

Analisis Total Kadar Asam Laktat Hasil Fermentasi Pare (*Momordica charantia*) Secara Spontan dengan Konsentrasi Garam Berbeda

PUTRI S. NOOR^{1*}, WIJANARKA WIJANARKA²

¹Mahasiswa Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang

²Dosen Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang

Diterima: 5 April 2021 – Disetujui: 26 Agustus 2021
© 2021 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Cenderawasih

ABSTRACT

Bitter melon (*Momordica charantia*) is a traditional medicinal plant with great potential for treating diabetes due to its ability to lower blood sugar level. The bitter taste of this plant is attributed to its high nutrient and antioxidants content. Meanwhile, one of the ways to reduce the bitterness and improve its taste is through a spontaneous fermentation process with the right salt concentration. Therefore, this study aims to analyze the effect of different salt concentrations on the total lactic acid content of spontaneous bitter melon fermentation. This study was conducted using a completely randomized design (CRD) with 4 treatments and 3 replications. The treatments used included salt of different concentrations, namely: 3, 6, 9, and 12%. The bitter melon was fermented for 7 days and the parameter measured was the total lactic acid content through titration process. Furthermore, data were analyzed by ANOVA with 5% significance and the Duncan test was also carried out. The results showed different salt concentrations had a significant effect on lactic acid contents ($P < 0.05$), with the highest being 0.4413% produced by 3% salt concentration treatment. These results are expected to contribute to the development of bitter melon utilization, as well as provide solutions, therefore, it becomes more effective and efficient food processing.

Key words: bitter melon; fermentation; lactic acid; salt; spontaneous.

PENDAHULUAN

Pare (*Momordica charantia*) buahnya berbentuk bulat panjang, permukaannya berbintil-bintil, dan terdapat sejumlah biji di dalam bagian daging buah yang agak tebal. Pare termasuk tanaman yang mudah dibudidayakan karena tidak bergantung pada musim. Tanaman ini cocok ditanam di daerah beriklim tropis seperti Indonesia dan beberapa kawasan di Asia (Riyadi *et al.*, 2015). Penelitian mengenai pare dan data produksi pare belum banyak dilaporkan.

Dibuktikan dengan data produksi pare terakhir pada tahun 1997 yaitu dengan teknik budidaya intensif per tanaman produksi pare mencapai 10-15 kg, hal ini setara dengan 30-52,5 ton per hektar tanaman pare (Rukmana, 1997). Pare juga digolongkan ke dalam sayuran minor, yaitu jenis kelompok sayuran yang hasil produksinya tinggi, tetapi tingkat konsumsi oleh masyarakat masih rendah dan penelitian mengenai sayuran ini masih sedikit (Soetiarto, 2010). Padahal buah pare merupakan jenis tanaman obat yang sudah lama dikenal oleh masyarakat Indonesia untuk mengobati penyakit diabetes.

Kandungan buah pare mampu menurunkan kadar gula darah bagi penderita diabetes juga sudah didukung oleh penelitian di berbagai negara seperti Inggris, India, Jepang, Jerman, Malaysia, dan Thailand (Basch *et al.*, 2003). Kandungan pare yang berperan penting dalam

* Alamat korespondensi:

Mahasiswa Bioteknologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Jl. Prof. Soedarto, SH, Tembalang Semarang – 50275, Jawa Tengah, Indonesia. E-mail: putrishania30@gmail.com

menurunkan kadar gula darah adalah polifenol dan insulinmimetik yaitu charantin, lektin, dan *polypeptide-P* (Joseph & Jini, 2013; Adnyana *et al.*, 2016). Kandungan ini dan antioksidan yang tinggi pada pare semuanya menimbulkan rasa pahit (Snee *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2016). Rasa pare yang pahit menduduki peringkat tertinggi pada persepsi konsumen dalam mengonsumsi sayuran minor yaitu 52,94% dibanding faktor lain seperti menu terbatas, ketersediaan, dan pantangan (Soetiarto, 2010).

Salah satu upaya untuk mengurangi rasa pahit pada pare adalah melalui proses fermentasi. Jenis fermentasi yang umumnya dilakukan untuk sayuran dan buah adalah fermentasi asam laktat. Asam organic yaitu asam laktat hasil fermentasi akan mendominasi cita rasa pada pare sehingga dapat mengurangi rasa pahit, selain itu juga memberikan tekstur, toksitas berkurang, dan memperpanjang umur simpan sayuran atau buah yang di fermentasi (Rolle & Satin, 2002; Swain *et al.*, 2014). Fermentasi asam laktat umumnya digunakan dalam preservasi makanan dengan mengontrol lingkungan untuk pertumbuhan bakteri selektif menggunakan penggaraman (Joshi & Sharma, 2009). Penambahan garam dilakukan untuk mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat (BAL) dan menghambat enzim pektinolitik dan proteolitik yang dapat menyebabkan pembusukan pada sayur atau buah (Swain *et al.*, 2014). BAL yang nantinya akan memproduksi asam laktat dan meningkatkan cita rasa pada sayur atau buah yang diperlakukan. Tetapi konsentrasi garam yang optimal untuk pertumbuhan BAL pada sayuran dan buah-buahan berbeda-beda (Ross *et al.*, 2002).

Berdasarkan dasar tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian konsentrasi garam berbeda terhadap kadar asam laktat hasil fermentasi pare secara spontan. Sehingga dapat diketahui konsentrasi garam yang memberikan kadar asam laktat tertinggi, dan diharapkan dapat memberikan kontribusi terhadap pengembangan dan pemanfaatan pare, serta memberikan solusi agar pare menjadi olahan pangan yang lebih efektif dan efisien.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus-September 2020. Penelitian berlangsung bersamaan dengan adanya pandemi COVID-19, sehingga penelitian dilaksanakan secara mandiri di luar laboratorium, dengan tetap memperhatikan prosedur keamanan kesehatan, dan sterilitas alat bahan yang digunakan.

Perlakuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) non faktorial. Perlakuanannya yaitu konsentrasi garam berbeda yang terdiri dari 3% (P1); 6% (P2); 9% (P3); dan 12% (P4), dengan pengulangan sebanyak tiga kali. Alat yang digunakan untuk penelitian ini yaitu jar kaca, timbangan analitik, spatula, gelas ukur, pisau, kain serbet, pemberat, gelas beker, buret, pipet tetes, blender. Bahan yang digunakan untuk penelitian ini yaitu pare, air, garam laut (*sea salt*), larutan *phenolphthalein* (pp), dan NaOH 0,1 N.

Pare yang digunakan adalah jenis pare hijau yang masih segar, dicuci bersih dengan air mengalir, dipotong bagian batangnya, dibuang bagian bijinya, kemudian pare dipotong menjadi ukuran kecil-kecil. Larutan garam dibuat dengan melarutkan garam laut (*sea salt*) dalam air. konsentrasi garam dibuat berbeda sebagai perlakuan yaitu 3, 6, 9, dan 12% (*w/v*). Hal ini sama dengan konsentrasi garam 7,5 g (P1), 15 g (P2), 22,5 g (P3), dan 30 g (P4) yang dilarutkan masing-masing ke dalam air hingga volume mencapai 250 ml.

Pare yang sudah dicuci bersih dimasukkan dalam jar kaca yang sudah disterilisasi yaitu sebanyak 200 g dan ditekan agar memenuhi bagian jar yang kosong sehingga tidak ada pare yang mengapung ke atas saat ditambahkan larutan garam. Agar posisi pare selalu tenggelam dibawah larutan (*submerge*), maka diletakkan plastik yang berisi air di atasnya atau digunakan sebagai pemberat. Jar kaca ditutup dan diletakkan di suhu ruang. Proses fermentasi berlangsung selama 7 hari.

Asam laktat hasil fermentasi pare dihitung kadar totalnya melalui metode titrasi. Pare hasil fermentasi dihaluskan menggunakan blender, dilakukan penyaringan, dan diambil filtratnya sebanyak 10 ml. Filtrat selanjutnya ditambahkan indikator *phenolphthalein* (PP) dan dititrasi menggunakan larutan NaOH 0,1 N hingga terjadi perubahan warna. Perubahan warna mengindikasikan telah tercapainya titik ekivalen dalam proses titrasi, yang artinya asam yang terbentuk selama proses fermentasi sudah dinetralkan oleh basa NaOH (Touret *et al.*, 2018). Titrasi dilakukan secara triplo, dan total asam secara tidak langsung menunjukkan asam laktat yang dihasilkan. Perhitungan total kadar asam laktat menggunakan rumus (AOAC *dalam* Ramadzanti, 2006):

$$\% \text{ Asam Laktat} = \frac{\text{ml NaOH} \times N \text{ NaOH} \times 90}{\text{volume sampel (10ml)} \times 1000} \times 100\%$$

Dimana :

N : Normalitas larutan NaOH yang digunakan sebagai titer

90 : BE asam laktat (90 g/ekivalen)

Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis homogenitas data. Bila data menunjukkan homogen, untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dilakukan uji beda ANOVA (*Analysis of Variance*) pada tingkat signifikan $P < 0,05$. Apabila hasilnya berpengaruh nyata, maka akan dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf signifikansi 5%. Analisis data menggunakan program SPSS berbayar (*Statistical Product of Service Solution*) untuk Windows versi 20.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fermentasi pare dibuat secara spontan dengan perlakuan konsentrasi garam berbeda (Gambar 1). Fermentasi secara spontan berarti ketika proses fermentasi tidak dilakukan penambahan mikroba sebagai starter atau



Gambar 1. Proses Fermentasi pare hari ke-0 (A); hari ke-7 (B).

inokulum, melainkan memanfaatkan mikroba indigen yang sudah ada (So'aib *et al.*, 2020; Lem, 2020). Umumnya kelompok BAL yang sering digunakan sebagai starter dalam proses fermentasi makanan adalah genus *Lactobacillus* yang termasuk dalam kelompok gram positif dengan sel berbentuk batang (Swain *et al.*, 2014). Genus *Lactobacillus* dapat tumbuh dalam kondisi anaerob dan pemberian kontrol lingkungan yang sesuai. Hal ini sesuai dengan penelitian Mazlan *et al.* (2015), sudah diidentifikasi adanya keberadaan BAL indigen yaitu *Lactobacillus plantarum* pada perendaman pare secara spontan dalam larutan garam 6%. Garam yang digunakan adalah garam laut (*sea salt*). Garam laut mengandung kelembapan lebih tinggi, proses panennya

dilakukan dengan menguapkan air laut sehingga hanya akan menyisakan garam yang mengandung mineral dan mikronutrien yang apabila difermentasi akan lebih mudah diserap tubuh (Shockey & Shockey, 2014).

Proses fermentasi dilakukan secara *submerged* yaitu pare terendam sepenuhnya dibawah larutan air garam (Gambar 1). Hal ini dilakukan agar menciptakan lingkungan yang bebas oksigen, karena BAL tumbuh dalam kondisi anaerob sehingga oksigen tidak diperlukan untuk pembuatan energi (Ghaffar *et al.*, 2014). Dengan begitu pada proses fermentasi pare ini *L. plantarum* dapat berkembang, dan bakteri atau khamir lain yang tidak diinginkan tidak dapat tumbuh. Umumnya bakteri atau khamir yang

Tabel 1. Hasil titrasi perlakuan fermentasi tanaman pare.

Variabel	Ulangan								
	1			2			3		
	Plo 1	Plo 2	Plo 3	Plo 1	Plo 2	Plo 3	Plo 1	Plo 2	Plo 3
3%	5,5	5,6	5,6	4,8	4,8	5	4,3	4,3	4,2
6%	3,8	3,9	3,9	3,6	3,5	3,6	3,5	3,3	3,5
9%	3,5	3,5	3,6	4,5	4,4	4,7	4,6	4,3	4,4
12%	2,8	2,8	3	3,6	3,9	3,6	3,8	3,5	3,9

Tabel 2. Hasil perhitungan kadar asam laktat

Variabel	Ulangan					
	1		2		3	
	X (ml)	Kadar %	X(ml)	Kadar %	X(ml)	Kadar %
3%	5,57	0,5013	4,87	0,4383	4,27	0,3843
6%	3,87	0,3483	3,57	0,3213	3,43	0,3087
9%	3,53	0,3177	4,53	0,4077	4,43	0,3987
12%	2,87	0,2583	3,7	0,333	3,73	0,3357

Tabel 3. Rata-rata kadar asam laktat pada berbagai perlakuan.

Kadar asam Laktat (%)			
3% (P1)	6% (P2)	9% (P3)	12% (P4)
0,441 ^a ± 0,06	0,326 ^b ± 0,02	0,374 ^{ab} ± 0,05	0,309 ^b ± 0,04

Keterangan: Data yang ditampilkan berupa rata-rata ± standar deviasi.

tidak diinginkan tumbuh dalam lingkungan aerob. Selain itu, pemberat yang digunakan selama fermentasi bertujuan untuk menjaga kondisi anaerob. Karena pada saat fermentasi akan dihasilkan CO₂, maka ketika gelembung udara didorong keluar dengan adanya pemberat yang menahan, air garam mengantikan ruang itu, menjaga oksigen agar tidak bergerak masuk (Shockey & Shockey, 2014).

Perhitungan kadar asam laktat dilakukan dengan metode titrasi secara triplo (Tabel 1). Total asam secara tidak langsung menunjukkan kadar asam laktat yang terbentuk. Hasil titrasi akan mencapai titik ekivalen, yang menandakan asam laktat sudah dinetralkan oleh basa NaOH sebagai pentiternya (Nurjannah *et al.*, 2017; Touret *et al.*, 2018). Rata-rata volume NaOH yang terpakai selanjutnya digunakan untuk menghitung total kadar asam laktat (Tabel 2). Rata-rata total kadar asam laktat tertinggi didapatkan pada P1 yaitu dengan konsentrasi garam 3% (Tabel 3).

Huruf berbeda pada Tabel 3 menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada masing-masing perlakuan. Perlakuan konsentrasi garam 3% berbeda signifikan dengan perlakuan 6% dan 12%. Sedangkan rata-rata perlakuan lainnya adalah sama. Adanya pengaruh yang signifikan menandakan bahwa konsentrasi garam merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi proses fermentasi asam laktat pada pare. Umumnya konsentrasi garam 3-10% dalam kondisi anaerob sudah dapat merangsang pertumbuhan BAL. Hal ini sesuai dengan (Setiawan *et al.*, 2013) bahwa BAL sudah dapat mengalami pertumbuhan pada konsentrasi garam 3%-10%. Konsentrasi garam yang terlalu tinggi akan menunda fermentasi spontan, karena kurang dapat mengkonversi gula atau zat kompleks sehingga menyebabkan bakteri asam laktat tidak tumbuh optimal dan memungkinkan adanya pertumbuhan khamir (Shobahiya, 2017). Pemberian kadar garam yang terlalu rendah tidak memberikan keuntungan bagi BAL karena akan menyebabkan sayuran atau buah yang di fermentasi mengalami kebusukan (Shockey & Shockey, 2014).

Berpengaruhnya konsentrasi garam terhadap hasil fermentasi dikarenakan peran utama garam adalah untuk mendukung pertumbuhan BAL dan mematikan pertumbuhan bakteri penghambat lainnya (Swain *et al.*, 2014). Mekanisme kerja garam pada proses fermentasi asam laktat yaitu garam akan menarik cairan dari dalam sel-sel sayuran atau buah yang di fermentasi. Cairan ini terdiri dari gula, mineral, dan vitamin yang digunakan sebagai substrat untuk menunjang pertumbuhan BAL (Ahillah *et al.*, 2017). BAL selanjutnya akan menghidrolisis karbohidrat kompleks menjadi glukosa, kemudian menjadi asam piruvat, dan selanjutnya diubah menjadi asam-asam organik terutama asam laktat (Cappuccino & Welsh, 2019). Asam laktat yang dihasilkan BAL akan menurunkan pH sitoplasma karena molekul asam laktat ini masuk ke dalam membran sel (Nurhalimah *et al.*, 2015). Keadaan pH yang rendah akan menghambat pertumbuhan mikroorganisme pembusuk, sehingga hanya bakteri yang tahan pada pH rendah yang dapat tumbuh. Contohnya *Lactobacillus* tumbuh pada kondisi yang relatif asam yaitu dari pH 5,5 hingga 6,5 (Swain *et al.*, 2014).

Keadaan *submerged* menciptakan lingkungan yang bebas oksigen dan *L. plantarum* dapat berkembang (Shockey & Shockey, 2014). Berdasarkan Tabel 3. rata-rata kadar asam laktat tertinggi adalah pada perlakuan 3% yaitu sebesar 0,441%, total ini lebih tinggi dibanding fermentasi pare metode *dry salts* yaitu sebesar 0,06% dengan konsentrasi garam yang sama (Silva *et al.*, 2016) Lebih tingginya kadar asam laktat pada fermentasi dengan larutan garam menunjukkan bahwa selama proses fermentasi tercipta keadaan yang anaerob dan produk terendam sempurna (*submerge*).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian konsentrasi garam berbeda berpengaruh terhadap total kadar asam laktat hasil fermentasi pare (*Momordica charantia*) secara

spontan, dengan total kadar asam laktat tertinggi dihasilkan oleh konsentrasi garam 3% yaitu 0,441%.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnyana, I.D.P.A., D.K. Meles, Wurlina, S. Zakaria, dan N. Suwasanti. 2016. Efek Antidiabetes Buah Pare (*Momordica charantia* Linn.) Terhadap Kadar Glukosa Darah, Sel Penyusun Pulau Langerhans dan Sel Leydig pada Tikus Putih Hiperglikemia. *Acta Veterinaria Indonesiana*. 4(2): 43-50.
- Ahillah, N., A. Rusdanillah, W. Afiana, R. Sulistiani, dan R.P.L. Mail. 2017. Pengaruh Konsentrasi Garam pada Fermentasi Ikan Wader (*Rasbora lateristriata*). *Bioedukasi*. 10(2): 12-17.
- Basch, E., S. Gabardi, and C. Ulbricht. 2003. Bitter melon (*Momordica charantia*): Review of Efficacy and Safety. *Am J Health Syst Pharm*. 60(4): 356-359.
- Cappuccino, J.G., and C.T. Welsh. 2019. *Microbiology: A Laboratory Manual 12th ed.* Pearson. New York.
- Ghaffar, T., M. Irshad, Z. Anwar, T. Aqil, Z. Zulifqar, A. Tariq, M. Kamran, N. Ehsan, and S. Mehmood. 2014. Recent Trends in Lactic Acid Biotechnology: A Brief Review on Production to Purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 7(2): 222-229.
- Joseph, B. and D. Jini. 2013. Antidiabetic Effects of *Momordica charantia* (Bitter Melon) and Its Medicinal Potency. *Asian Pac J Trop Dis*. 3(2): 93-102.
- Joshi, V.K. and S. Sharma. 2009. Lactic Acid Fermentation of Radish For Shelf Stability And Pickling. *Natural Product Radiance*. 8(1): 19-24.
- Lemi, B.W. 2020. Microbiology of Ethiopian Traditionally Fermented Beverages and Condiments. *International Journal of Microbiology*. doi: 10.1155/2020/1478536.
- Mazlan, F.A., M.S.M. Annuar and Y. Sharifuddin. 2015. Biotransformation of *Momordica charantia* Fresh Juice by *Lactobacillus plantarum* BET003 and Its Putative Anti-Diabetic Potential. *PeerJ*, 1-18. doi: 10.7717/peerj.1376.
- Nurhalimah, N., B. Sulistiyanto dan Widiyanto. 2015. *Kandungan Bakteri Asam Laktat dan Bakteri Selulolitik pada Pollard yang Difermentasi*. [Skripsi]. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Nurjannah, L., Suryani, S.S. Achmadi, and A. Azhari. 2017. Produksi Asam Laktat oleh *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dengan Sumber Karbon Tetes Tebu. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*. 9(1): 1-9.
- Ramadzanti, A. 2006. Aktivitas Protease dan Kandungan asam Laktat pada Yoghurt yang dimodifikasi *Bifidobacterium bifidum*. [Skripsi]. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Riyadi, N.H., D. Ishartani, dan R. Purbasari. 2015. Mengangkat Potensi Pare (*Momordica Charantia*) Menjadi Produk Pangan Olahan sebagai Upaya Diversifikasi. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*. 1(5): 1167-1172.
- Rolle, R. and M. Satin. 2002. Basic Recruitments For The Transfer Of Fermentation Technologies To Developing Countries. *International Journal of Food Microbiology*. 75(3): 181-187.
- Ross, R.P., S. Morgan, and C. Hill. 2002. Preservation and Fermentation: Past, Pesent, and Future. *International Journal of Food Microbiology*. 79(1-2): 3-16.
- Rukmana, R. 1997. *Budidaya Pare*. Kanisius. Yogyakarta.
- Setiawan, N. Yuliana, dan S. Setyani. 2013. Pengaruh Konsentrasi Garam Terhadap Warna, Total Asam dan Total Bakteri Asam Laktat Pikel Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* var *Ayamurasaki*) Selama Fermentasi. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. 18(1): 42-51.
- Shobahiya, N. 2017. *Pengaruh Jenis Media Fermentasi dan Konsentrasi Garam Terhadap Karakteristik Asinan Sawi Hijau (*Brassica rapa* L)*. [Skripsi]. Universitas Pasundan, Bandung.
- Shockey, K.K. and C. Shockey. 2014. *Fermented Vegetables: Creative Recipes for Fermenting 64 Vegetables & Herbs in Krauts, Kimchis, Brined Pickles, Chutneys, Relishes & Pastes*. Storey Publishing. Massachusetts.
- Silva, G.M.S.W., U.L.R.R.W. Premathilaka, S.D.T. Maduwanthi, and T.G.G. Uthpala. 2016. Development of Fermented *Momordica charantia* and Analysis of Biochemical Properties. *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 7(3): 363-366.
- Snee, L.S., V.R. Nerurkar, D.A. Dooley, J.T. Efird, A.C. Shovic, and P.V. Nerurkar. 2011. Strategies To Improve Palatability And Increase Consumption Intentions For *Momordica charantia* (Bitter Melon): A Vegetable Commonly Used For Diabetes Management. *Nutr J*. 10(1): 1-11.
- So'aib, M.S., K.H.K. Hamid, J. Salihon, H.L. Tan, and A. Hamid. 2020. Beneficial Effects Of Spontaneous Fermentation In Enhancing The Phenolic Contents, Antioxidant Activity And Cultivation Of Lactic Acid Bacteria Of *Carica papaya* Leaf. *IOP Conf. Series: Mater. Sci. Eng*. 991(1). doi:10.1088/1757-899X/991/1/012006
- Soetiarto, T.A. 2010. Persepsi dan Preferensi Konsumen Terhadap Atribut Produk Beberapa Jenis Sayuran Minor. *J. Hort*. 20(3): 299-312.
- Swain, M.R., M. Anandharaj, R.C. Ray, and R.P. Rani. 2014. Fermented Fruits and Vegetables of Asia: A Potential Source of Probiotics. *Biotechnology Research International*. doi: 10.1155/2014/250424.
- Touret, T., M. Oliveira, and T. Semedo-Lemsaddek. 2018. Putative Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Sauerkraut Fermentations. *PLoS ONE*. 13(9): 1-16.