

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI KLOOROFORM EKSTRAK ETANOL PEGAGAN (*Centella asiatica* (L) Urb) SERTA IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIFNYA

¹Fahrina Rachmawati, ¹Maulita Cut Nuria, ²Sumantri

¹Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

²Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

ABSTRAK

Penyakit infeksi merupakan penyakit yang banyak diderita oleh masyarakat dan terus berkembang dari waktu ke waktu dalam dunia kesehatan. Ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica* (L) Urb) memiliki aktivitas antimikroba yang lebih baik daripada ekstrak petroleum eter dan air (Jagtap *et al.*, 2009). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas antibakteri fraksi kloroform dari ekstrak etanol pegagan terhadap bakteri Gram positif (*S. aureus* dan *B. subtilis*) dan Gram negatif (*E. coli*, *P. aeruginosa* dan *S. typhi*), mengetahui besarnya aktivitas antibakteri dari fraksi kloroform tersebut dan mengidentifikasi golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi tersebut.

Ekstrak etanol pegagan diperoleh dengan menyari simplisia menggunakan penyari etanol 96% secara sokletasi, lalu diuapkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak tersebut kemudian difraksinasi bertingkat dengan pelarut *n*-heksan dan kloroform. Fraksi kloroform yang diperoleh diuapkan hingga kekentalan sekitar 300 cps kemudian dilarutkan dalam DMSO, konsentrasi yang digunakan adalah 2063; 1031,5; 515,7; 257,8; 128,9 $\mu\text{g}/\text{disk}$. Aktivitas antibakteri dilakukan secara difusi agar, identifikasi senyawa aktif menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Fraksi kloroform memiliki aktivitas antibakteri terhadap *B. Subtilis* dan *P.aeruginosa*, tetapi tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*, *E. coli* dan *S. typhi*. Fraksi kloroform tersebut dapat menghambat *B. subtilis* pada konsentrasi 257,8; 515,7; 1031,5; 2063 $\mu\text{g}/\text{disk}$ dengan DDH berturut-turut sebesar 7,50; 7,86; 8,63; 9,76 mm, sedangkan *P.aeruginosa* pada konsentrasi 515,7; 1031,5; 2063 $\mu\text{g}/\text{disk}$ dengan DDH berturut-turut sebesar 8,10; 9,10; 10,20 mm. Fraksi kloroform tersebut mengandung senyawa fenol dan terpenoid.

Kata kunci : Fraksi kloroform ekstrak etanol pegagan, aktivitas antibakteri, senyawa fenol dan terpenoid.

PENDAHULUAN

Di negara berkembang hampir 15 juta orang meninggal setiap tahunnya diakibatkan oleh penyakit infeksi. Beberapa penyakit infeksi yang masuk dalam daftar 10 penyakit terbanyak yang diderita masyarakat Indonesia diantaranya adalah diare, infeksi saluran pernapasan akut dan pneumonia (Anonim, 2007 ; Anonim, 2008). Penyebab penyakit infeksi tersebut diantaranya adalah bakteri *E. coli*, *P. aeruginosa* atau *B. subtilis*.

Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) memiliki berbagai khasiat diantaranya membersihkan darah, mengatasi demam, antibakteri, antiinflamasi, antialergi, insektisida, dan stimulant. Pegagan mempunyai kandungan kimia aktif seperti saponin, asiatikosida, madekasosida, asam brahmik, asam madasiatik, messoinositol, centellosida, karotenoida, hidroksitolin, vellarine (campuran damar dan minyak atsiri), tannin, serta garam mineral (Lasmadiwati, 2003).

Penelitian yang dilakukan oleh Jagtap *et al.*, (2009) mengenai aktivitas antimikroba pada ekstrak petroleum eter, etanol dan air dari tanaman pegagan dilakukan dengan metode difusi agar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol pegagan merupakan ekstrak yang paling aktif dibandingkan ekstrak petroleum eter dan ekstrak air.

Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian yang telah dilakukan oleh Jagtap *et al.*, (2009) dengan cara memfraksinasi ekstrak etanol pegagan secara partisi cair-cair. Fraksinasi dilakukan bertingkat menggunakan pelarut non polar yakni heksan dan kloroform. Fraksi kloroform hasil fraksinasi inilah yang digunakan pada penelitian ini. Uji kualitatif dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif dalam fraksi uji yang berpotensi sebagai antibakteri.

METODOLOGI

Bahan Penelitian

1. Bahan penelitian : herba pegagan (*Centella asiatica* (L) Urb) berumur \pm 6 bulan yang diperoleh dari desa Sumur Jurang, kecamatan Gunung Pati kabupaten Semarang dan dipanen pada bulan Juni 2010.
2. Bahan penyari : etanol 96% (berderajat p.a)
3. Bahan untuk fraksinasi dengan metode partisi cair-cair : *n*-heksan, kloroform, dan campuran aquadest-etanol.
4. Bahan untuk uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar :
 - a) Bakteri : *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, dan *Staphylococcus aureus*
 - b) Media : *Nutrient broth* (NB) (Merck), *nutrient agar* (NA) (Merck)
 - c) Kontrol positif : Antibiotik Ciprofloksasin 10 μ g/disk (Oxoid)
 - d) Kontrol negatif : Dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck)
5. Bahan untuk uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) :
 - a) Fase diam untuk identifikasi senyawa fenol dan terpenoid adalah silika gel F₂₅₄ (Merck), sedangkan untuk flavonoid adalah selulosa (Merck).
 - b) Fase gerak untuk identifikasi senyawa fenol adalah metanol : asam formiat (95:5), identifikasi senyawa terpenoid adalah toluen : etil asetat (93:7), sedangkan untuk identifikasi senyawa flavonoid adalah etil asetat-asam formiat-asam asetat-air (100:11:11:27). Reagen yang digunakan berderajat pro analisis.
 - c) Penampak bercak untuk senyawa fenol adalah ferri klorida, untuk senyawa terpenoid adalah vanilin – asam sulfat, sedangkan senyawa flavonoid adalah uap amoniak (Wagner, 1984).

Alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah *moisture balance*, blender (Maspion), perangkat alat sokletasi, alat-alat gelas (Iwaki Pyrex), oven (Memmert), timbangan analitik (Ohaus AR2140), inkubator (Binder), micropipette (Socorex), waterbath (Memmert), autoklaf (All American), *Laminar Air Flow* (LAF) (Model : LAF 105/1 18), rotary evaporator (Eyela Rotary Vacuum Evaporator n-n series sb-651), bejana kromatografi, lampu UV 254, 366 nm.

Jalannya Penelitian

1.Pembuatan Ekstrak Etanol Pegagan

Pembuatan ekstrak pada penelitian ini dilakukan dengan menyari serbuk pegagan menggunakan metode sokletasi. Proses sokletasi dilakukan sebagai berikut : serbuk pegagan sebanyak 400 gram dibagi menjadi 4 bagian yang sama banyak, sehingga proses sokletasi dilakukan sebanyak 4 kali. Serbuk pegagan diekstraksi dengan penyari etanol 96% menggunakan alat soxhlet pada suhu 60-80°C kemudian ditunggu hingga zat aktif dalam simplisia tersari seluruhnya yang ditandai dengan jernihnya cairan yang lewat pada tabung sifron. Sari atau menstrum pegagan yang diperoleh dari 4 kali sokletasi selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C sampai diperoleh ekstrak kental (Harborne, 1996). Ekstrak etanol pegagan yang diperoleh kemudian dikumpulkan dan diukur bobotnya untuk menghitung rendemen yang dihasilkan.

2.Pembuatan Fraksi Kloroform dari Ekstrak Etanol Pegagan

Ekstrak kental sebanyak 50 gram dilarutkan ke dalam 50 ml air hingga seluruh ekstrak larut sempurna, karena ada bagian yang tidak larut maka ditambahkan 10 ml campuran air dan etanol (9:1). Selanjutnya difraksinasi menggunakan corong pisah dengan pelarut *n*-heksan terlebih dahulu kemudian kloroform yang bersifat semi polar. Proses ini dilakukan hingga pelarut kloroform jernih. Jumlah pelarut yang digunakan untuk fraksinasi sebanding dengan jumlah air yang ditambahkan ke dalam ekstrak etanol (perbandingan 1:1). Fase kloroform yang diperoleh kemudian ditampung dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator*. Fraksi kloroform yang diperoleh diukur beratnya dan diuji aktivitas antibakterinya.

3.Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji dibuat dari fraksi kloroform ekstrak etanol pegagan. Fraksi tersebut dibuat lima seri konsentrasi yaitu 206,3 ; 103,15 ; 51,57 ; 25,78 dan 12,89 mg/ml, kemudian dilarutkan dengan pelarut dimetilsulfoksida (DMSO). Larutan uji tersebut kemudian dikonversi dosisnya dalam satuan $\mu\text{g/disk}$ (2063; 1031,5; 515,7 ; 257,8 ; 128,8 $\mu\text{g/disk}$).

4.Uji Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri diuji dengan metode difusi agar. Larutan uji sebanyak 10 μl ditetaskan diatas *paperdisk* (diameter = 6 mm) kemudian dibiarkan hingga mengering. Suspensi bakteri sebanyak 200 μl dicampur dengan 20 ml media nutrient agar (dalam keadaan hangat), digojog supaya homogen kemudian dituang ke dalam cawan petri. Ditunggu beberapa saat hingga media membeku. *Paperdisk* yang mengandung larutan uji kemudian diletakkan di atas permukaan media agar, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kontrol positif menggunakan antibiotik ciprofloxacin 10 $\mu\text{g/disk}$ dan kontrol negatif digunakan *paperdisk* yang telah ditetesi pelarut DMSO.

5.Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Bejana pengembang sebelumnya telah dijenuhi dulu dengan fase gerak yang akan digunakan. Larutan uji ditotolkan pada lempeng silika gel F₂₅₄ kemudian ditunggu hingga totolan kering. Setelah itu dielusi dalam bejana pengembang. Lempeng silika dikeringkan kemudian diamati bercaknya pada sinar UV_{254 nm} dan UV_{365 nm}. Deteksi dilakukan dengan penampak bercak ferri klorida untuk senyawa fenolik, diuapi amoniak untuk deteksi flavonoid, serta penampak bercak vanilin asam sulfat untuk senyawa terpenoid.

6. Analisis Data

Pembacaan hasil dari uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar adalah dengan mengamati terbentuknya zona jernih di sekitar *paperdisk* yang menunjukkan ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri. Hasil identifikasi golongan senyawa aktif dari fraksi ekloroform ekstrak etanol pegagan dilakukan dengan melihat kromatogram berdasarkan warna yang terbentuk pada bercak dan kesesuaian bercak senyawa uji dengan bercak senyawa standar. Setelah itu dilakukan penghitungan nilai faktor retardasi (*Rf*) pada masing-masing bercak.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Fraksinasi Pegagan

Ekstrak kental yang dihasilkan dari proses evaporasi adalah 115 gram, dengan warna hijau tua dan bau khas, sehingga rendemen hasil yang diperoleh adalah 12,706 %^b/_b. Fraksi kloroform yang diperoleh setelah proses penguapan adalah 825,2 mg.

Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan berbagai tingkat konsentrasi yang bertujuan untuk mengetahui apakah kenaikan konsentrasi akan meningkatkan aktivitas antibakterinya. Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik Ciprofloxacin, kontrol negatifnya adalah DMSO (dimetilsulfoksida). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kontrol negatif tidak memberikan zona hambatan. Hal tersebut membuktikan bahwa pelarut tidak berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri, sehingga aktivitas hanya berasal dari larutan uji, bukan dari pelarut yang dipakai.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa larutan uji memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis* yang ditandai dengan adanya daerah hambatan di sekitar *paper disk*. Pada kadar 257,8 $\mu\text{g}/\text{disk}$ larutan uji hanya bisa menghambat bakteri *B. subtilis*. Bila konsentrasi dinaikkan menjadi 515,7 $\mu\text{g}/\text{disk}$ maka larutan uji bisa menghambat *B. subtilis* dan *P. aeruginosa*. Bila konsentrasi terus dinaikkan sampai 2063 $\mu\text{g}/\text{disk}$, maka larutan uji hanya bisa menghambat kedua bakteri tersebut dengan nilai DDH yang tidak terlalu jauh berbeda (Tabel I).

Tabel I. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Kloroform dari Ekstrak Etanol Pegagan Terhadap Bakteri Uji dengan Diameter *Paperdisk* 6 mm. Nilai DDH merupakan nilai rata-rata dari 3 kali pengukuran.

Konsentrasi Larutan Uji ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	Diameter Daerah Hambat (mm)	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>
128,9	-	-
257,8	-	7,50
515,7	8,10	7,86
1031,5	9,10	8,63
2063	10,20	9,76
Ciprofloksasin 10 $\mu\text{g}/\text{disk}$	27,50	26,75
DMSO	-	-

Larutan uji pada kadar 257,8 $\mu\text{g}/\text{disk}$ menghasilkan DDH sebesar 7,50 mm pada *B. subtilis*, sedangkan antibiotik ciprofloksasin pada kadar 10 $\mu\text{g}/\text{disk}$ menghasilkan DDH sebesar 26,75 mm. Hal ini berarti bahwa aktivitas antibakteri larutan uji lebih lemah dibandingkan kontrol positifnya, sehingga harus dilakukan upaya untuk meningkatkan

aktivitasnya, salah satunya dengan jalan isolasi senyawa aktif dari larutan uji. Isolasi senyawa aktif akan menghasilkan senyawa yang lebih spesifik sehingga aktivitasnya akan lebih spesifik karena tidak ada lagi senyawa-senyawa pengotor yang bisa mengganggu aktivitas antibakteri larutan uji.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa larutan uji lebih mudah menghambat bakteri Gram positif dibandingkan bakteri Gram negatif, artinya bakteri Gram positif lebih rentan terhadap senyawa-senyawa kimia dibandingkan Gram negatif. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan komposisi dan struktur dinding sel pada bakteri Gram positif dan Gram negatif. Struktur dinding sel bakteri Gram positif lebih sederhana, yaitu berlapis tunggal dengan kandungan lipid yang rendah (1-4%) sehingga memudahkan bahan bioaktif masuk ke dalam sel. Struktur dinding sel bakteri Gram negatif lebih kompleks, yaitu berlapis tiga terdiri dari lapisan luar lipoprotein, lapisan tengah lipopolisakarida yang berperan sebagai penghalang masuknya bahan bioaktif antibakteri, dan lapisan dalam berupa peptidoglikan dengan kandungan lipid tinggi (11-12%)(Jawetz *et al.*, 2005).

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap Gram negatif hanya *P. aeruginosa* yang bisa dihambat sedangkan bakteri *E. coli* dan *S. typhi* tidak bisa dihambat. Hal ini kemungkinan disebabkan karena *E. coli* dan *S. typhi* mempunyai struktur antigenik yang kompleks dibandingkan *P. aeruginosa*. Struktur antigenik kompleks tersebut meliputi antigen O yang berperan alam resistensi terhadap aktivitas bakterisidal, antigen K (kapsular) dan antigen H (flagellar) berfungsi untuk meningkatkan daya invasif dari bakteri patogen. Pada *S. typhi*, antigen kapsular disebut antigen Vi. Antigen O merupakan bagian terluar dinding sel lipopolisakarida dan terdiri dari unit berulang polisakarida. Bakteri *P. aeruginosa* hanya mempunyai polisakarida, tetapi tidak mempunyai lipopolisakarida yang tersusun dari unit pengulangan polisakarida. Hal ini menyebabkan *P. aeruginosa* tidak mempunyai struktur antigen yang kompleks. Antigen O memiliki sifat tahan terhadap panas dan alkohol, sehingga hal ini memungkinkan *E. coli* dan *S. typhi* lebih tahan terhadap senyawa-senyawa yang terkandung dalam larutan uji (Jawetz *et al.*, 2005).

Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dengan metode KLT

Berdasarkan penelusuran literatur, kemungkinan senyawa yang bisa tertarik dalam fraksi kloroform ekstrak etanol pegagan adalah senyawa fenol, flavonoid dan terpenoid. Oleh karena itu dilakukan identifikasi terhadap ketiga senyawa tersebut secara kualitatif menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Kromatogram identifikasi golongan senyawa fenol menunjukkan bercak berwarna abu-abu pada daerah visibel. Berdasarkan reaksi warna pada kromatogram dapat diketahui bahwa fraksi kloroform ekstrak etanol pegagan mengandung senyawa fenol. $FeCl_3$ bisa digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa fenol. Bila senyawa fenol direaksikan dengan $FeCl_3$ akan menjadi berwarna abu-abu atau hitam (Harborne, 1996).

Kromatogram identifikasi flavonoid tidak menunjukkan warna kuning setelah diuapi amoniak pada daerah visibel namun pembanding rutin memberikan warna kuning. Hasil tersebut menunjukkan bahwa fraksi kloroform ekstrak etanol pegagan tidak mengandung senyawa flavonoid. Kromatogram identifikasi terpenoid menunjukkan bercak berwarna ungu pada daerah visibel. Berdasarkan reaksi warna pada kromatogram di bawah dapat diketahui bahwa fraksi kloroform ekstrak etanol pegagan mengandung senyawa terpenoid. Warna violet yang terdeteksi pada kromatogram setelah direaksikan dengan penampak bercak vanilin asam sulfat diakibatkan oleh reaksi Liebermann-Burchard, yaitu salah satu reaksi warna yang paling umum pada senyawa terpenoid tinggi dan steroid. Pereaksi ini merupakan campuran antara asam asetat anhidrat dan asam sulfat

pekat. Menurut Wagner (1984) senyawa terpenoid dapat dideteksi dengan pereaksi vanilin asam sulfat dengan mekanisme abstraksi H⁺ sehingga terbentuk senyawa yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi. Ikatan rangkap dua pada struktur kimia terpenoid memiliki spektrum serapan pada sinar ultraviolet dan sinar visibel, sehingga deteksi di daerah cahaya tampak terlihat berwarna violet (Wagner, 1984).

Hasil uji kualitatif dengan metode KLT menunjukkan bahwa golongan senyawa aktif dalam fraksi kloroform adalah senyawa fenol dan terpenoid, sehingga aktivitas antibakterinya diduga diakibatkan oleh kandungan senyawa tersebut. Mekanisme senyawa fenol sebagai antibakteri pada konsentrasi rendah adalah dengan merusak membran sitoplasma dan dapat menyebabkan kebocoran inti sel, sedangkan pada konsentrasi tinggi senyawa fenol berkoagulasi dengan protein seluler. Aktivitas tersebut sangat efektif ketika bakteri dalam tahap pembelahan dimana lapisan fosfolipid di sekeliling sel sedang dalam kondisi yang sangat tipis sehingga fenol dapat dengan mudah merusak isi sel (Volk and Wheller, 1984).

Mekanisme terpenoid sebagai antibakteri adalah bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri yang akan mengakibatkan sel bakteri akan kekurangan nutrisi, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Cowan, 1999).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

1. Fraksi kloroform ekstrak etanol pegagan mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis* dan *P. aeruginosa*, tetapi tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*, *E. coli* dan *S. typhi*.
2. Fraksi kloroform tersebut dapat menghambat *B. subtilis* pada konsentrasi 257,8; 515,7; 1031,5; 2063 µg/disk dengan DDH berturut-turut sebesar 7,50; 7,86; 8,63; 9,76 mm, sedangkan *P. aeruginosa* pada konsentrasi 515,7; 1031,5; 2063 µg/disk dengan DDH berturut-turut sebesar 8,10; 9,10; 10,20 mm.
3. Hasil KLT dari fraksi kloroform tersebut mengandung senyawa golongan fenol dan terpenoid.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian tentang isolasi senyawa penuntun (*lead compound*) dari fraksi kloroform ekstrak etanol pegagan yang berkhasiat sebagai antibakteri.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan menggunakan bakteri Gram positif dan Gram negatif lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2007, *Indonesia Health Profile 2005*, hal. 22, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Anonim, 2008, *Infection*, http://www.globalhealth.org/infectious_diseases/mortality_morbidity/, diakses tanggal 4 Agustus 2011.
- Cowan, M., 1999, Plant Product as Antimicrobial Agent, *Clinical Microbiology Reviews*, **12** (4), hal. 564-582.

- Harborne, J.B., 1996, *Metode Fitokimia*, diterjemahkan oleh Kokasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Cetakan ke-2, hal. 47, 69-72, 155, Institut Teknologi Bandung Press, Bandung.
- Jagtap, N.S., Khadabadi, S.S., and Ghorpade, D.S., 2009, Antimicrobial and Antifungal Activity of *Centella asiatica* (L) Urb, Umbeliferae, *Research J. Pharm and Tech*, **2(2)**, hal. 328 – 330.
- Jawetz, E., Melnick, J.L., and Adelberg, E., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, Penerjemah dan editor Bagian Mikrobiologi Kedokteran Universitas Airlangga, hal 20, 21, 29, 30, 33, 34, 36, 79, 82, 224, 233-235, 317, 318, 351, 352, 371, 372, Penerbit Salemba Medika, Jakarta.
- Lasmadiwati, E., 2003, *Pegagan Meningkatkan Daya Ingat, Membuat Awet Muda, Menurunkan Gejala Stres, Meningkatkan Stamina*, hal. 18-20, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Volk and Wheller, 1984, *Mikrobiologi Dasar*, diterjemahkan oleh Soenartono Adisoemarto, hal. 137-138, Erlangga, Jakarta.
- Wagner, H., 1984, *Plant Drug Analysis a Thin Layer Chromatography Atlas*, hal. 164, Springer-Verlag.