

Antibacterial Activity of Etanol Extract of Pinang (*Areca catechu* L.) Clup against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*

Siska Nuryanti^{1*}, Herwin¹, Hani Rahmayanti²

¹Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, 90231, Indonesia

²Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, 90231, Indonesia

Article info

Received: 15/04/2024

Available online: 17/04/2025

Corresponding Author:

Siska Nuryanti

Department of Microbiology
Faculty of Pharmacy, Universitas
Muslim Indonesia, Makassar,
South Sulawesi, Indonesia
email: Siska.nuryanti@umi.ac.id

ABSTRACT

Areca nut (Areca catechu L.) is a plant that has many uses and can be used for traditional medicine. Areca nut skin can be used to treat indigestion (dyspepsia), edema and beriberi due to low urine output. This study aims to determine the antibacterial activity of ethanol extract of areca nut peel against the test bacteria Streptococcus mutans and Porphyromonas gingivalis. In this research, the areca nut peel simplicia was extracted using the maceration method with 96% ethanol solvent, after which a liquid ethanol extract was obtained and then evaporated using a rotary vacuum evaporator to obtain a thick extract. After the extract is thick, a Minimum Inhibitor Concentration (MIC) test and a Minimum Bactericide Concentration (MBC) test are carried out. The results obtained in the Minimum Inhibitor Concentration (MIC) test and Minimum Bactericide Concentration (MBC) test on Streptococcus mutans and Porphyromonas gingivalis bacteria were 0.5%. Antibacterial activity test using the agar diffusion method was obtained, for Streptococcus mutans bacteria, the largest inhibitory zone diameter at a concentration of 16% was 12.58 mm and for Porphyromonas gingivalis bacteria at a concentration of 16%, namely 10.93 mm. Based on research, ethanol extract of areca nut peel has antibacterial potential.

Keyword:

Antibacterial, Areca catechu, Streptococcus mutans, Porphyromonas gingivalis

Copyright ©2025 by Author

Journal Microbiology Science by Faculty of Pharmacy Universitas Muslim Indonesia is licensed under a
[Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).



PENDAHULUAN

Infeksi merupakan keadaan masuknya mikroorganisme seperti bakteri, virus, dan jamur ke dalam tubuh yang dapat menyebabkan penyakit. Salah satu penyebab timbulnya penyakit disebabkan oleh bakteri yang bersifat patogen¹. Salah satu solusi dalam mengatasi permasalahan tersebut adalah melalui penggunaan antimikroba seperti antibiotik, antifungi, antivirus dan antiprotozoal². Antibiotik adalah senyawa-senyawa kimia yang

diproduksi oleh bakteri atau fungi dan memiliki sifat yang mampu membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen³. Penggunaan antimikroba seperti antibiotik secara luas dan tidak bijaksana dapat menghasilkan resistensi. Untuk mengatasi masalah tersebut, diperlukan mencari alternatif dengan penemuan senyawa-senyawa antimikroba dari tumbuhan yang memiliki khasiat⁴.

Telah banyak penelitian tentang bahan alam karena dianggap sangat bermanfaat untuk mengobati berbagai macam penyakit dan sangat jarang menimbulkan efek samping yang merugikan dibandingkan obat-obatan sintetik yang telah diketahui dan diwariskan secara turun-temurun⁵.

Salah satu tanaman yang dimanfaatkan sebagai antimikroba yaitu kulit buah pinang (*Areca catechu* L.). Kulit buah pinang mengandung senyawa flavonoid, triterpeneoid, alkaloid, dan tanin yang bermanfaat sebagai antibakteri. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Pribadi *et al* (2019) melaporkan bahwa ekstrak etanol kulit buah pinang (*Areca catechu* L) terbukti memiliki potensi yang baik sebagai antibakteri⁶.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alkohol 70%, aquadest, autoklaf (SIMIC Model YX-280 B), cawan petri (Normax), erlenmeyer 250, 500, 1000 mL (Iwaki Pyrex), etanol 96%, inkubator (Memmert), *Laminar Air Flow* (LAF), lampu spiritus, mikropipet (Eppendorf), *microplate* 96 well (Iwaki), *Mueller Hinton Broth* (MHB), *Nutrien Agar* (NA), oven (Memmert), *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, spektrofotometer, spoit, *waterbath* (IKA HB 10), timbangan analitik (Chyo), *Triphenyl Tetrazolium Chloride* (TTC)

(Merck), ose bulat, mikropipet (Eppendorf), dan vial.

Penyiapan sampel

Buah pinang yang telah didapatkan sebelumnya dicuci kemudian dikupas kulitnya, dipisahkan antara kulit dan biji pinang. Setelah itu, dipotong-potong kecil hingga didapatkan berat 1 kg dari sampel kulit buah pinang dan sampel kulit buah pinang siap diekstraksi⁶.

Pembuatan Ekstrak

Serbuk simplisia diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 500 gram lalu dimasukkan wadah kaca maserasi dengan menggunakan pelarut etanol sebanyak 500 mL, ditutup, lalu dibiarkan selama 3 x 24 jam terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk. Ekstrak disaring menggunakan kertas saring lalu diperoleh filtrat. Ekstrak diuapkan menggunakan Rotavapor pada suhu 70°C dan dilanjutkan dengan pengentalan yang dilakukan dengan menggunakan waterbath dengan suhu 60°C sampai menjadi ekstrak kental yang bertujuan untuk mendapatkan ekstrak yang bebas pelarut⁷.

Penyiapan mikroba uji

Disiapkan mikroba uji berupa bakteri uji *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis*, diinokulasikan kedalam media NA miring lalu diinkubasi 1 x 24 jam pada suhu 37°C untuk bakteri uji. Hasil peremajaan mikroba uji disuspensikan dengan larutan NaCl

fisiologis 0,9% sampai diperoleh transmittansi 25%T untuk bakteri yang diukur menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 580 nm⁸.

Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Uji MIC menggunakan *microplate* 96 *well*. Metode ini merujuk pada penelitian yang dilakukan Gharbani *et al.*, (2023) dengan dilakukan modifikasi. Disiapkan konsentrasi ekstrak kulit buah pinang 0,031%, 0,062%, 0,012%, 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 4%, 8%, 16%, 32%. Konsentrasi ekstrak dilarutkan ke dalam medium MHB hingga volume 180 µL. Selanjutnya, dimasukkan 20 µL suspensi mikroba uji. Selain itu, dimasukkan juga 200 µL medium MHB sebagai kontrol negatif, 180 µL medium MHB dan mikroba uji sebanyak 20 µL sebagai kontrol positif. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Selanjutnya, ditambahkan 5 µL dari 5 mg/mL reagen TTC pada setiap *well* lalu diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Nilai MIC dapat ditentukan dengan mengamati perubahan warna dan konsentrasi yang paling rendah yang menunjukkan penghambatan pertumbuhan bakteri ditandai dengan warna tidak berubah menjadi warna merah dari masing-masing medium uji⁹.

Uji Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

Untuk menentukan MBC sampel diambil dari setiap *well*, dibiakkan pada

medium *Nutrient Agar* selama 24 jam pada suhu 37°C. Nilai MBC ditentukan dengan mengamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri pada cawan petri setelah diinkubasi¹⁰.

Uji aktivitas antibakteri secara difusi agar

Pengujian dengan metode ini dilakukan uji aktivitas antibiotika yang umum digunakan yaitu menggunakan metode difusi agar dengan menggunakan disk blank dan medium *Nutrient Agar* (NA). Ekstrak etanol kulit buah pinang dibuatkan masing – masing dalam konsentrasi 2%, 4%, 8%, dan 16%. Medium NA diambil sebanyak 10 mL dan ditambahkan dengan 20 µL suspensi bakteri uji *Streptococcus mutans*, lalu dimasukkan kedalam cawan petri. Kemudian ekstrak etanol yang dibuat dalam seri konsentrasi dimasukkan menggunakan mikropipet sebanyak 20 µL lalu ditetesi disk blank yang akan digunakan. Disk blank diletakkan diatas medium yang telah memadat. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu diamati dan diukur zona hambat yang terbentuk. Hal yang sama dilakukan untuk bakteri uji *Porphyromonas gingivalis*¹¹.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Buah pinang telah terbukti secara empiris dapat dimanfaatkan untuk tujuan pengobatan. Kulit buah pinang dapat berperan sebagai pengobatan alami untuk mengatasi masalah jerawat. Kulit buah pinang mengandung senyawa flavonoid,

triterpenoid, alkaloid, dan tanin yang bermanfaat sebagai antibakteri⁶.

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit buah pinang memiliki efektivitas antibakteri yang signifikan terhadap *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis*. Pengujian MIC (Minimum Inhibitory Concentration) menunjukkan bahwa ekstrak ini mampu menghambat pertumbuhan kedua jenis bakteri tersebut, yang mana *S. mutans* merupakan bakteri gram positif dan *P. gingivalis* adalah bakteri gram negatif.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit buah pinang dapat menjadi agen antibakteri yang potensial, terutama dalam konteks pengendalian infeksi yang disebabkan oleh kedua jenis bakteri tersebut. Hal ini sangat relevan mengingat *S. mutans* adalah salah

satu bakteri utama yang berperan dalam pembentukan plak gigi dan kerusakan gigi, sedangkan *P. gingivalis* berhubungan erat dengan penyakit periodontal. Efektivitas ekstrak ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit buah pinang memiliki potensi untuk digunakan dalam formulasi produk-produk kebersihan mulut seperti pasta gigi atau obat kumur, yang dapat membantu dalam pencegahan dan pengendalian penyakit gigi dan mulut. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengkaji mekanisme aksi ekstrak ini serta potensi efek sampingnya, namun hasil awal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit buah pinang merupakan kandidat yang menjanjikan untuk pengembangan agen antibakteri alami. Untuk hasil nilai MIC ekstrak etanol kulit buah pinang dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pengujian MIC Ekstrak Etanol Kulit Buah Pinang (*Areca catechu L.*)

Bakteri uji	Hasil pengujian <i>Minimum Inhibitor Concentration</i> (%)										
	0,031	0,062	0,012	0,025	0,5	1	2	4	8	16	32
<i>S.mutans</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>P.gingivalis</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan: (+): Menghambat pertumbuhan bakteri, (-): Tidak menghambat pertumbuhan bakteri

Berdasarkan hasil pengujian MIC ekstrak etanol kulit buah pinang terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis* (Tabel 1) menunjukkan bahwa nilai MIC yang diperoleh yaitu 0,5%.

Dari hasil nilai MIC kemudian dilanjutkan dengan pengujian MBC. Pengujian MBC dilakukan dengan mengambil sampel hasil uji MIC lalu dibiakkan pada media *Nutrient Agar* (NA). Hasil nilai MBC ekstrak etanol kulit buah pinang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengujian MBC Ekstrak Etanol Kulit Pinang (*Areca catechu* L.)

Bakteri uji	Hasil pengujian <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> (%)										
	0,031	0,062	0,012	0,025	0,5	1	2	4	8	16	32
<i>S. mutans</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. gingivalis</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan: (+): Membunuh pertumbuhan bakteri, (-): Tidak membunuh pertumbuhan bakteri

Berdasarkan hasil pengujian MBC ekstrak etanol kulit buah pinang terhadap bakteri *S. mutans* dan *Porphyromonas gingivalis* (Tabel 2) menunjukkan bahwa nilai MBC yang diperoleh yaitu 0,5%.

Pada pengujian selanjutnya, dilakukan uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar. Tujuan dilakukan uji aktivitas antibakteri metode difusi agar

adalah untuk melihat seberapa besar zona hambat yang terbentuk. Zona hambat merupakan zona bening yang terbentuk di sekitar disk blank karena tidak adanya pertumbuhan bakteri yang disebabkan oleh adanya senyawa yang menghambat pertumbuhan bakteri¹⁵. Hasil dari nilai difusi agar ekstrak etanol kulit buah pinang dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil pengujian difusi agar Ekstrak Etanol Kulit Buah Pinang (*Areca catechu* L.)

Bakteri uji	Diameter zona hambat (mm)					
	2%	4%	8%	16%	K+	K-
<i>S. mutans</i>	8,01	8,74	10,56	10,93	24,13	0
<i>P. gingivalis</i>	8,51	10,09	10,65	12,58	26,86	0

Keterangan: K+ = kontrol positif (tetrakislin); K- = kontrol negatif (aquadest)

Berdasarkan hasil pengujian, ekstrak etanol kulit buah pinang menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis* pada konsentrasi 16%, dengan diameter zona hambat masing-masing 12,58 mm dan 10,93 mm. Sebagai perbandingan, kontrol positif menggunakan antibiotik tetrakislin menunjukkan diameter zona hambat yang lebih besar, yaitu 26,86 mm untuk *S. mutans* dan 24,13 mm untuk *P. gingivalis*. Penggolongan nilai zona hambat

mengklasifikasikan ekstrak etanol kulit buah pinang pada konsentrasi 2%, 4%, dan 8% sebagai sedang (zona hambat 5-10 mm), sedangkan pada konsentrasi 16% termasuk golongan kuat (zona hambat 11-20 mm). Meskipun diameter zona hambat ekstrak etanol kulit buah pinang lebih kecil dibandingkan dengan tetrakislin, hasil ini tetap menunjukkan potensi antibakteri yang signifikan. Penelitian ini memiliki relevansi yang penting dalam bidang farmasi, terutama dalam konteks peningkatan resistensi antibiotik. Antibiotik yang sering

digunakan, seperti tetrasiklin, semakin kurang efektif karena bakteri mengembangkan resistensi. Oleh karena itu, penelitian terhadap alternatif alami seperti ekstrak etanol kulit buah pinang menjadi sangat penting. Ekstrak ini dapat berpotensi menjadi alternatif pengobatan yang lebih aman dan alami, mengurangi ketergantungan pada antibiotik sintetis, serta membantu mengatasi masalah *resistensi* antibiotik.

Studi lain juga menunjukkan potensi antibakteri dari ekstrak tanaman alami. Misalnya, penelitian oleh Kumar et al. (2015) menemukan bahwa ekstrak biji pinang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif dan gram negatif, mendukung temuan bahwa senyawa alami dapat menjadi sumber agen antimikroba yang efektif. Dengan demikian, ekstrak etanol kulit buah pinang menunjukkan potensi besar sebagai agen antibakteri alami yang efektif. Pengembangan lebih lanjut dalam formulasi produk kesehatan mulut, seperti pasta gigi atau obat kumur, dapat membantu dalam pencegahan dan pengendalian infeksi bakteri. Selain itu, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memahami mekanisme aksi ekstrak ini, mengevaluasi potensi efek samping, dan menentukan aplikasi klinis yang optimal. Dengan demikian, ekstrak ini dapat berkontribusi signifikan dalam dunia farmasi *sebagai* alternatif yang lebih aman

dan efektif dalam mengatasi masalah kesehatan akibat infeksi bakteri.

KESIMPULAN

Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit buah pinang (*Areca catechu* L.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dan *Porphyromonas gingivalis*. Nilai MIC dan MBC ekstrak etanol kulit buah pinang terhadap kedua bakteri ini adalah 0,5%. Dalam uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi agar, diameter zona hambat terbesar untuk *S. mutans* pada konsentrasi 16% adalah 12,58 mm, sedangkan untuk *P. gingivalis* pada konsentrasi 16% adalah 10,93 mm.

Temuan ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit buah pinang memiliki potensi sebagai agen antibakteri yang efektif. Aktivitas antibakteri yang signifikan ini membuka peluang untuk mengembangkan obat antibakteri baru yang berbasis bahan alami. Potensi aplikasi ekstrak ini dalam formulasi produk kesehatan mulut, seperti pasta gigi atau obat kumur, dapat membantu mencegah dan mengendalikan infeksi bakteri yang umum ditemukan di rongga mulut.

Selain itu, temuan ini juga memiliki implikasi penting dalam mengatasi masalah resistensi antibiotik. Dengan meningkatnya kasus resistensi terhadap antibiotik konvensional, penelitian ini menunjukkan bahwa bahan alami seperti ekstrak kulit

buah pinang bisa menjadi alternatif yang efektif dan aman. Namun, penting untuk dicatat bahwa efektivitas antibakteri yang diamati berdasarkan model laboratorium ini memerlukan studi lebih lanjut untuk validasi klinis.

Menemukan alternatif baru untuk antibiotik yang ada sangat penting dalam menghadapi tantangan resistensi antibiotik. Penelitian ini tidak hanya menunjukkan potensi ekstrak etanol kulit buah pinang sebagai agen antibakteri, tetapi juga membuka jalan untuk eksplorasi lebih lanjut dalam pengembangan obat antibakteri berbasis bahan alami. Dengan penelitian lanjutan, ekstrak ini bisa menjadi salah satu solusi dalam mengatasi infeksi bakteri dan masalah resistensi antibiotik di masa depan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sugiharti RJ, Halimah I, Mahendra I, Sriyani ME. Biodistribusi Radiofarmaka ^{99m}Tc-Ketokonazol Pada Infeksi Yang Disebabkan Oleh *Candida Albicans*, *Staphylococcus Aureus*, Dan *Escherichia Coli*. *J Sains dan Teknol Nukl Indones*. 2016; 17(2):71
2. Kementerian Kesehatan, RI. *Permenkes Nomor 28 Tentang Pedoman Penggunaan Antibiotik*. Jakarta: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2021
3. Pratiwi RH. Mekanisme Pertahanan Bakteri Patogen Terhadap Antibiotik. *J Pro-Life*. 2017; 4(3):418–429
4. Amalia A, Sari I, Nursanty R. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Sembung (*Blumea Balsamifera* (L.) DC.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus* (MRSA). *J UIN Ar-Raniry*. 2017; 5(1):387–391
5. Purnamasari, Devi Ayu, Elly Munadzirroh, and R Mohammad Yogiartono. 2010. Konsentrasi Ekstrak Biji Kakao Sebagai Material Alam Dalam Menghambat Pertumbuhan *Streptococcus Mutans*. Universitas Airlangga. Jurnal Ilmiah
6. Pribady, H.K., Ardana, M. and Rusli, R. (2019) 'Potensi Ekstrak Kulit Buah Pinang sebagai Antibakteri *Propionibacterium acne* Penyebab Jerawat', *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*, 10, pp. 100–103. Available at: <https://doi.org/10.25026/mpc.v10i1.370>.
7. Antaryani D et al. Pendahuluan Pankreas Keadaan Normal , Ada Tersebar Di Pankreas Manusia , Pulau Semenanjung Malaya Archipelago), Filipina Dan Kepulauan Hindia Timur (East Indies Island). Pola Penyebaran Spesies Areca Di Indonesia Terutama Di Malaya, Kalimantan Dan Kel. *Farmakol J Farmasu*. 2019; XVI(2):135–144
8. Nuryanti S. Aktivitas Antifungi Sari Daun Pepaya (*Carica Papaya* L.) Terhadap *Candida Albicans*. *J As-Syifaa*. 2017; 9(2):137–145
9. Gharbani P, Jam N, Doshmanfekan H, Mehrizad A. Optimization of Synergic Antibacterial Activity of *Punica Granatum* L. and *Areca Nut* (P.G.L.A.N) Extracts Through Response Surface Methodology. *Sci Rep*. 2023; 13(1):1–8
10. Fitriana YAN, Fatimah VAN, Fitri AS. Aktivitas Anti Bakteri Daun Sirih: Uji Ekstrak KHM (Kadar Hambat Minimum) Dan KBM (Kadar Bakterisidal Minimum). *Sainteks*. 2020; 16(2):101–108
11. Nurung, A. H., Fitriana, & Herwin. 2022. 'Penentuan Aktivitas Antibakteri Fermentat Ekstrak Isolat Fungi Endofit Dari Daun Galing-Galing (*Cayratia trifolia* L)'. *As-Syifaa*. 14(1). pp. 11–17
12. Azizah M, Lingga LS, Rikmasari Y. Uji Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak

Etanol Daun Seledri (*Apium Graviolens* L.) Dan Madu Hutan Terhadap Beberapa Bakteri Penyebab Penyakit Kulit. *J Penelit Sains*. 2020; 22(1):37–44

13. Utomo SB, Fujiyanti M, Lestari WP, Mulyani S. Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Hexadecyltrimethylammonium-Bromide Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus* Dan *Escherichia Coli*. *JPKP (Jurnal Kim dan Pendidik Kim*. 2018; 3(3):201–209
14. Haeriah, Djide N, Alam G, Sartini S. Sinergitas Aktivitas Antibakteri Dari Kelopak Bunga Rosella Dan Kitosan Terhadap *Staphylococcus Aureus*. *J Farm Galen (Galenika J Pharmacy)*. 2018; 4(2):93–97
15. Indah Sagita Cahyani, A.H. and Yulianis (2020) 'Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Kulit Buah Pinang (*Areca catechu* L.) Dari Kabupaten Tanjung Jabung Barat' *Journal of Healthcare Technology and Medicine*, 6(1), pp. 2615–109. Available at: <http://www.jurnal.uui.ac.id/index.php/JH-TM/article/view/683>.
16. Tani, Priskila. Uji Daya Hambat Daging Buah Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Porphyromonas gingivalis*. *Pharmacon*, 2017, 6.3.
17. Asrianto, A., Asrori, A., Sahli, I. T., Hartati, R., Kurniawan, F. B., & Purwati, R. (2021). Bioaktivitas Ekstrak Etanol Biji Pinang (*Arecha catechu* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*: Bioactivity of Betel Nut (*Arecha catechu* L.) Ethanol Extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 3(6), 839-845.