

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Tumbuhan Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) mempunyai nama yang berbeda-beda di setiap daerah di Indonesia seperti sambilata di Melayu, ampadu di Padang, pepaitan di Maluku, ki orai, ki peurat dan takilo di Sunda, serta kenci di Jawa (Loupatty dkk, 1998). Sementara itu di Malaysia dan Singapura disebut *bidara*, di Thailand disebut *fathalaichon*, di Filipina disebut *sinta*, dan di India dikenal dengan *kalmegh* (Sutarno dkk, 1993).



Gambar 2.1. Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.)

### 2.1.1. Klasifikasi

Klasifikasi *Andrographis paniculata* (Syamsuhidayat & Hutapea, 1991):

Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Bangsa	: <i>Solanales</i>
Suku	: <i>Acanthaceae</i>
Marga	: <i>Andrographis</i>
Jenis	: <i>Andrographis paniculata</i> Nees.

### 2.1.2. Distribusi

Tumbuhan ini tersebar mulai dari India, Srilanka, Cina, Pakistan, Thailand, Malaysia, Filipina, dan Indonesia. Di Indonesia tumbuhan sambiloto terdapat hampir di seluruh daerah (Syamsuhidayat & Hutapea, 1991).

### 2.1.3. Deskripsi

*Andrographis paniculata* merupakan tumbuhan herba semusim yang mempunyai tinggi lebih kurang 50 cm. Batangnya berwarna hijau, mempunyai pangkal bulat dan sewaktu muda berbentuk segi empat, sedangkan setelah tua berubah menjadi bulat. Percabangannya bersifat monopodial (Syamsuhidayat & Hutapea, 1991).

Daun tumbuhan ini tunggal berbentuk bulat telur, bersilang berhadapan, pangkal dan ujungnya runcing, tepi rata, panjang kira-kira 5 cm dan lebar kira-kira 1,5 cm dengan panjang tangkai lebih kurang 3 cm. Pertulangan menyirip, berwarna hijau dan hijau keputih-putihan (Syamsuhidayat & Hutapea, 1991).

Bunganya majemuk, berbentuk tandan, terletak di ketiak daun dan di ujung batang. Kelopaknya berbentuk lanset, berbagi lima dengan pangkal saling berlingketan, berwarna hijau, benang sari dua berbentuk bulat panjang, kepala sari berbentuk bulat dan berwarna ungu. Sedangkan putiknya pendek dengan kepala putik berwarna ungu kecoklatan, mahkota lonjong dengan pangkal

berlengketan dan ujung pecah menjadi empat, bagian dalam berwarna putih dan bernoda ungu, dan bagian luar berambut dan berwarna merah (Syamsuhidayat & Hutapea, 1991).

Buah berbentuk bulat panjang dengan ujung runcing dan tengah beralur. Sewaktu masih muda buah ini berwarna hijau, sedangkan setelah tua menjadi hitam. Bijinya kecil, bulat, sewaktu muda berwarna putih dan setelah tua berwarna coklat. Akar tunggang dengan warna putih kecoklatan (Syamsuhidayat & Hutapea, 1991).

#### **2.1.4. Kandungan Kimia**

Kandungan kimia utama *Andrographis paniculata* adalah andrografolid. Andrografolid merupakan suatu senyawa diterpenoid lakton yang mempunyai rasa sangat pahit (disebut juga 'King of Bitter') dan tidak berwarna. Andrografolid dapat diisolasi dari setiap bagian tumbuhan *Andrographis paniculata* yang diekstraksi dengan etanol (Tang & Eisenbrand, 1992).

Kandungan kimia *Andrographis paniculata* lainnya adalah neoandrografolid. Berbeda dengan andrografolid, neoandrografolid rasanya tidak pahit. Kandungan kimia lainnya adalah deoksi-andrografolid, deoksi-didehidroandrografolid, deoksi-oksoandrografolid, deoksi-metoksiandrografolid, andrografisid, dan andrograpanin (Tang & Eisenbrand, 1992; Sutarno dkk, 1993).

Selain mengandung diterpenoid lakton, *Andrographis paniculata* juga mengandung flavonoid (oroksilin dan wogonin), saponin, dan tanin yang dapat diisolasi dari daunnya (Tang & Eisenbrand, 1992).

#### **2.1.5. Khasiat dan Penggunaan**

Sambiloto merupakan tumbuhan berkhasiat obat yang digunakan dalam pengobatan tradisional oleh masyarakat untuk mengobati berbagai macam penyakit. Penggunaan sambiloto sebagai obat tradisional ini antara lain adalah untuk mengobati penyakit-penyakit seperti demam, kencing manis, radang telinga, masuk angin, campak, batuk, diare, tekanan darah tinggi, dan gatal-gatal

(Syamsuhidayat & Hutapea, 1991; de Padua *et al*, 1999). Di India tumbuhan ini juga digunakan secara tradisional untuk mengobati penyakit hepatitis (Saraswat *et al*, 1995).

Secara empiris sambiloto juga digunakan untuk mengobati gigitan ular berbisa (de Padua *et al*, 1999). Salah satu efek akibat gigitan ular berbisa tersebut adalah terjadinya agregasi platelet karena bisa ular mengandung beberapa enzim yang diantaranya homolog dengan trombin misalnya crotalase, sedangkan trombin merupakan agonis yang dapat menginduksi agregasi platelet, sehingga dapat mengakibatkan terbentuknya trombus (Read *et al*, 1978; Kitchens, 1992).

Penggunaan sambiloto sebagai obat tradisional masih menggunakan cara yang sederhana, yaitu dengan merebus daun sambiloto, kemudian air rebusan tersebut diminumkan kepada penderita (Loupatty dkk, 1998).

#### **2.1.6. Efek Farmakologis**

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengetahui efek farmakologis dari *Andrographis paniculata*. Penelitian ini telah dilakukan pada sejumlah hewan coba seperti mencit, tikus dan kelinci. Hasil penelitian tersebut diantaranya menunjukkan bahwa ekstrak air sambiloto dapat menurunkan tekanan darah arteri pada mencit (Tang & Eisenbrand, 1992; de Padua *et al*, 1999).

Penelitian lain untuk membuktikan efek sambiloto dilakukan oleh Saraswat *et al* (1995) yang membuktikan efek hepatoprotektif dan efek antikolestasis tumbuhan ini. Efek hepatoprotektif ekstrak daun sambiloto jauh lebih baik daripada efek hepatoprotektif andrografolid murni (Tang & Eisenbrand, 1992). Pada suatu *double-blind study* terhadap pasien dengan *common cold* yang diobati dengan ekstrak daun sambiloto dosis 1200 mg/hari, menghasilkan perbaikan klinis yang signifikan pada hari ke-4 pemberian ekstrak (de Padua *et al*, 1999).

Ekstrak sambiloto menunjukkan efek antidiare pada kelinci. Ekstrak air sambiloto dengan dosis 10 mg/kgBB dapat mencegah hiperglikemia yang diinduksi dengan glukosa pada kelinci. Ekstrak etanol sambiloto yang diberikan

secara oral pada tikus menunjukkan efek antipiretik yang signifikan. Andrografolid yang diberikan per oral dengan dosis 300 mg/kgBB pada mencit dan tikus menunjukkan efek analgesik yang signifikan terhadap *acetic acid-induced writhing test*. Sementara itu ekstrak etanol sambiloto yang diberikan pada mencit memperlihatkan respon imun yang lebih baik daripada andrografolid murni (de Padua *et al*, 1999).

## 2.2. Trombosis

Trombosis merupakan salah satu masalah kesehatan yang penting untuk diatasi karena dapat mengakibatkan morbiditas dan mortalitas yang tinggi seperti *infark miokard*, *angina pectoris*, aterosklerosis, *stroke*, dan *infark serebri* (Goto & Handa, 1998; Mousa *et al*, 2000).

Trombosis dapat terjadi di arteri, vena, kapiler, atau di ruang-ruang dalam jantung. Manifestasi klinisnya tergantung pada derajat penyumbatan pembuluh darah yang terjadi, lokasi pembuluh darah yang mengalami penyumbatan dan terjadinya emboli akibat terlepasnya trombus dari dinding pembuluh darah (Saito, 1991; Goto & Handa, 1998).

Penyumbatan arteri oleh trombus dapat menyebabkan gangguan klinis akibat terjadinya nekrosis iskemik pada jaringan yang dialiri oleh arteri tersebut, misalnya *infark miokard*, *angina pectoris* dan *stroke* (Madan *et al*, 1998; Vorchheimer & Fuster, 1998). Jika yang mengalami penyumbatan adalah vena, dapat mengakibatkan edema dan inflamasi pada jaringan yang didrainase oleh vena tersebut (Majerus & Tollefsen, 2001).

### 2.2.1. Faktor-faktor yang Berperan dalam Trombosis

Pembentukan trombus merupakan suatu proses biokimia dan fisiologis yang kompleks dengan melibatkan berbagai faktor (Brodison *et al*, 1999). Virchow mengajukan tiga faktor predisposisi patogenesis pembentukan trombus yang dikenal dengan *Virchow's triad*, yaitu perubahan pada dinding pembuluh darah, abnormalitas darah dan stasis aliran darah. Faktor-faktor ini saling

berinteraksi satu dengan lainnya, misalnya perubahan pada pembuluh darah seperti aterosklerosis dapat disebabkan oleh abnormalitas darah seperti hiperkolesterolemia. Selanjutnya abnormalitas darah dapat disebabkan oleh kontak antara darah dengan pembuluh darah yang rusak seperti terjadinya agregasi platelet. Kemudian aliran darah yang lambat misalnya karena kandungan lipid yang tinggi dalam darah dapat memfasilitasi proses ini, karena akibat aliran darah yang lambat tersebut memungkinkan faktor-faktor koagulasi terakumulasi pada dinding pembuluh darah dan mengawali proses koagulasi darah (Saito, 1991; Goto & Handa, 1998).

### **2.2.2. Patogenesis Trombosis**

Mekanisme pembentukan trombus di arteri berbeda dengan pembentukan trombus di vena. Pembentukan trombus di vena umumnya terjadi karena stasis aliran darah, sehingga akan menyebabkan faktor-faktor koagulasi darah akan terkonsentrasi untuk membentuk trombus. Pembentukan trombus di arteri mempunyai mekanisme yang lebih kompleks. Pada pembentukan trombus di arteri, faktor-faktor koagulasi tidak memegang peranan penting, karena faktor-faktor koagulasi ini akan dibawa oleh aliran darah sehingga tidak dapat mencapai konsentrasi yang cukup untuk membentuk trombus. Faktor yang memegang peranan penting dalam proses pembentukan trombus di arteri adalah platelet. Platelet yang menempel pada permukaan pembuluh darah yang rusak dapat mengawali proses trombosis (Fuster *et al*, 1992; Goto & Handa, 1998; Mousa *et al*, 2000).

Trombosis arteri merupakan suatu proses yang terdiri dari beberapa tahap. Sebagai tahap awal adalah terjadinya agregasi platelet sebagai respon terhadap kerusakan dinding pembuluh darah. Agregasi platelet diawali dengan aktivasi platelet oleh suatu agonis seperti adenosin difosfat (ADP), kolagen, trombin, dan epinefrin yang akan menyebabkan transduksi sinyal intraplatelet dan akhirnya menyebabkan perubahan pada reseptor glikoprotein IIB/IIIA (GP IIB/IIIA) yang terdapat pada permukaan membran platelet dari bentuk inaktif menjadi bentuk

aktif. Perubahan reseptor GP IIb/IIIa ini akan mengikat fibrinogen untuk membentuk benang-benang fibrin yang akan menghubungkan antara satu platelet dengan platelet lainnya sehingga akan menjadi agregat platelet yang impermiabel dan selanjutnya akan mengakibatkan terjadinya trombosis (Bennett, 1995).

### 2.2.3. Peranan Platelet dalam Trombosis

Platelet merupakan komponen yang mempunyai peranan penting dalam trombosis (Ratnoff, 1991; Lefkovits *et al*, 1995). Agregasi platelet yang terjadi sebagai respon terhadap rusaknya pembuluh darah dapat menyebabkan pembentukan trombus yang akan mengakibatkan penyumbatan aliran darah (Brodison *et al*, 1999).

Rusaknya pembuluh darah mengakibatkan lapisan kolagen pada pembuluh darah tersebut terpapar aliran darah. Lapisan kolagen ini selanjutnya berinteraksi dengan platelet yang terdapat di dalam darah melalui reseptor GP Ia/IIa dan reseptor GP Ib yang terdapat di permukaan platelet sehingga akan mengaktifkan platelet dan menyebabkan platelet menempel pada lapisan subendotel pembuluh darah yang rusak (adhesi platelet) (Coller, 1990; Ferguson *et al*, 1998; Topol *et al*, 1999). Selain oleh kolagen, aktivasi platelet juga dapat disebabkan oleh pengikatan suatu agonis dengan reseptor spesifik yang terdapat pada membran platelet. Agonis ini antara lain adalah tromboksan A<sub>2</sub>, epinefrin, trombin, dan ADP (Marchant, 1994; Lefkovits *et al*, 1995; Brodison *et al*, 1999).

Aktivasi platelet oleh suatu agonis akan mengawali berbagai mekanisme dan proses biokimia yang terjadi di dalam platelet. Aktivasi platelet mengaktifkan berbagai jalur metabolisme, menyebabkan perubahan bentuk platelet, dan mengaktifkan reseptor GP IIb/IIIa (Marchant, 1994; Lefkovits *et al*, 1995; Ferguson *et al*, 1998). Setelah platelet diaktivasi terjadi hidrolisis fosfatidilinositol difosfat (PIP<sub>2</sub>, senyawa penyusun membran bagian dalam platelet) oleh fosfolipase C menjadi 1,2-diasilgliserol dan inositol trifosfat (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> berperan sebagai *second messenger* dan menyebabkan pelepasan kalsium dari sistem tubuli sehingga akan meningkatkan kalsium intraplatelet. Senyawa 1,2-diasilgliserol

merangsang pengeluaran granul platelet. ADP yang dikeluarkan dari granuli platelet merupakan agonis penting yang merangsang pelepasan granul oleh platelet lainnya sehingga akan terjadi agregasi platelet. Fase pengeluaran granul ini disebut reaksi pelepasan platelet (Marcus, 1991; Lefkovits *et al*, 1995; Brodison *et al*, 1999).

Kalsium intraplatelet dan 1,2-diasilgliserol juga mengaktivasi fosfolipase A<sub>2</sub> untuk menghidrolisis membran fosfolipid platelet menjadi asam arakidonat. Asam arakidonat selanjutnya dimetabolisme oleh siklooksigenase menjadi prostaglandin diendoperoksida (PGG<sub>2</sub>). PGG<sub>2</sub> kemudian diubah oleh peroksidase menjadi senyawa alkoholnya, yaitu PGH<sub>2</sub>. Dari PGH<sub>2</sub> dibentuk tromboksan A<sub>2</sub> dan senyawa lainnya, seperti prostaglandin dan prostasiklin. Tromboksan A<sub>2</sub> merupakan agonis yang kuat untuk menyebabkan pelepasan ADP sehingga akan menginduksi terjadinya agregasi platelet. Tromboksan A<sub>2</sub> berperan dalam memfasilitasi aliran kalsium ke dalam sitoplasma platelet dan membantu pemecahan PIP<sub>2</sub> untuk menghasilkan IP<sub>3</sub> yang meningkatkan pelepasan kalsium dari sistem tubuli ke dalam sitoplasma. Kalsium intraplatelet kemudian membentuk kompleks dengan protein kalmodulin dan selanjutnya akan menghasilkan transduksi sinyal yang menyebabkan platelet beragregasi. Agregat platelet yang terjadi akan membentuk sumbat platelet yang merupakan sumbat hemostasis sementara untuk menutupi celah pada pembuluh darah yang rusak (Marcus, 1991; Saito, 1991; Lefkovits *et al*, 1995).

Agregat platelet yang terbentuk tidak dapat mencegah perdarahan secara stabil, karena itu sebagai tahap berikutnya adalah pengikatan fibrinogen dengan reseptor GP IIb/IIIa yang terdapat di permukaan membran platelet untuk membentuk benang-benang fibrin yang akan memperkuat perlengketan antara satu platelet dengan platelet lainnya, sehingga akan dihasilkan agregat platelet yang padat dan impermiabel. Perubahan reseptor GP IIb/IIIa dari bentuk inaktif menjadi bentuk aktif sehingga akan berikatan dengan fibrinogen diaktivasi oleh peningkatan kalsium intraplatelet (Coller, 1990; Marcus, 1991; Marchant, 1994; Topol *et al*, 1999).

Mekanisme yang dijelaskan di atas yang dikenal juga dengan sistem hemostasis merupakan respon fisiologis tubuh terhadap terjadinya kerusakan pembuluh darah. Sistem hemostasis ini berperan dalam mengontrol keseimbangan antara trombosis dan perdarahan. Ketidakseimbangan sistem hemostasis dapat mengakibatkan trombosis maupun perdarahan. Aktivasi sistem hemostasis pada waktu dan lokasi yang abnormal misalnya karena kerusakan endotel pembuluh darah sehingga akan mengaktivasi platelet, koagulasi yang berlebihan, berkurangnya faktor-faktor penghambat koagulasi, dan penurunan proses fibrinolisis akan menyebabkan trombosis. Sedangkan abnormalitas dan gangguan yang menghambat sistem hemostasis seperti disfungsi platelet, defisiensi faktor-faktor koagulasi, dan hiperfibrinolisis dapat menyebabkan perdarahan (Marchant, 1994).

Respon platelet terhadap kerusakan pembuluh darah juga dipengaruhi oleh aliran darah. Kecepatan aliran darah akan mempengaruhi jumlah dan durasi yang diperlukan oleh platelet untuk menempel pada pembuluh darah yang rusak atau untuk beragregasi dengan platelet lainnya (Marcus, 1991).

Faktor selanjutnya yang menentukan aktivitas platelet dan pembuluh darah adalah eikosanoid, yang meliputi  $PGI_2$  (prostasiklin),  $PGD_2$ ,  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ , dan tromboksan  $A_2$ . Akumulasi dan aktivasi platelet pada permukaan pembuluh darah yang rusak akan menghasilkan rangsangan untuk sintesis dan pelepasan eikosanoid lainnya dari sel endotel pembuluh darah. Akumulasi dan agregasi platelet yang berlebihan dapat dihambat oleh  $PGI_2$  melalui kemampuannya dalam meningkatkan cAMP dalam platelet dan menghambat mobilisasi kalsium (Marcus, 1991).

*Endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) merupakan autakoid yang dilepaskan oleh endotel pembuluh darah dan menyebabkan vasodilatasi serta menghambat agregasi platelet. EDRF menghasilkan efek biologisnya melalui aktivasi guanilat siklase yang terdapat pada otot polos dan platelet. Aktivasi guanilat siklase akan meningkatkan kadar *guanosine-cyclic monophosphate* (cGMP) intrasel yang akan meningkatkan cAMP (Marcus, 1991).

#### 2.2.4. Eikosanoid dan Trombosis

Eikosanoid adalah suatu kelompok senyawa yang merupakan derivat oksigenasi dari asam arakidonat, asam lemak tak jenuh penyusun membran platelet. Derivat-derivat ini mempunyai aktivitas biologis yang luas. Eikosanoid terdiri dari prostaglandin, tromboksan, prostasiklin, leukotrin, lipoksin, dan asam hidroksi lainnya (Marcus, 1991).

Eikosanoid berperan dalam pengaturan respon terhadap *injury* dan inflamasi. Penghambatan sintesis eikosanoid oleh suatu agen seperti aspirin akan mempengaruhi fungsi fisiologis eikosanoid tersebut dan dapat diilai dengan mengukur efek yang ditimbulkannya misalnya terjadinya pemanjangan waktu perdarahan. Efek regulasi eikosanoid meliputi aktivasi atau inhibisi platelet, tonus dan permeabilitas pembuluh darah, kontraksi atau relaksasi otot, aktivasi netrofil dan limfosit. Selain itu juga ikut meregulasi aliran darah ginjal dan metabolisme mineral, mengontrol pertumbuhan dan penyebaran sel-sel neoplastik, dan mengatur aktivitas jaringan spesifik seperti vasokonstriksi koroner ( $LTC_4$ ) (Marcus, 1991).

Eikosanoid tidak disimpan di dalam sel, tetapi akan disintesis sebagai respon terhadap suatu rangsangan kimia atau fisik. Senyawa prekursornya adalah asam arakidonat yang terdapat di sel dalam bentuk ester dan harus dihidrolisis sebelum dioksidasi oleh enzim oksigenase. Pelepasan asam arakidonat memerlukan fosfolipase  $A_2$  dan kalsium. Fosfolipase ini diaktivasi oleh agonis platelet seperti kolagen, trombin, epinefrin dan ADP (Meyer *et al*, 1980; Marcus, 1991).

Asam arakidonat yang dilepaskan ini kemudian dioksidasi oleh enzim siklooksigenase yang terdapat di dalam platelet menjadi endoperoksida ( $PGG_2/PGH_2$ ). Sedangkan oleh enzim lipooksigenase asam arakidonat dikonversi menjadi *12-hydroxyeicosatetraenoic acid* (12-HETE). Di dalam leukosit asam arakidonat dikonversi menjadi leukotrin  $A_4$  ( $LTA_4$ ) (Marcus, 1991).

Aktivitas siklooksigenase dihambat oleh aspirin dan obat antiinflamasi nonsteroid lainnya seperti fenilbutazon, ibuprofen dan indometasin. Aspirin akan mengasetilasi enzim siklooksigenase secara irreversibel. Efek pemberian aspirin terhadap fungsi platelet adalah terjadinya pemanjangan waktu perdarahan. Aspirin mempunyai efek yang bermanfaat dalam menangani penyakit-penyakit trombosis melalui penghambatan enzim siklooksigenase tersebut (Meyer *et al*, 1980; Miletich, 1995).

Tromboksen A<sub>2</sub> menginduksi agregasi platelet melalui penghambatan adenilat siklase sehingga akan menurunkan cAMP dan menginduksi mobilisasi kalsium dalam platelet. Tromboksen A<sub>2</sub> juga merupakan vasokonstriktor yang memperkuat efek vasokonstriktor platelet lainnya, yaitu serotonin. Sementara itu prostasiklin mempunyai efek vasodilatasi dan menghambat fungsi platelet. Prostaglandin mempunyai efek antiagregasi platelet karena meningkatkan kadar cAMP dalam platelet melalui aktivasi adenilat siklase dan menghambat mobilisasi kalsium (Meyer *et al*, 1980; Marcus, 1991).

Mekanisme hemostasis dikontrol oleh keseimbangan antara produksi prostasiklin dengan tromboksen A<sub>2</sub>, karena kedua senyawa ini mempunyai efek yang saling berlawanan terhadap platelet dan pembuluh darah. Keadaan ini menjadi pertimbangan penting dalam pengobatan penyakit trombosis (Marcus, 1991).

#### **2.2.5. Penilaian Antitrombosis**

Efek antitrombosis dapat dinilai dengan mengukur waktu perdarahan. Platelet berperan dalam proses hemostasis, jika terjadi kerusakan pada pembuluh darah akan menyebabkan platelet beragregasi untuk membentuk sumbat hemostasis yang akan mencegah terjadinya perdarahan. Jika agregasi platelet dihambat maka sumbat hemostasis tidak terbentuk sehingga akan mengakibatkan pemanjangan waktu perdarahan (Bowie & Owen, 1991; Marcus, 1991).

Penilaian terhadap efek antitrombosis juga dapat dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan agonis yang dapat menginduksi agregasi platelet, seperti ADP, epinefrin, trombin, tromboksan A<sub>2</sub> dan kolagen (Bowie & Owen, 1991; Marchant, 1994; Bennett, 1995).

Reseptor glikoprotein dan membran fosfolipid platelet yang teraktivasi juga berperan dalam memediasi protrombin menjadi trombin. Trombin selanjutnya akan mengkonversi fibrinogen menjadi fibrin (Marchant, 1994; Scarborough *et al*, 1999), sehingga jika agregasi platelet dihambat, maka fibrinogen tidak dapat berikatan dan pembentukan benang-benang fibrin juga akan dihambat. Dengan demikian pembentukan benang-benang fibrin dapat digunakan untuk menilai efek antitrombosis (Coller, 1990; Scarborough *et al*, 1999).