

Pengaruh Ekstrak Biji *Eugenia Jambolana* terhadap Jumlah Sel Beta Pankreas dan Ekspresi Protein Glut4 pada Mencit Jantan Balb/C yang Diinduksi Streptozotocin

Siti Kharidah, Troef Soemarno

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Rumah Sakit Umum Daerah dr. Soetomo
Surabaya

ABSTRAK

Latar belakang

Biji *Eugenia jambolana* mengandung bahan aktif flavonoid, quercetin, tannin dan mineral kromium yang berpotensi sebagai antidiabetik dengan meningkatkan sekresi insulin dan merangsang transport glukosa.

Tujuan

Melihat pengaruh pemberian biji *Eugenia jambolana* terhadap jumlah sel beta pankreas dan ekspresi protein GLUT4 pada otot mencit jantan BALB/c yang diinduksi streptozotocin.

Bahan dan Cara

Desain penelitian ini menggunakan *post test only control group*. Mencit jantan yang digunakan strain BALB/c. Enam belas ekor mencit jantan BALB/c dibagi dalam dua kelompok yaitu kelompok kontrol diberikan plasebo (CMC) dan kelompok perlakuan diberi ekstrak biji *Eugenia jambolana* selama 15 hari. Pada hari pertama ke dua kelompok diinduksi dengan streptozotocin. Dilakukan pemeriksaan kadar gula darah (GDP dan GP2JPP) hari ke-3 dan hari ke-18 pada ke dua kelompok. Pada hari ke-18 ke dua kelompok diterminasi diambil pankreas dan otot skeletal, selanjutnya dilakukan pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi insulin dan GLUT4. Data dianalisis menggunakan *independent samples t-test*.

Hasil

Adanya perbedaan yang bermakna jumlah sel beta pankreas ($p=0,000$) dan ekspresi protein GLUT4 ($p=0,002$) antara kelompok

kontrol dibandingkan kelompok perlakuan, membuktikan bahwa ekstrak biji *Eugenia jambolana* mampu meningkatkan jumlah sel beta pankreas dan ekspresi protein GLUT4.

Kesimpulan

Ekstrak biji *Eugenia jambolana* meningkatkan jumlah sel beta pankreas dan ekspresi protein GLUT4 pada otot mencit jantan BALB/c yang diinduksi streptozotocin.

Kata kunci : *Eugenia jambolana*, streptozotocin, sel beta pankreas, protein GLUT4

ABSTRACT

Background

Eugenia jambolana seed contains active flavonoid, quercetin, tannin and chromium. They have potential effect as anti diabetic by increasing secretion of insulin and stimulate glucose transport.

Objective

To observe the effect of *Eugenia jambolana* seed on the number of beta cell pancreas and expression of GLUT4 protein in muscle of male BALB/C strain mice induced by streptozotocin.

Material and methods

This is an experimental study with a randomized post test only control group design. Sixteen male BALB/c strain mice were divided into 2 groups. Both groups were induced by streptozotocin on the first day. On the third day, group control received placebo (CMC) and group treated received *Eugenia jambolana* seed for 15 days. The blood glucose before meal and 2 hours after meal will be checked on 3rd and on 18th day for all groups. All group will be sacrificed on 18th day. Pancreas and muscle tissues will be stained with immunohistochemistry insulin antibody and GLUT4. Data will be analyzed by analysis of independent samples t-test.

Results

There were significant differences of the number of beta cell pancreas ($p=0,000$) and GLUT4 protein expression ($p=0,002$) on group 1 compared with group 2, proven that *Eugenia jambolana* seed had potential effect to increase the number of beta cell pancreas and expression of GLUT4 protein.

Conclusion

Extract of *Eugenia jambolana* seed increases the number of beta cell pancreas and expression of GLUT4 protein white male BALB/c strain mice induced by streptozotocin.

Keywords : *Eugenia jambolana*, streptozotocin, Beta Cell of Pancreas, GLUT4 protein

PENDAHULUAN

Hiperglikemik merupakan suatu keadaan di mana terdapat kadar glukosa darah melebihi nilai normal.¹ Kurang lebih 90 % dari total kasus diabetes mellitus adalah diabetes mellitus tipe 2. Diabetes mellitus tipe 2 adalah jenis diabetes mellitus yang disebabkan karena terjadinya resistensi insulin disertai dengan defisiensi insulin relatif.² Insulin adalah hormon yang diproduksi oleh sel beta pankreas.^{3,4,5} Insulin berinteraksi dengan sel target melalui ikatannya dengan reseptor insulin.⁶ GLUT4 (*glucose transporter 4*) adalah protein transport untuk membawa glukosa masuk ke dalam sel.

Menurut data yang dipublikasikan dalam jurnal *Diabetes Care* 2004, penderita diabetes mellitus di Indonesia pada tahun 2000 mencapai 8,4 juta orang dan menduduki peringkat ke empat setelah India, Cina dan Amerika Serikat.¹ Departemen Kesehatan RI mencatat prevalensi diabetes mellitus sebesar 12,7% disertai peningkatan 2-3 kali lebih cepat dibandingkan negara maju.⁶ Kondisi ini mendorong usaha mengembangkan terapi baru diabetes mellitus yang murah dan efektif.⁷

Pengobatan diabetes mellitus dengan bahan herbal telah banyak diteliti terutama berkaitan dengan efektivitas, keamanan dan efek sampingnya rendah. Salah satu tanaman yang banyak digunakan di negara India untuk menurunkan kadar gula darah adalah *Eugenia jambolana*,^{8,9} dengan nama lain juwet, duwet (Jawa), jamblang (Sunda).¹⁰ Di Indonesia, khususnya di Jawa Barat, Jawa Tengah dan Jawa Timur, *Eugenia jambolana* secara tradisional telah digunakan dalam pengobatan diabetes mellitus.¹⁰ Ekstrak biji *Eugenia jambolana* mengandung bahan aktif diantaranya tannin, flavonoid (quersetin), serta bahan mineral kromium.^{8,9}

Tannin berperan meningkatkan fosforilasi tirosin dari subunit β reseptor insulin, menghambat *tyrosine phosphatase*,¹¹ serta menstimulasi aktivitas transport glukosa dari ekstrak banaba.^{12,13} Flavonoid (quersetin) berperan menstimulasi peningkatan pengeluaran insulin dari sel beta pankreas¹⁴ dan memberikan perlindungan terhadap kerusakan sel akibat oleh stres oksidatif yang berhubungan dengan radikal bebas,¹⁵ sedangkan kromium dapat meningkatkan jumlah reseptor insulin, sehingga ikatan antara insulin dengan sel meningkat, meng-

hambat protein *tyrosine phosphatase1* (PTP1)¹⁶ dan mengaktifkan *insulin reseptor tyrosine kinase* (IRTK).¹⁷ Berdasarkan penelitian sebelumnya, ekstrak biji *Eugenia jambolana* dapat menurunkan kadar glukosa darah,^{18,19} meningkatkan sel beta pankreas dan reseptor insulin pada mencit yang diinduksi dengan streptozotocin,²⁰ serta meningkatkan ekspresi mRNA GLUT4 pada otot.¹⁹

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji *Eugenia jambolana* pada mencit jantan BALB/c hiperglikemik (analog diabetes mellitus) setelah diinduksi dengan streptozotocin terhadap jumlah sel beta pankreas dan ekspresi protein GLUT4 pada otot. Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi pengembangan efektivitas tanaman ini sebagai salah satu inovasi terapi diabetes.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan mencit jantan BALB/c yang secara fisik tampak sehat berumur 10 minggu dengan berat badan 25-35 gram. Pemeliharaannya dilakukan di Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga-RSUD. Dr. Soetomo, Surabaya. Mencit jantan BALB/c diaklimatisasi selama 1 minggu sebelum penelitian dimulai, dikandangkan secara individual, diberi pakan pellet CP 511 dan minum *ad libitum*.

Pada hari pertama dilakukan random alokasi, 16 ekor mencit dibagi dalam 2 kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, ke dua kelompok diinjeksi dengan streptozotocin 100 mg/kg BB secara intraperitoneal. Hari ke-3 kelompok kontrol diberi larutan CMC Na+ 0,5 % 1 ml/mencit /hari sonde per oral selama 15 hari, sedang kelompok perlakuan diberi ekstrak biji *Eugenia jambolana* 1400 mg/kg BB yang disuspensikan dalam CMC Na+ 0,5 % sebanyak 1ml/mencit/hari sonde per oral selama 15 hari. Pada hari ke-3 dan hari ke-18 dilakukan pengukuran kadar glukosa darah puasa (GDP) dan kadar glukosa darah 2 jam setelah pemberian glukosa oral 1,5 mg/g BB mencit (GD2JPP) menggunakan alat Glukostick, darah diambil dari ekor mencit.

Pada hari ke-18 mencit dikorbankan dengan cara dekapitasi untuk diambil pankreas dan otot skeletal, selanjutnya dilakukan prosesing jaringan, dibuat sediaan mikroskopik dan

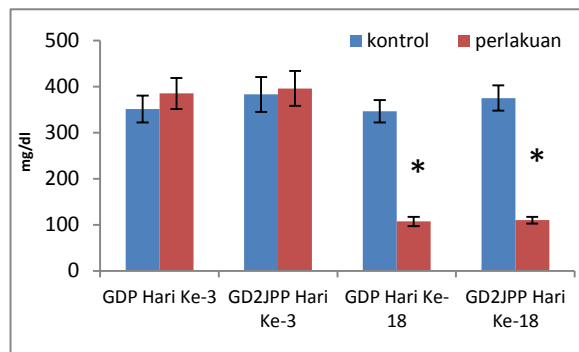
diwarnai secara imunohistokimia menggunakan teknik baku streptavidin-biotin dengan antibodi monoklonal Insulin Ab-6 (INS04 + INS05) dan GLUT4 (IF8) sc-53566 di Departemen/SMF/ Instalasi Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga-RSUD. Dr. Soetomo, Surabaya. Jumlah sel beta pankreas adalah angka penghitungan persentase sel beta pankreas yang mengekspresikan antibodi monoklonal insulin yang tercatat warna coklat pada sitoplasma sel beta pankreas dibandingkan jumlah keseluruhan dalam 1 pulau langerhans (% positif) pada 10 pulau langerhans dengan pembesaran objective 40 x. Ekspresi protein GLUT4 pada otot adalah angka penghitungan jumlah sel otot yang mengekspresikan antibodi monoklonal GLUT4 yang tercatat warna coklat pada sitoplasma sel otot pada seluruh jaringan dengan pembesaran objective 40 x.

Analisis statistik untuk mengetahui perbedaan kadar glukosa darah, jumlah sel beta dan ekspresi protein GLUT4 antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan digunakan *independent samples t-test*, di mana hasil bermakna apabila diperoleh harga $p < 0,05$.

HASIL

Data kadar glukosa darah, jumlah sel beta pankreas dan ekspresi GLUT4 diuji normalitasnya dengan *Kolmogorov-Smirnov Test*, semuanya hasil data berdistribusi normal. Pada hari ke-3 pada ke dua kelompok yang diberikan injeksi streptozotocin mengalami hiperglikemia ditandai dengan lebih tingginya kadar GDP dan GD2JPP dibandingkan dengan mencit normal tanpa injeksi. Selanjutnya untuk menguji perbedaan rata-rata kadar GDP dan GD2JPP hari ke-3 antara ke dua kelompok, dilakukan *independent samples t-test* variansi homogen yang ditampilkan pada gambar 1.

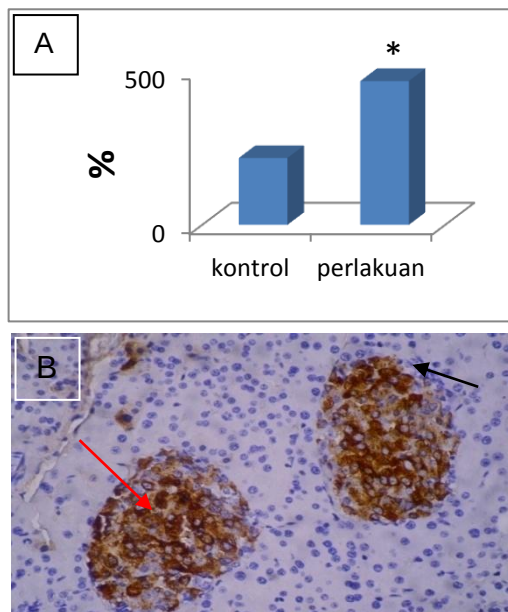
Hasil uji statistik memperlihatkan baik pada kadar GDP dan GD2JPP hari ke-3 setelah injeksi streptozotocin, memperlihatkan tidak ada perbedaan yang bermakna antara ke dua kelompok ($p=0,050$ dan $p=0,501$). Hal ini menunjukkan bahwa ke dua kelompok mencit ini telah memenuhi syarat untuk dilakukan percobaan selanjutnya guna memeriksa pengaruh ekstrak biji *Eugenia jambolana*, karena tidak ada perbedaan yang bermakna antara kadar GDP dan GD2JPP hari ke-3 antara ke dua kelompok.



Gambar 1. Kadar GDP dan GD2JPP hari ke-3 dan 18 mencit kelompok perlakuan yang diinjeksi streptozotocin dibandingkan dengan kelompok kontrol. (* bermakna $p < 0,01$)

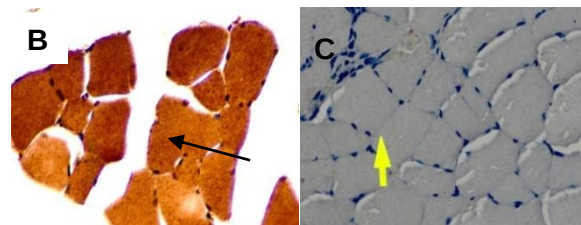
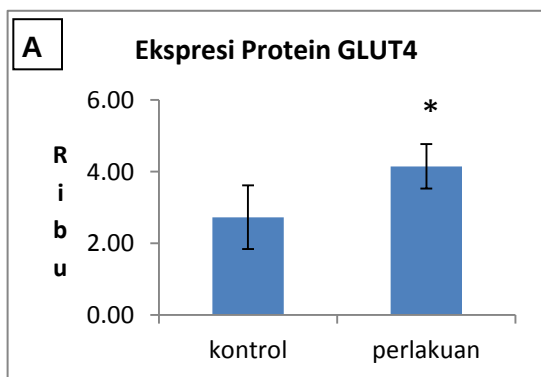
Kadar GDP dan GD2JPP hari ke-18 kelompok kontrol setelah pemberian placebo (CMC) tetap tinggi, sedangkan pada kelompok perlakuan setelah pemberian ekstrak biji *Eugenia jambolana* kadar GDP akhir dan GD2JPP lebih rendah dari kelompok kontrol (lihat gambar 1). Selanjutnya untuk menguji perbedaan rata-rata kadar GDP dan GD2JPP hari ke-18 antara ke dua kelompok dilakukan *independent samples t-test*, hasil ini memperlihatkan adanya perbedaan yang bermakna kadar GDP dan GD2JPP ($p=0,000$ dan $p=0,000$) antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Hal ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak biji *Eugenia jambolana* dapat menurunkan kadar GDP dan GD2JPP pada mencit diabetes yang diinduksi streptozotocin.

Ekspresi insulin positif pada sel beta pankreas pada pulau Langerhans yang terwarnai coklat digunakan sebagai parameter jumlah sel beta pankreas (gambar 2B), sedangkan ekspresi protein GLUT4 dengan pewarnaan imunohistokimia dapat dilihat pada gambar 3B dan 3C. Jumlah sel beta pankreas dan ekspresi protein GLUT4 di jaringan otot pada kelompok kontrol setelah pemberian placebo (CMC) lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan setelah pemberian ekstrak biji *Eugenia jambolana* (gambar 2A dan 3A).



Gambar 2. **A** Peningkatan jumlah sel beta pankreas pada kelompok mencit hiperglikemik yang diberi perlakuan ekstrak biji *Eugenia Jambolana* dibandingkan dengan kontrol. **B**. Ekspresi insulin positif pada sel beta pankreas dengan anak panah hitam dan negatif dengan anak panah merah (Imunohistokimia, objective 40 x).

Uji perbedaan rata-rata jumlah sel beta pankreas antara kedua kelompok dilakukan *independent samples t-test*, hasil ini memperlihatkan adanya perbedaan yang bermakna jumlah sel beta pankreas dan ekspresi protein GLUT4 di jaringan otot antara ke dua kelompok ($p=0,000$ dan $p=0,002$). Ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak biji *Eugenia jambolana* memberi efek terhadap peningkatan jumlah sel beta pankreas dan ekspresi protein GLUT4 pada mencit diabetes yang diinduksi dengan streptozotocin.



Gambar 3. **A**. Peningkatan ekspresi protein GLUT4 pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. **B**. Ekspresi protein GLUT4 positif pada sitoplasma sel otot dengan anak panah hitam **C**. Ekspresi protein GLUT4 negatif pada sitoplasma sel otot dengan anak panah kuning (Imunohistokimia, objective 40x).

DISKUSI

Peningkatan kadar GDP dan GD2JPP hari ke-3 dijumpai pada ke dua kelompok yang diberikan injeksi streptozotocin dibandingkan mencit normal. Pada penelitian ini diperoleh mencit hiperglikemik (analog diabetes mellitus) yang ditandai dengan peningkatan kadar GDP dan GD2JPP. Hasil ini memperlihatkan kesesuaian dengan kepustakaan bahwa streptozotocin yang diinjeksikan ke dalam tubuh mencit dapat menimbulkan kondisi hiperglikemia, karena sifat streptozotocin yang toksik, khusus-nya terhadap sel beta pankreas akibat alkilasi DNA dan pembentukan radikal bebas.²¹

Berdasarkan analisis statistik dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak biji *Eugenia jambolana* selama 15 hari dapat menurunkan kadar GDP dan GD2JPP pada mencit diabetes yang diinduksi streptozotocin. Kesesuaian hasil penelitian ini dengan penelitian Joeliantina A dan Sharma dkk yang menunjukkan bahwa pemberian ekstrak biji *Eugenia jambolana* dapat menurunkan kadar glukosa darah pada mencit diabetes yang diinduksi dengan streptozotocin.^{18,19}

Pada penelitian ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak biji *Eugenia jambolana* memberi efek peningkatan jumlah sel beta pankreas pada mencit diabetes yang diinduksi dengan streptozotocin. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Inawati yang juga menunjukkan bahwa ekstrak biji *Eugenia jambolana* meningkatkan sel beta pankreas pada mencit diabetes yang diinduksi dengan streptozotocin.²⁰ Peristiwa ini terjadi karena ekstrak biji *Eugenia jambolana* mengandung flavonoid (quersetin). Sharma dkk melaporkan

kandungan flavonoid ekstrak biji *Eugenia jambolana* menyebabkan hipoglikemik dan hipolipidemik pada mencit diabetes yang diinduksi dengan streptozotocin.¹⁴ Flavonoid juga menstimulasi 16% peningkatan pengeluaran insulin dari sel beta pankreas. Aksi tersebut melalui pengaturan *peroxisome proliferators activated receptors* (PPAR α dan PPAR γ).¹⁴

Kandungan ekstrak biji *Eugenia jambolana* lainnya adalah Quersetin. Quersetin memiliki kemampuan untuk memberikan perlindungan terhadap kerusakan sel yang diakibatkan oleh stres oksidatif (seperti peroksidase lipid dari membran dan degradasi membran) yang berhubungan dengan radikal bebas.¹⁵ Selain itu quersetin memperbaiki stres oksidatif pada mencit diabetes yang diinduksi streptozotocin, karena quersetin mempunyai aktivitas antioksidan.²²

Pada penelitian ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak biji *Eugenia jambolana* memberi efek peningkatan ekspresi protein GLUT4, hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Sharma dkk yang menunjukkan bahwa ekstrak biji *Eugenia jambolana* meningkatkan ekspresi profil *messenger ribonucleic acid* (mRNA) GLUT4 pada mencit diabetes yang diinduksi dengan streptozotocin.¹⁹ Peristiwa ini terjadi karena ekstrak biji *Eugenia jambolana* mengandung kromium dan tannin. Hattori dkk melaporkan bahwa tannin memiliki aksi meningkatkan fosforilasi tirosin dari subunit β reseptor insulin dan menghambat *tyrosine phosphatase*.¹¹ Klein dkk dan Liu dkk melaporkan bahwa tannin bertanggung jawab untuk menstimulasi aktivitas transport glukosa.^{12,13} Mekanisme aksi yang mungkin dari kromium dalam mengontrol kadar glukosa darah berhubungan dengan perbaikan reseptor dan aksi *post receptor*, yaitu kromium menyebabkan peningkatan ikatan insulin dengan sel, sehingga meningkatkan jumlah reseptor insulin dan meningkatkan fosforilasi reseptor insulin.¹⁶ Selain itu juga dapat meningkatkan penggunaan glukosa dan sensitivitas sel beta pankreas,^{16,23} mengaktifkan *insulin reseptor tyrosine kinase* (IRTK)¹⁷ dan menghambat protein *tyrosine phosphatase* 1 (PTP1), suatu homolog dari protein *tyrosine phosphatase* 1B (PTP1B) yang menginaktivasi reseptor insulin.¹⁶

KESIMPULAN

Penelitian ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak biji *Eugenia jambolana* dapat meningkatkan jumlah sel beta pankreas, ekspresi protein GLUT4 pada otot dan menurunkan kadar glukosa darah pada mencit jantan BALB/c hiperglikemik (analog diabetes mellitus) setelah diinduksi dengan streptozotocin.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of Diabetes. Estimates for the Years 2000 and projection for 2013. *Diabetes Care*. 2004;7:1047-53.
2. Hendromartono. The Role of PPAR Activator on Insulin Resistance. Surabaya: Surabaya Diabetes Up date XI; 2002. Surabaya, hal. 1-4.
3. Bowen R. Insulin Mechanism of Action. [Online]. 1999 June 15; [cited 2009 June 8]; Available from: URL: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathophys/endocrine/pankreas/insulin.html>.
4. Guyton AC. Hall JE. Textbook of Medical Physiology. 10th ed. Philadelphia: Saunders company; 2000. p.884-6.
5. Nolte MS, Karam JH. The Endocrine Pankreas. In: Katzung BG, editor. Basic and Clinical Pharmacology. 10th ed. San Francisco: McGraw Hill Co; 2007. p 683-7.
6. Departemen Kesehatan RI. Diabetes mellitus masalah kesehatan masyarakat yang serius [Online] disitasi 8 juli 2009 dari URL :<http://www.depkes.go.id/index.php?option=news&task=viewarticle&sid=942&Itemid=2>
7. Subroto. Ramuan Herbal Untuk Diabetes Melitus. Jakarta: Penebar Swadaya; 2006. hal.20-50.
8. Ravi K, Ramachandran B, Subramanian S. Protective Effect of *Eugenia Jambolana* Seed Kernel on Tissue Antioxidants in Streptozocin-induced Diabetic Rats. *Biol Pharm Bull*. 2004;27:1212-7.
9. Kumar A, Ilavarasan R, Jayachandran T, Deecaraman M, Aravindan P, Padmanabhan N, et al. Anti-diabetic Activity of *Syzygium Cumini* and Its Isolated Compound Against Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *J Med Plant Res*. 2008; 2:246-9.

10. Dalimartha S. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 3. Jakarta: Puspa Swara; 2003. p 19-23.
11. Hattori K, Sukenobu N, Sasaki T, Takasuqa S, Hayashi T, Kasai R et al. Activation of Insulin Receptors by Lagerstoemin. J Pharmacol Sci. 2003;93:69-73.
12. Klein G, Kim J, Himmeldirk K, Kim, Cao Y, and Chen Y. Antidiabetes and Antiobesity Activity of *Lagerstroemia speciosa*. eCAM. 2007;16:401-7.
13. Liu X, Kim J, Li Y, Li J, Liu F and Chen X. Tannic Acid Stimulates Glucose Transport and Inhibits Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells. J Nutr. 2005;135:165-71.
14. Sharma B, Balomajumbderb C, Roy P. Hypoglycemic and Hypolipidemic Effect of Flavonoid Rich Extract from *Eugenia Jambolana* Seed on Streptozotocin Induced Diabetic Rats. Food Chem Toxicol. 2008; 46:2376-83.
15. Macha A, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR. Quercetin, a Flavonoid Antioxidant, Modulates Endothelium-derived Nitric Oxide Bioavailability in Diabetic Rat Aortas. Nitric Oxide. 2007;16:442-7.
16. Anderson RA. Chromium, Glucose Intolerance and Diabetes. J Am Coll Nutr 1998;17:548-55.
17. Davis CM, Vincent JB. Chromium Oligopeptide Activates Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity. Biochemistry 1997;15: 36:4382-5.
18. Joeliantina A. Pengaruh ekstrak biji jambang (*Eugenia Jambolana*) terhadap penurunan kadar glukosa plasma, kolesterol total, trigliserida, kolesterol LDL, kolesterol HDL pada mencit putih jantan yang diinduksi streptozotocin. Surabaya: Universitas Airlangga; 2007.
19. Sharma B, Viswanath G, Salunke R, Roy P. Effects of Flavonoid-rich Extract from Seeds of *Eugenia Jambolana* (L.) on Carbohydrate and Lipid Metabolism in Diabetic Mice. Food Chem. 2008;110:697-705.
20. Inawati. Pengaruh Ekstrak Biji Juwet (*Eugenia Jambolana*) terhadap Peningkatan Sel Beta Pankreas dan Jumlah Reseptor Insulin pada Mencit BALB/C Jantan yang Diinduksi Streptozotocin. TESIS. Universitas Airlangga Surabaya. 2009.
21. Szkuldeski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pankreas. Physiol Res.2001;50:536-46.
22. Mahesh T, Menon VP. Quercetine Allievates Oxidative Stres in Stretozotocin induced Diabetic Rats. Phytother Res. 2004;18:123-7.
23. Potter JF, Levin P, Anderson RA, Freiberg JM, Andres R, Elahi D. Glucose Metabolis in Glucose-intolerant Older People during Chromium Supplementation. In: Metabolism, clinical and experimental. New York: Elsevier: 1985 p.199-204.