

AKTIVITAS ANTIHIPERGLIKEMIA FRAKSI ETIL ASETAT DAUN SALAM (*Syzygium polyanthum*) TERHADAP TIKUS PUTIH YANG DIINDUKSI ALOKSAN MONOHIDRAT

(*Salam Leaf (Syzygium Polyanthum) Antihyperglycemic Activity in White Rats Induced by Alloxan Monohydrate*)

Dhimas Toni Angger Prambudi^{1*}, Dewa Ketut Meles², Thomas Valentinus Widiyatno³

¹Program Pascasarjana Ilmu penyakit dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

²Departemen Kedokteran Dasar Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

³Departemen Patologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

*Korespondensi e-mail: dhimastoni94@gmail.com

ABSTRACT

Bay leaf (Syzygium polyanthum) is traditionally used for diabetes treatment in Indonesia. It's contains antioxidant that prevent the free radicals due to hyperglycemic condition. The purpose of this study is to demonstrate the ability of the ethyl acetate fraction of bay leaf in male white rats had hyperglycemia due to alloxan administration. This study used laboratory tests in which up to 24 white rats were randomly separated into six groups. Intraperitoneal administration of alloxan at a dose of 170 mg/Kgbw is used to induce hyperglycemia. A group of healthy rats (K-) were administered 0,5% CMC Na suspension 1mL/day. A group of hyperglycemic rats (K+) received metformin at a dose of 45 mg/Kgbw/1mL/day, while a group of hyperglycemic rats (P0) received 0.5% CMC Na suspension at a dose of 1mL/day. Three hyperglycemia treatment groups received different amounts of ethyl acetate fraction of bay leaf for 14 days. The P1 group received 125 mg/Kgbw/1mL/day of bay leaf ethyl acetate fraction extract, the P2 group received 250 mg/Kgbw/1mL/day, and the P3 group received 500 mg/Kgbw/1mL/day. Blood glucose levels were measured before and after alloxan administration, and then again on day 14. After 14 days of treatment, all rats were euthanized, and blood from the heart was collected to examine the insulin levels. To determine the differences between treatments, statistical analysis utilizing ANOVA was used, followed by Duncan's test. The findings revealed administered an ethyl acetate fraction of bay leaf can lower blood glucose and increased insulin levels in rats had hyperglycemia.

Keywords: bay leaves; blood glucose; ethyl acetate fraction; hyperglycemia; insulin

PENDAHULUAN

Diabetes Mellitus (DM) merupakan penyakit metabolismik kronis yang ditandai dengan kadar glukosa darah yang mengalami peningkatan melebihi batas normal (hiperglikemia) yang terjadi akibat ketidakmampuan pankreas dalam mensekresikan hormon insulin, gangguan kerja insulin sehingga tubuh tidak mampu untuk menggunakan insulin yang diproduksi oleh pankreas secara efektif ataupun keduanya (Al-Ishaq *et al.*, 2019).

Menurut laporan *International Diabetes Federation* (IDF, 2017) dalam beberapa dekade terakhir tampak bahwa prevalensi dan insidensi DM di banyak negara di dunia termasuk Indonesia cenderung mengalami peningkatan. Hasil proyeksi menunjukkan bahwa pada tahun 2045 total penderita diabetes global dapat mencapai angka 629 juta atau meningkat sebesar 48% dibandingkan tahun-tahun sebelumnya. Indonesia sendiri berada pada peringkat sepuluh besar negara dengan prevalensi penderita diabetes dengan usia 20-79 berada pada jumlah 10,3 juta jiwa (IDF, 2017).

Hormon insulin memiliki peran krusial dalam pengaturan homeostasis glukosa darah. Pada keadaan hiperglikemia, sel-sel β pada pulau langerhans pankreas diketahui secara bertahap mengalami kerusakan. Kerusakan sel beta ini diketahui akan mempengaruhi

produksi insulin tubuh. Dimana produksi insulin endogen akan mengalami penurunan yang berimbang pada rendahnya kadar insulin. Kadar insulin yang rendah ini akan memicu hiposensitivitas insulin yang akhirnya menyebabkan terjadinya hiperglikemia. Selanjutnya kondisi hiperglikemia ini diketahui memiliki dampak langsung pada peningkatan kadar *Reactive oxygen species* (ROS) (Fiorentino *et al.*, 2013).

Dalam keadaan hiperglikemik, produksi ROS yang berlebihan bisa disebabkan oleh penurunan pertahanan enzimatik antioksidan. Sel- β sangat sensitif terhadap ROS karena tidak banyak enzim penangkal radikal bebas seperti katalase dan superokksida dismutase yang dimiliki oleh sel tersebut. Molekul-molekul ROS ini sangat reaktif dan dapat mengoksidasi kelompok protein sulfhidril, asam amino seperti nitrat tirosin, dan meningkatkan peroksidasi lipid (Ullah Asmat *et al.*, 2016)

Salah satu sumber alternatif alami yang berpotensi untuk digunakan sebagai anti-diabetes adalah *Syzygium polyanthum* (*S. polyanthum*) atau daun salam. Dalam survei pendahuluan yang dilakukan pada pasien diabetes rawat jalan di Pusat Komunitas Kesehatan Sering Medan, Indonesia, tercatat bahwa ramuan yang paling umum digunakan sebagai obat tradisional untuk diabetes mellitus adalah *S. polyanthum* (57,1%) (Widyawati *et*

al., 2015).

Aloksan merupakan senyawa kimia yang merupakan agen diabetogenik yang sering digunakan pada hewan percobaan. Aloksan diketahui sebagai salah satu pilihan bahan kimia yang banyak digunakan dalam penelitian untuk menginduksi kejadian DM pada hewan coba. Bahan ini memiliki kemampuan untuk menyebabkan kondisi yang menyerupai DM dengan ciri kejadian DM yang identik dengan DM tipe 1

manusia. Sifat toksitas aloksan terutama terhadap sel- β pankreas yang secara spesifik dapat menyebabkan kerusakan pada sel- β pankreas. (Badole *et al.*, 2007). Oleh karena itulah maka aloksan dipilih sebagai bahan aktif yang akan digunakan pada penelitian ini sebelum tikus putih dirawat dengan pemberian ekstrak daun salam (*S. polyanthum*) sebagai pengobatan alternatif alami untuk DM.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Departemen Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner untuk proses ekstraksi daun salam, selanjutnya pemeliharaan hewan coba dilaksanakan di Kandang Hewan Coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, kemudian Pengamatan kadar insulin dilaksanakan di Laboratorium ITD (*Institut of Tropical Disease*) Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian ini dilaksanakan pada Februari 2021 sampai April 2021.

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan sejumlah 24 ekor yang dibagi secara acak dalam 6 kelompok. Induksi aloksan dilakukan secara intraperitoneal dengan dosis 170 mg/Kgbb (Ighondaro, 2018) untuk membuat keadaan hiperglikemia. Berikut adalah pembagian kelompok

perlakuan dan sistematika perlakuannya:

- 1) Kelompok tikus sehat (K-) hanya diberikan suspensi CMC Na 0,5% 1mL/hari.
- 2) Kelompok tikus hiperglikemia (K+) yang diberikan metformin dosis 45 mg/Kgbb/1mL/hari.
- 3) Kelompok tikus hiperglikemia (P0) yang hanya diberikan suspensi CMC Na 0,5% 1mL/hari.

Selanjutnya ada tiga kelompok perlakuan hiperglikemia yang akan diterapi dengan berbagai dosis ekstrak dari fraksi etil asetat daun salam yaitu:

- 1) Kelompok P1 menerima 125 mg/Kgbb/1mL/hari.
- 2) Kelompok P2 menerima 250 mg/Kgbb/1mL/hari.
- 3) Kelompok P3 menerima 500 mg/Kgbb/1mL/hari.

Pemberian fraksi etil asetat daun salam dimulai tiga hari pasca injeksi aloksan dan dilanjutkan

selama 14 hari. Fraksi etil asetat daun salam diberikan secara peroral, sekali sehari dengan menggunakan sonde.

Pembuatan ekstrak fraksi etil asetat daun salam dibuat dengan teknik maserasi dengan methanol 96%. Adaptasi Tikus putih (*Rattus norvegicus*) selama 7 hari dengan pemberian pakan dan minum *ad libitum*. Kondisi hiperglikemia pada tikus diinduksi melalui injeksi intraperitoneal aloksan dosis tunggal 170 mg/Kgbb (Ighondaro, 2018). Sebelum injeksi aloksan tikus dipuaskan terlebih dahulu selama satu malam.

Sampel darah dikoleksi dari vena ekor kemudian dilakukan pemeriksaan kadar gula darah menggunakan alat glukometer digital (GluckoDr. Auto AGM-4000), dengan satuan mg/dL. Tikus dengan KGD ≥ 200 mg/dL dianggap hiperglikemia (Ighondaro, 2018) dan digunakan dalam penelitian ini.

Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan pada sebelum dan sesudah pemberian aloksan dan setelah 14 hari perlakuan pemberian obat.

Di akhir periode percobaan tikus dianastesi menggunakan *diethyl ether* 0.5- μ L secara inhalasi (Shareghi *et al.*, 2018). Pengukuran kadar insulin dilakukan dengan teknik ELISA menggunakan Rat Kit ELISA.

Analisis statistik menggunakan IBM SPSS Statistical Software (version 23). Perbedaan antara kelompok dianalisis menggunakan analisis varians (ANOVA) setelah menilai homogenitas mereka dengan uji Levene. Perbandingan data dari dua kelompok (kelompok kontrol dan kelompok perlakuan) dilakukan dengan menggunakan uji *Duncan*. Semua hasil dinyatakan sebagai mean + SD. Varians dievaluasi pada tingkat signifikansi 5% (Desmukh, 2016).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian pada Tabel 1 menunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan berada pada kondisi normal sebelum diberikan aloksan dan setelah diberi aloksan tampak peningkatan kadar glukosa darah yang signifikan ($p < 0,05$) pada semua kelompok tersebut. Selanjutnya pada hari ke-14 setelah perlakuan tampak penurunan kadar

glukosa darah pada semua kelompok tikus hiperglikemia (K+, P0, P1, P2 dan P3), akan tetapi penurunan yang terjadi pada kelompok P0 relatif lebih sedikit dibandingkan 4 kelompok tikus hiperglikemia lainnya (K+, P1, P2 dan P3). Sedangkan pada K- tidak terjadi perubahan apapun.

Tabel 1. Nilai rata-rata kadar Glukosa darah sebelum dan setelah diinduksi aloksan serta hari ke 14 pemberian ekstrak fraksi etil asetat daun salam

Perlakuan	Rata-rata kadar gula darah ± Standar Deviasi (mg/dl)		
	Sebelum aloksan	Setelah aloksan	14 hari setelah perlakuan
K+	78,75 ± 2,21	414,50 ^b ± 65,76	173,30 ^b ± 21,37
K-	79,00 ± 1,82	79,25 ^a ± 5,05d	76,45 ^a ± 4,03
P0	77,00 ± 6,97	423,75 ^b ± 49,20	413,30 ^d ± 27,15
P1	81,00 ± 4,24	402,75 ^b ± 64,58	296,10 ^c ± 30,11
P2	77,00 ± 9,12	374,75 ^b ± 43,31	269,20 ^c ± 35,75
P3	80,00 ± 3,91	349,25 ^b ± 35,30	177, 90 ^b ± 11,92

Keterangan: (P<0,05) Perbedaan signifikan 1) Kelompok tikus sehat (K-) hanya diberikan suspensi CMC Na 0,5% 1ml/hari. 2) Kelompok tikus hiperglikemia (K+) yang diberikan metformin dosis 45 mg/kgbb/1ml/hari. 3) Kelompok tikus hiperglikemia (P0) yang hanya diberikan suspensi CMC Na 0,5% 1ml/hari. 4) Kelompok tikus hiperglikemia (P1) menerima FEADS dosis 125 mg/kgbb/1ml/hari. 5) Kelompok tikus hiperglikemia (P2) menerima FEADS dosis 250 mg/kgbb/1ml/hari. 6) Kelompok tikus hiperglikemia (P3) menerima FEADS dosis 500 mg/kgbb/1ml/hari.

Dari tabel diatas dapat dilihat bahwa kadar glukosa darah pada tikus sebelum diinduksi aloksan menunjukkan nilai <100 mg/dl, yang berarti bahwa tikus dalam keadaan normal (Kim *et al.*, 2006). Peningkatan kadar glukosa darah setelah induksi aloksan menunjukkan bahwa tikus mengalami kondisi hiperglikemia yang dapat dilihat dari hasil pengukuran kadar glukosa (>200 mg/dl) (Ighodaro., 2017). Hiperglikemia yang terjadi akibat pemberian aloksan dimungkinkan karena efek toksik aloksan yang spesifik mengakibatkan kerusakan pada sel beta pankreas sehingga menyebabkan defisiensi sekresi insulin. Peningkatan kadar glukosa darah setelah pemberian aloksan dalam penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian dari Obasi dan

Ogugua (2021).

Efek hiperglikemia akibat pemberian aloksan terutama dikaitkan dengan penyerapan aloksan secara cepat kedalam sel beta karena bentuk molekulnya yang menyerupai glukosa yang bersifat hidrofilik sehingga dapat menembus membran plasma sel beta melalui perantara glukosa transporter 2 (GLUT-2), saat aloksan memasuki sel beta menyebabkan pembentukan radikal bebas superoksida yang dibentuk oleh reaksi redoks aloksan (Szkudelski, 2001).

Selanjutnya, kadar glukosa darah pada hari ke 14 setelah perlakuan pemberian ekstrak fraksi etil asetat daun salam (P1, P2 dan P3) menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p <0,05$) terhadap penurunan kadar glukosa darah tikus hiperglikemia. Hal ini dapat

disebabkan karena adanya senyawa fenolik pada daun salam (*Syzygium polyanthum*) berupa tanin dan flavonoid yang bersifat sebagai antioksidan yang berperan untuk melindungi komponen sel dan membran sel pankreas dari oksidasi radikal bebas akibat pemberian aloksan (Hidayati *et al.*, 2017).

Senyawa Fenolik seperti flavonoid dapat menekan pembentukan Reactive Oxygen Species (ROS) melalui mekanisme transfer elektron ke ROS. Selanjutnya, ROS akan diubah menjadi senyawa non radikal yang tidak berbahaya bagi membran sel (Mayes 2002). Idakwoji *et al.*, (2021) mengungkapkan bahwa senyawa fenolik dapat menyebabkan regenerasi sel beta dan pelepasan insulin, sehingga menurunkan konsentrasi glukosa darah. Penurunan kadar glukosa darah setelah pemberian ekstrak fraksi etil asetat daun salam sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Widharna *et al.*, (2015)

Selanjutnya Tabel 2 menunjukkan nilai rata-rata kadar insulin setelah 14 hari perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan adanya penurunan kadar insulin yang signifikan ($p <0,05$) antara kelompok tikus hiperglikemia yang tidak menerima fraksi etil asetat tumbuhan atau obat (P0) dibandingkan dengan kelompok tikus normal (K-). Kadar insulin tikus hiperglikemia yang diobati dengan metformin (K+) mengalami peningkatan kadar insulin namun

tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p >0,05$) bila dibandingkan dengan tikus hiperglikemia (P0) yang tidak menerima fraksi etil asetat daun salam atau metformin. Peningkatan kadar insulin yang signifikan ($p <0,05$) terlihat pada kelompok perlakuan tikus hiperglikemia yang diobati dengan ekstrak fraksi etil asetat daun salam (P1, P2, P3) dibandingkan dengan kelompok diabetes yang tidak menerima fraksi etil asetat daun salam atau metformin (P0). Berdasarkan hasil ketiga dosis terapi ekstrak fraksi etil asetat daun salam, peningkatan rata-rata nilai kadar insulin tertinggi terdapat pada kelompok P2 yang menerima terapi dosis 250 mg/Kgbb.

Dalam penelitian ini terlihat bahwa kadar insulin pada tikus hiperglikemia (K+, P0, P1, P2, P3) secara signifikan mengalami penurunan ($p<0,05$) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (K-). Pemberian aloksan pada tikus mengakibatkan kerusakan pada sel beta yang berfungsi untuk mensekresikan hormon insulin. Gangguan terhadap sekresi hormone insulin juga dapat berpengaruh negatif terhadap proses penyerapan glukosa darah sehingga terjadi keadaan hiperglikemia. Disfungsi sel beta pankreas yang menyebabkan gangguan sekresi insulin dianggap sebagai salah satu kontributor utama penyebab diabetes.

Tabel 2. Nilai rata-rata kadar insulin ± standar deviasi dengan teknik ELISA

Perlakuan	Rata-rata kadar insulin ± SD (mIU/L)
K+	6,640 ^{ab} ± 0,501
K-	9,013 ^d ± 0,710
P0	5,844 ^a ± 0,301
P1	7,362 ^{bc} ± 0,733
P2	10,579 ^e ± 0,762
P3	7,944 ^c ± 0,747

Keterangan: Perbedaan signifikan ($P<0,05$)

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan kadar insulin tikus yang signifikan ($p<0,05$) setelah tikus diberikan terapi ekstrak fraksi etil asetat daun salam (P1, P2, P3) dibandingkan dengan kelompok tikus hiperglikemia yang tidak menerima fraksi etil asetat daun salam atau metformin (P0). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak fraksi etil asetat daun salam selama 14 hari terbukti mampu memperbaiki kerusakan jaringan pankreas yang diakibatkan oleh induksi aloksan. Ekstrak fraksi etil asetat daun salam membantu sel beta sehingga dapat mensekresikan insulin.

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa pemberian ekstrak fraksi etil asetat daun salam (P2) selama 14 hari mampu meningkatkan kadar insulin

melebihi kelompok normal K-. Hal ini menunjukkan bahwa efek pemberian ekstrak fraksi etil asetat daun salam pada dosis 250 mg/Kgbb memberikan efek yang paling baik dibandingkan kelompok kontrol (K+) maupun kelompok perlakuan dengan dosis berbeda lainnya (P1 dan P3). Penigkatan kadar insulin pada tikus yang diberikan ekstrak fraksi etil asetat daun salam disebabkan karena adanya kandungan antioksidan daun salam. Tsao, (2010) mengungkapkan bahwa bahwa Polifenol seperti flavonoid memiliki sifat antioksidan yang kuat. Salah satu mekanisme aksi polifenol yang berperan penting dalam regulasi glukosa dan insulin pada penderita diabetes adalah aktivasi PPAR- γ , yang memiliki efek pada metabolisme dan proses inflamasi (Aryaeian *et al.*, 2017).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa: Fraksi etil asetat daun salam (*Syzygium polyanthum*) dgn dosis 125, 250 dan 500 mg/Kgbb dapat menurunkan glukosa, meningkatkan

kadar insulin plasma pada tikus (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia yang diinduksi aloksan. Terdapat hubungan antara kadar glukosa dengan insulin pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aloksan

dengan diberi fraksi etil asetat daun salam (*Syzygium polyanthum*).

Saran dalam penelitian ini adalah perlu adanya penelitian lebih

lanjut pada hasil isolasi senyawa antioksidan fraksi etil asetat daun salam untuk menguji bioaktivitas daun salam sebagai antioksidan

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Ishaq RK, Abotaleb M, Kubatka P, Kajo K, Büsselberg D. 2019. Flavonoids and Their Anti-Diabetic Effects: Cellular Mechanisms and Effects to Improve Blood Sugar Levels. *Biomolecules*; 9(9):430.
- Aryaeian N, Khorshidi Sedehi S, Arablou T. 2017. Polyphenols and their effects on diabetes management: A review. *Med J Islam Repub Iran*; 31:134.
- Badole, S.L., N.M. Patel, P.A. Thakurdesai and S.L. Bodhankar. 2007. Interaction of Aqueous Extract of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel-Champ with Glyburide in Alloxan Induced Diabetic Mice. *eCAM*: 1-6.
- Deshmukh, Narendra S. 2016. Safety assessment of McB-E60 (extract of a *Momordica* sp.): Subchronic toxicity study in rats. Nutritional Health Institute Laboratories LLC. Elsevier Ireland Ltd.
- Fiorentino TV, Prioletta A, Zuo P, Folli F. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des*. 2013;19(32):5695-703. doi: 10.2174/13816128113193200 05. PMID: 23448484.
- Hidayati, Mutia Devi (2015) Pemisahan Dan Identifikasi Antioksidan Dan Inhibitor α -Glukosidase Dari Daun Salam. Undergraduate thesis, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Idakwoji, P.A., Ekpo, D.E., Joshua, P.E., Njoku, O.U., Nwodo, O.F.C., 2021. Ethanol extract of *Tephrosia bracteolata* leaves and its fractions ameliorates alloxan-induced diabetes and its associated complications in Wistar rat model. *Int. J. Diabetes Dev. Ctries.* 41 (3), 456–468.
- Ighodaro, O. M., Adeosun, A. M., Akinloye, O.D. 2017. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. *Medicina* 53(6); 365- 374.
- International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 8th Edition. Brussels, Belgium:

- International Diabetes Federation, 2017.
- Mayes PA (2002) Metabolism asam lemak tak jenuh dan eicosanoid. Jakarta: Sikumbang EGC: 242-259
- Meles, D.K. 2007. Alkaloid Achyranthes aspera linn Menyebabkan Nekrosis dan Apoptosis Sel Mieloma. Media Kedokteran Hewan. Vol.23.1.
- Obasi, D., C. and Oggua, V., N. 2021. Effect of Ruzu Herbal Bitters on the Liver Function and Lipid Profile Parameters of Alloxan-Induced Diabetic Rats. Journal of Clinical and Experimental Hepatology. 27(10):101057
- Shareghi Brojeni M, Salimi M, Mirmohammadsadeghi Z, Haghparast A, Eliassi A. Comparison of Effects of Light Anesthetics, Diethyl Ether and Carbon Dioxide, on Hypothalamic Paraventricular Nucleus D₁ and D₂ Dopamine Receptors- and Glucosensitive Neurons- Induced Food Intake in Fasted Conscious Rats. *Basic Clin Neurosci.* 2018;9(4):269-274.
- doi:10.32598/bcn.9.4.269
- Szkudelski, T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas Physiol. Res. 50: 536-546,
- Ullah Asmat, Khan Abad, Khan Ismail, Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review, Saudi Pharmaceutical Journal, Volume 24, Issue 5, 2016, Pages 547-553, ISSN 1319-0164,
- Widharna, R.M., Ferawati, Tamayanti, W.D., Hendriati, L., Widjajakusuma, E.C., 2015. Antidiabetic effect of the aqueous extract mixture of Andrographis paniculata and Syzygium polyanthum leaf. Eur. J. Med. Plants 6, 82–91.
- Widyawati T, Purnawan WW, Atangwho IJ, Yusoff NA, Ahmad M, Asmawi MZ. ,2015. Anti-diabetic activity of Syzygium polyanthum (Wight) leaf extract, the most commonly used herb among diabetic patients in Medan, North Sumatera, Indonesia. Int J Pharm Sci Res 6:1698.