

## Isolation of Endophytic Fungi in Rhizophora Apiculata Mangroves in Teluk Buo Mangrove Area, Bungus Teluk Kabung District, West Sumatra

Rury Trisa Utami<sup>1\*</sup>, Delladari Mayefis<sup>2</sup>, Hesti Marliza<sup>3</sup>

Institut Kesehatan Mitra Bunda

**Corresponding Autor** : Rury Trisa Utami [rurytrisautami@ikmb.ac.id](mailto:rurytrisautami@ikmb.ac.id)

---

### ARTICLE INFO

*Keywords:* Endofit, Isolasi, Mangrove

*Received :* 3 August

*Revised :* 17 August

*Accepted:* 23 September

©2023 Utami, Mayefis, Marliza: This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Atribusi 4.0 Internasional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



### ABSTRACT

Endophytic fungi are microbes that live in plant tissues that are able to produce secondary metabolite compounds and have the potential to be antibacterial, antifungal and anticancer. Purpose: To isolate endophytic fungi on mangrove plants Rhizophora apiculata that can be used as antibiotics. Method: This study was conducted experimentally in the microbiology laboratory by isolating endophytic fungi in mangrove roots, after isolation followed by microscopic observations to identify the type of fungus that grew. Results: Based on the results of observation and identification, the endophytic fungal genus Penicilium sp was successfully isolated from the mangrove roots of Rhizophora apiculata. Conclusion: Penicilium sp is an endophytic fungus obtained from the roots of the mangrove Rhizophora apiculata

---

## Isolasi Jamur Endofit pada Mangrove *Rhizophora Apiculata* di Kawasan Mangrove Teluk Buo, Kabupaten Bungus Teluk Kabung, Sumatera Barat

Rury Trisa Utami<sup>1\*</sup>, Delladari Mayefis<sup>2</sup>, Hesti Marliza<sup>3</sup>

Institut Kesehatan Mitra Bunda

**Corresponding Autor** : Rury Trisa Utami [rurytrisautami@ikmb.ac.id](mailto:rurytrisautami@ikmb.ac.id)

---

### ARTICLE INFO

*Kata Kunci*: Endofit, Isolasi, Mangrove

*Received* : 3 August

*Revised* : 17 August

*Accepted*: 23 September

©2023 Utami, Mayefis, Marliza:

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Atribusi 4.0 Internasional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



### ABSTRAK

Jamur endofit adalah mikroba yang hidup di jaringan tumbuhan yang mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder dan berpotensi bersifat antibakteri, antijamur dan antikanker. Tujuan: Untuk mengisolasi jamur endofit pada tanaman mangrove *Rhizophora apiculata* yang dapat digunakan sebagai antibiotik. Metode: Penelitian ini dilakukan secara eksperimental di laboratorium mikrobiologi dengan mengisolasi jamur endofit pada akar mangrove, setelah isolasi dilanjutkan dengan pengamatan mikroskopis untuk mengidentifikasi jenis jamur yang tumbuh. Hasil : Berdasarkan hasil pengamatan dan identifikasi, jamur endofit genus *Penicilium* sp berhasil diisolasi dari akar mangrove *Rhizophora apiculata*. Kesimpulan: *Penicilium* sp merupakan jamur endofit yang diperoleh dari akar mangrove *Rhizophora apiculata*

---

### PENDAHULUAN

Prevalensi penyakit menular telah muncul sebagai masalah kesehatan masyarakat yang signifikan di negara-negara berkembang, seperti Indonesia. Menurut Mutasqof (2015) penyakit menular adalah kondisi patologis yang timbul karena adanya dan aktivitas mikroorganisme patogen, termasuk bakteri, virus, dan jamur. Menurut Darmadi (2008), Antibiotik berfungsi sebagai pendekatan utama untuk mengatasi infeksi menular. Antibiotik adalah senyawa kimia yang memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Mikroorganisme yang awalnya rentan terhadap antibiotik dapat mengembangkan resistensi terhadap mereka dari waktu ke waktu. (Refdanita, 2004). Infeksi yang disebabkan oleh resistensi bakteri terhadap antibiotik dapat meningkat dalam keparahan dan memerlukan perawatan yang berkepanjangan karena tantangan yang terkait dengan manajemen mereka dan biaya tinggi terapi antibiotik (Alanis, 2005).

Tanaman mangrove diakui sebagai salah satu sumber botani yang menampung sejumlah besar bahan kimia bioaktif yang disintesis oleh jamur endophytic. Menurut Noor *et al.* (2012), mangrove adalah jenis tanaman yang tinggal di zona transisi antara laut dan darat. Tanaman ini memiliki morfologi yang unik, menyerupai semak dan pohon. Selama tahap awal pertumbuhan,

akar mangrove menjadi mabuk dengan air, akhirnya menjadi terlihat di atas tanah. Menurut studi yang dilakukan oleh Noor et al. (2012), Lingkungan mangrove menunjukkan tingkat garam yang luar biasa dan memiliki kelimpahan bahan organik yang substansial, memfasilitasi penghuni berbagai komunitas mikroba yang mampu menghasilkan enzim melalui proses metabolisme. Barang-barang alami berfungsi sebagai reservoir utama antibiotik. Ekosistem mangrove menunjukkan kemampuan yang jelas untuk menghasilkan bahan kimia bioaktif baru yang luar biasa, termasuk antibiotik. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk sepenuhnya mengeksplorasi kemungkinan keragaman sumber daya alam, khususnya dalam kaitannya dengan spesies tumbuhan. Dari sudut pandang kimia tumbuhan, jelas bahwa tanaman berfungsi sebagai sumber yang berharga dari bahan kimia bioaktif yang sangat diminati. Prihatiningtias (2005) menyatakan bahwa bahan kimia bioaktif berasal dari banyak makhluk seperti tumbuhan, hewan, mikroorganisme, dan kehidupan laut, dengan eksplorasi yang sedang berlangsung bertujuan untuk menemukan senyawa baru dalam menanggapi penyakit yang muncul. Banyak penelitian telah mencapai isolasi jamur endophytic dari berbagai spesies tanaman mangrove. Namun, para ilmuwan saat ini terlibat dalam upaya untuk mengekstrak endophytes dari sistem akar spesies mangrove *Rhizophora* sp.

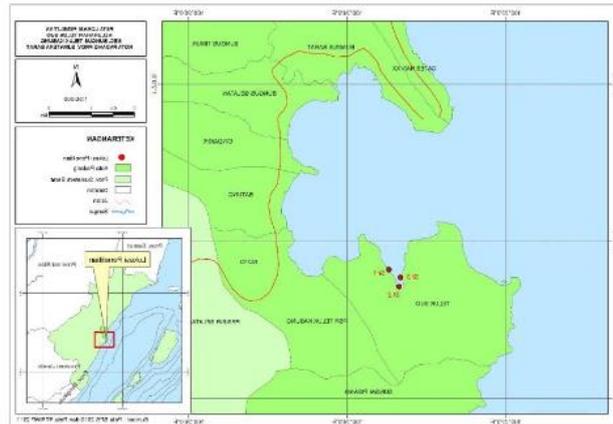
#### TINJAUAN PUSTAKA

Istilah "mangrove" berasal dari penggabungan kata Portugis "mangue" dan kata Inggris "grove". Dalam bahasa Portugis, istilah "mangrove" digunakan untuk menandai spesies tanaman tertentu, tetapi dalam bahasa Inggris, frasa "mangrove" mencakup baik komunitas tanaman yang berkembang di zona intertidal dan spesies individu yang terdiri dari komunitas. Tanaman mangrove dikenal karena kemampuan mereka untuk menghasilkan bahan kimia metabolit sekunder yang menunjukkan sifat antibakteri. Asam phenolic, glikosida, alkaloid, protein insaponins, flavonoid, terpenoid, steroid, dan senyawa logam yang mengikat pada bahan organik dihipotesis untuk berfungsi sebagai agen potensial untuk kontrol bakteri, secara khusus menargetkan bakteri patogen yang bertanggung jawab untuk menghasilkan penyakit. Pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh variasi gradient tekanan osmotik di seluruh membran seluler, agregasi protein denaturasi di dalam sitoplasma, gangguan sel membran karena iritasi, perubahan tingkat pH, dinamika emulsi, dan difusi cairan seluler. Di antara beberapa jenis tanaman mangrove, spesies *Rhizophora* sp telah diidentifikasi sebagai sumber penting dari bahan kimia metabolit sekunder (Hogarth, 1999). Selain itu, mangrove menunjukkan kelimpahan bahan kimia mikrobial yang tinggi, seperti alkaloid, flavonoid, fenol, terpenoid, steroid, tanin, dan saponin. Menurut Kordi (2012), Mikroorganisme endophytic mengacu pada hubungan simbiotik antara mikroorganisme dan jaringan tumbuhan. Hubungan biologis antara mikroba endophytic dan tanaman tuan rumah menunjukkan berbagai asosiasi, mulai dari interaksi netral hingga komensalisme dan simbiosis. Dalam skenario saat ini, tanaman berfungsi sebagai sumber nutrisi untuk mikroba endophytic, memfasilitasi penyelesaian siklus hidupnya. Sebuah mikroorganisme endophytic mengacu pada bakteri yang menunjukkan

kemampuan untuk tinggal di dalam organisme tuan rumah untuk durasi tertentu, sementara membangun koloni di dalam jaringan tanaman tanpa menyebabkan kerusakan pada tuan rumahnya. Setiap tanaman yang lebih tinggi memiliki potensi untuk menampung mikroorganisme endophytic, yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan metabolit biologis atau sekunder. Metabolit-metabolit ini diyakini telah muncul melalui koevolusi atau transfer genetik dari tanaman ke mikroba endofit (Radji 2005). Jamur endofit adalah jenis jamur yang membangun hubungan mutualistik dengan tanaman yang sehat dan hidup, tanpa menyebabkan infeksi gejala. Jamur endofit adalah organisme jamur yang tinggal, berkembang, dan berkembang di dalam jaringan tumbuhan. Jamur endofit memiliki kemampuan untuk menyerang jaringan spesifik tanaman sehat dan memiliki kapasitas untuk menghasilkan mikotoksin, enzim, dan antibiotik. Jamur endofit mengacu pada sekelompok jamur yang tinggal di dalam jaringan tanaman, menunjukkan hubungan komensal dengan tidak menginduksi manifestasi patologis yang dapat diidentifikasi pada tanaman tuan rumah mereka. Jamur endofit dan tanaman tuan rumahnya membangun hubungan simbiotik yang ditandai dengan mutualisme, di mana kedua organisme memperoleh manfaat dari asosiasi mereka. Menurut studi yang dilakukan oleh Gandjar *et al.* pada tahun 2006, Endofit mengacu pada jenis mikroba yang tinggal di jaringan tanaman tanpa menimbulkan gejala penyakit yang dapat diidentifikasi di tanaman tuan rumah. Mikroba endofit memperoleh nutrisi yang diperlukan untuk siklus hidup mereka dari tanaman tuan rumah mereka, sementara secara bersamaan memperoleh perlindungan terhadap patogen tanaman melalui bahan kimia yang disintesis oleh mikroba endophyte ini. Mikroorganisme endofit hadir pada kedua bakteri dan jamur, namun yang milik kelompok jamur adalah yang paling sering ditemukan.

## METODOLOGI

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2019. Sampel mangrove *R. apiculata* diambil secara acak dari Teluk Buo, Kecamatan Bungus teluk kabung Sumatera Barat. Penelitian dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang. Sampel mangrove *R. apiculata* dipilih secara acak dari salah satu perwakilan pohon pada zonasi mangrove kawasan Teluk Buo, Kecamatan Bungus Teluk Kabung. Bagian sampel mangrove *R. apiculata* yang diambil yaitu akar sebanyak  $\pm 500$  g setiap bagiannya. Sampel yang diambil dimasukkan ke dalam plastik sampel terlebih dahulu sebelum dipotong agar sampel tidak terkontaminasi. Pada penanganan di laboratorium, sampel yang telah diambil dicuci menggunakan air laut steril dicuci dengan air laut steril sebanyak 3 kali untuk menghilangkan kotoran, selanjutnya direndam menggunakan alkohol 70 % selama 1-2 menit. Setelah sampel direndam kemudian dibilas kembali menggunakan air laut steril (Kjer *et al.*, 2010).



Gambar 1. Lokasi Penelitian Mangrove Teluk Buo, Bungus

### Penumbuhan dan Isolasi Jamur pada Media PDB dan Media PDA

Sampel akar yang dipotong dimasukkan ke dalam media dalam rasio 1:9 (g/v), yang terdiri dari 10 g sampel dan 90 ml *Potato Dextrose Broth* (PDB). Sampel diproses untuk dicampur menggunakan shaker selama 4-7 hari sampai air mencapai warna coklat. Proses pencampuran dilakukan dengan kecepatan rotasi 150 putaran per menit (rpm) pada kondisi suhu lingkungan (Kjer *et al.*, 2010), sampel media PDB diperkenalkan ke dalam tabung reaksi menggunakan pendekatan pencernaan bertahap, dengan faktor pencerahan  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , dan  $10^{-6}$ . Sampel ketiga terakhir, yang terdiri dari 104,105 dan 10-6, digunakan untuk tujuan penanaman dengan cara dituangkan ke dalam cawan petri masing-masing volume 1 ml masing-masing. Media PDA, (*Potato Dextrose Agar*), disiapkan dan kemudian dituang dalam cawan Petri sambil homogenisasi sampai padat. Media yang telah dibuat diambil, dituangkan ke dalam cawan petri sambil dihomogenkan hingga media menjadi padat dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 25°C (Benson, 2002)

### Karakterisasi Jamur Endofit

Karakterisasi dilakukan pada koloni individu jamur melalui analisis makroskopik dan mikroskopis. Menurut Gandjar (1999), pengamatan makroskopis mencakup berbagai karakteristik koloni, termasuk warna dan permukaan mereka. (such as granular texture, roughness, smoothness, and the presence or absence of exudate drops). Pengamatan ini juga melibatkan memeriksa garis-garis radial yang membentang dari pusat ke tepi koloni, serta kehadiran lingkaran konsentris di kedua piring konsentrik dan non-konsentrik. Selain itu, tingkat pertumbuhan kolonial diukur dalam sentimeter per hari. Pengamatan mikroskopis mencakup pemeriksaan berbagai karakteristik, seperti adanya atau tidak adanya pemblokiran di hyphae, pola pertumbuhan hyphal (bercabang atau tidak bercabang), pigmensi hyfae (hijau, jelas, atau hitam), kurangnya conidia, dan morfologi conidia. Terminologi yang digunakan untuk menggambarkan bentuk geometris adalah bulat, lonjong, berantai, atau tidak beraturan. Pengamatan mikroskop ini dilakukan dengan menggunakan metode *slide culture*. Disediakan cawan petri steril, diletakkan *ring* penyangga didalamnya dan teteskan 5 ml akuades untuk menjaga kelembaban. Bagian atas *ring* diletakkan kaca preparat / *object glass* dan potongan media PDA steril diatasnya.

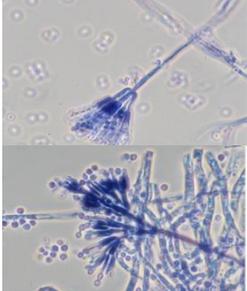
Biakan jamur diambil dan dioleskan diseluruh permukaan dan ditutup menggunakan *cover glass*. Biakan jamur diinkubasi selama 5-7 hari dengan suhu 25 °C. Biakan yang telah tumbuh pada *cover glass* diletakan dibagian atas kaca preparat yang ditetesi *Lactofenol Blue Cotton* untuk menambah efek transparan pada jamur agar lebih mudah diamati dengan mikroskop pada perbesaran 10 X dan 40 X (BKIPM, 2014).

**Identifikasi Jamur Endofit**

Pengamatan yang diperoleh dari karakterisasi akan digunakan dalam fase identifikasi, mengikuti pedoman yang disediakan dalam Panduan Buku Identifikasi Pengantar Muntah Makanan (Samson et al., 1995), Umum Tropical Flies Identifications (Gandjar et al, 1999), dan Identifying Filamentous Fungi (St-Germain and Summerbell, 1996)

**HASIL PENELITIAN**

Tabel 1. Hasil Isolasi Jamur Endofit

No	Pemurnian jamur endofit mangrove <i>R. apiculata</i>	Jamur Endofit dilihat dari Mikroskop
1	 <p>Ket: Koloni <i>Penicillium sp.</i> dalam medium PDA setelah di inkubasi 7 hari, Warna permukaan jamur putih dan seperti kapas</p>	 <p>Ket: Pengamatan Mikroskopis perbesaran 10x40</p>

**PEMBAHASAN**

Tingkat pertumbuhan jamur endophytic ditentukan selama periode tujuh hari menggunakan populasi jamur putih, seperti kapas. Pemeriksaan jamur pada tingkat mikroskopis melibatkan. Berdasarkan data pengamatan dan referensi taksonomis yang disediakan oleh Domsch *et al.* (1980), dapat ditentukan bahwa isolat tertentu ini termasuk dalam genus *Penicillium*. Genus ini termasuk dalam kelas *Deuteromycetes*, yang ditandai dengan tidak adanya spora seksual. Selain itu, isolat dapat diklasifikasikan di bawah urutan *Monilliales*, yang dikenal untuk menghasilkan output bebas conidiofor dari *miscellia*. Akhirnya, dapat dikaitkan dengan keluarga *Monilliaceae*, yang ditandai dengan kehadiran miselia yang tidak berwarna atau berwarna terang. Spesies *Penicillium* biasanya menampilkan karakteristik septik, dengan tubuh buah mengambil bentuk seperti spade, diikuti oleh sterigma dan susunan seperti rantai dari conidia. Dalam semua spesies, konidia menunjukkan warna hijau selama tahap awal mereka, yang kemudian beralih ke warna coklat. Gams *et al.* (1987) melaporkan bahwa *Penicillium sp.* memiliki fitur mikroskopis di mana ia memiliki rantai conidia sel tunggal yang berasal dari sel conidia khusus yang dikenal sebagai fialid. Di bawah pemeriksaan mikroskopis, menjadi jelas bahwa violet terletak di ujung metula yang menunjukkan cabang. Setiap cabang membawa violet, yang

pada gilirannya menghasilkan beberapa conidias. Akibatnya, conidia mengadopsi morfologi yang menyerupai rantai panjang, bulat, atau silinder. Berdasarkan literatur yang ada, diperhatikan bahwa *Penicillus* sp. menunjukkan atribut mikroskopis yang ditandai dengan kehadiran string conidia sel tunggal, yang dihasilkan oleh sel khusus yang disebut conidia. Objek yang dipertimbangkan adalah kapal berwarna ungu, ditandai dengan kombinasi komponen silindris dan seperti leher, serta lampiran tipis yang mengalir ke ujungnya. Konidias menunjukkan beberapa bentuk morfologis, termasuk rantai yang diperpanjang, bentuk sferik, dan struktur silinder. Menurut Kidd (2017), koloni *Penicillium* sp. biasanya memiliki warna putih, kadang-kadang tampak hijau, dan ditandai dengan adanya conidiophores. Sebuah mononematus atau synematous conidiophore terdiri dari batang tunggal yang membawa banyak phialids, khususnya dari jenis sederhana atau monoverticillate. Sel-sel yang terletak di daerah antara mulsa dan batang menunjukkan kapasitas untuk bercabang. Pattern cabang organisme dapat diklasifikasikan menjadi tiga kategori: satu derajat (biverticillata-symmetrical), dua derajat (biversicillata asymmetric/terverticillate), dan tiga derajat atau lebih cabang (quaterverticillata). Spesies jamur saprofit yang dominan biasanya ditemukan di dalam ekosistem tanah. Organisme yang sedang dipertimbangkan adalah *Penicillium* sp. Jamur memiliki kemampuan untuk mensintesis senyawa penisilin, yang memiliki sifat antimikroba yang mampu menghancurkan atau menghambat proliferasi mikroorganisme patogen. *Penicillium*, jamur filamentus, menunjukkan janji bioteknologi yang signifikan karena kemampuan beragam spesiesnya dalam memproduksi enzim industri dan bahan kimia bioaktif. Menurut Barreiro *et al.* (2012), *Penicillium*, mikroorganisme yang dikenal karena kemampuannya menciptakan enzim yang memecah karbohidrat, memiliki kemampuan untuk berkembang di tanah yang dihuni oleh tanaman kapur. Hal ini disebabkan oleh fakta bahwa kelapa banyak mengandung selulosa, karbohidrat kompleks, serta limbah serangga, yang berfungsi sebagai sumber nutrisi untuk *Penicillium*. Menurut Hoyos-Carvajal *et al.* (2009), *Penicillium* sp. banyak digunakan di sektor antibiotik, khususnya dalam produksi penisilin oleh *Penicillum notatum* dan *Penicilium chrysogenum*. (Erida, 2010). Qomariah (2012) mengklaim bahwa *Penicillium chrysogenum*, yang telah diperoleh dari biji kacang, memiliki potensi sebagai produsen penisilin. Dalam sebuah studi lebih lanjut, Panda *et al.* (2005) melaporkan bahwa *Penicillium* sp. memiliki kemampuan untuk mensintesis senyawa mikrobial griseofulvin, yang memiliki kapasitas untuk menghambat pertumbuhan jamur.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengamatan dan identifikasi didapatkan genus jamur endofit yang berhasil diisolasi dari akar mangrove *Rhizophora apiculata* adalah *Penicillum* sp

## PENELITIAN LANJUTAN

Penelitian lanjutan yaitu menguji daya hambat antibakteri hasil isolasi jamur endofit dari akar *Rhizophora apiculata*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada tim yang telah membantu dalam penelitian ini sehingga berjalan dengan lancar.

## DAFTAR PUSTAKA

- Barreiro, C., Martin, J. F. & Garcia-Estrada, C. (2012). Proteomics shows new faces for the old penicillin produces *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 20(2): 1-15
- Benson HJ. 2002. *Microbiological Applications a Laboratory Manual in General Microbiology*. Boston: McGraw Hill
- BKIPM. 2014. *Instruksi Kerja Teknis Jamur*. Palembang: Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas II Palembang.
- Erida, Y. (2010). Karakterisasi enzim ekstraseluler dan produk biosolubilisasi batubara hasil iridiasi gamma oleh kapang *Penicillium sp.* Dan *Trichoderma sp.* Skripsi. UIN Syari Hidayatullah. Jakarta
- Gandjar I, Samson RA, Tweel-Vermeulen Kvd, Oetari A, Santoso I. 1999. *Pengenalan kapang tropik umum: Yayasan Obor Indonesia*.
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S. & Bissett, J. (2009). Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology*. 4(6): 615 - 631
- Kidd S, Halliday C, Alexiou H, Ellis D. *Description of Medical Fungi*. Third Edition. Australia: Newstyle Printing; 2017
- Kjer J, Debbab A, Aly AH, Proksch P. 2010. Methods for isolation of marine-derived end phytic fungi and their bioactive secondary products. *Nature protocols*. 5(3): 479-490.
- Mutsaqof AAN, Wiharto, Suryani E. 2015. Sistem Pakar untuk Mendiagnosis Penyakit Infeksi Menggunakan Forward Chaining. *J Itsmart*.;4(1):43-7.
- Noor YR, Khazali M, INN S. 2012. *Panduan Pengenalan Mangrove di Indonesia: PKA/WI-IP (Wetlands International-Indonesia Programme)*.
- Panda, D., Rathinasamy, K., Santra, M.K. & Wilson, L. (2005). Kinetic suppression of microtubule dynamic instability by griseofulvin: implications for its possible use in the treatment
- Prihatiningtias W. 2005. Senyawa bioaktif fungi endofit akar kuning (*Fibraurea Hloroleucae Miers*) sebagai senyawa antimikroba. [Thesis]. Yogyakarta: Pascasarjana Universitas Gajah Mada.
- Qomariah, U.K.N., Hastuti, U.S. & Witjoro, A. (2012). Isolasi dan identifikasi spesies kapang kontaminan pada biji kacang merah di pasar tradisional kota Malang. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA*. Yogyakarta, 2 Juni 2012 Darmadi. 2008. *Infeksi Nosokomial Problematika dan Pengendaliannya*.
- Refdanita R, Maksum R, Nurgani A, Endang P. Pola Kepekaan Kuman terhadap Antibiotika di Ruang Rawat Intensif Rumah Sakit Fatmawati Jakarta Tahun 2001-2002. *Makara Kesehat*. 2004;8(2):41-8.
- Alanis AJ. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Arch Med Res*. 2005;36(6):697-705.