



Media Farmasi

<https://ojs3.poltekkes-mks.ac.id/index.php/medfar/>



Open access article

Mf Media
Farmasi
Poltekkes Makassar

AKTIVITAS VERMISIDA EKSTRAK DAUN MIANA TERHADAP *Ascaris lumbricoides* DENGAN METODE REAL TIME

Vermicidal Activity of Miana Leaf Extract Against *Ascaris lumbricoides* Using Real Time Method

Penulis / Author (s)

| | |
|--------------------------------------|--|
| Sesilia Rante Pakadang ^{*1} | ^{1,2,34} Poltekkes Kemenkes Makassar, |
| St. Ratnah ² | *e-mail korespondensi: mamajassy@gmail.com |
| Alfrida Monica Salasa ³ | |
| Djuniasti Karim ⁴ | |

DOI: <https://doi.org/10.32382/mf.v19i2.168>

ARTICLE INFO

Keywords:

Miana leaves
Ascaris lumbricoides
onset of action
duration
vermicida

Kata Kunci

Daun Miana
Ascaris lumbricoides
Mula kerja obat
Durasi
Vermicida

ABSTRACT

*Soiled Transmitted Helminth (STH) is an infectious disease caused by earthworms. The type of worm identified as the cause of STH is dominated by *Ascaris lumbricoides* and 3 other types. Many studies have been carried out to monitor the results of worm death. This study aimed to determine the profile of vermicides including onset of action, duration, and effectiveness of miana leaf extract compared to the drug pyrantel pamoat. The research method is to gradually start preparing miana leaf extract using a maceration process with continuous stirring, preparing the extract, and treating worms. The worms are placed in a sterile cup, then the test material is added and observed every hour. Worm death profiles such as paralysis, death, and life were observed for each worm subject. The results showed the death profile of worms after administration of miana leaf extract concentrations of 10, 20, and 40 mg/ml and pyrantel pamoat 2.5 mg/ml gave onset of action data for 4, 3, 2, and 1 hour respectively. The working duration of the test material is 5, 5, 3, and 1 hour respectively. The effective dose is generated by a concentration of 40 mg/ml which can kill worms starting 2 hours after administration of the test material, with a duration of 1 hour*

*Soiled Transmitted Helminth (STH) adalah salah satu penyakit infeksi akibat cacing tanah. Jenis cacing yang teridentifikasi sebagai penyebab STH didominasi oleh *Ascaris lumbricoides* dan 3 jenis lainnya, penelitian telah banyak dilakukan dengan memantau hasil akhir kematian cacing. Tujuan penelitian ini mengetahui profil vermisida meliputi onset of action, durasi dan efektivitas ekstrak daun miana yang dibandingkan dengan obat pyrantel pamoat. Metode penelitian secara bertahap mulai penyiapan ekstrak daun miana dengan proses maserasi dengan pengadukan kontinu, penyiapan ekstrak dan perlakuan terhadap cacing. Cacing dimasukkan dalam cawan steril, kemudian ditambahkan bahan uji dan diamati setiap jam. Profil kematian cacing seperti paralisis, mati dan hidup diamati setiap subjek cacing. Hasil penelitian menunjukkan profil kematian cacing setelah pemberian ekstrak daun miana konsentrasi 10, 20 dan 40 mg/ml dan pyrantel pamoat 2,5 mg/ml memberikan data onset of action berturut 4, 3, 2 dan 1 jam. Durasi kerja bahan uji berturut 5, 5, 3 dan 1 jam. Dosis efektif*

dihasilkan oleh konsentrasi 40 mg/ml yang dapat mematikan cacing mulai 2 jam setelah pemberian bahan uji, durasi 1 jam.

PENDAHULUAN

Soiled Transmitted Helminth (STH) adalah salah satu penyakit infeksi akibat cacing tanah. WHO masih mencatat 1,45 miliar penderita STH di dunia dan 70% diantaranya berada di Asia terutama Asia Tenggara. Indonesia mencatatkan penderita *askariasis*, *trichuriasis*, dan cacing tambang terbanyak di wilayah Asia Pasifik. Ter data lebih dari 90 juta kasus untuk *askariasis* dan *trichuriasis*, serta 60 juta kasus cacing tambang ([Lee J, Ryu JS, 2019](#)).

Pemerintah telah mencanangkan program Pemberian Obat Pencegahan Secara Massal Cacingan yaitu pemberian obat yang dilakukan untuk mematikan cacing secara serentak kepada semua penduduk sasaran di wilayah berisiko cacingan sebagai bagian dari upaya pencegahan penularan cacingan. Jenis cacing yang teridentifikasi sebagai penyebab STH didominasi oleh *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, dan *Necator americanus* ([Permenkes no 15, 2017](#)). Salah satu upaya penyediaan bahan baku obat termasuk obat cacing adalah optimalisasi penggunaan herbal secara ilmiah.

Herbal seperti daun miana secara empiris telah digunakan sebagai obat cacing dan didukung oleh penelitian miana terhadap *Hymenolepis microstoma* ([Ridwan et al., 2020](#)). Beberapa penelitian aktivitas tanaman terhadap *Ascaris lumbricoides* juga telah dilakukan terhadap buah delima ([Apriliani et al., 2022; Amelia, 2017](#)); daun sirih ([Sumual et al., 2021](#)); daun pinang ([Roring et al, 2019](#)); bawang merah dan bawang putih ([Dibfiora et al., 2021](#)); labu kuning ([Ganestya et al., 2017](#)); daun anting-anting ([Astuti, 2020; Mutiarawati, 2020](#)). Namun penelitian tersebut menguji aktivitas pasca inkubasi saja atau waktu kematian cacing saja, sehingga belum menunjukkan profil efektivitas ekstrak tanaman sebagai vermisida.

Penelitian ini memberikan inovasi baru dalam pengujian herbal sebagai *anthemeticum* khususnya terhadap *Ascaris lumbricoides*. Tujuan penelitian ini mengetahui profil vermisida meliputi *onset of action*, durasi dan efektivitas ekstrak daun miana yang dibandingkan dengan obat pyrantel pamoat.

METODE

Penelitian dilakukan di Poltekkes Kemenkes Makassar. Penelitian bertahap dari penyiapan simplisia, proses ekstraksi, dan pengujian vermisida.

Penyiapan simplisia dilakukan dengan mengambil daun miana dari Kabupaten Tana Toraja, Provinsi Sulawesi Selatan. Bahan daun miana disortasi basah, dicuci dan dikeringkan dalam oven suhu 50-55°C selanjutnya disortasi kering.

Proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96%, metode maserasi yang dimodifikasi dengan pengadukan kontinu menggunakan orbital shaker kecepatan 100 rpm. Selanjutnya ekstrak cair hasil maserasi dipekatkan dengan rotary evaporator. Ekstrak kental 4 gram disuspensikan dengan Na CMC 1% 20 ml dan diencerkan dengan NaCl 0,9% ad 100 ml. Ekstrak dihomogenkan hingga menjadi bahan uji ekstrak daun miana 40 mg/ml. Dengan cara yang sama ditimbang 2 gram dan 1gram ekstrak untuk menyiapkan ekstrak daun miana 20 mg/ml dan 10 mg/ml. Kontrol positif menggunakan pyrantel pamoat Bahan uji kontrol positif disiapkan dengan mengencerkan sediaan menjadi 250 mg/100 ml (2,5mg/ml) dan kontrol negatif campuran Na CMC dan NaCl.

Pengujian vermisida terhadap bahan uji diawali dengan memasukkan cacing *Ascaris lumbricoides* ke dalam cawan steril sebanyak 5 cacing setiap cawan. Selanjutnya ekstrak daun miana 10 mg/ml sebanyak 10 ml dimasukkan dalam cawan yang berisi cacing, Hal yang sama dilakukan untuk ekstrak daun miana 20 mg/ml dan 40 mg/ml, kontrol positif dan kontrol negatif. Semua perlakuan dibuat dengan 6 x replikasi. Pengamatan dilakukan setiap 60 menit hingga semua cacing telah mati. Parameter pengujian vermisida berdasarkan kondisi cacing ketika waktu pengamatan yaitu hidup, paralisis dan mati cacing setiap jam. Parameter pengamatan cacing mati adalah cacing sudah kaku atau tidak bergerak lagi. Paralisis diamati dengan memindahkan cacing yang tak bergerak ke dalam NaCl 0,9%b/v dan digoyangkan beberapa kali, jika cacing kembali bergerak sendiri berarti status cacing paralisis. Cacing hidup berarti cacing tetap bergerak aktif atau

lambat. Cacing dinyatakan mati jika tidak bergerak lagi meskipun telah diamati secara metode paralisis.

Penetapan parameter *onset of action* (dalam penelitian ini) adalah mula kerja obat atau waktu yang dibutuhkan oleh bahan obat cacing (ekstrak dan pyrantel pamoat) untuk bekerja

(dalam hal ini mematikan cacing). Durasi (dalam penelitian ini) adalah lama kerja obat adalah lama waktu yang dibutuhkan untuk mematikan cacing pertama hingga semua cacing. Pengamatan dihentikan setelah semua cacing yang diberikan perlakuan telah mati.

HASIL

Tabel 3. Hasil Pengamatan Kematian Cacing dalam Rendaman Bahan Uji

| Kelom pok | kondisi cacing | jam pengamatan | | | | | | | | |
|-----------------|----------------|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 10 mg/ml | Mati | 0 | 0 | 0 | 0.3±0,5 | 0.7±0,8 | 2.2±1,2 | 2.7±0,8 | 4±1,5 | 5±0 |
| | Paralisis | 0 | 0 | 0.2±0,4 | 0.7±1 | 0.7±1 | 1.2±1 | 1.2±1 | 0.8±1,6 | 0 |
| | Hidup | 5±0 | 5±0 | 4.8±0,4 | 4±1,3 | 3.7±1,2 | 1.7±1,5 | 1.2±1,6 | 0.2±0,4 | 0 |
| 20 mg/ml | Mati | 0 | 0 | 0.7±0,8 | 1.3±1,2 | 3.2±1 | 4.7±0,5 | 4.7±0,5 | 5±0 | |
| | Paralisis | 0 | 0 | 0.5±0,5 | 1.8±1,5 | 0.7±0,8 | 0 | 0.3±0,5 | 0 | |
| | Hidup | 5±0 | 5±0 | 3.7±1,2 | 1.8±1,9 | 1.2±1,5 | 0.3±0,5 | 0 | 0 | |
| 40 mg/ml | Mati | 0 | 0.7±1,2 | 2±1,3 | 4.3±1 | 5±0 | | | | |
| | Paralisis | 1±2 | 0.7±0,8 | 1±0,9 | 0.3±0,8 | 0 | | | | |
| | Hidup | 4±2 | 3.6±1 | 2±1,9 | 0.3±0,8 | 0 | | | | |
| kontrol Positif | Mati | 5±0 | | | | | | | | |
| | Paralisis | 0 | | | | | | | | |
| | Hidup | 0 | | | | | | | | |
| kontrol Negatif | Mati | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Paralisis | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Hidup | 5±0 | 5±0 | 5±0 | 5±0 | 5±0 | 5±0 | 5±0 | 5±0 | 5±0 |

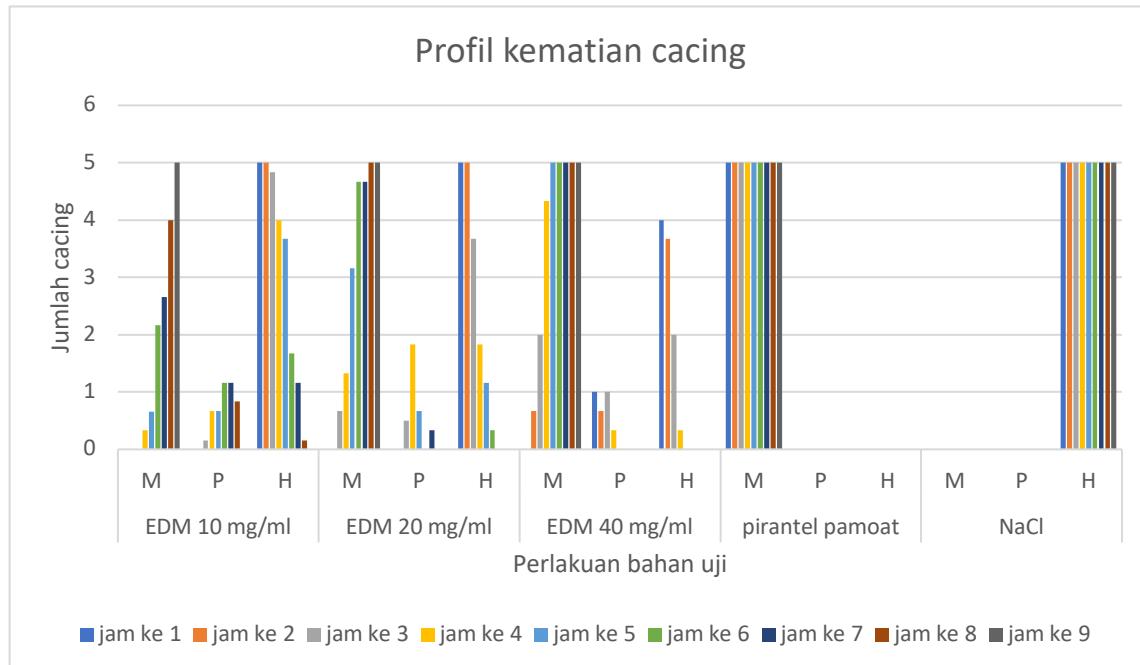
Keterangan

- Waktu kerja obat
- Onset obat

Tabel 2. Hasil analisis *onset of action* dan durasi kerja obat sebagai vermisida

| Bahan uji | Onset of action | Durasi |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| EDM 10 mg/ml | 4 jam | 5 jam |
| EDM 20 mg/ml | 3 jam | 5 jam |
| EDM 40 mg/ml | 2 jam | 3 jam |
| kontrol positif | 1 jam | <1 jam |
| kontrol negatif | tidak teridentifikasi | tidak teridentifikasi |

Profil vermisida setelah pemberian bahan uji ekstrak daun miana dan kontrol diperlihatkan pada gambar histogram berikut:



Gambar 1 Profil vermisida ekstrak daun miana

PEMBAHASAN

Fokus utama penelitian ini adalah pengamatan proses kematian cacing *Ascaris lumbricoides*. Secara umum penelitian yang ada selama ini mengamati jumlah cacing yang mati setelah kontak bahan uji (ekstrak, kontrol positif dan kontrol negatif) selama beberapa waktu inkubasi seperti penelitian sebelumnya dengan waktu inkubasi 24 jam. Profil kematian cacing tidak teramat karena pengamatan hanya 1 kali. Penelitian ini menjawab profil kematian cacing dengan pengamatan *real time*. Proses kematian cacing yang melewati fase paralisis kemudian mati dan waktu kontak yang dibutuhkan hingga bahan uji mulai aktif (membunuh atau membuat cacing paralisis) dapat teramat dan terdata pada tabel 1 dan gambar 1.

Pentingnya menganalisis profil kematian cacing untuk menentukan mula kerja obat (bahan uji) untuk setiap konsentrasi bahan uji yang diberikan. *Onset of action* yang cepat dibutuhkan dalam pengobatan untuk memberikan efek yang singkat dan akan memberikan perbedaan efektivitas antar perlakuan dalam hal ini perbedaan konsentrasi ekstrak daun miana. Hasil menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak memberikan mula kerja obat yang lebih baik.

Durasi kerja obat (bahan uji) yang terlihat pada tabel 2 juga merupakan hal penting dalam pengobatan karena menentukan efektivitas

dosis pemberian obat. Secara farmakologi efektivitas durasi kerja obat (singkat atau lama) akan berbeda setiap indikasi. Khusus dalam pengobatan kecacingan efektivitas obat ditentukan oleh durasi yang singkat. Kontrol positif (pyrantel pamoat) dalam penelitian ini menunjukkan efektivitas yang sangat baik dengan mematikan cacing dalam waktu < 1 jam. Meskipun demikian efektivitas optimal (durasi 3 jam) ekstrak daun miana konsentrasi 40 mg/ml dibanding konsentrasi lainnya (durasi 5 jam). Secara parasitologi durasi vermisida dalam waktu 3 – 5 jam, cukup efektif mengingat dosis pemberian yang hanya sekali. Berdasarkan anjuran Kemenkes RI, obat cacing diberikan dalam dosis tunggal sebanyak 2 kali setahun. Identifikasi mula kerja obat dan durasi kerja obat merupakan novelty dalam penelitian ini yang dapat dikembangkan untuk menjadi bahan baku obat dengan penelitian lanjutan.

Hasil penelitian ini menunjukkan ekstrak daun miana dalam 3 dosis kecil (10, 20 dan 40 mg/ml atau 1, 2 dan 4% b/v) telah efektif sebagai vermisida karena dapat mematikan semua cacing dalam waktu 5 - 9 jam, sehingga potensial untuk diberikan sebagai pengganti obat cacing bahan kimia. Meskipun pembandingnya pyrantel pamoat 2,5 mg/ml hanya 1 jam. Beberapa penelitian yang sejalan dengan penelitian ini menggunakan replikasi 3 – 5 cacing per kelompok perlakuan menunjukkan variasi

waktu total mematikan cacing yang ditentukan oleh konsentrasi ekstrak yang digunakan. Ekstrak daun anting-anting dan daun belimbing konsentrasi 40 - 100% mematikan cacing dalam waktu 1,1 – 8,2 jam. Ekstrak biji labu kuning konsentrasi 54 dan 70% mematikan cacing dalam waktu 7,1 – 11,8 jam. Ekstrak daun anting-anting 60 – 100% mematikan cacing dalam waktu 1,5 – 3,8 jam. Data ini mendukung efektivitas ekstrak daun miana sebagai vermisida dengan pembanding ekstrak tanaman lainnya dengan dosis kecil (1,2 dan 4%/b/v) memberikan potensi yang setara dengan ekstrak lainnya dengan dosis besar. Efektivitas dosis pemberian berpengaruh dalam mula kerja obat dan durasi kerja obat karena mekanisme kerja yang dihasilkan oleh senyawa aktif dalam tanaman. Besarnya penghambatan proses pada *mitokondria* cacing dapat dipengaruhi oleh besarnya jumlah obat yang diberikan. Beberapa produk alami tampaknya menggunakan aktivitas *anthelmintiknya* melalui penghambatan *mitokondria*, tanpa menimbulkan toksisitas yang berlebihan bagi inangnya ([Adak dan Kumar, 2020](#)).

Mekanisme ekstrak daun miana sebagai vermisida ditentukan oleh zat aktif (metabolit sekunder) yang terkandung dalam ekstrak. Ekstrak daun miana mengandung senyawa alkaloid, tannin, saponin, flavonoid (flavon), fenol, steroid, terpenoid, phlobotanin dan antrakuinon. Penelusuran literatur telah menunjukkan bahwa senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak tanaman memberikan aktivitas antelmentika seperti terpen, glikosida, saponin, flavonoid, tanin dan alkaloid memiliki aktivitas anthelmintik.

Penelusuran pustaka menunjukkan bahwa senyawa tanin yang terkandung dalam ekstrak daun miana mampu menghambat kerja enzim pencernaan sehingga mengganggu proses metabolisme pencernaan pada cacing dan merusak membran sel cacing yang dapat menyebabkan kematian ([Hanafiah et al., 2022](#)). Kandungan senyawa alkaloid berpotensi sebagai vermisida dengan mekanisme menekan fungsi sistem saraf pusat. sehingga terjadi kelumpuhan otot atau paralisis pada cacing ([Mahatry et al., 2014; Hanafiah et al., 2022](#)). Flavonoid dan saponin yang terkandung dalam ekstrak tanaman termasuk dalam ekstrak daun miana berpotensi menghambat enzim asetilkolinesterase yang akan berpengaruh terhadap otot-otot cacing ([Pratama, 2021](#)). Demikian pula kandungan Fenol akan bekerja dengan cara menyebabkan terjadinya gangguan pada glikoprotein di permukaan sel cacing ([Liu et al., 2020](#)).

Pentingnya profil kematian cacing diamati untuk mengetahui potensi senyawa aktif herbal dan pengembangannya untuk memperoleh hasil yang lebih memuaskan dalam menunjang kemandirian bahan baku obat di Indonesia. [Liu et al \(2022\)](#) menyatakan hanya sedikit penelitian yang menentukan mekanisme kerja senyawa antelmintiknya, mengingat besar dan sulitnya upaya yang dilakukan untuk membuktikan hal tersebut. Meskipun demikian, gambaran profil yang terjadi pada subyek cacing dapat dengan cepat mengidentifikasi senyawa tersebut dengan mekanisme aksi baru yang diduga.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa: Profil kematian cacing setelah pemberian ekstrak daun miana konsentrasi 10, 20 dan 40 mg/ml dan pyrantel pamoat 2,5 mg/ml memberikan data *onset of action* berturut 4, 3, 2 dan 1 jam. Durasi kerja bahan uji berturut 5, 5, 3 dan 1 jam. Dosis efektif dihasilkan oleh konsentrasi 40 mg/ml yang dapat mematikan cacing mulai 2 jam setelah pemberian bahan uji.

SARAN

Disarankan untuk melanjutkan penelitian ini pada 3 jenis cacing lainnya yang menjadi penyebab infeksi kecacingan di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Adak M, Kumar P., 2022. *Herbal anthelmintic agents: a narrative review*. J Tradit Chin Med. 2022 Aug;42(4):641-651. doi: 10.19852/j.cnki.jtcm.2022.04.007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35848982/>
- Apriliani D, Suwendar, Fitrianingsih SP, 2022. *Uji Aktivitas Antelmintik Ekstrak Etanol Kulit Buah Delima (Punica granatum L.) terhadap Cacing Gelang Babi Dewasa (Ascaris suum Goeze.) dan Telurnya Secara In Vitro*. Bandung Conf. Ser. Pharm. 2. <https://doi.org/10.29313/bcsp.v2i2.3966>
- Amelia, M., Jasaputra, D.K., Tjokropranoto, R., 2017. *Effects of Pomegranate Peel (Punica granatum L.) Extract as an Anthelmintic*. J. Med. Heal. 1. <https://doi.org/10.28932/jmh.v1i5.537>
- Astuti, S.S.E., 2020. Identification of the *Anthelmintic Power of Anting-anting Leaf and Starfruit Leaf*. Heal. Notions 4. <https://doi.org/10.33846/hn40502>
- Dibfiora, R., Situmorang, E.U.M., Firmansyah, R.D., 2021. *Efficacy of Shallot (Allium cepa L. Var. aggregatum) and Garlic*

- (*Allium sativum*) as Herbal Anthelmintic against *Ascaris suum*. J. Med. Heal. 3. https://doi.org/10.28932/jmh.v3i1.3267
- Ganestya, S., Djumarga, S., Utari, C.S., 2017. Anthelmintic effects of pumpkin (*Cucurbita moschata*) seed extract on *Ascaris suum* in vitro. Biofarmasi J. Nat. Prod. Biochem. 10. https://doi.org/10.13057/biofar/f100101
- Hanafiah MR., Yuniarni U, Choesrina R, 2022. Studi Literatur Aktivitas Antelmintik pada Tanaman Pepaya (*Carica papaya L.*) terhadap Cacing Gelang Babi (*Ascaris suum Goeze*). Bandung Conf. Ser. Pharm. 2. https://doi.org/10.29313/bcsp.v2i2.4210
- Lee J, Ryu JS. Current Status of Parasite Infections in Indonesia: A Literature Review. Korean J Parasitol. 2019;57(4):329-339. doi:10.3347/kjp.2019.57.4.329
- Liu M, Panda S. J., Luyten W., 2022. Plant-Based Natural Products for the Discovery and Development of Novel Anthelmintics against Nematodes. Biomolecules. 2020 Mar; 10(3): 426. Published online 2020 Mar 9. doi: 10.3390/biom10030426. PMID: PMC7175113. PMID: 32182910 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/article/s/PMC7175113/
- Mahatriny, N. N., Payani, N. P. S., Devi, P. K. S., Yulita, S., Astuti, K. W., dan Oka, I. B. M. (2014). Uji Aktivitas Anthelmintik Ekstrak Etanol Daun Pepaya Pada Cacing Gelang Babi. Program Kreativitas Mahasiswa-Penelitian, pp. 1-5.
- Mutiarawati, D.T., 2020. In Vitro Anthelmintic Activity of *Acalypha Indica* Leaves
- Extracts. Heal. Notions 4. https://doi.org/10.33846/hn40305
- Menteri Kesehatan.2017.Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 15 Tahun 2017 Tentang Penanggulangan Cacingan. Menteri Kesehatan
- Pratama, R. A. 2021. Potensi Anthelmintik Mangga Arumanis (*Mangifera indicaL.*). Jurnal Medika Hutama, Vol. 2, No. 2, pp. 498-500
- Ridwan Y., Satrija F, Handharyan E. 2020. Aktivitas Anticestoda In Vitro Metabolit Sekunder Daun Miana (*Coleus blumei. Benth*) terhadap Cacing *Hymenolepis microstoma* In Vitro. Jurnal Medik Veteriner DOI: 10.20473/jmv.vol3.iss1.2020.31-37 April 2020, Vol.3 No.1, 31-37 online pada https://e-journal.unair.ac.id/JMV J Med Vet 2020 , 3(1):31-37. pISSN: 2615-7497; eISSN: 2581-012X | 31
- Roring, T., Simbala, H.E.I., De Queljoe, E., 2019. Uji Efek Antelmintik Ekstrak Etanol Daun Pinang Yaki (*Areca Vestiaria*) Terhadap Cacing Gelang (*Ascaris Lumbricoides*) Secara In Vitro. Pharmacon 8. https://doi.org/10.35799/pha.8.2019.2931
- Sumual, P.F., Bodhi, W., Lebang, J.S., 2021. Uji Aktivitas Antelmintik Ekstrak Etanol Daun Sirih (*Piper Betle L.*) Terhadap Cacing Gelang (*Ascaris Lumbricoides*) Secara In Vitro. Pharmacon 10. https://doi.org/10.35799/pha.10.2021.340 38



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution, and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third-party material in this article are included in the article's Creative Commons license unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.