

**UJI AKTIVITAS ANTIINFLAMASI EKSTRAK ETANOL DAUN JERUK
NIPIS (*Citrus aurantiifolia*) PADA MENCIT JANTAN
(*Mus musculus*) YANG DIINDUKSI
KARAGENAN TAHUN 2022**

*Anti-Inflammatory Activity Test of Lime Leaf (Citrus Aurantiifolia)
Ethanol Extract in Male Mice (Mus Musculus)
Induced Carrageenan on 2022*

Novandi Purba¹, Bulan Andriani Harianja², Khairil Akbar³

Fakultas Farmasi Institut Kesehatan Medistra Lubuk Pakam
Jalan Sudirman No. 38 Lubuk Pakam, Kabupaten Deli Serdang,
Sumatera Utara –Indonesia

e-mail : gultomvandi6196090908@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini memiliki tujuan untuk mengetahui adanya pengaruh ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*) sebagai antiinflamasi pada hewan percobaan. Metode yang dapat digunakan adalah udema buatan pada telapak kaki mencit putih jantan dengan diinduksi karagenan 1%. Pengujian aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol daun jeruk nipis menggunakan 25 ekor hewan uji, dengan 5 kelompok perlakuan. Kelompok terdiri atas kontrol positif yang diberikan Na.diklofenak dengan dosis 6,5 mg/kgBB, kontrol negatif yang diberi perlakuan CMC Na 0,5%, dan 3 kelompok ekstrak yang dimana kelompok ekstrak dosis 100 mg/kgBB, kelompok ekstrak dosis 200 mg/kgBB, dan kelompok ekstrak dosis 300 mg/kgBB. Persen radang pada kelima kelompok uji mengalami penurunan secara terus menerus mulai dari menit ke-60 sampai menit ke-360 setelah induksi karagenan. Persen radang terbesar terjadi pada menit ke-120 pada suspensi Na.CMC dan diikuti oleh 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, 300 mg/kgBB dan Na.diklofenak. Nilai persen inhibisi radang terbesar dimiliki oleh kelompok Na.diklofenak dan diikuti oleh 300 mg/kgBB, 200 mg/kgBB dan 100 mg/kgBB. Hal ini berarti, persen hambatan yang baik terdapat pada EEDJN 300 mg/kgBB setelah Na.diklofenak, kemudian diikuti EEDJN 200 dan 100 mg/kgBB dan hal ini menunjukkan bahwa kelompok Na.diklofenak, 100, 200 dan 300 mg/kgBB memiliki potensi sebagai agen antiinflamasi sedangkan kelompok Na.CMC tidak memiliki potensi tersebut.

Kata kunci: Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantiifolia*), Antiinflamasi.

Abstract

The aim of this study was to determine the effect of ethanol extract of lime leaves (*Citrus aurantiifolia*) as an anti-inflammatory in experimental animals. The method that can be used is artificial edema on the soles of male white mice induced by 1% carrageenan. Testing the anti-inflammatory activity of lime leaf ethanol extract using 25 test animals, with 5 treatment groups. The group consisted of a positive control that was given Na.diclofenac at a dose of 6.5 mg/kgBW, a negative control that was treated with 0.5% CMC Na, and 3 extract groups where the extract group was at a dose of 100 mg/kgBW, the extract group at a dose of 200 mg. /kgBW, and the extract group at a dose of 300 mg/kgBW. The percentage of inflammation in the five test groups decreased continuously from the 60th minute to the 360th minute after carrageenan induction. The highest percentage of inflammation occurred at 120 minutes in Na.CMC suspension and followed by 100 mg/kgBW, 200 mg/kgBW, 300 mg/kgBW and Na.diclofenac. The highest percentage value of inflammation inhibition was in the Na.diclofenac group and followed by 300 mg/kgBW, 200 mg/kgBW and 100 mg/kgBW. This means, a good percentage of inhibition is found in EEDJN 300 mg/kgBW after Na.diclofenac, then followed by EEDJN 200 and 100 mg/kgBW and this shows that the Na.diclofenac, 100, 200 and 300 mg/kgBW groups have potential as anti-inflammatory agent while the Na.CMC group did not have that potential.

Keywords: Lime Leaf (*Citrus aurantiifolia*), Anti- inflammatory

1. PENDAHULUAN

Inflamasi merupakan respon sistem kekebalan tubuh terhadap rangsangan yang berbahaya seperti patogen, sel yang rusak, atau senyawa beracun. Tanda-tanda utama peradangan akut ditandai oleh beberapa proses seperti: rubor (kemerahan), calor (panas), tumor (bengkak) dan dolor (nyeri) (Ricciotti et al., 2011).

Pengobatan pada inflamasi dapat dilakukan dengan mengonsumsi obat-obatan seperti obat non steroid atau obat steroid. Obat golongan non steroid menyebabkan banyaknya pasien yang dirawat karena ADR (*Adverse Drug Reactions*) yakni reaksi obat yang tidak diinginkan yang terjadi selama penggunaan klinik, seperti mual, rasa perih di lambung, feses hitam dan meningkatkan tekanan darah (Idacahyati et al., 2019). Obat golongan steroid atau kortikosteroid adalah obat antiinflamasi yang identik dengan

kortisol, hormon steroid alami pada tubuh manusia. Efek samping dari obat golongan ini yaitu seperti osteoporosis, katarak, (Rusmini dan Ma'rifah, 2017). WHO mendefinisikan obat tradisional telah berkembang dari generasi ke generasi sebelum adanya ilmu kedokteran modern (Ningsih, 2016). Salah satu tanaman yang banyak digunakan untuk pengobatan oleh masyarakat adalah tanaman daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Biasanya tanaman jeruk nipis digunakan sebagai penambah nafsu makan, penurun panas (antipireutik), diare, menguruskan badan, antioksidan dan antibakteri.

Daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) diketahui mengandung flavonoid seperti Quersetin serta fenolik yang bersifat sebagai antioksidan. Flavonoid adalah senyawa polifenol yang memiliki khasiat sebagai antioksidan, sebagai sistem pertahanan tubuh (Rezky, 2021).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Manullang, dkk, 2020 mengatakan bahwa hasil uji skrining fitokimia daun jeruk nipis mengandung tanin, saponin dan flavonoid. Senyawa flavonoid memiliki aktivitas antiinflamasi dengan menghambat pelepasan serotonin dan histamin ketempat terjadinya radang serta menghambat sintesis prostaglandin dari asam arakhidonat dengan cara penghambatan kerja siklooksigenase (COX) (Khotimah & Muhtadi, 2016). Berdasarkan penelitian (Ramadhani dan Sumiwi, 2017) senyawa flavonoid memiliki aktivitas antiinflamasi. Kekuatan efek antiinflamasi yang ditunjukkan oleh persentase inhibisi udem.

2. METODE PENELITIAN

Jenis, Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorium. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Institut kesehatan Medistra Lubuk Pakam pada bulan juni-juli 2022.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Plethysmometer, lumpang, spuit injeksi suplantar dan peroral 1 ml dan 3 ml, neraca analitik, Rotari Evaporator, oral sonde, timbangan hewan, waterbath.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Simplisia daun jeruk nipis, karagenan 1%, etanol 96%, natrium diklofenak, Natrium Karboksimetil Selulosa (Na.CMC), larutan natrium klorida 0,9% (NaCl 0,9%), Asam Klorida 2 Normalitas (HCl 2 N), Pereaksi Mayer, Pereaksi Dragendroff (Farnsworth, 1996).

Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit jantan dengan berat badan 20-30 g sebanyak 25 ekor. Jumlah Hewan percobaan yang dibuat dari setiap kelompok perlakuan dihitung menggunakan rumus Federer sebagai berikut:

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan:

n: Jumlah hewan per kelompok

t: Jumlah kelompok = 5 kelompok

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$(n-1)4 \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$4n \geq 19$$

$$n = 4,75 \text{ (dibulatkan menjadi 5)}$$

Berdasarkan perhitungan diatas maka jumlah sampel minimal yang diperlukan sebanyak 5 hewan per kelompok percobaan.

Penyiapan Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun jeruk nipis yang diperoleh dari Desa Tanah Tinggi, Kec. Air Putih, Kab. Batu Bara. Daun Jeruk Nipis segar sebanyak 5 kg dicuci bersih di air mengalir dan ditiriskan. Sampel kemudian dikeringkan didalam suhu ruangan. Sampel yang telah kering selanjutnya dihaluskan dengan cara diblender sampai menjadi serbuk.

Ekstraksi Sampel

Serbuk simplisia daun jeruk nipis ditimbang sebanyak 500 gram, dimasukkan dalam bejana maserasi (toples), kemudian ditambahkan etanol 96% sampai serbuk simplisia seluruhnya terendam. Dibiarkan selama 5 hari dan sekali-kali diaduk selama 1x24 jam, dan dibiarkan pada suhu kamar dan terlindung dari sinar matahari langsung. Setelah itu dilakukan penyaringan dan dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali. Filtrat yang diperoleh ditampung kemudian diuapkan dengan menggunakan rotary

evaporator sehingga diperoleh ekstrak kental dari daun jeruk nipis (Depkes RI, 1995).

Skrining Fitokimia

a. Pemeriksaan Alkaloid

Dimasukan kedalam tabung reaksi sebanyak 3 pipet tetes ekstrak ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air suling, dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan, filtrat dipakai untuk uji alkaloid. Diambil 3 tabung reaksi, lalu kedalam masing-masing tabung reaksi dimasukan 0,5 ml filtrat.

Pada tabung I : Ditambahkan 2 tetes Pereaksi Mayer, akan terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning.

Pada tabung II : Ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendroff, akan terbentuk endapan berwarna coklat atau jingga kecoklatan

Pada tabung III : Ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat, akan terbentuk endapan berwarna coklat sampai kehitaman. Alkaloid tersebut positif jika terjadi endapan atau kekeruhan pada dua atau tiga dari percobaan diatas (Depkes RI, 1995).

b. Pemeriksaan Flavonoid

Dimasukan kedalam tabung reaksi 1 pipet ekstrak ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium dan 1 ml Hcl pekat dan 2 ml butanol, dikocok dan dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terjadi warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan butanol (Depkes RI, 1995).

Penetapan Dosis dan Penyiapan Larutan

a. Pembuatan Induksi Karagenan 1%

Induksi radang dibuat dengan melarutkan 100 mg karagenan pada larutan NaCl 0,9% 10 ml, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Dosis karagenan sebagai induktor udem untuk kaki mencit yakni 0,1 ml dari larutan karagenan 1 %

b. Kontrol negatif (Na CMC)

Suspensi Na

CMC dibuat dengan memasukkan 1 gram Na.CMC sedikit demi sedikit pada 100 ml aquadest panas dengan suhu 70°C sambil diaduk sampai terbentuk larutan koloidal yang homogen.

c. Kontrol positif (Na.Diklofenak)

Na.diklofenak yang digunakan ialah tablet natrium diklofenak generik Dosis natrium diklofenak sebagai kontrol positif adalah 6,5 mg/kgBB mencit. Untuk membuat larutan na.diklofenak, dilakukan uji kesetaraan bobot, kemudian tablet natrium diklofenak digerus lalu ditimbang sesuai serbuk setara dan dilarutkan dalam larutan suspensi Na.CMC sebanyak 10 ml selanjutnya diaduk sampai homogen.

Perlakuan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus*) sebanyak 25 ekor mencit yang dibagi menjadi 5 kelompok dengan 5 ekor mencit di setiap kelompok. Dilakukan aklimatisasi pada hewan uji terhadap lingkungan laboratorium selama 1 minggu dalam kandang yang dijaga kebersihannya. Hewan uji dipuaskan terlebih dahulu selama ± 18 jam dengan tetap diberi minum sebelum dilakukan perlakuan.

Pengujian Aktivitas Antiinflamasi

Pada hari pengujian, masing-masing hewan ditimbang dan diberi tanda pada ekor dan kaki kirinya. Kemudian kaki kiri mencit dimasukkan ke dalam sel yang berisi cairan khusus yang ada pada alat pletismometer sampai cairan naik (garis batas atas) kemudian pedal ditahan, dicatat angka pada monitor sebagai volume awal (V0) yaitu volume kaki sebelum diberi obat dan diinduksi dengan larutan karagenan. Masing-masing telapak kaki

kiri mencit disuntik secara intraplantar dengan 0,1 ml larutan karagenan 1%, 30-60 menit kemudian masing-masing mencit diberi suspensi bahan uji secara oral sesuai dengan kelompoknya.

Kelompok I : Suspensi Na-CMC 0,5 %

Kelompok II : Suspensi na.diklofenak

Kelompok III : EEDJ dosis 100 mg/kgBB

Kelompok IV : EEDJ dosis 200 mg/kgBB

Kelompok V : EEDJ dosis 300 mg/kgBB

30-60 menit kemudian, dilakukan pengukuran kembali selama 6 jam tiap 1,2,3,4,5,6 jam (V_t) dengan cara mencelupkan kaki kiri mencit ke dalam sel pletismometer yang berisi cairan khusus sampai garis tanda pada kaki kiri tikus dan pedal ditahan.

Perhitungan Persen Radang dan Persen Inhibisi Radang

Data yang diperoleh dari pengukuran volume edema telapak kaki mencit setiap waktu pengamatan pada semua kelompok ditabulasi. Ada tidaknya efek antiinflamasi dilihat dengan cara menghitung prosentase edema setiap waktu.

$$\% \text{ Radang} := \frac{V_t - V_o}{V_o} \times 100\%$$

Keterangan :

V_t : volume edema pada waktu t

V_o : volume awal kaki mencit

Persen penghambat (inhibisi) radang dihitung dengan rumus dibawah ini:

$$\% \text{ inhibisi radang} := \frac{a - b}{a} \times 100\%$$

Keterangan :

a = Persen radang rata-rata kelompok kontrol negatif

b = Persen radang rata-rata kelompok bahan uji dan kontrol positif.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pemeriksaan Makroskopik

Hasil Pemeriksaan makroskopik dari tumbuhan daun jeruk nipis segar yaitu berdaun majemuk, berbentuk

elips dengan pangkal membulat, ujung tumpul, dan tepi beringgit. Panjang daunnya mencapai 2,5–9 cm dan lebarnya 2–5 cm dan berwarna hijau, dan untuk pengamatan ekstrak daun jeruk nipis yaitu warna coklat kehijauan, bau aromatik dan rasa pahit.

Hasil Ekstraksi Daun Jeruk Nipis

Hasil simplisia pada daun jeruk nipis memiliki berat sampel 700 gr yang direndam dalam pelarut etanol sebanyak 7 liter. Lama perendaman pada ekstrak daun jeruk nipis selama 5 hari dan diaduk sesekali (1×24 jam). Hasil ekstrak yang sudah diwater bath memiliki berat 52,5 gr.

Hasil Skrining Fitokimia

Hasil skrining ekstrak etanol daun jeruk nipis untuk menunjukkan golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat didalamnya. Adapun pemeriksaan yang dilakukan terhadap serbuk simplisia daun jeruk nipis adalah pemeriksaan golongan senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin.

Berdasarkan hasil skrining fitokimia serbuk simplisia daun jeruk nipis dapat dilihat, golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat didalam simplisia tersebut adalah flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin.

Uji Antiinflamasi

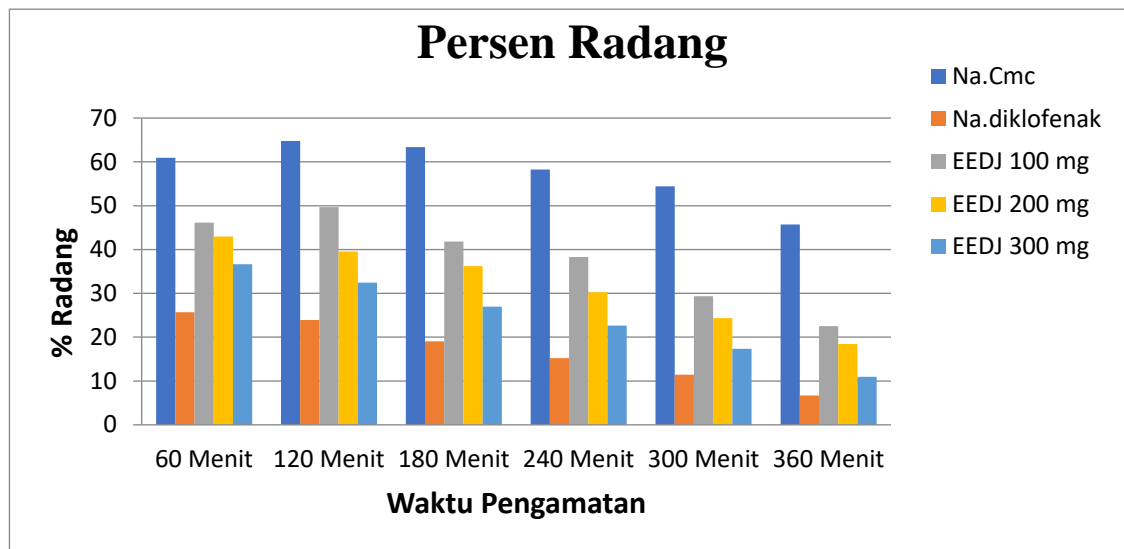
Pengujian aktivitas antiinflamasi Ekstrak etanol daun jeruk nipis menggunakan 25 hewan uji, dengan 5 kelompok perlakuan. Kelompok terdiri atas kontrol positif yang diberikan na.diklofenak dengan dosis 6,5 mg/kgbb secara oral, kontrol negatif yang diberi perlakuan Na.CMC Na 0,5% secara oral, kelompok perlakuan ekstrak dosis 100 mg/kgbb, kelompok ekstrak 200 mg/kgbb, dan kelompok ekstrak dosis 300 mg/kgbb.

Perubahan volume kaki mencit, dapat dihitung persen radang pada kaki mencit. Selanjutnya dibuat grafik

perubahan persen radang rata-rata kaki menciit. Kelompok persen radang pada kaki menciit yang lebih kecil dari

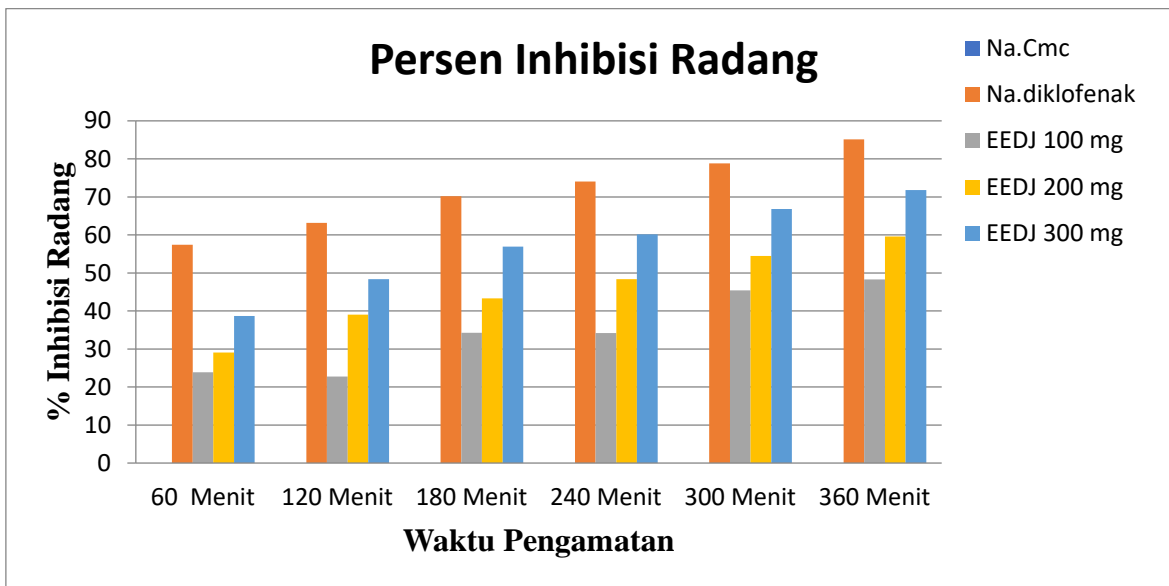
kelompok kontrol menunjukkan bahwa bahan uji mampu menekan radang yang disebabkan oleh karagenan.

Gambar 1. Hasil Rata – Rata Persen Radang.



Pada gambar 1 dapat kita lihat bahwa persen radang menunjukkan pada kelima kelompok uji mengalami penurunan secara terus menerus mulai dari menit ke-60 sampai menit ke-360 setelah induksi karagenan. Persen radang terbesar terjadi pada menit ke-120 pada suspensi Na.CMC dan diikuti oleh 100 mg, 200 mg, 300 mg dan Na.diklofenak. Kelompok Na.diklofenak dan juga EEDJ 100, 200, dan 300 mg/kgbb mulai mengalami penurunan persen radang pada menit ke-180, hal ini terjadi karena penghambatan prostaglandin ke jaringan oleh keempat kelompok uji tersebut. Kelompok Na.CMC mulai mengalami penurunan dan peningkatan persen radang pada menit ke-180 hingga menit ke-360 yang diduga ada penghambatan pelepasan prostaglandin oleh tubuh namun tidak terlalu kuat dibandingkan kelompok uji. Berdasarkan hasil persen radang yang diperoleh menunjukkan bahwa keempat kelompok uji yaitu kelompok na.diklofenak, EEDJ 100, 200, dan 300

mg telah memberikan efek antiinflamasi pada menit ke-180 hingga menit ke-360 sedangkan Na.CMC tidak memberikan efek tersebut. Persentase radang kaki menciit yang lebih kecil dari kontrol menunjukkan bahwa suspensi natrium diklofenak dan suspensi EEDJ 100, 200 dan 300 mg/kgbb mampu menghambat peradangan pada kaki menciit yang disebabkan karagenan. Kemampuan untuk menghambat peradangan ini yang disebut dengan inhibisi radang.



Gambar 2. Hasil Rata-Rata Persen Inhibisi Radang

Pada gambar 2 dapat dilihat bahwa nilai persen inhibisi radang menunjukkan hasil terbesar dimiliki oleh kelompok Na.diklofenak dan diikuti oleh 300 mg/kgbb, 200 mg/kgbb dan 100 mg/kgbb. Hal ini berarti, persen hambatan yang baik terdapat pada EEDJ 300 mg/kgbb setelah Na.diklofenak, kemudian diikuti EEDJ 200 dan 100 mg/kgbb dan hal ini menunjukkan bahwa kelompok Na.diklofenak, 100, 200 dan 300 mg/kgbb memiliki potensi sebagai agen antiinflamasi sedangkan kelompok Na.CMC tidak.

Efek antiinflamasi dapat dilihat dari besarnya persen hambatan (inhibisi) rata-rata tiap pengukuran, karena semakin besar nilai daya hambatan maka makin besar pula dapat menekan radang yang disebabkan oleh karagenan.

Pada penelitian uji aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol daun jeruk nipis menunjukkan bahwa efek tergantung dosis pada peningkatan dosis tertentu. Efek antiinflamasi dapat dilihat dari kandungan daun jeruk nipis dimana senyawa flavonoid memiliki aktivitas antiinflamasi dengan

menghambat pelepasan seretonin dan histamin ketempat terjadinya radang serta menghambat sintesis prostaglandin dari asam arakhidonat dengan cara penghambat kerja sikloogenase (COX) (Ningsih, 2016).

4.KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*) dosis 100 mg/kgbb, 200 mg/kgbb, dan 300 mg/kgbb mempunyai kemampuan menurunkan udem pada telapak kaki mencit jantan yang diinduksi karagenan 1%. Kelompok ekstrak dengan dosis 100, 200, 300 mg/kgbb lebih rendah dibandingkan dengan pembanding natrium diklofenak.

Ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*) memiliki efek antiinflamasi yang sebanding dengan natrium diklofenak. Kelompok Na.diklofenak dan juga EEDJ 100, 200, dan 300 mg/kgbb mulai mengalami penurunan persen radang.

Ekstrak etanol daun jeruk nipis (*Citrus aurantiifolia*) dengan dosis 300 mg/kgbb lebih efektif mengurangi inflamasi dengan persen radang yang

baik setelah Na.diklofenak, kemudian diikuti EEDJ 200 dan 100 mg/kgbb.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., & Junliang. (2018). *Inflammatory responses and inflammation-associated diseases. Oncotarget, 2018, Vol. 9, (No. 6), 9, 7204-7218.*
- Depkes RI. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi V. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. pp 6.
- Farnsworth, Norman. R., 1996, Biological and Pytochemical Screening of Plants, *Journal Of Pharmaceutical Sciences, 55(3), 225-276.*
- Idacahyati, K., Nofianti, T., Aswa, G. A., & Nurfatwa, M. (2019). Hubungan Tingkat Kejadian Efek Samping Antiinflamasi Non Steroid dengan Usia dan Jenis Kelamin. *Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia Vol. 6 No. 2 Desember 2019, 6, 56-61.*
- Khotimah, S. N., & Muhtadi, A. (2016). Review Artikel: Beberapa Tumbuhan Yang Mengandung Senyawa Aktif Antiinflamasi. *Farmaka Suplemen Volume 14 Nomor 2, 2016, 2, 28-40.*
- Ningsih, I. Y. (2016). Studi Etnofarmasi Penggunaan Tumbuhan Obat Oleh Suku Tengger Di Kabupaten Lumajang Dan Malang, Jawa Timur. *Pharmacy, Vol.13 No.*
- Ramadhani, N. & Sumiwi, S. A. (2017). Aktivitas Antiinflamasi Berbagai Tanaman Diduga Berasal Dari Flavonoid. *Suplemen Volume 14 Nomor 2, 2017, 111-123. 01 Juli 2016, 10-20.*
- Rezky Yanuarty, 2021. Buku Penuntun Pratikum Pharmacology Farmasi. Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Pelita Mas Palu
- Ricciotti, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Volume 31, Issue 5, May 2011, 986-1000.*
- Rusmini, H., & Ma'rifah, S. (2017). GAMBARAN PENGGUNAAN KORTIKOSTEROID SISTEMIK JANGKA PANJANG. *Jurnal Ilmu Kedokteran Dan Kesehatan, Vol. 4, Nomor 2, April 2017, 91-97.*
- Zahra, A. P., & Carolia, N. (2017). Obat Anti-inflamasi Non-steroid (OAINS): Gastroprotektif vs Kardiotoksik. *Majority Vol. 6, No. 3, Juli 2017, 6, 153-158.*