

PENGGUNAAN EKSTRAK KEDELAI HITAM (*Glycine max L*) TERHADAP AKTIVITAS ENZIM HEPAR (AST - ALT) DAN ANTIOKSIDAN SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) TIKUS PUTIH

I Gusti Ayu Nyoman Danuyanti, Ersandhi Resnhaleksmana

Abstrak: Aktivitas fisik yang berat dapat meningkatkan aktivitas enzim AST (*aspartat aminotransaminase*) dan ALT (*alanine aminotransaminase*) dalam darah sebagai pertanda dari gangguan fungsi hepar yang disebabkan oleh stress oksidatif akibat. Radikal bebas yang berlebihan sehingga merusak makromolekul dalam sel. Pemberian suplementasi kedelai hitam (*Glycine max L*) yang mengandung antosianin sebagai antioksidan diharapkan dapat menekan pembentukan radikal bebas sehingga aktivitas enzim hepar dan kadar enzim SOD sebagai antioksidan intraseluler dapat terjaga. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penggunaan ekstrak kedelai hitam (*Glycine max L*) terhadap aktivitas enzim hepar (AST-ALT) dan antioksidan Superoksida Dismutase (SOD) tikus putih yang diberikan aktivitas fisik maksimal. Penelitian ini menggunakan desain *control group post test only design* secara *in vivo* menggunakan perlakuan ekstrak kedelai hitam yang diberikan pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar yang diberikan aktivitas fisik maksimal. Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak kedelai hitam 40% paling kuat mempertahankan aktivitas enzim hepar dan kadar antioksidan SOD. Kesimpulan hasil penelitian ini terdapat pengaruh pemberian ekstrak kedelai hitam terhadap aktivitas enzim hepar (AST-ALT) pada tikus putih yang diberikan aktivitas maksimal, sedangkan untuk enzim SOD dapat menghambat penurunan kadar sampai 37,8% tetapi secara statistik tidak terdapat pengaruh secara signifikan.

Kata Kunci: Aktivitas fisik maksimal; antioksidan SOD; enzim AST-ALT; kedelai hitam.

THE USE OF BLACK SOYBEAN (*Glycine max L*) EXTRACT AGAINST THE ACTIVITY OF LIVER ENZYMES (AST - ALT) AND ANTI-OXIDANT SUPER-OXIDE DISMUTASE (SOD) OF WHITE RAT

Abstract: Strenuous physical activity can increase the activity of enzymes AST (aspartate aminotransaminase) and ALT (alanine aminotransaminase) in the blood as a sign of hepatic dysfunction caused by oxidative stress as a result. Excessive free radicals that damage macromolecules in cells. The supplementation of black soybean (*Glycine max L*) contains anthocyanin as an antioxidant is expected to reduce the formation of free radicals thus the activity of liver enzymes and the levels of SOD enzymes as intracellular antioxidant can be maintained. The purpose of this study was to determine the effect of using extracts of black soybean (*Glycine max L*) on the activity of liver enzymes (AST-ALT) and the antioxidant superoxide dismutase (SOD) of white rats that were given a maximum of physical activity. The research was *control group post test* design *in vivo* that used black soya extract treatment given to white rats (*Rattus norvegicus*) Wistar strain given maximum physical activity. The results indicated black soybean extract 40% was the most powerful retaining the activity of liver enzymes and blood levels of antioxidants SOD. The conclusion is there is an effect of black soybean extract against the activity of liver enzymes (AST-ALT) in rats given maximal activity, whereas SOD enzymes can inhibit the decline of SOD enzyme level to 37.8% but statistically there is no significant influence.

Keywords: AST-ALT enzymes; antioxidants SOD; Soybean black; Physical activity maximum.

LATAR BELAKANG

Hepar merupakan salah satu organ vital di dalam tubuh yang memiliki berbagai fungsi dalam menjaga kesehatan tubuh misalnya pembentukan dan sekresi empedu, metabolisme karbohidrat, protein, dan lemak, dan lain sebagainya. Olahraga berat dapat menurunkan aliran darah di hepar sampai setengah dari normal, yang dapat mengindikasikan adanya iskemia atau hipoxia yang di induksi oleh olahraga. Penurunan ini dapat mengakibatkan peningkatan faktor-faktor pembentukan ROS (*Reactive oxygen Spesies*) yang kemudian dapat merusak struktur dan fungsi dari sel hepar (Murray *et al.*, 2009; Sunaryo *et al.*, 2003).

Pada latihan fisik berat dapat menimbulkan ketidakseimbangan antara senyawa pro-oksidan dan antioksidan intraselular. Kondisi tersebut dapat mengakibatkan kerusakan sel hepar sehingga terjadi peningkatan kadar plasma *aspartat aminotransaminase* (AST) dan kadar bilirubin yang merupakan tanda dari gangguan fungsi hepar. Peningkatan dari kadar AST bisa mencapai 4 kali lipat (Sunaryo *et al.*, 2003). Aktivitas fisik berat yang dilakukan sesaat, dapat juga meningkatkan aktivitas enzim AST (*aspartat aminotransaminase*) dan ALT (*alanine aminotransaminase*) dalam darah sebagai pertanda dari gangguan fungsi hepar yang disebabkan oleh stress oksidatif (Wresdiyati *et al.*, 2003).

Pelatihan fisik berat akut pada penelitian secara *in vivo* pada tikus juga dapat menyebabkan peningkatan kadar lipid peroksidase pada hepar dan jantung sebagai pertanda dari stress oksidatif serta kerusakan pada *nuclear* DNA sel. Radikal bebas

sangat diperlukan bagi kelangsungan beberapa proses fisiologis dalam tubuh, terutama untuk transportasi elektron, tetapi radikal bebas yang berlebihan dapat membahayakan tubuh karena dapat merusak makromolekul dalam sel seperti karbohidrat, protein, DNA dan sebagainya. Kerusakan makromolekul selanjutnya dapat mengakibatkan kematian sel. Secara normal, tubuh mempunyai strategi yang sistematis untuk memerangi pembentukan radikal bebas atau untuk mempercepat degradasi senyawa tersebut. Sistem ini dapat dibagi menjadi dua kelompok besar, yaitu sistem pertahanan preventif seperti enzim superoksida dismutase dan sistem pertahanan melalui pemutusan reaksi radikal melalui antioksidan secara eksogen (Rynertson *et al.*, 2007).

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Untuk mencapai kestabilan atom atau molekul, radikal bebas akan bereaksi dengan molekul disekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini akan berlangsung terus menerus di dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya. Oleh karena itu tubuh memerlukan suatu substansi penting yaitu antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas tersebut sehingga tidak dapat menginduksi suatu penyakit (Wresdiyati *et al.*, 2008; Rynertson *et al.*, 2007).

Tubuh memerlukan suplementasi tambahan berupa antioksidan eksogen sebagai *scavenger* radikal bebas. Beberapa antioksidan yang beredar

dipasaran saat ini seperti vitamin A, vitamin C, vitamin E, α -tokoferol, Butil Hidroksi Anilin (BHA), dan Butli Hidroksi Toluena (BHT), tetapi penggunaan antioksidan sintetis BHA dan BHT yang berlebihan dan lama dapat meningkatkan resiko toksis pada tubuh dan merusak hepar (Jawi *et al.*, 2008). Adanya trend *back to nature* di masyarakat dalam memelihara kesehatan dan kebugaran tubuh melahirkan konsep pangan fungsional (*functional food*) yang dapat menyembuhkan atau menghilangkan efek negatif dari penyakit tertentu.

Kedelai hitam (*Glycine max L*) merupakan sumber pigmen antosianin seperti *cyandin-3-glucoside* dan *delphinidin-3-glucoside* yang dapat menurunkan kadar kolesterol darah. Kandungan antosianin pada kedelai hitam jauh lebih banyak dibanding kedelai kuning karena warna hitam pada kulitnya. Antosianin bermanfaat bagi kesehatan tubuh manusia karena dapat berfungsi sebagai antioksidan, anti hipertensi, dan pencegah gangguan fungsi hepar. Penggunaan kedelai hitam khususnya di Nusa Tenggara Barat lebih ditekankan pada olahan sayur yang sangat khas dan digemari karena selain mengandung antosianin tinggi juga terdapat asam amino glutamate lebih tinggi dibandingkan dengan kedelai kuning sehingga rasanya lebih gurih. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan penggunaan yoghurt kedelai hitam dapat menurunkan kadar kolesterol, Tryglicerida dan HDL tikus putih hiperkolesterolemia dan penggunaan ekstrak daun ubi jalar ungu dengan konsentrasi 10% dapat dapat menurunkan pengaruh radikal bebas akibat nekrosis hepar mencit yang diberikan parasetamol dan beban aktivitas maksimal (Wresdiyati *et al.*, 2003). Pada

penelitian ini lebih ditekankan pada penggunaan ekstrak kedelai hitam terhadap aktivitas enzim hepar dan antioksidan Superoksida Dismutase (SOD) tikus putih yang diberikan latihan fisik secara maksimal sehingga diharapkan dapat sebagai bahan masukan khususnya bagi yang sering melakukan aktivitas fisik secara maksimal sementara ataupun terus-menerus untuk mengimbangi dengan asupan yang benar sehingga hasil yang diharapkan dari latihan yang dilakukan dapat memberikan hasil secara optimal tanpa memberikan efek negatif untuk fungsi metabolisme tubuh (Nugraheni *et al.*, 2008).

METODE PENELITIAN

Kedelai hitam yang dibuat ekstrak menggunakan alkohoi 80% diproses evaporasi sehingga uap etanol hilang dan yang tertinggal ekstrak kental. Pemberian ekstrak kedelai hitam dengan dosis bervariasi diberikan kepada tikus putih sesuai dengan perlakuan yang diberikan selama 7 hari dan pada hari ke-8 diberikan perlakuan aktivitas maksimal berupa renang sampai hampir tenggelam atau nampak tanda-tanda kelelahan berupa tenggelamnya hampir semua badan kecuali hidung dan melemahnya gerakan anggota gerak serta menurunnya waktu reaksi. Lamanya renang berkisar antara 45-50 menit. Sehari setelah perlakuan dilakukan pemeriksaan aktivitas enzim AST, ALT dan antioksidan SOD darah tikus putih (Jawi *et al.*, 2008; Sumardika *et al.*, 2012).

HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian menunjukkan rerata aktivitas enzim hepar (AST dan ALT) meningkat

setelah diberikan perlakuan renang maksimal selama 45-50 menit yang secara lengkap disajikan pada tabel. 1.

Tabel 1. Rerata hasil pemeriksaan AST, ALT dan SOD darah tikus putih yang diberikan ekstrak kedelai hitam dan renang maksimal selama 45-50 menit

Perlakuan	Sebelum pemberian ekstrak kedelai hitam			Setelah pemberian ekstrak kedelai hitam & renang maksimal selama 45-50 menit			Peningkatan/ Penurunan		
	AST (U/L)	ALT (U/L)	SOD (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	SOD (U/L)	AST	ALT	SOD
T0	53.85	17.03	384.85	114.58	34.91	322.304	60.7	17.9	62.5
T1	51.06	18.66	381.59	98.27	32.76	325.026	47.2	14.1	56.6
T2	52.85	20.00	410.38	83.81	30.58	372.546	30.9	10.6	54.1
T3	53.06	19.02	391.09	74.28	28.80	336.974	20.7	9.8	47.4
T4	49.50	20.03	390.01	68.66	25.92	342.594	19.2	5.9	37.8
Rerata	52.06	18.95	315.27						

Keterangan :

- T0 : Tanpa pemberian ekstrak kedelai hitam + renang 45-50 menit
- T1 : Pemberian ekstrak kedelai hitam 10% + renang 45-50 menit
- T2 : Pemberian ekstrak kedelai hitam 20% + renang 45-50 menit
- T3 : Pemberian ekstrak kedelai hitam 30% + renang 45-50 menit
- T4 : Pemberian ekstrak kedelai hitam 40% + renang 45-50 menit

Peningkatan tertinggi terlihat pada kontrol yang tidak diberikan ekstrak kedelai hitam yaitu AST 60,7%, ALT 17,9% dan penurunan antioksidan SOD sebesar 62,5% sedangkan pada pemberian ekstrak kedelai hitam 40% selama 7 hari lebih menekan peningkatan aktivitas enzim AST sebesar 19,2%, ALT 5,9% dan penurunan kadar antioksidan SOD 37,8%.

Untuk melihat pengaruh penggunaan ekstrak kedelai hitam terhadap aktivitas enzim hepar dan kadar antioksidan SOD dilanjutkan dengan analisa *One Way Anova*. Hasil analisa statistik menunjukkan terdapat pengaruh pemberian ekstrak kedelai hitam terhadap aktivitas enzim hepar (AST-ALT) dalam darah tikus dengan nilai $p < \alpha=0,05$ (AST = 0,031; ALT = 0,027) sedangkan untuk antioksidan SOD tidak memberikan pengaruh yang signifikan dengan nilai $p > \alpha=0,05$ yaitu 0,460

PEMBAHASAN

Pemberian ekstrak kedelai hitam (*Glycyne max L*) yang mengandung zat warna antosianin berfungsi sebagai antioksidan yang dapat menurunkan AST dalam darah tikus yang diberi aktivitas fisik maksimal. Suplementasi antioksidan flavonoid dapat menangkap radikal bebas maupun senyawa oksigen reaktif sehingga tidak terjadi stress oksidatif dan kerusakan pada sel (Sumardika *et al.*, 2012). Bila tidak terjadi kerusakan pada sel maka kadar AST dalam darah tidak akan meningkat karena AST adalah enzim yang berada dalam sel (Jawi *et al.*, 2008).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kedelai hitam konsentrasi 40% paling kuat menurunkan kadar AST darah tikus. Banyak faktor yang menentukan apakah aktivitas fisik berat menyebabkan terjadinya kerusakan akibat radikal bebas, termasuk status kesehatan, intensitas

latihan, dan diet. Peningkatan aktivitas enzim ALT pada darah tikus putih dapat terjadi akibat pelepasan enzim ke dalam serum ketika jaringan hepar mengalami kerusakan salah satunya karena aktivitas fisik maksimal yang menimbulkan peroksidasi lipid pada sel hepar (Jawi *et al.*, 2006; Suda *et al.*, 2003)

Konsumsi kedelai hitam yang mengandung senyawa-senyawa polifenol seperti flavonoid dan antosianin mampu menghambat reaksi oksidasi melalui mekanisme *radical scavenging* dengan cara menyumbangkan satu elektron pada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas sehingga banyaknya radikal bebas menjadi berkurang. Secara *in vitro*, flavonoid merupakan inhibitor yang kuat terhadap peroksidasi lipid, sebagai penangkap spesies oksigen atau nitrogen yang reaktif, dan juga mampu menghambat aktivitas enzim lipooksigenase dan siklooksigenase (Rynertson *et al.*, 2007). Adanya suplementasi antioksidan pada aktivitas fisik maksimal mampu mencegah terjadinya kerusakan pada sel sehingga kadar ALT dalam darah tidak akan meningkat karena ALT tetap berada dalam sel yang utuh (Suda *et al.*, 2003).

Aktivitas fisik berat yang diberikan berupa renang maksimal pada tikus putih akan memperberat terjadinya stress oksidatif karena peningkatan pembentukan radikal bebas sehingga terjadi kerusakan sel-sel hepar yang terlihat dari meningkatnya AST dan ALT dalam darah. Pemberian ekstrak kedelai hitam yang mengandung zat warna antosianin dapat menurunkan aktivitas AST dan ALT dalam darah tikus putih. Penurunan AST dan ALT paling kuat terjadi setelah pemberian ekstrak kedelai hitam konsentrasi 40% selama 1

minggu pada kelompok tikus putih yang diberikan aktivitas maksimal. Selain sebagai *scavenger*, senyawa flavonoid dengan kandungan antosianin menghambat langkah propagasi, yaitu memutus rantai autoksidasi atau disebut juga *Chain-breaking antioxidants*. *Chain-breaking antioxidants* bisa bereaksi dengan radikal peroksil dan alkoksil, sehingga dapat menghambat pembentukan, isomerisasi dan dekomposisi hidroperoksida. Aktivitas fisik maksimal meningkatkan kebutuhan oksigen dan glukosa pada otot untuk pembentukan ATP, sehingga proses glukoneogenesis di hepar meningkat. Peningkatan metabolisme tersebut akan meningkatkan pembentukan ROS yang dapat menimbulkan terjadinya stress oksidatif. Stress oksidatif akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid, fragmentasi protein, dan DNA sehingga terjadi nekrosis pada sel dan keluarnya enzim AST dan ALT ke dalam darah. Adanya penghambatan dalam pembentukan radikal dengan mekanisme *Chain-breaking antioxidants* tersebut dapat menghambat terjadinya peroksidasi lipid sehingga mampu mencegah keluarnya (*release*) AST-ALT dalam darah dan melindungi sel hepar dari nekrosis pada tikus yang diberikan aktivitas fisik maksimal (Nugraheni *et al.*, 2008; Suda *et al.*, 2003). Antosianin merupakan salah satu senyawa yang bermanfaat bagi kesehatan tubuh manusia karena dapat berfungsi sebagai *radical scavenging*, anti hipertensi, pencegah gangguan fungsi hepar. Suplementasi antosianin dari *Aronia melanocarpa* pada mencit yang diinduksi dengan cadmium chloride terbukti menurunkan kadar enzim AST, ALT, dan bilirubin (Jawi *et al.*, 2008).

Superoksida Dismutase (SOD) merupakan enzim yang mendismutasi radikal superoksida (O_2^-) menjadi hydrogen peroksida (H_2O_2). Enzim ini berada dalam cairan intraseluler yang berpartisipasi pada proses degradasi senyawa radikal bebas intraseluler. Enzim ini mempunyai sebuah atom oligo elemen pada sisi aktifnya. SOD mengkatalisis dismutasi O_2^- menjadi H_2O_2 . Radikal bebas akan dinetralkan menjadi produk yang lebih stabil oleh enzim antioksidan intraseluler, seperti superoksida dismutase, katalase, dan glutathion peroksidase. Peningkatan jumlah radikal bebas yang terus-menerus pada kondisi melakukan aktivitas fisik berat yang diberikan berupa renang maksimal pada tikus putih akan memperberat terjadinya stress oksidatif karena peningkatan pembentukan radikal bebas sehingga terjadi kerusakan sel-sel hepar yang terlihat dari meningkatnya AST dan ALT dalam darah. Aktivitas maksimal akan meningkatkan pemakaian enzim antioksidan intraseluler. Hal ini dapat menurunkan aktivitas maupun kandungan antioksidan. Hasil penelitian menunjukkan penurunan kadar SOD paling kuat terjadi kelompok kontrol sampai > 50% akibat pemberian aktivitas maksimal dan tidak adanya suplementasi antioksidan dari luar tubuh yang dapat menghambat penurunan kadar enzim SOD. Pemberian suplementasi ekstrak kedelai hitam pada konsentrasi 40% dapat menghambat penurunan hingga 37,8% dibandingkan dengan kontrol. Pemberian suplementasi kedelai hitam ini secara statistik tidak berpengaruh terhadap penurunan kadar enzim SOD pada tikus putih yang direnangkan selama 45-50 menit. Hal ini dimungkinkan karena pemberian suplementasi

ekstrak kedelai hanya selama 7 hari sehingga belum efektif untuk mempertahankan kadar antioksidan SOD dalam darah sehingga terjadi penumpukan hydrogen peroksida dari radikal superoksida akibat perlakuan aktivitas fisik maksimal. Semakin banyak H_2O_2 terbentuk, maka proses peroksidasi lipid akan semakin tinggi, sehingga membutuhkan peningkatan aktivitas enzim SOD sebagai antioksidan intraseluler menyebabkan kadar enzim SOD semakin turun (Murray *et al.*, 2009; Nugraheni *et al.*, 2008; Jawi *et al.*, 2008).

Pemberian suplementasi ekstrak kedelai hitam yang mengandung antosianin sebagai antioksidan secara efektif diharapkan sebagai tindakan preventif untuk dapat mengatasi penurunan kadar enzim SOD diakibatkan pemberian aktivitas secara maksimal. Hal ini disebabkan oleh antosianin yang berfungsi sebagai antioksidan, yang bereaksi dengan radikal bebas untuk membentuk produk yang lebih stabil. Antosianin termasuk antioksidan primer yang bekerja sebagai antioksidan pemutus rantai dengan cara menjadi donor ion hidrogen bagi radikal bebas sehingga radikal bebas menjadi molekul yang lebih stabil. Hal ini membuat SOD lebih ringan dalam mengkatalis reaksi dismutase radikal superoksida menjadi produk lain yang lebih stabil, sehingga kadarnya dalam sel menjadi lebih terjaga. Antosianin dapat disimpan oleh tubuh. Hati merupakan salah satu organ yang dapat menyimpan antosianin dalam jumlah besar. Antosianin yang tersimpan dalam hati dapat bereaksi dengan radikal bebas yang terbentuk pada saat stress ataupun pemberian aktivitas maksimal, sehingga peningkatan radikal bebas dapat ditekan. Penurunan jumlah

radikal bebas ini membantu mengurangi aktivitas dan penggunaan enzim SOD (Jawi *et al.*, 2006; Suda *et al.*, 2003; Wresdiyati *et al.*, 2003).

DAFTAR PUSTAKA

- Jawi I., Manuaba I., Sutirtayasa I., Muruti G.,2006. Pemberian Glutamin Menurunkan Kadar Bilirubin Darah serta Mengurangi Nekrosis Sel-Sel Hati setelah Pemberian Aktivitas Fisik Maksimal dan Parasetamol pada Mencit. *Dexa Media*, 4(19) : 192- 95
- Jawi IM., Suprpta D.N, Subawa AA.,2008. Sirup atau Ekstrak Air Umbi Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* L) Dosis 4 ml Efektif sebagai Antioksidan pada Tikus Putih yang diberlakukan stress. *Dexa Media*, 21(4).
- Murray R.K., Granner D.K., Meyes P.A., Rodwell V.W, 2009. *Biokimia Harper Edisi 27*. Penerbit Buku Kedokteran, EGC, Jakarta.
- Nugraheni, Mutiara.,2008. Potensi Kentang Hitam Dalam Mereduksi Stress Oksidatif Dan Menghambat Proliferasi Sel Kanker Payudara MCF-7. *Jurnal Teknologi dan Industri*, 24(2).
- Rynertson KA., 2007. Phytochemical Analysis of Bioactive Constituents from Edible Myrtaceae Fruit, Dissertation, The City University of New York, New York.
- Suda I., Tomoyuki OKI., Mami M., Mio K., Yoichi N., Shu F.,2003. Physiological Functionality of Purple-Fleshed Sweet Potatoes Containing Anthocyanins and Their Utilization in Foods. *Japan Agricultural Research Quarterly (JARQ)*. *JIRCAS*, 37(3)
- Sumardika IW., Jawi IM.,2012. Water Extract Of Sweet Potato Leaf Improved Lipid Profile And Blood SOD Content Of Rats With High Cholesterol Diet. *Medicina*, 43(2)
- Sunaryo, Manalu, Wasmen, Kusumarini, Nastiti, Priyono A., Ratih D.,2003. Perbaikan Level Glutation Hipokampus Pada Tikus Yang mengalami Penuaan Fisiologis dan Penuaan akibat Stress Oksidatif Dengan Pemberian Alanin-Glutamin Dipeptida. *Jurnal Sains Medika*, 4(1):1-12
- Wresdiyati T., Hartanta AB., Astawan M.,2008. The Effect Of Seaweed *Euchema Cottoni* On Superoxide Dismutase (SOD) Liver Of Hypercholesterolemic Rats. *Hayati Journal Of Biosciences*, 5(3)
- Wresdiyati T.,2003. Imunohistochemical Study of Oxygen-Free Radical Scavenger-Copper, Zinc-Superoxide Dismutase (Cu,Zn-SOD) in The Rats Liver Under Stress Condition. *Biota*, 8: 107-112