

---

# Bio augmentation Effect of *Alcaligenes* sp.2 and Isolates *Bacillus* sp.2 on Lowering Used Lubricating Oil-Contaminated Soil pH

Nur Afni\*, Yuni Ahda

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

\*Correspondence author: [nurafni110395@gmail.com](mailto:nurafni110395@gmail.com)

## Abstract

**Aim** This study aims to see the effect of biugmentation on pH values on contaminated oil used soil. In this study using *Alcaligenes* sp.2 isolates. and *Bacillus* sp.2 which was successfully isolated by Ahda and Fitri (2016).

**Methods** The bacterial formulation is a single isolate of *Alcaligenes* sp.2, *Bacillus* sp.2 and the *Alcaligenes* sp.2 and *Bacillus* sp.2 consortium. The variation in frequency of biaoaugmentation used in this study was 6 times biotechnology. Calculation of pH values is done once a week and carried out during the 6 weeks of the study period.

**Results** The results of this study indicate that bioaugmentation influences the pH value of contaminated oil used soil. The type of bacteria that is the fastest in reducing and increasing pH in contaminated oil from used oil is a consortium of *Alcaligenes* sp.2 bacteria. and *Bacillus* sp.2.

**Key words** *Bio augmentation, hydrocarbons, microbiology, contaminatio*

## Pendahuluan

Oli merupakan salah satu produk turunan minyak bumi yang berfungsi sebagai pelumas pada mesin kendaraan bermotor. Penggunaan oli di Indonesia terus mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya jumlah kendaraan bermotor. Pada umumnya oli tidak dikelola dengan baik dan sering dibuang secara ilegal di lokasi – lokasi yang tidak selayaknya sebagai tempat pembuangan limbah, seperti pembuangan pada tanah (Basuki, 2011). Pembuangan oli pada tanah baik disengaja maupun tidak menyebabkan terjadinya pencemaran pada tanah (Brown et al., 2017). Hal ini akan menyebabkan kerusakan yang serius pada tanah karena menurut Kepmen LH No. 128 tahun 2003 oli bekas termasuk kedalam limbah B3 (Bahan Berbahaya dan Beracun) yang perlu mendapatkan penanganan khusus.

Tanah yang telah terkontaminasi oli bekas ini akan mengalami perubahan seperti perubahan warna menjadi hitam dan berminyak dengan bau oli yang menyengat (Yolantika, 2015). Kontaminasi oli juga akan berdampak terhadap produktifitas biota pada tanah tersebut (Shen et al., 2016), hal ini turut serta dalam mempengaruhi biomassa dan keragaman komunitas biologis tanah (Burgess et al., 2015). Oli yang tumpah ke tanah juga mengakibatkan kematian mikroorganisme tanah karena oli menyebabkan terhalangnya suplai oksigen ke dalam tanah (Adams et al., 2017). Bahaya yang ditimbulkan oleh kontaminasi oli bekas terhadap tanah diakibatkan oleh kandungan hidrokarbon yang terdapat didalamnya. PAH (Polycyclic Aromatik Hidrocarbon) merupakan salah satu jenis hidrokarbon yang terkandung didalam oli bekas. PAH memiliki sifat yang sangat sulit untuk terdegradasi dilingkungan (Kalantary et al., 2013). Senyawa ini dapat terbentuk karena proses pembakaran yang tidak sempurna oleh batu bara, minyak, gas, dan bahan organik lainnya (Karyab et al., 2013). Senyawa PAH apabila terakumulasi didalam tubuh makhluk hidup akan menyebabkan dampak yang sangat berbahaya. Beberapa senyawa PAH dapat menstimulasi terjadinya efek immunotoksisitas, genotoksisitas, dan toksisitas pada proses reproduksi (Liu et al., 2010). Selain itu, kontaminasi PAH dalam jangka waktu yang lama dan dalam jumlah yang besar dapat menyebabkan penyakit liver, ginjal, kerusakan pada sumsum tulang dan meningkatkan resiko kanker (Gargauri et al., 2015).

Mengingat bahaya dan resiko yang ditimbulkan dari tanah yang terkontaminasi oli bekas sangat merugikan, maka lingkungan tersebut harus segera dipulihkan. Pada dasarnya lingkungan itu sendiri dapat mendegradasi senyawa-senyawa yang masuk kedalamnya melalui proses biologis dan kimiawi. Namun pada kasus ini, tingginya tingkat cemaran tidak sebanding dengan kecepatan proses degradasinya, sehingga menyebabkan senyawa - senyawa tersebut terakumulasi (Charlena et al., 2011). Dengan demikian dibutuhkan tindakan manusia dalam mengatasi pencemaran lingkungan tersebut.

Salah satu teknologi yang dapat digunakan sebagai usaha penanggulangan terhadap masalah pencemaran lingkungan akibat oli bekas ini adalah bioremediasi. Bioremediasi merupakan proses pemulihan lahan yang tercemar dengan memanfaatkan kemampuan mikroorganisme untuk mendegradasi senyawa – senyawa penyebab terjadinya pencemaran (Nuryana, 2017). Mikroorganisme tersebut mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon dengan memanfaatkan atom karbon (C) yang terdapat pada pada tanah yang tercemar sebagai sumber nutrisinya (Hafiludin, 2011). Sehingga, bioremediasi memainkan peranan penting dalam pemulihan lingkungan yang tercemar hidrokarbon yang berasal dari minyak bumi (Cheng, 2017).

Bioaugmentasi adalah salah satu bentuk dari bioremediasi. Bioaugmentasi merupakan proses penambahan mikroorganisme asli ataupun yang telah direkayasa genetiknya ke lingkungan tercemar (Garbisu et al., 2016). Kesuksesan dari bioaugmentasi bergantung pada kelangsungan hidup dari mikroorganisme yang diinokulasikan (Yao et al., 2013). Mikroorganisme yang memiliki kemampuan mendegradasi hidrokarbon dikenal dengan istilah mikroorganisme hidrokarbonoklastik (Sayuti, 2015). Keberadaan mikroorganisme tersebut tersebar luas di alam (Mohanty et al., 2013). Ahda dan Fitri (2016) telah berhasil mengisolasi bakteri pendegradasi hidrokarbon pada tanah tercemar oli bekas di kota padang. Adapun bakteri yang telah berhasil diisolasi yaitu *Bacillus* sp.1, *Bacillus* sp.2 dan *Alcaligenes* sp.2

Pada saat proses degradasi hidrokarbon oleh mikroorganisme hidrokarbonoklastik berlangsung, mikroorganisme tersebut akan menghasilkan metabolit-metabolit berupa asam - asam organik (terutama asam glukonat, piruvat, sitrat dan suksinat) yang terbentuk dari metabolisme gula (Gosalam et al., 2008). Selain itu hidrokarbon yang berakhir didegradasi akan diubah menjadi asam lemak primer dan akan masuk kejalur  $\beta$ - oksidasi dan membebaskan CO<sub>2</sub>. Hal ini dapat mempengaruhi derajat keasaman (pH) tanah. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh bioaugmentasi isolat *Alcaligenes* sp.2 dan *Bacillus* sp.2 yang telah berhasil diisolasi oleh Ahda dan Fitri tahun 2016 terhadap nilai pH pada tanah tercemar oli bekas.

# Bahan dan Metode

## Pembuatan Media

Media yang digunakan ialah media Nutrien Agar, Nutrien broth, dan MSM (mineral salt medium). MSM dibuat dengan melarutkan aquadest dan bahan-bahan berikut: 1,2 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 1,6 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1 g  $\text{NaCl}$ ; 1 g  $\text{KNO}_3$ ; 20 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 10 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,05 g  $\text{FeCl}_3$ , 1 ml vitamin dan 1 ml larutan trace elemen. Larutan trace elemen mengandung bahan-bahan berikut per liter: 50 mg  $\text{MnCl}_2$ ; 300 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1,1 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 190 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 2 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 24 mg  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 18 mg  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 42 mg  $\text{ZnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Masing masing bahan dilarutkan dengan aquadest sampai volumenya menjadi 1 liter, pH medium diatur sebesar 7,3 kemudian medium disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu  $121^\circ\text{C}$  dan tekanan 15 psi selama 15 menit. Medium ini digunakan sebagai medium pertumbuhan selektif bagi bakteri hidrokarbon.

## Perbanyak Isolat Bakteri

Isolat bakteri yang diinokulasikan ke tanah tercemar oli bekas terlebih dahulu diperbanyak di laboratorium. Masing-masing isolat ditumbuhkan pada media Nutrient Agar (NA) selama 2 hari. Selanjutnya media Nutrient Broth (NB) digunakan untuk perbanyak awal sel. Koloni tunggal bakteri yang tumbuh di media NA dipindahkan dengan ose ke media NB steril dalam erlenmeyer 30 ml kemudian di inkubasi di atas shaker dengan kecepatan 150 rpm pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam hingga mencapai fase eksponensial. Selanjutnya masing-masing kultur dipindahkan ke dalam 450 ml medium MSM.

## Setting Bioaugmentasi

Tanah sebanyak 1000 gram ditempatkan dalam wadah berpori dan ditambahkan masing-masing 50 ml oli bekas, kemudian diaduk sampai homogen. Dalam hal ini konsentrasi oli bekas di tanah sebanyak 5%. Biarkan pada suhu ruang selama 48 jam untuk volatilisasi komponen-komponen racun minyak. Setelah dua hari ditambahkan bahan nutrisi yang berasal dari kotoran sapi ke tanah terkontaminasi dan diaduk sampai rata. Bahan nutrisi yang ditambahkan dengan kadar 20 g. Isolat bakteri kemudian ditempatkan dalam masing-masing wadah tanah yang terkontaminasi oli bekas sebanyak 43 ml. Kelembapan diatur sampai 60% kemampuan tanah menyerap air dan diinkubasi pada suhu ruang ( $28^\circ\text{C}$ ). Kontrol yang digunakan adalah tanah yang diberi oli bekas namun tidak ditambahkan isolat bakteri.

## Perhitungan pH

pH tanah diukur pada hari ke 7, ke 14, ke 21, ke 28 ke 35 dan hari ke 42. Pengukuran dilakukan dengan pH meter. Sebelum digunakan, pH meter dikalibrasi terlebih dahulu dengan menggunakan larutan buffer 4 dan 7. Pengukuran dilakukan dengan mengambil 1 gram sampel tanah perlakuan ditambahkan 9 mL akuades dengan pH 7. Sampel dan aquades dihomogenkan dengan menggunakan vorteks kemudian disaring. Sampel kemudian diukur dengan menggunakan pH meter.

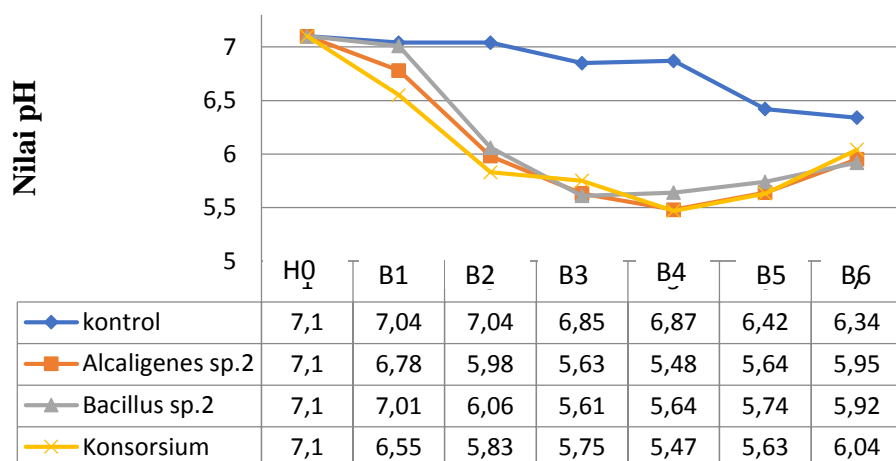
## Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis dengan uji ANOVA (Analysis of Varians) dan bila hasil yang diperoleh menunjukkan beda nyata, maka dilakukan uji lanjut menggunakan uji Duncan New Multiple Range Test (DNMRT).

# Hasil dan Pembahasan

Nilai pH tanah diamati dalam waktu 42 hari. Nilai pH diukur pada minggu ke-1, ke-2, ke-3, ke-4, ke-5, dan minggu ke-6 setelah diberi perlakuan bioaugmentasi. Pengukuran nilai pH dilakukan dengan menggunakan pH-meter. Data nilai pH disajikan dalam bentuk grafik nilai rata-rata pH tanah sebagai berikut:

## Nilai Rata-Rata pH Tanah



Gambar 1. Grafik nilai rata-rata pH tanah tercemar oli bekas dengan perlakuan bioaugmentasi isolat *Alcaligenes sp.2* dan *Bacillus sp.2*.

Berdasarkan data pada gambar diatas terlihat bahwa proses bioaugmentasi berpengaruh terhadap nilai pH tanah. Hal ini dapat dilihat dari penurunan nilai pH tanah dari awal inkubasi (H0) sampai perlakuan bioaugmentasi keempat, dan mulai mengalami kenaikan nilai pH pada perlakuan bioaugmentasi berikutnya. Berdasarkan pada analisis ANOVA diketahui bahwa pengaruh jenis bakteri dan frekuensi bioaugmentasi yang digunakan dalam proses degradasi hidrokarbon berbeda nyata pada taraf 5%. Uji lanjut DMNRT pada taraf 5% memperlihatkan perbedaan kemampuan dari masing-masing bakteri dan frekuensi bioaugmentasi dalam menurunkan maupun menaikkan pH pada tanah tercemar oli bekas.

Meskipun pada ketiga jenis bakteri yang digunakan dalam proses bioaugmentasi terjadi penurunan pH di awal bioaugmentasi, dan terjadi peningkatan nilai pH pada akhir bioaugmentasi, namun kecepatan proses penurunan dan kenaikan pH ini berbeda pada masing-masing jenis bakteri. Dari grafik pada gambar 01 terlihat jenis bakteri yang paling cepat dalam proses penurunan nilai pH tanah adalah konsorsium bakteri *Alcaligenes sp.2* dan bakteri *Bacillus sp.2* yaitu mampu menurunkan nilai pH tanah turun dari 7,1 pada awal inkubasi (H0) menjadi 5,47 pada bioaugmentasi ke-4. Sementara isolat tunggal bakteri *Alcaligenes sp.2* mampu menurunkan nilai pH tanah hingga 5,48 pada perlakuan bioaugmentasi ke-4, dan isolat tunggal bakteri *Bacillus sp.2* menurunkan pH tanah hingga 5,64 pada bioaugmentasi ke-4.

Kenaikan nilai pH terjadi pada ketiga jenis bakteri yang digunakan dalam proses bioaugmentasi dan terjadi pada bioaugmentasi ke-5 dan ke-6. Dari ketiga jenis bakteri yang digunakan dalam penelitian ini, bakteri yang lebih cepat dalam menaikkan nilai pH tanah adalah konsorsium bakteri *Alcaligenes sp.2* dan bakteri *Bacillus sp.2* yang mampu menaikkan nilai pH tanah dari 5,47 pada perlakuan bioaugmentasi ke 4 menjadi 6,04 pada bioaugmentasi ke-6, sementara bakteri *Alcaligenes sp.2* dan bakteri *Bacillus sp.2* secara berturut-turut mampu menaikkan nilai pH tanah hingga 5,95 dan 5,92 pada perlakuan bioaugmentasi ke-6.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Nugroho (2006) yang melakukan penelitian bioremediasi tanah tercemar minyak bumi, hasil penelitiannya menunjukkan nilai pH selama 150 hari penelitian tidak selalu dalam kondisi asam, peningkatan nilai pH terjadi pada hari ke-40 hingga hari ke-80 dengan rata-rata 5 dari 9 perlakuan menunjukkan terjadi peningkatan nilai pH. Penelitian lain yang sejalan dengan penelitian ini adalah penelitian Hafiluddin (2011), dalam penelitiannya pH tanah mengalami penurunan dari 7 menjadi 5 pada hari 0 perlakuan hingga hari ke -30. Sedangkan pada hari ke -30 sampai hari ke- 45 mengalami peningkatan menjadi 7.

Menurut Aislabe (2006) pH tanah cenderung mengalami penurunan disebabkan oleh produksi asam alifatik yang terjadi selama proses biodegradasi senyawa alkana berlangsung. Dalam proses ini alkana akan ditransformasikan menjadi bentuk alkohol dan selanjutnya akan diubah menjadi asam lemak (Rojo, 2010). Asam lemak yang sebelumnya telah dihasilkan selanjutnya akan diubah menjadi asetat dan asam propionat, hal inilah yang menyebabkan terjadinya penurunan pada pH tanah yang diukur (Prayitno, 2017). Selain itu menurut Sulistyorini (2010) penurunan pH tanah selama proses degradasi berlangsung juga disebabkan oleh adanya pelepasan CO<sub>2</sub>.

Meningkatnya nilai pH tanah pada minggu ke 5 dan 6 menandakan bahwa perombakan senyawa organik karbon menjadi asam organik tidak lagi menjadi proses yang dominan. Proses tersebut mulai digantikan dengan proses pembentukan senyawa amonium yang dapat menyebabkan terjadinya peningkatan nilai pH tanah (Ismayana et al., 2012). Nugroho (2006) juga menambahkan bahwa terjadinya peningkatan nilai pH diduga akibat adanya kemampuan bakteri dalam melakukan respon toleransi asam dengan mekanisme pompa hidrogen. Hal ini dilakukan dalam rangka pertahanan homeostatis terhadap kondisi lingkungan yang asam. Mekanisme yang terjadi adalah pertukaran ion K<sup>+</sup> yang ada di dalam sel dengan ion H<sup>+</sup> yang banyak di lingkungan. Selain itu Gosalam (2008) menyatakan bahwa terjadinya peningkatan nilai pH juga dapat disebabkan oleh adanya proses perombakan protein pada sel – sel bakteri yang telah mati dan proses perombakan gugus – gugus samping rantai hidrokarbon yang dapat menghasilkan senyawa atau ion yang bersifat basa.

Meskipun pada penelitian ini terlihat bahwa pada minggu ke-1 hingga minggu ke-4 terjadi penurunan pH pada tanah, namun pada minggu ke-5 dan ke-6 terjadi kenaikan nilai pH tanah kembali. Hal ini membuktikan bahwa proses degradasi hidrokarbon dengan teknik bioaugmentasi tidak hanya menghilangkan hidrokarbon dari tanah namun juga mampu memulihkan tanah dari segi keasaman tanah tersebut. Hal ini memungkinkan tanah yang tercemar oli bekas bisa dimanfaatkan kembali sebagai media tumbuh bagi tumbuhan.

Bioaugmentasi isolat *Alcaligenes* sp.2 dan *Bacillus* sp.2 dapat menurunkan pH tanah yang tercemar oli bekas pada empat minggu pertama pengamatan. Hal ini disebabkan oleh senyawa asam yang dihasilkan oleh masing-masing isolat bakteri. Namun pada minggu ke-5 dan ke-6 pH tanah meningkat sebagai bentuk toleransi mikroorganisme terhadap kadar asam dalam tanah. Jenis bakteri yang memiliki kemampuan tercepat dalam menurunkan maupun

## Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Kurnia Sari yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan draft manuskrip ini.

## Daftar Pustaka

- Adams F, Niyamugobudo A, Sylvetes OP. 2017. Bioremediation of crude oil contaminated soil using agriculturated wastes. *Procedia Manufacturing*. (8)459-464
- Ahda Y & Fitri L. 2016. Karakterisasi Bakteri Potensial Pendegradasi Oli Bekas pada Tanah Bengkel di Kota Padang. *Journal of Sainstek* 8(2): 98-103
- Basuki W. 2011. Bioremediasi Limbah Oli Bekas Oleh *Lycini Bacillus sphaericus* TCP C 2.1. *Jurnal Teknik Lingkungan*. Vol. 12 No. 2.
- Brown L.D, Cologgi D L, Gee K F, Ulrich A C. 2017. Bioremediation of oil spills on land. *Oil Spill Science and Technology*.
- Burges A, Epelde L, Garbisu C. 2015. Impact of repeated single-metal and multi-metal pollution events on soil quality. *Chemosphere* 120 (2015) 8–15.
- Charlena, Mas'ud ZA, Yani M, Sjahriza A, Tarigan JG. 2011. Biodegradasi limbah minyak berat menggunakan Isolat tunggal dan campuran dengan penambahan Alkilbenzena sulfonat linear. Seminar Nasional Kimia Terapan Indonesia 2011 "Potensi Riset Kimia Terapan dalam Mendukung Pembangunan Iptek Berbasis Inovasi"
- Cheng Y, Wang L, Faustorilla V, Megharaj M, Naidu R, Chen Z. 2017. Integrated electrochemical treatment systems for facilitating the bioremediation of oil spill contaminated soil. *Chemosphere* 175 (2017) 294e299
- Garbisu C, Olatz G, Lur E, Elisabeth G, Itziar A. (2017). Plasmid-Mediated Bioaugmentation for the Bioremediation of Contaminated Soils. *frontiers of microbiology*.8:1966.
- Goudarzi GG, Sahar , Alavi N. 2018. Association between cancer risk and polycyclic aromatic hydrocarbons' exposure in the ambient air of Ahvaz, southwest of Iran. *International Journal of Biometeorology*.
- Gosalam, S., Akbar T., dan Silvana J.L. (2008). Uji Kemampuan Bakteri dari Perairan dalam Mendegradasi Senyawa Minyak Solar. *Jurnal Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin*.
- Hafiluddin. 2011. Bioremediasi Tanah Tercemar minyak Dengan Teknik Bioaugmentasi dan Biostimulasi. *Emryo* Vol. 8 No. 1
- Ismayana, A., dkk. 2012. Faktor Rasio C/N Awal dan Laju Aerasi pada Proses Co-Composting Bagasse dan Blotong. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*. Departemen Industri Pertanian Fakultas Pertanian IPB. Bogor.
- Kalantary RR, Baadkoubi A, Mohseni-Bandpi A, Esrafil A, Baneshi MM, Jorfi S. 2013. Modification of phenanthrenes biodegradation with humic compounds. *Soil Sed Cont*; 22:185-198.
- Karyab H, Yunesian M, Nasser S, Mahvi AH, Ahmadvani R, Rastkari N, 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbon in drinking water of tehran, Iran. *J Environ Health Sci Eng* 11 (25)
- Liu Y, Chen L, Zhao J, Wei Y, Pan Z, Meng XZ, Huang, Q, and Li W. 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the surface soil of Shanghai, China: Concentrations, distribution and sources. *Organic Geochemistry*. 41, 355-362.

- Mohanti S, Jasmine J, & Mukherji S. 2013. Practical Considerations and Challenges Involved in surfactant Enhanced Bioremediation of Oil. *BioMed Research International*
- Nugroho A. 2006. Biodegradasi 'Sludge' Minyak Bumi Dalam Skala Mikrokosmos. *Makara Teknologi*. 10 (2): 82-89
- Nuryana D. 2017. Review: Bioremediasi Pencemaran Minyak Bumi. *JEEE* Vol. 6 No. 2
- Prayitno J. 2017. The Effectiveness of Microbial Consortia for Bioremediation of Oil- Contaminated Soil Using Bench-Scale Landfarming Technology. *Jurnal Teknologi Lingkungan*. Vol. 18, No 2, Juli 2017, 208-215.
- Rojo F. 2010. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 34: 658-684
- Shen W, Zhu N, Cui J, Wang H, Dang Z, Wu P, Luo Y, Shi C. 2016. Ecotoxicity monitoring and bioindicator screening of oil-contaminated soil during bioremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 124(2016)120-128.
- Sulistiyorini dan Munawar Ali., MT. 2015. Bioremediasi Dengan *Pseudomonas putida* Terhadap Pencemaran Tanah Minyak Bumi Dengan Bioaugmentasi. *Jurnal Envirotek* Vol. 10 No. 1
- Yao Y, Lu Z, Zhu F, Min H, Bian C. 2013. Successful bioaugmentation of an activated sludge reactor with *Rhodococcus* sp. YYL for efficient tetrahydrofuran degradation. *Journal of Hazardous Materials* (261) 550- 558
- Yolantika H, Periadnadi, Nurmiati. 2015. Isolasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon di Tanah Tercemar Lokasi Perbengkelan Otomotif. *Jurnal Niologi Universitas Andalas*. 4(3): 153-157.