

## Efektivitas Hipofisa Ayam Broiler Terhadap Respon Ovulasi Ikan Betok (*Anabas testudeineus*, Bloch)

<sup>1</sup>Andre Wijaya, <sup>\*2</sup>Muhammad Sugihartono, dan <sup>2</sup>Muarofah Ghofur

<sup>1</sup>Program Studi Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Batanghari

<sup>2</sup>Alumni Program Studi Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Batanghari

Jl. Slamet Riyadi, Broni, Jambi, 36122. Telp. +6074160103

<sup>\*2</sup>e-mail korespondensi : [muhmadsugihartono01@gmail.com](mailto:muhmadsugihartono01@gmail.com)

**Abstract.** Betok fish (*Anabas testudineus*, Bloch) is a local freshwater fish that has high economic value and is loved by the community, but has not been widely cultivated, because the betok fish have not been bred so that fish production still relies on catches from nature. The potential for betok fish to become consumption fish and ornamental fish is accompanied by increasing market demand for Violita et al (2019). This study aims to determine the effect of the effectiveness of the broiler's pituitary gland on the ovulatory response of betok fish (*A. testudeineus*, Bloch) by using a hormone extract from the broiler's pituitary gland. This study used a completely randomized design (CRD) with 4 treatments and 3 replications. Where each treatment was given an injection dose: Treatment A: Hypophysis Broiler Chicken 0.2 ml/kg. Treatment B: Hypophysis of Broiler Chicken 0.4 ml/kg. C: Hypophysis Broiler Chicken 0.6 ml/kg. Treatment D: Control. Parameters Observed Ovulation Latency Time, fecundity. Research shows that the average latency time is 8.07 hours. 6518 items.

**Keywords:** Fecundity, Broiler Chicken Hypophyses, Betok fish eggs, Latency time.

**Abstrak.** Ikan betok (*Anabas testudineus*, Bloch) merupakan ikan lokal air tawar yang mempunyai nilai ekonomis tinggi dan di gemari oleh masyarakat, tetapi belum banyak dibudidayakan, karena ikan betok belum di kembang biakan sehingga produksi ikan masih mengandalkan hasil tangkapan dari alam. Potensi ikan betok menjadi ikan konsumsi dan ikan hias diiringi dengan meningkatnya permintaan pasar Violita et al (2019). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh efektivitas hipofisa ayam broiler terhadap respon ovulasi ikan betok (*A. testudeineus*, Bloch). Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 3 ulangan. Dimana masing-masing perlakuan tersebut diberikan dosis penyuntikan: perlakuan A: Hipofisa Ayam Broiler 0,2 mL/Kg, perlakuan B: Hipofisa Ayam Broiler 0,4 mL/Kg, perlakuan C: Hipofisa Ayam Broiler 0,6 mL/Kg dan perlakuan D: Kontrol. Parameter yang Diamati Waktu Latensi Ovulasi. Penelitian menunjukkan bahwa rata-rata waktu latensi 8 jam 7 menit.

**Kata kunci:** Hipofisa Ayam Broiler, Telur ikan betok, Waktu latensi.

### PENDAHULUAN

Ikan betok (*Anabas testudineus*, Bloch) merupakan ikan lokal air tawar yang mempunyai nilai ekonomis tinggi dan di gemari oleh masyarakat, tetapi belum banyak dibudidayakan, karena ikan betok belum di kembang biakan sehingga produksi ikan masih mengandalkan hasil tangkapan dari alam. Potensi ikan betok menjadi ikan konsumsi dan ikan hias diiringi dengan meningkatnya permintaan pasar Violita et al (2019).

Namun saat ini keberadaan ikan betok sudah mulai langka, dan terancam punah sehingga perlu dilestarikan, karena pemijahan ikan betok di alam terjadi sekali dalam setahun pada musim penghujan dan ikan ini termasuk ikan yang sulit memijah secara alami. Melimpahnya air pada suatu perairan dapat mempengaruhi ikan betok untuk melakukan pemijahan. Hal ini juga didukung oleh Muslim et al (2019), berdasarkan penelitiannya menunjukkan bahwa pemijahan ikan betok dalam kolam terpal dengan ketinggian air berbeda berpengaruh nyata terhadap waktu laten ikan betok. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk menjaga kelestarian ikan ini adalah melalui kegiatan budidaya, dengan menerapkan teknik pemijahan buatan. Untuk menghasilkan jumlah telur yang terbuahi lebih banyak dari pada pemijahan secara alami. Dilakukan dengan domestikasi, pemeliharaan induk secara intensif, melakukan proses pemijahan, dan selanjutnya meregenerasi induk ataupun restocking keperairan umum.

Hipofisisasi telah umum dilakukan dengan menggunakan ekstrak kelenjar hipofisa ikan yang sejenis. Dalam penjelasan Sakuro et al (2016), ikan yang diinduksi dengan ekstrak hipofisa ikan sejenis dapat berpengaruh nyata terhadap waktu laten pemijahan. Kelenjar hipofisa pada ikan vertebrata juga menghasilkan Follicle Stimulating hormone (FSH) dan Luteinizing hormone (LH) yang secara langsung mengontrol banyak aspek perkembangan dan fungsi gonad. Namun, hipofisa donor tidak hanya berasal dari ikan tetapi dapat juga digunakan dari kelenjar hipofisa ayam.

Penggunaan hipofisa ayam broiler ini telah dicobakan oleh Wadi et al (2018), hasil penelitiannya menunjukkan bahwa penggunaan ekstrak hipofisa ayam broiler untuk menggantikan peran ovaprim dapat dilakukan dengan dosis 500 mg/kg untuk pemijahan ikan lele dumbo. Kelebihan lain dari hipofisa ayam broiler adalah ukurannya lebih besar. Hipofisa ayam broiler juga mempunyai aktivitas untuk mensekresi hormon gonadotropin (*Folikel stimulating Hormone* dan *Luteinizing Hormone*) FSH dan LH.

Diba et al (2016), menyatakan Hipofisa yang digunakan adalah 400 mg/kg, 500 mg/kg, 600 mg/kg, bahwa perlakuan pada hipofisa ayam broiler yang terbaiknya untuk ikan betok adalah 400 mg/kg, kandungan hormon FSH

dan LH dalam hipofisa dapat menginduksi hormon. Hal ini juga didukung dengan pendapat Sandra (2020), bahwa kombinasi ekstrak hipofisa ayam broiler dengan ovaprime berpengaruh nyata terhadap waktu latensi ovulasi ikan lele sangkuriang. Dari uraian di atas maka perlu dilakukan kajian lagi untuk mendapatkan perlakuan yang terbaik tentang “efektivitas hipofisa ayam broiler terhadap respon ovulasi ikan betok (*A. testudeineus*, bloch)”.

## METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli sampai Agustus Tahun 2021 selama 30 hari, penelitian dilaksanakan di Balai Benih Ikan (BBI) Thehok, Kota Jambi.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuarium untuk pemijahan sebanyak 12 buah dengan ukuran 100 x 40 x 40 cm, dengan ketinggian air 15 cm dan Airpump Yamano Lp 60 aerator. Mikroskop Binokuler XSZ/107 BN dengan pembesaran 100x, ammonia as detector tipe AR-8500, CO<sub>2</sub> Tvoc tipe pm 2.6, lutron Do tipe 5509 oxygen, gelas ukur 50 ml, gelas piala 250 ml dan 1000 ml, cawan petri, tissue, centrifuge kecepatan 3000 rpm dengan tipe 8 Hole Dragon, pH meter Digital tipe ATC, timbangan digital mini scale Precision Akurasi 0,001 gra, spuit 1 ml, alat tulis, pisau pemotong, Camera Digital Canon IXUS 160 dan bak fiber ukuran 200 x 100 x 70 cm untuk indukan yang sudah diseleksi.

Bahan yang digunakan adalah ikan betok sebanyak 12 jantan dan 12 betina yang telah terdomestikasi dan tingkat kematangan gonad akhir. Untuk kelenjar hipofisa digunakan kelenjar hipofisa ayam broiler yang diambil dari kepala ayam broiler. Bahan-bahan lain yaitu alkohol 96% larutan fisiologis (NaCl 0,9%).

Dalam penelitian ini ingin mencari yang terbaik lagi dengan Rancangan penelitian yang akan dilakukan menggunakan model Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan dan 3 kali ulangan, masing-masing perlakuan tersebut adalah perlakuan A: Hipofisa Ayam Broiler 0,2 mL/Kg, perlakuan B: Hipofisa Ayam Broiler 0,4 mL/Kg, perlakuan C: Hipofisa Ayam Broiler 0,6 mL/Kg dan perlakuan D: Kontrol.

Ikan uji yang berukuran 14 cm – 15 cm dan berat 170 gr – 250 gr terlebih dahulu diseleksi untuk memastikan kematangan Gonad ikan uji yang siap untuk dipijahkan. Kemudian ikan uji diberokkan/dipuaskan terlebih dahulu selama 6-12 jam, sebelum perlakuan dilakukan untuk mengetahui apakah ikan perutnya gendut karena telur atau gendut karena pakan, ciri induk Betina yaitu Tubuh gemuk dan lebar kesamping, warna badan agak gelap, bagian bawah perut agak melengkung jika diurut akan keluar telur, alat kelamin berwarna kemerahan, umur induk lebih dari 10 bulan. Sedangkan ciri induk Jantan yaitu Tubuh ramping dan panjang, warna badan agak cerah, bagian bawah perut rata jika diurut akan keluar cairan sperma, umur induk lebih dari 10 bulan.

Setelah mempersiapkan Ikan uji selanjutnya ikan uji dimasukkan kedalam bak penampungan ukuran 200 x 100 x 70 cm dengan sesama jenis kelamin untuk diberokkan sebelum dilakukan penyuntikan, dan setelah penyuntikan ikan dimasukkan kedalam akuarium yang berukuran 60 x 30 x 30 cm dengan volume air sebanyak 10 liter, dengan rasio jantan dan betina 1:1, kemudian akuarium ditutup menggunakan jaring nilon dan diberi aerasi dengan kecepatan sedang.

Kelenjar hipofisa yang sudah disimpan dalam styrofoam ice diambil dan dikeringkan sampai kering dan ditimbang sesuai perlakuan yang dibutuhkan yaitu, A. 0,2 ml/kg, B. 0,4 ml/kg dan C. 0,6 ml/kg. Selanjutnya kelenjar hipofisa tersebut digerus sampai hancur didalam mortar. Setelah hancur kelenjar hipofisa tersebut ditambahkan larutan NaCl sebanyak 1,5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung. Setelah itu kelenjar hipofisa disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm, setelah disentrifuge terdapat dua lapisan yaitu (cairan bening dan endapan), yang diambil adalah cairan beningnya dengan menggunakan spuit suntik dan kemudian dimasukkan kedalam ice box.

Kelenjar hipofisa ayam broiler diperoleh dari rumah pemotongan ayam di pasar Angso Duo, Kota Jambi. Kelenjar hipofisa dikumpulkan sebanyak yang dibutuhkan yaitu 20 kepala ayam broiler, kemudian pengambilan kelenjar hipofisa dilakukan dengan cara membela tengkorak kepala ayam dari arah paruh ke bagian otak belakang, sehingga sebelum mengangkat kelenjar hipofisa, terlebih dahulu mengangkat otak.

Kelenjar hipofisa diangkat menggunakan pinset dan dimasukkan ke dalam botol yang telah berisi alkohol 96% untuk disimpan sementara sebelum digunakan. Pada waktu yang akan digunakan, kelenjar hipofisa ayam broiler ditimbang berdasarkan perlakuan (A. 0,2 mg/kg, B. 0,4 mg/kg, C. 0,6 mg/kg) dikali dengan berat bobot ikan yang akan dipakai, menggunakan timbangan analitik. Setelah ditimbang kelenjar hipofisa dihaluskan dengan penggerus dalam cawan petri dan kemudian ditambahkan larutan fisiologis NaCl 0,9% masing-masing 1,5 ml. Ekstrak hipofisa dimasukkan ke dalam gelas tabung dan disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, setelah itu akan terbentuk dua lapisan (cairan bening dan endapan). Cairan yang digunakan adalah cairan bening supernata inilah yang akan disuntikkan untuk merangsang pemijahan ikan betok.

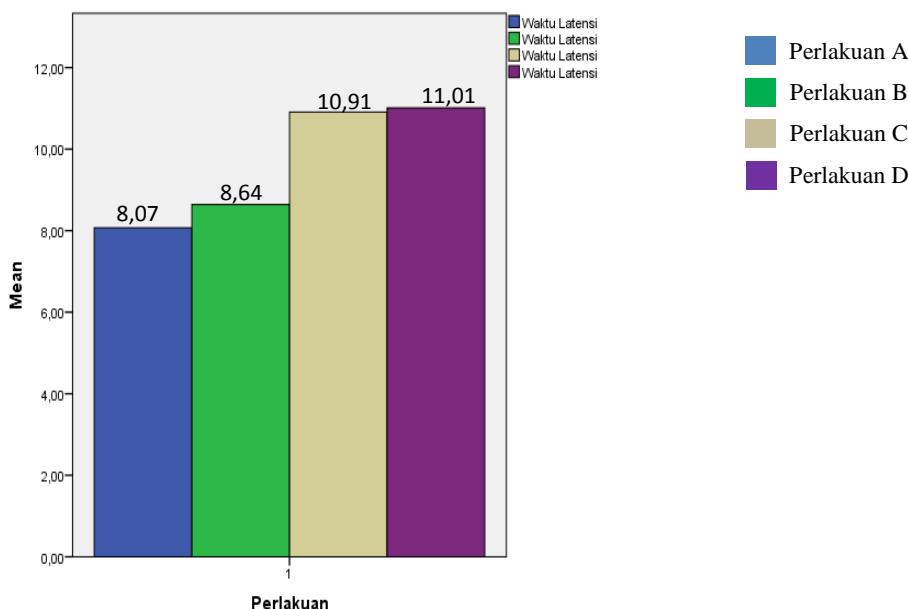
Pada saat penyuntikan induk, dilakukan dibagian punggung dengan kemiringan jarum suntik 40-45°. Kedalaman jarum suntik ± 1 cm dan disesuaikan dengan besar kecilnya tubuh ikan. Penyuntikan dilakukan perlahan dan hati-hati. Setelah disuntik obat didorong masuk, jarum dicabut kemudian bekas suntikan diurut perlahan-lahan dengan jari telunjuk atau jempol beberapa saat agar obat tidak keluar.

Penyuntikan terhadap ikan uji dilakukan satu kali dengan dosis yang sudah ditetapkan, setelah itu induk ikan dimasukkan kembali kedalam akuarium pemijahan, pengecekan ovulasi ikan dilakukan setelah 6 jam dari penyuntikan Selama proses pemijahan dilakukan pengamatan secara visual setiap satu jam sekali tujuannya adalah untuk melihat perkembangan yang terjadi pada ikan uji

Parameter yang diamati adalah waktu latensi, daya tetas telur, dan parameter kualitas air dianalisis menggunakan analisis ragam pada selang kepercayaan 95%, analisis ini dilakukan untuk menentukan apakah perlakuan berpengaruh nyata atau tidak terhadap Ekstrak hipofisa ayam broiler pada ikan betok (*A. testudineus*. *Bloch*). Apabila berpengaruh nyata, dilakukan uji lanjut menggunakan uji Duncan. Parameter kualitas air dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel untuk melihat kelayakan dalam penyuntikan ikan betok pada hipofisa ayam broiler.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Waktu Latensi (Jam, Menit)



**Gambar 1.** Rata-rata waktu latensi ovulasi

Dari hasil penelitian pada gambar waktu latensi ovulasi ikan betok menunjukkan pada perlakuan A menghasilkan waktu latensi tercepat dengan rata-rata 8 jam 7 menit dikarenakan dosis yang digunakan pada perlakuan A 0,2 ml/kg sudah optimal karena hormon yang diberikan mengandung FSH dan LH untuk merangsang kematangan gonad secara sempurna sehingga menghasilkan waktu latensi tercepat pada induk ikan betok (*Anabas testudineus*. *Bloch*). Sugihartono (2021) menjelaskan ovulasi akan terjadi jika proses kuning telur pada oosit bekerja secara sempurna. Sedangkan pada perlakuan D (kontrol) ulangan 3 yang tidak disuntik menghasilkan waktu latensi ovulasinya lebih lama yaitu 12 jam 38 menit, dengan jarak lebih lama, dikarenakan tidak diberikan hormon perangsang pada induk sehingga menghasilkan waktu ovulasi nya lebih lama dibandingkan dengan menggunakan hormon pada induk ikan.

### Parameter Kualitas Air

Parameter kualitas air memegang peranan penting dalam proses Reproduksi dan penetasan telur ikan. Untuk proses penetasan telur umumnya berlangsung lebih cepat pada suhu yang lebih tinggi karena pada suhu yang lebih tinggi proses metabolisme berjalan lebih cepat sehingga perkembangan embrio akan lebih cepat juga. Air yang diukur meliputi Suhu, pH, Oksigen terlarut, CO<sub>2</sub>, dan Ammonia (NH<sub>3</sub>).

Data hasil uji parameter kualitas air untuk reproduksi dan penetasan telur ikan betok (*A. testudineus*. *Bloch*) dalam tabel 1berikut:

Tabel 1. Hasil uji kualitas air penelitian

No	Parameter	Satuan	Perlakuan				Standar
			A	B	C	D	
1	Suhu(°C)	mg/L	28	28	29	29	27 °C -30 °C Boyd, 1989
2	(DO)	mg/L	4,8	3,2	4,7	4,5	<3mg/L Zonneveld, 1991
3	Ph	-	7,3	7,5	7,4	7,7	6-8 Zonneveld, 1991
4	Amoniak	mg/L	0,012	0,012	0,013	0,012	<0,001 mg/L Boyd, 1989

Sumber : Laboratorium Balai Perikanan Budidaya Air Tawar Sungai Gelam

Data hasil uji parameter kualitas air masih dalam kisaran cukup baik untuk pemijahan dan penetasan telur ikan betok (*A. testudineus*. Bloch).

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa penetasan telur ikan betok yang didapat antara 7,6-7,8, menurut Zonneveld *et al* (1991) perairan yang baik untuk pemijahan dan penetasan telur adalah pH 6-8, dan pada hasil penelitian merupakan kisaran pH yang cukup baik untuk proses pemijahan dan penetasan ikan betok (*A. testudineus*. Bloch). Untuk pengukuran suhu selama proses pemijahan dan penetasan ikan betok antara 27,7°C-28,8°C, menurut Boyd, (1990) menyatakan bahwa suhu untuk perairan yang baik berkisar antara 27°C-30°C, suhu pada hasil penelitian tersebut masih dalam kisaran yang cukup baik untuk proses pemijahan dan penetasan telur ikan betok (*A. testudineus*. Bloch). Untuk pengukuran oksigen terlarut (DO) selama proses pemijahan dan penetasan telur ikan betok adalah 2,0-3,2 mg/L, menurut Zonneveld *et al* (1991) menyatakan bahwa ketersediaan oksigen terlarut dalam suatu perairan dengan nilai DO dari <3mg/L, pada hasil penelitian tersebut merupakan masih dalam kisaran toleransi untuk proses pemijahan dan penetasan telur ikan betok (*A. testudineus*. Bloch). Dan kandungan ammonia (NH<sub>3</sub>) selama proses pemijahan dan penetasan telur ikan betok adalah 0,011-0,024 mg/L, menurut Boyd (1979), perairan yang baik untuk pemijahan dan penetasan telur ikan adalah yang mengandung ammonia <1 ppm, berdasarkan hasil pengukuran diketahui bahwa kandungan ammonia pada penelitian ini masih dalam kisaran optimal dan masih bisa ditoleransi sebagai habitat ikan betok (*A. testudineus*. Bloch) untuk proses pemijahan dan penetasan telur.

## KESIMPULAN

Ekstrak hipofisa ayam broiler terbaik yang diujikan pada ikan betok terdapat pada perlakuan A. 0,2 mL/Kg dan memberikan pengaruh terhadap waktu latensi ovulasi yaitu 8 jam 7 menit, fekunditas sebesar 6.618 dan pada Daya Tetas sebesar 94,67%.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustinus, F. dan Infa, M. 2018. Pemijahan dan Kelangsungan Hidup Ikan Betok (*Anabas testudineus*) dengan rasio indukan yang berbeda. Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan, Universitas Kristen Palangka Raya. Vol 7. ISSN : 2301-7783.
- Ayer, Y. Joppy M dan Hengki S. 2015. DayaTetas Telur dan Sintasan Larva dari Hasil Penambahan Madu Pada Bahan Pengencer Sperma Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). Mahasiswa Prodi Bubidaya Perairan Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan UNSRAT Manado. Vol 3. No. 1 : 149-153.
- Azrianto. 2018. Pengaruh Debit Air Terhadap Kelangsungan Hidup dan Pertumbuhan Benih Ikan Betok (*Anabas testudineus*) pada Sistem Resirkulasi. Skripsi. Program Studi Budidaya Perairan Fakultas Pertanian. Universitas Batanghari Jambi. Hal 12-16.
- Blanco, A. M. 2019. Hypothalamic and Pituitary Derived Growth and Reproductive Hormones and the Control Of Energy Balance in Fish. Laboratory of Integrative Neuroendocrinology. University Of Saskatchewan. Canada.
- Boyd, C. E. 1989. Water Quality Management and Aeration in Shrimp Farming Department of Fish and Allied Aquaculture. Alabama USA.
- Diba, N, F, Muslim dan Yusliman. 2016. Pemijahan Ikan Betok (*Anabas testudineus*) yang Diinduksi Dengan Ekstrak Hipofisa Ayam Broiler. Akuakultur Fakultas Pertanian UNSRI. 4(1);188-199. ISSN 2303-2960.
- Fakriadis, I., F. Lisi., I. Sigelaki., M. Papadaki., C. C. Maylonas. 2019. Spawning Kinetics and Egg/Larva Quality of Greater Amberjack (*Seriola dumerili*) in response to Multiple GnRH<sub>A</sub> Injection or Implants. University of Barcelona. Spain.
- Mardhatillah, H., Efrizal., dan R. Rahayu. 2018. Pengaruh Ekstrak Kelenjar Hipofisa Ayam Broiler Dalam Mempercepat Respon Ovulasi Ikan koi (*Cyprinus carpio*. L.). Jurnal Metamorfosa. V (1): 28-35.
- Muller, T., L. Horvath., T. Ittzes., A. Bognar., P. Faidt., A. Ittes., B. Urbanyi., B. Kucska. 2018. Novel Method For Induced Propagation Of Fish: Sperm Injection In Oviducts And Ovary/Ovarian Lavage With Sperm.

- Department Of Aquaculture, Faculty Of Agricultural And Environmental Sciences, Szent István University, 2100 Gödöllő, Hungary
- Muslim, M., M. Fitriani., M, Busroh. 2019. Pemijahan Ikan Betok (*A. testudineus* bloch) Dalam Kolam Terpal Dengan Ketinggian Air Berbeda. Studi Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya. Vol 17. No 2.
- Nagahama, Y. 1987. The Functional Morphology of Teleost Gonads. In. WSHoar, Randall DJ, Donalson Em (Eds). Fish Pisiology IX B. Acad Press New York. Vol I. : 223-275.
- Saanin, H. 1968. Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan 1 dan 2. Bogor.
- Sakuro, B, A. Muslim dan Yusliman. 2016. Rangsangan Pemijahan Ikan Gabus (*channa striata*) Menggunakan Ekstrak Hipofisa ikan Gabus. Akuakultur, Fakultas Pertanian, UNSRI. 91-102. ISSN 2303-2960.
- Sandra, A, A. 2020. Kombinasi Hormon Ovaprim Dengan Ekstrak Hipofisa Ayam Broiler Terhadap Waktu Latensi Ovulasi (Hatching rate) Ikan Lele Sangkuriang (*Clarias gariepinus* var.Sangkuriang). Ps Budidaya Perairan Fakultas Pertanian. Universitas Batanghari. Hal. 9-12, ISSN 2597-8837.
- Servili, A., Canario., O. Mouchel., J. Cueto. 2020. Climate Change Impact on Fish Reproduction Are Mediated at Multiple Levels of the Brain Pituitary Gonad Axis. University of the Seas (SEA-EU. Spain.
- Sivan, L., J. Bogerd., E. Mananos., A. Gomez., J. Lareyre. 2010. Perspectives On Fish Gonadotropins And Their Receptors. Faculty of Agriculture, Food and Environment, Department of Animal Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot 76100, Israel.
- Sugihartono, M. Muarofah, G. Dan A. Sandra. 2021. Waktu Latensi dan Kecepatan tetas Telur ikan Lele Sangkuriang (*clarias gariepinus*) Menggunakan Kombinasi Hormon Ovaorim dan Ekstrak Hipofisa Ayam Pedaging. Universitas Batanghari Jambi. 36122
- Wadi, H. Y. dan M. Idris. 2018. Respon Pemberian Ekstrak Hipofisa Ayam Broiler Dengan Dosis Berbeda Terhadap Ovulasi Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) Betina. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Halu Oleo. Vol.3, No.2, Hal 617-629. ISSN 2503-4324.
- Zonneveld, N. Huisman, E. A. Boon J. H. 1991. Perinsip-perinsip Budidaya ikan. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama Hal. 312-316