

**UJI PROTEKSI KOMBINASI ANTIOKSIDAN ASAM ASKORBAT DAN
Na₂EDTA SEBAGAI PENGKELAT Pb DARAH TERHADAP
KADAR HEMOGLOBIN TIKUS (*Mus musculus*)**

**PROTECTION TEST COMBINATIONS OF ANTIOXIDANTS ASCORBIC ACID AND
Na₂EDTA AS BRACING Pb BLOOD TOWARD
HAEMOGLOBIN LEVELS OF MICE (*Mus musculus*)**

Sarno Setiawan*, Irawan, Alfath Fanidya

Universitas Negeri Semarang
Semarang, Jawa Tengah, Indonesia

*email korespondensi: sarno.setiawan19@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis tingkat proteksi antioksidan kombinasi Na₂EDTA dan asam askorbat terhadap kadar hemoglobin tikus putih yang dipapar timbal asetat. Jumlah perlakuan dibagi menjadi 6 kelompok. Setiap kelompok perlakuan dipapar Pb asetat 175 mg/kg bb kecuali kelompok kontrol. Pada kelompok I diberikan Na₂EDTA 150 mg/kg bb, kelompok II Na₂EDTA 250 mg/kg bb, kelompok III Na₂EDTA 150 mg/kg bb dan asam askorbat 300 mg/kg bb, dan kelompok IV Na₂EDTA 250 mg/kg bb dan asam askorbat 500 mg/kg bb. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kelompok kontrol memiliki kadar hemoglobin tertinggi yaitu 13,1 g/100 mL, sedangkan kelompok kontrol negatif yaitu 6,3 g/100 mL, kelompok I yaitu 7,2 g/100 mL, kelompok II yaitu 7,7 g/100 mL, kelompok III yaitu 9,3 g/100 mL, dan kelompok IV yaitu 8,3 g/100 mL. Data tersebut menunjukkan bahwa ada pengaruh asam askorbat dan Na₂EDTA dalam menormalkan kadar hemoglobin tikus putih. Kombinasi antioksidan paling efektif yaitu 300 mg/kg bb asam askorbat dengan 150 mg/kg bb Na₂EDTA. Hasil ANOVA menunjukkan bahwa f hitung < f tabel, artinya ada pengaruh pemberian Na₂EDTA dan asam askorbat terhadap kadar hemoglobin tikus putih yang induksi timbal asetat secara oral. Peningkatan kadar hemoglobin darah tikus disebabkan oleh pengkhelatan logam Pb, sehingga menurunkan gangguan pada proses sintesis heme.

Kata kunci: asam askorbat, hemoglobin, Na₂EDTA, Pb darah

Abstract

This study aimed to analyze the level of antioxidant protection in combination of Na₂EDTA and ascorbic acid to the hemoglobin levels of white rats exposed to lead acetate. The number of treatments was divided into 6 groups. Each treatment group was exposed to Pb acetate 175 mg/kg bw except the control group. The group I was given Na₂EDTA 150 mg/kg bw, group II Na₂EDTA 250 mg/kg bw, group III Na₂EDTA 150 mg/kg bw and ascorbic acid 300 mg/kg bw, and group IV Na₂EDTA 250 mg/kg bw and ascorbic acid 500 mg/kg bw. The results showed that the control group had the highest hemoglobin level of 13.1 g/100 mL, while the negative control group was 6.3 g/100 mL, group I was 7.2 g/100 mL, group II was 7.7 g/100 mL, group III was 9.3 g/100 mL, and group IV was 8.3 g/100 mL. The data show that there is an effect of ascorbic acid and Na₂EDTA in normalizing hemoglobin levels in white rats. The most effective combination of antioxidants is 300 mg/kg bw ascorbic acid with 150 mg/kg bw Na₂EDTA. The ANOVA results showed that f count < f table, that mean there was an effect of the administration of Na₂EDTA and ascorbic acid in the hemoglobin levels of white rats which induced lead acetate orally. Increased levels of hemoglobin in rat blood are caused by the bracing of Pb metal, so decreasing interference on the process of heme synthesis.

Keywords: ascorbic acid, haemoglobin, Na₂EDTA, Pb blood

PENDAHULUAN

Senyawa timbal (Pb) terutama Tetra Ethyl Lead (TEL), yang digunakan sebagai bahan aditif pada bensin, merupakan senyawa Pb yang paling toksik bagi manusia. Timbal dalam bentuk TEL mudah larut dalam lemak dan mudah berdifusi ke dalam jaringan lunak seperti hati dan ginjal serta ke dalam jaringan keras seperti tulang. Senyawa Pb yang masuk tubuh manusia lewat inhalasi, akan diabsorpsi paru-paru sebesar 10-30% dan sekitar 90% Pb yang terbawa aliran darah akan berikatan dengan eritrosit (Suyono, 1995). Sifat timbal mudah berikatan dengan gugus sulfhidril (-SH) penyusun enzim dan molekul protein, sehingga dapat menimbulkan hambatan terhadap aktivitas enzim (Hernayanti dkk., 2015).

Logam Pb dapat berasal dari aktivitas di bidang industri, transportasi, pertambangan dan lain sebagainya. Logam ini dapat mencemari lingkungan tanah, air dan udara, serta dapat berdampak terhadap kesehatan. Batas toleransi Pb yang masuk ke dalam tubuh per minggu (*provisional tolerable weekly intake*/PTWI) adalah 50 µg/kg berat badan untuk dewasa dan 25 µg/kg berat badan untuk anak-anak. Berdasarkan standar WHO (2011), apabila kandungan Pb lebih dari 80 µg/100 mL dapat membahayakan kesehatan. Pada anak-anak, kadar yang diperkenankan oleh *Centre for Disease Control* (CDC) adalah 10 µg/100 mL.

Logam Pb dapat masuk ke tubuh secara inhalasi. Efisiensi pejalan Pb secara inhalasi dapat meningkat jika ukuran partikel semakin kecil. Setelah masuk ke dalam tubuh, Pb anorganik dan organik akan terdistribusi pada jaringan lunak, susunan saraf pusat, dan jaringan tulang. Efek klinik utama Pb anorganik adalah defisit susunan saraf pusat, neuropati, periferik anemia, nefropati dan hipertensi sedangkan Pb organik adalah ensefalopati (Kosnet, 2012).

Dalam tubuh Pb bersifat akumulatif sehingga proses pengeksresiannya berjalan lambat. Proses ekskresi Pb berjalan melalui beberapa cara, diantaranya melalui ginjal dan saluran pencernaan. Ekskresi Pb melalui urine sebanyak 75-80%, feses 15% dan lainnya melalui empedu, keringat, kuku dan rambut (Palar, 2008). Kadar Pb dalam tubuh yang melebihi batas normal dapat mengganggu kesehatan baik fisik maupun mental. Menurut Doloksaribu (2008), kerusakan ginjal dapat terjadi apabila terpapar Pb 40 µg/dL, kerusakan saraf dan anemia apabila Pb darah > 60 µg/dL, dan apabila kadar Pb darah > 150 µg/dL dapat

menyebabkan ensefalopati, sakit kepala, konstipasi, sakit perut, diare, dan anoreksia (Doloksaribu, 2008). Disisi lain, logam Pb juga menyebabkan timbulnya radikal bebas yang berbahaya bagi tubuh serta menurunkan kemampuan antioksidasi tubuh (Ostrovskaya dkk., 2011).

Penelitian Mulyadi dkk. (2015), menunjukkan bahwa adanya Pb dalam darah mempengaruhi kadar hemoglobin yaitu pada kelompok terpapar Pb 11,20 ppm memiliki kadar hemoglobin sebesar 12,97 g/dL yang nilainya lebih rendah dibandingkan kelompok yang tidak terpapar yaitu 14,77 g/dL. Peningkatan kadar hemoglobin dapat dilakukan dengan pemberian antioksidan. Penelitian Eni dkk., (2018) menunjukkan bahwa pemberian kitosan 64 mg/kg BB dan asam askorbat 300 mg/kg BB dapat meningkatkan kadar hemoglobin tikus yang dipapar timbal asetat 175 mg/kg BB yaitu 14,336 g/dL dibanding kelompok kontrol negatif.

Logam Pb mengganggu proses sintesis heme yaitu mengikat Fe yang dibutuhkan oleh hemoglobin, sehingga menurunkan kadar hemoglobin. Pemberian kitosan berfungsi untuk mengkhelat ion Pb²⁺ sedangkan asam askorbat berfungsi untuk mempercepat penyerapan Fe untuk sintesis heme (El-fattah dkk., 2013; Elmatris dkk., 2015). Namun efek sebagai khelator Pb²⁺ belum sepenuhnya maksimal, serta penggunaan asam askorbat sebagai pengobatan penyakit masih perlu diteliti kembali (Arifuddin dkk., 2016; Marianti dkk., 2017).

Senyawa EDTA (Ethylen Diamine Tetra Acetate) merupakan ligan polidentat yang dapat mengikat ion Pb pada enam situs yang berbeda, yaitu ion asetat dan atom nitrogen melalui ikatan kovalen koordinasi (Aziz dkk., 2015). Maka dari itu, penelitian ini dilakukan untuk menganalisis apakah kombinasi Na₂EDTA dan asam askorbat yang berfungsi sebagai pengkelat Pb dan antioksidan akan saling bersinergi meningkatkan sifat antioksidasi dan mengurangi dampak negatif dari Pb dalam tubuh, terutama terhadap kadar Hb.

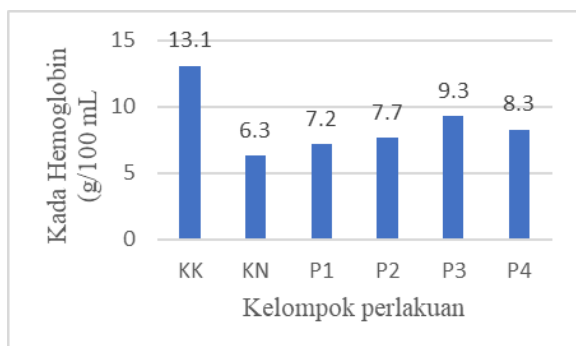
METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan yaitu timbangan hewan, haemometer sahli, mikrohematokrit, dan sonde. Bahan yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus noevigicus* L.) strain wistar 18 ekor, larutan Pb asetat 175 mg/kg, aquades, alkohol 70%, larutan HCl 0,1 N, larutan Na₂EDTA, dan asam askorbat dari vitacimin.

Penelitian ini diawali dengan adaptasi tikus putih dengan lingkungan laboratorium selama 1 minggu. Pemberian perlakuan (induksi oral 175 mg/kg Pb asetat) setelah adaptasi dilakukan pada kelompok perlakuan kecuali kelompok kontrol (KK). Pemberian zat pengkelat pada perlakuan 1 (P1) yaitu Na₂EDTA 150 mg/kg bb, perlakuan 2 (P2) yaitu Na₂EDTA 250 mg/kg bb, perlakuan 3 (P3) yaitu Na₂EDTA 150 mg/kg dan asam askorbat 300 mg/kg, dan perlakuan 4 (P4) yaitu Na₂EDTA 250 mg/kg dan asam askorbat 500 mg/kg. Setelah perlakuan selama 14 hari, darah tikus diambil melalui ekor dan dilakukan uji kadar Hb. Tabung pengukur Haemometer diisi dengan HCl 0,1 N sampai angka 2 (garis pada tabung paling bawah). Darah diambil dengan cara menghisapnya melalui pipet kapiler sampai tepat pada garis, kemudian ditiupkan darah ke dalam tabung pengukur yang telah diisi HCl 0,1 N kemudian dicampur rata dan dibiarkan selama 3 menit. Selanjutnya aquades ditetaskan dan diaduk perlahan sampai muncul warna coklat standar yang ada di sebelah kiri dan kanan tabung pengukur. Kadar Hb darah ditunjukkan oleh tinggi permukaan cairan dalam tabung pengukur yaitu dalam g% (yaitu g Hb dalam 100 ml darah) dan dalam % (persentase Hb yang dihitung dibandingkan dengan Hb normal).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemberian paparan Pb asetat sebanyak 175 mg/kg BB selama 14 hari memberikan perbedaan kadar hemoglobin tikus putih setiap kelompok perlakuan. Kadar Hemoglobin tikus putih setelah pemaparan Pb asetat disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Kadar Hb tikus putih setelah dipapar Pb asetat

Pb asetat menurunkan kadar Hb dalam darah tikus putih. Hal ini ditunjukkan dengan perbandingan nilai rata-rata dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Paparan Pb

asetat secara terus menerus mengakibatkan timbal terakumulasi dalam darah dan terabsorpsi oleh tubuh, sehingga mempengaruhi oksigen yang terikat oleh hemoglobin.

Hasil analisis keempat kelompok perlakuan dengan menggunakan ANOVA dengan tingkat signifikansi 5% menunjukkan bahwa $f_{hit} < f_{tab}$ sehingga ada pengaruh induksi Pb asetat terhadap penurunan kadar Hb tikus putih dan ada pengaruh kombinasi asam askorbat dan Na₂EDTA dalam menormalkan Hb darah.

Hasil pengukuran kadar hemoglobin tertinggi pada kelompok perlakuan 3 yaitu 9,3 g/100 mL. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian Na₂EDTA 150 mg/kg bb dan asam askorbat 300 mg/kg mampu meningkatkan kadar hemoglobin terhadap kelompok kontrol negatif (KN). Perbedaan muncul pada kelompok perlakuan 4 yang diperoleh kadar Hb sebesar 8,3 g/100 mL dengan asam askorbat 500 g/100 mL. Kadar Hb ini menurun sebesar 1 g/100 mL dari kelompok perlakuan 3. Hal ini disebabkan oleh kemungkinan terjadi pengkelatan lebih banyak terhadap logam Fe dibandingkan Pb oleh Na₂EDTA karena sifatnya yang tidak selektif dalam mengkelat logam (Scott, 2004).

Tinggi rendahnya hemoglobin darah salah satunya dipengaruhi oleh asam askorbat (Purwani dan Hadi, 2002). Asam askorbat berperan dalam metabolisme zat besi (mereduksi Fe dari bentuk Fe³⁺ menjadi Fe²⁺ yang lebih mudah diserap oleh sel mukosa usus. Selain itu, asam askorbat berperan dalam mobilisasi simpanan Fe terutama hemosiderin dalam limpa dan pemindahannya dalam darah. Jadi, adanya suplementasi asam askorbat akan mempercepat dan membantu penyerapan Fe, sehingga kadar hemoglobin darah akan meningkat.

Absorpsi Pb menimbulkan efek subklinis karena sifat afinitas yang kuat. Efek subklinis yang ditimbulkan dapat terjadi pada sistem saraf, hematopoietik dan metabolisme pada sintesis heme, nukleotida, dan vitamin D. Efek utama Pb adalah mempengaruhi sintesis heme yang selanjutnya akan menyebabkan kerusakan pada darah. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Mulyadi dkk., (2015), menyatakan bahwa kandungan Pb dalam cat mempengaruhi kadar hemoglobin darah pekerja bagian pengecatan, setelah diteliti diperoleh bahwa kadar hemoglobinnya lebih rendah dibandingkan dengan pekerja bagian administrasi. Rata-rata kadar hemoglobin darah kelompok terpapar 12,97 g/dL, sedangkan pada

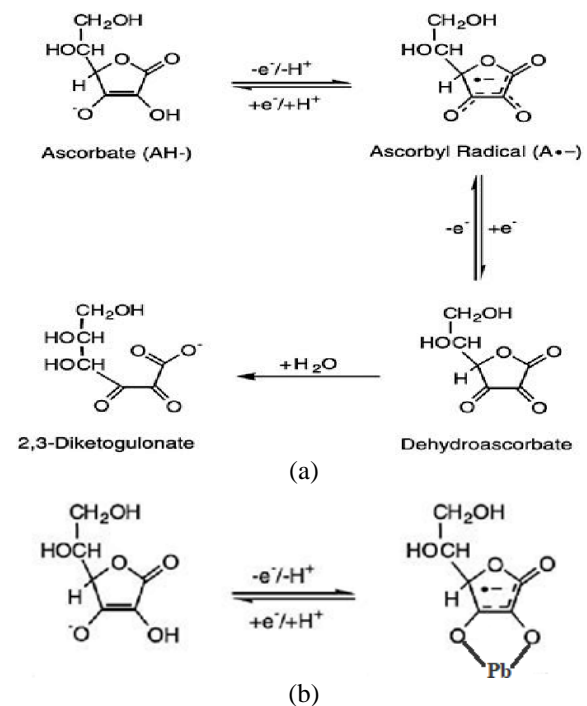
kelompok tidak terpapar 14,77 g/dL dan sebagian besar kadar hemoglobin darah kelompok terpapar kurang dari syarat hemoglobin darah normal yaitu 13,2-17,3 g/dL.

Mekanisme Pb dapat menurunkan kadar hemoglobin yaitu Pb dalam darah akan berikatan dengan eritrosit, sehingga dapat menghambat aktivitas enzim oksidase (Yulaipi, 2013). Adanya Pb dalam darah dapat mengikat ALAD (*aminolevulinic acid dehidrase*), suatu enzim yang diperlukan dalam metabolisme pembentukan sel darah merah dan membuangnya melalui urine. Itulah sebabnya semakin tinggi kadar Pb maka semakin tinggi pula kadar ALA dalam urine (ALA-U) dan semakin rendah ALAD dalam darah, sehingga banyaknya Pb darah adalah penyebab berkurangnya hemoglobin. Hal ini telah diteliti oleh Adnan (2001), bahwa kadar timbal dalam darah 10 µg/dL sudah dapat menyebabkan gangguan pada sintesis hemoglobin dengan penghambatan pada aktivitas enzim δ-aminolevulinat dehidratase (ALAD). Hal ini mengakibatkan peningkatan kadar δ-aminolevulinat (δ-ALA) dalam serum dan kemih.

Keberadaan Pb dalam tubuh dapat mengganggu sistem hemopoitik pada sintese heme melalui tiga mekanisme, yakni mengganggu penyatuan Glycine dan Succinyl Co-Enzyme A, melalui depresi terhadap delta-ALAD, dan melalui gangguan terhadap enzim Ferrochelataze yang berfungsi melekatkan besi (Fe) terhadap protoporphyrin yang kemudian menjadi heme sebagai bagian dari hemoglobin (Malaka, 2012). Kombinasi asam askorbat dan EDTA sebagai antioksidan bekerja dengan mengkelat logam Pb dalam darah. Pada kelompok perlakuan yang diberi vitamin C dan EDTA terbukti dapat meningkatkan kadar Hb walaupun tikus terpapar Pb.

Asam askorbat merupakan agen pereduksi (antioksidan) karena mendonorkan elektronnya, vitamin ini mencegah senyawa-senyawa lain agar tidak teroksidasi. Kadar asam askorbat di dalam tubuh memungkinkan untuk membentuk ion kompleks. Asam askorbat sendiri akan teroksidasi dalam proses antioksidan, sehingga menghasilkan asam dehidroaskorbat. Asam dehidroaskorbat dapat tereduksi kembali menjadi asam askorbat dengan bantuan enzim 4-hidroksifenilpiruvat dioksigenase. Namun tidak semuanya dapat kembali menjadi asam askorbat lagi, karena di dalam tubuh manusia hanya terjadi secara parsial. Asam askorbat yang telah

berubah menjadi ion kompleks berpotensi untuk menerima elektron dan direduksi oleh senyawa lain. Salah satunya direduksi melalui reaksi transisi yang diperantarai logam (misalnya *ferrum* atau *cuprum*). Disisi lain apabila Pb juga terdapat di dalam darah, maka ion kompleks asam askorbat juga akan mengkelat Pb. Hal ini ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. (a) Pembentukan ion kompleks asam askorbat, (b) pengkelatan Pb oleh asam askorbat

Hal ini mengakibatkan asam dehidroaskorbat meningkatkan persaingan antara Pb dan Fe di darah untuk dikhelat. Kemungkinan asam dehidroaskorbat lebih banyak mengkelat Fe daripada Pb, sehingga asam dehidroaskorbat tidak signifikan dalam mengkelat Pb. Dampak yang ditimbulkan yaitu proses sintesis hemoglobin akan terganggu, sehingga terjadi penurunan kadar hemoglobin di dalam darah. Hal ini memungkinkan pada perlakuan 4 asam askorbat yang diberikan sebagian berubah menjadi ion kompleks, sehingga akan mengkelat Fe dan Pb di dalam darah. Dampaknya kadar hemoglobin lebih rendah dibanding perlakuan 3. Penelitian Purwani dan Hadi (2002), menunjukkan bahwa pemberian vitamin C (asam askorbat) yang berlebih pada ikan juga dapat menjadikan defisiensi vitamin B12 karena vitamin C dapat mengubah sebagian vitamin B12 menjadi analognya, salah satu analognya adalah antivitamin B12, padahal vitamin B12 ini

diperlukan dalam meningkatkan kadar hemoglobin.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan uji statistik yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa induksi timbal asetat secara oral pada tikus berpengaruh terhadap jumlah kadar Hemoglobin (Hb). Kombinasi antioksidan yang paling optimal untuk mengkhelat Pb yaitu Na₂EDTA 150 mg/kg bb tikus dan asam askorbat 300 mg/kg BB dengan kadar Hb sebesar 9,3 g/100 mL.

DAFTAR RUJUKAN

- Adnan, S. (2001). Pengaruh Paparan Timbal terhadap Kesehatan dan Kualitas Semen Pekerja Laki-laki. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 51(5): 168-174.
- Anies. (2015). *Penyakit Berbasis Lingkungan. :Berbagai Penyakit Menular dan Tidak Menular yang Disebabkan oleh Faktor Lingkungan*. Cetakan 1. Yogyakarta: Ar-ruzz Media.
- Arifuddin, A., Asri., dan Elmatris. (2016). Efek Pemberian Vitamin C terhadap Gambaran Histopatologi Hati Tikus Wistar yang Terpapar Timbal Asetat. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 5 (1).
- Aziz, T., Amalia, R. P., dan Vishe, D. (2015). Removal Logam Berat dari Tanah Terkontaminasi dengan Menggunakan Chelating Agent (EDTA). *Jurnal Teknik Kimia*. 2(1): 41-49.
- Doloksabiru, B. (2008). Pengaruh Proteksi Vitamin C Terhadap Kadar Ureum Kreatinin, dan Gambaran Histopatologis Ginjal Mencit yang Dipapar Plumbun. *Tesis*. Medan: Universitas Sumatra Utara.
- El-fattah, H. M. A., El-rahman, M. K. A., dan Hassan, L. E. (2013). Chitosan as a hepato-protective agent against single oral dose of dioxin. *IOSR J Environ Sci Toxicol Food Technol*. 7(3): 11–17.
- Elmatris, S., Husnii, K., dan Eti, Y. (2015). Efek Pemberian Vitamin C terhadap Aktivitas Katalase Hati Tikus Galur yang Terpapar Ion Pb. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. 4(1): 279-285.
- Eni, W. N., Aditya, M., dan Wiwi, I. (2018). Bioaplikasi Kitosan dan Vitamin C terhadap Kadar Hemoglobin *Rattus norvegicus*. *Life Science Journal of Biology*. 7(2): 65-72.
- Flora, S. J. S., Mehta A., dan Satsangi, K. (2003). Aluminum-induced oxidative stress in rat brain: response to combined administration of citric acid and HEDTA. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 134(3), 319–328.
- Hernayanti., Agung, S., Dwi, L., dan Saefuddin, A. (2015). Efek Polimerase GENA GSTP-1 Terhadap Aktivitas Glutathion S-Transferase (GST) Pada Individu terpapar Logam Berat Timbal. *J. Manusia dan Lingkungan*. 22(3): 305-309.
- Kosnet, M. J. (2012). *Heavy Metals Intoxication and Chelators (Chapter 57)*. Basic and Clinical Pharmacology. 12t edition. Editor Katzung, B,G. Masters, SB., Trevor, AJ.. Mc GrawHill Companies Inc.
- Malaka, I. (2012). Hubungan Kadar Timbel dalam Darah dengan Kadar Hemoglobin dan Hematokrit pada Petugas Pintu Tol Jagorawi. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. 6 (1).
- Marianti, A., Anatiasara, D., dan Ashar, F. F. (2017). Chitosan as Chelating and Protective Agents from Lead Intoxication in Rat. *Biosaintifika*. 9(1): 126–133.
- Muliyadi., H. J. Mukono., dan Haryanto N. (2015). Paparan Timbal Udara Terhadap Timbal Darah, Hemoglobin, Cystatin C Serum Pekerja Pengecatan Mobil. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. 11(1): 87-95.
- Ostrovskaya, S. S., Shatornaya V. F., dan Kolosova, I. (2011). Combined Impact of Plumbum and Cadmium on the Organism. *Foreigning Literature Review* 2(1): 99-101.
- Palar, H. (2008). *Pencemaran & Toksikologi Logam Berat*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Purwani, R. D., dan Hadi, H. (2002). Pengaruh Pemberian Pil Besi Folat dan Pil Vitamin C terhadap Perubahan Kadar Hemoglobin Anak Sekolah Dasar yang Anemia di Desa Nelayan Kabupaten Rembang. *Jurnal Kedokteran Yarsi*, 10, 8-15.
- Scott, A. S. (2004). EDTA- a Molecule with a Complex Story. *Molecule of the Month*.
- Suyono, J. (2015). *Deteksi Dini Penyakit Akibat Kerja (World Health Organization)*. Editor: Caroline Wijaya. Jakarta: EGC Penerbit Buku Kedokteran.

WHO (World Health Organisation). (2011). Lead in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.

Yulaipi, A. (2013). Bioakumulasi Logam Berat Timbal (Pb) dan hubungannya dengan Laju Pertumbuhan Ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*). *Jurnal Sains dan Semi Pormits*. 2(2): 2337-3520.