

**Studi Sub-Kronik 90 Hari: Pengaruh Ekstrak *Scurrula atropurpurea*
Terhadap Kadar Kolesterol Tikus (*Rattus norvegicus*) Betina Galur
Wistar**

***Study of Sub Chronic during 90 Days: Effect of Scurrula atropurpurea
Extract toward Cholesterol Level in Rat (*Rattus norvegicus*)***

Jihan Farah Zakia^{1*)}, Nour Athiroh^{2**)}

^{1,2}Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Malang, Indonesia

ABSTRAK

Keamanan sediaan uji untuk informasi adanya efek toksik setelah pemaparan sediaan uji secara berulang dalam jangka waktu tertentu perlu dilakukan uji toksikologi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun benalu teh *Scurrula atropurpurea* Bl. terhadap kadar kolesterol pada hewan coba tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) selama 90 hari (subkronik). Metode penelitian ini adalah Eksperimental dengan perlakuan dosis Ekstrak Metanolik *Scurrula atropurpurea* (EMSA) dosis 250 mg/KgBB., 500 mg/KgBB dan 1000 mg/KgBB dengan ulangan 5x tiap perlakuan. Subjek menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar yang berumur 1,5 – 2 bulan dengan berat badan minimal 100 gram. Perlakuan dalam penelitian ini berupa Dosis tersebut diberikan 5 kali seminggu selama 90 hari (uji toksisitas subkronik) secara *per oral*. Kadar kolesterol dianalisis menggunakan uji One-way ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar kolesterol darah antara kontrol dengan perlakuan tidak berbeda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa dengan pemberian EMSA (Ekstrak Metanolik *Scurrula atropurpurea*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina adalah tidak toksik pada hewan coba.

Kata kunci : Benalu teh, sub kronik, kolestrol

ABSTRACT

*The safety of compound for experiment and agent toxic effect in certain time period, need toxicity test. The research was aimed to investigate the effect of Methanolic Extract of Scurrula atropurpurea [Bl] Dans (MESA) to rats (*Rattus norvegicus*) during 90 days. Subject of the study were female white rats Wistar strain, 1.5 – 2 months old and 100 gram minimum weight. Rats were divided into 4 groups; each group consists of 5 rats. The first group was control. Second, third and fourth groups were given MESA peroral with dosage 250, 500 and 1000 mg/KgBW. MESA were given 5 times in a week during 90 days (sub chronic toxicity test). The result of one-way ANOVA test revealed there was no significant difference of cholesterol level in serum among four treatment groups. Dosage treatments of MESA and control groups in female white Rats (*Rattus norvegicus*) are not toxic in experimental animals.*

Keywords: Mistletoe tea, Sub chronic, cholesterol

^{*)}Jihan Farah Zakia. Biologi FMIPA Universitas Islam Malang, Jl. MT. Haryono 193, Malang Tlp.082141389057 e-mail: jihan.zakia1@gmail.com

^{**)}Dr. Nour Athiroh AS., S.Si., M.Kes. Biologi FMIPA Universitas Islam Malang, Jl. MT. Haryono 193, Malang Tlp. 081330017206 email: nur_athiroh_mlg@yahoo.co.id

Diterima Tanggal 21 Juli 2017 – Publikasi Tanggal 5 Oktober 2017

Pendahuluan

Indonesia sebagai negara mega-biodiversity ketiga di dunia memiliki berbagai tipe ekosistem yang menyediakan habitat bagi berbagai spesies flora, fauna dan mikroba. Keberadaan beberapa spesies di Indonesia masih memerlukan upaya untuk dieksplorasi dan digali lebih mendalam mengingat belum sepenuhnya potensi tersebut diungkap dan dimanfaatkan untuk kesejahteraan masyarakat [1]. Obat herbal Indonesia pada dasarnya dapat dikelompokkan dalam tiga kategori, yaitu: 1) Jamu; 2) Obat Herbal Terstandar; dan 3) Fitofarmaka [2]. Diantara banyaknya obat herbal di Indonesia, masih sedikit yang dijadikan produk fitofarmaka. Salah satu tanaman herbal yang mempunyai banyak potensi yaitu Benalu Teh.

Ekstrak benalu teh *Scurrula atropurpurea* Bl. Dans mengandung 16 bahan bioaktif yaitu; enam senyawa asam lemak tak jenuh, dua senyawa *xantin*, dua senyawa flavonol glikosida, empat senyawa flavonol, satu senyawa lignan glikosida, dan satu senyawa monoterpen glikosida [3]. Menurut [4], senyawa flavon dalam *Scurrula atropurpurea* yaitu pentahidroksi flavon (Kuersetin)

Di Indonesia, khususnya di Pulau Jawa, batang dan daun Benalu teh telah digunakan secara empiris sebagai unsur pengobatan [5]. Untuk membuktikan Benalu Teh dapat dijadikan sediaan yang aman, maka perlu dilakukan tahapan uji seperti uji *in vitro*, *in vivo* dan uji toksikologi. Secara *in vivo*, benalu teh dapat berperan sebagai perbaikan stres oksidatif dan disfungsi endotel. Hal tersebut ditunjukkan pada kemampuan benalu teh yang dapat memodulasi jumlah *Nitrit Oxide* dalam plasma darah dan dapat meningkatkan EPC (*Endothelial Progenitor Cell*) serta menurunkan kadar MDA (*Melondialdehyde*) di paru-paru [5].

Benalu teh dapat meningkatkan kadar enzim SOD (*superoxide dismutase*), dimana enzim SOD memegang peran penting sebagai scavenger *superoxide anion* yang dibentuk selama fase awal stres oksidatif [6][7]. Pemberian ekstrak metanolik benalu teh dapat menurunkan tekanan darah pada tikus yang diberi perlakuan darah tinggi [8]. Selanjutnya, penelitian tentang uji toksikologi selama 28 hari benalu teh sudah pernah dilakukan. Antara lain, penelitian dari Athiroh dan Sulistyowati, uji subkronik pada tikus putih *Rattus norvegicus* selama 28 hari, didapatkan hasil bahwa ekstrak metanolik daun benalu teh tidak menyebabkan gangguan serum biokimia klinis pada liver tikus (fungsi hati) [9]. Kadar kolesterol dalam serum darah tikus berubah selama masa kebuntingan dan selama siklus estrus [9][10]. Selain itu uji toksikologi pada penelitian-penelitian sebelumnya menyatakan bahwa kadar SGOT, SGPT, Trigliserida, albumin dan kreatinin dari kelompok tikus perlakuan dosis 250, 500 dan 1000 mg/KgBB tidak berbeda nyata dengan kelompok tikus kontrol [11]. Berdasarkan peraturan yang dicantumkan BPOM tahun 2014, untuk melihat keamanan sediaan uji untuk memperoleh informasi adanya efek toksik setelah pemaparan sediaan uji secara berulang dalam jangka waktu tertentu perlu dilakukan uji toksikologi [12].

Berdasarkan latar belakang maka perlu dilakukan uji analisa biokimia klinis analisa kadar kolesterol pada darah tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) setelah pemberian ekstrak metanolik daun benalu teh *Scurrula atropurpurea* selama 90 hari (subkronik).

Material dan Metode

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan yaitu: Tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina, Benalu teh yang sudah diidentifikasi, Metanol teknis 90%, Susu pap pelet sebagai makanan tikus, Air, Sekam, Eter, 50 mM Good's Buffer pH 6,7, 5 mM fenol, 0,3 mM 4-aminioantipirin, ≥ 200 U/I kolesterol esterase, ≥ 50 U/I kolesterol oksidase, ≥ 3 KU/I peroksidase, Standar kolesterol 200 mg/dL.

Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak adalah Blender, Oven, Timbangan digital, Botol, Gelas ukur, Corong, Kandang tikus ukuran 40 cm x 30 cm, Timbangan digital, gelas ukur,

timbangan digital, botol penyimpanan dosis, spatula kaca, alat sonde, Papan sectio, Jarum, Gunting, Pinset, *Handscoon*, Botol organ, Tabung serum, Spektrofotometer UV-Vis, Penangkas air, Vortex, Tabung reaksi, mikropipet.

Metode

Jenis penelitian ini menggunakan metode *True Experimental Design* dengan Rancangan Acak Lengkap. Jumlah Tikus yang digunakan yaitu 20 ekor tikus wistar betina dengan berat badan 100-200 gram yang dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok 1 sebagai kontrol, kelompok 2, 3 dan 4 diberi perlakuan dosis 250 mg/KgBB, 500 mg/KgBB dan 1000 mg/KgBB ekstrak metanolik benalu teh. EMSA diberikan 5 kali dalam seminggu selama 90 hari.

Data diolah dengan uji *one-way* ANOVA dan uji lanjutan Duncan Multiple Range Test (DMRT) menggunakan software IBM Statistics ver 20.0. Kelompok perlakuan secara langsung dibandingkan dengan kontrol dan ada perbedaan nyata jika $p < 0.05$. Apabila diperoleh hasil berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan dan *Post Hoc*.

Penelitian ini mendapatkan persetujuan dari komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang (*Ethical Clearance*) Nomor: 369/EC/KEPK/06/2015.

Cara Kerja

Persiapan Ekstraksi Benalu Teh: Ekstraksi benalu Teh menggunakan metode maserasi. Daun benalu teh dikeringkan dalam oven dengan suhu 40-60°C. Daun benalu teh yang telah kering dihaluskan dengan blender sampai berbentuk serbuk. Ditimbang 100 gram serbuk benalu teh lalu dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 L. Kemudian direndam dengan metanol teknis 90% sampai mencapai volume 1 L. Setelah itu dikocok hingga menjadi larutan yang homogen selama 30 menit. Selanjutnya didiamkan semalam hingga mengendap. Diambil lapisan supernatan dan dilarutkan dalam metanol teknis 90% hingga 3 kali perendaman. Kemudian didiamkan lagi selama semalam. Larutan hasil ekstraksi kemudian dievaporasi menggunakan *Rotary Vacuum Evaporator* (90°C, 90-100 rpm, kurang lebih 1,5 – 2 jam untuk satu labu, hingga diperoleh EMSA. Ekstrak diberi label dan disimpan dalam kulkas.

Aklimatisasi Hewan Coba: Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) betina dikelompokkan dalam kandang sesuai dengan kelompok perlakuan. Setiap kandang berisi 2-3 ekor Tikus. Kandang terbuat dari plastik dengan tutup berupa kawat sehingga memenuhi kriteria kedap air, kuat dan mudah dibersihkan. Tikus dipelihara pada Kandang Laboratorium Faal Universitas Brawijaya. Pemberian pakan Tikus dengan susu pap pelet (sesuai standar laboratorium) dan tanpa batas (*ad libitum*). Selain itu, tikus diberi air untuk minum dengan wadah minum khusus tikus. Penggantian sekam pada kandang dilakukan setiap minggu dua kali untuk mencegah kelembaban pada kandang. Penimbangan Tikus dilakukan seminggu sekali sebagai referensi untuk pembuatan dosis ekstrak metanolik benalu teh.

Pemeriksaan Kadar Kolesterol Darah: Pemeriksaan kadar kolesterol serum darah tikus putih betina dilakukan di laboratorium klinik “Bromo” Malang. Pemeriksaan dilakukan dengan mengambil serum sebanyak 10 µL direaksikan dengan 1000 µL pereaksi uji untuk pemeriksaan kolesterol di dalam tabung reaksi 5 mL, dihomogenkan dengan bantuan vortex, diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Hal yang sama dilakukan terhadap blanko (pereaksi+aquades) dan standar (pereaksi+standar kolesterol). Kadar kolesterol dapat dihitung dengan membandingkan absorbansi sampel dengan absorbansi kolesterol standar yang dikalikan dengan konsentrasi kolesterol standar. Rumus yang digunakan sebagai berikut:

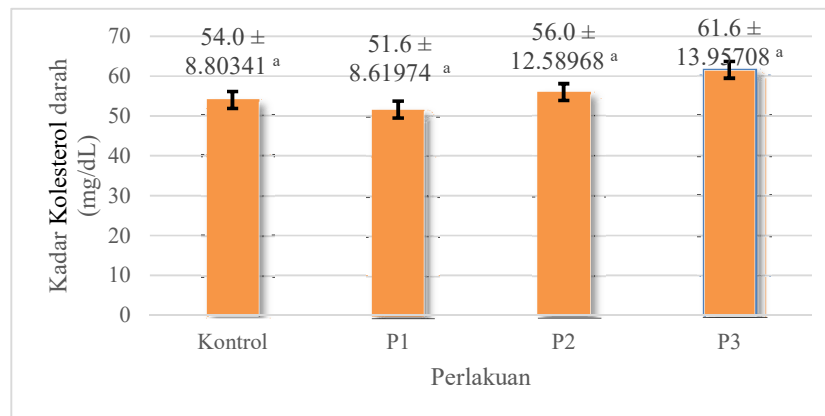
$$\text{Kolesterol total } \left(\frac{g}{dL}\right) = \frac{A \text{ sampel} - A \text{ blangko}}{A \text{ standar} - A \text{ blangko}} \times \text{konsentrasi standar } \left(\frac{g}{dL}\right)$$

Hasil dan Diskusi

Hasil Penelitian

Dalam penelitian ini dilakukan uji toksisitas dalam aspek biokimia klinis. Dalam pemeriksaan biokimia klinis, salah satunya adalah pemeriksaan kadar kolesterol darah. Hipotesis dalam penelitian ini yaitu H_0 yaitu pemberian ekstrak metanolik *Scurrula atropurpurea* pada tikus putih *Rattus norvegicus* betina selama 90 hari tidak berpengaruh terhadap kadar kolesterol darah.

Rerata kadar kolesterol tikus putih betina dapat dilihat dalam bentuk histogram (Gambar 1). Terjadi peningkatan kadar total kolesterol darah seiring dengan peningkatan dosis EMSA. Peningkatan tersebut bisa dipengaruhi oleh kondisi fisiologis Tikus Putih Betina, seperti faktor hormonal.



Gambar 1. Rerata Kadar Kolesterol Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) betina setelah pemberian EMSA selama 90 hari

Jumlah tikus yang digunakan yaitu 40 ekor tikus betina strain Wistar. Alasan menggunakan tikus betina karena tujuan dari penelitian ini yaitu benalu teh dapat dikonsumsi oleh pasien baik laki-laki maupun perempuan, dan dalam penelitian ini digunakan subjek tikus putih betina. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini antara lain dosis P1 (250 mg/KgBB), P2 (500 mg/KgBB) dan P3 (1000 mg/KgBB), menyesuaikan dengan penelitian STRANAS I tentang uji toksisitas subkronik 28 hari mengenai kadar SGOT, SGPT, Trigliserida, Protein Total dan Kreatinin [11] [13] [14] [15] [16].

Pada penelitian ini, pengolahan data statistik menggunakan uji one-way ANOVA dengan tujuan untuk membandingkan nilai rata-rata lebih dari 2 kelompok. Data penelitian pada Tabel 1 menunjukkan bahwa pemberian EMSA dengan dosis tertinggi tidak menunjukkan kerusakan pada aspek kadar kolesterol total pada darah tikus putih betina, ditunjukkan dengan nilai uji *one-way* ANOVA yang signifikan ($p \geq 0,05$).

Tabel 1. Kadar Kolesterol Setelah Pemberian EMSA Selama 90 Hari

No	Perlakuan	Kadar Kolesterol (mg/dL)					Rerata ± SD	P value
		Kelompok ke-						
		1	2	3	4	5		
1	K	40	61	53	62	54	54.0 ± 8.80341 ^a	0,55
2	P1	39	54	48	55	62	51.6 ± 8.61974 ^a	
3	P2	40	46	69	59	66	56.0 ± 12.58968 ^a	
4	P3	48	62	62	84	52	61.6 ± 13.95708 ^a	

Keterangan:

K (Kontrol) : Tikus tanpa diberi EMSA

P1 (Perlakuan 1) : Tikus Perlakuan EMSA dosis 250 mg/KgBB

P2 (Perlakuan 2) : Tikus Perlakuan EMSA dosis 500 mg/KgBB

P3 (Perlakuan 3) : Tikus Perlakuan EMSA dosis 1000 mg/KgBB

^a)secara signifikan semua perlakuan P1, P2 dan P3 tidak berbeda nyata dengan kontrol.

Pembahasan

Berdasarkan Tabel 1, didapatkan nilai rata-rata kadar kolesterol 54 mg/dL untuk kelompok Kontrol, 51,6 mg/dL untuk kelompok P1, 56,0 mg/dL untuk kelompok perlakuan P2 dan 61,6 mg/dL untuk kelompok perlakuan P3.

Hasil uji one-way ANOVA menunjukkan P_{value} sebesar 0,55 dan lebih besar dari F_{tabel} 0,05 sehingga Ekstrak Metanolik Benalu Teh tidak berpengaruh terhadap kadar kolesterol total pada hewan uji. Kolesterol adalah suatu substansi seperti lilin yang berwarna putih, secara alami ditemukan di dalam tubuh. Kolesterol diproduksi di hati, fungsinya untuk membangun dinding sel dan membuat hormon-hormon tertentu, seperti hormon steroid [17].

Ekstrak benalu teh spesies *Scurrula atropurpurea* mengandung 16 bahan bioaktif yang terdiri atas enam senyawa asam lemak, 2 xantin, 2 glikosida flavonol, 1 glikosida monoterpen, 1 glikosida lignan, dan 4 flavon. Kemampuan benalu teh kemungkinan menghambat kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas berkaitan dengan aktivitas bahan aktif pada benalu teh sebagai antioksidan [3]

Flavonoid merupakan zat aktif yang memiliki pengaruh terhadap kadar profil lipid dengan cara mengaktifkan sistem multi enzim seperti *cytochrome* P-450 dan B5 yang mempunyai fungsi mengikat kadar kolesterol dan cairan empedu untuk diekskresikan. Flavonoid terdiri dari 6 kelompok utama, yaitu chalone, flavon, flavonol, flavonon, anthocyanin dan isoflavonoids [3].

Salah satu mekanisme kerja dari antioksidan adalah dengan meningkatkan lipid peroksidase pada sel. Flavonoid sebagai metabolit sekunder berguna untuk memperkuat kapiler darah dan diuretik. Flavonoid juga menyebabkan terjadinya vasodilatasi dan menghambat agregasi platelet darah [18] [19].

Salah satu flavonoid yang berkhasiat adalah quercetin. Senyawa ini beraktivitas sebagai antioksidan dengan melepaskan atau menyumbangkan ion hidrogen kepada radikal bebas peroksi agar menjadi lebih stabil. Aktivitas tersebut menghalangi reaksi oksidasi kolesterol jahat (LDL) yang menyebabkan darah mengental, sehingga mencegah pengendapan lemak pada dinding pembuluh darah [20].

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian uji toksisitas subkronik ekstrak metanolik *Scurrula atropurpurea* selama 90 hari menunjukkan bahwa Ekstrak Metanolik *Scurrula atropurpurea* tidak berpengaruh terhadap kadar kolesterol darah tikus putih *Rattus norvegicus* betina.

Terima Kasih

Kementrian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi (Kemenristek DIKTI) dengan Surat Perjanjian Penelitian Nomor: 020/SP2H/P/K7/KM/2016, Tanggal 25 April 2016.

Daftar Pustaka

- [1] Biologi-LIPI. 2014, Kontribusi LIPI Dalam Temuan Spesies Baru. Tanggal akes 13 Juni. dari: http://www.biologi.lipi.go.id/bio_indonesia/mTemplate.php?h=3&id_berita=551
- [2] Dewoto, H. 2007. Pengembangan Obat Tradisional Indonesia Menjadi Fitofarmaka. *Majalah Kedokteran Indonesia*. **57**(7).
- [3] Athiroh, N dan Permatasari, N.2012. Mechanism of Tea Mistletoe Action on Blood Vessels. *Medicinal Journal Brawijaya* **27**(1), 1-4.
- [4] Fitriya, 2011. Flavonoid Kuersetin dari Tumbuhan Benalu Teh (*Scurulla atropurpurea* BL. Dans). *Jurnal Penelitian Sains*. 14(4).
- [5] Athiroh, N and Sulistyowati, E. 2013. *Scurrula atropurpurea* Increases Nitric Oxide and Decreases Malondialdehyde in Hypertensive Rats. *Jurnal Universa Medicina* **32** (1): 44-50.
- [6] Athiroh, N., Permatasari, N., Sargawo, D. and Widodo, M.A. 2014. Antioxidative and Blood Pressure-Lowering Effects From *Scurrula atropurpurea* On DOCA-Salt Hypertensive Rats. *Biomarkers and Genomic Medicine* **6** (1): 32-36.
- [7] Athiroh, N dan Wahyuningsih, D. 2017. Study Of Superoxide Dismutase And Malondialdehyde Concentrations in Mice After Administration Of Methanolic Extract of *Scurrula atropurpurea* (BL.). *Jurnal Kedokteran Hewan*. **11**(1): 19-22.
- [8] Athiroh, N., Permatasari, N., Sargawo, D. and Widodo, M.A. 2014. Effect of *Scurrula atropurpurea* on Nitric Oxide, Endothelial Damage, and Endothelial Progenitor Cells of DOCA- salt Hypertensive rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. **17** (8): 622.
- [9] Athiroh, N and Sulistyowati, E. 2015. Evaluation of Methanolic Extract of *Scurrula atropurpurea* (BL.) Dans Sub-Chronic Exposure On Wistar Rat Liver. *American-Euroasian Network for Scientific Journal*. 245-250.
- [10] Kartikasari, N dan Ummami R. 2014. Kadar Kolesterol Pada Kambing Bligon Selama Siklus Estrus. *Jurnal Sain Veteriner*. **32**(2).
- [11] Hikmah, U. Athiroh, N., dan Santoso, H. 2017. Kajian Ekstrak Metanolik *Scurrula atropurpurea* (BL.) Dans. Terhadap Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase Tikus Betina. *e-Jurnal Ilmiah Biosaintropis* **2**(2), 30-35.
- [12] Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. Tahun 2014

- [13] Argus, Athiroh, N., dan Santoso, H. 2016. Paparan 28 Hari Ekstrak Metanolik *Scurrula atropurpurea* (Bl.) Dans. Terhadap Kadar SGPT Tikus Betina. *Jurnal Ilmiah Biosaintropis* **2**(1), 53-58.
- [14] Munawaroh, N.S. Athiroh, N., dan Santoso, H. 2016. Kajian Ekstrak Metanolik *Scurrula atropurpurea* (Bl.) Dans. Terhadap Kadar Trigliserida Tikus Betina. *e-Jurnal Ilmiah Biosaintropis*. **2**(2), 30-35.
- [15] Sammad, F.H.A., Athiroh, N., dan Santoso, H. 2017. Pemberin Ekstrak Metanolik *Scurrula atropurpurea* (Bl.) Dans. Secara Subkronik Terhadap Protein Total dan Albumin Tikus Betina . *e-Jurnal Ilmiah Biosaintropis*. **2**(2), 49-54.
- [16] Prastika, N.I, Athiroh, N., dan Santoso, H. 2017. Pengaruh pemberian Subkronik Ekstrak Metanolik *Scurrula atropurpurea* (Bl.) Dans. Terhadap Kadar Kreatinin Tikus Wistar. *e-Jurnal Ilmiah Biosaintropis*. **2**(2), 42-48.
- [17] Mamat. 2010. Faktor-Faktor yang Berhubungan Dengan Kadar Kolesterol HDL Di Indonesia (Analisis Data Sekunder IFLS 2007/2008). Skripsi. Fakultas Kesehatan Masyarakat. Program Ilmu Kesehatan Masyarakat. Universitas Indonesia. Jakarta
- [18] Athiroh, N., Widodo MA, dan Widjajanto E. 2000. Efek *Scurrula Oortiana* (Benalu Teh) dan *Macrosolen javanus* (Benalu Jambu Mawar) Terhadap Kontraktilitas Pembuluh Darah Arteri Ekor Tikus Terpisah Dengan Atau Tanpa Endotel. Tesis. Universitas Brawijaya, Malang.
- [19] Athiroh, N . 2009. Kontraktilitas Pembuluh Darah Arteri Ekor Terpisah Dengan Atau Tanpa Endotel Setelah Pemberian Ekstrak *Scurrula oortiana* (Benalu Teh). *Jurnal Berkala Hayati Edisi Khusus D 3*: 31-34.
- [20] Athiroh, N dan N. Permatasari. 2011. Mekanisme Deoxycorticosterone Acetate (DOCA)-Garam Terhadap Peningkatan Tekanan Darah Pada Hewan Coba. *Jurnal El-Hayah*. **1**(4): 199-213.