui beberapa cara, yaitu mekanisme donor proton, *radical scavenger*, *oxygenquencher*, dan inhibisi dengan enzim (Gordon, 1990). Kandungan antioksidan yang terdapat pada tanaman bertindak sebagai *radical scavenger* dan membantu mengkonversikan radikal bebas yang kurang reaktif. Antioksidan alami yang terdapat pada seluruh bagian tanaman berupa karotenoid, vitamin, flavonoid, dan fenol (Mandal *et al.*, 2009).

Salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai antioksidan adalah *Etlingera elatior*. Tanaman ini merupakan salah satu famili zingiberaceae yang merupakan tanaman asli Indonesia (Sukandar *et al.*, 2010). Beberapa penelitian mengenai aktivitas antioksidan yang terdapat pada tanaman *Etlingera elatior* telah dilakukan. Hasil penelitian Handayani *et al.* (2014) menyebutkan bahwa pengujian antioksidan dengan metode DPPH pada ekstrak metanol bunga dan daun kecombrang memiliki nilai IC_{50} sebesar 30,65 $\mu\text{g/mL}$ untuk daun, dan bunga 101,84 $\mu\text{g/mL}$.

Hasil studi lain menunjukkan bahwa kecombrang dapat dipakai untuk mengobati penyakit-penyakit yang tergolong berat seperti kanker dan tumor. Senyawa kimia stigmas-4-en-3-one dan stigmast-4-en-6b-ol-3-one dari rimpang tanaman ini terbukti mempunyai sifat menghambat pertumbuhan tumor berdasarkan EBV-EA (*Epstein Barr Virus Early Antigens*) assay. Senyawa-senyawa tersebut juga bersifat sitotoksik terhadap kultur sel kanker CEM-SS (LC_{50} 4 $\mu\text{g/ml}$) berdasarkan MTT (*methyl thiazole tetrazolium*) assay, sehingga direkomendasikan untuk dapat dipakai sebagai obat atau campuran obat antikanker (Habsah *et al.*, 2005). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Lestari dan Ruswanto (2015) menunjukkan bahwa bunga kecombrang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D sehingga dapat direkomendasikan sebagai obat antikanker.

Penelitian ini bertujuan untuk menetapkan aktivitas antioksidan secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan metode 1,1-difenil-2-pikrihidrazil (DPPH) dan aktivitas sitotoksik menggunakan metode BSLT, serta menetapkan kadar senyawa fenol totalnya menggunakan reagen Folin Ciocalteu dari ekstrak daun,

bunga, dan rimpang kecombrang yang berasal dari daerah Bandung.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan, yaitu mulai dari penyiapan bahan meliputi pengumpulan bahan, determinasi tanaman, dan proses pengolahan bahan hingga menjadi simplisia, pemeriksaan karakteristik simplisia, skrining fitokimia, ekstraksi, fraksinasi, pengujian aktivitas antioksidan baik secara kualitatif maupun kuantitatif, dan menetapkan kadar fenol total.

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 70% sebagai pelarut. Ekstraksi masing-masing bahan dilakukan selama 3x24 jam.

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Uji secara kualitatif dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), hasil positif sebagai antioksidan ditandai dengan adanya bercak kuning berlatar ungu dari larutan DPPH. Uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif adalah dengan menghitung nilai IC_{50} (*Inhibitor Concentration*) dari masing-masing sampel. Sampel direaksikan

dengan larutan DPPH kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm.

Pengujian sitotoksik sebagai skrining awal antikanker dilakukan terhadap larva udang *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam dengan metode BSLT. Pengujian dilakukan selama dua puluh empat jam, kemudian dihitung nilai LC₅₀.

Penetapan kadar fenol total pada ekstrak uji dilakukan menggunakan reagen Folin Ciocalteu, dengan asam galat sebagai standar. Kadar fenol dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 765 nm. Hasil pengukuran dihitung sebagai nilai % mg/g asam galat dari kurva kalibrasi yang didapat.

Hasil dan Pembahasan

Penyiapan Bahan

Penyiapan bahan daun, bunga, dan rimpang kecombrang diperoleh dari Kabupaten Bandung, Jawa Barat. Daun, bunga, dan rimpang kecombrang dibersihkan terlebih dahulu dari pengotor-pengotor kemudian dilakukan pencucian. Selanjutnya dilakukan perajangan atau merubah sampel ke bentuk yang lebih kecil, kemudian pengeringan dilakukan menggunakan oven pada suhu 40 °C.

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam simplisia daun, bunga, dan rimpang kecombrang. Skrining fitokimia ini meliputi pemeriksaan alkaloid, flavonoid, saponin, kuinon, tannin, dan steroid/triterpenoid. Adapun hasil dari penapisan fitokimia ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil skrining fitokimia

Parameter	Daun	Bunga	Rimpang
Alkaloid	-	-	-
Flavonoid	+	+	+
Saponin	+	-	-
Tanin	+	+	+
Kuinon	+	+	+
Steroid/Triterpenoid	+	+	+

Keterangan:

(+) mengandung senyawa yang diuji; (-) tidak mengandung senyawa yang diuji.

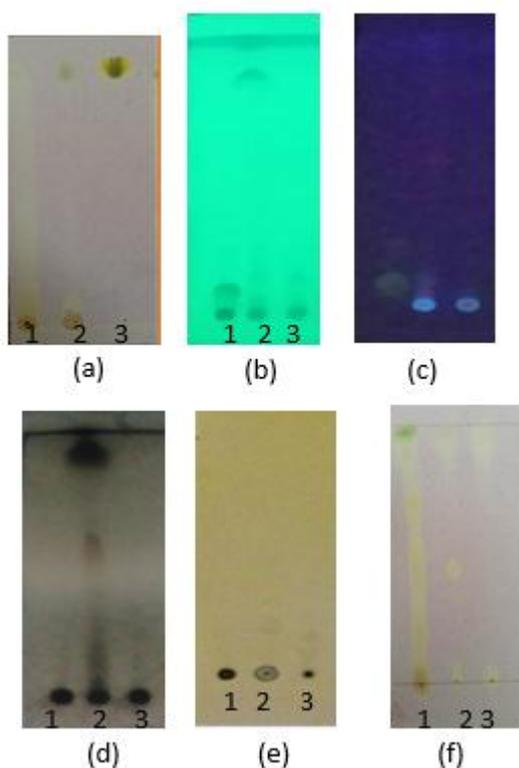
Pengolahan Bahan

Daun, bunga, dan rimpang kecombrang masing-masing sebanyak 500 gram diekstraksi dengan metode maserasi selama 3x24 jam dengan pelarut etanol 70%. Ekstrak yang didapat kemudian dipekatkan dengan alat penguap berputar hampa udara dan didapatkan rendemen ekstrak

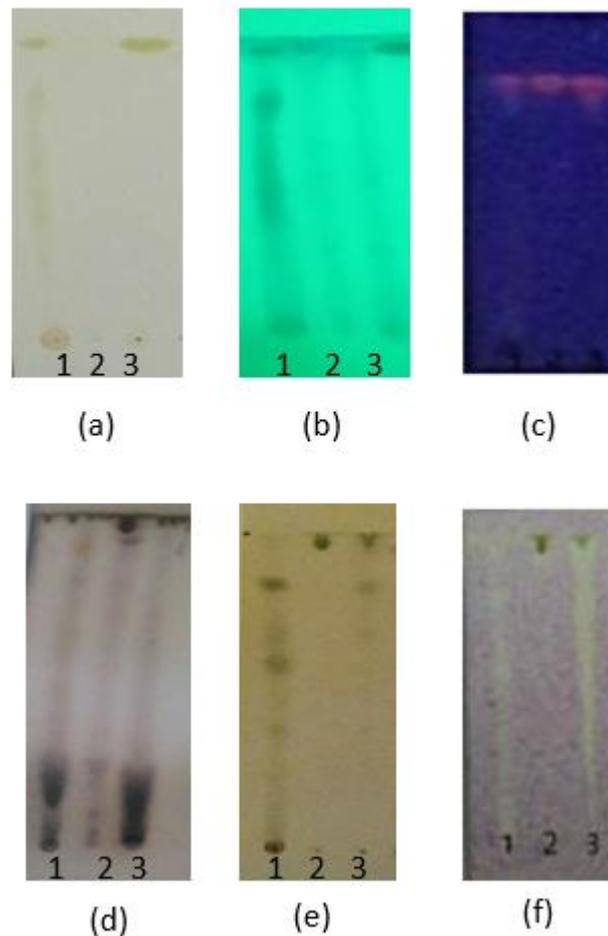
19,95% untuk daun, 10,66% untuk bunga, dan 11,43% untuk rimpang.

Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan secara kualitatif dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ prasalut dan fase gerak sesuai. Penampak bercak yang digunakan yaitu H₂SO₄ 10%, FeCl₃ 10% dan DPPH 0,2% dalam metanol.



Gambar 1. Kromatogram ekstrak dengan fase gerak n-heksana : etil asetat = 8 : 2. KLT fase diam silika gel GF₂₅₄ prasalut, (1) ekstrak bunga, (2) ekstrak daun, (3) ekstrak rimpang. (a) visual, (b) di bawah lampu UV λ 254 nm, (c) di bawah lampu uv λ 366 nm, (d) penampak bercak H₂SO₄ 10%, (e) penampak bercak FeCl₃, (f) DPPH 0,2% dalam metanol.



Gambar 2. Kromatogram dengan fase gerak asam format : etil asetat : air = 8 : 1 : 1. KLT fase diam silika gel GF₂₅₄ prasalut, (1) ekstrak bunga, (2) ekstrak daun, (3) ekstrak rimpang. (a) visual, (b) di bawah lampu UV λ 254 nm, (c) di bawah lampu uv λ 366 nm, (d) penampak bercak H₂SO₄ 10%, (e) penampak bercak FeCl₃, (f) DPPH 0,2% dalam metanol.

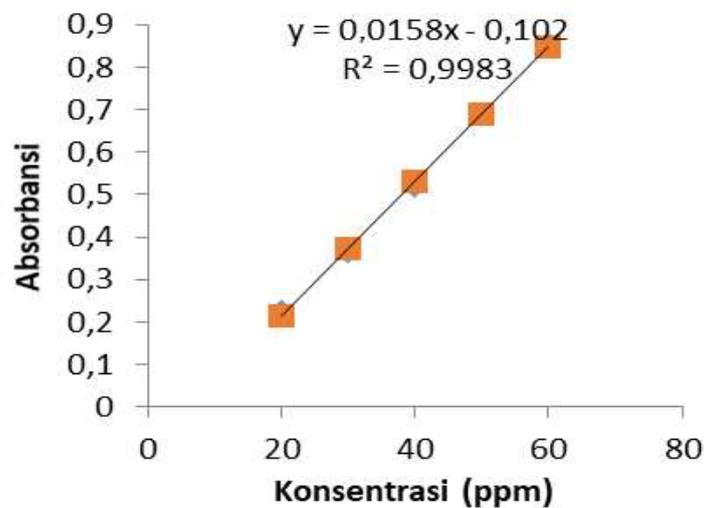
Dari hasil pengujian secara kualitatif setelah disemprot penampak bercak FeCl₃ 10%, menunjukkan hasil positif dengan munculnya warna (bercak) hitam pada sampel ekstrak dan fraksi untuk menunjukkan adanya senyawa fenolat, pereaksi DPPH 0,2% dalam metanol menunjukkan adanya senyawa antioksidan dengan adanya

bercak berwarna kuning dengan latar ungu yang muncul (Gambar 1 dan 2).

Pengujian aktivitas antioksidan secara kuantitatif diuji secara *in vitro* terhadap ekstrak dan fraksi menggunakan DPPH sebagai radikal bebas. Metode ini memanfaatkan pengukuran serapan DPPH yang teroksidasi oleh larutan uji pada saat

inkubasi sehingga diperoleh nilai absorbansi yang lebih rendah dibandingkan nilai absorbansi kontrol (larutan stok DPPH : metanol = 1 : 1). Kurva kalibrasi DPPH dibuat untuk

menunjukkan hubungan linieritas antara respon absorbansi larutan dengan konsentrasi larutan DPPH yang terekam pada instrumen spektrofotometer UV-sinar tampak.



Gambar 3. Kurva kalibrasi DPPH.

Kurva pada Gambar 3 menunjukkan bahwa DPPH 60 ppm dengan panjang gelombang 516 nm dapat digunakan untuk pengujian antioksidan secara *in vitro* pada standar kuersetin dan sampel ekstrak daun, bunga, dan rimpang kecombrang. Selanjutnya larutan stok DPPH ditambah metanol p.a dengan perbandingan volume (1:1), ditambahkan ke dalam beberapa variasi konsentrasi standar dan sampel kemudian diinkubasi selama 30

menit. Setelah inkubasi selanjutnya dilakukan pengukuran pada panjang gelombang serapan maksimum DPPH yang didapat. Adanya aktivitas dari sampel mengakibatkan terjadinya perubahan warna dari yang semula warna ungu kemudian menjadi warna kuning. Semakin pekat perubahan warna kuning yang terjadi semakin kuat pula aktivitas antioksidannya. Selanjutnya nilai peredaman 50% radikal bebas (IC_{50}) pada sampel uji dihitung dengan

menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh antara konsentrasi sampel (x) terhadap persen inhibisi. Nilai IC₅₀ menunjukkan nilai konsentrasi efektif

yang dapat meredam 50% radikal bebas (DPPH). Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Aktivitas antioksidan

Sampel Kecombrang	IC ₅₀ (µg/mL)	r ²
Ekstrak Daun	52,05	0,996
Ekstrak Bunga	457,54	0,983
Ekstrak Rimpang	310,69	0,981
Standar Kuersetin	10,05	0,998

Data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ terbaik terdapat pada sampel ekstrak daun kecombrang yang menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat karena menunjukkan hasil IC₅₀ < 100 ppm. Sedangkan sampel yang lainnya menunjukkan aktivitas antioksidan sangat lemah.

Pengujian Aktivitas Sitotoksik

Daya toksisitas suatu senyawa dapat diketahui dengan menghitung jumlah kematian larva *Artemia salina* dengan parameter LC₅₀ kurang dari 1000 µg/ml.

Perhitungan nilai LC₅₀:

$$= \frac{\text{jumlah larva mati}}{\text{jumlah larva total}} \times 100\%$$

Pengamatan potensi bioaktivitas dilakukan berdasarkan nilai LC₅₀ yaitu suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi zat toksik yang dapat mengakibatkan kematian organisme sampai 50%. Apabila LC₅₀ < 30 ppm maka ekstrak sangat toksik, sedangkan jika LC₅₀ 31 ppm-1000 ppm bersifat toksik yang memiliki potensi mengandung senyawa biokatif antikanker.

Pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak merupakan skrining awal antikanker dilakukan terhadap 10 larva udang *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam dengan metode BSLT. Pengujian dilakukan selama dua puluh empat jam, untuk selanjutnya dihitung nilai LC₅₀.

Tabel 3. Aktivitas sitotoksik

Sampel Kecombrang	Konsentrasi (ppm)	% Kematian	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak Daun	50	0	859,039
	100	13,3	
	200	26,7	
	500	36,7	
	1000	53,3	
Ekstrak Bunga	50	23,3	418,022
	100	40	
	200	46,7	
	500	60	
	1000	70	
Ekstrak Rimpang	50	0	1261,202
	100	13,3	
	200	23,3	
	500	33,3	
	1000	40	

Data pada Tabel 3 yang merupakan hasil pengujian aktivitas sitotoksik menunjukkan bahwa ekstrak daun dan bunga menunjukkan nilai LC₅₀ < 1000 ppm, sedangkan ekstrak rimpang menunjukkan nilai LC₅₀ > 1000 ppm. Ekstrak daun dan bunga kecombrang memiliki aktivitas sitotoksik yang kuat terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

Penetapan Kadar Fenol Total

Teknik penetapan kadar fenol menggunakan reagen Folin Ciocalteu yang dilarutkan dalam akuades (1:10). Sebanyak 0,5 mL sampel ekstrak dari larutan induk ditambahkan 5 mL reagen Folin Ciocalteu dan diinkubasi 5 menit,

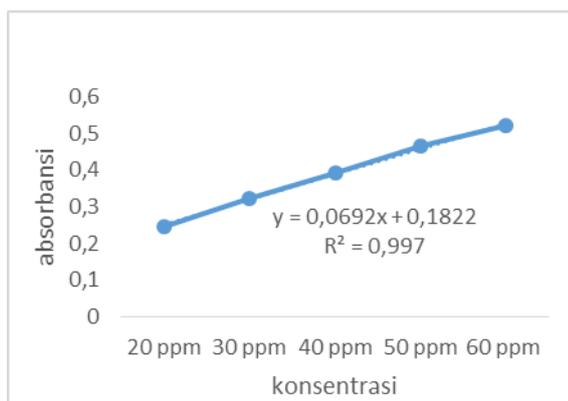
kemudian larutan tersebut ditambahkan Na₂CO₃ 1 M dan diinkubasi selama 15 menit, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 765 nm. Gambar 4 menunjukkan kurva kalibrasi asam galat. Dari hasil kurva kalibrasi diperoleh persamaan regresi linier dengan nilai $r^2 = 0,997$.

Selanjutnya pengukuran terhadap sampel ekstrak daun, bunga, dan rimpang kecombrang dilakukan dengan perlakuan yang sama terhadap standar asam galat. Data absorbansi hasil pengukuran dimasukkan ke dalam kurva kalibrasi asam galat dimana absorbansi sampel uji yang didapat dinyatakan sebagai "y" dan nilai "x"

sebagai konsentrasi galat ekivalen. persamaan berikut:

Perhitungan kadar fenol (%) didapat dari

$$\text{Kadar Fenol Total (\%)} = \frac{\text{sampel ekivalen (\mu\text{g/mL}) \times \text{volume total metanol (mL)} \times \text{faktor pengenceran (mL)}}{\text{berat sampel (mg)} \times 100 \text{ Fp}}$$



Gambar 4. Kurva kalibrasi asam galat.

Tabel 4. Kadar fenol total

Sampel Kecombrang	Sampel Ekivalen (ppm)	Kadar Fenol Total (%)
Ekstrak Daun	3,407	0,339 ± 0,007
	3,451	
	3,321	
Ekstrak Bunga	1,384	0,144 ± 0,024
	1,702	
	1,225	
Ekstrak Rimpang	0,561	0,074 ± 0,018
	0,749	
	0,922	

Keterangan: konsentrasi sampel 1000 ppm.

Tabel 4 menunjukkan hasil pengukuran kadar fenol total. Dari data pengukuran kadar fenol total dapat disimpulkan bahwa sampel yang

memiliki kadar fenol total paling tinggi terdapat pada ekstrak daun kecombrang dengan kadar 0,339%.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian terhadap sampel ekstrak daun, bunga, dan rimpang kecombrang didapatkan data sebagai berikut:

1. Aktivitas antioksidan yang paling baik adalah ekstrak daun kecombrang, menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai $IC_{50} = 52,05$ ppm, sedangkan ekstrak bunga dan rimpang memiliki nilai IC_{50} 457,54 ppm dan 310,69 ppm yang menunjukkan aktivitas antioksidan yang sangat lemah.
2. Aktivitas sitotoksik ekstrak daun dan bunga kecombrang menunjukkan nilai $LC_{50} < 1000$ ppm yaitu 859,039 dan 418,022 ppm. Sedangkan ekstrak rimpang $LC_{50} > 1000$ ppm.
3. Hasil penetapan kadar fenol total pada ekstrak daun, bunga, dan rimpang secara berurutan hasilnya $0,3393 \pm 0,0066\%$; $0,14374 \pm 0,0242\%$; dan $0,0744 \pm 0,0181\%$.
4. Ekstrak daun kecombrang memiliki aktivitas antioksidan dan kadar fenol yang lebih tinggi dari ekstrak lainnya. Ekstrak daun dan bunga kecombrang memiliki potensi sebagai agen antikanker karena memiliki nilai $LC_{50} < 1000$ ppm.

Daftar Pustaka

- Badarinath, A., Rao, K., Chetty, C.S., Ramkanth, S., Rajan, T., dan Gnanaprakash, K.A. 2010. Review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations, and considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2010:1276-1285.
- Gordon, M.H. 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro. In: *Food Antioxidants*, eds Hudson, B.J.F. Dordrecht: Springer.
- Habsah, M., Ali, A.M., Nakatani, N. 2005. Antitumour-promoting and cytotoxic constituents of *Etlingera elatior*. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 12(1):6–12.
- Handayani, V., Ahmad, A.R., dan Sudir, M. 2014. Uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol bunga dan daun patikala (*Etlingera elatior* (Jack) R.M.Sm) menggunakan metode DPPH. *Pharmaceutical Sciences & Research*, 1(2):86-93.
- Mandal, S., Yadav, S., Nema, R. 2009. Antioxidants: a review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 1(1):102-104.
- Sukandar, D., Radiastuti, N., Jayanegara, I., dan Hudaya, A. 2010. Karakterisasi senyawa aktif antibakteri ekstrak air bunga kecombrang (*Etlingera elatior*) sebagai bahan pangan fungsional. *Jurnal Kimia Valensi*, 2(1):333-339.
- Lestari, T dan Ruswanto. 2015. Potensi antikanker dari ekstrak bunga

kecombrang dengan berbagai tingkat kepolaran terhadap sel T47D. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*, 14(1):8-11.

Vaya, J. dan Aviram, M. 2001. Nutritional antioxidant: mechanism of action, analyses of activities and medical applications. *Current Medicinal Chemistry* -

Immunology, Endocrine & Metabolic Agents, 1:99-117.

WHO. 2010. World Health Organization (WHO) Technical Report Series: Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Geneva: WHO.