

Uji Antagonis Jamur Tempe (*Rhizopus Sp*) terhadap Bakteri Patogen Enterik

Dewi Peti Virgianti

STIKes Bakti Tunas Husada, Jl. Cilolohan 36 Tasikmalaya Jawa Barat.
e-mail : dewivirgianti@gmail.com

Abstract

Indonesian tempeh is a food product made from soybeans fermented by *Rhizopus oligosporus*. The role of *R. oligosporus* as the primary fungi in soybean is very important, that changing the composition of the substrate soybeans into food that is more nutritious and contains many enzymes and bioactive compounds, including antibacterial compounds. This study was aimed at testing the antibacterial activity of *Rhizopus sp* fungus isolated from commercial tempeh against several enteric pathogen bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and *Shigella flexneri* ATCC 12022. The tests were conducted by the antagonism test agar diffusion method, by putting pieces of SDA that has grown *Rhizopus sp* on agar Muller Hinton which test bacteria was inoculated. The incubation period was 24 hours at 37 ° C. The results showed that *Rhizopus sp* has antagonistic to the bacteria, which produce inhibitory zone of 28 mm against the *E. coli* ATCC 25922, 26 mm against *S. typhimurium* ATCC 14028 and 39.5 mm against *Shigella flexneri* ATCC 12022. Based on these results it can be concluded that the *Rhizopus sp* isolated from tempeh is antagonistic against enteric pathogenic bacteria. The results of this study reinforce the benefits of tempeh as a functional food.

Keyword: tempeh, *Rhizopus sp*, enteric pathogen bacteria, antibacterial activity

Abstrak

Tempe merupakan produk pangan Indonesia berbahan kacang kedelai yang difermentasi oleh *Rhizopus oligosporus*. Peranan *Rhizopus oligosporus* pada tempe sangat penting, yaitu sebagai jamur utama yang mengubah komposisi substrat kacang kedelai menjadi makanan yang lebih bernutrisi serta mengandung banyak enzim dan senyawa bioktif, diantaranya senyawa antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri jamur *Rhizopus sp* yang diisolasi dari tempe komersial terhadap beberapa bakteri patogen enterik, yaitu *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 dan *Shigella flexneri* ATCC 12022. Pengujian dilakukan dengan uji antagonisme metode difusi agar, yaitu dengan meletakkan potongan SDA yang telah ditumbuhi *Rhizopus sp* pada agar Muller Hinton yang telah diinokulasikan bakteri uji. Masa inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Rhizopus sp* bersifat antagonis terhadap bakteri uji, yaitu menghasilkan zona hambat sebesar 28 mm terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922, 26 mm terhadap *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 dan 39,5 mm terhadap *Shigella flexneri* ATCC 12022. Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa *Rhizopus sp* yang diisolasi dari tempe bersifat antagonis terhadap bakteri patogen enterik. Hasil penelitian ini menguatkan manfaat tempe sebagai pangan fungsional.

Kata kunci: tempe, *Rhizopus sp*, bakteri patogen enterik, aktivitas antibakteri

Pendahuluan

Tempe merupakan pangan fungsional yang sangat bermanfaat bagi kesehatan karena mengandung banyak nutrisi dan komponen bioaktif. Banyak penelitian menunjukkan bahwa nutrisi dan komponen bioaktif pada tempe dihasilkan dari kapang, kamir, dan bakteri asam laktat, tetapi mikroorganisme utama yang berperan dalam fermentasi kedelai menjadi tempe yaitu *Rhizopus oligosporus* (Nout dan Kiers 2005; Nurdini *et al.*, 2015). *Rhizopus oligosporus* pada tempe berperan sebagai pengepak butiran kacang kedelai menjadi

bentuk padat dengan anyaman miselium. Selain itu peranan penting dalam proses enzimatik yang berfungsi dalam mengubah senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana sehingga mudah diserap oleh tubuh, yaitu mengandung semua asam amino esensial, kalsium, asam lemak, vitamin, isoflavon, serta menurunkan kandungan zat anti gizi asam fitat (Babu *et al.*, 2009).

Penelitian mengenai aktivitas komponen bioaktif tempe terhadap bakteri telah banyak dilakukan, di antaranya penelitian Soka *et al.* (2014) menunjukkan

bahwa konsumsi tempe pada tikus Sprague-Dawley dapat meningkatkan populasi *Bacterioidetes*, sehingga mengindikasikan bahwa tempe dapat memodulasi komposisi mikrobiota usus menjadi lebih sehat. Berdasarkan kultur *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak tempe bersifat menghambat pertumbuhan *Basilus subtilis*, tetapi dapat menstimulasi pertumbuhan *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* yang merupakan flora normal usus (Kuligowski *et al.*, 2013). Ekstrak tempe mentah dapat menghambat pertumbuhan *Basillus cereus* dan sporanya (Roubous *et al.*, 2010) dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Basillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* (Mambang *et al.*, 2014).

Salah satu penyakit yang dapat dicegah dengan mengonsumsi tempe yaitu penyakit diare (Kiers *et al.*, 2003; Nout dan Kiers 2005; Roubous *et al.*, 2011). Pada penelitian Karmini *et al.* (1997) dapat dibuktikan bahwa konsumsi pangan berbahan dasar tempe pada tikus jantan dapat mengurangi diare yang disebabkan oleh EPEC. Begitu pula dengan Kiers *et al.* (2003) yang membuktikan bahwa konsumsi tempe dapat mengurangi insiden diare pada babi.

Kandungan senyawa aktif pada tempe yang dihasilkan dari proses metabolisme jamur *Rhizopus oligosporus* dapat digunakan sebagai fermentor. Pemurnian protein yang bersifat antibiotik dari larutan hasil fermentasi biakan *Rhizopus oligosporus* salah satunya dilakukan oleh Kobayasi *et al.* (1992), protein sederhana dengan berat molekul 5.500 yang mengandung komponen asam amino cystein yang tinggi tersebut sangat aktif melawan bakteri Gram positif. Kajian mengenai peranan jamur tempe *Rhizopus sp* dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen enterik belum dilakukan. Bakteri patogen enterik diantaranya adalah Entero Patogenic *Escherichia coli* (EPEC) penyebab diare, *Salmonella typhi* penyebab demam tifoid dan *Shigella sp* penyebab penyakit disentri, prevalensi penyakit-penyakit tersebut di Indonesia masih sangat tinggi. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk melihat aktivitas antibakteri dari *Rhizopus sp* yang diisolasi dari tempe terhadap beberapa bakteri patogen enterik yaitu *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, dan

Shigella flexneri ATCC 12022.

Materi dan metode

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah autoklaf, inkubator, cawan petri, erlenmeyer, gelas kimia, *laminar air flow cabinet*, jangka sorong, pinset, kaca objek, kaca penutup, timbangan analitik, tabung durham. Bahan-bahan yang digunakan adalah tempe komersial yang dibeli di kec. Cineam Kab. Tasikmalaya, Sabouraud Dextrose Agar (SDA), medium agar Muller Hinton. Bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 dan *Shigella flexneri* ATCC 12022 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Prodi Analis Kesehatan STIKes BTH Tasikmalaya.

Isolasi jamur tempe

Tempe dipotong dengan ukuran 5 cm x 5 cm, kemudian menggunakan jarum ose lurus steril diambil jamurnya dan diletakkan pada SDA. Inkubasi dilakukan dalam waktu 7 hari pada suhu ruangan.

Pengujian aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan uji antagonisme metode difusi agar. Disediakan medium agar Muller Hinton. Diinokulasikan bakteri uji dengan membentuk goresan padat pada agar. Pada isolat jamur tempe yang telah tumbuh pada media SDA, diambil sedikit bagian agar yang telah ditumbuhi fungi dengan menggunakan lingkaran tabung durham steril, kemudian bagian agar tersebut diletakkan pada bagian tengah medium Muller Hinton yang telah diinokulasikan bakteri uji. Dilakukan pengujian secara duplo. Kontrol perlakuan dilakukan dengan cara yang sama terhadap agar yang tidak diinokulasikan fungi yang diletakkan pada medium Muller Hinton yang telah diinokulasikan bakteri uji. Inkubasi dilakukan selama 24 jam, untuk kemudian diamati diameter zona hambat yang terbentuk.

Karakterisasi jamur tempe secara makroskopik dan mikroskopik

Isolat jamur tempe yang diperoleh dikarakterisasi secara makroskopik pada medium SDA, dengan dilakukan pengamatan terhadap morfologi fungi meliputi bentuk koloni, warna koloni, warna

sebalik koloni (*reverse side*), ada tidaknya tetes eksudat, garis radial, garis konsentris dan karakteristik khusus yang dimiliki.

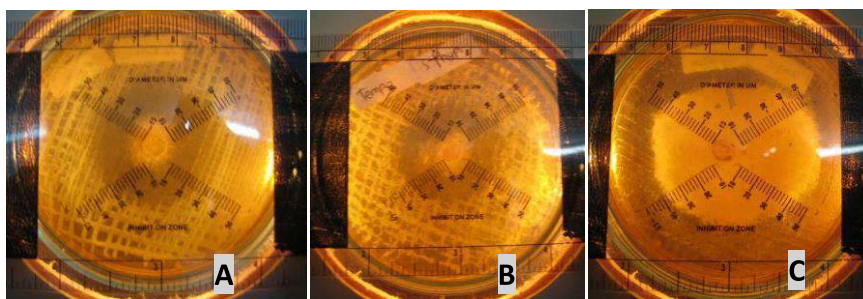
Pengamatan morfologi mikroskopis dilakukan dengan teknik *moist chamber* (de La Maza *et al.*, 1997), yaitu dengan meneteskan SDA cair ke atas permukaan kaca objek steril, dan diinokulasikan dengan spora fungi yang akan diamati kemudian ditutup dengan kaca penutup, kaca objek tersebut diletakkan pada cawan petri steril yang telah didasari oleh kapas basah steril dan kaca yang dibengkokkan sebagai dasar agar kaca objek tidak bersentuhan langsung dengan kapas basah. Cawan petri tersebut ditutup dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 7 hari. Setelah fungi tumbuh kemudian kaca penutup pada *moist chamber* tersebut diletakkan pada kaca objek baru, kemudian dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 100x dan 400x. Pengamatan mikroskopik yang dilakukan

meliputi ada tidaknya septat pada hifa, warna hifa, percabangan hifa, struktur reproduksi (bentuk spora, warna spora) serta tangkai penghasil spora atau sporangiofor.

Hasil dan Pembahasan Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antagonis antibakteri jamur tempe yang dilakukan dengan metode difusi agar diperoleh hasil bahwa jamur tempe yang diisolasi menghasilkan zona hambat yang cukup besar terhadap pertumbuhan bakteri uji, yaitu mempunyai diameter zona hambat sebesar rata-rata 28 mm terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922, 26 mm terhadap *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, dan 39,5 mm terhadap *Shigella flexneri* ATCC 12022 (tabel 1; gambar 1). Sedangkan pada kontrol, yaitu SDA tanpa jamur tempe yang diletakkan pada bakteri uji tidak menghasilkan zona hambat.

Tabel 1. Diameter zona hambat uji aktivitas antagonism antibakteri jamur tempe terhadap bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 dan *Shigella flexneri* ATCC 12022.

Bakteri uji	Diameter Zona Hambat		Rata-rata (mm)
	Ulangan 1	Ulangan 2	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	28	28	28
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	27	25	26
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	40	39	39,5



Gambar 1. Diameter zona hambat yang dihasilkan oleh isolat jamur tempe terhadap bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 (A), *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (B), dan *Shigella flexneri* ATCC 12022 (C) pada agar Muller Hinton dengan metode difusi agar.

Diameter zona hambat yang diperoleh pada pengujian relatif kuat karena mempunyai diameter yang cukup besar. Interpretasi zona hambat antibiotik terhadap bakteri uji dapat dikategorikan antara rentang resisten, intermediet dan *susceptible*. Berdasarkan NCCLS (2002) bahwa untuk bakteri *Enterobacteriaceae* dapat dikatakan *susceptible* apabila zona hambat yang dihasilkan pada pengujian dengan metoda difusi agar oleh antibiotik ampicillin ≥ 17 mm, dengan antibiotik kloramfenikol ≥ 18 mm, dengan antibiotik cotrimoxazol ≥ 16 mm, dengan antibiotik ciprofloxacin ≥ 21 mm, dan dengan antibiotic nalidixic acid ≥ 19 mm.

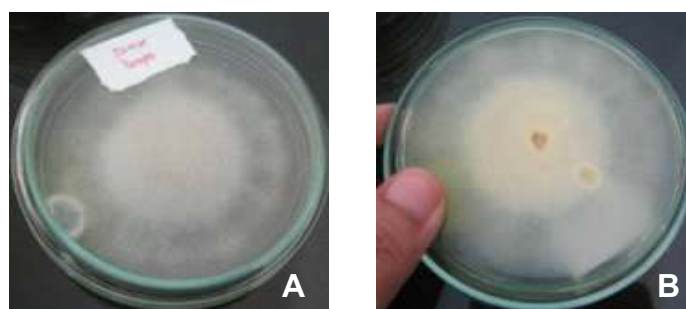
Berdasarkan besarnya zona hambat yang terbentuk dari uji antagonis metode difusi agar yang dilakukan jamur tempe terhadap bakteri patogen enterik *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 dan *Shigella flexneri* ATCC 12022 maka besarnya zona hambat tersebut dapat dikategorikan dalam rentang *susceptible*. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat *Rhizopus sp* tersebut menghasilkan suatu senyawa bioaktif yang bersifat antibakteri terhadap bakteri uji.

Beberapa penelitian mengenai kemampuan *Rhizopus oligosporus* dalam menghasilkan senyawa antibakteri telah dilaporkan diantaranya oleh Nout (1989)

yaitu mampu menghambat pertumbuhan beberapa mikroba uji diantaranya mampu menghambat pertumbuhan *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus parasiticus* serta menghambat akumulasi Aflatoxin B1 yang dihasilkannya. Protein yang bersifat antibakteri dapat dihasilkan oleh *Rhizopus oligosporus* dan telah berhasil dimurnikan oleh Kobayashi *et al* (1992), protein tersebut aktif dalam melawan *Basillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus cremoris*.

Karakteristik jamur tempe

Setelah dilakukan penanaman kembali isolat jamur tempe pada SDA dan diinkubasi selama satu minggu, didapatkan beberapa koloni jamur, tetapi isolat yang mendominasi adalah isolat jamur berwarna putih yang diduga jamur *Rhizopus sp*. Kemudian dilakukan penanaman kembali isolat tersebut sebagai tahap pemurnian untuk pengujian. Ciri-ciri koloninya mempunyai miselium seperti kapas, berwarna putih keabuan menyebar menutupi cawan petri, tetapi terjadi pemusatan ketebalan pada bagian tengah koloni, sedangkan miselium bagian pinggir koloni lebih tipis. Warna sebalik koloni berwarna putih krem. Tidak terdapat tetes eksudat dan tidak terdapat garis radial (gambar 2).

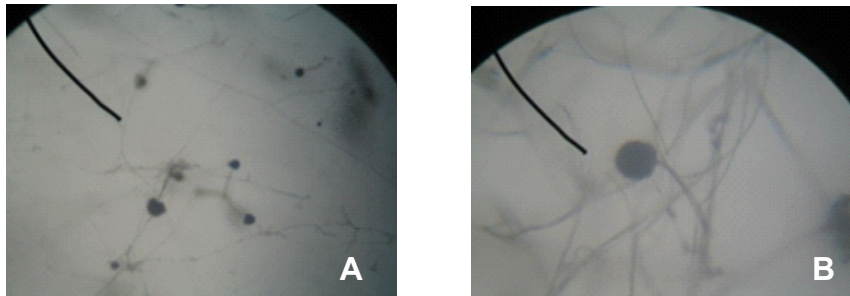


Gambar 2. Morfologi koloni jamur tempe bagian atas (A), dan bagian sebalik koloni (B).

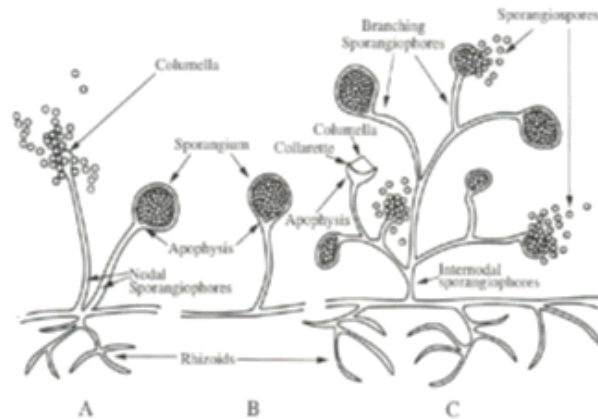
Pada pengamatan mikroskopik dengan menggunakan metoda *moist chamber* diperoleh ciri-ciri isolat jamur tempe mempunyai hifa yang tipis tidak berseptat, terdapat hifa horizontal berupa stolon yang dari stolon tersebut merupakan tempat munculnya percabangan sporangiofor dimana terbentuk juga rizoid (seperti akar), warna hifa putih transparan. Struktur

reproduksi berupa sporangium yang ditopang oleh sporangiofor, spora berwarna abu kehitaman berbentuk bulat berisi spora (gambar 3).

Berdasarkan ciri-ciri mikroskopik yang diamati, jamur tempe sesuai dengan Zygomycetes genera *Rhizopus sp* (gambar 4).



Gambar 3. Morfologi mikroskopik jamur tempe, hifa/stolon, sporangiofor dan rizoid (A), Sporangium dan spora (B).



Gambar 4. Ciri-ciri Zygomycetes, *Rhizopus sp.* (A), *Mucor sp.* (B), pembentukan sporangiofor internodal. (de La Maza *et al.*, 1997).

Genera *Rhizopus sp* digunakan sebagai jamur utama dalam fermentasi tempe, pada starter tempe yang di jual komersial dengan merk tertentu dan secara umum digunakan sebagai starter pembuatan tempe secara umum mengandung jamur *Rhizopus oligosporus*. Dari sekian banyak mikroba yang terlibat para ahli bersepakat bahwa fakta membuktikan bahwa yang utama berperan dalam proses fermentasi adalah *Rhizopus oligosporus* (Babu, 2009). Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Dewi dan Aziz (2011) yang melakukan isolasi *Rhizopus sp* dari inokulum ragi tempe pada sentra tempe di 4 desa di Kabupaten Banyumas, usar daur waru, usar daun jati dan usar daun pisang yang biasa digunakan dalam pembuatan tempe, diperoleh beberapa isolat jamur, dari 55 isolat yang diperoleh 19 isolat diidentifikasi sebagai *Rhizopus oligosporus*. Isolat jamur *Rhizopus sp* pada penelitian ini belum diidentifikasi sampai penentuan spesies, tetapi dari ciri-ciri koloni dengan

miselium putih keabuan dan spora abu kehitaman, serta mempunyai hifa halus dengan sporangiosfor yang tidak terlalu panjang dan sporangium berbentuk bulat (*globosa*) maka sesuai dengan ciri-ciri *Rhizopus oligosporus* namun harus dipastikan dengan penelitian lebih lanjut.

Rhizopus sp dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang bersifat antibakteri terhadap beberapa bakteri gram positif. Ekstrak tempe 1% dalam media BHI diantaranya dapat menghambat pertumbuhan *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria innocua* dan *Listeria monocytogenes*, namun tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif *E.coli* dan *Salmonella enteriditis*. Namun pada penelitian-penelitian dengan perlakuan yang berbeda dapat menunjukkan aktivitas antibakteri berspektrum luas pada bakteri Gram positif dan Gram negatif *B. cereus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *Proteus vulgaris*, *S. aureus* dan

Salmonella typhi (Roubous 2011). Penggunaan ekstrak tempe 1% yang dilakukan oleh Roubous (2011) tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *Salmonella enteritidis* pada BHI dimungkinkan karena kandungan zat antimikroba terlarutnya sedikit sehingga tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri uji. Pada penelitian ini digunakan biakan jamur *Rhizopus sp* secara langsung yang diletakkan pada media agar yang telah diinokulasikan bakteri uji sehingga zat antibakteri yang dihasilkan oleh *Rhizopus sp* dapat terdifusi secara langsung terhadap bakteri uji sehingga sifat antagonis melawan bakteri uji dapat terlihat. Penggunaan *Rhizopus sp* secara langsung pada uji antagonis yang dilakukan berdasarkan pada kenyataan bahwa masyarakat Indonesia melakukan konsumsi tempe dalam jumlah yang cukup banyak, dan pada tempe tersebut tentu saja mengandung jamur *Rhizopus sp* dan produk-produk metabolit yang tersimpan pada substrat yang difermentasinya.

Simpulan

Bedasarkan hasil uji antagonis jamur tempe *Rhizopus sp* yang diisolasi dari tempe komersial yang dijual di Tasikmalaya terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, dan *Shigella flexneri* ATCC 12022, diperoleh diameter zona hambat yang cukup besar sehingga dapat disimpulkan bahwa jamur *Rhizopus sp* tersebut bersifat antagonis terhadap bakteri patogen enterik. Hasil tersebut dapat menguatkan manfaat tempe sebagai pangan fungsional.

Ucapan terimakasih

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada tim laboratorium Mikrobiologi yang telah banyak membantu terlaksananya penelitian ini.

Daftar Pustaka

Babu PD, Bhakayaraj R, Vidhyalakshmi R. 2009. A low cost nutritious "Tempe" – A Review. *World J Dairy Food Sci* 4(1): 22-27.

de La Maza LM, Pezzlo MT, Baron EJ. 1997. *Color Atlas of Diagnostic Microbiology*. Mosby-Year Book, Inc. St.Louis Missouri.

Dewi RS & Aziz S. 2011. Isolasi *Rhizopus oligosporus* pada beberapa inokulum tempe di Kabupaten Banyumas. *Molekul* 6(2): 93-104.

Karmini M, Affandi E, Hermana, Karyadi D, Winarno F. 1997. The inhibitory effect of tempe on *Escherichia coli* infection. In: *International Tempe Symposium*, Bali, Indonesia: 157-162.

Kiers JL, Meijer JC, Nout MJR., Rombouts FM, Nabuurs MJA and Van der Meulen J. 2003. Effect of fermented soya beans on diarrhoea and feed efficiency in weaned piglets. *Journal of Applied Microbiology* 95, 545–552. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02011.x.

Kobayasi SY,, Okazaki N, Koseki T. 1992. Purification and characterization of an antibiotic substance produced from *Rhizopus oligosporus* IFO 8631. *Bioscienc, Biotechnology and Biochemistry* 56 (1): 94-98.

Kuligowski M, Kuligowska IJ, Nowak J. 2013. Evaluation of Bean and Soy Tempeh Influence on Intestinal Bacteria and Estimation of Antibacterial Properties of Bean Tempeh. *Polish Journal of Microbiology*. 62(2): 189-194.

Kuligowski M, Kuligowska IJ, Nowak J. 2013. Evaluation of Bean and Soy Tempeh Influence on Intestinal Bacteria and Estimation of Antibacterial Properties of Bean Tempeh. *Polish Journal of Microbiology*. 62(2): 189-194.

Mambang DEP, Rosidah, Suryanto D. 2014. Aktivitas antibakteri ekstrak tempe terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus*. *J teknol dan Industri Pangan* 25(1): 115-118. DOI: 10.6066/jtip.2014.25.1.115.

NCCLS [National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twelfth Informational Supplement. NCCLS document M100-S12 [ISBN 1-56238-454-6]. NCCLS 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087 USA.

Nout MJR & Kiers JL. 2005. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. *J Appl Microbiol* 98: 789-805. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02471.x.

Nout MJR. 1989. Effect of *Rhizopus* and

- Neurospora* spp. on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* and accumulation of aflatoxin B1 in groundnut. *Mycological Research*, 93: 518-523.
- Nurdini AL, Nuraida L, Suwanto A dan Suliantari. 2015. Microbial growth dynamics during tempe fermentation in two different home industries. *International Food Research Journal* 22(4): 1668-1674. Journal homepage: <http://www.ifrj.upm.edu.my>.
- Roubous-van de Hil PJ, Dalmas E, Nout MJR, Abee T. 2010. Soya bean tempe extract show antibacterial activity against *Bacillus cereus* cells and spore. *Journal of Applied Microbiology* (109): 137-145. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04637.x.
- Roubus-van de Hill PJ, Nout MJR. 2011. Anti-Diarrhoeal aspect of fermented soya beans. *Soybean and health*. El-Shemy H (Ed). ISBN: 978-953-307-535-8. In Tech. DOI: 10.5772/17997. [internet][cited 12 Nov 2015]. Available from <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/19757.pdf>
- Soka S, Suwanto A, Sajuthi D, Rusmana I. 2014. Impact of Tempeh Supplementation on Gut Microbiota Composition in Sprague-Dawley Rats. *Research Journal of Microbiology*. DOI: 10.3923/jm.2014. [internet] [cited 13 Nov 2015]. Available from: <http://docsdrive.com/pdfs/academicjournals/jm/0000/64126-64126.pdf>