



**PENGARUH PEMBERIAN TIMBAL ASETAT PADA KADAR MDA
(malondialdehyde) DAN MOTILITAS MENCIT JANTAN (*Mus Musculus*)**

Lilis Majidah¹⁾

¹D3 Analis Kesehatan, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Insan Cendikia Medika
Email: Lilismajidah2@gmail.com

Emi Kusumawardani²⁾

²D4 Bidan Pendidik, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Insan Cendikia Medika
Email: emikusumawardani80@gmail.com

ABSTRAK

Pendahuluan Penyebab umum dari gangguan reproduksi pria adalah produksi sperma yang terganggu, sistem transportasi sperma yang terhambat, kondisi kesehatan dan keadaan lingkungan sekitar, ataupun karena pencemaran logam berat. **Tujuan** untuk mengetahui apakah Pb asetat berpengaruh terhadap kadar MDA (*malondialdehyde*) dan motilitas spermatozoa. **Jenis penelitian** yang digunakan adalah *true experimental* dengan desain *post test only control group design* dengan jumlah replikasi mencit jantan berjumlah 10, unit eksperimen akan dibagikan secara proporsional pada 3 kelompok, dengan perlakuan normal diberikan aquabidestilata, dosis timbal asetat 0,5 mg dan dosis quercetin 0,7 mg. Variabel yang dianalisa meliputi kadar MDA (*malondialdehyde*) dan motilitas spermatozoa. Analisa data dilakukan meliputi uji normalitas *Shapiro-Wilks*, Uji Homogenitas menggunakan *Levene test*, uji rata-rata kelompok menggunakan *Oneway Anova*, setelah itu dilanjutkan uji beda masing-masing kelompok menggunakan *Post Hoc Tukey HSD*. Analisis data dengan uji *Post Hoc Tukey* tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan nilai $p > 0,05$ antara kelompok Pb+aquabidestilata dengan kelompok normal, hal ini menunjukkan bahwa pemberian timbal asetat mempengaruhi pembentukan radikal bebas pada tahap inisiasi dan belum pada tahap akhir pembentukan MDA, **hasil analisis** data dengan uji *Post Hoc Tukey* pada penelitian menunjukkan bahwa ada perbedaan antara kelompok Pb+aquabidestilata dengan kelompok normal dan kelompok Pb+quercetin, hal ini menggambarkan bahwa adanya pengaruh pemberian timbal asetat terhadap motilitas spermatozoa. Timbal asetat belum mampu mempengaruhi pembentukan akhir MDA dan Timbal asetat dapat mempengaruhi penurunan motilitas spermatozoa.

Kata kunci : Timbal asetat, kadar MDA (*malondialdehyde*), motilitas spermatozoa

ABSTRACT

Introduction Common causes of male reproductive disorders are impaired sperm production, stunted sperm transport systems, health conditions and environmental conditions, or due to heavy metal pollution. **The goal** is to find out if Pb acetate affects MDA levels (*malondialdehyde*) and spermatozoa motility. **The type of research** used is *true experimental* with *post test only control group design* with the number of male mice replication numbering 10, experimental units will be distributed proportionally in 3 groups, with normal treatment given

aquabidestilata, lead acetate dose 0.5 mg and quercetin dose 0.7 mg. The variables analyzed included MDA levels (malondialdehyde) and spermatozoa motility. The data analysis included the Shapiro-Wilks normality test, the Homogeneity Test using the Levene test, the average test of the group using Oneway Anova, after which the different tests of each group continued using the Post Hoc Tukey HSD. Analysis of data with The Post Hoc Tukey test showed no noticeable difference with a p value of > 0.05 between the Pb+ aquabidestilata group and the normal group, this showed that lead acetate administration affected free radical formation at this stage and not yet in the final stages of MDA formation, data analysis results with Tukey's Post Hoc test on the study showed that there were differences in between the Pb+aquabidestilata group with the normal group and the Pb+quercetin group, this illustrates that the effect of lead acetate administration on spermatozoa motility. Lead acetate has not been able to affect the final formation of MDA and lead acetate may affect decreased motility of spermatozoa.

Keyword : Lead acetate, MDA levels (*malondialdehyde*), motility of spermatozoa

PENDAHULUAN

Terdapat sekitar 15 % pasangan yang tidak subur dan saat ini sedang menjalani pengobatan untuk infertilitas (Jungwirth *et al.*, 2015). Penyebab utama dari sekitar 30,0% dari 50,0% pasangan infertil adalah infertilitas pada pria dengan kelainan sperma, yang terjadi pada 1 dari 20 pria (Nadeem *et al.*, 2012).

Penyebab umum dari gangguan reproduksi pria adalah produksi sperma yang terganggu, sistem transportasi sperma yang terhambat, kondisi kesehatan dan keadaan lingkungan sekitar, ataupun karena pencemaran logam berat (Feichtinger, 1999). Timbal merupakan bahan kimia yang termasuk dalam logam berat dan salah satu bahan pencemar utama saat ini di lingkungan (Naria, 2005). Timbal merupakan bahan pencemar yang harus diwaspadai karena dapat mengganggu kesehatan manusia diantaranya adalah kesehatan reproduksi. Perkembangan sel-sel spermatogenik merupakan bagian dari kesehatan reproduksi dari pria atau hewan jantan. Jika dibiarkan

dapat menyebabkan kemandulan (Nadapdap, 2015).

Standar yang berbeda untuk kadar Pb dalam darah diterapkan menurut *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* (2016) kadar timbal darah yang normal adalah kurang dari 10 $\mu\text{L/dL}$. Kadar timbal dalam darah yang melebihi 10 $\mu\text{L/dL}$ didefinisikan sebagai keracunan timbal yang merupakan masalah kesehatan yang serius dan memerlukan perawatan lebih lanjut. Berdasarkan data dari *US Environmental Protection Agency* (2010) nilai *Biological Exposure Index (BEI)* untuk timbal darah adalah 30 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ darah dan menurut WHO adalah 25 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ darah (Najmi dan Iting. S 2013). Timbal yang masuk ke dalam sistem metabolisme tubuh manusia meskipun dalam jumlah kecil dapat berbahaya karena terakumulasi di dalam tubuh dan akhirnya menyebabkan keracunan pada berbagai fungsi organik (Kawatu *et al.* 2008).

Penelitian tentang dampak timbal terhadap fungsi reproduksi yang dilakukan oleh Acharya *et al.*, (2003) hasil penelitian menunjukkan adanya

penurunan berat testis dan peningkatan kejadian abnormalitas spermatozoa serta penurunan jumlah spermatozoa.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah Pb asetat berpengaruh terhadap kadar MDA (*malondialdehyde*) dan motilitas spermatozoa.

METODE PENELITIAN

Tiga puluh ekor mencit jantan dewasa (*mus musculus*) dan dilakukan penyesuaian diri dengan lingkungan selama 1 (satu) minggu pada kandang hewan coba, diberikan makanan *pellet* dan diberikan minum.

Perlakuan terhadap mencit jantan (*mus musculus*) diberikan selama 35 hari. Perlakuan dengan memberikan Aquadest pada kelompok normal (KN). Perlakuan dengan pemberian timbal asetat 0,5 mg/0,01KgBB pada hari ke 21-35 pada kelompok perlakuan I (KP I) dan pemberian quercetin 0,7 mg/0,01KgBB pada hari ke 1 dan pemberian quercetin 0,7 mg/0,01KgBB + 0,5 mg/0,01KgBB timbal asetat pada hari ke 21-35 terhadap kelompok perlakuan II (KP II) . Pada hari ke 36 dilakukan dekapitasi kemudian dilakukan pembedahan mengambil cauda epididimis untuk pemeriksaan motilitas dan mengambil serum darah melalui jantung untuk pemeriksaan kadar MDA (*malondialdehyde*) .

Pemeriksaan kadar MDA (*malondialdehyde*) akan dilakukan di laboratorium dengan menggunakan ELISA Kit.

Pemeriksaan motilitas spermatozoa dilakukan dengan cara meneteskan 1 tetes suspensi sperma pada gelas benda, kemudian diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Pada setiap bidang pandang diamati pola pergerakan individual tiap-tiap spermatozoa. Dengan alat

bantu hitung (*handcouter*), dari 100 ekor spermatozoa, dihitung persentasenya berdasarkan pola gerakan masing-masing terutama gerak progresif (Nugraheni *et al.*, 2003).

Gerakan spermatozoa diamati dan dikategorikan menurut WHO (1987) sebagai berikut :

- a. +++ = Jika sperma bergerak cepat dan lurus ke depan (gerak maju sangat baik)
- b. ++ = Jika gerakannya lambat atau sulit maju lurus atau bergerak tidak lurus (gerak lemah)
- c. + = Jika tidak bergerak maju
- d. N = Jika sperma tidak bergerak (Nekrozoospermia)

Data hasil pengukuran kadar MDA (*malondialdehyde*) dan motilitas spermatozoa dianalisis dengan menggunakan *SPSS 17 for windows*. Analisis data meliputi uji normalitas *Shapiro-Wilk*, uji homogenitas menggunakan uji *Levene Test*, kemudian dilakukan rata-rata kelompok menggunakan *Anova* dengan hipotesis diterima apabila $p \leq 0,05$ dan untuk mengetahui uji beda masing-masing kelompok menggunakan *Post Hoc Tukey*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil perhitungan kadar MDA (*malondialdehyde*) pada serum darah dapat dilihat dari tabel berikut ini :

Tabel 1. Kadar MDA (*malondialdehyde*) pada mencit percobaan

Kelompok	n	Kadar <i>Malondialdehyde</i> (MDA) nmol/mL				P
		Mean	SD	Minimum	Maksimum	
Norma l	10	4,68 ^a	1,85	2,00	7,00	
Pb+quercetin	10	14,90 ^b	4,71	7,00	20,50	0,000*
Pb+aquabide stilata	10	9,42 ^{ab}	4,84	3,00	16,91	

Tabel 1 menunjukkan bahwa rata-rata kadar MDA (*malondialdehyde*) tertinggi pada kelompok Pb+quercetin yaitu sebesar 14,90 nmol/mL, kemudian diikuti kelompok Pb+aquabidestilata sebesar 9,42 nmol/mL dan terendah pada kelompok normal yaitu sebesar 4,68 nmol/mL. Hasil analisis *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa data kadar MDA berdistribusi normal ($p>0,05$), kemudian dilakukan uji homogenitas *Levene test* dengan hasil uji menunjukkan bahwa data homogen ($p>0,05$), kemudian dilakukan uji *Anova*, hasil uji menunjukkan terdapat perbedaan antar kelompok ($p<0,05$). Untuk mengetahui kelompok yang berbeda maka pengujian dilanjutkan dengan menggunakan uji *Post Hoc Tukey*.

Hasil perhitungan persentase motilitas spermatozoa pada mencit percobaan disajikan dalam tabel di bawah ini.

Tabel 2. Persentase motilitas spermatozoa

Kelompok	n	Motilitas					p
		Mean (%)	SD	Median	Minimum	Maximum	
Normal	10	2,25	0,46	2,00 ^c	2,00	3,00	
Pb+quercetin	10	1,75	0,46	2,00 ^{bc}	1,00	2,00	
Pb+aquabidestilata	10	0,62	0,51	1,00 ^a	0,00	1,00	0,000*

Tabel 2 menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa tertinggi pada kelompok normal yaitu sebesar 2,25 diikuti kelompok Pb+quercetin sebesar 1,75 kemudian terendah pada kelompok Pb+aquabidestilata sebesar

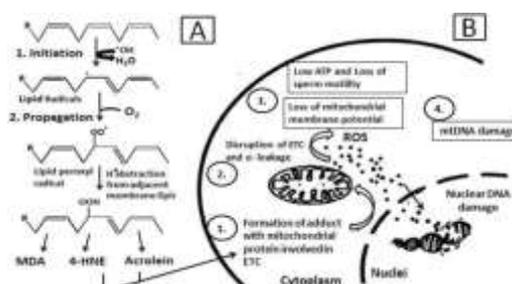
0,62. Hasil analisis *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa data motilitas spermatozoa berdistribusi tidak normal ($p<0,05$), uji homogenitas *Levene test* menunjukkan hasil homogen ($p>0,05$), kemudian dilakukan uji *Anova* hasil uji menunjukkan terdapat perbedaan antar kelompok ($p<0,05$). Untuk mengetahui kelompok yang berbeda maka pengujian dilanjutkan dengan menggunakan uji *Post Hoc Tukey*.

Mekanisme toksisitas timbal pada jaringan testis disebabkan oleh produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang berlebihan dan menghambat aktivitas enzim antioksidan (Lamondo, 2014). Spermatozoa sangat rentan terhadap ROS, karena lipid membran plasma memiliki fosfolipid dengan kadar yang tinggi (Sanocka *et al.*, 2004). Membran sel kaya akan sumber *poly unsaturated fatty acid* (PUFA), yang mudah dirusak oleh bahan-bahan pengoksidasi, proses tersebut dinamakan peroksidasi lemak (Alessio, 2000). Hal ini menunjukkan bahwa membran spermatozoa adalah target utama ROS dan lipid merupakan sasaran yang potensial (Lamarande *et al.*, 1997). Peroksidasi lemak (*lipid peroxidase*) pada membran spermatozoa menghasilkan senyawa MDA (*Malondialdehyde*), yang bersifat toksik pada sel sehingga menyebabkan kerusakan membran spermatozoa (Hayati, 2006). Peroksida lipid tidak stabil sehingga mudah mengalami penguraian membentuk berbagai senyawa, banyaknya lipid yang mengalami oksidasi ditunjukkan dengan meningkatnya senyawa MDA (Endrinaldi, 2014). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada hasil uji normalitas menunjukkan semua data normal ($p>0,05$) dan hasil uji homogenitas, menunjukkan data homogen ($p>0,05$), analisis data dengan uji *Anova* diperoleh nilai

signifikannya $p = 0,000$ atau nilai $\alpha < 0,05$ sehingga dapat dikatakan terdapat perbedaan nilai MDA pada masing-masing kelompok. Selanjutnya pada analisis data dengan uji *Post Hoc Tukey* tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan nilai $p > 0,05$ antara kelompok Pb+aquabidestilata dengan kelompok normal, dan kelompok Pb+quercetin hal ini menunjukkan bahwa pemberian timbal asetat mempengaruhi pembentukan radikal bebas pada tahap inisiasi dan belum pada tahap akhir pembentukan MDA. Pemberian timbal berpengaruh pada tahapan pembentukan radikal bebas yang terjadi pada tahap inisiasi, dimana tahap ini merupakan tahap awal radikal bebas mulai terbentuk. Hal ini sejalan dengan penelitian Ismanto (2019) yang menyatakan bahwa timbal dalam darah tidak ada hubungan bermakna dengan MDA dalam darah.

Tahap inisiasi dapat terjadi karena reaksi langsung antara molekul lipid dengan katalis logam atau karena dekomposisi hidroperoksida yang berasal dari reaksi molekul lipid dengan singlet oksigen atau enzim pengkatalis reaksi molekul lipida dengan triplet oksigen. Ikatan O-O di dalam hidroperoksida bersifat lemah, sehingga logam dapat mengkatalisis dekomposisi hidroperoksida menghasilkan radikal bebas (Gordon, 1990). Menurut Liochev dan Fridovich (1999) dalam Muchtadi (2012) menjelaskan bahwa dismutase anion superoksida akan menghasilkan hidroperoksida, kemudian direduksi menjadi air atau radikal hidroksil (OH^*). Tahapan perubahan hidrogen dirubah menjadi radikal hidroksil (OH^*) terjadi pada tahap propagasi. Radikal hidroksil inilah yang menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak pada membran sel sehingga sel mengalami kerusakan. Keadaan ini

kalau dibiarkan terus menerus akan menyebabkan ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan endogen yang dikenal dengan nama stres oksidatif (Parwata, 2016).



Gambar 1 *Role of Reactive Oxygen Species in Male Reproduction* (Fatima, S., 2018)

Pada penelitian menunjukkan bahwa rata-rata motilitas yang tertinggi pada kelompok normal, Pb+quercetin, kemudian kelompok Pb+aquabidestilata. Hasil analisis data dengan uji *Post Hoc Tukey* pada penelitian menunjukkan bahwa ada perbedaan kelompok normal dengan kelompok Pb+quercetin dan kelompok Pb+aquabidestilata. Timbal sebagai radikal bebas dapat mengganggu kelompok normal ATP-ase yang ada di dalam membran sel, ATP-ase ini ada dibagian tengah ekor dan berfungsi mempertahankan homeostatis internal membran sel (Sanocka, 2014). Stres oksidasi merupakan faktor utama dalam etiologi dari infertilitas pria. Serangan ROS dapat menginduksi peroksidasi lipid dan fragmentasi DNA yang mengganggu motilitas sperma (Aitken, 2008). Hasil akhir dari peroksidasi lipid akibat ROS yang berlebihan adalah terbentuknya *Malondialdehyde* (MDA) yang digunakan sebagai indikator keberadaan radikal bebas dalam tubuh dan indikator kerusakan oksidatif membran sel. MDA dapat mengganggu biosintesis protein dengan membentuk

adisi dengan DNA, RNA dan protein (Zhou, 2006).

Penelitian pada tingkat molekuler menyebutkan bahwa infertilitas pria dilaporkan berhubungan dengan gangguan pada DNA mitokondria (mtDNA) dan apoptosis (Nakada *et al.*, 2006). Motilitas spermatozoa sangat bergantung pada ATP yang dihasilkan dari fosforilasi oksidatif dalam selubung mitokondria. Pergerakan spermatozoa membutuhkan sejumlah energi ATP yang digunakan untuk menggerakkan apparatus flagela, gangguan pada fungsi respirasi mitokondria dapat menyebabkan menurunnya motilitas dan fertilitas (Kao *et al.*, 1998).

SIMPULAN DAN SARAN

Pemberian timbal asetat dengan dosis 0,5 mg/0,01KgBB memberikan pengaruh pembentukan MDA pada tahap inisiasi pada mencit jantan (*Mus Musculus*) dan timbal asetat dengan dosis 0,5 mg/0,01KgBB berpengaruh terhadap penurunan motilitas spermatozoa secara langsung pada organ membran sel testis pada proses pembentukan ATP-ase spermatozoa.

Berdasarkan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa pemberian Pb asetat berpengaruh pada tahap awal inisiasi maka penelitian selanjutnya diharapkan dapat menambahkan durasi waktu yang lebih lama, sehingga akumulasi Pb asetat dalam tubuh mencit semakin banyak, sehingga kemungkinan besar pengaruhnya terhadap pembentukan MDA.

DAFTAR PUSTAKA

Acharya UR, Acharya S, & Mishra M. (2003). Lead acetate induce cytotoxicity in male germinal cell

of swiss mice. *Industrial Health*, no. 41, pp. 291-294

Alessio, H.M., Hagerman, A.E., Fulkerson, B.K., Ambrose, J., Rice, R.E., Wiley, R.L., (2000) Generation of Reactive Oxygen Species after Exhaustive Aerobic and Isometric Exercise. *Med Sci Sport Exerc*, vol. 32, no. 9, pp. 1576-1581

Aitken, R.J., & Roman, S.D., (2008). Antioxidant Systems and Oxidative Stress in The Testes: Oxidative Medicine and Cellular Longevity. *Hindawi Publishing*, vol. 1, no. 1, pp. 15-24

Endrinaldi, A. (2014). Pengaruh Timbal (Pb) terhadap Kadar MDA Serum Tikus Putih Jantan. *Jurnal Kesehatan Andalas*. vol. 3, no. 3, pp. 531-535

Fatima, S., (2018) *Role of Reactive Oxygen Species in Male Reproduction*. Retrieved from : Chapter 4. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.74763>

Feichtinger, W. (1999). Environmental Factors And Fertility . *Human Reproduction*, vol. 6, pp. 1170-1175.

Gordon, M.H., (1990). *The mechanism of antioxidant action in vitro*. Di dalam B.J.F. Hudson, ed. Food Antioxidant. Elviesier Applaid Science. London

Hayati.A, Mangkowitzjojo S. Hinting A, Moeljopawiro S (2006). Hubungan kadar MDA sperma dengan integritas membran spermatozoa tikus (*Rattus Norvegicus*) setelah pemaparan 2 – methoxyethanol, *Penelitian Hayati*, vol. 11, pp. 151 – 154

Ismanto, H., (2019). Hubungan kadar timbal (Pb) dengan kadar *malondialdehyde* (MDA) dalam darah Ibu hamil di wilayah pantai

- kabupaten Brebes. *Media kesehatan masyarakat Indonesia*. vol. 18, no. 2, pp. 28-34
- Jungwirth A, T. Diemer, G-R. Dohlem, A. Giwerzman, Z. Kopa, L Krausz, H. Tournaye (2015). Male infertility, *European Association of Urology*
- Kao, S. H., Chao, H. T, & Wei Y. H., (1998) Multiple Deletions of Mitochondrial DNA are Associated with The Decline of Motility and Fertility of Human Spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, vol. 4, no. 7, pp. 657-666
- Kawatu PAT. (2008). Kadar timbal darah, hipertensi, dan perasaan kelelahan kerja pada petugas Stasiun Pengisian Bahan Bakar Umum di Kota Manado. *Tesis*, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta
- Lamirande, E-D., Jiang, H ., Zini, A., Kodama, H ., Eagnan, C., (1997). Reactive oxygen Species and Sperm Physiology. *Reviews Of Reproduction*. Vol. 2, DOI:10.1530/ror.0.00.20048., pp 48 – 54.
- Lamondo ,D., A. Soegianto, A. Abadi, & S. Kemana. (2014). Antioxidant Effect of Sarang Semut (*Myrmecodia pendans*) on the Apoptosis of Spermatogenic Cell of Rats Exposed to Plumbum. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. vol 2, no. 5, pp. 282-292
- Muchtadi, D., (2013) Antioksidan dan kiat sehat di usia produktif. Bandung. Penerbit Alfabeta
- Nadapdap.T.P (2015) Apoptosis Jel-sel spermatogenik tikus putih (*Rattus norvegicus*) akibat pajanan plumbum (Pb) serta perbaikannya setelah pemberian kitosan. *Jurnal bio sains*, vol I, no.02, pp 31-35
- Nadeem F, Fahim A, & Bugti S. (2012). Effect of cigarette smoking on male infertility. *Turki Journal Medical Science*, no. 42, pp. 1400-1405
- Najmi Nur Laila, Iting Shofwati. (2013). Kadar timbal darah dan keluhan kesehatan pada operator wanita SPBU. *Jurnal Kesehatan Reproduksi*, vol. 4, no. 1, pp. 41-49
- Nakada, K., Sato, A., Yoshida, K., Morita, T., et al., (2006). Mitochondria-Related Male Infertility, *PNAS*, vol. 103, no. 41, pp. 15148-15153
- Naria, E (2005), Mewaspadai dampak bahan pencemaran timbal (Pb) di lingkungan terhadap kesehatan. *Jurnal Komunikasi Penelitian*, vol 17, no.4, pp 1-6
- Nugraheni, T., Astirin, O.P., Widiyani, T., (2003). Pengaruh vitamin C terhadap perbaikan spermatogenesis dan kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L) setelah pemberian ekstrak tembakau (*Nicotiana tabacum* L). *Biofarmasi*, vol. 1, no. 1, pp. 13-19
- Parwata, I.M.O., (2016). Flavonoid. Bahan ajar Kimia Organik Bahan Alam. Laboratorium Kimia Organik, Fakultas MIPA, Universitas Udayana, Denpasar
- Rolland, M., Le Moal, J., Wagner, V., Royère, D., De Mouzon, J. (2013). Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Human Reproduction*, vol. 28, no. 2, pp. 462-470.
- Sanocka D, Kurpiz M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cell. *Journal of Reproduction Biology*

and Endocrinology, vol. 2, no. 12, pp. 112-117

WHO (1987). Towards more objectivity in diagnoses and management of male infertility, *International J Androl*, vol. 7, pp. 281-284

Zhou , Dx., Qiu, S.D., Zhang, H., Tian and wang, HX. (2006). The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by Formaldehyde in the testes of adult Rats. *Asian journal of Andrology*, vol-8, no-5, pp. 584-588