

# PELABELAN ANTIBODI ANTI-NS1 DENGUE KELINCI DENGAN HORSERADISH PEROKSIDASE

Paisal,\* Beti Ernawati Dewi,\*\* T. Mirawati Sudiro,\*\* Fithriyah\*\*

## LABELING OF HEMORRHAGIC RABBIT ANTI-NS1 WITH HORSERADISH PEROXIDASE

### Abstract

*Dengue NS1 protein can be an ideal target for early detection of dengue virus infection. The aim of the study is to label rabbit anti-NS1 antibody with HRP, so that it can be used for detection of NS1 protein. The design of this study is laboratory experimental. Anti-NS1 IgG-contained rabbit serum was purified with column chromatography (Sephadex G-200). The result of purification was labeled with HRP using periodate method. Then, HRP-labeled IgG was generated with dot blot and ELISA. Using dot blot assay, we found that rabbit anti-NS1 IgG labeled with HRP is successful. Nevertheless, the ability of detection was not so good (1:1600). In addition, HRP-labeled IgG used to detect NS1 protein utilizing ELISA resulted in high negative control absorbance ( $0,453 \pm 0,013$ ). Therefore, we cannot interpret the assay. The labeling was successful, but it need further optimization in order to get the HRP-labeled IgG can be used in ELISA. Optimization was also needed to increasing the ability of detection of HRP-labeled IgG in dot blot assay.*

**Key words:** protein NS1, dengue anti-NS1 IgG, labeling, HRP

### Pendahuluan

Protein non struktural 1 (NS1) ditemukan pada 82% pasien dengue, sejak hari pertama demam sampai hari kesembilan.<sup>1</sup> Kadar NS1 serum bervariasi antar individu, dari beberapa nanogram sampai beberapa mikrogram per mililiter, bahkan pada satu kasus mencapai 50 µg/ml serum.<sup>2</sup> Kadar protein NS1 lebih tinggi pada awal penyakit, oleh karena itu ideal digunakan sebagai target deteksi dini infeksi dengue.

Kumarasamy dkk menemukan bahwa *antigen-capture* ELISA NS1 komersial mempunyai kemampuan deteksi lebih baik dibanding isolasi virus dan RT-PCR. Uji lain yaitu uji kromatografi dapat mendeteksi NS1 lebih cepat, lebih mudah, serta cukup sensitif dan spesifik.<sup>3</sup>

Walaupun telah tersedia kit komersial,

masih perlu dikembangkan teknik deteksi NS1 *in house* menggunakan gen NS1 strain lokal. Pengembangan antibodi anti-NS1 label *horseradish peroxidase* (HRP) *in house* terdiri dari beberapa tahap, yaitu produksi protein NS1 pada *E. coli*, produksi antibodi anti-NS1 pada kelinci, pelabelan antibodi anti-NS1 dengan HRP, dan pengujian kemampuan deteksi antibodi anti-NS1 label HRP terhadap NS1 dalam serum penderita terinfeksi dengue. Laporan penelitian ini akan difokuskan pada tahap pelabelan antibodi anti-NS1 dengan HRP.

### Metode

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium. Pada penelitian ini dilakukan purifikasi dan pelabelan IgG anti-NS1 kelinci. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobio-

\* UPF Penelitian Kesehatan Aceh.

\*\*Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

logi FKUI pada tahun 2010. Pada akhir penelitian diharapkan diperoleh IgG anti-NS1 label HRP yang dapat digunakan untuk mendeteksi protein NS1.

Serum kelinci yang mengandung IgG anti-NS1 diperoleh dengan cara mengimunitasi kelinci dengan protein GST-NS1 rekombinan. Produksi protein GST-NS1 rekombinan<sup>4</sup> dan penyuntikan protein tersebut pada kelinci dilakukan pada tahap awal rangkaian penelitian ini. Secara singkat prosesnya adalah, dilakukan *reverse genetic* gen NS1 yang diperoleh dari DENV-2 strain DS-3106 koleksi Departemen Mikrobiologi FKUI yang berasal dari pasien DBD di Jakarta tahun 2006. Setelah itu, cDNA hasil *reverse genetic* diinsersikan pada plasmid pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Plasmid yang mengandung fusi GST-NS1 (pGEXD<sub>2</sub>NS1.12) ditransformasi ke *E. coli* strain BL21. Bakteri *E. coli* digunakan untuk memproduksi protein GST-NS1. Protein NS1 yang dihasilkan adalah protein NS1 utuh yang masih menyatu dengan protein GST (GST-NS1). Purifikasi protein GST-NS1 dilakukan menggunakan *Bulk GST Purification Modules* (GE Healthcare). Protein GST-NS1 kemudian disuntikkan pada kelinci jenis *New Zealand White* betina usia sekitar 4 bulan dengan berat 2,5 kg. Setelah itu serum kelinci diambil dan disimpan pada suhu -80° C.

#### **Pemeriksaan serum kelinci dengan metode *indirect* ELISA**

Untuk menentukan apakah terbentuk antibodi anti-NS1 dan pada tingkat pengenceran berapa antibodi tersebut dapat mendeteksi protein NS1, maka serum kelinci diperiksa menggunakan metode *indirect* ELISA.

Metode pemeriksaan *indirect* ELISA dilakukan seperti dijelaskan pada penelitian sebelumnya.<sup>5</sup> Sumur ELISA (Disposable Products Pty. Ltd, South Australia) dilapisi dengan 100 µl NS1 (2,3 µg/µl) 1:25 dalam *coating buffer* selama semalam pada suhu 4°C. Kemudian sumur diinkubasi dengan 300 µl *blocking buffer* yaitu 5% *skim milk* (Tropicana Slim, PT. Nutrifood Indonesia, Jakarta) dalam PBS pH 7,3 selama 1 jam pada suhu ruang. Sumur dicuci dengan 300 µl *washing buffer* (PBS/Tween 20) sebanyak 3 kali, kemudian diinkubasi dengan serum kelinci dengan pengenceran 1:50 selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah dicuci dengan *washing buffer*,

sumur diinkubasi dengan *goat antirabbit* IgG HRP (Sigma Aldrich, Missouri) dengan pengenceran 1:5000 dalam *skim milk* 1% selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah dicuci ditambahkan 100 µl substrat TMB peroksidase (Kirkegaard & Perry Laboratories, Maryland) dan dibiarkan 10 menit pada suhu ruang. Kemudian reaksi dihentikan dengan penambahan 100 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N. Nilai absorbansi diukur dengan ELISA reader (Bio-Rad Model 550, California) pada panjang gelombang 450 nm. Sebagai kontrol negatif digunakan serum kelinci preimunitasi dan sumur yang tidak dilapisi antigen.

Pemeriksaan *indirect* ELISA juga dilakukan pada serum kelinci yang diencerkan secara serial. Pada sumur ELISA dilapiskan protein NS1 rekombinan 1:25. Antibodi I adalah serum kelinci dengan pengenceran 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400; 1:12800. Antibodi II digunakan *goat antirabbit* IgG HRP. Sebagai kontrol negatif adalah antibodi I menggunakan serum kelinci preimunitasi.

#### **Purifikasi antibodi IgG dari serum kelinci**

Untuk memurnikan IgG dari serum kelinci, digunakan kolom kromatografi sephadex G-200 (Pharmacia, Swedia). Hasil fraksinasi sephadex di uji dengan *indirect* ELISA untuk menentukan fraksi mana yang mengandung antibodi anti-NS1. Protein yang dilapiskan adalah NS1 dalam *coating buffer* (1:25). Antibodi I adalah hasil fraksinasi dengan pengenceran 1:25 dalam *skim milk* 1%. Antibodi II adalah *goat antirabbit* IgG HRP (Sigma Aldrich, Missouri) dengan pengenceran 1:5000 dalam *skim milk* 1%. Sebagai kontrol negatif digunakan serum kelinci preimunitasi dan sebagai kontrol positif digunakan serum kelinci positif IgG anti-NS1.

#### **Pelabelan antibodi IgG kelinci dengan HRP**

Konjugasi IgG dengan HRP dilakukan dengan metode periodat dengan beberapa modifikasi.<sup>6</sup> Pertama-tama, dilakukan aktivasi HRP dengan cara melarutkan 2 mg HRP (Sigma Aldrich, Missouri) dalam 0,5 ml DDW, lalu ditambahkan 0,2 ml NaIO<sub>4</sub> 0,1 M yang baru dibuat. Campuran kemudian diinkubasi dalam suhu ruang selama 2 jam sampai warna berubah menjadi hijau, lalu dididalsis dalam 100 volume lebih natrium asetat buffer 1 mM (pH 4,4) pada suhu 4°C selama semalam menggunakan membran dialisis (Spectrapor, Fischer Scientific Co., Pittsburgh). Secara bersamaan, 1 ml serum

kelinci hasil purifikasi didialisis dalam 100 volume lebih natrium carbonat buffer 10 mM (pH 9,5) pada suhu 4°C selama semalam.

Konjugasi HRP dengan IgG dilakukan dengan cara mencampurkan HRP yang sudah didialisis dan ditambahkan 10 µl natrium carbonat buffer 0,2 M pH 9,5 dengan IgG yang sudah didialisis. Hasil campuran kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah dibungkus dengan *aluminium foil*, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam. Campuran kemudian ditambahkan dengan 100 µl NaBH<sub>4</sub> yang baru dibuat lalu didialisis dalam 100 volume lebih PBS pada suhu 4°C selama semalam. Untuk menghilangkan HRP yang tidak terkonjugasi dilakukan presipitasi dengan ammonium sulfat.

#### Dot blot IgG kelinci label HRP

Tujuan pemeriksaan dot blot adalah untuk mengetahui apakah IgG label HRP dapat mendeteksi protein NS1 yang direkatkan pada membran nitroselulose.

Dot blot mengikuti metode yang telah dijelaskan sebelumnya, dengan beberapa modifikasi.<sup>7</sup> Sebanyak 1 µl (2,3µg) protein NS1 direkatkan ke membran nitroselulose (Hybond-C Extra, Amersham Bioscience, UK). Membran kemudian diinkubasi dengan *blocking buffer* yaitu 5% *skim milk* dalam PBS pH 7,3 selama semalam pada suhu 4°C. Setelah proses *blocking* selesai, membran dicuci menggunakan dapar pencuci (0,01% tween-20 dalam PBS) dilanjutkan dengan menginkubasi membran dengan antibodi berlabel HRP dengan pengenceran 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400; 1:12800. Inkubasi berlangsung selama 1 jam pada suhu ruang. Membran dicuci dengan PBS/Tween.

Setelah selesai pencucian, membran diinkubasi dengan substrat DAB yakni 3 mg

diaminobenzidine dalam 5 mL PBS dan 5 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Sigma Aldrich, Missouri) selama 5 menit pada kondisi gelap. Reaksi dihentikan dengan menambahkan akuades. Kontrol negatif adalah membran nitroselulose yang tidak dilapisi dengan protein NS1.

#### Direct ELISA IgG kelinci label HRP

Tujuan pemeriksaan *direct* ELISA adalah untuk mengetahui apakah IgG label HRP dapat mendeteksi protein NS1 yang dilapiskan pada sumur ELISA.

Prosedur pemeriksaannya hampir sama dengan *indirect* ELISA yang telah dijelaskan sebelumnya, tetapi pada *direct* ELISA hanya digunakan satu antibodi, yaitu antibodi anti-NS1 yang telah dilabel HRP dengan pengenceran 1:100; 1:200; 1:400; 1:800; 1:1600; 1:3200; 1:6400; 1:12800. Kontrol negatif adalah sumur yang tidak dilapisi dengan protein NS1.

#### Hasil

Pada pemeriksaan serum kelinci dengan *indirect* ELISA ditemukan bahwa absorbansi pada serum kelinci pasca imunisasi adalah 2,201 ± 0,046. Sedangkan absorbansi serum kelinci preimunisasi adalah 0,106 ± 0,001. Dari hasil ini terlihat bahwa nilai absorbansi pada serum kelinci yang telah diimunisasi lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif. Hal ini bermakna bahwa terdapat antibodi anti-NS1 dalam serum kelinci yang diperiksa.

Pemeriksaan serum kelinci yang telah diencerkan secara serial dengan *indirect* ELISA menunjukkan hasil positif pada semua tingkat pengenceran (Tabel 1). Hal ini berarti bahwa, pada tingkat pengenceran tertinggi yaitu 1:12800, IgG anti-NS1 masih dapat mendeteksi protein NS1 di sumur ELISA.

**Tabel 1. Pemeriksaan Serum Kelinci dengan *Indirect* ELISA**

Serum kelinci	Pengenceran	OD <sub>450 nm</sub>
SK*	1:100	1,856 ± 0,115
	1:200	1,451 ± 0,046
	1:400	0,890 ± 0,068
	1:800	0,777 ± 0,055
	1:1600	0,542 ± 0,013
	1:3200	0,364 ± 0,009
	1:6400	0,244 ± 0,131
	1:12800	0,216 ± 0,020
SK[-] †	1:100	0,092 ± 0,001

Ket: \* SK: serum kelinci

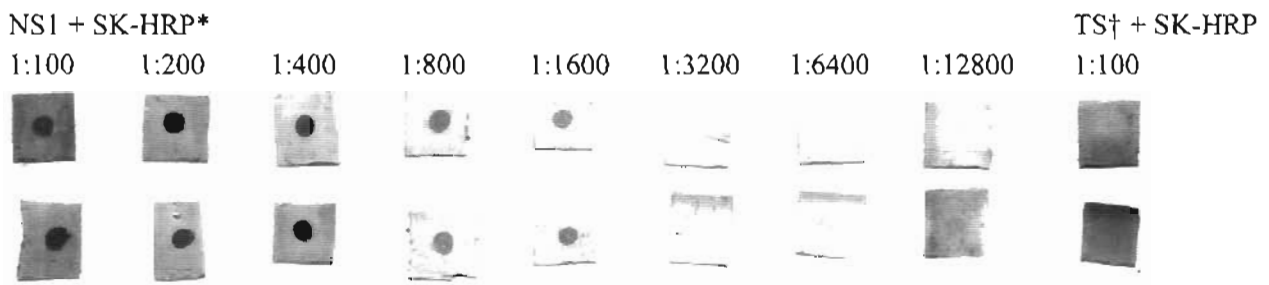
† SK[-]: serum kelinci preimunisasi, sebagai kontrol negatif

**Tabel 2. Pemeriksaan ELISA terhadap Hasil Purifikasi Sephadex G-200**

Serum Kelinci	OD <sub>450 nm</sub>
S01	0,076 ± 0,008
S02	0,102 ± 0,008
S03	0,498 ± 0,046
S04	0,786 ± 0,023
B01	0,812 ± 0,100
B02	0,925 ± 0,069
B03	0,969 ± 0,077
B04	0,968 ± 0,030
B <sub>AKHIR</sub>	0,889 ± 0,014
SK [+]*	1,109 ± 0,050
SK [-]†	0,122 ± 0,003

Ket: \* SK[+]: serum kelinci positif antibodi anti-NS1, sebagai kontrol positif

† SK[-]: serum kelinci preimunisasi, sebagai kontrol negatif



**Gambar 1. Pemeriksaan SK-HRP dengan Metode Dot Blot**

Ket: \* SK-HRP: serum kelinci berlabel HRP;

† TS: tanpa serum kelinci, sebagai kontrol negatif

**Tabel 3. Pemeriksaan SK-HRP dengan *direct* ELISA**

Serum kelinci	Pengenceran	OD <sub>450 nm</sub>
SK-HRP*	1:100	0,615 ± 0,035
	1:200	0,410 ± 0,016
	1:400	0,279 ± 0,030
	1:800	0,166 ± 0,009
	1:1600	0,198 ± 0,021
	1:3200	0,101 ± 0,011
	1:6400	0,090 ± 0,016
	1:12800	0,085 ± 0,008
SK[-] †	1:100	0,453 ± 0,013

Ket: \* SK-HRP: serum kelinci yang telah dilabel dengan HRP

† SK[-]: serum kelinci preimunisasi, sebagai kontrol negatif

Pemeriksaan hasil purifikasi dengan *indirect* ELISA memperlihatkan nilai absorbansi di atas kontrol negatif berada pada fraksi S03, S04, B01, B02, B03, B04, dan B<sub>AKHIR</sub> (Tabel 2).

Dengan pertimbangan terbatasnya kapasitas membran dialisis, maka hanya fraksi B01, B02, B03, B04 yang akan dilakukan pelabelan lebih lanjut. Gabungan dari keempat fraksi ini diberi

kode B<sub>GAB</sub>. Pelabelan dengan HRP dilakukan terhadap B<sub>GAB</sub> dan hasilnya diberi kode SK-HRP.

Pemeriksaan hasil pelabelan dengan metode dot blot memberikan hasil positif pada tingkat pengenceran sampai 1:1600 (Gambar 1). Hal ini berarti, IgG label HRP yang dikembangkan dapat mendeteksi protein NS1 yang direkatkan di membran, walaupun pada tingkat pengenceran yang tidak terlalu tinggi.

Pemeriksaan hasil pelabelan dengan metode *direct* ELISA memberikan hasil yang tidak dapat diinterpretasi. Hal ini terjadi karena kontrol negatif memiliki nilai absorbansi yang tinggi (Tabel 3).

## Diskusi

Protein yang digunakan pada penelitian ini adalah protein yang diperoleh dari ekspresi gen NS1 DENV-2 DS-3106 strain lokal (GenBank Accession Number: AB189124.1). Penggunaan gen strain lokal diduga mampu menghasilkan antibodi yang dapat mendeteksi protein NS1 dengan lebih baik. Tetapi, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikannya.

Ada beberapa keterbatasan dari penelitian ini. Antigen yang diimunisasikan pada kelinci dalam bentuk GST-NS1, karena pada saat imunisasi protein ini belum berhasil dipisahkan. Oleh karena itu, antibodi yang diinduksi juga terhadap GST dan NS1. Adanya antibodi anti-GST dalam serum kelinci mungkin dapat mempengaruhi kemampuan deteksi antibodi label HRP terhadap NS1 dalam serum pasien. GST (Glutathione S-Transferase) merupakan protein dengan berat molekul kurang lebih 26 kDa, yang berasal dari cacing *Schistosoma japonicum*.<sup>8</sup>

Protein GST-NS1 merupakan hasil ekspresi pada *E. coli*. Karena ekspresi pada sel prokariot, maka tidak terjadi modifikasi pasca translasi yang penting untuk pembentukan epitop konformasional. Walaupun demikian, selain epitop konformasional, NS1 mempunyai beberapa epitop linear. Chunya Puttikhunt dkk menemukan 3 epitop (NS1-1F, NS1-3F and NS1-4) linear protein NS1.<sup>9</sup> Sedangkan Falconar dkk mengidentifikasi 4 epitop linear protein NS1 (LD2, 24A, LX1 and 24C) dan Young dkk<sup>10</sup> mengidentifikasi 6 epitope linear protein NS1 (1H7.4; 2C9.4; 5H4.4; 4H3.4; 3D1.4; 3A5.4U).

Agar protein mengalami modifikasi pasca translasi, penggunaan *E. coli* dapat diganti dengan sel eukariot seperti *Pichia pastoris*.<sup>11</sup>

Dari pemeriksaan dot blot, diketahui bahwa proses pelabelan antibodi IgG kelinci dengan HRP berhasil dilakukan (Gambar 1). Walaupun demikian, kemampuan deteksinya masih belum baik dan perlu ditingkatkan. Selain itu, jika IgG label HRP digunakan untuk mendeteksi protein NS1 menggunakan ELISA, kontrol negatif menghasilkan absorbansi yang tinggi (Tabel 3). Akibatnya, hasil pemeriksaan tidak dapat diinterpretasi. Untuk mengatasi hal tersebut, maka perlu dilakukan modifikasi protokol pelabelan yang digunakan. Disamping itu, sebaiknya protein NS1 yang dipakai adalah protein NS1 murni yang tidak lagi bersatu dengan GST. Protein NS1 juga sebaiknya adalah protein yang diperoleh dari ekspresi pada sel eukariot. Teknik purifikasi yang digunakan sebaiknya adalah teknik terbaru yang lebih baik misalnya teknik kromatografi pertukaran ion<sup>12</sup> atau kromatografi afinitas<sup>13</sup>.

Penelitian lain, dengan teknik yang relatif berbeda, telah berhasil melabel IgG kelinci dengan HRP. Majidi dkk<sup>14</sup> berhasil melabel antibodi IgG kelinci dengan HRP. Saat digunakan untuk pemeriksaan *direct* ELISA, IgG label HRP dapat mendeteksi immunoglobulin *bovine* (10 µg/100 µl) pada pengenceran 1:12800. Perbedaan yang cukup prinsip penelitian tersebut dengan penelitian kami adalah teknik purifikasi antibodi, yaitu menggunakan kromatografi pertukaran ion.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan, pelabelan telah berhasil dilakukan, tetapi perlu optimasi lanjut agar hasil pelabelan dapat digunakan pada pemeriksaan ELISA. Optimasi juga diperlukan untuk meningkatkan kemampuan deteksi hasil label pada pemeriksaan dot blot.

## Ucapan Terima Kasih

Saya mengucapkan terima kasih kepada Kepala Badan Litbang Kesehatan, DR. dr. Trihono, karena telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pelatihan penulisan artikel ilmiah. Saya juga mengucapkan terima kasih kepada para fasilitator pelatihan yaitu Bapak Prof. Bastaman Basuki, Dr. Muchtaruddin, MS, PhD, Sp.Ok, dan Dr. Herqutanto, MPH, MARS; juga kepada seluruh pihak yang turut membantu penelitian dan penulisan artikel ini.

---

## Daftar Pustaka

1. Kumarasamy V, Wahab AH, Chua SK, Hassan Z, Chem YK, et al. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *J Virol Methods*. 2007 Mar;140(1-2):75-9.
2. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol*. 2002 Feb;40(2):376-81.
3. Chaiyaratana W, Chuansumrit A, Pongthapisith V, Tangnaratchakit K, Lertwongrath S, et al. Evaluation of dengue nonstructural protein 1 antigen strip for the rapid diagnosis of patients with dengue infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 May;64(1):83-4.
4. Fithriyah, Sudiro TM, Dewi BE, Rukmana A, Cucanawangsih. Produksi protein non struktural 1 virus dengue serotipe 2 strain Indonesia sebagai reagen diagnosis infeksi dengue [Tesis]. Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2008.
5. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol*. 2002 Feb;40(2):376-81.
6. Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody: a new method of conjugation. *J Histochem Cytochem*. 1974;22:1084-91.
7. Cardoso MJ, Tio PH. Dot enzyme immunoassay: an alternative diagnostic aid for dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Bulletin of the World Health Organization*. 1991;60(6):741-5.
8. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, et al (Eds). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley – Interscience. 1990.
9. Puttikhunt C, Kasinrerak W, Srisa-ad S, Duangchinda T, Silakate W, et al. Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization. *J Virol Methods*. 2003 Apr;109(1):55-61.
10. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar;38(3):1053-7.
11. Zhou JM, Tang YX, Fang DY, Zhou JJ, Liang Y, Guo HY, Jiang LF. Secreted expression and purification of dengue 2 virus full-length nonstructural glycoprotein NS1 in *Pichia pastoris*. *Virus Genes [Abstracts]*. 2006 Aug;33(1):27-32.
12. Grodzki AC, Berenstein E. Antibody purification: ion-exchange chromatography [Abstract]. *Methods Mol Biol*. 2010;588:27-32.
13. Grodzki AC, Berenstein E. Antibody purification: affinity chromatography - protein A and protein G Sepharose [Abstract]. *Methods Mol Biol*. 2010;588:33-41.
14. Majidi J, Abdolalizadeh J, Amirkhiz M, Majidi S. Production and purification of polyclonal antibody against bovine immunoglobulins in rabbits. *Afr J Biotechnol*. 2007 Jun 18; 6 (12): 1369-72.