

Artikel

Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit dan Daging Buah Labu Siam (*Sechium edule* Sw.) Terhadap Radikal Bebas DPPH

Arsyik Ibrahim^{1*}, Irwansyah², Arman Rusman¹, Satriani Badawi¹, Riki¹, Hifdzur Rashif Rija'i¹, Jaka Fadraersada³.

¹ Laboratorium Riset dan Pengembangan Kefarmasian "FARMAKA TROPIS", Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur, Indonesia.

² Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur, Indonesia.

³ Bagian Farmasi Klinik Program Studi S1 Klinis, Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur, Indonesia.

* Correspondence: arsyik@farmasi.unmul.ac.id; achie.ibrahim@gmail.com Tel.: (+62)81347912495 (A.I)

Abstract

Citation: Ibrahim, A.; Irwansyah; Rusman, A.; Badawi, S.; Riki; Rija'i, H.R.; Fadraersada, J. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit dan Daging Buah Labu Siam (*Sechium edule* Sw.) Terhadap Radikal Bebas DPPH. *J Riset Naturafarm* 2024, 1(2), 46-52.
<https://doi.org/10.70392/jrn.v1i2.4652>

Academic Editor: Dr. Rolan Rusli

Received: 25 Oktober 2024

Revised: 26 November 2024

Accepted: 26 November 2024

Publisher's Note: B-CRETA publisher stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC-BY-NC-SA) 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

ISSN: 3048-0582

Chayote is a vines type of plant, and usually people known it as a healthy food and its fruit can be cooked as a vegetable soup. Research aim was to find out the activity from rind and fruit flesh extract of chayote (*Sechium edule* Sw.) as an antioxidant and find out IC₅₀ from rind and fruit flesh extract of chayote *S. edule* Sw. After peel the rind of chayote fruit, then chayote rind extracted with soxhletation method and chayote fruit flesh with maceration method. Antioxidant activity evaluated by using DPPH method with spectrophotometry, and IC₅₀ count using regresi linier analysis. This research used methanol extract of chayote rind and methanol extract of chayote fruit flesh. Research results showed that chayote rind extract and chayote fruit flesh have some activity as an antioxidant. IC₅₀ for each sample is 422,38 ppm for methanol extract of chayote rind and 1322,62 ppm for methanol extract of chayote fruit flesh.

Keywords: Antioxidant, DPPH, IC₅₀, Maceration, *Sechium edule* Sw, Soxhletation

Abstrak

Tanaman labu siam merupakan tanaman menjalar atau merambat, sehari-hari dikenal sebagai sayuran buah yang menyehatkan. Buahnya biasa dimasak sebagai sayur. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui aktivitas ekstrak kulit dan daging buah labu siam (*Sechium edule* Sw.) sebagai antioksidan dan mengetahui nilai IC₅₀ dari ekstrak kulit dan daging buah *S. edule* Sw. Buah labu siam dipisahkan antara kulit buah dan daging buahnya, kemudian kulit buahnya diekstraksi dengan metode sokletasi dan daging buahnya di ekstraksi dengan maserasi. Uji aktivitas antioksidan pada penelitian ini dilakukan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) secara spektrofotometri, kemudian ditentukan nilai IC₅₀ dengan menggunakan analisis regresi linier. Ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol kulit dan daging buah *S. edule* Sw. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas antioksidan ekstrak kulit dan daging buah labu siam. Nilai IC₅₀ untuk masing masing sampel antara lain ekstrak metanol kulit buah labu siam sebesar 422,38 ppm dan ekstrak metanol daging buah labu siam sebesar 1322,62 ppm. Dari hasil pengujian

aktivitas antioksidan diketahui bahwa ekstrak metanol kulit buah labu siam lebih baik daripada ekstrak daging buah labu siam.

Kata Kunci: Antioksidan, DPPH, IC_{50} , Maserasi, *Sechium edule* Sw, Sokletasi

1. PENDAHULUAN

Labu siam atau *Sechium edule* Swartz tergolong dalam keluarga Cucurbitaceae, buahnya termasuk golongan berbiji tunggal, bentuknya seperti buah pir, dengan warna buah ada yang hijau tua, hijau muda, atau hampir putih dan daging buah berwarna putih atau putih hijau. Hasil skrining fitokimia dan analisis KLT menunjukkan bahwa buah labu siam (*Sechium edule* Sw.) mengandung alkaloid, saponin, dan flavonoid [1]. Buah labu siam (*Sechium edule* (Jacq.) swartz) merupakan salah satu tanaman yang mengandung vitamin C [2]. Walaupun buahnya sering menjadi pilihan untuk dimakan, namun hampir semua bagian tanaman yang lain dari tanaman ini berguna dan dapat dimakan.

Antioksidan merupakan zat yang dapat mencegah terjadinya oksidasi atau menetralkan senyawa yang telah teroksidasi dengan cara menyumbangkan hidrogen dan atau elektron [3]. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) adalah radikal bebas stabil berwarna ungu. Ketika direduksi oleh senyawa antiradikal, terjadi perubahan warna menjadi berwarna kuning (difenilpikrilhidrazin). Metode DPPH berfungsi untuk mengukur elektron tunggal seperti aktivitas transfer hidrogen, sekaligus juga untuk mengukur aktivitas penghambatan radikal bebas. Metode ini sangat cocok untuk skrining awal berbagai sampel, terutama ekstrak tumbuhan [4,5].

Parameter yang dipakai untuk menunjukan aktivitas antioksidan adalah harga konsentrasi efisien atau Efficient Concentration (EC_{50}) atau Inhibition Concentration (IC_{50}) yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal atau konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan persen penghambatan sebesar 50%. Zat yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi, akan mempunyai harga EC_{50} atau IC_{50} yang rendah [6].

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui aktivitas ekstrak kulit dan daging buah *S. edule* Sw. sebagai antioksidan dan mengetahui nilai IC_{50} dari ekstrak kulit dan daging buah labu siam *S. edule* Sw. Oleh karena itu, perlu dilakukan kajian secara ilmiah tentang Aktivitas Antioksidan *S. edule* Sw, terhadap radikal bebas. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat bagi peningkatan kesehatan dalam masyarakat

2. BAHAN, ALAT, DAN PROSEDUR

2.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah dari *S. edule* Sw. yang diperoleh dari Kota Samarinda, Kalimantan Timur, aquades, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) dan metanol, alumunium foil.

2.2. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: Spektrofotometer UV-Visible (Genesys I0S UV-Vis Spectrophotometer®), maserator, rotary evaporator (Buchi), timbangan digital (Hummer®, timbangan analitik (And gf 300), vortex (Health H-VM-400®, corong pisah, corong Buchner, gelas kimia, tabung reaksi, penjepit tabung, pipet tetes, Erlenmeyer, oven (Memmert), water bath (Wisebath®, batang pengaduk, labu ukur (Pyrex®), mikropipet (Sacores Swiss®), spatula, tabung reaksi bertutup (Pyrex®).

2.3. Prosedur

2.3.1. Penyiapan Sampel

2.3.1.1 Pengumpulan buah *S. edule* Sw

Buah *S. edule* Sw yang dikumpulkan adalah yang segar dan muda berwarna hijau, kemudian dibersihkan dari kotoran (sortasi basah) dan ditimbang beratnya, selanjutnya dikeringkan menggunakan oven suhu 42°C.

2.3.1.2 Pembuatan Ekstrak Metanol Daging Buah *S. edule* Sw

Sampel yang telah kering timbang sebanyak 1,0 Kg dimasukkan ke dalam wadah *macerator*, diberikan cairan penyari metanol sebanyak 8,0 L. Sampel direndam selama 3-5 hari sambil diaduk, sampai diperoleh larutan ekstrak metanol. Perendaman dan penggantian pelarut dilakukan sebanyak 3 kali sampai larutan ekstrak terlihat jernih. Sampel disaring, larutan ekstrak kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Ekstrak metanol kental selanjutnya diuapkan dengan *water bath* secara maksimal dan dikeringkan dalam desikator. Ekstrak metanol kering yang diperoleh kemudian ditimbang, disimpan dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari cahaya.

2.3.1.3 Pembuatan Ekstrak Metanol Kulit Buah *S. edule* Sw

Kulit buah *S. edule* Sw yang telah dipisahkan dari daging buah, kemudian dikering anginkan di dalam ruangan yang tidak terpapar sinar matahari secara langsung, dan diperoleh kulit buah *S. edule* Sw kering. Selanjutnya kulit buah dipotong kecil-kecil ukuran 1 cm², dan ditimbang berat keringnya. Kulit buah selanjutnya diekstraksi dengan metode sokletasi, menggunakan pelarut metanol. Proses Sokletasi dilakukan selama 5-7 jam hingga memperoleh 6-7 siklus. Sampel disaring dan ekstrak metanol dimasukkan ke dalam *rotary evaporator* pada suhu 50°C diperoleh ekstrak metanol kental. Ekstrak metanol kental selanjutnya diuapkan dengan *water bath* secara maksimal dan dikeringkan dalam desikator. Ekstrak metanol kering yang diperoleh kemudian ditimbang, dan disimpan dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari cahaya.

2.3.2 Pengujian Antioksidan

2.3.2.1 Penyiapan Larutan DPPH

Kristal DPPH ditimbang sebanyak 4 mg untuk dilarutkan dalam 100 mL metanol di dalam labu ukur gelap atau labu ukur coklat, sehingga didapatkan larutan DPPH uji dengan konsentrasi 40 ppm (*part per million*). Larutan disimpan pada tempat tertutup rapat dan terlindung dari cahaya [7].

2.3.2.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Dimasukkan 2 mL larutan DPPH 40 ppm ke dalam tabung reaksi tertutup dan ditambahkan 2 mL metanol. Selanjutnya dihomogenkan dan dibiarkan ditempat gelap selama 30 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510 – 520 nm dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang pada saat nilai absorbansi maksimum [8].

2.3.2.3 Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Kulit Buah (KB) dan Daging Buah (DB) *S. edule* Sw

Diambil 2 mL ekstrak kemudian ditambahkan dengan 2 mL larutan DPPH 40 ppm dalam tabung reaksi tertutup, dihomogenkan (*vortex*), kemudian ditempatkan di tempat gelap pada suhu kamar selama 30 menit. berubahnya warna menjadi kuning menunjukkan bahwa, masing-masing konsentrasi menunjukkan efisiensi penangkal radikal bebas di uji dengan spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 517 nm [4,7,9].

Data pada penelitian ini adalah presentase peredaman radikal DPPH yang didapat menggunakan rumus :

$$\% \text{ Aktiv. Antioksidan} = \frac{\text{Abs.Blanko} - \text{Abs.Sampel}}{\text{Abs.Blanko}} \times 100 \%$$

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Pemisahan dengan metode Ekstraksi

Proses ekstraksi yang dilakukan menggunakan metode maserasi untuk sampel daging buah dan metode sokhletasi untuk sampel kulit buah, keduanya menggunakan pelarut metanol. Perbedaan pemilihan metode ekstraksi berdasarkan pertimbangan tekstur bahan yang diekstraksi. Metode maserasi merupakan metode ekstraksi cara dingin dimana tidak ada pengaruh suhu dalam proses penyariannya. Metode ini umumnya digunakan untuk mengekstraksi bahan dengan tekstur lunak, dan tidak tahan terhadap panas. Metode sokhletasi merupakan metode ekstraksi cara panas yang menggunakan pemanasan dalam proses penyariannya. Metode ini umumnya digunakan untuk mengekstraksi bahan dengan tekstur keras dan tahan terhadap panas. [10,11,12]. Penentuan variasi konsentrasi dilakukan dengan cara membuat berbagai seri konsentrasi. Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan menguji ekstrak metanol daging buah dan ekstrak daging buah. Kemudian dilakukan analisis untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari masing-masing ekstrak. Hasil penelitian yang diharapkan adalah dapat diketahui aktivitas antioksidan kulit dan daging buah yang memenuhi syarat minimal sebagai antioksidan. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat apabila nilai IC_{50} antara 50-100 ppm, sedang apabila nilai IC_{50} berkisar antara 100-150 ppm, dan lemah apabila nilai IC_{50} berkisar antara 150-200 ppm [13].

3.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum bertujuan untuk mengetahui besarnya panjang gelombang yang dibutuhkan DPPH untuk mencapai serapan maksimal. Larutan DPPH 40 ppm sebanyak 2 mL ditambahkan metanol sebanyak 2 mL. Lalu diamati serapannya pada panjang gelombang dengan rentang 500-520 nm. Sebagai blanko digunakan metanol. Panjang gelombang dengan absorbansi tertinggi yang diperoleh adalah panjang gelombang maksimum, yaitu 515 nm dengan nilai absorbansi 0,686.

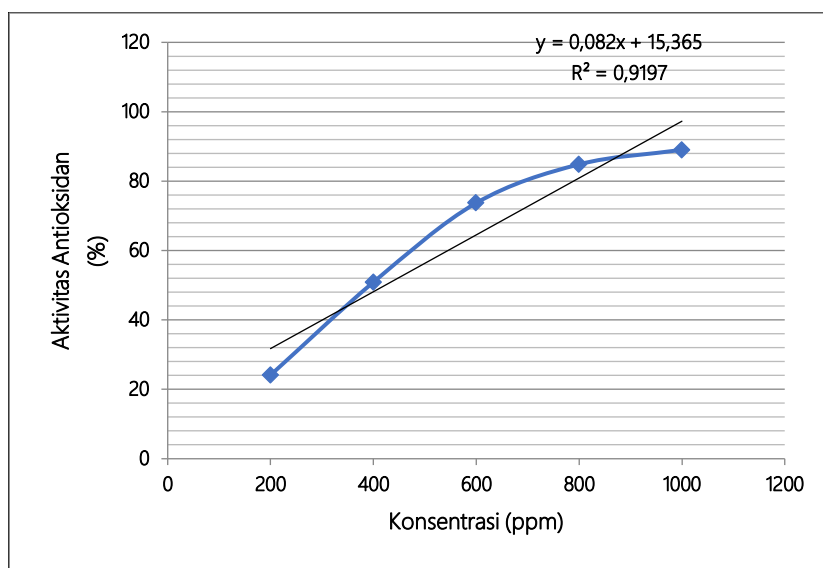
3.3 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol KB *S. Edulis* Sw

Ekstrak metanol dari KB *S. edule* Sw diperoleh melalui proses sokletasi dengan menggunakan pelarut metanol. Konsentrasi yang digunakan pada pengujian aktivitas antioksidan ekstrak metanol KB *S. edule* Sw adalah 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm ($\mu\text{g/mL}$). Dari hasil penelitian, didapatkan nilai absorbansi dan persen aktivitas antioksidan dari tiap konsentrasi yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai Absorbansi dan Persen Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol KB *S. edule* Sw.

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Aktivitas Antioksidan (%)	IC_{50} (ppm)
Blanko DPPH	0,686	-	
200	0,521	24,10	422,38
400	0,337	50,87	
600	0,180	73,71	
800	0,104	84,84	
1000	0,075	89,02	

Berdasarkan data pada Tabel 1, diperoleh persamaan regresi linier yaitu $y = 0,082x + 15,365$. Dari persamaan regresi ini, maka diperoleh nilai IC_{50} ekstrak metanol KB *S. edule* Sw sebesar 422,38 ppm. Dari hasil ini diperoleh aktivitas antioksidan ekstrak metanol KB *S. edule* Sw yang lemah dengan nilai IC_{50} ekstrak lebih dari 200 ppm.



Gambar.1. Grafik nilai LC_{50} ekstrak metanol KB *S. edule* Sw.

Grafik pada Gambar 1, menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin tinggi persentase aktivitas antioksidannya. Persamaan regresi linier memiliki nilai b yang positif dan diperoleh koefisien korelasi (r) dengan nilai 0,9197 dan nilai koefisien regresi (b) yaitu 0,082.

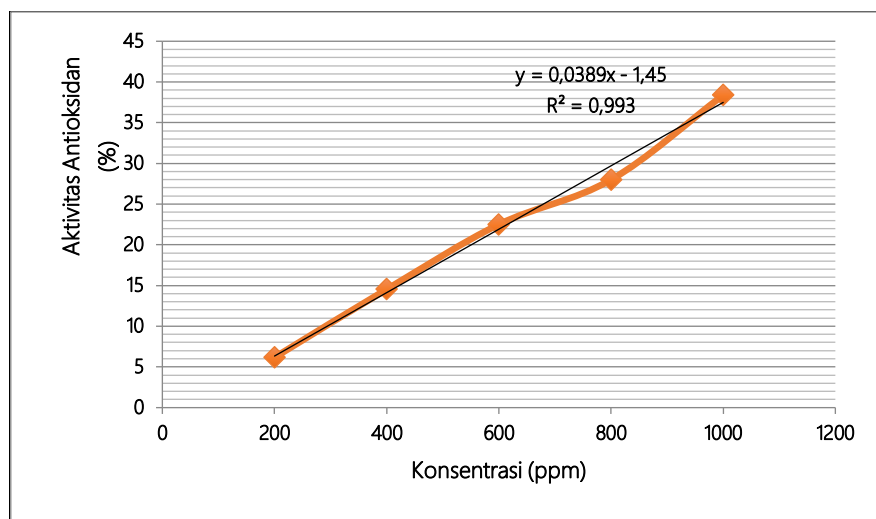
3.4 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol DB *S. edule* Sw

Ekstrak metanol dari DB *S. edule* Sw diperoleh melalui proses maserasi dengan menggunakan pelarut metanol. Konsentrasi yang digunakan pada pengujian aktivitas antioksidan ekstrak metanol daging buah labu siam adalah 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm ($\mu\text{g/mL}$). Dari hasil penelitian, didapatkan nilai absorbansi dan persen aktivitas antioksidan dari tiap konsentrasi yang ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel. 2 Nilai Absorbansi dan Persen Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol DB *S. edule* Sw.

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Aktivitas Antioksidan (%)	IC_{50} (ppm)
Blanko DPPH	0,686	-	1322,62
200	0,644	6,17	
400	0,586	14,53	
600	0,532	22,50	
800	0,494	27,99	
1000	0,423	38,38	

Berdasarkan data pada Tabel 2, didapatkan persamaan regresi linier yaitu $y = 0,0389x - 1,45$. Dari persamaan regresi ini, maka diperoleh nilai IC_{50} ekstrak metanol DB *S. edule* Sw sebesar 1322,62 ppm. Dari hasil ini diperoleh aktivitas antioksidan ekstrak metanol DB *S. edule* Sw yang sangat lemah dengan nilai IC_{50} ekstrak lebih dari 1000 ppm.

Gambar.2. Grafik nilai LC₅₀ ekstrak metanol DB *S. edule* Sw

3.5 Nilai IC₅₀ Ekstrak Buah *S. edule* Sw

Nilai IC₅₀ merupakan nilai yang digunakan untuk menentukan konsentrasi yang dibutuhkan suatu zat atau senyawa untuk menghambat 50% radikal bebas. Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa nilai IC₅₀ dari ekstrak metanol KB dan DB *S. edule* Sw adalah sebagai berikut :

Tabel 3. Nilai LC₅₀ Ekstrak kulit dan daging buah *S. edule* Sw

No.	Buah <i>S. edule</i> Sw	LC ₅₀ (ppm)	Persamaan regresi
1.	Kulit buah	422,38	$y = 0,082 x + 15,365$
2.	Daging buah	1322,62	$y = 0,0389 x - 1,45$

Berdasarkan data Tabel 3, nilai LC₅₀ masing-masing ekstrak uji dapat diketahui bahwa ekstrak metanol kulit buah menunjukkan aktivitas lebih baik dari ekstrak metanol daging buah *S. edule* Sw. Ekstrak metanol kulit buah *S. edule* Sw masih berpotensi dilakukan penelitian lanjutan dengan melakukan fraksinasi ekstrak metanol kasar untuk mengetahui aktivitas antioksidan yang lebih kuat dengan nilai LC₅₀ < 200 ppm.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan data hasil penelitian dapat disimpulkan antara lain ekstrak metanol kulit dan daging buah labu siam (*Sechium edule* Sw.) memiliki aktivitas lemah sebagai antioksidan terhadap radikal bebas DPPH dengan nilai IC₅₀ masing-masing adalah 422,38 ppm, dan 1322,62 ppm.

KONTRIBUSI PENULIS: Konsep- Arsyik Ibrahim, Irwansyah dan Arman Rusman; Metodologi- Arsyik Ibrahim dan Satriani Badawi; Sumber- Irwansyah, Riki; Bahan-Irwansyah, Satriani Badawi dan Riki; Pengawasan- Jaka Fadraersada; Menulis—Meninjau- Arsyik Ibrahim, Arman Rusman dan Hifdzur Rashif Rija'l; Telaah kritis-Arsyik Ibrahim dan Jaka Fadraersada; Editor: Arsyik Ibrahim; Koleksi data- Irwansyah dan Satriani Badawi; Pencarian literatur- Arman Rusman, Hifdzur Rashif Rija'l dan Riki.; Publikasi- Arsyik Ibrahim dan Irwansyah.

PENDANAAN: -

UCAPAN TERIMA KASIH: Penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada Dekan Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman, Kepala Laboratorium Farmasi Dasar, dosen pengarah, dosen pembahas, seluruh

tenaga laboran, dan pihak lain yang telah mendukung dan memberikan saran, dan motivasi sehingga dapat menyelesaikan artikel ilmiah ini.

Konflik Kepentingan: Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan.

REFERENSI

1. Marlina, Soerya D., Venty S., dan Suyono. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. *Jurnal Biofarmasi*, 2005, 3(1), 1-6.
2. Daulay, S. A., Wahyuni, S., Optimasi Sediaan Sari Buah Labu Siam (*Sechium Edule* (Jacq) Swartz) Sebagai Minuman Herbal Berdasarkan Beberapa Analisis. *Prosiding "Hilirisasi Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat"*, 2022, 489–501.
3. Silalahi, J. *Makanan Fungsional*, 2006, Kanisius: Yogyakarta.
4. Prakash, A., Rigelhof, F. and Miller, E., Antioxidant Activity: *Medallion Laboratories, Analithycal Progress*, 2001, 19 (2), 1-4.
5. Rahayu, D.S., Kusri, D., Fachriyah, E. Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang (*Terminalia catappa* L) dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH). *Skripsi*, Universitas Diponegoro: Semarang, 2010.
6. Kosasih, Peranan Antioksidan pada Lanjut Usia, Pusat Kajian Nasional Masalah Lanjut Usia. 2004, Jakarta.
7. Setiawan, I.M., Yudistira, A., Defny S.W. Uji Aktivitas Antioksidan *Stylissa Sp.* dengan Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), *J. Pharmacon*, 2019, 8(4), 961-967.
8. Septian, M.T., Wahyuni, F.D., Nora, A. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH dan Identifikasi Golongan Metabolit Sekunder pada Daging Ubi Jalar dari Berbagai Daerah di Indonesia; *Spin Jurnal Kimia & Pendidikan Kimia*, 2022, 4 (2), 185-196.
9. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan makanan, Jakarta, 1995.
10. Ulfa, A.S.M., Emelda, Abdurrahman, M.M., Sulistyani, N., Pengaruh Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi terhadap Standardisasi Parameter Spesifik dan Non Spesifik Ekstrak Etanol Biji Pepaya (*Carica papaya* L.), *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*, 2023, 6(1), 1-12.
11. Damayanti, K.W., Purnama, L.S., Setyawati T. E., Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanolik Biji Pepaya (*Carica papaya* L.) Seed, *J Curr Pharm Sci*, 2021, 4(2), 355–359.
12. Emelda, Safitri E.A., Fatmawati, A. An activity of ethanolic extract of *Ulva lactuca* in Inhibiting *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceutical Journal of Indonesia*, 2021, 7(1), 43–7.
13. Molyneux, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 2004, 26(2), 489–501.