

JURNAL
PENELITIAN

**MEDIKA
EKSAKTA**

Profil dan Identifikasi Serum Amiloid Protein (SAP) Sebagai Protein Fase Akut pada Mencit yang Dipapar Salmonella Enteritidis

Sunarni Zakaria, Rochmah Kurnijasanti, Iwan Sahrial Hamid

Perbedaan Konsentrasi Bahan Pemutih Gigi Terhadap Sitotoksitas Menggunakan Esei MTT

Asti Meizarini

Penentuan Shelf-Life Sediaan Kapsul Racikan Dari Tablet Karbamazepin

I Nyoman Wijaya, Gusti Noorizka, Anila Impian Sukorini

Komposisi Kimiawi dan Aktivitas Antimikroba Propolis dari Malang Jawa Timur

Bambang Susilo, Ni Made Mertaniasih, Eko Budi Koendhori, Mangestuti Agil

Gambaran Histopatologik Ginjal Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Pasca Ovariohisterektomi dengan Suplemen Kalsium Karbonat Dosis Tinggi

Wiwik Misaco Yuniarti, Ira Sari Yudaniyanti, Nusdianto Triakoso

Aktivitas Antibakterial Ekstrak Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) Terhadap Bakteri *Staphylococcus* Asal Susu Sapi Perah Penderita Mastitis

Mustofa Helmi Effendi

Pemanfaatan Lempung Kutorejo Mojokerto Sebagai Bahan Untuk Isolasi Penyangga Produk Industri

Abdulloh

Optimasi Dosis Paparan Laser-Puncture Untuk Mengendalikan Kadar Gula Darah Mencit Secara Efektif dan Aman

Welina R.K., Tri Anggono Prijo dan Muzakki

Analisis Faktor Untuk Mengetahui Sikap Berisiko Kecelakaan Pada Lanjut Usia (LANSIA)

Rachmah Indawati, Hj. Soenarnatalina M, Muji Sulistyowati

Identifikasi Enterotoksin Isolat *Staphylococcus Aureus* dari Sarang Walet

Wahyu Hidayatiningsih

J. Penelit. Med. Eksakta.	Vol. 8	No. 1	Hal. 1-87	Surabaya April 2009	ISSN 1411-6626
------------------------------	--------	-------	-----------	------------------------	-------------------

JURNAL PENELITIAN

MEDIKA EKSAKTA

DAFTAR ISI

Profil dan Identifikasi Serum Amiloid Protein (SAP) Sebagai Protein Fase Akut pada Mencit yang Dipapar <i>Salmonella Enteritidis</i>	
PROFILE AND IDENTIFY THE SERUM OF AMILOID PROTEIN (SAP) AS ACUTE PHASE PROTEIN AT MICE WHICH INOCULATED SALMONELLA ENTERITIDIS	
Sunarni Zakaria, Rochmah Kurnijasanti, Iwan Sahrial Hamid	1-7
Perbedaan Konsentrasi Bahan Pemutih Gigi Terhadap Sitotoksitas Menggunakan Esei MTT	
THE DIFFERENCES CONCENTRATION OF TOOTH WHITENING MATERIAL TOWARD CYTOTOXICITY USING MTT ASSAY	
Asti Meizarini	8-15
Penentuan Shelf-Life Sediaan Kapsul Racikan Dari Tablet Karbamazepin	
THE DETERMINATION OF THE SHELF LIFE OF EXTEMPORANEVS CARBANAZEPINE CAPSULE	
I Nyoman Wijaya, Gusti Noorizka, Anila Impian Sukorini	16-22
Komposisi Kimiawi dan Aktivitas Antimikroba Propolis dari Malang Jawa Timur	
CHEMICAL COMPOSITION AND ACTIVITY OF PROPOLIS AS ANTI MICROBIAL FROM MALANG EAST JAVA	
Bambang Susilo, Ni Made Mertaniasih, Eko Budi Koendhori, Mangestuti Agil	23-30
Gambaran Histopatologik Ginjal Tikus Putih (<i>Rattus Norvegicus</i>) Pasca Ovariohisterektomi dengan Suplemen Kalsium Karbonat Dosis Tinggi	
HISTOPATOLOGICAL STUDY OF RENAL RATS (<i>RATTUS NORVEGICUS</i>) AFTER OVARYHYSTERECTOMIZED AND GIVEN HIGH DOSE OF CALCIUM CARBONATE AS SUPPLEMENT	
Wiwik Misaco Yuniarti, Ira Sari Yudaniayanti, Nusdianto Triakoso.....	31-38
Aktivitas Antibakterial Ekstrak Herba Sambiloto (<i>Andrographis paniculata</i> Nees) Terhadap Bakteri <i>Staphylococcus</i> Asal Susu Sapi Perah Penderita Mastitis	
ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF SAMBILOTO HERBS EXTRACT (<i>Andrographis paniculata</i> Nees) ON STAPHYLOCOCCUS FROM MILK OF DAIRY COWS MASTITIS	
Mustofa Helmi Effendi	39-45
Pemanfaatan Lempung Kutorejo Mojokerto Sebagai Bahan Untuk Isolasi Penyangga Produk Industri	
THE EXPLOITATION OF KUTOREJO MOJOKERTO CLAY AS BUFFER ISOLATION MATERIAL FOR INDUSTRIAL PRODUCT	
Abdulloh	46-56

Optimasi Dosis Paparan <i>Laser-Puncture</i> Untuk Mengendalikan Kadar Gula Darah Mencit Secara Efektif dan Aman	
THE OPTIMALIZATION OF LASER-PUNCTURE DOSE EXPOSURE FOR CONTROLLING LEVEL OF THE BLOOD SUGAR RATE OF MICE IN SAFELY AND EFFECTIVENESS	
Welina R.K., Tri Anggono Prijo dan Muzakki	57-63
Analisis Faktor Untuk Mengetahui Sikap Berisiko Kecelakaan Pada Lanjut Usia (LANSIA)	
THE FACTOR ANALYSIS TO IDENTIFICATION OF RISK ATTITUDE OF ACCIDENT TO OLDER AGE (ELDERLY)	
Rachmah Indawati, Hj. Soenarnatalina M, Muji Sulistyowati	64-73
Identifikasi Enterotoksin Isolat <i>Staphylococcus Aureus</i> dari Sarang Walet	
THE IDENTIFICATION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS ENTEROTOXINS FROM SWITLET™ SNEST	
Wahyu Hidayatiningsih	74-87

AKTIVITAS ANTIBAKTERIAL EKSTRAK HERBA
SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Nees) TERHADAP
BAKTERI STAPHYLOCOCCUS ASAL SUSU SAPI PERAH
PENDERITA MASTITIS

*ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF SAMBILOTO HERBS EXTRACT
(Andrographis paniculata Nees) ON STAPHYLOCOCCUS FROM
MILK OF DAIRY COWS MASTITIS*

Mustofa Helmi Effendi⁽¹⁾

ABSTRACT

Investigation by using Sambiloto extract as antibacterial agent of Staphylococcus aureus and Coagulase Negative Staphylococci should be done to solve mastitis problems. The experiment was used 70 milk samples that collected from Nongkojajar and Batu Dairy Herds for identification and isolation of Staphylococcus aureus and Coagulase Negative Staphylococci. From mastitic milk samples were identified isolate S. aureus by Staphylococci are perfectly spherical cells about 1 micrometer in diameter and grow in clusters, β hemolysis, coagulase (+), catalase (+) and Gram (+), however Coagulase Negative Staphylococci have coagulase (-).

Antibacterial test against some bacteria from the milk of dairy cows mastitis performed using the diffusion method of Kirby Bauer. Antibacterial discs were given the extract powder of sambiloto 0 mg, 125 mg, 250 mg and 500 mg in 70 cc of water solvent. The result showed that there was no antibacterial activity from sambiloto extract againts isolates of Staphylococcus aureus and Coagulase Negative Staphylococci (CNS) were collected from Nongkojajar and Batu dairy herds.

Keywords: *Staphylococcus aureus, CNS, antibacterial test, sambiloto extract*

⁽¹⁾ Departemen Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

PENDAHULUAN

Mastitis yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* adalah sangat sukar untuk dikontrol oleh pengobatan (Jones, 1998), dan angka kejadian mastitis yang disebabkan *Staphylococcus aureus* merupakan angka kejadian tertinggi (Morin and Hurley, 2003). Keberhasilan pengendaliannya hanya melalui pencegahan infeksi baru, pengafkiran sapi terinfeksi *Staphylococcus aureus*. Organisme ini mungkin penetrasi ke lubang puting selama pemerahan dan berkembang menjadi infeksi baru.

Data mengenai kasus mastitis di Indonesia, telah banyak dilaporkan. Tingginya kasus mastitis subklinis sering dikaitkan dengan faktor-faktor yang mempermudah terjadinya mastitis seperti luka lecet pada ambing akibat pemerahan yang salah dan kasar, sanitasi yang buruk. Beberapa data menampilkan persentase kejadian mastitis subklinis cukup tinggi, seperti di tahun 1983 tercatat 67% mastitis subklinis di pulau Jawa dan tahun 1987 lebih dari 80% sapi yang diperiksa di DKI Jakarta menderita mastitis subklinis. Selanjutnya dari tahun 1989 sampai dengan tahun 1996 persentase mastitis subklinis baik di Jawa Barat, Jawa Tengah dan Jawa Timur berkisar 80 – 90%. Data tahun 1999 di Jawa Barat terutama Kabupaten Bogor dan sekitarnya tercatat 70% dari sapi-sapi yang diperiksa menderita mastitis subklinis (Sudarwanto, 1999).

Kerugian ekonomi secara umum yang diakibatkan mastitis subklinis, meliputi penurunan produksi, penurunan mutu susu, pembuangan susu, biaya perawatan dan pengobatan, pengafkiran ternak lebih awal serta pembelian sapi perah baru. Penurunan produksi susu akibat mastitis sangat bervariasi antara 10 – 40% (Anonymous, 2003).

Kerugian ekonomi akibat turunnya kualitas susu asal penderita mastitis subklinis lebih banyak disoroti dari aspek teknologinya. Kualitas susu turun ditandai dengan perubahan susunan susu seperti turunnya kadar laktosa, lemak, kasein (Anonymous, 2003). Di samping susunan susu, pH susu meningkat, daya menggumpal dan aktivitas plasmin juga turut meningkat. Akibat lain adalah susu menjadi tidak stabil bila dipanaskan, produk susu pasteurisasi berkualitas rendah, cita rasanya menurun (Hurley and Morin, 2003).

METODE PENELITIAN

Bahan penelitian berupa sampel susu yang diambil dari puting sapi perah yang menderita mastitis.

Bahan untuk penentuan mastitis subklinis digunakan California Mastitis Test yang merupakan standard bahan untuk deteksi mastitis subklinis (Jones, 1998)

Bahan untuk menentukan isolat *Staphylococcus aureus* dan *Coagulase Negative Staphylococci* murni secara laboratoris adalah Pewarna Gram.

Berdasarkan visualisasi dan palpasi pada ambing. Dalam kasus mastitis klinis, ambing menjadi keras, kemerahan dan hangat. Palpasi pada ambing mnenyebabkan sapi kesakitan. Simptom ini merupakan perubahan dari sistem aliran darah di glandula mammae ketika terjadi peradangan.

Deteksi pada Somatic cells. Metoda yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah California Mastitis Test (CMT). Alat ini mendeteksi bentukan gel ketika DNA dalam somatic cells bereaksi dengan reagen. Reaksi terjadi pada paddle CMT dan dinilai secara subyektif (negatif, ringan, 1, 2, 3).

Sampel diperoleh dari susu sapi perah penderita mastitis di Nongkojajar dan Batu. Sampel

dikultur pada media MS agar dan dilanjutkan sub kultur pada agar darah untuk diidentifikasi, bentuk mikroskopis kokus, sifat hemolisis, katalase (+), koagulase (+) dan Gram (+) untuk *Staphylococcus aureus*, sedangkan koagulase (-) untuk CNS.

Herba sambiloto diperoleh dari daerah pedesaan Jawa Timur dan

diidentifikasi sebagai *Andrographis paniculata* Nees (*Acanthaceae*) di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya. Herba yang telah dikeringkan digiling untuk menghasilkan serbuk.



Gambar 1. Bahan Herba Sambilloto

Serbuk (500 g) diekstraksi secara sinambung dengan alat Soxhlet secara berturut-turut menggunakan pelarut heksana, etilasetat dan etanol. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan pada suhu tidak lebih dari 60°C dengan tekanan diperendah.

Pengujian antibakteri terhadap beberapa kuman asal susu sapi perah penderita mastitis dilakukan dengan menggunakan metode difusi dari Kirby Bauer. Media yang digunakan untuk menguji adalah media Mueller Hilton Broth (Oxoid), Mueller Hilton Agar (Oxoid) dan cakram antibakteri diberi ekstrak bubuk sambiloto 0 mg, 125 mg, 250 mg dan 500 mg dalam pelarut 70 cc air.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Isolat Staphylococcus aureus dan Coagulase Negative Staphylococci (CNS)

Identifikasi *Staphylococcus aureus* dan CNS bertujuan untuk memperoleh isolat murni *Staphylococcus aureus* dan CNS dari kasus mastitis sapi perah di di Peternakan Nongkojajar dan Batu. Dalam identifikasi ini digunakan metode standar yaitu berupa uji mikroskopis, pengecatan Gram, uji fermentasi pada Manitol Salt Agar, uji katalase, uji hemolisis dan uji koagulase yang berguna untuk membedakan dengan berbagai spesies

Staphylococcus yang menginfeksi kelenjar susu sapi perah.

Pemeriksaan identifikasi sampel susu mastitis sebanyak 70 sampel. Infeksi *Staphylococcus sp.* yang terjadi sering dengan manifestasi subklinis, maka upaya dari penelitian ini adalah untuk mengamati dan menilai keberadaan *Staphylococcus sp.* melalui pendekatan metode standar laboratorium. Organisme yang diisolasi dari sampel susu yang ditumbuhkan ke MS agar yang mengandung 7,5% sodium chloride akan membatasi pertumbuhan

organisme lainnya, tetapi genus *Staphylococcus* dapat tumbuh. Setelah dilakukan identifikasi *Staphylococcus sp.* dengan metode standar laboratorium diperoleh isolat *Staphylococcus aureus* berjumlah 16 isolat. Sisanya positif spesies *Staphylococcus* yang lain dalam jumlah yang menyebar antara lain *Staphylococcus epidermidis* dan *Staphylococcus saprophyticus* dan sebagian merupakan genus dari *Streptococcus spp* yang ditandai dengan uji katalase negatif dan berbentuk mikroskopis rantai kokus.



Gambar 2. Penanaman Isolat *Staphylococcus sp* dan CNS pada media MSA

Sebuah identifikasi yang cepat dan terpercaya untuk *Staphylococcus aureus* yang diambil dari sampel susu merupakan hal utama dalam pengontrolan terhadap *Staphylococcal mastitis*. Tingginya angka sensitivitas dan spesifisitas dari uji koagulase yang dibuat untuk metode standar dalam identifikasi *Staphylococcus aureus* dalam susu. Hanya separuh dari isolat *Staphylococcus aureus* yang positif dalam uji koagulase setelah 4 jam waktu inkubasi, dan waktu inkubasi lebih dari 12 jam diperlukan untuk memperoleh hasil yang terpercaya (Boerlin *et al.*, 2003). Hal tersebut juga didukung oleh penelitian Chusniati dan Effendi (2003) yang membandingkan antara

uji koagulase tabung dan uji koagulase *slide test* yang menghasilkan kesimpulan bahwa sensitivitas koagulase *slide test* untuk deteksi mastitis yang disebabkan *Staphylococcus aureus* cukup tinggi yaitu 91,11% dan dapat dipakai untuk mengkonfirmasi tentang agen penyebab mastitis *Staphylococcus aureus* dengan cepat.

Uji β hemolisis juga merupakan kriteria yang penting untuk identifikasi *Staphylococcus aureus* dari kultur primer. Meskipun dalam studi sebelumnya diperlihatkan data sekitar seperlima dari isolat *Staphylococcus aureus* tidak menunjukkan aktivitas β hemolisis pada kultur primernya. Jadi uji β

hemolisis merupakan uji yang spesifik tetapi kurang sensitif untuk identifikasi *Staphylococcus aureus*. Untuk menghasilkan identifikasi *Staphylococcus aureus* yang cepat dan terpercaya perlu mengkombinasikan antara uji β hemolisis dengan uji koagulase dengan waktu inkubasi 4 jam (Boerlin *et al.*, 2003).

Rendahnya hasil isolasi *Staphylococcus aureus* ini mungkin disebabkan kemampuan tumbuh dan berkembangnya bakteri tersebut tergantung dari kemampuan untuk beradaptasi dengan perubahan lingkungan. *Staphylococcus aureus* mempunyai beberapa mekanisme untuk mengatasi perubahan terutama dalam sebuah infeksi (Haris *et al.*, 2003). Pertumbuhan dari *Staphylococcus aureus* pada kondisi ideal terdiri dari tiga fase yaitu fase lag, eksponensial dan stasioner. Pada

kondisi yang tidak menguntungkan maka bakteri mengalami penghentian pertumbuhan.

Aktivitas Antibakterial Ekstrak Herba Sambiloto

Herba sambiloto adalah jenis herba yang diyakini mempunyai efek pengobatan dan sudah digunakan sebagai bahan pengobatan untuk infeksi saluran pernafasan dengan efektivitas hasil 75 - 100% di Thailand (Mishra *et al.*, 2007). Untuk meng-investigasi kemampuan antibakterial herba sambiloto dipergunakan bakteri yang diisolasi dari susu penderita mastitis. Tujuan dari investigasi ini adalah untuk menjadikan dasar sistem pengobatan yang tepat untuk sapi penderita mastitis dengan agen penyebab dari bakteri.

Tabel 1. Diameter (mm) Zona Hambatan Ekstrak Herba Sambiloto

Nama isolat	Konsentrasi Dosis			
	0 mg/ 70 cc	125mg/ 70 cc	250 mg/ 70 cc	500 mg/ 70 cc
N CNS1	7 mm	11 mm	8 mm	9 mm
N CNS2	9 mm	8 mm	10 mm	12 mm
N CNS3	8 mm	9 mm	9 mm	9 mm
N SA1	10 mm	10 mm	7 mm	7 mm
N SA2	8 mm	9 mm	9 mm	11 mm
B CNS1	9 mm	9 mm	9 mm	11 mm
B SA1	8 mm	6 mm	8 mm	10 mm
B SA2	8 mm	9 mm	8 mm	9 mm
B SA3	8 mm	10 mm	9 mm	8 mm

Keterangan:

N CNS: Nongkojajar, *Coagulase Negative Staphylococci*

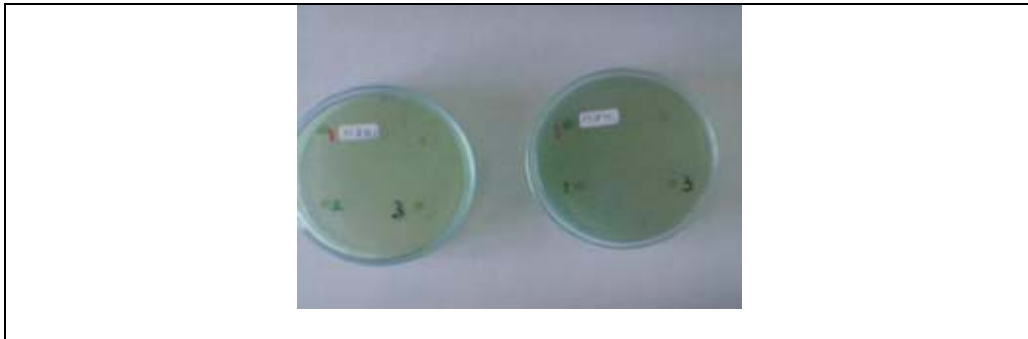
N SA: Nongkojajar, *Staphylococcus aureus*

B CNS: Batu, *Coagulase Negative Staphylococci*

B SA: Batu, *Staphylococcus aureus*

Aktivitas antibakteri ekstrak sambiloto diuji dengan menggunakan disc diffusion test. Dengan merujuk Tabel 1. dapat dijabarkan bahwa tidak ada aktivitas antibakterial ekstrak

sambiloto terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* maupun *Coagulase Negative Staphylococci* dengan kriteria diameter zona hambat bakteri kurang dari 11 mm.



Gambar 3. Zona hambatan ekstrak sambiloto terhadap bakteri Staphylococcus asal susu sapi perah penderita mastitis

Hasil yang diperoleh berbeda dengan yang dilaporkan oleh Singha *et al.*, 2003 yang dilaporkan adanya antibakterial terhadap *S. aureus*, *E.coli* ataupun *P. aeruginosa*. Hal ini dimungkinkan karena penggunaan dosisnya jauh lebih rendah dibandingkan yang digunakan oleh Singha *et al.*, (2003). Penelitian lainnya tidak sependapat dengan pendekatan dosis sebagai rujukan tidak adanya aktivitas antibakterial. Hal ini dilaporkan bahwa oleh Inchaisri *et al.*, (2005) yang melaporkan bahwa tidak ada aktivitas antibakterial secara in vitro terhadap *Salmonella*, *E. Coli*, *Shigella* dan *S. aureus* meskipun dosisnya ditinggikan sampai 25 g/ liter ekstrak sambiloto dalam air.

Meskipun ekstrak sambiloto tidak menampakkan aktivitas antibakterial terhadap bakteri asal susu penderita mastitis dalam penelitian ini, ekstrak sambiloto di laporkan mempunyai efek yang signifikan melawan infeksi diare oleh *E. Coli* dengan menggunakan kelinci sebagai hewan coba Tipakorn (2002).

Hasil dari penelitian ini sejalan dengan yang dilaporkan oleh Inchaisri *et al.*, (2005) yang menggunakan bakteri dari agen penyebab mastitis; Xu *et al.*, (2006) yang menggunakan 9 bakteri yang sering menyebabkan infeksi pada manusia maupun Jiang

et al. (2008) yang menggunakan bakteri penyebab diare dan dari laporannya mereka secara tegas dilaporkan tidak ada aktivitas antibakterial dari ekstrak sambiloto terhadap beberapa bakteri tersebut.

SIMPULAN

Simpulan

Hasil penelitian secara keseluruhan pada penelitian ini memperlihatkan satu pokok hal sebagai berikut: Tidak ada aktivitas antibakterial dari ekstrak sambiloto terhadap *Staphylococcus sp.* bakteri yang diisolasi dari susu sapi perah penderita mastitis.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous, 2003. Mastitis in Dairy Cows. Faculty of Agricultural & Environmental Sciences, Macdonald Campus of McGill University.
- Boerlin, P., P. Kuhnert, D. Hüßy, and M. Schaellibaum. 2003. Methods for Identification of *Staphylococcus aureus* Isolates in Cases of Bovine Mastitis. *J. Clin. Microbiol.* 41: 767-771
- Chusniati, S. dan M.H. Effendi. 2003. Sensitivitas Koagulase *Slide test* Untuk Deteksi *Staphylococcus aureus* pada Kasus Mastitis Sapi Perah. Laporan Penelitian, LPPM-Universitas Airlangga.
- Haris, L.G., S.J. Foster and R.G. Richards. 2003. An Introduction to *Staphylococcus aureus*, and

- Techniques for Identifying and Quantifying *S. aureus* Adhesins in Relation to Adhesion to Biomaterials: Review. Academic Paper, AO Research Institute, Switzerland.
- Hurley, W.L and D.E. Morin. 2003. Mastitis Lesson A. University of Illinois, USA.
- Inchaisri, C., K. Ajariyakhajorn, and S.Samngannim. 2005. Antibacterial Activity of Some Herb Extracts Against Bovine Mastitis Pathogens. The 4th Chulalongkorn University Veterinary Annual Conference, Thailand
- Jiang, X., P. Yu, J. Jiang, Z. Zhang, Z. Wang, and Z. Yang. 2008. Synthesis and evaluation of antibacterial activities of andrographolide analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry* 44: 2936–2943
- Jones, G.M. 1998. *Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection and Control. Virginia Cooperative Extension, USA.
- Mishra, S.K., N.S. Sangwan and R. S. Sangwan. 2007. *Andrographis paniculata* (Kalmegh): A Review. *Pharmacognosy Reviews*, 1:283-297
- Morin, D.E. and W.L. Hurley. 2003. Mastitis Lesson B. University of Illinois, USA.
- Singha, P.K., S. Roy and S. Dey. 2003. Antimicrobial activity of *Andrographis paniculata*. *Fitoterapia* 74: 692–694.
- Sudarwanto, M. 1999. Usaha Peningkatan Produksi Susu Melalui Program Pengendalian Mastitis Subklinis. Prosiding Seminar Nasional Mastitis, Bogor.
- Tipakorn, N. 2002. Effects of *Andrographis Paniculata* (Burm. F.) Nees on Performance, Mortality and Coccidiosis I Broiler Chickens. Dissertation, Georg-August-University, Göttingen, Germany
- Xu, Y., L. Raymond and K.S. Mukkur. 2006. An Investigation on the Antimicrobial Activity of *Andrographis paniculata* Extracts and Andrographolide in vitro. *Asian Journal of Plant Sciences*, 3: 527-530.