

Pengaruh Ekstrak Jinten Hitam (*Nigella Sativa L.*) terhadap Kerusakan Sel Tubulus Proksimal Ginjal Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Jantan Galur Sprague Dawley yang Diinduksi Gentamisin

Susianti

Bagian Ilmu Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

Abstrak

Bagian ginjal yang sering terjadi kerusakan akibat zat xenobiotik adalah tubulus proksimal. Gentamisin sebagai salah satu zat xenobiotik, di dalam tubulus proksimal mengganggu proses transpor yang diperantarai kalsium dan menimbulkan kerusakan ginjal yang derajatnya bisa berupa gangguan ginjal ringan sampai dengan nekrosis tubulus akut berat yang dapat bersifat ireversibel. Salah satu tanaman obat yang diduga bisa digunakan untuk mengurangi kerusakan sel tubulus ginjal akibat gentamisin adalah jinten hitam (*Nigella sativa L.*). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa L.*) terhadap sel tubulus proksimal ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague dawley yang diinduksi gentamisin. Penelitian menggunakan 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague dawley berumur 10–16 minggu yang dipilih secara random yang dibagi menjadi 5 kelompok. Waktu penelitian selama 2 bulan. Prosedur penelitian meliputi pembuatan ekstrak, pemeliharaan dan perlakuan hewan coba, pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan hematoxylin-eosin, pengamatan preparat histologi dan analisis data. Dari hasil penelitian ini didapatkan bahwa total skor kerusakan tubulus proksimal ginjal tikus kelompok 1 (kontrol normal) $6,73 \pm 3,87$, kelompok 2 (gentamisin) $27,93 \pm 8,80$, kelompok 3 (gentamisin+jinten hitam 500mg/kgBB) $27,5 \pm 12,98$, kelompok 4 (gentamisin+jinten hitam 1000mg/kgBB) $9,07 \pm 3,94$ dan kelompok 5 (gentamisin+jinten hitam 1500mg/kgBB) $13,57 \pm 4,54$. Data yang diperoleh diuji dengan kruskal wallis dengan nilai $p=0,00$ ($p<0,05$). Terdapat pengaruh pemberian ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa L.*) terhadap kerusakan tubulus proksimal ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague dawley yang mendapat diinduksi gentamisin.

Kata kunci: ekstrak etanol jinten hitam, gentamisin, kerusakan tubulus proksimal, *Nigella Sativa L*

Pendahuluan

Ginjal merupakan organ kedua setelah hepar yang sering mengalami kerusakan akibat zat xenobiotik. Hal tersebut dapat disebabkan karena ekskresi utama beberapa zat kimia melalui ginjal, selain itu ginjal juga merupakan pintu gerbang utama ekskresi zat-zat hasil pencernaan atau hasil metabolisme (Underwood, 1999; Guyton, 2008). Ginjal memiliki kemampuan untuk mengkonsentrasikan larutan dan substansi zat

atau bahan kimia sehingga menjadikan ginjal sangat rentan terhadap pengrusakan oleh xenobiotik dan bahan-bahan kimia berbahaya yang ada di dalam sirkulasi darah (Underwood,1999)

Salah satu bagian ginjal yang sering terjadi kerusakan akibat zat xenobiotik adalah tubulus proksimal, karena sebagian besar (60–80%) proses reabsorpsi hasil filtrasi terjadi di tubulus proksimal. Selain itu,

tubulus proksimal peka terhadap anoksia dan mudah hancur akibat toksisitas kontak dengan bahan-bahan yang diekskresikan melalui ginjal. Kerusakan yang sering terjadi adalah nekrosis tubulus dan hiperplasia atau hipoplasia tubulus (Underwood, 1999).

Gentamisin sebagai salah satu zat xenobiotik dapat mengganggu proses transpor di tubulus proksimal yang diperantarai kalsium sehingga dapat menimbulkan kerusakan ginjal ringan hingga terjadi nekrosis tubulus akut berat yang bersifat ireversibel (Mycek, 2001; Katzung, 2005). Selain itu, gentamisin juga menambahkan produksi anion O₂ dan radikal OH⁺ yang tidak stabil sehingga mengakibatkan radikal bebas yang menimbulkan kerusakan oksidatif pada tubulus proksimal ginjal (Singh dkk., 2009).

Menurut Juan (2007), gentamisin juga dapat memicu apoptosis atau kematian sel tubulus proksimal ginjal tikus melalui mekanisme aktivasi beberapa protein yang terlibat dalam apoptosis seperti caspase-3, caspase-8, caspase-9 dan Bax. Pemberian tetramethylpyrazine yang terkandung dalam tanaman obat *Ligusticum wallichii* (*Chuanxiong*) dapat mengurangi efek apoptosis tersebut. Tanaman obat lainnya yang diduga dapat mengurangi kerusakan sel tubulus ginjal akibat pemberian gentamisin adalah jinten hitam/ *Habatussauda* (*Nigella sativa L.*).

Data hasil penelitian menunjukkan bahwa biji jinten hitam mengandung 36–38% fixed oil dan 0,4–2,5% essential oil. Essential oil jinten hitam mengandung timoquinon, alkaloid dan saponin (Ali dan Blunden, 2003). Selain itu, biji jinten hitam memiliki efek antipiretik, analgesik, antimikroba, antiinflamasi, dan sebagai antioksidan. Jinten hitam juga berperan sebagai protektor hepar dari induksi beberapa bahan toksik (Alsaif, 2007; Farrag dkk, 2007; Gilani dkk, 2004) serta sering digunakan sebagai obat antikanker (Shafi dkk, 2009). Hal tersebut tidak terlepas dari

banyaknya antioksidan yang terkandung di dalam jinten hitam. Kandungan bahan aktif jinten hitam terbanyak adalah thymoquinone (27,8%–57,0%) (El-Tahir dan Bakeet, 2006; Gernot, 2009). Jinten hitam dosis 250–500 mg/kgBB mampu melindungi hepar dari induksi karbon tetraklorida (CCl₄) (Al-Ghamdi, 2003). Menurut De Padua dkk. (1999), senyawa alkaloid bersifat detoksifikasi yang dapat menetralkan racun di dalam tubuh, sedangkan flavonoid memiliki aktivitas farmakologik sebagai antiinflamasi, analgetik, antidiare, antitumor, antioksidan, dan imunostimulan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya pengaruh ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa L.*) terhadap kerusakan sel tubulus proksimal ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague Dawley yang diinduksi gentamisin.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode acak terkontrol. Menggunakan 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague dawley berumur 10–16 minggu yang dipilih secara random yang dibagi menjadi 5 kelompok. Penelitian dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Unila dan Laboratorium Fakultas Kedokteran UGM. Waktu penelitian selama 6 bulan. Populasi penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague dawley berumur 10–16 minggu yang diperoleh dari laboratorium Balai Penelitian Veteriner (BALITVET) Bogor. Sampel penelitian sebanyak 25 ekor yang dipilih secara acak yang dibagi dalam 5 kelompok. Ekstrak dibuat di Bagian Farmasi FK UGM. Proses pembuatan ekstrak etanol jinten hitam dalam penelitian ini menggunakan etanol sebagai pelarut.

Menurut Sulistianto dkk (2004), ekstraksi dimulai dari penimbangan jinten hitam. Selanjutnya seluruh bagian dikeringkan dalam almari pengering, dibuat serbuk dengan menggunakan blender atau mesin

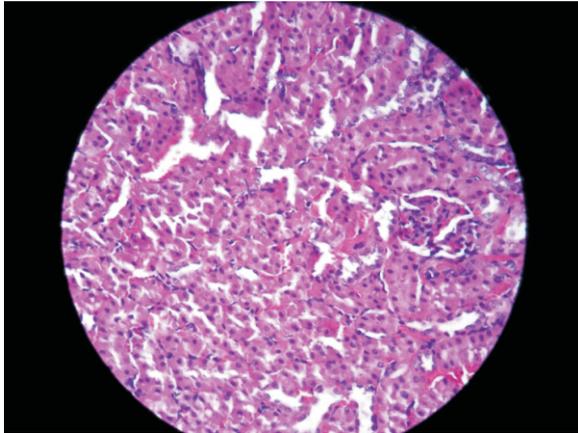
penyerbuk. Etanol dengan kadar 70% ditambahkan untuk melakukan ekstraksi dari serbuk ini selama kurang lebih 2 (dua) jam kemudian dilanjutkan maserasi selama 24 jam. Setelah masuk ke tahap filtrasi, akan diperoleh filtrat dan residu. Filtrat yang didapatkan akan diteruskan ke tahap evaporasi dengan Rotary evaporator pada suhu 400 C sehingga akhirnya diperoleh ekstrak kering. Selanjutnya dari ekstrak ini akan dibuat larutan stok. larutan stok yang dimaksud adalah larutan pekat dengan dosis 100 g/100 ml, hal ini dimaksudkan agar mempermudah dalam perlakuan pada tikus saat percobaan. Ekstrak dibuat dengan melarutkan 100 g berat ekstrak jinten hitam kedalam 100 ml akuades sehingga dalam 1 mL ekstrak mengandung 1000 mg. Dosis pertengahan ekstrak etanol jinten hitam yang akan digunakan dalam penelitian ini berdasar pada penelitian Utami et al. (2011) sebesar 500, 1000 dan 1500 mg/kg. Pada penelitian tersebut dosis ini telah terbukti dapat menurunkan kadar serum kreatinin, serum urea, dan blood urea nitrogen (BUN) terhadap tikus yang diinduksi gentamisin. Tikus sebanyak 10 ekor, dikelompokkan dalam 5 kelompok. Kelompok I sebagai kontrol normal, dimana hanya akan diberi aquades. Kelompok II sebagai kontrol patologis, dimana diberikan gentamisin dengan dosis 80 mg/KgBB. Kelompok III adalah kelompok perlakuan coba dengan pemberian ekstrak jinten hitam dosis 500 mg/KgBB, kelompok IV dengan dosis ekstrak jinten hitam sebanyak 1000 mg/KgBB, dan kelompok V dengan dosis ekstrak jinten hitam sebanyak 1500 mg/KgBB. Kemudian selang 2 jam kelompok III, IV dan V diberikan induksi gentamisin sebesar 80 mg/KgBB. Masing-masing diberikan secara intra peritoneal selama 8 hari. Kemudian pada hari ke-9 dan 10, masing-masing mencit dari kelompok III, IV, dan V tetap diberikan ekstrak jinten hitam. Mencekoki tikus dengan ekstrak jinten hitam selama 8 hari dan melakukan injeksi gentamisin secara intraperitoneal selama 8

hari, dilanjutkan pemberian ekstrak jinten hitam peroral hingga hari ke 10. Tikus tetap diberikan makan ad libitum. Setelah 10 hari, perlakuan diberhentikan. Lima tikus jantan dari tiap kelompok dinarkosis dengan kloroform, dilakukan laparotomi, diambil ginjal untuk dibuat sediaan mikroskopis. Pembuatan sediaan mikroskopis dengan metode paraffin dan pewarnaan Hematoksilin Eosin. Hematoksilin mempunyai sifat pewarna basa, yaitu memulas unsur jaringan yang basofilik, Eosin memulas unsur jaringan yang bersifat asidofilik. Kombinasi ini paling banyak digunakan (Junqueira dkk, 2007). Sampel ginjal ini difiksasi dengan formalin 10%. Selanjutnya dilakukan pembuatan sediaan mikroskopis jaringan ginjal. Sediaan mikroskopis dengan pewarnaan HE diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x10 pada 5 lapang pandang kemudian ditentukan skor kerusakan tubulus proksimal. Kerusakan yang dinilai adalah tubulus ginjal yang mengalami degenerasi berupa edema dan nekrosis. Skor yang diberikan untuk tubulus yang mengandung sel normal berupa angka 0, sel edema berupa angka 1 dan sel nekrosis berupa angka 2. Skor tiap tubulus dijumlah per lapangan pandang. Analisis data menggunakan uji Kruskal Wallis karena distribusi data tidak normal.

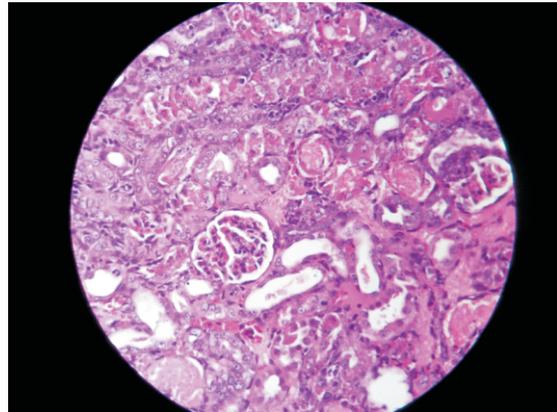
Hasil

Dari hasil penelitian yang dilakukan diperoleh bahwa pada kelompok I (kelompok kontrol) terlihat ada beberapa sel tubulus proksimal yang mengalami edema/pembengkakan, namun itu hanya bagian kecil. Sedangkan sel tubulus yang edema hampir tidak ditemukan. Sebagian besar sel normal (Gambar 1).

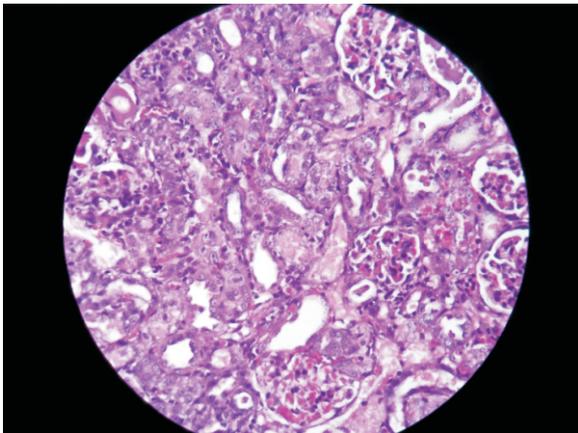
Histopatologi ginjal tikus yang diberikan gentamisin (kelompok II) tampak pada gambar 2. Pada gambar tersebut terlihat tubulus proksimal mengalami perubahan struktur histopatologi berupa pembengkakan dan nekrosis sel tubulus.



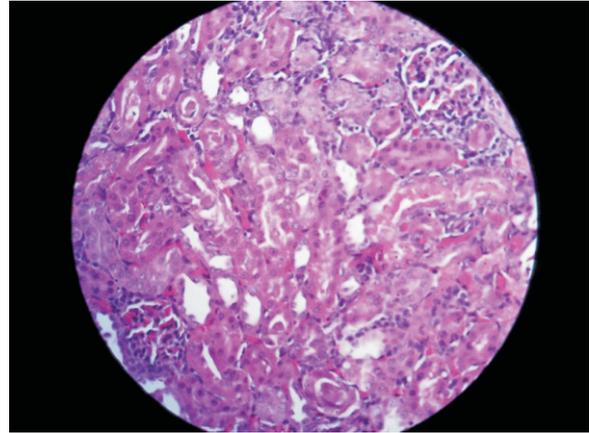
Gambar 1. Gambaran histopatologi ginjal tikus kelompok I dengan pewarnaan H.E (perbesaran 400 kali)



Gambar 3. Gambaran histopatologi ginjal tikus kelompok III dengan pewarnaan H.E (perbesaran 400 kali)



Gambar 2. Gambaran histopatologi ginjal tikus kelompok II dengan pewarnaan H.E (perbesaran 400 kali)



Gambar 4. Gambaran histopatologi ginjal tikus kelompok IV dengan pewarnaan H.E (perbesaran 400 kali)

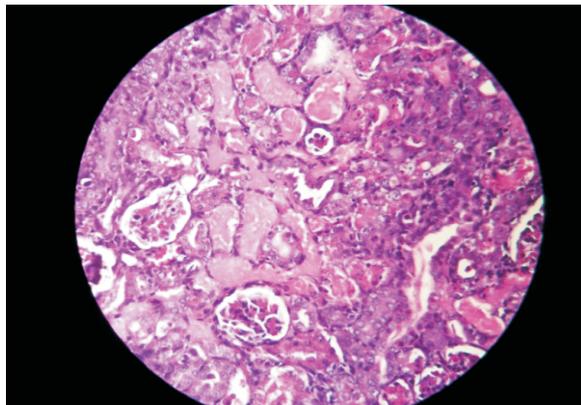
Pada tikus yang diberikan gentamisin dan ekstrak jinten hitam dosis 500mg/kgBB (kelompok III) didapatkan gambaran kerusakan ginjal yang hampir sama dengan kelompok II yaitu mengalami pembengkakan dan nekrosis sel tubulus (Gambar 3).

Gambaran histopatologi tubulus proksimal ginjal tikus yang diberikan gentamisin dan ekstrak jinten hitam dosis 1000 mg/kgBB (kelompok IV) didapatkan gambaran kerusakan ginjal berupa pembengkakan dan nekrosis sel tubulus, namun tidak terlalu banyak seperti kelompok I dan II (Gambar 4).

Pada tikus yang diberikan gentamisin dan ekstrak jinten hitam dosis 1500 mg/kgBB (kelompok V) didapatkan gambaran kerusakan ginjal berupa pembengkakan dan nekrosis sel tubulus yang lebih banyak dibanding kelompok IV, namun lebih sedikit dari kelompok II dan III (Gambar 5).

Untuk melihat perbandingan gambaran histopatologis masing-masing kelompok dapat dilihat rata-rata skor kerusakan sel tubulus pada tabel 1 serta grafik pada gambar 6.

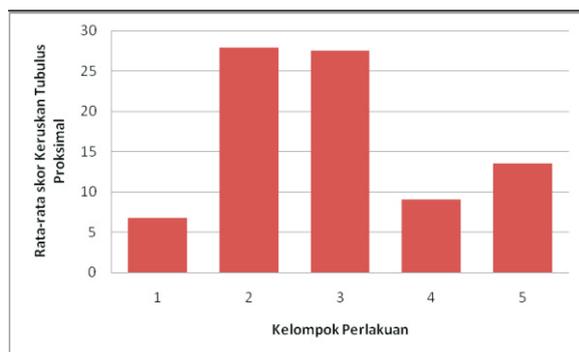
Dari hasil analisis data menggunakan Kruskal Wallis, didapatkan hasil signifikan dengan nilai $p=0,00$ ($p<0,05$), artinya paling tidak terdapat 2 kelompok data yang mempunyai perbedaan rerata yang bermakna.



Gambar 5. Gambaran histopatologi ginjal tikus kelompok V dengan pewarnaan H.E (perbesaran 400 kali)

Tabel 1. Rata-rata skor kerusakan tubulus proksimal

Kelompok	Rata-rata \pm SD
1	6,73 \pm 3,87
2	27,93 \pm 8,80
3	27,5 \pm 12,98
4	9,07 \pm 3,94
5	13,57 \pm 4,54



Gambar 6. Grafik kerusakan tubulus proksimal

Pada hasil mikroskopis gambaran histopatologi ginjal tikus didapatkan bahwa tubulus yang diinduksi gentamisin 0,4 ml selama 8 hari mengalami kerusakan.

Kerusakan yang dimaksud adalah pembengkakan sel, tubulus degenerasi, tubulus dilatasi, dan nekrosis sel tubulus. Respon pertama kali yang terjadi ketika suatu sel bereaksi terhadap jejas atau cedera adalah pembengkakan kemudian akan dilanjutkan dengan dilatasi, degenerasi dan nekrosis. Pada penelitian ini, waktu 8 hari pemberian gentamisin dapat menimbulkan jejas yang bersifat akut hal tersebut dikarenakan gentamisin dalam tubulus proksimal dapat mengganggu proses transpor yang diperantarai kalsium dan menimbulkan kerusakan ginjal berupa jejas yang ringan hingga nekrosis tubulus akut berat yang bersifat ireversibel (Mycek, 2001). Gentamisin juga menambahkan produksi O₂-anion dan radikal OH⁺ yang tidak stabil sehingga mengakibatkan radikal bebas yang mengindikasikan kerusakan oksidatif pada level tubulus proksimal ginjal (Singh et al., 2009).

Berdasarkan analisis dengan uji Kruskal Wallis, didapatkan hasil signifikan dengan nilai $p=0,00$ ($p<0,05$), yang artinya terdapat pengaruh pemberian perlakuan pemberian jinten hitam terhadap gambaran histopatologi tubulus proksimal ginjal jantan secara signifikan. Ekstrak etanol jinten hitam diduga dapat mencegah kerusakan tubulus proksimal dengan mekanisme antioksidan dan antiinflamasi yang dikandung dalam jinten hitam.

Pada hasil penelitian dapat dilihat bahwa skor kerusakan antara kelompok II (gentamisin) dan kelompok III (gentamisin+jinten hitam 500mg/kgBB) hampir tidak ada perbedaan. Hal tersebut menunjukkan bahwa jinten hitam dengan dosis 500 mg/kgBB belum efektif untuk melindungi sel tubulus proksimal ginjal dari kerusakan akibat pemberian gentamisin. Sedangkan pada kelompok IV (jinten hitam dosis 1000mg/kgBB) memperlihatkan bahwa kerusakan sel tubulus proksimal lebih rendah dibandingkan kelompok II dan III. Itu artinya

- El-Tahir, K. E. H., & Bakeet, M. 2006. The black seed *nigella sativa* linnaeus—a mine for multi cures: A Plea for Urgent Clinical Evaluation of its Volatile Oil. *JTU Med Sc.* 1: 1–19.
- Gernot, K. 2009. Spice pages: Onion seeds (*Nigella sativa*, falsely black cumin or black caraway). Available from: <http://www.unigraz>.
- Al-Ghamdi, M. S. 2003. Protective effect of *nigella sativa* seeds against carbon tetrachloride-induced liver damage. *The American Journal of Chinese Medicine.* 31:721–728.
- Yaman I, Balikci E.. 2010. Protective effects of *nigella sativa* against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol*, 62(2): 183–90
- Shafi G, Munshi A, Hasan T.N, Alshatwi A.A, Jyothy A and Lei D K Y. 2009.
- De Padua, L.S, Bunyapranastsara, Lemmens, R.H.M.J. 1999. Plant resources of South Asia 12 (1) Medicinal and Poisonous Plants I. Bogor.
- Gordon, M.H. 1993. The mechanism of antioxidants action in vitro. Di dalam: *Food Antioxidants*. B.J.F. Hudson, editor. Applied Science.
- Guyton, C. dan Hall, E. 2008. Fisiologi kedokteran. EGC. Jakarta.
- Juan, S.H., Chen, C.H., Hsu, Y.H., Hou, C.C., Chen, T.H., Lin, H., Chu, Y.L., Sue, Y. M. 2007. Tetramethylpyrazine protects rat renal tubular cell apoptosis induced by gentamicin. *Nephrol Dial Transplant.* 22:732–73.
- Katzung, G.B. (1998). *Basic and Clinical Pharmacology*. Edisi 9. Singapore: Mc. Graw Hill. hlm. 635–640, 686–693
- Mycek, J. Mary., Harvey, A. Richard., and Champe, C. Pamela. (2001). *Farmakologi ulasan bergambar*. Widya Medika. Jakarta.
- Robbins, S., Ramzi, R., Vinay, K. 2007. *Robbins dasar patologi penyakit* Edisi 7. EGC. Jakarta.
- Sulistianto, D.E., Harini., Handajani N.S. 2004. Pengaruh pemberian ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl) terhadap struktur histologis hepar tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) setelah Perlakuan dengan Karbon Tetraklorida (CCl₄) secara Oral. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta. Surakarta
- Singh, Pratibha., Srivastava, Man Mohan., and Khemani, Lakhu Dev. 2009. Renoprotective effects of *andrographolida paniculata* (Burm.f.) Nees In Rats. Departement of chemistry Dayalbagh Educational Institute. India. 114:136–139
- Underwood, J.C.E. 1999. *Patologi umum dan sistemik*. Vol 2. EGC. Jakarta
- Wijoyo, Y. 2003. Interaksi sari wortel (*Daucus carota*)–Parasetamol: kajian terhadap hepatotoksikan dan kinerja toksikokinetika parasetamol pada tikus. Tesis. Program Pascasarjana Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.

jinten hitam mulai efektif memiliki efek protektif terhadap sel tubulus proksimal ginjal pada dosis 1000 mg/kgBB.

Sejalan dengan pernyataan Wijoyo (2003) yang menyatakan bahwa mekanisme reaksi penangkapan radikal bebas akan membentuk metabolit yang stabil, baik senyawa radikal bebas yang diberi atom hidrogen maupun senyawa flavonoid itu sendiri. Sebelum benar-benar stabil, radikal antioksidan yang terbentuk akibat kehilangan atom hidrogennya mengalami proses stabilisasi dan resonansi, sehingga radikal antioksi dan menjadi inaktif. Kemudian gugus karbonil dari tiap radikal antioksidan tersebut membentuk pasangan dengan sesamanya sehingga menghasilkan radikal-radikal antioksidan inaktif menjadi benar-benar relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipid lain untuk membentuk radikal lipid yang baru (Gordon, 1993).

Bila dihubungkan antara gambaran histopatologis ginjal dengan mekanisme kerja antioksidan secara molekuler, maka didapat hubungan bahwa mekanisme penghambatan radikal bebas pada proses peroksidasi lipid yang terjadi diluar membran sel telah berhasil mempertahankan keutuhan membran tubulus sehingga tidak terjadi kerusakan. Sebaliknya pada kelompok kontrol patologis yang tidak diberikan ekstrak jinten hitam, memperlihatkan gambaran kerusakan tubulus berupa pembengkakan kemudian akan dilanjutkan dengan dilatasi, degenerasi dan nekrosis. Kerusakan membran sel disebabkan oleh aldehida lemak yang relatif mantap (radikal lipid), yang dihasilkan oleh peroksidasi lipid pada membran. Peroksidasi lipid sering dimulai pada kandungan lemak yang terdapat pada membran sel. Hal itu dikarenakan kandungan lemak pada membran sel bersifat tidak jenuh sehingga menjadikan lipid membran lebih sering terikat oleh radikal bebas dan membentuk peroksidasi lipid (Robbins dkk, 2007).

Pada penelitian ini menunjukkan hasil bahwa pada pemberian ekstrak jinten hitam dosis 1500 gr/kgBB kerusakan bahkan lebih tinggi daripada pemberian jinten hitam dosis 1000 gr/kgBB. Hal tersebut dapat disebabkan oleh pengaruh dosis jinten hitam yang meningkat justru akan menyebabkan jinten hitam menjadi prooksidan. Keadaan demikian juga sesuai dengan pendapat Gordon (1993) yang menyatakan bahwa besar konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat berpengaruh pada laju oksidasi. Pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan grup fenolik sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan. Oleh karena itu peningkatan dosis jinten hitam sebagai antioksidan dapat mengubah fungsi antioksidan sehingga beralih fungsi menjadi prooksidan yang dapat merusak sel sebagaimana radikal bebas.

Simpulan, terdapat pengaruh pemberian ekstrak jinten hitam (*Nigella sativa L.*) terhadap kerusakan tubulus proksimal ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague dawley yang mendapat diinduksi gentamisin

Daftar Pustaka

- Ali dan Blunden. 2003. Pharmacological and toxicological properties of *nigella sativa*. *Phytother Res* 17: 299–305.
- Alsaif, M. A. 2007. Effect of thymoquinone on ethanol-induced hepatotoxicity in wistar rats. *J. Med. Sci.* 7:1164-1170
- Farrag, A. R. H., Mahdy, K. A., Rahman, G.H. A., & Osfor, M. M. 2007. Protective effect of *nigella sativa* seeds against lead induced hepatorenal damage in male rats. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 10:2809-2816.
- Gilani, A.-u. H., Jabeen, Q., & Khan, M. A. 2004. A review of medicinal uses and pharmacological activities of *nigella sativa*. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 4:441-451.