

Pengaruh Kombinasi Ekstrak Daun Pare (*Momordica charantia* L.) dan Kunyit (*Curcuma longa*) Terhadap Kadar Kreatinin Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi CCl₄

Suchin Ramadhan*, H. Achmad Ramadhan, Abd. Hakim Laenggeng*, & I Nengah Kundera

Program Studi Pendidikan Biologi, Universitas Tadulako, Indonesia

Received: 10 Februari 2021; Accepted: 25 April 2020; Published: 5 Desember 2021

ABSTRAK

Daun pare dan kunyit mengandung senyawa-senyawa kimia seperti flavonoid dan kurkumin yang berperan sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mendeskripsikan pengaruh pemberian kombinasi ekstrak daun pare (*Momordica charantia* L.) dan kunyit (*Curcuma longa*) terhadap penurunan kadar kreatinin darah tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan karbon tetraklorida (CCl₄) dan pemanfaatannya sebagai media pembelajaran. Penelitian menggunakan eksperimen laboratorium dengan pola rancangan acak lengkap (RAL). Sebanyak 18 ekor tikus jantan diberi perlakuan. Kelompok (Kn) merupakan kelompok tanpa perlakuan, (K-) hanya diinduksi CCl₄ secara per oral, (P1) diberi kombinasi ekstrak daun pare dan kunyit konsentrasi 10%, (P2) diberi kombinasi ekstrak daun pare dan kunyit konsentrasi 20%, (P3) diberi kombinasi ekstrak daun pare dan kunyit konsentrasi 40%, dan (P4) diberi kombinasi ekstrak daun pare dan kunyit konsentrasi 80%. Data dianalisis dengan ANAVA menggunakan program STAT-27. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pemberian kombinasi ekstrak daun pare dan kunyit terhadap penurunan kadar kreatinin pada tikus. Konsentrasi kombinasi ekstrak daun pare dan kunyit yang optimal menurunkan kadar kreatinin pada tikus yang diinduksi CCl₄ yaitu pada konsentrasi 80%. Dan hasil penelitian ini layak digunakan sebagai media pembelajaran dalam bentuk poster.

Kata Kunci: Daun pare; Kunyit; Kadar kreatinin; *Rattus norvegicus*; CCl₄.

Effect of Combination of Pare (*Momordica charantia* L.) and Turmeric (*Curcuma longa*) Leaf Extracts on Creatinine Levels in CCl₄-Induced Rats (*Rattus norvegicus*)

ABSTRACT

Pare leaves and turmeric contain chemical compounds such as flavonoids and curcumin which act as antioxidants. This study aims to describe the effect of giving a combination of bitter melon leaf extract (*Momordica charantia* L.) and turmeric (*Curcuma longa*) on reducing blood creatinine levels of rats (*Rattus norvegicus*) induced by carbon tetrachloride (CCl₄) and Its Utilization as Learning Media. The study used a laboratory experiment with a completely randomized design (CRD). A total of 18 male rats were treated. The (Kn) group was the untreated group, (K-) was only induced by CCl₄ orally, (P1) was given a combination of bitter melon leaf extract and turmeric at a concentration of 10%, (P2) was given a combination of bitter melon leaf extract and turmeric at a concentration of 20%, (P3) was given a combination of bitter melon leaf extract and turmeric concentration of 40%, and (P4) was given a combination of leaf extract bitter melon and turmeric concentration 80%. Data were analyzed by ANOVA using the STAT-27 program. The results showed that there was a significant effect of giving a combination of bitter melon leaf extract and turmeric to decrease creatinine levels in rats. The optimal concentration of the combination of bitter melon leaf extract and turmeric reduced creatinine levels in CCl₄-induced rats at a concentration of 80%. And the results of this study deserve to be used as a learning medium in the form of a poster.

Keywords: Bitter gourd; Turmeric; Creatinine levels; *Rattus norvegicus*; CCl₄.

PENDAHULUAN

Pengobatan herbal atau sering disebut juga pengobatan tradisional merupakan salah satu upaya dalam pengobatan atau perawatan di luar ilmu kedokteran, pengobatan tradisional perlu dibina, dikembangkan dan diawasi agar dapat dipertanggungjawabkan manfaat dan keamanannya. Obat herbal di Indonesia merupakan warisan budaya bangsa sehingga perlu digali, diteliti dan dikembangkan agar dapat digunakan lebih luas oleh masyarakat untuk digunakan sebagai obat tradisional (Dewoto, 2007). Indonesia yang beriklim tropis memiliki keanekaragaman hayati terbesar kedua di dunia setelah Brazil, memiliki sekitar 25.000-30.000 spesies tanaman yang merupakan 80% dari jenis tanaman di dunia dan 90% dari jenis tanaman di Asia. Daun pare (*Momordica charantia* L.) dan kunyit (*Curcuma longa*) merupakan 2 jenis tanaman dari sekian banyaknya jenis tumbuhan tersebut (Budianto, 2014).

Beberapa daerah menggunakan tanaman pare untuk dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Daunnya berkhasiat sebagai obat cacangan, obat batuk, obat demam, peluruh haid, obat sembelit, penambah nafsu makan, melancarkan pengeluaran ASI, mengobati penyakit sipilis, dan liver (Aulya, 2012).

Tanaman kunyit atau kunir, (*Curcuma longa* Linn. syn. *Curcuma domestica* Val.) termasuk salah satu tanaman rempah dan obat asli dari wilayah Asia. Khasiat atau manfaat dari tanaman kunyit baik sebagai pelengkap bumbu masakan, jamu/obat-obatan atau untuk menjaga kesehatan dan kecantikan. Tetapi dapat juga digunakan sebagai obat tradisional dalam mencegah racun yang masuk ke dalam tubuh (Fachry, 2013).

Pare dan kunyit merupakan tanaman yang dimanfaatkan secara turun-temurun sebagai obat tradisional oleh beberapa kelompok etnis di Indonesia, seperti masyarakat suku "Topo Uma" di desa Oo Parese kecamatan Kulawi Selatan Kabupaten Sigi Sulawesi Tengah yang telah mengenal pemanfaatan tumbuhan ini untuk kehidupan sehari-hari sebagai obat tradisional. Bagian dari tanaman pare yang digunakan adalah daunnya, dengan cara pengolahan diremas lalu dioles diketiak balita untuk menyembuhkan penyakit panas tinggi dan batuk. Sementara, bagian rimpang kunyit digunakan untuk

menghilangkan bekas luka bakar dengan cara pengolahannya ditumbuk lalu ditempelkan dibagian yang terkena luka bakar (Yulia, dkk, 2017).

Tanaman pare memiliki kandungan senyawa aktif yang diantaranya flavonoid, lektin, polifenol, vitamin C, glikosida kurkubitasin, momordisin dan kharantin. Flavonoid, polifenol, dan vitamin C, tanin, saponin, steroid dan terpenoid berperan sebagai antioksidan (Liqolbinisa, 2017).

Menurut Purba (2009), salah satu bahan alam yang juga mengandung senyawa antioksidan adalah kunyit yang memiliki bahan aktif yaitu kurkumin. Kurkumin adalah fraksi dari kurkuminoid yang mengandung banyak khasiat.

Dengan demikian hal-hal tersebut yang melatar belakangi pentingnya dilakukan penelitian mengenai pengaruh kombinasi ekstrak daun pare (*Momordica charantia* L.) dan kunyit (*Curcuma longa*) terhadap kadar kreatinin darah tikus yang diinduksi karbon tetraklorida (CCl₄).

METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif kuantitatif. Menurut Sugiyono (2012), penelitian deskriptif kuantitatif merupakan jenis penelitian yang bertujuan untuk menginterpretasikan data penelitian (angka) agar lebih mudah dipahami. Metode penelitian ini adalah eksperimen laboratorium dengan pola rancangan acak lengkap (RAL). Sampel yang digunakan sebanyak 18 ekor tikus jantan, yang terdiri dari 6 perlakuan dan 3 ulangan. Kelompok (Kn) merupakan kelompok tanpa perlakuan, (K-) hanya diinduksi CCl₄ secara per oral, (P1), (P2), (P3), dan (P4) diberi kombinasi ekstrak daun pare dan kunyit konsentrasi 10%, 20% 40%, 80%. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANAVA yang diolah dengan program STAT-27.

Prosedur Kerja Penelitian

Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan. Daun pare dan kunyit dibersihkan, hasil dari perajangan dijemur pada sinar matahari secara tidak langsung. Pembuatan ekstrak daun pare dan kunyit dengan metode meserasi menggunakan pelarut etanol dan dilakukan proses pemisahan ekstrak dari pelarut dengan metode

evaporasi. Dilanjutkan dengan persiapan hewan coba yaitu 18 ekor tikus putih jantan. Sampel tikus dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, 2 kelompok kontrol: kontrol normal (Kn) tanpa diberi perlakuan dan kontrol negatif (K-) hanya diinduksi CCl_4 0,2 ml secara oral selama 7 hari. Dan pada hari ke delapan, perlakuan 1 (P1) diberi kombinasi ekstrak 10%, perlakuan 2 (P2) diberi kombinasi ekstrak 20%, perlakuan 3 (P3) diberi kombinasi ekstrak 40%, dan perlakuan 4 (P4) diberi kombinasi ekstrak 80% per oral selama 7 hari. Pada hari ke 15 sampel dibedah dan diambil serum darahnya dengan menggunakan sentrifug kecepatan 3000 rpm selama 15 menit dan mengukur absorbansi sampel dengan menggunakan Spektrofotometer dengan panjang gelombang 546 nm.

Analisis Data

Data kadar kreatinin dianalisis dengan teknik analisis varians (ANOVA) yang diolah menggunakan program STAT-27.

HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL

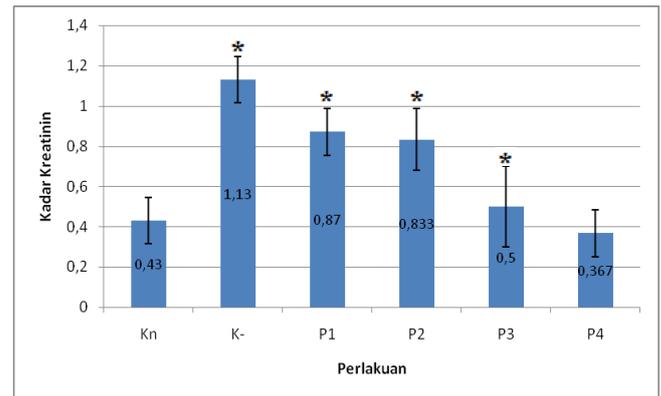
Hasil penelitian pengaruh ekstrak daun pare dan kunyit terhadap kadar kreatinin pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) setelah diinduksi karbon tetraklorida (CCl_4) dapat diuraikan sebagai berikut:

Tabel 4.1 Hasil Pengukuran Kadar Kreatinin Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Keterangan : K- = kontrol negatif (pemberian CCl_4 selama 7 hari); Kn = kontrol normal (pemberian makan dan minum); P1, P2, P3 dan P4 = perlakuan (dengan konsentrasi kombinasi ekstrak daun pare dan kunyit 10%, 20%, 40%, dan 80%)

Grafik Rata-rata Kadar Kreatinin Pada Tikus

Perlakuan	Konsentrasi	Ulangan			Jumlah	Rata-rata
		I	II	III		
Kn	Kontrol (normal)	0,5	0,5	0,3	1,3	0,43
K-	Kontrol (-)	1,2	1,2	1	3,4	1,13
P1	10%	1	0,8	0,8	2,6	0,87
P2	20%	1	0,7	0,8	2,5	0,833
P3	40%	0,3	0,7	0,5	1,5	0,5
P4	80%	0,5	0,3	0,3	1,1	0,367



Gambar 1. Grafik rata-rata jumlah kadar kreatinin tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi ekstrak daun pare (*Momordica charantia* L.) dan kunyit (*Curcuma longa*) pada konsentrasi yang berbeda. (K- = kontrol negatif (pemberian CCl_4) selama 7 hari); Kn = kontrol normal (pemberian makan dan minum); P1, P2, P3 dan P4 = perlakuan (dengan konsentrasi ekstrak daun pare dan kunyit 10%, 20%, 40%, dan 80%) (keterangan; *berbeda nyata (<0,05))

Data yang diperoleh, kemudian diuji dengan ANOVA program STAT-27 yang dilakukan untuk mengetahui pengaruh kombinasi ekstrak daun pare (*Momordica charantia* L.) dan kunyit (*Curcuma longa*) dalam kadar kreatinin pada tikus (*Rattus norvegicus*). Hasil dari ANOVA tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.2 berikut:

Tabel 4.2 Analisis Sidik Ragam Jumlah Kadar Kreatinin Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Sumber Keragaman	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F _{hitung}	F _{tabel} 5%
Perlakuan	5	1,36444	0,27289	14,03429	3,11
Galat	12	0,23333	0,01944		
Total	17	1,59778			

Berdasarkan hasil penelitian dapat dilihat bahwa kadar kreatinin pada tikus (*Rattus norvegicus*) di atas menunjukkan $F_{hitung} > F_{tabel}$ yang berarti hipotesis nol (H_0) ditolak dan hipotesis alternatif (H_1) diterima.

Tabel 4.3 Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Jumlah Kadar Kreatinin Tikus

Konsentrasi %	Rata-rata Perlakuan	Rata-rata			BNT 5%
K (-)	1,133				0,2481
K (+)	0,433	-0,7			
P1 (10%)	0,87	0,266*	0,434*		
P2 (20%)	0,833	0,3*	0,4*	0,034	
P3 (40%)	0,5	0,633*	0,067	0,367* 0,333*	
P4 (80%)	0,367	0,766*	0,066	0,5* 0,466* 0,133	

Keterangan: * Berbeda Nyata

Berdasarkan Tabel 4.3 Uji lanjut BNT yang dilakukan didapatkan nilai BNT sebesar 0,2481%. Nilai BNT yang diperoleh menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata dari tiap perlakuan.

PEMBAHASAN

Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa setelah pemberian CCl_4 (Karbon Tetraklorida) pada perlakuan kontrol negatif, rata-rata jumlah kadar kreatinin pada serum darah tikus putih meningkat menjadi 1,133 mg/dL. Bila dibandingkan dengan kontrol normal (0,433 mg/dL). Peningkatan jumlah kreatinin di dalam darah menunjukkan penurunan fungsi ginjal (Bashandy & Alwasel, 2011). Toksisitas CCl_4 dapat disebabkan oleh bentuk metabolitnya yaitu CCl_3 (Trichloromethyl). Metabolisme CCl_4 akan menghasilkan radikal bebas CCl_3 , kemudian CCl_3 akan memicu terjadinya peroksidasi lipid yang bisa menyebabkan kerusakan membran dan hilangnya fungsi sel dan organel (Hossain, dkk, 2014). Sifat toksik CCl_4 telah terbukti dari beberapa penelitian, bahwa dosis yang kecil sekalipun dapat menimbulkan efek pada berbagai organ tubuh termasuk susunan saraf pusat, hepar, ginjal dan peredaran darah (Lesage, dkk, 1999).

Berdasarkan hasil penelitian pada tabel 4.2 dapat dilihat bahwa kadar kreatinin pada tikus menunjukkan $F_{hitung} > F_{tabel}$ yang berarti hipotesis nol (H_0) ditolak dan hipotesis alternatif (H_1) diterima. Hipotesis alternatif (H_1) yang diterima adalah kombinasi ekstrak daun pare (*Momordica charantia* L.) dan kunyit (*Curcuma longa*) berpengaruh dalam kadar kreatinin tikus putih setelah diinduksi CCl_4 . Kemudian H_1 yang

diterima adalah terdapat salah satu konsentrasi kombinasi ekstrak daun pare (*Momordica charantia* L.) dan kunyit (*Curcuma longa*) yang efektif berpengaruh dalam kadar kreatinin pada tikus setelah diinduksi CCl_4 . Dengan demikian terlihat adanya pengaruh kombinasi ekstrak daun pare dan kunyit dalam kadar kreatinin pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) setelah diinduksi CCl_4 .

Berdasarkan Tabel 4.3 Uji lanjut BNT yang dilakukan didapatkan nilai BNT sebesar 0,2481%. Pada perlakuan pemberian kombinasi ekstrak daun pare dan kunyit 10% berbeda nyata dengan konsentrasi 20%, 40%, 80% dan kontrol normal (Kn). Perlakuan pemberian kombinasi ekstrak daun pare dan kunyit dengan konsentrasi 20% berbeda nyata dengan konsentrasi 40%, 80% dan kontrol normal (Kn). Begitu juga dengan perlakuan 80% berbeda nyata dengan kontrol negatif (K-). Dengan demikian kombinasi ekstrak daun pare dan kunyit pada konsentrasi 80% efektif menurunkan kadar kreatinin serum darah tikus.

Ginjal mempunyai volume aliran darah yang tinggi, mengkonsentrasi toksikan pada filtrat, dan membawa toksikan melalui sel tubulus, serta mengaktifkan toksikan tertentu. Akibatnya ginjal merupakan organ sasaran utama dari efek toksik (Lu, 1995 dalam Santoso 2006).

Pada pemberian CCl_4 (Karbon Tetraklorida) menimbulkan efek yang dapat dilihat dari perilaku dan keadaan fisik hewan percobaan. Pada tikus yang diberikan CCl_4 (Karbon Tetraklorida), terlihat bahwa tikus menjadi lemas, lebih banyak tidur, kurang agresif, dan menyebabkan bulu tikus mengalami kerontokan.

Aktivitas sebagai antioksidan yang dimiliki oleh sebagian besar flavonoid disebabkan oleh adanya gugus hidroksi fenolik dalam struktur molekulnya juga melalui daya tangkap terhadap radikal bebas serta aktivitasnya sebagai penarik logam. Sesuai mekanisme kerjanya antioksidan memiliki dua fungsi, yaitu sebagai pemberi atom hidrogen dan memperlambat laju autooksidasi yang menghambat terbentuknya radikal lipid. Dengan memberikan atom hidrogen pada radikal

lipid maka radikal lipid tersebut akan berubah menjadi bentuk lebih stabil dan tidak mengakibatkan kerusakan lebih lanjut (Prasetyo 2002 dalam Ardhini 2006).

Berdasarkan penelitian Amdat (2017) dengan judul penelitian “Pengaruh Pemberian Ekstrak Bunga Mawar Merah (*Rosa damascena* Mill.) Terhadap Morfologi Sel Ginjal Pada Tikus Putih Galur Wistar (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Karbon Tetraklorida (CCl_4)”. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada pemberian ekstrak bunga mawar merah dapat memperbaiki kerusakan sel nekrosis ginjal tikus Wistar pada perlakuan dosis II (500 mg).

Hasil penelitian yang telah dilakukan, menunjukkan terjadinya peningkatan dalam kadar kreatinin serum darah yang diinduksi oleh CCl_4 . Penurunan kadar kreatinin merupakan salah satu indikasi kesembuhan ginjal yang mengalami kerusakan atau terjadinya perlindungan ginjal dari kerusakan yang diakibatkan oleh CCl_4 . Dengan demikian pemberian kombinasi ekstrak daun pare (*Momordica charantia* L.) dan kunyit (*Curcuma longa*) dapat mempengaruhi penurunan dalam kadar kreatinin pada tikus (*Rattus norvegicus*).

Media pembelajaran yang dihasilkan dari penelitian ini berupa poster. Analisis media pembelajaran dilakukan dengan menguji kelayakan poster dengan melakukan validasi poster oleh tim dosen ahli isi, media dan desain serta 20 orang mahasiswa yang berperan sebagai validator sehingga dapat diperoleh hasil kelayakan media pembelajaran. Setelah dilakukan validasi media, diperoleh dari tim ahli isi sebesar 68%, ahli desain sebesar 76%, ahli media sebesar 82%, dan mahasiswa sebesar 82,88% dengan rata-rata 77,22%. Dari hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa poster layak dijadikan sebagai media pembelajaran. Arikunto (1996) menyatakan kategori kelayakan media pembelajaran pada presentase 76%-100% dikatakan layak.

KESIMPULAN

Pemberian kombinasi ekstrak daun pare dan kunyit berpengaruh signifikan dalam penurunan kadar kreatinin darah tikus. Konsentrasi kombinasi ekstrak daun pare dan kunyit yang optimal menurunkan kadar kreatinin pada tikus yang diinduksi CCl_4 yaitu konsentrasi 80%. Serta hasil penelitian ini layak digunakan sebagai media pembelajaran berupa poster.

DAFTAR PUSTAKA

- Arikunto. S. (1996). *Prosedur Penilaian Suatu Pendekatan Praktek*. Jakarta: PT. Rineka Cipta.
- Amdat, M.K.S. (2017). Pengaruh Pemberian Ekstrak Bunga Mawar Merah (*Rosa damascena* Mill.) terhadap Morfologi Sel Ginjal Pada Tikus Putih Galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Karbon Tetraklorida (CCl_4). *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Ardhini, R. (2006). Pengaruh Pemberian Ekstrak Meniran (*Phyllanthus* sp.) terhadap Gambaran Mikroskopik Ginjal Tikus Wistar yang Diinduksi Karbon Tetraklorida. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
- Aulya S. (2012). Adsorpsi, Emulsifikasi, dan Antibakteri Ekstrak Daun Pare (*Momordica charantia*). *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Bashandy, S. A., & AlWasel, S.H. (2011). Carbon Tetrachloride –Induced Hepatotoxicity And Nephrototoxicity In Rats: Protective Role Of Vitamin C. *Jurnal of Pharmacology and Toxicology*. 6(3), 283-292.
- Budianto, N.E.W. (2014). Ekstrak Etanol Kunyit (*Curcuma domestica* Val.) Dalam Mencegah Peningkatan Keasaman Lambung *Rattus norvegicus* yang

- Diinduksi Histamin. *Jurnal Ilmiah Kedokteran*, 3(1), 48-59.
- Dewoto, H. R. (2007). *Pengembangan Obat Tradisional Indonesia Menjadi Fitofarmaka*. Jakarta: Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Halaman 205–211.
- Fachry, A.R., Ferila, B., & Farhan, M. (2013). Ekstraksi Senyawa Kurkuminoid Dari Kunyit (*Curcuma longa* Linn.) Sebagai Zat Pewarna Kuning pada Proses Pembuatan Cat. *Jurnal Teknik Kimia*, 19(3), 10-19.
- Liqolbinisa, S.H., Rismawati, E., & Syafnir, L. (2017). Pengujian Potensi Antioksidan dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Buah Pare (*Momordica charantia* L.). *Prosiding Farmasi*, 3(2), 673-677.
- Nusmara, K.G. (2012). Uji Stabilitas dan Aktivitas Pertumbuhan Rambut Tikus dari Sediaan Hair Tonic yang Mengandung Ekstrak Etanol Daun Pare (*Momordica charantia*). *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Program Studi Farmasi. Depok.
- Pazry, M. (2017). Uji Keberadaan Bakteri *Escherichia coli* Pada Produk Pengolahan Daging Kepiting Kaleng di Laboratorium Pengendalian dan Pengujian Mutu Hasil Perikanan Provinsi Lampung. *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
- Purba, E. R., & Martosupono, M. (2009). Kurkumin Sebagai Senyawa Antioksidan. *Prosiding Seminar Nasional Sains & Pendidikan Sains*. 4(3), 607-621.
- Santoso, H.B., & Nurliani, A. (2006). Efek Doksisisiklin Masa Organogenesis pada Struktur Histopatologi Organ Hati dan Fetus Mencit. *Jurnal BIOSCIENTIAE*. 3(1), 15-27.
- Sugiyono. (2012). *Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R&D*. Bandung: Alfabeta
- Yulia, C., Fahri., & Ramadhanil. (2017). Studi Etnobotani Tumbuhan Obat Suku “Topo Uma” Di Desa Oo Parese Kecamatan Kulawi Selatan Kabupaten Sigi Sulawesi Tengah. *Biocelbes*. 12(2), 1-22.