

Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Sifat Fisik dan Kimia Ekstrak Biji Kopi Sangrai Jenis Arabika (*Arabica coffea*) Asal Wamena dan Lanny Jaya

Septiani Mangiwa^{*1}, Agnes Eri Maryuni²

^{1,2}Program Studi Kimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Cenderawasih, Jayapura.

septhy.mangiwa@yahoo.com

ABSTRAK

Kopi merupakan salah satu komoditas unggulan di Papua. Papua memiliki berbagai jenis kopi berkualitas yang memiliki cita rasa dan aroma yang khas. Kopi-kopi tersebut tersebar di beberapa wilayah di Papua. Kopi yang berkualitas akan menghasilkan cita rasa, aroma dan khasiat yang berkualitas. Kualitas biji kopi dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain : jenis, letak geografis, cara pengolahan dan cara penyajian. Umumnya kopi disajikan dalam bentuk minuman yang diolah dari biji kopi sangrai dengan teknik penyeduhan menggunakan metoda ekstraksi menggunakan pelarut air. Pemilihan metoda ekstraksi akan mempengaruhi kualitas ekstrak yang dihasilkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh metode ekstraksi terhadap sifat fisik dan kimia kopi Papua. Sampel kopi yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kopi Arabika asal Wamena dan Lanny Jaya. Biji kopi diekstraksi dengan metode maserasi dan soxhletasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua ekstrak biji kopi berwarna coklat kehitaman, aroma biji kopi yang dihasilkan dengan metode soxhletasi lebih khas dan tajam. Tingkat keasaman ekstrak kopi secara soxhletasi sedikit lebih tinggi dibanding maserasi. Sementara itu, kandungan kimia kopi seperti : alkaloid, terpenoid, steroid, saponin, polifenol dan tanin dalam ekstrak kopi soxhletasi lebih banyak dibanding dengan metode maserasi. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa metode ekstraksi mempengaruhi sifat fisik dan kimia kopi. Dimana metode soxhletasi lebih optimal dalam mengekstrak biji kopi dibanding metode maserasi.

Kata Kunci : Kopi Arabika Papua, metode ekstraksi, maserasi, soxhletasi, sifat fisik kopi, sifat kimia kopi.

PENDAHULUAN

Kopi merupakan salah satu komoditas yang diperhitungkan di Papua. Papua memiliki berbagai jenis kopi dari berbagai daerah di Papua dengan cita rasa dan aroma yang khas. Kopi Papua tersebar di beberapa wilayah antara lain : Jayawijaya, Timika, Pegunungan Bintang, Lanny Jaya, Waropen, Nabire, Serui dan daerah lainnya. Kopi- kopi tersebut sudah dikenal di Indonesia bahkan beberapa kopi Arabika unggulan Papua seperti kopi Wamena dan Timika sudah dikenal dan diekspor sampai ke manca negara.

Kopi tidak hanya mempunyai cita rasa dan aroma khas tetapi juga diyakini mempunyai khasiat bagi kesehatan tubuh manusia. Hal ini menjadikan kopi menjadi minuman yang populer bagi seluruh kalangan masyarakat, baik tua maupun muda, pria maupun wanita. Kepopuleran kopi di Papua terlihat dari industri kopi yang terus berkembang yang ditandai dengan meningkatnya jumlah cafe dan kedai kopi di daerah Papua. Minuman kopi disajikan dalam berbagai macam metode pengolahan, penyajian dan varian rasa.

Pada umumnya, minuman kopi yang disajikan, diolah dari biji kopi yang telah disangrai dan dihaluskan. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa

penyangraian mempengaruhi aroma, cita rasa dan komponen kimia kopi yang berdampak pula pada aktivitas biologinya. Bioaktivitas kopi ditentukan oleh komposisi polifenol yang terkandung di dalamnya. (Belay *et al*, 2009; Hečimović *et al*, 2011; Tamilmani, *et al*; 2015). (Farah *et al*, 2005; Ewa *et al*, 2007; Bicho *et al*, 2011; Hečimović *et al*, 2011). Semakin tinggi suhu penyangraian, aktivitas antioksidannya semakin berkurang (Cammerer, *et al.*, 2006). Kadar kafein meningkat dengan adanya penyangraian sedangkan kadar asam klorogenat semakin berkurang (Mangiwa, dkk; 2014; Mangiwa, dkk, 2015, Mangiwa, dkk 2016).

Selain penyangraian, metode penyeduhan kopi juga dapat mempengaruhi aroma dan cita rasa kopi. Metode penyeduhan kopi yang umumnya digunakan dalam pengolahan serbuk kopi sangrai menjadi minuman merupakan aplikasi metode ekstraksi menggunakan pelarut air. Di dalam air, komponen volatil serta komponen-komponen kimia akan larut sedangkan selulosa tidak dapat larut dan tertinggal sebagai ampas. Komponen volatil dan komponen kimia yang terlarut dalam air inilah yang akan mempengaruhi cita rasa, aroma, komponen kimia dan bioaktivitasnya.

Metode ekstraksi terdiri dari beberapa jenis, yaitu maserasi, perkolasi, soxhletasi, reflux, dekok, infusa, dan lain sebagainya. Pemilihan metode yang tepat akan menghasilkan minuman kopi dengan kualitas unggul dari segi cita rasa, aroma dan khasiat dari senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya. Berdasarkan uraian di atas, maka pada penelitian ini akan dilakukan kajian mengenai pengaruh metode ekstraksi terhadap sifat fisik dan kimia kopi Arabika Papua.

METODOLOGI PENELITIAN

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Cenderawasih selama 5 bulan, yaitu Mei - September 2019.

Alat dan Bahan

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas laboratorium, neraca analitik, magnetik stirrer, seperangkat alat soxhlet, oven, furnace, pH Meter, evaporator.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuades, metanol, kloroform, etanol, amoniak, asam sulfat pekat, asam klorida, besi (III) klorida, asam asetat anhidrid, serbuk Mg, pereaksi

Wegner, pereaksi Meyer, pereaksi Dragendrof, aseton, dan kertas saring.

Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kopi Arabika Papua asal Wamena dan Lanny Jaya yang dibeli di supermarket di Wamena.

Prosedur Kerja

Karakterisasi Sampel

Karakterisasi sampel yang dilakukan meliputi : varietas, proses pengeringan, rasa dan letak geografi

Preparasi Sampel

Biji kopi disangrai dan dihaluskan untuk mendapatkan ukuran yang seragam. Serbuk biji kopi yang diperoleh disimpan dalam wadah dan ditutup rapat.

Ekstraksi Biji Kopi

Ekstraksi serbuk kopi dilakukan dengan 2 metode yaitu maserasi dan soxhletasi menggunakan pelarut methanol.

1. Metode Maserasi

Sebanyak 100 gram serbuk kopi diekstraksi dengan 300 mL pelarut pada suhu kamar selama 3 x 24 jam sambil diaduk . Campuran yang diperoleh, disaring untuk memisahkan ekstrak cair

dan ampasnya. Ekstrak cair dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator.

2. Metode Soxhletasi

Sebanyak 100 gram serbuk kopi dibungkus dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam kolom soxhlet dan disoxhletasi menggunakan 300 mL pelarut pada titik didih pelarut yang digunakan. Ekstrak cair yang diperoleh disaring dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator.

Uji Sifat Fisik

Uji sifat fisik dilakukan secara organoleptik menggunakan panca indra. Parameter uji fisik meliputi warna dan aroma.

Uji Sifat Kimia

Tingkat keasaman (pH)

Pengukuran pH dilakukan menggunakan pH-meter. Sejumlah ekstrak dilakutkan ke dalam akuades yang telah dididihkan sebelumnya, kemudian diukur dengan pH-meter.

Kandungan Kimia

Kandungan kimia ekstrak kopi ditentukan melalui skrining fitokimia

berdasarkan metode Harborne, 1987 dengan beberapa modifikasi.

a. Alkaloid

Sebanyak 0,2 g ekstrak dilarutkan ke dalam sejumlah kloroform, kemudian ditambahkan 10 ml amoniak dan 10 ml kloroform. Larutan disaring dan ke dalam filtratnya ditambahkan larutan asam sulfat 4 M sebanyak 10 tetes. Filtrat dikocok dengan dengan baik dan didiamkan sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan atas dipisahkan dan dibagi menjadi 3 bagian kemudian dianalisis dengan pereaksi Wegner, Meyer dan Dragendroff. Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan coklat dengan pereaksi Wegner, endapan kuning dengan pereaksi Meyer dan endapan merah jingga dengan pereaksi Dragendroff.

b. Flavonoid

Sebanyak 0,2 g ekstrak dilarutkan dengan 5 ml etanol dan dipanaskan selama 5 menit. Kemudian ditambahkan beberapa tetes HCl pekat dan 0,2 g serbuk Mg. Adanya Flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga, merah muda atau merah tua yang tidak hilang dalam waktu 3 menit.

c. Terpenoid dan Steroid

Sebanyak 0,2 g ekstrak direndam dengan asam asetat anhidrat dan dibiarkan selama \pm 15 menit. Pipet beberapa tetes larutan ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 2-3 tetes asam sulfat pekat. Adanya terpenoid ditunjukkan dengan terjadinya warna merah, jingga atau ungu. Adanya steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau atau biru.

d. Saponin

Sebanyak 0,2 g ekstrak direndam dalam sejumlah akuades, kemudian dididihkan selama 5 menit dan didinginkan. Setelah dingin, larutan dikocok kuat. Adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil.

e. Polifenol dan Tanin

Sebanyak 0,2 g ekstrak direndam dengan sejumlah etanol. Selanjutnya 1 ml larutan tersebut direaksikan dengan dengan 2 -3 tetes larutan FeCl_3 1 %. Adanya polifenol dan tanin ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Biji Kopi

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kopi yang berasal dari Kabupaten Jayawijaya dan Lanny Jaya.

Di mana kedua kopi ini merupakan kopi Papua dengan kualitas unggul. Hal ini dibuktikan saat kedua jenis kopi tersebut dihadirkan dalam Festival Kopi Papua yang dilaksanakan di Jayapura pada tahun 2018 lalu. Dalam festival tersebut, kedua kopi tersebut dihargai dengan harga yang fantastik. Berikut ini adalah karakter dari kedua kopi tersebut :

Tabel 1. Karakterisasi Biji Kopi Wamena dan Lanny Jaya

No	Karakter	Biji Kopi Wamena	Biji Kopi Lanny Jaya
1	Varietas	Arabica Typica	Arabica Typica
2	Proses pengeringan	Natural Sun dried	Natural/Sundried
3	Rasa	Medium acidity	Low acidity High sweetness
4	Letak geografis	1600 meter Asl	2150 meter Asl

Biji kopi disangrai secara tradisional menggunakan api sedang. Biji kopi mengalami pengembangan ukuran, perubahan warna dan aroma ketika disangrai. Hal tersebut karena selama proses penyangraian terjadi penguapan air, terbentuknya senyawa volatil, karemelisasi karbohidrat, pengurangan serat kasar, gas CO_2 dan menghasilkan aroma kopi yang khas (Ridwansyah, 2009).

Karamelisasi karbohidrat selama proses penyangraian menyebabkan biji kopi mengalami perubahan warna dari hijau, menjadi coklat. Perubahan warna ini disebut juga reaksi Maillard yaitu reaksi yang terjadi antara asam amino dan gula pereduksi. Perubahan warna yang terjadi disertai dengan pelepasan aroma kopi yang sangat khas akibat dari lepasnya senyawa- senyawa volatil yang terdapat dalam biji kopi.

Biji kopi sangrai dihaluskan dan diayak untuk memperluas permukaan kopi agar mudah diekstraksi serta mendapat ukuran-ukuran yang seragam. Di mana semakin luas permukaan suatu zat maka proses ekstraksinya akan semakin optimal.

Sifat Fisik

Sifat fisik ekstrak biji kopi diketahui melalui uji organoleptik menggunakan panca indra. Adapun parameter fisik yang diamati yaitu warna dan aroma. Ekstraksi secara maserasi maupun soxhletasi menghasilkan ekstrak biji kopi sangrai (Kopi Wamena dan Lanny Jaya) yang digunakan dalam penelitian ini berwarna coklat kehitaman sesuai dengan warna serbuk biji kopi sangrai.

Biji kopi yang diekstrak secara soxhletasi menghasilkan aroma kopi yang khas dan lebih tajam dibandingkan metode

maserasi. Hal ini disebabkan karena ekstraksi secara soxhletasi menggunakan uap panas dari pelarut yang digunakan sedangkan ekstraksi secara maserasi dilakukan pada suhu kamar. Ketika terjadi interaksi antara uap panas dan serbuk kopi, terjadi pelepasan senyawa- senyawa volatil yang menghasilkan aroma kopi yang khas dan tajam. Ekstrak biji kopi Lanny Jaya menghasilkan aroma yang khas dan sangat tajam dibandingkan ekstrak biji kopi Wamena. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa metode ekstraksi mempengaruhi sifat kimia kopi.

Tabel 2. Sifat Fisik Ekstrak Biji Kopi Wamena dan Lanny Jaya

No	Sifat Fisik	Ekstrak Biji Kopi Wamena		Ekstrak Biji Kopi Lanny Jaya	
		Maserasi	Soxhletasi	Maserasi	Soxhletasi
1	Warna	hitam kecoklatan	hitam kecoklatan	hitam kecoklatan	hitam kecoklatan
2	Aroma	khas kopi	khas kopi dan tajam	khas kopi	khas kopi dan sangat tajam



Gambar 1. A: Biji kopi (sangrai) Wamena;
 B : Biji kopi (sangrai) Lanny Jaya;
 C : Serbuk kopi (sangrai) Wamena; D.
 Serbuk kopi (sangrai) Lanny Jaya.

Sifat Kimia

Sifat kimia ekstrak biji kopi ditentukan terhadap pH dan kandungan kimianya. Sifat kimia ekstrak biji kopi ditunjukkan pada Tabel 4.3. Data pada tabel tersebut menunjukkan bahwa biji kopi Wamena yang diekstraksi secara maserasi dan soxhletasi mempunyai pH berturut-turut sebesar 5,71 dan 5,54 sedangkan pH biji kopi Lanny Jaya yang diekstraksi secara maserasi dan soxhletasi berturut-turut sebesar 5,37 dan 5,18. Terlihat bahwa kedua biji kopi yang dianalisis mempunyai tingkat keasaman yang rendah, namun biji kopi Lanny Jaya memiliki tingkat keasaman yang sedikit lebih tinggi dibanding kopi Wamena.

Sementara itu, perbedaan metode ekstraksi juga menghasilkan tingkat keasaman yang berbeda. Biji kopi yang diekstraksi dengan cara soxhletasi memiliki tingkat keasaman yang lebih tinggi dibanding dengan metode maserasi. Hal ini menunjukkan bahwa metode soxhletasi dapat mengekstrak komponen dalam biji kopi, termasuk didalamnya asam-asam organik secara maksimal dibandingkan metode maserasi.

Uji sifat kimia ekstrak biji kopi menunjukkan bahwa ekstrak biji kopi Wamena dan kopi Lanny Jaya teridentifikasi mengandung alkaloid, terpenoid, steroid, saponin, polifenol dan tanin sedangkan flavonoid tidak terdeteksi. Adanya alkaloid dalam keempat ekstrak biji kopi tersebut ditandai dengan terbentuknya endapan coklat kemerahan dengan pereaksi Wagner, endapan putih kekuningan dengan pereaksi Mayer dan endapan jingga dengan pereaksi Drgendroff. Endapan yang dihasilkan merupakan kompleks kalium-alkaloid yang terbentuk dari reaksi antara ion logam kalium dari masing – masing pereaksi dengan alkaloid yang teradapat dalam ekstrak. Alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas yang dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinasi

dengan ion logam. Warna coklat kemerahan dengan pereaksi Wagner merupakan warna dari I^{3-} yang dihasilkan dari reaksi I_2 dengan I^- dari KI dalam pembuatan pereaksi Wagner sedangkan warna jingga pada reaksi dengan Dragendorff dihasilkan dari ikatan antara ion logam Bi^{2+} dan dengan I^- pada pembuatan reagen tersebut.

Pada identifikasi flavonoid, terbentuk gelembung – gelembung yang merupakan gas hidrogen yang dihasilkan dari reaksi logam magnesium dan asam klorida. Namun tidak terjadi perubahan warna. Hal ini mengindikasikan bahwa keempat ekstrak tidak mengandung flavonoid.

Adanya terpenoid dan steroid ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi hijau pekat dengan penambahan asetat anhidrat serta terbentuknya cincin berwarna coklat pada batas larutan saat ditambahkan H_2SO_4 pekat. Perubahan warna disebabkan karena terjadinya oksidasi pada senyawa terpenoid dan steroid melalui pembantuan ikatan rangkap terkonjugasi.

Tabel 3. Sifat Kimia Ekstrak Biji Kopi

Wamena dan Lanny Jaya

No	Sifat Kimia	Ekstrak Biji Kopi Wamena		Ekstrak Biji Kopi Lanny Jaya	
		Maserasi	Soxhletasi	Maserasi	Soxhletasi
1	pH	5,71	5,54	5,37	5,18
2	Kandungan Kimia :				
	a. Alkaloid	-	-	-	-
	b. Flavonoid	+	++	+	++
	c. Terpenoid	+	++	+	++
	d. Steroid	+	++	+	++
	e. Saponin	+	++	+	++
	f. Polifenol dan Tanin				

- : tidak terdeteksi; + : terdeteksi; ++ :terdeteksi banyak

Adanya polifenol dan tanin dalam ekstrak ditandai dengan terbentuknya warna hijau kehitaman dengan pereaksi $FeCl_3$ 1 %. Warna hijau kehitaman yang dihasilkan merupakan senyawa kompleks Fe-tanin yang terbentuk dari reaksi antara tanin dari ekstrak dengan ion Fe^{3+} dari pereaksi $FeCl_3$.

Adanya saponin dalam ekstrak ditandai dengan terbentuknya busa setelah pengocokan terhadap ekstrak yang dilarutkan dalam air panas. Busa yang dihasilkan terbentuk dari reaksi antara gugus hidrofobik dengan udara. Di mana senyawa golongan saponin memiliki gugus hidrofilik yang dapat berikatan dengan air dan gugus hidrofobik yang dapat berikatan dengan udara.

Kandungan kimia ekstrak biji kopi dengan metode soxhletasi lebih mudah

dideteksi dan terlihat jelas dibanding dengan metode maserasi. Hal ini ditunjukkan dengan perubahan warna yang lebih jelas dan pekat, jumlah busa yang lebih banyak dan stabil pada biji kopi yang diekstraksi secara soxhletasi dibanding maserasi. Dengan kata lain dapat dikatakan bahwa kandungan alkaloid, terpenoid, steroid, saponin, polifenol dan tanin yang terkandung dalam ekstrak secara soxhletasi lebih banyak dibanding metode maserasi. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa metode ekstraksi mempengaruhi sifat kimia biji kopi.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan di atas, dapat disimpulkan bahwa metode ekstraksi mempengaruhi sifat fisik dan kimia biji kopi. Dimana biji kopi Arabika asal Wamena dan Lanny Jaya yang diekstraksi secara soxhletasi menghasilkan aroma kopi yang khas dan lebih tajam dibanding dengan metode maserasi. Metode soxhletasi menghasilkan ekstrak kopi dengan tingkat keasaman sedikit lebih tinggi dibanding metode maserasi. Ekstrak biji kopi dari kedua metode tersebut mengandung alkaloid, terpenoid, steroid, saponin, polifenol dan tanin. Namun

metode soxhletasi menghasilkan alkaloid, terpenoid, steroid, saponin, polifenol dan tanin dalam jumlah yang lebih banyak dibanding dengan metode maserasi. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa metode ekstraksi mempengaruhi sifat fisik dan kimia kopi. Dimana metode soxhletasi lebih optimal dalam mengekstrak biji kopi dibanding metode maserasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada LPPM Uncen yang telah mendanai penelitian ini melalui dana PNBPU Uncen tahun 2019. Terima kasih juga disampaikan kepada Ketua Jurusan dan Laboratorium Kimia FMIPA Uncen yang telah mengizinkan peneliti untuk melakukan penelitian di Laboratorium Kimia.

DAFTAR PUSTAKA

- Belay A, dan Gholap A.V., 2009. Characterization and determination of chlorogenic acid (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy., African Journal of Pure and Applied Chemistry. 3 (11) : 234-240.
- Bicho, N.C., Leitao, A.E., Rumalho, J.C., Lidon, F.C., 2011. Identification of

- chemical clusters discriminator of roast degree in arabica and robusta coffee beans. *Journal Europa Food Res Technologi*.
- Cämmer Bettina, Lothar W., Kroh., 2006. Antioxidant Activity of Coffee Brews., *Eur Food Res Technol.*, 223 : 469-474.
- Ewa, N., Budryn, G., Kula, J. 2007. The effect of roasting method on headspace composition of Robusta coffee bean aroma. *Eur Food Res Techol.* 225 : 9-19.
- Farah, A., Paulis, T., Trugo, L., dan Martin, P.R. 2005. Effect roasting on the formation chlorogenic acid lactone in coffea. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53 : 1505-1513.
- Hečimović, I., Cvitanović, A. B., Horžić, D., Komes, D., 2011. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by degree of roasting. *Food Chemistry* 129 : 991 – 1000.
- Mangiwa, S., Futwembun, A., dan Awak, Putri M., 2014. Kadar Asam Klorogenat (CGA) dalam Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) Asal Wamena, Papua . *Jurnal Ilmiah Kependidikan Kimia "Hydrogen"*. 2 (2) : 313-317.
- Mangiwa, S., dan Maryuni, A., E., 2015. Pengaruh Suhu Penyangraian Terhadap Kadar Kafein Dalam Biji Kopi Arabika (*Arabica coffea*). *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Pengembangan Ipteks dan Sains, LPPM Uncen*. Edisi 1, April 2015 : 7-11.
- Mangiwa, S., dan Yabansabra, Yuliana R., 2016. Kadar Trigonelin dalam Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) Asal Wamena, Kabupaten Jayawijaya, Papua. *Jurnal SAINS dan Pengajaranya*. 16 (1) : 29 - 34
- Minamisawa, M, Yoshida S, Takai N., 2004. Determination of Biologically Active Substances in Roasted Coffees Using a Diode-Array HPLC System., *Analytical Science*, 20 : 325-328.
- Naidu MM, Sulochanamma G, Sampathu SR, Srinivas P., 2008. Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee., *Food Chemistry* 107 : 337-384.
- Tamilmani, P., dan Pandey, M.C., 2015. Optimization and elaviation of phenolic coumpound and their antioxidant activity from coffee beans. *International Journal of Advanced Research*. Volume 3 (4) : 296 – 306.