



KAJIAN GLUTATION DAN F₂ ISOPROSTAN PADA PASIEN TUBERKULOSIS PARU YANG MENDAPAT TERAPI OBAT ANTI TUBERKULOSIS

Nurul Hidayah✉, Ari Yuniastuti

Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Negeri Semarang, Indonesia
Gedung D6 Lt.1 Jl Raya Sekaran Gunungpati Semarang Indonesia 50229

Info Artikel

Sejarah Artikel
Diterima Februari 2015
Disetujui April 2015
Dipublikasikan Mei 2015

Keywords:
Pedada (Sonneratia caseolaris), Hepatoprotector, Liver

Abstrak

Tuberkulosis paru merupakan penyakit menular yang masih mendapat perhatian di dunia. Tujuan dari penelitian ini adalah mengkaji kadar glutation (GSH) dan F₂ isoprostan pada pasien TB paru yang belum mendapat dan setelah mendapat terapi OAT. Metode penelitian ini adalah eksperimental Quasi (eksperimental semu), dimana dalam eksperimen ini tidak menggunakan kontrol study kasus dengan rancangan pre dan post. Sampel yang digunakan merupakan pasien TB yang belum mengkonsumsi OAT sebanyak 59 pasien umur 15-55 tahun. Darah diambil sebanyak 5ml melalui intra vena. Uji kadar GSH dan F₂ Isoprostan kemudian di baca menggunakan Elisa kit pada 450 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar GSH awal 0,052 mM/mL kadar GSH akhir 0,058 mM/mL. Uji t statistik mendapat nilai signifikan 0,05 (P<0,005). Pada kadar F₂ISO awal 96,969 Pg/ML kadar F₂ISO akhir 96.578 Pg/MI Uji Wilcoxon di dapat nilai sig 0,902 (P>0,05) Simpulanya bahwa kadar GSH pasien sebelum dan setelah mendapat terapi OAT terdapat perbedaan sedangkan pada kadar F₂ISO sebelum dan setelah mengkonsumsi OAT tidak terdapat perbedaan, tetapi terdapat hubungan antara GSH dan F₂ISO pada pasien tuberkulosis paru.

Abstract

Pulmonary tuberculosis is a contagious disease that still gets the attention of the world. the purpose of this study is to examine the levels of glutathione (GSH) and F₂ isoprostane in patients with pulmonary TB who have not received OAT and after therapy. This research method is experimental Quasi (quasi-experimental), which in this experiment not using the case control study with pre and post design. The sample used was TB patients who do not consume as much 59 pasien OAT aged 15-55 years. Blood taken as 5ml via intravenous. Test the levels of GSH and F₂ Isoprostan then be read using Elisa kit at 450 nm. The results showed that the levels of GSH beginning of 0.052 mM / mL final concentration 0.058 mM GSH / mL. T test statistic got significant value of 0.05 (P <0.005). At the beginning F₂ISO levels 96.969 Pg / ML levels F₂ISO end 96 578 Pg / ML in the Wilcoxon test can sig 0.902 (P > 0.05) Simpulanya that GSH levels of patients before and after therapy OAT whereas there are differences in the levels before and after consuming F₂ISO OAT there is no difference, but there is a relationship between GSH and F₂ISO in patients with pulmonary tuberculosis.

© 2015 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:
E-mail: Hamohkitsi@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Tuberkulosis paru merupakan penyakit menular yang menjadi masalah kesehatan di dunia dan di Indonesia. Diperkirakan terdapat 8 juta kasus baru dan 3 juta kematian karena TB setiap tahunnya. Mengingat apabila seorang penderita, dengan alasan apapun tidak berobat maka dalam waktu setahun akan menularkan ke 10-15 orang lain yang sehat. Penularannya pun sangat mudah sekali, dapat melalui interaksi komunikasi antara penderita TB dengan lawan bicara. Bahkan dengan bersinpun, mudah sekali menularkan ke orang lain yang sehat. Tuberkulosis membunuh penderita dengan perlahan-lahan, menggerogoti, melubangi paru dengan akibat kematian yang sangat mengerikan (WHO, 2010).

Tuberkulosis diobati dengan 4 atau 5 obat utama yang disebut lini pertama, misalnya isoniazid, rifampisin, etambutol dan streptomisin. Kalau tidak mempan dengan obat lini pertama maka ada obat lini ke dua, misalnya quinolone, sikloserin, kanamisin dll. Nah, MDR (multi drug resistance) (resistensi ganda -RG) adalah kuman TBC yang sudah kebal terhadap obat lini pertama, khususnya rifampisin, INH. Untuk MDR ini pengobatannya sudah amat susah, amat mahal dan banyak efek sampingnya. MDR cukup banyak ditemui sehari-hari di Indonesia. Obat lini kedua yang mungkin dapat dipakai dalam penanganan MDR TB. Antara lain disebutkan bahwa regimen pengobatan pada penderita tuberkulosis yang resisten terdiri atas OAT primer yang masih sensitif, ditambah dengan salah satu fluorokinolon, OAT suntik (biasanya amikacin) dan dua atau lebih OAT sekunder oral (thioacetazone, PAS, ethionamide, cycloserine) Juga jelas disebutkan bahwa karena tingginya ancaman kegagalan pengobatan dan tingginya biaya pengobatan MDR-TB, jalan yang terbaik adalah menekan sekecil mungkin terjadinya kasus MDRTB melalui peningkatan kemanfaatan pengobatan penyakit tuberkulosis melalui program DOTS (Munir, 2010).

Tuberkulosis paru disebabkan oleh bakteri batang gram positif *Mycobacterium*

tuberculosis. Bakteri ini dapat menularkan penyakit TBC dari individu satu ke individu yang lainnya melalui percikan ludah yang terbawaudara (*Airbone droplets*), seperti batuk dan dahak. Pada saat penderita batuk, butir-butir air ludah berterbangan di udara dan terhirup oleh orang yang sehat. Selanjutnya bakteri tersebut masuk ke dalam paru-paru yang kemudian menginfeksi sehingga paru mengalami peradangan dan peningkatan ROS (stres oksidatif), Stres oksidatif dapat diukur dengan menilai penanda biokimia seperti F₂-isoprostan, F₂-isoprostan saat ini dianggap sebagai biomarker stres oksidatif secara *in vivo* yang paling dapat diandalkan karena mudah diukur stabilitas dan spesivitasnya tinggi (Milne *et al.* 2011). F₂-isoprostan adalah produk dari peroksidasi lipid yang terbentuk secara non-enzimatis dan dapat diukur dalam darah, urin atau jaringan (Montuschi *et al.* 2004).

Peningkatan ROS menyebabkan penggunaan antioksidan semakin besar sehingga terjadi penurunan antioksidan endogen. Salah satu antioksidan endogen yang diperlukan adalah glutathione, yaitu merupakan antioksidan alami yang diproduksi di dalam tubuh (Taha dan Imad, 2010). Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa pada pasien tuberkulosis terjadi penurunan status total antioksidan, pemberian OAT pada pasien TB paru diduga menghasilkan berbagai ROS yang dapat menimbulkan terjadinya stres oksidatif (Jack *et al.*, 1994) yang dapat menyebabkan kerusakan berbagai komponen sel seperti DNA, protein, karbohidrat, lemak dan makromolekul. Strain *M. Tuberculosis* sensitif terhadap antioksidan glutathione (Dayaram *et al.* 2006). Glutathione dapat mempengaruhi proliferasi sel, mencegah peroksidasi lipid tak jenuh dengan menetralkan ROS, sebuah proses yang penting pertahanan tubuh terhadap infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Connell, 2009). Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengkaji kadar antioksidan glutathione dan kadar F₂ Isoprostan pada pasien tuberkulosis sebelum dan sesudah mendapat terapi obat antituberkulosis pada pasien TB Paru.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Balai besar Kesehatan Paru Masyarakat Makassar, Laboratorium Nechri RS Pendidikan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar dilakukan selama 1 tahun. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental Quasi (eksperimental semu), dimana dalam eksperimen ini tidak menggunakan kontrol study kasus dengan rancangan pre and post. Sampel yang digunakan pasien TB belum mengkonsumsi OAT, memenuhi Kriteria inklusi Pria atau wanita usia 15-55 tahun. Sampel ditentukan *consecutive sampling*, yaitu berdasarkan urutan kedatangan. sampel ditentukan selama satu bulan, diperoleh sebanyak 65 sampel dan mengalami DO karena darah lisis sebanyak 6 sampel, sehingga sampel yang dapat dianalisis sebanyak 59 sampel pasien TB paru. Pasien sebelum mengkonsumsi OAT di uji kadar Glutation dan kadar F2-isoprostan kemudian diterapi OAT selama 6 bulan setelah itu di uji lagi kadar glutatation dan F2isoprostan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan kadar glutatation

Sebanyak 10 ml darah yang sudah dipisahkan plasma dan limfositnya. Dan yang digunakan limfositnya untuk uji glutatation dengan metode ELIZA.

Standar, sampel delution Tambahkan 40 ml sampel dilution, 10 ml sampel, standart secara hati-hati jangan sampe menyentuh dinding sumur, inkubasi selama 30 menit dengan suhu 37° C, cuci dengan dilute yang sudah di encerkan dengan aquades perbandingan 1:20 sebanyak 1x pencucian, cuci (wash) 2x dan buang secara cepat, tambahkan enzim HRP 50ml, inkubasi selama 30 menit-

pada suhu 37° C, cuci (wash) 2x dan buang secara cepat, tambahkan 50ml chromogen A dan chromogen B hindarkan dari cahaya selama 15 menit pada suhu 37° C, tambahkan 50ml stop solution bertujuan untuk menghentikan reaksi (perubahan warna biru menjadi kuning), Baca plate pada 450 nm yg sudah diamkan selama 15 menit, menghitung dengan eliza kit.

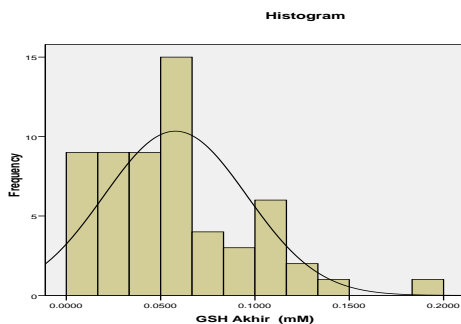
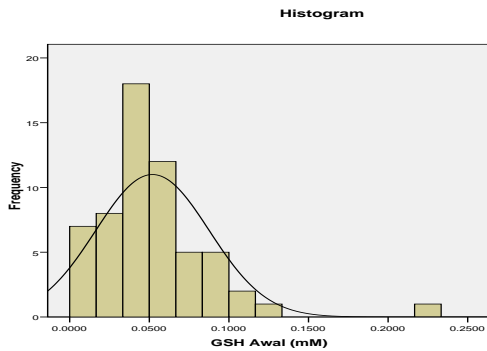
Pemeriksaan F₂ isoprostan

1. Tambahkan 100 uL Standar masing-masing sumur.
2. Tambahkan 100 uL diencerkan 15 - ISOP F2t HRP Conjugate ke setiap sumur menghilangkan Reagent (tambahkan 100 uL 1x Dilusi Buffer sebagai pengganti konjugasi) - Inkubasi pada suhu kamar selama 2 jam.
3. Cuci sumur sesuai dengan prosedur berikut :
 - a. membuang isi dari masing-masing sumur secara cepat
 - b. Tekan keluar isi sisa piring ke selembartissue
 - c. Tambahkan 300 uL buffer wash
 - d. Diamkan selama 2-3 menit .
 - e. membuang isi dari masing-masing inversi piring secara cepat
 - f. Tekan keluar isi sisa piring ke selembartissue.
4. Tambahkan 200 uL TMB Substrat untuk masing-masing sumur jangan sampai menyentuh dinding sumur. Inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar sampai berwarna biru.
5. Tambahkan 50 uL 3 N H₂SO₄ ke setiap sumur untuk menghentikan reaksi . Warnanya akan berubah dari biru menjadi kuning.
6. Baca plate pada 450 nm. Harap dicatat bahwa piring dapat alternatif dibaca pada 650 nm dalam ketiadaan penambahan 3 N H₂SO₄.

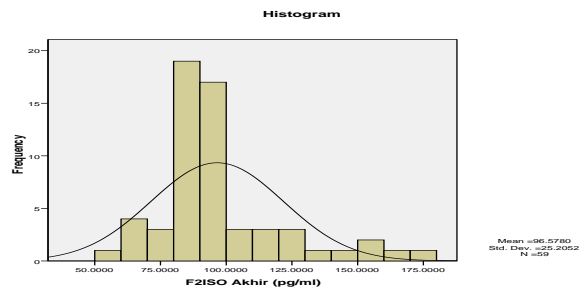
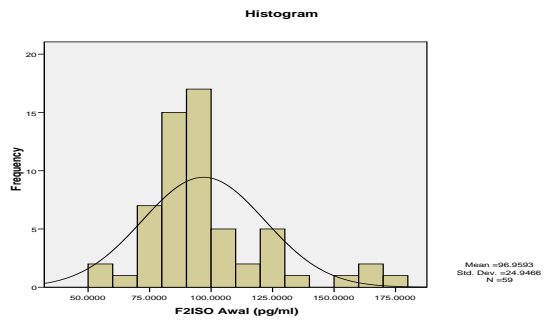
Tabel 1. Uji Normalitas Data pada GSH dan F2 Isoprostan awal dan akhir

	GSH Awal	GSH Akhir	F2- ISO Awal	F2- ISO Akhir
N	59	59	59	59
Negative	-0.095	-0.098	-0.146	-0.127
Kolmogorov- Smirnov Z	1.155	1.169	1.639	1.603
Asymp. Sig. (2-tailed) Test distribution is Normal.	0.139	0.130	0.009	0.012

Berdasarkan hasil uji Normalitas dengan Kogmogorov Smirnov diperoleh hasil bahwa nilai sig untuk GSH awal 0,139 > 0,05 dan GSH akhir sebesar 0,130 > 0,05. Dengan demikian kedua data terdistribusi normal sehingga analisis selanjutnya menggunakan Paired Sampel test (Uji t berpasangan). Sedangkan nilai sig untuk F2ISO di peroleh nilai awal 0,009 < 0,05 dan F2ISO akhir sebesar 0,012 < 0,05. Dengan demikian kedua data tidak terdistribusi normal sehingga analisis selanjutnya menggunakan Wilcoxon test. untuk melihat perbedaanya dapat di lihat pada grafik sebagai berikut.



Grafik 1. Statistik perbandingan kadar GSH awal dan akhir



Grafik 2. Diagram statistik perbandingan F2ISO awal dan Akhir

Tabel 2. Uji berpasangan kadar GSH awal dan akhir dan uji wilcoxon F2-Isoprostan awal dan akhir.

	Rata-rata		T	df	Sig.(2-tailed)
	GSH	GSH			
	Awal	Akhir			
Pair 1	0.052	0.058	2.897	58	0.005

uji wilcoxon	
	F2ISO Akhir (pg/ml) - F2ISO Awal (pg/ml)
Z	-1.362
Asymp.Sig. (2-tailed)	0,173

Berdasarkan hasil perhitungan uji t pada kadar GSH di dapat nilai sig = 0,005 maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan nilai GSH pasien sebelum dan setelah mendapat terapi obat anti tuberkulosis (OAT). Dimana kadar GSH setelah terapi obat anti tuberkulosis (OAT) mengalami kenaikan. Sedangkan pada kadar F2-Isoprostan Berdasarkan hasil uji wilcoxon

diperoleh nilai sig sebesar $0,173 > 0,05$ Dengan demikian tidak ada perbedaan antara F2ISO dan F2ISO akhir.

Tabel 4. Uji korelasi.

		Perubaha perubahan	
		n GSH	F2ISO
Selisih	Correlation		
GSH	Coefficient	1	0.333*
	Sig. (2-tailed)		0.01
	N	59	59
Selisih	Correlation		
F2ISO	Coefficient	0.333*	1
	Sig. (2-tailed)	0.01	
	N	59	59

Dari tabel di atas diperoleh koefisien korelasi $-0,333$ dengan sig $0,01 < 0,05$ jadi dapat disimpulkan terdapat hubungan Negative antara perubahan Glutathion dengan hubungan F2-isoprostan.

Kadar glutathion pada pasien TB sebelum mengkonsumsi OAT lebih rendah dibandingkan pasien TB sesudah mengkonsumsi OAT. Hal ini disebabkan pada pasien TB setelah terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*, mengalami penurunan kadar antioksidan glutathion di bawah kadar GSH normal (kadar GSH normal 2-8mM). Antioksidan merupakan senyawa untuk pertahanan tubuh terhadap radikal bebas. Pada pasien tuberkulosis paru (TB paru), rendahnya antioksidan menyebabkan kerusakan jaringan. Salah satu antioksidan tubuh adalah glutathion. Rendahnya glutathion berhubungan dengan gangguan sistem imun, sehingga menyebabkan keparahan penyakit pada pasien TB paru.

Pasien TB sebelum mengkonsumsi OAT mempunyai Kadar antioksidan rendah ini disebabkan peningkatan radikal bebas selama proses fagositosis *Mycobacterium*. Setelah mengkonsumsi OAT selama 6 bulan kadar antioksidan mengalami kenaikan yang berperan sebagai senyawa yang dapat mencegah stres oksidatif, dengan menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dapat mencegah terbentuknya radikal bebas. Antioksidan

mempunyai mekanisme untuk menetralkan kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas. Mekanisme tersebut diperankan oleh jaringan antioksidan, yang dalam bekerjanya saling menopang dalam jaringan kerjasama antar antioksidan sehingga stres oksidatif mengalami penurunan.

Tubuh memerlukan antioksidan sebagai sistem perlindungan yang kompleks dan komprehensif untuk mengatasi kerusakan oksidatif (stres oksidatif), melindungi sel dari pengaruh toksik *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Intermediate* (RNI) serta memiliki efek antimikroba secara langsung dengan meningkatkan kekebalan tubuh dan menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*, mengontrol pertumbuhan intraseluler *Mycobacterium tuberculosis* pada makrofag, memiliki aktivitas antimikobakteria yang berperan sebagai pembawa *nitric oxide* (NO), sebagai molekul efektor pada imunitas seluler untuk pertahanan tubuh terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Yuniastuti 2013). Hal ini menunjukkan bahwa betapa pentingnya antioksidan glutathion bagi tubuh. Pada pasien TB paru, glutathion tidak hanya memiliki aktivitas anti-mikobakteri langsung tetapi juga dapat mengatur fungsi sel kekebalan tubuh untuk mengendalikan infeksi *Mycobacterium tuberculosis*.

Kadar glutathion lebih dipengaruhi oleh kondisi adanya ketidakseimbangan antara antioksidan dan oksidan di dalam tubuh. Bila terjadi stress oksidatif atau ketidak seimbangan antara antioksidan dan oksidan maka hal ini memicu terjadinya perubahan kadar antioksidan glutathion.

Pemberian obat anti TB diberikan sebagai pengobatan ganda (*dual drug treatment*) atau Paduan obat ganda terdiri dari 2 obat anti yaitu rifampisin dan Isoniazid. Tujuan utama pemberian anti TB melalui panduan obat anti-TB adalah perolehan kesembuhan bakteriologis (*bacteriological cure*) yang ditentukan atas dasar terjadinya konversi dahak. Kesembuhan radiografis (*radiological cure*) sering tidak berjalan paralel dengan kesembuhan bakteriologis,

dalam arti, kesembuhan bakteriologis lebih cepat daripada kesembuhan radiografis.

Hal ini menunjukkan bahwa setelah pemberian OAT kadar GSH mengalami peningkatan dan secara signifikan glutation berpengaruh terhadap infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, yaitu sebagai antimikobakteri.

Terdapat perbedaan kadar GSH pada pasien setelah mengkonsumsi OAT selama 6 bulan Hal tersebut menunjukkan faktor waktu berpengaruh terhadap kadar glutation, Keadaan ini terjadi karena pemberian terapi OAT dapat menurunkan stres oksidatif, meningkatkan kadar vitamin C dalam darah dan meningkatkan antioksidan glutation. Faktor perlakuan bermakna secara statistik terhadap kadar antioksidan, dan keduanya saling tergantung. Pemberian OAT sebagai suplementasi dapat menurunkan pembentukan radikal bebas Stres oksidatif dapat menyebabkan beberapa keadaan yang kurang menguntungkan, seperti : gangguan sinyal transduksi terhadap *Mycobacterium tuberculosis*, gangguan sintesis DNA dan RNA, sintesis protein dan menyebabkan resistensi OAT dan berhubungan dengan mekanisme patogenesis TB (Zakiyah, 2014).

Berdasarkan hasil uji wilcoxon menunjukkan bahwa data kondisi F2ISO pada pasien penderita TBC sebelum dan setelah pemberian obat anti tuberkolosis diperoleh nilai sig sebesar $0,173 > p 0,05$. Dengan demikian tidak ada perbedaan yang signifikan antara F2ISO dan F2ISO akhir.yang berarti bahwa hipotesis kedua yang menyatakan bahwa ada perbedaan F2ISO pada pasien penderita TBC sebelum dan setelah pemberian obat anti tuberkolosis ditolak. Bila dilihat dari teori munculnya F2-isoprostan sebagai tanda dari munculnya radikal bebas dan ini adalah akibat dari peroksidasi lipid.Radikal bebas ini kemudian diekspresikan oleh sel endotel dalam bentuk tingginya ekspresi terhadap F2-isoprostan.Korelasi antara kandungan F2-isoprostan di dalam penelitian ini memberikan efek proteksi terhadap munculnya radikal bebas yang diakibatkan oleh pemberian OAT tersebut

sehingga memberikan gambaran penekanan terhadap munculnya F2-isoprostan baik konsentrasinya di dalam darah maupun ekspresinya di sel endotel.

Penurunan kadar F2-isoprostan pada pasien setelah mengkonsumsi OAT dapat diakibatkan oleh adanya antioksidan yang memang berperan dalam mencegah munculnya radikal bebas atau menekan efek stress oksidasi. sehingga produksi F2-isoprostan juga diekspresikan oleh sel. F2-isoprostan yang terdeteksi di darah adalah akibat rusaknya dinding sel yang menyebabkan isi sel keluar bersama dengan F2-isoprostan. F2-isoprostan yang di darah lebih mudah muncul dan tereliminasi dibandingkan dengan yang di dalam sel. (Milne *et al.* 2011).

Untuk melihat hubungan antara kadar glutation dan F2 isoprostan menggunakan uji korelasi Spearman. Dari tabel diperoleh koefisien korelasi $-0,333$ dengan sig $0,01 < 0,05$ jadi dapat disimpulkan terdapat hubungan negatif antara kadar GSH dengan kadar F2ISO pada pasien tuberkulosis. Yang artinya jika kadar antioksidan rendah maka kadar f2-isoprostan meningkat, dan jika kadar antioksidan (GSH) meningkat maka kadar f2-isoprostan menurun. Kadar antioksidan rendah disebabkan asupan kurang dan peningkatan radikal bebas selama proses fagositosis *Mycobacterium*. Antioksidan adalah senyawa yang dapat mencegah stres oksidatif dengan menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan mencegah terbentuknya radikal bebas. Antioksidan mempunyai mekanisme untuk menetralkan kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas. Mekanisme tersebut diperankan oleh jaringan antioksidan, yang dalam bekerjanya saling menopang dalam jaringan kerjasama antar antioksidan.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan kadar GSH pada pasien TB paru sebelum dan setelah mengkonsumsi OAT, sedangkan pada kadar F2-Isoprostan tidak terdapat perbedaan pada pasien

TB paru sebelum dan setelah mengkonsumsi OAT, tetapi terdapat hubungan antara kadar GSH dan kadar F2-Isoprostan pada pasien tuberkulosis paru.

DAFTAR PUSTAKA

- Connell ND and Venketaraman V. 2009. Control of *Mycobacterium tuberculosis* infection by Glutathione Recent Patients on Anti-Infective. *Drug Discovery* (4): 214-226.
- Dayaram YK, Connell ND, Venketaraman V. 2006. Characterization of a glutathione metabolic mutant of *Mycobacterium tuberculosis* and its resistance to glutathione and Nitrosoglutathione. *Jurnal Bacteriology* 188: 1364-72.
- Milne Gl, Yin H, Hardy KD, Davies SS dan Roberts LJ. 2011. Isoprostane generation and function. *Chem Rev* 111 (100):5973-5996.
- Montuschi P, Barnes PJ, Robert LJ 2nd. 2004. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J* 18:1791-800.
- Mohod K, Archana D and Smith K. 2011. Status of Oxidants and Antioxidants in Pulmonary Tuberculosis With Varying Bacillary Load. *Journal of Experimental Science* 2(6):35-37.
- Taha DA and Imad AJT. 2010. Antioxidant status, C-Reactive Protein and Status in Patient with Pulmonary tuberculosis. *SQU MED.J* 10 (3):361-369.
- Venketaraman V, Dayaram YK, Talaue MT dan Connell ND. 2005. Glutathione and Nitrosoglutathione in macrophage defense against *M. tuberculosis*. *Infect Immunity* 73: 1886-9
- World Health Orgnitation. 2010. Global Tuberculosis Programme : Global Tuberculosis Control. WHO Report.
- Yuniastuti A. 2013. Status Antioksidan Glutation Pada Pasien Tuberkulosis Paru Di Balai Kesehatan Paru (BKPM) Makasar. Makasar. Hal : 54-54
- Zakiyah, E. R. 2014. Pengaruh Pemberian Vitamin C Terhadap Perubahan Kadar Total Antioksidan Serum Pada Tuberkulosis Paru Anak.. Departemen Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Padjajaran. 16(2):110-4.