

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Tikus

Tikus merupakan hewan mamalia yang paling umum digunakan sebagai hewan percobaan pada laboratorium, dikarenakan banyak keunggulan yang dimiliki oleh tikus sebagai hewan percobaan, yaitu memiliki kesamaan fisiologis dengan manusia, siklus hidup yang relatif pendek, jumlah anak per kelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi dan mudah dalam penanganan (Moriwaki *et al.*, 1994). Tikus (*Rattus norvegicus*) memiliki beberapa galur yang merupakan hasil persilangan sesama jenis, namun demikian galur yang akan digunakan untuk penelitian ini adalah *Sparaque dawley*. Adapun taksonomi tikus menurut Besselsen (2004) adalah sebagai berikut ;

- Kingdom : Animalia
- Filum : Chordata
- Sub-filum : Vertebrata
- Kelas : Mammalia
- Sub-kelas : Theria
- Ordo : Rodensia
- Sub-ordo : Scuirognathi
- Famili : Muridae

- Sub Famili : Murinae
- Genus : *Rattus*
- Spesies : *Rattus Norvegicus*

B. Kulit

Kulit adalah salah satu organ tunggal ditubuh yang terberat. Umumnya pada orang dewasa kulit memiliki berat sekitar 16% dari berat badan total orang dewasa, mempunyai luas sebesar 1,2- 2,3 m² yang terpapar pada dunia luar (Junquiera, 2007). Lapisan-lapisan kulit yang dimaksud dalam penelitian ini, dibagi menjadi dua daerah yaitu epidermis dan dermis.

Kulit berperan sebagai proteksi tubuh seperti pencegahan infeksi dan penguapan berlebihan dari tubuh. Selanjutnya dikatakan bahwa didalam jaringan kulit terdapat kelenjar minyak dan kelenjar keringat (Junquiera, 2007). Kulit merupakan indra peraba yang menerima rangsangan nyeri, panas, dingin dan sebagainya (Eroschenko, 2003). Oleh sebab itu kulit merupakan salah satu organ tubuh yang sangat penting bagi tubuh.

1. Epidermis

Epidermis terbentuk dari sel epitel gepeng berlapis, bertanduk (keratin), namun ada juga sel-sel lain yang terdapat di epidermis dalam jumlah yang lebih dikit yaitu sel melanosit, sel merkel, dan sel langerhans. Biasanya lapisan kulit dibedakan menjadi kulit tebal (licin, tidak berambut) dan kulit tipis (berambut) (Junqueira, 2007).

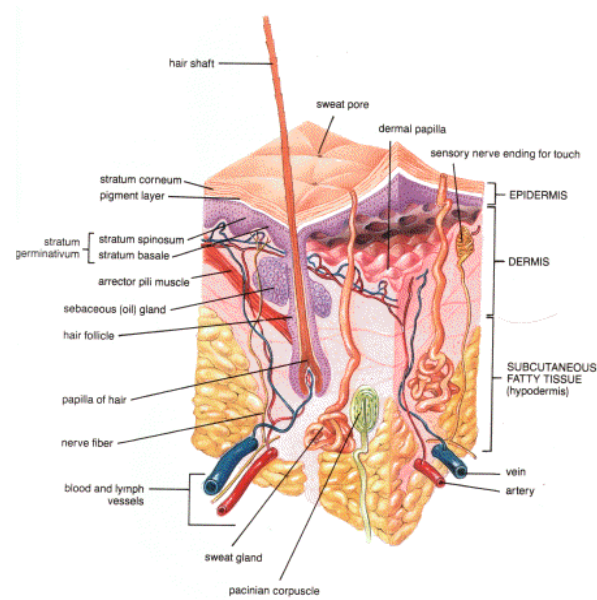
Pada umumnya area epidermis dibagi menjadi lima lapisan yaitu,

- a. Stratum Basale
- b. Stratum Spinosum
- c. Stratum Granulosum
- d. Stratum Lusidum
- e. Stratum Korneum

2. Dermis

Dermis adalah jaringan ikat yang menyusun dan mengikat epidermis ke jaringan subkutan. Ketebalan dari area ini bervariasi tergantung dari lokasi tubuh, dan mencapai retikulin, yang disebut lamina retikularis. Pada umumnya dermis terdiri dari dua lapisan dengan batas yang tidak nyata yaitu stratum papilare di bagian luar dan stratum retikulare di bagian dalam (Eroschenko, 2003).

Pada daerah stratum papilare tipis terdiri atas jaringan ikat longgar, fibroblas, dan sel mast dan makrofag. Leukosit yang ekstrasfasasi juga bisa dijumpai di sini. Sedangkan stratum retikulare yang tebal, terdiri atas jaringan ikat padat tidak teratur (Eroschenko, 2003).



Gambar 3. Lapisan kulit (Cyintia, 2012)

3. Fungsi Kulit

Kulit adalah pembungkus tubuh yang berkontak langsung dengan dunia luar. Itu sebabnya kulit mempunyai berbagai macam fungsi yang penting

a. Kulit sebagai alat proteksi

Epitel berlapis gepeng bertanduk pada lapisan epidermis melindungi permukaan tubuh terhadap abrasi mekanik dan juga membentuk sawar fisik terhadap mikroorganisme patogen. Selain itu glikolipid yang terdapat diantara sel-sel membuat epidermis tidak permeabel terhadap air dan mencegah untuk dehidrasi berlebihan (Junqueira, 2007).

b. Kulit pada regulasi suhu tubuh

Kulit berperan penting dalam regulasi suhu tubuh. Saat beraktifitas fisik atau pada lingkungan yang panas tubuh akan meningkatkan proses berkeringat, ini memungkinkan untuk hilangnya sebagian panas

tubuh dari penguapan dan pelebaran pembuluh darah dan sebaliknya pada daerah yang dingin (Junqueira, 2007).

c. Kulit sebagai persepsi sensoris

Kulit adalah organ sensoris besar dan sumber utama sensasi umum pada tubuh terhadap lingkungan luar. Reseptor sensoris yang terdapat pada kulit antara lain suhu, sentuhan, nyeri, dan tekanan (Junqueira, 2007).

d. Kulit sebagai organ ekskretoris

Memalui produksi keringat, maka air, larutan garam, dan limbah bernitrogen dapat dieksresikan oleh tubuh (Junqueira, 2007).

e. Pembentukan vitamin D

Bila kulit terpapar terhadap sinar UV dari matahari, dibentuk vitamin D dari prekursor yang disintesis di dalam epidermis. Vitamin D diperlukan untuk penyerapan kalsium dan mukosa usus dan metabolisme mineral yang memadai (Junqueira, 2007).

C. Luka Iris

Luka iris adalah luka yang disebabkan oleh objek yang tajam, oleh karena alat ditekan pada kulit dengan kekuatan relatif ringan kemudian digeserkan sepanjang kulit, biasanya mencakup seluruh luka akibat benda-benda seperti pisau, pedang, silet, kaca, kampak tajam dan lain sebagainya. Ciri yang paling penting dari luka iris adalah adanya pemisahan yang rapih dari kulit dan

jaringan dibawahnya, maka sudut bagian luar biasanya bisa dikatakan bersih dari kerusakan apapun (Moenadjat, 2005).



Gambar 4. luka iris di punggung tangan

D. Proses Penyembuhan Luka

Persembuhan luka merupakan suatu proses yang kompleks karena berbagai kegiatan bioseluler dan biokimia terjadi berkesinambungan (Tawi, 2008). Menurut Price dan McCarty (1992), jenis persembuhan yang paling sederhana dapat terlihat pada insisi pembedahan yang tepi lukanya dapat saling didekatkan untuk dimulainya proses penyembuhan. Penyembuhan seperti ini disebut penyembuhan primer (*healing by first intention*). Apabila luka yang terjadi cukup parah seperti adanya kerusakan epitel yang menyebabkan kedua tepi luka berjauhan maka disebut penyembuhan sekunder (*healing by second intention* atau penyembuhan dengan granulasi). Mekanisme tubuh akan mengupayakan mengembalikan komponen-komponen jaringan yang rusak tersebut dengan membentuk struktur baru dan fungsional sama dengan keadaan sebelumnya (Tawi, 2008).

Berdasarkan perubahan morfologik, terdapat tiga fase persembuhan luka yaitu fase inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi.

1. Fase Inflamasi

Fase inflamasi adalah adanya respons vaskuler dan seluler yang terjadi akibat perlukaan pada jaringan lunak. Setelah terjadi perlukaan yang menyebabkan pembuluh darah pecah, akan terjadi vasokonstriksi sesaat kemudian dilatasi berkepanjangan (Spector, 1993). Selain itu, kerusakan pembuluh darah akan menyebabkan hemostasis berupa keluarnya platelet. Platelet akan menutupi vaskuler yang terbuka (*clot*) dan juga mengeluarkan beberapa substansi seperti *platelet-derived growth factor* yang akan mengaktifkan makrofag dan fibroblas (Clark & Singer, 1999).

Saat terjadi dilatasi terjadi peningkatan aliran darah namun sirkulasi berjalan lambat. Pada saat yang sama terjadi perubahan pada dinding venula dan kapiler. Hal tersebut membuat tekanan hidrostatik dalam pembuluh darah meningkat sehingga mengganggu keseimbangan di dalamnya yang menyebabkan leukosit dan cairan dapat keluar dari pembuluh darah kemudian memasuki jaringan (Underwood, 2004). Leukosit, terutama neutrofil, akan membersihkan area luka dari benda asing, sel-sel mati dan bakteri untuk mempersiapkan dimulainya proses penyembuhan (Tawi, 2008).

Penelitian terbaru menunjukkan bahwa neutrofil juga merupakan sumber sitokin yang memungkinkan sebagai pemacu awal aktivasi fibroblas lokal dan keratinosit (Martin, 1997). Sitokin yang meliputi *Epidermal Growth*

Factor (EGF), *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) dan *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β) berperan dalam terjadinya kemotaksis neutrofil, makrofag, sel mast, sel endotelial dan fibroblas (Perdanakusuma, 2008).

Infiltrasi neutrofil hanya berlangsung beberapa hari. Neutrofil akan mati setelah melakukan fagositosis dan neutrofil yang mati akan difagositosis oleh makrofag. Makrofag juga akan mengeluarkan *growth factor* dan sitokin yang akan memperkuat sinyal awal dari degranulasi platelet dan neutrofil (Martin, 1997).

2. Fase Proliferasi

Pada manusia, fase proliferasi kira-kira di mulai 4 hari setelah terjadi perlukaan dan selesai hingga 3-4 minggu atau lebih, tergantung pada ukuran luka. Fase ini ditandai dengan adanya pembentukan angiogenesis, reepitelisasi, dan fibroplasia (Ackermann, 2007). Pada awal pembentukan neovaskuler, pertama-tama nampak sebagai pita yang padat dari sel-sel endotel yang tumbuh ke luar sebagai kuncup dari kapiler yang utuh pada tepi luka. Sel-sel muncul oleh aktivitas mitosis pada sel-sel pembuluh darah tua diikuti oleh migrasinya ke arah luka. Pita endotel yang padat menjadi bersaluran dalam beberapa jam dan dalam lumen yang terbentuk demikian darah mulai mengalir (Spector, 1993).

Jaringan vaskuler (angiogenesis) yang melakukan invasi kedalam luka merupakan suatu respon untuk memberikan oksigen dan nutrisi yang

cukup di daerah luka karena biasanya dalam keadaan hipoksik dan turunnya tekanan oksigen. Pada fase ini fibroplasia dan angiogenesis merupakan proses terintegrasi dan dipengaruhi oleh substansi yang dikeluarkan oleh platelet dan makrofag (*growth factors*). Proses selanjutnya adalah reepitelisasi, dimana fibroblas mengeluarkan *keratinocyte growth factor* (KGF) yang berperan dalam stimulasi mitosis sel epidermal. Reepitelisasi ini telah dimulai sejak beberapa jam setelah terjadi perlukaan (Clark & Singer, 1999).

Keratinisasi akan dimulai dari pinggir luka dan akhirnya membentuk *barrier* yang menutupi permukaan luka. Dengan sintesa kolagen oleh fibroblas, pembentukan lapisan dermis ini akan disempurnakan kualitasnya dengan mengatur keseimbangan jaringan granulasi dan dermis. Untuk membantu jaringan baru tersebut menutup luka, fibroblas akan merubah strukturnya menjadi miofibroblas yang mempunyai kapasitas melakukan kontraksi pada jaringan. Fungsi kontraksi akan lebih menonjol pada luka dengan defek luas dibandingkan dengan defek luka minimal (Tawi, 2008).

Peran fibroblas sangat besar pada proses perbaikan, yaitu bertanggung jawab pada persiapan menghasilkan produk struktur protein yang akan digunakan selama proses rekonstruksi jaringan. Menurut Tawi (2008), pada jaringan lunak yang normal (tanpa perlukaan), keberadaan sel fibroblas sangat jarang dan biasanya bersembunyi di matriks jaringan penunjang. Sesudah terjadi luka, fibroblas akan aktif bergerak dari jaringan sekitar luka ke dalam daerah luka, kemudian akan berkembang

(proliferasi) serta mengeluarkan beberapa substansi (kolagen, elastin, asam hyaluronat, fibronektin dan proteoglikan) yang berperan dalam membangun (rekonstruksi) jaringan baru. Serat kolagen yang terbentuk menyebabkan adanya kekuatan untuk bertautnya tepi luka (Perdanakusuma, 2008).

3. Fase Maturasi (*remodelling*)

Fase ini merupakan fase yang terakhir dan terpanjang pada proses penyembuhan luka. Terjadi proses yang dinamis berupa remodelling kolagen, kontraksi luka dan pematangan parut. Aktivitas sintesis dan degradasi kolagen berada dalam keseimbangan (Perdanakusuma, 2008).

Setelah terjadi proses perbaikan yang ekstensif, banyak neovaskuler yang lenyap lewat penyusutan pembuluh-pembuluh darah yang berlebihan, sehingga suplai darah ke luka secara berangsur-angsur berkurang (Guyton & Hall, 2007). Fibroblas juga sudah mulai meninggalkan jaringan granulasi dan serat fibrin dari kolagen bertambah banyak untuk memperkuat jaringan parut. Sintesa kolagen yang telah dimulai sejak fase proliferasi akan dilanjutkan pada fase maturasi. Selain pembentukan kolagen juga akan terjadi pemecahan kolagen oleh enzim kolagenase. Kolagen yang berlebihan akan terjadi penebalan jaringan parut atau *hypertrophic scar*, sebaliknya produksi yang berkurang akan menurunkan kekuatan jaringan parut dan luka akan selalu terbuka (Tawi, 2008).

Faktor-faktor yang mempengaruhi persembuhan luka seluruh proses peradangan bergantung pada sirkulasi darah ke daerah yang terluka. Jika suplai darah ke suatu daerah kurang, maka proses peradangan akan berjalan sangat lambat, infeksi menetap, dan terjadi persembuhan yang buruk. Selain itu, persembuhan luka dipengaruhi oleh umur, nutrisi yang tidak seimbang, keberadaan benda asing, radiasi, pengobatan anti inflamasi dan faktor kesehatan individu misalnya immunosupresan, stress dan diabetes mellitus (Perdanakusuma, 2008).

Persembuhan luka pada individu yang berusia tua akan memakan waktu lebih lama jika dibandingkan dengan individu yang masih muda. Hal ini terkait dengan suplai darah individu muda yang lebih baik dan adanya kemungkinan penyakit seperti artheroskeloris pada individu tua. Kegagalan vaskuler akibat penyakit (diabetes), pengobatan (radiasi) atau obat (preparat steroid) mengakibatkan lambatnya proses sembuh karena terbentuknya ulkus yang kronis (Tawi, 2008).

E. Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas L.*)

Tanaman jarak pagar (*Jathropha curcas L.*) telah lama dikenal masyarakat Indonesia, yaitu pada masa penjajahan oleh bangsa Jepang pada tahun 1942. Pada masa itu masyarakat diharuskan menanam pohon jarak pagar di pekarangan rumahnya untuk dimanfaatkan sebagai bahan bakar minyak (BBM) untuk kendaraan perang bangsa Jepang. Tanaman jarak berbentuk pohon kecil atau semak belukar besar ini yang tingginya mencapai 5 meter.

Cabang-cabang pohon ini bergetah dan dapat diperbanyak dengan biji dan dengan cara stek atau kultur jaringan dan mulai berubah berbuah delapan bulan sejak ditanam (Ernawati, 2007).



Gambar 5. Tanaman jarak pagar

Jathropa curcas termasuk tanaman famili *Euphorbiacea*, satu famili dengan tanaman karet dan ubi kayu. Tanaman ini diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Ordo	: <i>Euphorbiales</i>
Famili	: <i>Euphorbiaceae</i>
Genus	: <i>Jatropha</i>
Spesies	: <i>Jatropha curcas L.</i>

Tanaman jarak pagar atau *Jatropha curcas* merupakan tanaman perdu dapat tumbuh tinggi mencapai 1-7m, dan memiliki cabang yang tidak beraturan. Batang kayu berbentuk silindris dan jika dipotong akan mengeluarkan getah (Ernawati, 2007).

1. Bagian-bagian jarak pagar

Adapun bagian *Jatropha curcas* sebagai berikut:

a. Daun

Daun *Jatropha curcas* merupakan daun tunggal memiliki sudut 3-5. Daun menyebar diseluruh batang. Daun pada permukaan atas dan bawah berwarna hijau, namun pada bagian bawahnya sedikit lebih pucat.. lebar daun menyerupai hati atau oval dengan panjang 5-15 cm. Daun berlekuk, bergaris hingga ke tepi. Tulang daun menjari dengan 5-7 tulang daun utama. Daun di hubungkan dengan tangkai yang memiliki panjang sekitar 4-15 cm (Hambali *et al*, 2007).

b. Bunga

Bunga tanaman jarak adalah bunga majemuk berbentuk malai, berwarna hijau kekuningan, berkelamin tunggal dan berumah satu (putik dan benang sari dalam satu tanaman). Bunga betina 4-5 kali lebih banyak dari bunga jantan. Bunga jantan maupun bunga betina tersusun dalam rangkaian berbentuk cawan yang tumbuh di ujung batang atau ketiak daun. Bunganya mempunyai 5 kelopak berbentuk bulat telur dengan panjang kurang lebih 4 mm.

Benang sari mengumpul pada pangkal dan berwarna kuning. Tangkai putik pendek berwarna hijau dan kepala putik melengkung keluar berwarna kuning. Bunganya mempunyai 5 mahkota berwarna keunguan, setiap tandan terdapat lebih dari 15 bunga. Jarak pagar termasuk tanaman *monoecious* dan bunganya uniseksual. Kadangkala muncul bunga hermaprodit yang berbentuk cawan berwarna hijau kekuningan (Hambali *et al*, 2007).

c. Buah

Buah tanaman jarak berupa kotak berbentuk bulat telur dengan diameter 2-4 cm. Panjang buah 2 cm dengan ketebalan sekitar 1 cm. Buah berwarna hijau ketiak muda dan berubah menjadi abu-abu kecokelatan atau kehitaman ketika masak. Buah jarak terbagi menjadi 3 ruang, masing-masing ruang berisi satu biji sehingga dalam setiap buah terdapat 3 biji (Hambali *et al*, 2007).

d. Biji

Biji berbentuk bulat lonjong dan berwarna coklat kehitaman. Biji inilah yang banyak mengandung minyak dengan rendemen sekitar 30-50% dan mengandung toksin sehingga tidak dapat dimakan (Hambali *et al*, 2007).

2. Syarat Tumbuh

Jatropha curcas atau jarak pagar tumbuh di dataran rendah sampai ketinggian sekitar 300 m dpl. Curah hujan berkisar antara 300-2.380 mm/tahun. Suhu yang sesuai sekitar 20-26⁰C. Pada daerah dengan suhu

yang terlalu tinggi diatas 35⁰C atau terlalu rendah dibawah 15⁰C, akan menghambat pertumbuhan serta mengurangi kadar minyak dalam biji dan mengubah komposisinya.

Sistem perakaran tanaman jarak pagar mampu menahan air dan tanah terhadap kekeringan serta berfungsi sebagai tanaman penahan erosi. Jarak pagar dapat tumbuh pada berbagai ragam tekstur dan jenis tanah, baik tanah berbatu, tanah berpasir maupun tanah berlempung atau tanah liat. Disamping itu, jarak pagar dapat beradaptasi pada tanah yang kurang subur atau tanah bergaram, memiliki drainase baik, tidak tergenang dan pH tanah antara 5.0 and 6.5 (Hambali *et al*, 2007).

3. Pembuatan antibiotik topikal getah jarak pagar

Pengumpulan getah dari pohon jarak pagar dilakukan secara purposif yaitu tanpa dibandingkan dengan daerah lain. Pada kenyataannya, masyarakat mendapatkan getah jarak pagar dengan mematahkan daun atau tunas muda dari tumbuhan jarak pagar. Sehingga bahan penelitian ini adalah getah jarak pagar yang diperoleh dari tanaman jarak pagar dengan mematahkan tangkai daun, atau tunas muda, lalu getah yang keluar ditampung ke dalam tabung sampel atau wadah. Pada uji pendahuluan, peneliti mengetahui bahwa 1 patahan daun jarak pagar menghasilkan 1 tetes getah yang setara 0,1 cc. Sedangkan 1 patahan tunas muda jarak pagar menghasilkan 4 hingga 8 tetes getah. Getah yang sudah terkumpul langsung diaduk dengan pengaduk sehingga homogen tanpa proses apapun. Setelah getah jarak pagar diaduk, getah tidak

menggumpal atau mencair, namun getah terlihat mengalami perubahan warna dari putih sedikit keruh menjadi putih keruh dan sedikit kemerahan. Kemudian getah dicampurkan dengan Vaseline putih dengan penambahan sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga homogen sesuai perbandingan konsentrasi. Salap dimasukkan kedalam wadah yang tertutup rapat dan steril (Safriyani, 2012).

4. Manfaat dan kandungan getah jarak pagar

Getah jarak pagar memiliki berbagai manfaat, antara lain dari segi industri biofuel, antihama dan kesehatan. Getah jarak pagar diketahui menyimpan banyak manfaat bagi kesehatan manusia.

Diantaranya mengandung :

1. Flavonoid :

- a) Dapat berfungsi sebagai antifungi, antiseptik, antiradang (Hogiono & Dogi, 1994).
- b) Juga berfungsi dalam proses regenerasi atau perbaikan sel (Hogiono & Dogi, 1994).

2. Saponin :

- a) Dapat memacu pertumbuhan kolagen dalam proses penyembuhan (Igbinosa *et al*, 2009).
Kolagen yaitu sebuah protein struktur yang berperan dalam proses penyembuhan (Guyton & Hall, 2007).
- b) Memiliki efek menghilangkan rasa sakit dan merangsang pembentukan sel-sel baru (Igbinosa *et al*, 2009).

3. Jatrofin (mengandung alkaloid), yang diketahui ada manfaat dalam hal analgesik (Igbiosa *et al.*, 2009).

F. Bioplasenton

Bioplasenton mengandung ekstrak plasenta dan neomisin sulfat (merupakan antibiotik). Kombinasi ini merupakan bagian dari perawatan luka yang sangat efektif. Ekstrak plasenta sebagai “*biogenic stimulator*” memegang peranan penting dalam mempercepat regenerasi sel dan penyembuhan luka. Sedangkan neomisin sulfat bekerja sebagai antibiotik yang mampu membunuh beragam jenis kuman. Plasenta telah lama digunakan sejak 5000 tahun yang lalu. Di China, dikenal sebagai pengobatan tradisional yang digunakan sebagai tonik untuk kesehatan dengan sebutan ‘shikasha’, yang penggunaannya untuk memperbaiki ginjal, kasus-kasus infertilitas, serta mensuplai air susu saat menyusui, dan sudah dipakai untuk pengobatan luka iris. Begitu pula dengan Paul Niehans dari Swedia yang terkenal sebagai pioner di bidang terapi sel, yang menggunakan plasenta dari domba (*black sheep*) untuk berbagai terapi dibidang peremajaan kulit (*skin rejuvenating*). Penemuan oleh Filatov dari Rusia dengan menggunakan plasenta sebagai “*Tissue Therapy*” dimana jaringan yang rusak dapat berkembang kembali setelah diberikan *Tissue Therapy*. Karena penemuan-penemuan diatas yang membuat plasenta memiliki banyak hal yang bermanfaat dalam dunia medis (Yoshida *et al*, 2006).

Plasenta merupakan suatu organ yang terbentuk pada dinding sebelah dalam uterus segera setelah terjadi pembuahan. Zat-zat makanan dan oksigen akan di distribusikan dari ibu ke janinnya melalui plasenta serta membawa sisa-sisa metabolisme ke luar dari tubuh janin. Plasenta sebagian besar berasal dari bagian yang membentuk janin (*fetus*), dan berfungsi sebagai organ *foetomaternal* yang memiliki dua komponen, yaitu bagian foetal (*chorion frondosum*), dan bagian maternal (*deciduas basalis*) (Yoshida *et al*, 2006). Plasenta mengandung bahan enzim yaitu sitokrom P450_{scc}, dimana enzim ini berfungsi sebagai mediasi untuk perubahan kolesterol menjadi pregnenolon, serta enzim P450_{c17} yang berperan untuk mengubah 17 -hidroksysteroid dehydrogenase menjadi androstenedion dan testosteron . Adanya proses aromatisasi dari P450 arom menyebabkan perubahan testosteron menjadi estrogen (Yoshida *et al*, 2006).