

AKTIVITAS ANTIRADIKAL BEBAS SENYAWA β -KAROTEN PADA ALGA MERAH

RADICAL SCAVENGING ACTIVITY β -CAROTENE COMPOUNDS IN RED ALGAE

Anindita Tri Kusuma Pratita¹, Denis Pajriati¹, Gatut Ari Wardani¹, Mochamad Fathurohman^{1*}

¹ Departemen Kimia Farmasi, Program Studi S1 Farmasi, Universitas Bakti Tunas Husada
Jl. Cilolohan No 36 Kota Tasikmalaya 46115
E-mail korespondensi: mochamadfathurr@gmail.com

ABSTRACT

Red microalgae contain phenolic compounds, carotenoids, phycobiliproteins, and chlorophyll which can donate hydrogen atoms to free radicals. The red color in algae is produced by carotenoid pigments, one of which is β -carotene. This study aimed to determine the free radical activity of β -carotene compounds in red microalgae. β -carotene was extracted by maceration, then qualitative analysis was carried out using TLC and FTIR, and the anti-free radical activity was tested using DPPH. TLC results showed that β -carotene compounds eluted using acetone and ethyl acetate (3:7) had an Rf value of 0.8 and on FTIR showed that β -carotene compounds had hydroxyl, carbonyl, alkane, alcohol, and aromatic groups. The free antiradical activity of β -carotene compounds has an IC₅₀ value of 267.375 ppm, categorized as weak.

Keywords: Red microalgae, antiradical activity, β -carotene

Diterima : 18 Maret 2023

Direview : 27 Maret 2023

Diterbitkan : Agustus 2023

ABSTRAK

Mikroalga merah mengandung senyawa fenolat, karotenoid, fikobiliprotein, dan klorofil yang mampu mendonorkan atom hidrogennya pada radikal bebas. Warna merah pada alga dihasilkan oleh pigmen karotenoid dengan salah satu turunannya adalah β -karoten. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui aktivitas antiradikal bebas dari senyawa β -karoten yang terkandung dalam mikroalga merah. β -karoten diekstraksi dengan cara maserasi kemudian dilakukan analisis kualitatif dengan menggunakan KLT dan FTIR, pengujian aktivitas antiradikal bebas dilakukan dengan pengujian dengan menggunakan DPPH. Hasil KLT menunjukkan senyawa β -karoten yang dielusi dengan menggunakan pelarut aseton dan etil asetat (3:7) memiliki nilai Rf 0,8 dan pada FTIR menunjukkan senyawa β -karoten memiliki gugus hidroksil, karbonil, alkana, alkohol, dan aromatik. Aktivitas antiradikal bebas pada senyawa β -karoten memiliki nilai IC₅₀ sebesar 267,375 ppm yang dikategorikan lemah.

Kata kunci: Mikroalga merah, aktivitas antiradikal, β -karoten

PENDAHULUAN / INTRODUCING

Indonesia memiliki wilayah laut yang sangat luas dan didukung oleh iklim tropis, menjadikan perairan Indonesia sangat kaya akan sumber daya laut. Di perairan laut dikenal dengan berbagai warna yang sangat indah. Warna yang indah tercipta dari pigmen yang terkandung dalam

mikroorganisme. Salah satu pigmen sumber daya laut yang paling umum digunakan adalah mycoalgae (Balira et al., 2017). Mikroalga merupakan mikroorganisme akuatik yang mampu melakukan fotosintesis untuk menghasilkan bahan organik uniseluler dan tumbuh secara autotrof menggunakan karbondioksida sebagai

sumber karbon dan cahaya untuk fotosintesis (Imelda et al., 2018; Oktora et al., 2016). Mikroalga memiliki potensi besar untuk dikembangkan sebagai makanan dan sumber makanan yang digunakan sebagai bahan obat-obatan, perikanan, makanan dan banyak bahan lainnya (Imelda et al., 2018).

Mikroalga yang berperan sebagai antioksidan menggunakan metode DPPH untuk senyawa fenolik dengan golongan 362 ppm yaitu mikroalga *Porphyridium cruentum* (Juliana et al., 2020). *Porphyridium cruentum* adalah mikroalga merah (Rhodophyta) yang berasal dari phycoerythrin dan karotenoid, termasuk β -karoten. Berdasarkan penelitian (Fuentes et al., 2000) mikroalga *Porphyridium cruentum* dilaporkan mengandung senyawa β -karoten sekitar 102 mg/100 gram berat kering biomassa. Mikroalga dapat menjadi antioksidan alami yang kuat karena mengandung senyawa fenolik, karotenoid, fikobiliprotein dan klorofil yang dapat mendonorkan atom hidrogennya ke radikal bebas (Ridlo et al., 2015). Karotenoid merupakan kelompok pigmen alami dan antioksidan yang dapat mereduksi radikal bebas yang menghasilkan warna kuning, jingga, dan merah pada tanaman. Kelompok pigmen ini terdapat pada beberapa tumbuhan tingkat tinggi seperti alga, jamur, bakteri, fotosintetik dengan klorofil dan jaringan non-fotosintetik. Beberapa karotenoid telah dipelajari secara ekstensif, salah satunya adalah β -karoten. β -Karoten

adalah pigmen jingga, kuning atau jingga-merah yang dapat terjadi secara alami pada tumbuhan fotosintesis, ganggang, dan berbagai jamur dan bakteri. Fungsi β -karoten adalah untuk membersihkan tubuh dari racun. (Kuzbandari, 2017). Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi senyawa β -karoten yang terkandung dalam mikroalga *Porphyridium cruentum* dan menentukan aktivitas anti radikalnya menggunakan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

METODE PENELITIAN / *METHOD*

Ekstraksi B-karoten

Ekstraksi β -karoten menggunakan metode maserasi. Biomassa basah yang sudah ditimbang ditambahkan aseton p.a sampai terendam. Proses maserasi tersebut dilakukan selama 3 jam sampai terjadi perubahan warna pelarut (Hapsari et al., 2012).

Pengujian menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak β -karoten dipantau dengan metode kromatografi lapis tipis untuk mengidentifikasi β -karoten dalam sampel. Plat di inaktivasi terlebih dahulu dengan oven pada suhu 105°C selama 30 menit. Jenuhkan chamber dengan pelarut hingga jenuh. Digunakan Fase diam yaitu plat aluminium silika gel 60 F254. Fase gerak campuran aseton p.a : etil asetat p.a (3:7) lalu ekstrak ditotolkan pada plat menggunakan pipa kapiler. plat disinari dengan lampu UV

254 dan 366 nm dan disemprot dengan penampak bercak Lieberman burchad untuk memvisualisasikan noda dan menentukan nilai Rf-nya (Bonilla-ahumada et al., 2018)..

Analisis gugus fungsi menggunakan FTIR

Isolat diidentifikasi menggunakan FTIR untuk melihat gugus fungsi yang terkandung dalam β -karoten. Analisis ini menggunakan blanko udara dan sampel sebanyak 1 gram. Kemudian blanko dan sampel diletakkan pada cyristal secara bergantian. Lalu diukur dengan serapan sinar infra merah pada upanjang gelombang 4000-400 cm^{-1} sehingga diperoleh

gelombang sampel (Rusmawanto *et al.*, 2019).

Pengujian Aktivitas Antiradikal Bebas

Pengukuran larutan stok DPPH dengan spektrofotometri dan didapat Panjang gelombang maksimum 516 nm. Sampel ditambahkan larutan DPPH dan dilakukan *operating time* selama 30 menit. Larutan sampel β -karoten dibuat konsentrasi 31,25; 62,5; 125; 250 dan 500 ppm dan diukur pada panjang gelombang maksimum β -karoten 417 nm. Aktivitas penangkal radikal bebas dapat dilihat dari persen inhibisi yang dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs Kontrol (DPPH)} - \text{Abs DPPH} + \text{Betakaroten}}{\text{Abs Kontrol (DPPH)}} \times 100\%$$

IC_{50} diperoleh dari persamaan regresi linier antara % inhibisi terhadap konsentrasi larutan sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN / RESULTS AND DISCUSSION

Ekstraksi senyawa β -karoten

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi, ekstraksi ini dipilih karena senyawa β -karoten tidak tahan terhadap panas. Metode maserasi merupakan metode ekstraksi dengan proses perendaman bahan dengan pelarut yang sesuai serta senyawa aktif yang akan diambil dengan pemanasan rendah atau tanpa adanya proses pemanasan (Chairunnisa *et al.*, 2019). Senyawa β -karoten ini merupakan senyawa kimia yang

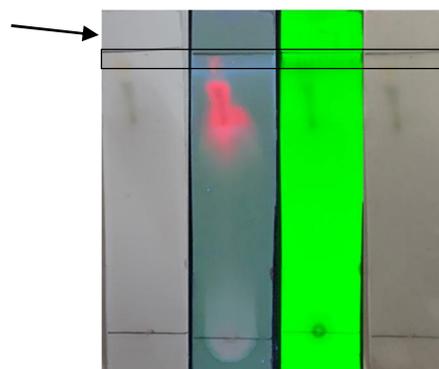
memiliki sifat lipofilik artinya tidak larut dalam air tetapi larut dalam pelarut organik seperti aseton yang mempunyai konstanta dielektrik 21, kloroform, dan n-heksan. β -karoten memiliki sifat kimia mudah rusak. Hal ini dipengaruhi oleh struktur rantai kimia β -karoten yang tidak stabil pada suhu 60°C (Oktora *et al.*, 2016).

Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi ini yaitu pelarut aseton p.a. Setelah penelusuran pustaka, β -karoten larut dalam pelarut aseton yang memiliki konstanta dielektrik 21 lebih besar dari pada

kloroform dan n-heksan, sehingga untuk menarik senyawa β -karoten lebih besar. Salah satu ciri dari pelarut aseton adalah mudah menguap (*volatil*), mudah terbakar dan tidak berwarna (bening). Senyawa ini juga memiliki bau seperti daun mint dan memiliki rasa pedas. Sifat kepolaran aseton dapat dipakai dalam pelarut senyawa polar dan non polar (Noviantari *et al.*, 2017). Sehingga pelarut aseton dapat menarik senyawa β -karoten yang bersifat nonpolar. Dalam penelitian ini metode maserasi dilakukan selama 3 jam dengan menggunakan pelarut aseton p.a sampai terendam, diperoleh ekstrak berwarna hijau. Setelah dilakukannya proses ekstraksi, kemudian diperoleh randemen ekstrak. Randemen ekstrak ini berfungsi untuk mengetahui efektivitas dari pelarut yang digunakan dalam mengekstraksi senyawa β -karoten. Nilai randemen ekstrak β -karoten yang didapatkan yaitu sebanyak 66% (b/b),

Nilai Rf Ekstrak dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak dilakukan pemantauan dengan KLT yang bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya senyawa β -karoten pada mikroalga *Porphyridium cruentum*. Hasil pemantauan KLT ekstrak dapat dilihat pada gambar 4.1.

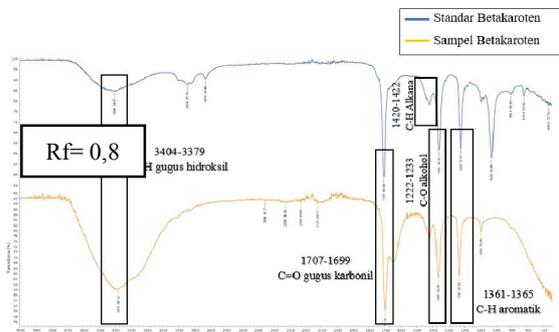


Gambar 1 Hasil Pemantauan Ekstrak Menggunakan KLT

Keterangan: A. Sinar tampak, B. sinar UV 254 nm, C. sinar UV 366 nm, D. disemprot penampak bercak Lieberman burchad

Ekstrak β -karoten dari mikroalga *Porphyridium cruentum* di uji kualitatif menggunakan KLT. Digunakan fase diam yang n yaitu silika gel GF₂₅₄ serta fase gerak yang digunakan yaitu aseton p.a dan etil asetat p.a (3:7). Pemantauan ekstrak dengan beberapa kali percobaan eluen, berdasarkan konstanta dielektrik hasil elusi terbaik diperoleh pada eluen aseton dan etil asetat (3:7) dengan konstanta dielektrik 21 dan 6,32. Berdasarkan pemantauan ekstrak dengan metode KLT dapat dilihat terdapat spot berwarna kuning pada sinar tampak dan pada sinar UV 366 warna merah, kemudian disemprot dengan Lieberman burchad menandakan warna kuning yang jelas dengan Rf 0,8 yang diduga merupakan senyawa β -karoten (Maryam & Musthainah, 2020). Berdasarkan penelitian Aryandani, (2010) senyawa β -karoten dari mikroalga *Chaetoceros gracilis* menghasilkan nilai Rf 0,8.

Gugus Fungsi Senyawa β -karoten Menggunakan FTIR



Gambar 2. Spektrum Inframerah Senyawa β -karoten

Berdasarkan hasil interpretasi spektrum inframerah dari senyawa β -karoten menunjukkan adanya beberapa gugus fungsi pada puncak kisaran 4000-600 cm^{-1} . Jika diamati dari bilangan gelombang serapan yang diperoleh, sampel β -karoten hampir mirip dengan standar β -karoten. Pada bilangan gelombang standar dan sampel β -karoten berada pada puncak kisaran 3404 dan 3379 cm^{-1} menunjukkan adanya uluran O-H dari gugus hidroksil. Bilangan gelombang pada puncak kisaran 1707 dan 1699 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi uluran C=O dari dari gugus karbonil. Pada bilangan gelombang 1222 dan 1233 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi uluran C-O dari alkohol sekunder. Pucak pada kisaran 1420 cm^{-1} dan 1422 cm^{-1} berada pada daerah *fingerprint* yang menunjukkan adanya ikatan C-H dari alkana yang merupakan ciri khas dari β -karoten. Hal ini tidak sesuai dengan serapan khas yang ada pada kisaran 1429 cm^{-1} . Hal ini disebut dengan

batokromik yang merupakan adanya pergeseran pada bilangan gelombang kearah yang lebih tinggi (Loukopoulos *et al.*, 2021). Bilangan gelombang 1361 dan 1365 cm^{-1} menunjukkan adanya uluran C-H asimetris dari aromatik CH_3 . Berdasarkan penelitian Rusmawanto *et al.*, (2019) pada senyawa β -karoten dari mikroalga *Dunaliella salina* berada pada puncak kisaran 1059 cm^{-1} yang menunjukkan adanya ikatan C-O dari alkohol dan asam karboksilat.

Aktivitas Antiradikal Bebas

Pengujian aktivitas anti radikal bebas menggunakan metode penangkap radikal bebas DPPH (2,2-diphenyl-1-picrihydrazyl) dengan spektrofotometri UV-Vis. Salah satu cara untuk menguji aktivitas radikal bebas suatu senyawa adalah dengan mereaksikannya secara spektrofotometri dengan DPPH. Reaksi anti radikal dengan DPPH, menunjukkan adanya atom hidrogen dari senyawa anti radikal

dengan mengikat elektron bebas dalam senyawa radikal, menghasilkan konversi radikal bebas (diphenylpicrylhydrazyl) menjadi senyawa non-radikal (diphenylpicrylhydrazine). Hal ini dikenal dengan perubahan warna dari sebelumnya ungu menjadi kuning (senyawa radikal bebas direduksi oleh anti radikal bebas) (Molyneux, 2004). Mekanisme β -karoten sebagai antiradikal bebas adalah melindungi membran sel dan mempertahankan keutuhan membran sel melalui radikal bebas, sehingga

peroksidasi lipid pada membran sel dapat dicegah (Yuhernita & Juniarti, 2012). DPPH sering digunakan untuk menguji kemampuan senyawa untuk bertindak sebagai donor elektron atau hidrogen. Metode ini dipilih karena cukup sederhana, fleksibel, cepat, sensitif dan hanya membutuhkan sedikit sampel. Untuk menguji aktivitas anti radikal bebas, terlebih dahulu harus disiapkan larutan DPPH, sampel β -karoten dan vitamin C. Sebelum pengujian sampel, terlebih dahulu ditentukan panjang gelombang maksimum DPPH dan sampel. Tujuan pengukuran panjang gelombang maksimum adalah untuk mengetahui pada panjang gelombang mana DPPH dan sampel dapat menawarkan penyerapan terbesar. Berdasarkan hasil pengujian panjang gelombang maksimum DPPH yaitu 516 nm ditunjukkan pada Gambar 4.3. Hal ini sesuai dengan penelitian Juliana et al. (2020) dengan panjang gelombang maksimum DPPH adalah 516 nm. Untuk mendapatkan waktu pengukuran yang stabil, waktu operasi harus ditentukan. Waktu tindakan ditentukan dengan mengukur rasio antara waktu pengukuran dan absorpsi. Waktu pengoperasian yang dihasilkan adalah 2 menit selama 30 menit yang dapat dilihat pada gambar 4.4. Hal ini sesuai dengan penelitian Kusbandar (2017) bahwa waktu inkubasi 30 menit merupakan ukuran inkubasi yang paling stabil.

Berdasarkan hasil pengujian, panjang gelombang maksimum senyawa β -karoten

yang diperoleh yaitu 417 nm dapat dilihat pada gambar 4.5. Menurut penelitian Novianti, (2019) senyawa β -karoten dari mikroalga *Chlorella Vulgaris* diperoleh panjang gelombang maksimum yaitu 430 nm.

Berdasarkan hasil pengujian antiradikal bebas nilai absorbansi yang diperoleh dihitung nilai presentase penghambatan nilai DPPH (%inhibisi). Konsentrasi berbanding lurus dengan persen inhibisi, semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi persen inhibisinya. Konsentrasi bertolak belakang dengan absorbansi, semakin tinggi konsentrasi maka semakin kecil nilai absorbansinya. Kemudian diperoleh persamaan regresi linier dengan konsentrasi sebagai sumbu x dan persen inhibisi sebagai sumbu y. Nilai IC_{50} dapat dihitung dari persamaan regresi linier. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa nilai IC_{50} dari ekstrak β -karoten yaitu 267,375 ppm. Sedangkan hasil pengujian dari vitamin C memiliki aktivitas antiradikal bebas dengan nilai IC_{50} sebesar 2,200 ppm. Berdasarkan hasil tersebut sampel β -karoten dikatakan lemah karena berada pada rentang >150 ppm. Berdasarkan penelitian Agustina et al., (2018) aktivitas antiradikal bebas senyawa β -karoten dari mikroalga *Spirulina sp* menggunakan metode DPPH menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 70,271 ppm dengan kategori kuat. Berdasarkan penelitian Wayan & Agustini, (2017) aktivitas antiradikal bebas senyawa eksopolisakarida

dari mikroalga *Porphyridium cruentum* menggunakan metode DPPH menghasilkan nilai IC₅₀ sebesar 150,586 ppm dengan kategori lemah.

KESIMPULAN DAN SARAN / CONCLUSION

Berdasarkan hasil penelitian diatas dapat diambil kesimpulan yaitu mikroalga merah yaag diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut aseton mengandung senyawa β-karoten ditandai dengan terbentuknya warna kuning pada pengujian KLT dan adanya gugus hidroksil, gugus karbonil dan gugus alkohol sekunder pada pengujian FTIR, selain itu juga memiliki aktivitas antiradikal bebas sebesar IC₅₀ 267,375 ppm yang dikategorikan lemah.

DAFTAR PUSTAKA / REFERENCE

Agustina, S., Aidha, N. N., & Oktarina, E. (2018). Ekstraksi Antioksidan *Spirulina Sp.* Dengan Menggunakan Metode Ultrasonikasi Dan Aplikasinya Untuk Krim Kosmetik. *Jurnal Kimia dan Kemasan.* 40(2), 105–116.

Balaira, G. Y., Kemer, K., & Mantiri, D. M. H. (2017). Pemisahan Pigmen Pada Mikroalga *Dunaliella Salina.* *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis.* 1, 41–49.

Bonilla-Ahumada, F. D. J., Khandual, S., & Lugo-Cervantes, E. C. (2018).

Microencapsulation Of Algal Biomass (*Tetraselmis Chuii*) By Spray-Drying Using Different Encapsulation Materials For Better Preservation Of Beta- Carotene And Antioxidant Compounds. *Algal Research,* 36(April), 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.006>

Chairunnisa, S., Wartini, N. M., & Suhendra, L. (2019). Pengaruh Suhu Dan Waktu Maserasi Terhadap Karakteristik Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus Mauritiana* L.) Sebagai Sumber Saponin. *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri,* 7(4), 551–560. <https://doi.org/10.24843/jrma.2019.v07.i04.p07>.

Fuentes, M. M. R., Fernandes, A. G. G., Perez, S. J. ., & Guerrero, J. L. G. (2000). Biomass Nutrient Profiles Of The Microalga *Porphyridium Cruentum.* 70, 345–353.

Hapsari, D. T., Agustini, T. W., & Cahyono, B. (2012). Analisis Kimia Dan Fisik Komponen β-karoten Dalam Mikroalga *Porphyrodium Cruentum.* In *Bioteknologi Kelautan Dan Perikanan.*

Imelda, S., Claudia, C., Lambui, O., & Suwastika, I. N. (2018). Kultivasi Mikroalga Isolat Lokal Pada Medium Ekstrak Tauge. *Natural Science:*

- Journal of Science and Technology*. 7(2), 148–157.
- Juliana, V., Budiana, W., Farmasi, F., & Bhakti, U. (2020). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Mikroalga *Porphyridium Cruentum* Menggunakan Metode Peredam Radikal Bebas DPPH. *Journal of Pharmacopolium*. 3(3), 157–165.
- Kusbandari, A. H. S. (2017). Kandungan Beta Karoten Dan Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas Terhadap DPPH (1,1-Difenil 2-Pikrilhidrazil) Ekstrak Buah Blewah (*Cucumis Melo* Var. *Cantalupensis* L) Secara Spektrofotometri Uv-Visibel. *Jurnal Farmasi Sains Dan Komunitas*. 14(1), 37–42.
- Loukopoulos, P., Kapama, D., Valasi, L., Pappas, C., Bethanis, K., Tzamalís, P., & Mandala, I. (2021). Thermal And Structural Study Of Drying Method Effect In High Amylose Starch- Beta-Carotene Nanoparticles Prepared With Cold Gelatinization. *Carbohydrate Polymer Technologies And Applications*, 2(February), 10092. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100092>.
- Molyneux, P. (2004). The Use F Stable Free Radical Diphenylpivryl-Hydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarín J. Sci. Technol.*
- Noviantari, N. P., Suhendra, L., & Wartini, N. M. (2017). Pengaruh Ukuran Partikel Bubuk Dan Konsentrasi Pelarut Aseton Terhadap Karakteristik Ekstrak Warna *Sargassum Polycystum*. *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*. 5(3), 102–112.
- Novianti, T. (2019). Kandungan B-karoten Dari Mikroalga *Chlorella Vulgaris* Yang Dikultur Dengan Perlakuan Sumber Cahaya Dan Kepadatan Awal Inokulum (Kai) Yang Berbeda. *Jurnal Biologi And Pendidikan Biologi*, 4(1), 46–61.
- Oktora, A. R., Ruf, W. F. M. ', & Agustini, T. W. (2016). Pengaruh Penggunaan Senyawa Fiksator Terhadap Stabilitas Ekstrak Kasar Pigmen B-Karoten Mikroalga *Dunaliella Salina* Pada Kondisi Suhu Berbeda. *JPHPI*, 19(3). <https://doi.org/10.17844/jphpi.2016.19.3.206>.
- Ridlo, A., Sedjati, S., & Supriyantini, E. (2015). Aktivitas Anti Oksidan Fikosanin Dari *Spirulina Sp* . Menggunakan Metode Transfer Elektron Dengan DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil). *Jurnal Kelautan Tropis September*. 18(September), 58–63.
- Rusmawanto, Prajitno, A., & Yuniarti, A. (2019). Minimum Inhibitory Concentration Of Marine Microalgae *Dunaliella Salina* On Fish Pathogenic

- Bacteria Edwardsiella Tarda. 147–156.
Research Journal of Life Science.
6(2), 72–82. <https://doi.org/10.18502/rls.v3i4.699>
- Wayan, N., & Agustini, S. (2017). Potensi Endo-Exopolysaccharide Dari *Porphyridium Cruentum* (SF GRAY) Nageli Sebagai Antioksidan (Dpph) Dan Toksisitas Biologis (BSLT). Yuhernita, & Juniarti. (2012). Metanol Daun Surian Yang Berpotensi Sebagai Antioksidan. *Makara, Sains*, 15(1), 48–52.