

SKRINING AKTIVITAS ANTIBAKTERI TANAMAN FAMILI MYRTACEAE TERHADAP PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Endang Setyowati^{1,a}, Eko Retnowati^{1,b}, Vivin Rosita^{1,c}, Leily Hardianti Rosiana^{1,d}

¹Universitas Muhammadiyah Kudus

Prodi S-1 Farmasi

Jl. Ganesha I Purwosari, Kudus, Indonesia

^aendangsetyowati@umkudus.ac.id

^bekoretnowati@umkudus.ac.id

^cvivinrosita@umkudus.ac.id

^dleilyhardianti@umkudus.ac.id

Abstrak

Pseudomonas aeruginosa menyebabkan penyakit paru obstruktif kronik (PPOK). Kejadian infeksi *P. aeruginosa* pada pasien dengan PPOK berkisar dari 4% hingga 15%. *P. aeruginosa* resisten terhadap antibiotik seftriakson, sefiksime, eritromisin, sulfametroksazol, dan ampisilin, namun masih sensitif terhadap antibiotik kloramfenikol dan siprofloksazin. Tujuan penelitian ini mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun tanaman famili *Myrtaceae* yaitu Kayu Putih dan Salam terhadap *P. aeruginosa*, serta mengetahui golongan senyawa aktif dalam ekstrak daun tanaman yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa*. Daun tanaman diekstraksi menggunakan penyari etanol 70% dengan metode maserasi, selanjutnya diuji aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* menggunakan metode difusi disk. Tahap selanjutnya identifikasi kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung pada ekstrak daun tanaman, sedangkan golongan senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri dideteksi menggunakan uji bioautografi. Hasil uji t probabilitas $0,004 < 0,05$ menunjukkan bahwa ekstrak daun tanaman memiliki perbedaan yang tidak signifikan dengan kontrol positif. Sehingga dapat disimpulkan bahwa daun salam dan daun kayu putih memiliki aktivitas antibakteri. Daun kayu putih (*Melaleuca leucadendra*) memiliki aktivitas antibakteri tertinggi dengan diameter zona hambat sebesar $23,17 \pm 1,53$ mm dan kontrol positif $26,67 \pm 3,06$ mm. Golongan senyawa yang diduga mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* yaitu polifenol dan tanin.

Kata Kunci: Antibakteri, *Myrtaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, Kayu putih, Salam.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa causes chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The incidence of infection in patients with COPD ranges from 4% to 15%. *P. aeruginosa* is resistant to the antibiotics of ceftriaxone, cefixime, erythromycin, sulfamethoxazole, and ampicillin, but is still sensitive to chloramphenicol and ciprofloxacin. The purpose of this research were to investigate the antibacterial activity of ethanol 70% leaf extract of plants of the family *Myrtaceae* namely Kayu Putih and Salam against *P. aeruginosa*, and the compounds in leaf extract that has antibacterial activity against *P. aeruginosa*. The leaf extract were extracted using 70% ethanol with maceration method, tested antibacterial activity against *P. aeruginosa* used the disk diffusion method. The next step there Thin Layer Chromatography (TLC) to identity the compounds in leaf extracts, whereas the compounds with antibacterial activity were detected using bioautography. Result of of probability t test $0,004 < 0,05$ show the leaf extract have difference which is not significant with positive control. It can be concluded leaf of Kayu Putih and Salam have antibacterial activity against *P. aeruginosa*. The leaf of Kayu Putih (*Melaleuca leucadendra*) has the highest antibacterial activity with inhibition zone diameter of 23.17 ± 1.53 mm and positive control 26.67 ± 3.06 mm. Compounds in the leaf extract of Kayu Putih were suspected of having antibacterial activity against *P. aeruginosa* are polyphenol and tannin.

Keywords: antibacterial, *Pseudomonas aeruginosa*, *Myrtaceae*, Kayu putih, Salam.

I. PENDAHULUAN

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri Gram-negatif yang termasuk patogen nosokomial yang bertanggung jawab terhadap berbagai macam infeksi dengan tingkat resistensi antimikroba yang tinggi (Lambert, 2002). Pengobatan pada infeksi bakteri *P. aeruginosa* pada pasien dengan penyakit PPOK dapat diterapi menggunakan antibiotik. Namun *P. aeruginosa* resisten terhadap beberapa antibiotik diantaranya sefotaksim, seftriakson, sefiksim, eritromisin, sulfametroksazol, dan ampisilin dengan persentase resistensi 51%, 57%, 61%, 69%, 71%, dan 79% (Sonita *et al.*, 2012). *P. aeruginosa* masih memiliki sensitivitas terhadap antibiotik siprofloksazin dan kloramfenikol dengan diameter zona hambat 44,5 mm dan 30 mm (Putri *et al.*, 2014).

Tingginya tingkat resistensi bakteri *P. aeruginosa* terhadap antibiotik menyebabkan menurunnya keefektifan terapi antibiotik pada pasien PPOK, dan menyebabkan semakin tingginya angka mortalitas serta morbiditas penyakit PPOK. Oleh karena itu, diperlukan adanya alternatif lain sebagai terapi pada penyakit PPOK yaitu penggunaan bahan alam sebagai terapi infeksi bakteri. Keuntungan bahan alam yang berasal dari tumbuhan yaitu mudah diperoleh karena terdapat disekitar lingkungan masyarakat dan harganya lebih murah. Ekstrak daun tanaman yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *Bacillus cereus* yaitu ekstrak metanol daun kayu putih (*Melaleuca leucadendra*) dengan diameter zona hambat sebesar 13,6 mm dan 6,3 mm (Abd *et al.*, 2015) dan daun salam (*Eugenia polyantha*) memiliki diameter zona hambat sebesar 8 mm (Lau *et al.*, 2014).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun tanaman Kayu Putih dan Salam terhadap *P. aeruginosa* serta mengetahui golongan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri.

II. METODE PENELITIAN

A. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya cawan porselin, seperangkat alat evaporator (HEIDOLPH Laborato 4000 Efficien WB eco), rak tabung reaksi, *spreader glass*, ose steril, lampu spiritus, batang

pengaduk, pipet tetes, pinset, mikropipet (Socorex), seperangkat alat gelas (Pyrex®), gelas objek, gelas penutup, neraca analitik (Precisa XT 120A), bejana kaca, cawan petri, inkubator bakteri (Memmert), autoklaf (Hiramaya), LAF (*Laminar Air Flow*) (CV. Srikandi Laboratory), lampu UV, oven (Memmert), dan mikroskop (CX21FS1).

B. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain daun Kayu Putih dan daun Salam yang diperoleh dari daerah sekitar Kudus, bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, etanol 70%, media MH (Mueller Hinton), media BHI (*Brain Heart Infusion*), media KIA (*Kligler Iron Agar*), SIM (*Sulfide Indole Motility*), disk kosong, NaCl 0,9%, disk siprofloksazin, metanol, n-heksan, kloroform, cat Gram A, cat Gram B, cat Gram C, cat Gram D, H, alfa naftol, KOH, silika gel GF254, sitroborat, Dragendorff, vanillin-H₂SO₄.

C. Jalannya Penelitian

1. Penyiapan Bahan

Bahan penelitian yang digunakan berupa daun Kayu Putih dan daun Salam dicuci hingga bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun. Kemudian daun dipotong menjadi ukuran lebih kecil, lalu dikeringkan di bawah sinar matahari dan ditutupi kain berwarna hitam, kemudian daun yang sudah kering dihaluskan dengan blender untuk memperkecil ukuran dan memperluas permukaan.

2. Ekstraksi

Lima puluh gram masing-masing serbuk daun direndam dengan 1500 mL etanol 70%, selanjutnya dimaserasi selama 3x24 jam dan sesekali diaduk. Kemudian disaring menggunakan kertas saring dan ampas hasil penyaringan diperas. Filtrat dari masing-masing daun dipekatkan dengan menggunakan evaporator. Hasil dari evaporasi kemudian diuapkan dengan penangas air hingga diperoleh ekstrak.

3. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Metode yang digunakan yaitu metode disk difusi agar. Suspensi bakteri diambil sebanyak 200 µL, diletakkan pada media MH, kemudian diratakan dengan *spreader glass*. Larutan ekstrak daun tanaman dengan

konsentrasi 20% b/v (200 mg dalam 1 mL etanol 70%) diambil 10 µL kemudian diteteskan pada disk kosong. Selanjutnya disk didiamkan 3-5 menit kemudian diletakkan di media yang telah diinokulasi dengan bakteri *P. aeruginosa*. Kontrol positif menggunakan disk antibiotik siprofloksasin dan kontrol negatif menggunakan disk yang ditetesi etanol 10 µL. Kemudian media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati diameter zona hambat yang terbentuk.

4. Kromatografi Lapis Tipis

Larutan ekstrak daun yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ditotolkan pada fase diam silika gel GF₂₅₄, kemudian dimasukkan dalam bejana berisi fase gerak n-heksan:aseton (6:4). Setelah dielusi, plat KLT dikeringkan dan diamati menggunakan sinar tampak, UV 254 nm, dan 366 nm. Kemudian setiap plat KLT disemprot dengan FeCl₃, sitroborat, Dragendorff, vanillin-H₂SO₄ (satu plat KLT untuk satu reagen semprot), selanjutnya yang menggunakan reagen semprot FeCl₃, Dragendorff, dan vanillin-H₂SO₄ diamati di sinar tampak, sedangkan sitroborat diamati di UV 366.

5. Bioautografi

Uji bioautografi dilakukan untuk mendeteksi bercak pada plat KLT yang mempunyai aktivitas antibakteri. Plat KLT hasil elusi ditempelkan pada media MH yang telah diinokulasi dengan *P. aeruginosa*, kemudian didiamkan selama 20 menit supaya senyawa aktif yang ada pada plat KLT dapat berdifusi ke dalam media. Selanjutnya plat KLT diambil dari media dan cawan petri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Aktivitas antibakteri senyawa diamati dengan melihat ada atau tidak zona hambat yang terbentuk, kemudian dihitung nilai Rf yang memiliki zona hambat. Area jernih menunjukkan letak senyawa aktif dalam daun yang mempunyai aktivitas antibakteri. Nilai Rf pada bioautografi dan KLT untuk mengetahui golongan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri dengan cara melihat antara nilai Rf dan KLT hasilnya sama.

a. Analisis Data

Hasil uji aktivitas antibakteri memperoleh data diameter zona hambat yang terbentuk. Hasil

diameter zona hambat yang didapat dari 3x replikasi dirata-rata dan dihitung nilai SD (Standar Deviasi) serta dihitung perbedaan rata-rata satu sampel (*One Sample t Test*) dengan aplikasi SPSS.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan tahap awal yang dilakukan dalam penelitian ini untuk memperoleh ekstrak kental daun tanaman. Proses ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Hasil ekstraksi (Tabel 1) yang diperoleh menunjukkan nilai rendemen yang bervariasi dari simplisia yang digunakan. Rendemen yang paling tinggi yaitu daun Kayu Putih sebesar 19,4%.

Tabel 1. Hasil ekstraksi daun tanaman

Sampel	Bobot Serbuk Simplisia (gram)	Bobot Ekstrak (gram)	Rendemen (%)
Daun Kayu Putih	50,6	9,8	19,4
Daun salam	55,2	5,9	10,7

B. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri bertujuan mengetahui kemampuan ekstrak etanol 70% daun tanaman dalam menghambat bakteri *P. aeruginosa*. Metode yang digunakan yaitu difusi disk. Ekstrak daun tanaman yang positif memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* ditandai dengan adanya zona bening di daerah sekitar disk yang merupakan zona hambat. Kontrol negatif yang digunakan yaitu etanol 70%. Kontrol positif menggunakan disk antibiotik siprofloksasin dengan diameter zona hambat sebesar 44,5 mm (Putri *et al.*, 2014). Hasil uji aktivitas antibakteri (Tabel 2 dan Tabel 3) menunjukkan hasil uji t dengan *One Sample t Test* (Tabel 3) bahwa probabilitas $0,004 < 0,05$ maka tidak ada perbedaan zona hambat yang signifikan ekstrak daun tanaman terhadap kontrol positif, jadi dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun Kayu Putih dan daun Salam memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa*.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun tanaman

Bahan uji	Rata2 diameter zona hambat \pm SD(mm)
Ekstrak daun Kayu Putih	23,17 \pm 1,53
Ekstrak daun Salam	14,00 \pm 3,46
Etanol 70% (K-)	6,00 \pm 0
Siprofloksasin(K+)	26,67 \pm 3,06

Keterangan: Diameter zona hambat termasuk diameter disk (6 mm), hasil dari 3x uji

Tabel 3. Hasil uji perbedaan rata-rata satu sampel (*One Sample t Test*)

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Dev.	Std. Error Mean
Rata2 zona hambat	2	16.6740	3.79070	1.69525

One-Sample Test

Test Value = 26.67						
95% Confidence Interval of the Difference						
	t	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Diff.	Lower	Upper
Rata2 zona hambat	-5.896	1	.004	9.99600	-14.7028	-5.2892

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun tanaman menunjukkan bahwa ekstrak daun Kayu Putih memiliki aktivitas antibakteri tertinggi dengan diameter zona hambat sebesar 23,17 mm. Abd *et al.*, (2015) menyatakan bahwa ekstrak metanol daun Kayu Putih dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dengan diameter zona hambat 12,33 mm. Perbedaan penggunaan bakteri dan pelarut mempengaruhi perbedaan hasil zona hambat. Senyawa aktif dalam ekstrak daun Kayu Putih yang diduga memiliki aktivitas antibakteri yaitu flavonoid, fenol, tanin, dan terpenoid (Abd *et al.*, 2015).

C. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun tanaman. Ekstrak daun yang dianalisis yaitu ekstrak daun Kayu Putih karena memiliki aktivitas antibakteri tertinggi dibanding

dengan ekstrak daun Salam. Fase diam yang digunakan yaitu silika gel GF 254. Fase gerak yang digunakan adalah n-heksan:aseton (6:4) yang mampu memisahkan senyawa yang terkandung di dalam ekstrak daun Kayu Putih. Komponen kimia yang terkandung di dalam ekstrak daun Kayu Putih bergerak naik mengikuti fase gerak karena daya serap adsorben terhadap komponen-komponen kimia tidak sama sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan jarak yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya. Hal tersebut menyebabkan terjadinya pemisahan komponen-komponen kimia di dalam ekstrak daun Kayu Putih. Hasil elusi KLT diperoleh nilai Rf (*Retardation factor*) yang merupakan jarak angka banding antara warna yang timbul dengan jarak batas yang telah ditentukan. Analisis dan hasil identifikasi golongan senyawa setelah diberi pereaksi semprot menunjukkan bahwa ekstrak daun Kayu Putih mengandung golongan senyawa alkaloid, polifenol, tanin, saponin, dan terpenoid.

Golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun Kayu Putih diidentifikasi perubahan warna bercak yang terjadi setelah diberi pereaksi semprot. Pereaksi semprot yang digunakan diantaranya sitroborat, FeCl₃, Dragendorff, dan vanilin-H₂SO₄. Penggunaan pereaksi semprot sitroborat pada ekstrak etanol 70% daun Kayu Putih tidak menunjukkan adanya bercak warna yang sesuai. Sitroborat digunakan untuk mengidentifikasi adanya golongan senyawa flavonoid yang jika dilihat pada UV 366 nm menunjukkan fluoresensi warna kuning-coklat atau oranye setelah diberi pereaksi semprot (Nansy *et al.*, 2015). Pereaksi semprot FeCl₃ digunakan untuk mengidentifikasi golongan senyawa tanin dan polifenol dengan hasil positif bercak berwarna hijau-hitam (Ukoha *et al.*, 2011). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun Kayu Putih positif mengandung senyawa tanin dan polifenol karena setelah disemprot dengan FeCl₃ muncul bercak warna hijau pada Rf 0,23 dan bercak abu-abu kehitaman pada Rf 0,68. Dragendorff digunakan untuk mengidentifikasi golongan senyawa alkaloid dengan warna coklat, jingga berlatar belakang kuning (Harborne, 1996). Ekstrak daun Kayu Putih positif mengandung alkaloid karena

setelah disemprot Dragendorff terdapat bercak berwarna coklat dengan nilai Rf sebesar 0,68. Vanilin-H₂SO₄ digunakan untuk mengidentifikasi adanya senyawa golongan saponin dan terpenoid yang berupa bercak warna utama biru, biru-ungu, dan kadang-kadang kuning-merah atau kuning pada sinar tampak setelah diberi pereaksi semprot vanillin-H₂SO₄ (Wagner and Bladt, 1996). Ekstrak daun Kayu Putih menunjukkan hasil positif mengandung golongan senyawa saponin dan terpenoid dengan adanya bercak berwarna ungu pada nilai Rf 0,2 dan 0,87 serta bercak warna biru pada Rf 0,78. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Abd *et al.*, (2015) senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak daun Kayu Putih yang diduga memiliki aktivitas antibakteri yaitu flavonoid, fenol, tanin, dan terpenoid. Hasil uji KLT dengan pereaksi semprot yang diperoleh terdapat kesamaan pada golongan senyawa fenol, tanin, dan terpenoid. Terdapat perbedaan yaitu hasil uji KLT menunjukkan adanya senyawa golongan alkaloid dan tidak menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid, kemungkinan karena tempat perolehan daun Kayu Putih di tanah yang berbeda, sehingga menyebabkan adanya perbedaan kandungan senyawa.

A. Bioautografi

Uji bioautografi bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri pada ekstrak daun tanaman dengan aktivitas antibakteri tertinggi. Ekstrak daun yang digunakan yaitu ekstrak daun Kayu Putih karena memiliki aktivitas antibakteri tertinggi terhadap *P. aeruginosa*. Metode yang digunakan adalah bioautografi langsung dengan cara meletakkan plat KLT yang sudah dielusi pada media MH agar yang telah diinokulasi bakteri. Senyawa aktif yang memiliki aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih dibekas bercak hasil elusi KLT. Hasil bioautografi dapat dilihat dari adanya zona jernih yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada bekas bercak hasil elusi KLT. Zona jernih yang diperoleh yaitu pada Rf 0,68 (Gambar 1) menandakan adanya aktivitas antibakteri pada bercak. Golongan senyawa yang diduga mampu menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* yaitu polifenol

dan tanin pada Rf 0,68. Berdasarkan penelitian sebelumnya, golongan senyawa pada ekstrak daun Kayu Putih yang diduga mempunyai aktivitas antibakteri yaitu flavonoid, fenol, tanin dan terpenoid (Abd *et al.*, 2015).

Polifenol sebagai agen antibakteri bekerja dengan mendenaturasi protein sel. Ikatan hidrogen yang terbentuk antara fenol dan protein mengakibatkan struktur protein menjadi rusak, selain itu mampu mempengaruhi permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma karena keduanya tersusun atas protein (Pelczar, 2010). Tanin memiliki aktivitas antibakteri memiliki mekanisme kerja yaitu menginaktivasi adhesin mikroba, enzim, transport protein pembungkus sel, dan membentuk kompleks dengan polisakarida (Cowan, 1999).



Gambar 1. Hasil bioautografi ekstrak daun kayu putih

IV. KESIMPULAN

Ekstrak daun yang memiliki aktivitas antibakteri tertinggi terhadap *P. aeruginosa* yaitu ekstrak etanol 70% daun Kayu Putih. Alkaloid, terpenoid, saponin, polifenol dan tanin merupakan golongan senyawa yang terkandung pada ekstrak daun Kayu Putih. Golongan senyawa yang diduga bertanggung jawab dalam menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* yaitu polifenol dan tanin.

DAFTAR PUSTAKA

1. Abd N.M., Nor Z.M., Mansor M., Azhar F., Hasan M.S. dan Kassim M., 2015, Antioxidant, Antibacterial Activity and Phytochemical Characterization Of Melaleuca cajuputi Extract, Journal of BMC Complementary and Alternative Medicine, 15, 385.

2. Cowan M.M., 1999, Plant Products as Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564–582.
3. Harborne J., 1996, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*, ITB, Bandung.
4. Lambert PA., 2002, Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *J R Soc Med*, 95, 22-26.
5. Lau K.Y., Zainin N.S., Abas F. dan Rukayadi Y., 2014, Antibacterial and sporicidal activity of *Eugenia polyantha* Wight against *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*, *International Journal Current Microbiology and Applied Sciences*, 3 (12), 499-510.
6. Nansy E., Harwoko, Pramono S., Nugroho A.E., 2015, Total Flavonoid Content and In Vivo Hypotensive Effect of Chloroform Insoluble Fraction of *Centella asiatica* Leaf Extract, *International Food Research Journal*, 22 (5), 2119-2125.
7. Pelczar, M.C., 2010, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Universitas Indonesia, Jakarta.
8. Putri A. A., Rasyid R., dan Rahmatini, 2014, Perbedaan Sensitivitas Kuman *Pseudomonas aeruginosa* Penyebab Infeksi Nosokomial Terhadap Beberapa Antibiotika Generik dan Paten, *Jurnal Kesehatan Andalas*, 3 (3), 330-331.
9. Sonita A. Erly dan Masri M., 2014, Pola Resistensi Bakteri pada Sputum Pasien PPOK Terhadap Beberapa Antibiotika di Laboratorium Mikrobiologi RSUP Dr. M. Djamil Periode 2010 – 2012, *Jurnal Kesehatan Andalas*, 3 (3), 356-357.
10. Ukoha P.O., Cemaluk E.A.C., Nnamdi O.L., and Madus E.P., 2011, Tannins and Other Phytochemical of the *Samanea saman* Pods and Their Antimicrobial Activities, *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 5 (8), 237-244.
11. Wagner H., and Bladt S., 1996, *Plant Drugs Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd Edition., Germany, Springer.