

AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL 96% DAUN BANGKAL (*Nauclea subdita*) TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus*

Cahya Monica^{1*}, Irfan Zamzani², Siti Nashihah²

¹Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Banjarmasin

²Fakultas Farmasi, Universitas

Muhammadiyah Banjarmasin, Jl. Gubernur Sarkawi, Lingkar Utara, Handil Bakti,
Kabupaten Barito Kuala, Kalimantan Selatan, Indonesia.

*E-mail: cahyamonica077@gmail.com

ABSTRAK

Tumbuhan Bangkal (*Nauclea subdita*) merupakan tumbuhan khas di bagian selatan Pulau Kalimantan. Dalam kehidupan sehari-hari, daun bangkal digunakan untuk mengobati bisul, luka, sakit gigi, demam dan diare. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui dan mengukur aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun bangkal terhadap *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE). Daun bangkal diekstraksi dengan ekstraksi bantuan UAE menggunakan pelarut etanol 96%. Aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram *Kirby-Bauer*. Pengujian zona hambat antibakteri ekstrak daun bangkal terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki efek atau berbeda secara signifikan dengan konsentrasi masing-masing 40%, 60%, 80%, 100% dan menghasilkan aktivitas antibakteri dengan zona hambat berturut-turut 12,7±0,06 mm, 13,9±0,00 mm, 15±0,00 mm, 16±0,00mm. Hasil pemeriksaan aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun bangkal dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 40% dengan diameter zona hambat 12,7 mm dan yang tertinggi pada konsentrasi 100% dengan diameter zona hambat 16,00 mm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun bangkal memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* yang memiliki zona hambat dengan kategori sedang hingga kuat.

Kata kunci : Daun Bangkal, UAE, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Bangkal (Nauclea subdita) is a typical plant in the southern part of the island of Borneo. In everyday life, bangkal leaves are used to treat wounds, ulcers, toothache, fever and diarrhea. The purpose of this study was to measure and determine the antibacterial activity of the ethanol extract of bangkal leaves against Staphylococcus aureus using the Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) method. Bangkal leaves were extracted by UAE using 96% ethanol. The antibacterial inhibition test was carried out using the Kirby-Bauer disc diffusion method. Testing of antibacterial inhibition zones of Bangkal leaf extract against Staphylococcus aureus bacteria had an effect or significantly different with concentrations of 40%, 60%, 80%, 100% respectively and produced antibacterial activity with inhibition zones of 12.7±0.06 mm, 13.9±0.00 mm, 15±0.00 mm, 16±0.00mm. The results of the antibacterial activity examination showed that the ethanolic extract of bangkal leaves could inhibit the growth of Staphylococcus aureus at a

concentration of 40% with an inhibition zone diameter of 12.7 mm and the highest concentration at 100% with an inhibition zone diameter of 16.00 mm. This indicates that the extract of bangkal leaves has antibacterial activity against Staphylococcus aureus which has an inhibition zone with a moderate to strong category.

Keywords : *Bangkal leaves, Ultrasonic Assisted Extraction, Staphylococcus aureus*

PENDAHULUAN

Salah satu penyakit infeksi kulit yang pernah dialami hampir semua orang adalah jerawat (*acne vulgaris*). Bakteri yang sering menginfeksi penyakit jerawat adalah *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* dan *Propionibacterium acnes*¹.

Infeksi penyakit jerawat yang disebabkan oleh bakteri biasanya diberi pengobatan golongan antibiotik, penisilin, dan amoksisilin. Overdosis antibiotik membuat patogen menjadi resisten, oleh karena itu perlu diketahui alternatif lain yang mampu membasmi atau membuat pertumbuhan bakteri menjadi terhambat, seperti penggunaan bahan alami pada tanaman obat yang ada².

Tanaman Bangkal (*Nauclea subdita*) merupakan khas Kalimantan Selatan yang dapat dijadikan sebagai tanaman obat. Dalam kehidupan sehari-hari tanaman bangkal digunakan untuk mengobati luka, bisul, diare, sakit gigi, batuk, demam dan

sakit perut. Aktivitas farmakologi dan kandungan senyawa aktif yang telah diteliti meliputi antimikrobia, genotoksis, dan klastogenik³.

Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya terhadap daun *Nauclea subdita* antara lain Ariessanty, *et al.*, (2018) menyebutkan bahwa ekstrak etanol dari daun *Nauclea subdita* dengan metode maserasi mempunyai aktivitas sebagai antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes* dengan konsentrasi tertinggi 80% mendapatkan hasil zona hambat berdiameter 8,56 mm⁴. Fitriana (2013) juga menginformasikan bahwa dalam pembuatan gel ekstrak kulit tanaman *Nauclea subdita* mampu menghambat aktivitas bakteri penyebab jerawat yaitu bakteri *Propionibacterium acnes*⁵.

Berdasarkan data-data dan uraian tentang banyaknya kasus jerawat, dampak resistensi dan belum pernah diteliti

mengenai aktivitas antibakteri ekstrak daun bangkal terhadap *Staphylococcus aureus*, maka peneliti tertarik untuk melakukan pengujian menggunakan ekstrak daun bangkal untuk melihat aktivitas antibakteri dari ekstrak daun bangkal terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode non konvensional yaitu *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) dengan konsentrasi 40%, 60%, 80% dan 100%.

Penelitian dengan menggunakan metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) belum banyak dilakukan, oleh karena itu peneliti menggunakan metode UAE dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak daun bangkal dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan antara lain sonikator (China Biobase *ultrasonik cleaner* UC-40A), gelas ukur (Iwaki), Erlenmeyer (Pyrex), labu takar(Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), blender (Cosmos),

sendok tanduk (Pyrex), rak tabung reaksi, pinset, jarum ose, mikropipet (Dragonlab), inkubator (memmert), evaporator, waterbath, cawan petri (Pyrex), batang pengaduk (Pyrex), timbangan analitik, pipet tetes (Pyrex), pipet volume, penggaris, *laminar air flow* (LAF), penjepit tabung, gelas beker (Iwaki), sentrifugasi, autoklaf, api bunsen dan oven. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Daun Bangkal (*Nauclea subdita*), Etanol 96 %, Bakteri *Staphylococcus aureus*, Aluminium foil, media *Nutrient Agar* (NA), *disk* antibiotik klindamisin, DMSO 1% (Merck), aquades (Bratachem), kapas steril, kassa steril, HCl 2N, bubuk Mg, NaOH 1N, Asam asetat anhidrat, H₂SO₄ Amil alkohol, Reagen mayer, Reagen Dragendorf, dan FeCl₃ 1%.

Pembuatan Simplisia Daun Bangkal

Sampel daun bangkal (*Nauclea subdita*) yang dijadikan sampel merupakan daun hijau yang masih segar kemudian dilakukan sortasi basah dan perajangan, dilanjutkan dengan pencucian dan dikeringkan. Setelah kering sampel

disortasi kering dan dihaluskan hingga menjadi serbuk.

Standarisasi Simplisia

Penetapan kadar air

Pemeriksaan kadar air dilakukan dengan cara destilasi. sebanyak 20g ditimbang dan dimasukkan ke labu alas bulat dan ditambahkan toluen yang sudah dijenuhkan. Labu alas bulat dipanaskan selama 15 menit, setelah toluen mulai mendidih, penyulingan diatur 2 tetes/detik, lalu 4 tetes/detik. Lanjutkan pemanasan selama 5 menit setelah semua air didistilasi. Tabung dibiarkan dalam keadaan dingin sampai mencapai suhu ruang. Volume air dibaca ketika air dan toluen memisah sempurna. Kadar air tidak boleh melebihi 10%⁶.

Penetapan susut pengeringan

Serbuk simplisia sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam cawan penguap. Cawan penguap sebelumnya dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan sudah ditara. Cawan penguap dimasukkan ke dalam oven, keringkan pada suhu 105°C hingga bobot konstan. Dilakukan sebanyak tiga kali replikasi setelah itu dihitung persentasenya⁶.

Penetapan kadar Sari larut air

Simplisia sebanyak 5 gram ditimbang, lalu dimasukkan ke dalam wadah botol, kemudian ditambahkan air jenuh kloroform sebanyak 100 ml. Gojok berkali-kali selama 6 jam pertama, setelah itu diamkan selama 18 jam. Ekstrak disaring dan ambil 20 ml filtrat yang sudah disaring dan diuapkan hingga kering dalam cawan penguap yang telah ditara. Residu dipanaskan pada suhu 105°C hingga mencapai bobot konstan. Setelah mendapat bobot konstan hitung kadar dalam % sari larut air, dihitung terhadap bahan yang telah di keringkan di udara⁶.

Penetapan kadar sari larut etanol

Simplisia di timbang sebanyak 5 gram, lalu dimasukkan ke dalam wadah botol dan di tambahkan etanol 96% sebanyak 100 ml. Gojok berkali-kali selama 6 jam pertama kemudian biarkan selama 18 jam. Ekstrak disaring cepat untuk menghindari penguapan etanol 96%. Sebanyak 20 ml filtrat disaring dan diuapkan hingga kering dalam cawan penguap yang telah ditara. Residu dipanaskan dengan suhu 105°C hingga

berat konstan, hitung kadar dalam % sari larut air, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di suhu ruang⁶.

Pembuatan Ekstrak Daun Bangkal

Serbuk daun Bangkal (*Nauclea subdita*) sebanyak 500 g direndam dalam etnaol 96% (1:5) didalam erlenmeyer, kemudian dimasukkan ke dalam ultrasonic cleaning bath dengan frekuensi 40 Khz, selama 30 menit⁷. Hasil ekstraksi disaring untuk memisahkan filtrat dan ampas. Filtrat dipekatkan dengan diangin-anginkan pada suhu ruang hingga didapat ekstrak kental. Ekstrak tersebut dihitung rendemennya.

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan dengan beberapa metode uji yang meliputi alkaloid, flavonoid, kuinon, polifenol saponin dan terpenoid. Uji alkaloid dilakukan dengan pereaksi mayer dan dragendorff, uji flavonoid dengan pereaksi Mg dan amil alkohol, uji kuinon menggunakan pereaksi NaOH, uji polifenol menggunakan pereaksi FeCl₃ 1%, uji saponin menggunakan metode uji busa dan terpenoid menggunakan pereaksi H₂SO₄.

Uji Aktivitas Antibakteri

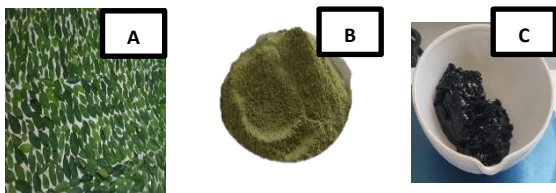
Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar. Bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah diinkubasi selama 24 jam dalam media Nutrient Agar (NA) diambil dengan menggunakan kawat ose untuk disuspensikan ke dalam tabung yang berisi larutan NaCl 0,9% sebanyak 2 mL⁸. Suspensi bakteri diinokulasi pada permukaan media padat (NA) dalam cawan petri. Kemudian disk cakram yang telah dijenuhkan dengan larutan uji konsentrasi 40%, 60%, 80% dan 100%(b/v), kontrol positif yang digunakan adalah klindamisin dan pelarut DMSO sebagai kontrol negatif diletakkan diatas permukaan media cawan petri yang telah diinokulasi bakteri uji. Selanjutnya cawan petri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C⁹.

Menurut Davis dan Stout (1971) diameter zona bening yang terbentuk digolongkan menjadi empat kategori, yaitu < 10 mm kategori lemah, 10-15 mm kategori sedang, 16-20 mm kategori kuat dan > 20 mm kategori sangat kuat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Simplisia dan Standarisasi Simplisia

Pembuatan simplisia daun bangkal (*Nauclea subdita*) dari 3 Kg daun segar memperoleh serbuk kering sebanyak 500 gram. Hasil ekstrak yang diperoleh dari perbandingan 1:10 dengan total 500 gram serbuk daun bangkal dalam pelarut etanol 96% sebanyak 5000 ml yaitu di dapatkan ekstrak kental berwarna hitam kehijauan 51,66 gram dengan rendemen 10,33%.



Gambar I. Sampel: A. Daun Bangkal; B. Serbuk; C. Rendemen Ekstrak.

Pengujian mutu simplisia daun bangkal dilakukan dengan 4 pengujian yaitu kadar air, susu pengeringan, kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol. Hasil yang diperoleh menerangkan bahwa simplisia daun bangkal telah memenuhi persyaratan (Farmakope Herbal Indonesia Edisi II, 2017).

Tabel 1. Uji standarisasi simplisia daun Bangkal

Uji standarisasi	Hasil	Parameter
Penetapan kadar air	8%	$\leq 10\%$
Susut pengeringan	6,5%	$\leq 10\%$
Penetapan kadar sari larut air	25%	$> 24\%$
Penetapan kadar sari larut etanol	35%	$> 6\%$

Dari tabel 1 standarisasi simplisia daun Bangkal (*Nauclea subdita*) dilakukan 4 pengujian yaitu penetapan kadar air, susut pengeringan, kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol. Mendapatkan hasil masing 8%, 6,5%, 25% dan 35% yang dimana hasil dari standarisasi simplisia daun Bangkal (*Nauclea subdita*) dapat diketahui pada penetapan kadar air, susut pengeringan, kadar sari larut air, dan kadar sari larut etanol memenuhi syarat simplisia menurut¹⁰.

Uji Skrining Fitokimia

Skrining Fitokimia bertujuan untuk mengetahui keberadaan metabolit sekunder pada ekstrak etanol daun bangkal. Hasil pengujian disajikan pada tabel 2.

Tabel 2 Uji Skrining Fitokimia

Uji	Pereaksi	Hasil	Keterangan
Alkaloid	Reagen Mayer	+	Endapan putih
	Reagen Dragendorf	+	Endapan jingga
	Mg + Amil alkohol	+	Warna jingga
Kuinon	NaOH	+	Warna kuning
Polifenol	FeCl ₃	+	Warna hijau kehitaman
Saponin	HCl 2 N	+	Terdapat busa
Terpenoid	H ₂ SO ₄ P	-	Tidak ada perubahan warna

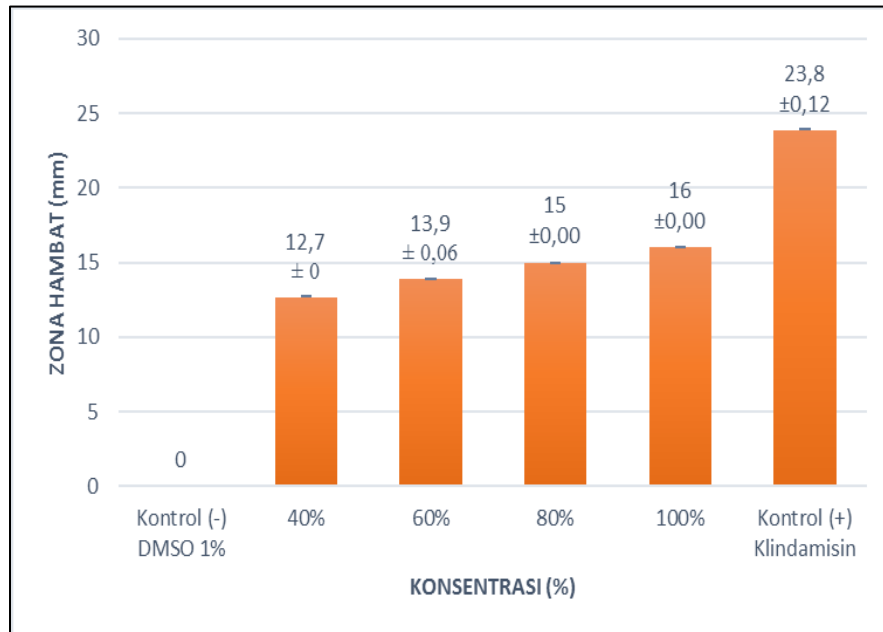
Berdasarkan hasil skrining fitokimia daun Bangkal (*Nauclea subdita*) menunjukkan metabolit sekunder yang terkandung dalam daun Bangkal (*Nauclea subdita*) antara lain alkaloid, flavonoid, kuinon polifenol, dan saponin. Penelitian ini menunjukkan hasil yang sama pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ariessanty, *et al.*, (2018) dan Aisiah, (2012)^{4,11}.

Uji Aktivitas Antibakteri

Pada pegujian aktivitas antibakteri menggunakan kontrol positif disk cakram klindamisin dan kontrol positif

menggunakan DMSO 1%. Pelarut DMSO ini digunakan karena dapat melarutkan senyawa polar dan nonpolar, DMSO ini juga aman digunakan untuk uji aktivitas terhadap mikroorganisme, sehingga tidak akan mempengaruhi hasil uji oleh pelarut ekstraknya yaitu DMSO¹². Kontrol positif yang digunakan yaitu klindamisin, penggunaan klindamisin dikarenakan klindamisin dapat mengobati infeksi kuman anaerob dalam penggunaan klinis, dimana klindamisin merupakan antibiotik turunan dari linkomisin yang memiliki mekanisme menghambat sintesis protein¹³.

Ekstrak etanol daun Bangkal (*Nauclea subdita*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* (Tabel 3) dengan terbentuknya zona bening. Kontrol positif menunjukkan diameter zona hambat sebesar 23,8 mm, sedangkan kontrol negatif tidak menunjukkan adanya zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.



Gambar 2. Hasil uji Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun Bangkal (*Nauclea subdita*) karena adanya kandungan metabolit senyawa alkaloid, flavonoid, kuinon, polifenol, dan saponin. Metabolit tersebut saling bersinergi atau mendukung efektivitas sebagai antibakteri. Alkaloid mempunyai mekanisme sebagai antibakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara sempurna dan

menyebabkan kematian sel tersebut¹⁴. Flavonoid mempunyai mekanisme sebagai antibakteri dengan menghambat metabolisme energi bakteri dan fungsi dari membran sel¹⁵.

Kuinon mempunyai mekanisme sebagai agen antibakteri dengan cara senyawa kompleks terbentuk yang memiliki sifat irreversible dengan residu asam amino nukleofilik pada protein transmembran, membran plasma, polipeptida dinding sel, serta enzim-enzim yang terkandung pada permukaan

membran sel, hal ini akan mengganggu pertumbuhan sel bakteri¹⁵. Polifenol sebagai antibakteri mempunyai peran sebagai racun protoplasma, menembus dan merusak dinding sel dan mengendapkan protein seluler bakteri. Enzim esensial dalam sel bakteri akan mati pada saat senyawa fenolik mempunyaiberat molekul tinggi bahkan pada konsentrasi yang sangat rendah. Polifenol juga dapat menonaktifkan enzim, menyebabkan kebocoran sel dan mendenaturasi protein¹⁶. Saponin memiliki mekanisme sebagai antibakteri yang dapat menyebabkan hemolisis sel dan membuat membran permeabilitas meningkat. Bakteri akan pecah dan lisis pada saat saponin berinteraksi dengan sel bakteri¹⁷.

KESIMPULAN

Berdasarkan uraian hasil dan pembahasan, disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun bangkal dengan menggunakan metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Khumaidi, A., Nugrahani, A. W., & Gunawan, F. (2020). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kapas (*Gossypium barbadense* L.) terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Propionibacterium acnes*. *Jurnal Farmasi Udayana*, 9(1), 52. <https://doi.org/10.24843/jfu.2020.v09.i01.p08>
2. Nurhayati, L. S., Yahdiyani, N., & Hidayatulloh, A. (2020). Perbandingan Pengujian Aktivitas Antibakteri Starter Yogurt dengan Metode Difusi Sumuran dan Metode Difusi Cakram. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 1(2), 41. <https://doi.org/10.24198/jthp.v1i2.27537>
3. Rahmi, N., Salim, R., & Rizki, M. I. (2021). Aktivitas Antibakteri Dan Penghambatan Radikal Bebas Ekstrak Kulit Kayu Bangkal (*Nauclea subdita*) (*The Effect of Solvents and Extraction Methods on Antibacterial and Free Radical Scavenging Activities from Bangkal (Nauclea subdita) Bark Extracts*). 39(1), 13–26.
4. Ariessanty Alicia Kusuma Wardhani, R., Akhyar. (2018). Skrinig Fitokimia, Uji Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri *Propionibacterium Acnes* Ekstrak Etanol Kulit Batang dan Daun Tanaman Bangkal (*Nuclea Subdita*). *Sains dan Terapan Kimia*, Vol. 12, No. 2 (Juli 2018), 64 – 75.

5. Fitriana, D. (2013). Formulasi Sediaan Gel dan Nanoemulgel Ekstrak Etanol Kulit Batang *Nauclea subdita* (Korth) Steud. (Bangkal) Serta Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *Propionibacterium Acnes*. Bandung: Institut Teknologi Bandung
6. Utami, Y. P., Umar, A. H., Syahrini, R., & Kadullah, I. (2017). Standardisasi Simplisia dan Ekstrak Etanol Daun Leilem (*Clerodendrum*). *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*, 2(1), 32–39
7. Sjahid, L. R., Aqshari, A., & Sediarto, S. (2020). Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Hasil Ultrasonic Assisted Extraction Daun Binahong (*Anredera cordifolia* [Ten] Steenis). *Jurnal Riset Kimia*, 11(1), 16–23.
<https://doi.org/10.25077/jrk.v11i1.348>
8. Dima L, Fatimawali, Lolo WA. (2016). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah Farmasi*; 5 (2) : 282 – 289.
<https://doi.org/10.35799/pha.5.2016.12273>
9. Mpila DA, Fatimawali, Wiyono WI. (2012). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mayana (*Coleus atropurpureus* [L] Benth) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* secara InVitro. Manado: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi;1(1):13-21.
<https://doi.org/10.35799/pha.1.2012.440>
10. Depkes RI. (2000). Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
11. Aisiah, S. (2012). Untuk Pengendalian Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Potential Plant Bangkal (*Nauclea orientalis*). 2(4), 166–177. DOI:10.20527/fs.v2i4.1172
12. Octaviani, M., Fadhli, H., & Yuneistya, E. (2019). *Antimicrobial Activity of Ethanol Extract of Shallot (Allium cepa L.) Peels Using the Disc Diffusion Method. Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(1), 62–68. <https://doi.org/10.7454/psr.v6i1.4333>
13. Katzung, B.G., Masters, S.B. & Trevor, A.J., 2012. *Basic & Clinical Pharmacology*. 12th Ed. United States: McGraw-Hill Companies.
14. Kurniawan, B., & Aryana, W. F. (2015). *Binahong (Cassia Alata L) As Inhibitor Of Escherichiacoli Growth*. 4, 100–104.
15. Sapara, T. U., & Waworuntu, O. (2016). Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pacar Air (*Impatiens Balsamina* L.) Terhadap Pertumbuhan *Porphyromonas Gingivalis*. *Pharmacon*, 5(4), 10–17.

<https://doi.org/10.35799/pha.5.2016.13968>

16. Rosidah, A. N., Lestari, P. E., & Astuti, P. (2014). Daya antibakteri ekstrak daun kendali (*Hippobroma longiflora* [L] G . Don) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *Jurnal Pustaka Kesehatan*, 1–9
17. Poeloengan M, Praptiwi P. 2012. Uji aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* Linn). *Media Litbang Kesehatan*.; 20(2). h. 65-9