

Purifikasi dan Karakterisasi Protein Antibakteri dari *Pheretima javanica*
(Purification and Characterization of Antibacterial Protein from
Pheretima javanica)

Joko Waluyo¹⁾, Bambang Sugiharto²⁾ dan Noor Cholies Zaini³⁾

¹⁾ Staf Pengajar FKIP Universitas Jember

²⁾ Staf Pengajar Fakultas MIPA Universitas Jember

³⁾ Staf Pengajar Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

ABSTRACT

This research aimed to examine and isolate antibacterial protein from three species of earthworms has antibacterial potencies. The research was conducted in several stages, namely: extraction earthworm by using three kinds of solvents; antibacterial activity test of earthworm extract by agar diffusion method; purification of antibacterial protein by using DEAE chromatography, filtration column chromatography, and Native-PAGE. The results showed that three species of earthworms contained antibacterial protein. The activity of antibacterial protein extract of Pheretima javanica in MOPS buffer was highest and the inhibition zone diameter were 10.0-14.0 mm. Compared to the other solvents, the of MOPS buffer most precise for the solvent of protein. The extract of Pheretima javanica with MOPS solvent was fractionated by using DEAE chromatography (anion exchanger) and produced three peaks of protein group. Among the peaks, last peak that need 0.380 M NaCl to eluate performed antibacterial activity. Further fractionation of the protein by using gel filtration chromatography produced two peaks and one of the peak has antibacterial activity. Further purification that carried out by cutting the active fraction of second protein peak by using Native-PAGE produced seven bands. A single protein of the sixth band from lowest band showed antibacterial activity.

Keywords: Pheretima javanica, protein purification, chromatography, electrophoresis, antibacterial protein, agar diffusion method.

PENDAHULUAN

Jenis cacing tanah yang banyak ditemukan di Pulau Jawa antara lain jenis *Pontoscolex coretrurus*, *Lumbricus rubellus*, *Pheretima capensis* dan *Pheretima javanica*. Di antara ketiga cacing tanah tersebut yang paling banyak jumlah populasinya adalah *Pheretima javanica* dan mempunyai tubuh relatif lebih besar dan panjang di antara cacing tanah yang lain (Waluyo, 1994). Uji pendahuluan terhadap potensi beberapa ekstrak cacing tanah menunjukkan bahwa cacing tanah *Pheretima javanica* mengandung senyawa antibakteri (Waluyo, 2003).

Secara umum tubuh cacing tanah mengandung protein, asam amino dan bermacam-macam enzim. Beberapa penelitian juga telah membuktikan adanya daya antibakteri ekstrak protein cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan *Pheretima sp.* yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* (Affandi, 1996).

Ju Hyun *et al.*, (1998) mengemukakan bahwa peptida antimikroba dari cacing tanah

Lumbricus rubellus telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi disebut *lumbricin I*. *Lumbricin I* merupakan peptida antimikroba yang mengandung prolin 15% dari total berat kering, dan tersusun dari 62 macam asam amino serta mempunyai berat molekul 7,231 kDa. Selain itu, Milochau dkk. (1997) juga telah mengisolasi dan mengkarakterisasi protein antibakteri dari cairan *coelomic* dari cacing tanah *Eisenia fetida andrei*, yang mempunyai aktivitas antibakteri dan diberi nama *fetidin* dengan berat molekul 40,0 kDa dan 45,0 kDa.

Sejauh ini belum ada laporan tentang protein antimikroba dari cacing tanah di Indonesia. Akan tetapi berdasarkan kajian di atas, dilakukan penelitian terkait dengan purifikasi protein dari cacing tanah yang berpotensi sebagai antibakteri. Penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan protein dari cacing tanah yang berpotensi sebagai antibakteri, sehingga dapat digunakan sebagai dasar untuk pengembangan penelitian lebih lanjut utamanya penggunaan protein antibakteri melalui bioteknologi.

METODE

Persiapan Bahan Cacing Tanah

Cacing tanah *Pheretima javanica* diambil dan dikumpulkan secara acak di daerah Kabupaten Jember. Pengambilan dilakukan dengan cara dipilih cacing yang sudah dewasa dengan ciri sudah terdapat klitelum, umur lebih dari lima bulan dan bergerak dengan lincah (sehat).

Pembuatan Ekstrak dan Presipitasi Protein Cacing Tanah

Cacing tanah segar yang telah dibersihkan dari kotoran/tanah dengan air suling yaitu: *Pheretima javanica*, ditimbang 200 gram, kemudian diekstrak dalam tiga macam pelarut (NaCl, MOPS, bufer sulfat). Ekstraksi dilakukan dengan cara mencampur 200 gram cacing tanah dan 400 mL pelarut, kemudian diblender, dihomogenkan dengan sonikator sampai seluruh sel pecah menjadi homogenat. Masing-masing homogenat disentrifugasi $14.000 \times g$ selama 30 menit suhu 4°C . Supernatan yang dihasilkan dipresipitasi dengan amonium sulfat 80%, kemudian disentrifugasi $14.000 \times g$ selama 30 menit suhu 4°C , pelet yang dihasilkan dilarutkan dalam pelarut steril, kemudian amonium sulfatnya dipisahkan dengan kolom Sephadex G-25, didapatkan sembilan macam ekstrak. Setiap ekstrak dilihat kandungan proteinnya dengan uji *Bradford* dan dilakukan uji aktivitas ekstrak.

Uji Potensi Aktivitas Antibakteri Protein Cacing Tanah

Menyiapkan 12,5 mL media nutrisi yang telah dicairkan (suhu 45°C - 50°C) dalam tabung *base layer* dituangkan ke dalam cawan petri steril, dibiarkan memadat. Dimasukkan 10 μL inokulum bakteri uji ke dalam tabung *seed layer* yang berisi 7,5 mL media nutrisi yang telah dicairkan (suhu 45°C - 50°C), dikocok dengan vortex selanjutnya dituang secara merata di atas permukaan *base layer* di dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Sumuran dibuat pada agar dengan pipa pencetak agar atau meletakkan ring dengan posisi yang teratur. Masing-masing lubang/ring tersebut diisi dengan larutan uji dan larutan standar (50 μL untuk lubang, 250 μL untuk ring) sesuai tempatnya, kemudian cawan petri diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Diamati dan diukur diameter daerah hambatan yang terbentuk dengan

jangka sorong untuk 5 macam bakteri uji (Ju Hyun, 1998).

Purifikasi Protein Antibakteri dengan Kolom Kromatografi DEAE Sephacel (Anion Exchanger)

Ekstrak protein antibakteri dari cacing tanah yang diperoleh dipisahkan dengan kromatografi kolom DEAE Sephacel (*Anion Exchanger*). Kolom DEAE panjangnya 70 cm dan diameter 2,5 cm dipasang dengan standar penjepit, kemudian bahan DEAE dimasukkan dalam kolom sedikit demi sedikit sampai ketinggian 55 cm. Selanjutnya larutan sampel dimasukkan kolom di atas bahan DEAE, kemudian dialiri bufer 0,50 mM MOPS tetes demi tetes. Fraksi yang keluar ditampung dalam kolektor fraksi setiap 2 mL, setelah tetesan fraksi tidak mengandung protein yang dilihat dengan spektrofotometer, dialirkan tetes demi tetes 0,5 M NaCl ke dalam bufer MOPS, supaya homogen dicampur dengan stirer, NaCl berfungsi untuk mengganti protein bermuatan positif yang terikat dalam DEAE. Protein akan keluar dari ikatan DEAE. Fraksi-fraksi yang dihasilkan dilihat kandungan proteinnya dengan spektrofotometer melalui pengamatan absorbansinya pada panjang gelombang 280 nm (Murray, 1994). Dibuat grafik hubungan antara kandungan protein dan nomor fraksi dan hasil uji aktivitas, sehingga didapatkan fraksi protein antibakteri. Fraksi protein antibakteri dari cacing tanah dikumpulkan, dipresipitasi dengan amonium sulfat 80%. Pelet yang dihasilkan dilarutkan dalam bufer MOPS dan dilewatkan sephadex G-25. Fraksi protein antibakteri dikumpulkan dan dipisahkan dengan kolom kromatografi filtrasi Sephadex G-100.

Purifikasi Protein Antibakterial dengan Kromatografi Kolom Sephadex G-100 (Filtrasi)

Pemisahan Protein dilakukan dengan kromatografi kolom filtrasi sephadex G-100, kemudian ditampung dengan fraksi kolektor, fraksi-fraksi yang dihasilkan diuji aktivitasnya, didapatkan fraksi protein antibakteri dari cacing tanah (Murray, 1994).

Fraksi protein antibakteri dari cacing tanah dikumpulkan, dipresipitasi dengan amonium sulfat 80%, pelet yang dihasilkan diencerkan dengan bufer MOPS, dilewatkan sephadex G-25, dan selanjutnya fraksi protein antibakteri

dimurnikan dengan pemotongan gel Native-PAGE.

Pemurnian Protein Antibacterial dengan Native-PAGE

Fraksi protein antibakteri dari cacing tanah hasil kromatografi kolom Sephadex G-100 (Filtrasi) dilewatkan pada native-PAGE, dengan metode yang sama dengan SDS-PAGE tanpa SDS, sampel tidak dipanaskan dan tidak diwarnai, hanya bagian tepi saja dipotong yang diwarnai. Setelah selesai diwarnai disejajarkan untuk acuan tempat memotong, kemudian hasil potongan gel yang ada proteinnya dikeluarkan dari gel dengan cara dimasukkan dalam kantong membran dialisis, dielektroforesis selama ± 8 jam, selanjutnya masing-masing protein yang didapat diuji aktivitasnya (Murray, 1994).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Aktivitas Ekstrak Protein dari *Pheretima javanica* yang Berpotensi Sebagai Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar nutrien. Dari sembilan macam endapan protein tiga jenis cacing tanah dan tiga macam pelarut protein yang diujikan, ekstrak protein dari *Pheretima javanica* dalam pelarut bufer 0,5 mM MOPS mempunyai zona hambatan lebih lebar dibanding yang lain, data tersaji pada Tabel 1. Dari Tabel 1 di atas tampak bahwa ekstrak protein dari *Pheretima javanica* dengan pelarut bufer MOPS mempunyai zona hambat terbesar dibanding dengan pelarut lainnya, karena bufer MOPS mempunyai daya larut protein lebih tinggi dan kemampuan

mempertahankan pH lebih stabil dibanding pelarut lain.

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak protein yang paling besar zona hambatannya adalah ekstrak protein dari *Pheretima javanica* dengan pelarut bufer MOPS. Zona hambatan untuk bakteri *S.typhi*, *S.dysenteriae*, *E.coli*, *P.aeruginosa* dan *B.subtilis* masing-masing adalah: 10; 12; 13; 11 dan 14 mm (Tabel 1 no.3). Karena ekstrak protein yang paling aktif sebagai antibakteri didapat dari ekstrak protein dari *Pheretima javanica*, maka untuk purifikasi lebih lanjut dilakukan hanya pada ekstrak protein dari *Pheretima javanica* dan menggunakan bufer MOPS sebagai pelarut.

Purifikasi Protein Antibakteri dari *Pheretima javanica* dengan Kromatografi Kolom DEAE Sephacel (Anion Exchanger)

Hasil fraksinasi protein dari *Pheretima javanica* dengan kromatografi kolom DEAE sampai dengan 114 fraksi. Hasil fraksinasi protein ditunjukkan pada Gambar 1 dengan kromatografi kolom DEAE yang digambarkan sebagai hubungan antara kandungan protein dan aktivitasnya. Pengukuran kandungan protein dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm menghasilkan tiga puncak kelompok protein, yang terdiri dari puncak I (fraksi 6-17), puncak II (fraksi 19-23) dan puncak III (fraksi 85-101). Ketiga puncak kelompok protein tersebut diuji aktivitasnya dengan metode difusi agar. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa puncak I dan puncak II tidak mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, sedang puncak ke III mempunyai aktivitas sebagai antibakteri.

Tabel 1. Uji aktivitas antibakteri ekstrak protein dari cacing tanah dengan metode difusi agar pada media nutrien.

No	Jenis ekstrak protein	φ zona hambatan (mm)				
		<i>St</i>	<i>Sd</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>Bs</i>
1.	Ekstrak <i>P. javanica</i> dlm 0,9% NaCl	8,0	9,0	8,0	7,5	10,0
2.	Ekstrak <i>P. javanica</i> dlm fosfat pH 7,2	7,0	8,0	8,0	8,0	9,0
3.	Ekstrak <i>P. javanica</i> dlm 0,5 mM MOPS	10,0	12,0	13,0	11,0	14,0
4	Kontrol pelarut ekstrak protein	-	-	-	-	-

Keterangan :

St = *Salmonella typhi*

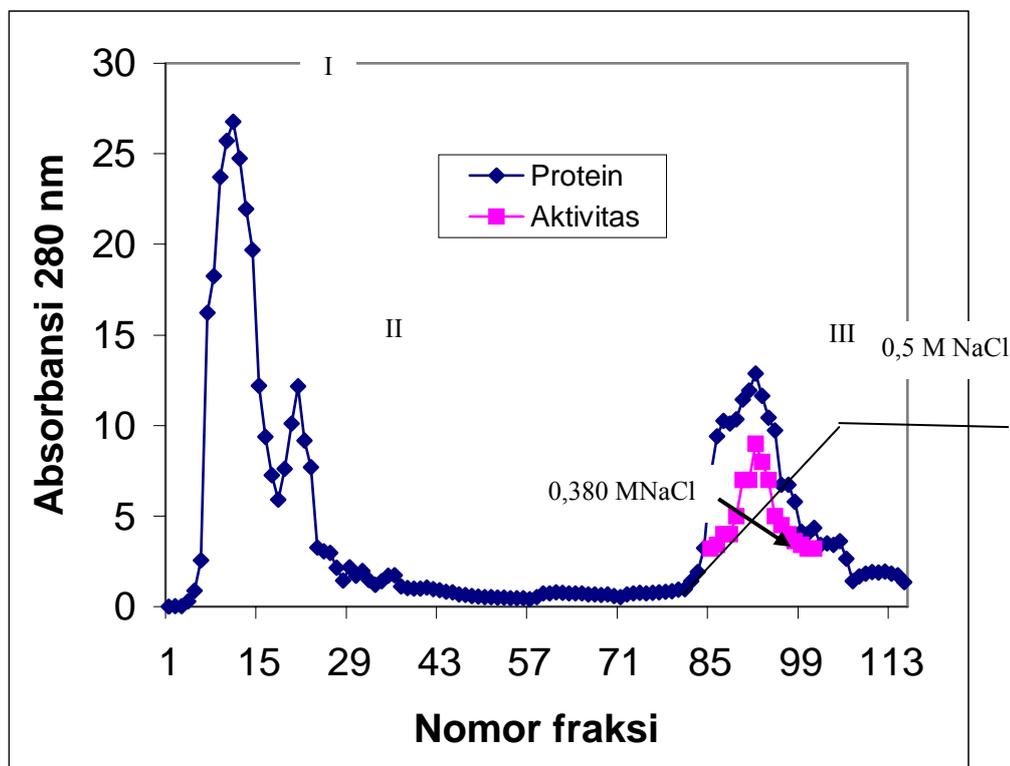
Sd = *Shigella dysenteriae*

Ec = *Escherichia coli*

Pa = *Pseudomonas aeruginosa*

Bs = *Bacillus subtilis*

- = tidak ada hambatan



Gambar 1. Hasil purifikasi protein dari *Pheretima javanica* menggunakan kromatografi kolom DEAE, kandungan protein masing-masing fraksi diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada λ 280 nm beserta aktivitasnya dengan difusi agar pada media nutrisi.

Pada grafik di atas terlihat bahwa fraksinasi protein dari *Pheretima javanica* pada kromatografi kolom DEAE menghasilkan tiga puncak kelompok protein. Namun hanya puncak kelompok protein ke III yang mempunyai aktivitas antibakteri. Elusi protein menggunakan NaCl menunjukkan bahwa kelompok protein ke III dapat terelusi dari kolom pada konsentrasi NaCl 0,380 M. Total kandungan protein pada puncak III apabila dikumpulkan dan diukur dengan metode Bradford didapat 20,640 μ g protein.

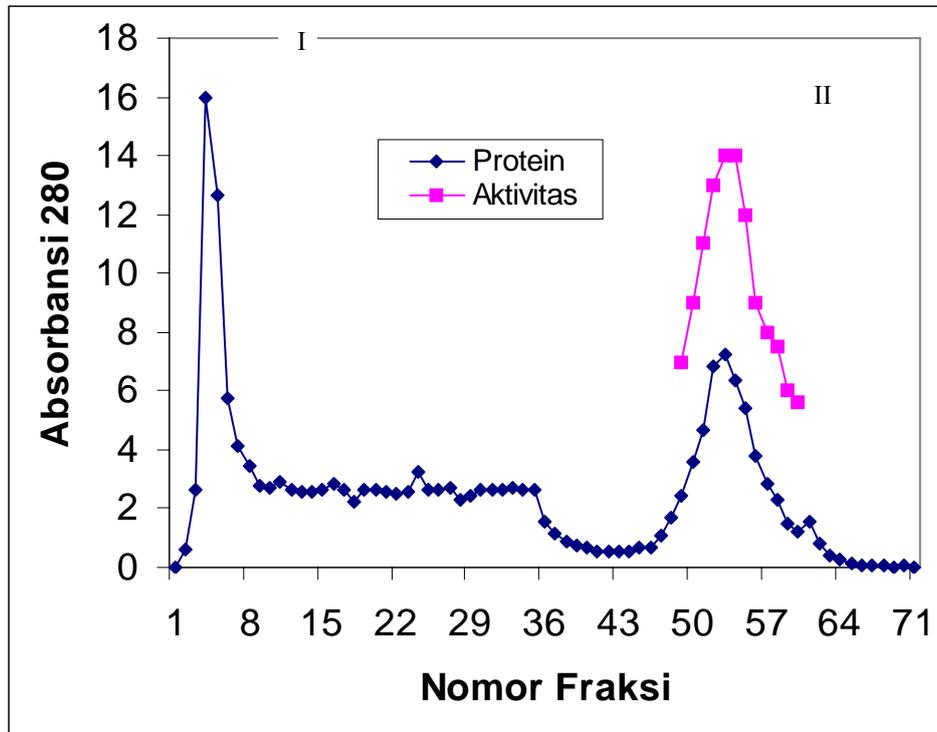
Purifikasi Protein Antibakteri dari *Pheretima javanica* dengan Kromatografi Kolom Sephadex G-100 (Filtrasi)

Fraksi aktif (puncak III) yang dihasilkan pada kolom kromatografi DEAE dikumpulkan, dilanjutkan pemisahannya dengan kromatografi kolom Sephadex G-100. Pengukuran kandungan protein fraksi kromatografi kolom gel filtrasi Sephadex G-

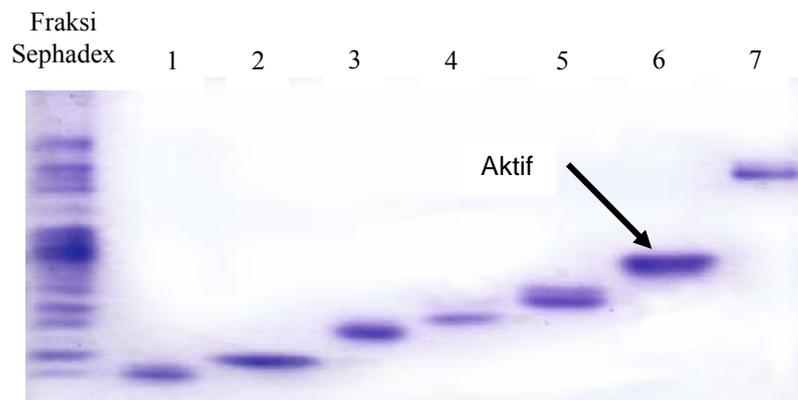
100 dengan spektrofotometer pada λ 280 nm dilakukan sampai dengan 71 fraksi, dihasilkan 2 puncak, yang kemudian diuji aktivitasnya. Puncak I (fraksi 3–8) tidak mempunyai aktivitas, sedang puncak II (fraksi 50–58) mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, data tersaji pada Gambar 2.

Pada grafik dalam Gambar 2. terlihat bahwa fraksinasi protein dari *Pheretima javanica* dengan kromatografi kolom Sephadex G-100 menghasilkan dua puncak kelompok protein, Namun hanya puncak kelompok ke II yang mempunyai aktivitas antibakteri. Hasil fraksinasi menggunakan kolom gel filtrasi ini menunjukkan bahwa kelompok protein ke II mempunyai berat molekul kecil karena terelusi pada fraksi ke 50-58, sekitar 7-55 kDa (Waluyo et al, *in preparation*) Total kandungan protein pada puncak II apabila dikumpulkan dan diukur dengan Bradford didapatkan 6,400 μ g protein. Fraksi aktif (puncak II) dikumpulkan, kemudian

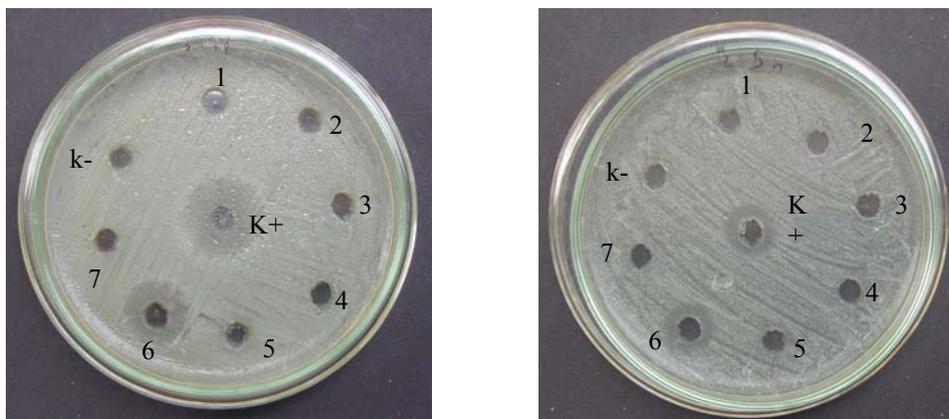
dimurnikan dengan pemotongan pita gel menggunakan Native-PAGE.



Gambar 2. Hasil fraksinasi protein dari *Pheretima javanica* menggunakan kromatografi kolom Sephadex G-100, kandungan protein masing-masing fraksi diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada λ 280 nm dan aktivitas diukur dengan difusi agar pada media nutrien.



Gambar 3. Visualisasi protein hasil pemisahan dengan Native-PAGE. Total protein hasil fraksinasi dengan sephadex G-100 (kiri) dan protein hasil pemotongan dari gel (1 s/d 7) dielektroforesis dan dicat dengan CBB



Gambar 4. Uji aktivitas protein antibakteri hasil pemisahan Native-PAGE menggunakan metode difusi agar nutrisi. Sumur: 1,2,3,4,5,6,7= no pita protein, tiap sumur 40 μ L konsentrasi 50 μ g protein. k-: bufer MOPS, k+: Kloramfenikol

Tabel 2. Kuantifikasi uji aktivitas protein antibakteri dari *Pheretima javanica* hasil pemurnian dengan Native-PAGE pada media nutrisi

No.	Macam protein	ϕ zona hambatan pada Bakteri (mm)				
		<i>St</i>	<i>Sd</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>Bs</i>
1.	Protein pita 1	-	-	-	-	-
2.	Protein pita 2	-	-	-	-	-
3.	Protein pita 3	-	-	-	-	-
4.	Protein pita 4	-	-	-	-	-
5.	Protein pita 5	-	-	-	-	-
6.	Protein pita 6	17,0	14,0	16,0	19,0	23,0
7.	Protein pita 7	-	-	-	-	-
8.	Kontrol pelarut bufer MOPS	-	-	-	-	-
9.	Kontrol antibiotik *	19,0	13,0	18,0	20,0	22,0

Keterangan :

St = *Salmonella typhi*

Pa = *Pseudomonas aeruginosa*

Sd = *Shigella dysenteriae*

Bs = *Bacillus subtilis*

Ec = *Escherichia coli*

* = Kontrol antibiotik kloramfenikol konsentrasi protein 50 μ g/mL sebanyak 40 μ L

Pemurnian Protein Antibakteri dari *Pheretima javanica* dengan Native-PAGE

Fraksi aktif hasil fraksinasi dengan sephadex G-100 dimurnikan dengan pemotongan pita gel menggunakan Native-PAGE. Pita-pita protein yang dihasilkan dipotong-potong, kemudian protein dikeluarkan dari gel menggunakan seperangkat alat elektroforesis dan membran dialisis (elektro elusi). Dari elusi protein

dengan elektroforesis didapatkan 7 macam protein murni seperti tampak pada Gambar 3.

Gambar 3 terlihat tujuh macam pita protein yang telah dimurnikan dan berbeda migrasinya (berat molekul). Masing-masing pita protein belum dapat diketahui berat molekulnya, karena tidak ada standar marker protein untuk Nativ-PAGE. Tampak bahwa hasil pemotongan menghasilkan pita tunggal (*single band*) protein. Tujuh macam protein

dari *Pheretima javanica* yang diperoleh, masing-masing diuji aktivitasnya sebagai antibakteri menggunakan metode difusi agar nutrien.

Uji Aktivitas Protein dari *Pheretima javanica* yang Berpotensi Sebagai Antibakteri

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap tujuh macam pita protein menunjukkan bahwa potongan protein nomor 6 memberikan zona hambatan (jernih), yang berarti mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Sedangkan protein lainnya tidak memberikan zona hambatan (Gambar 4).

Kuantifikasi zona hambatan secara keseluruhan terhadap aktivitas protein antibakteri dari *Pheretima javanica* dapat dilihat pada Tabel 2. Zona hambatan yang muncul pada uji difusi agar (Gambar 4) diukur dan dibandingkan dengan kontrol.

Tabel 2 menunjukkan bahwa dari hasil pemurnian protein dari *Pheretima javanica* menghasilkan 7 pita protein, setelah diuji aktivitasnya, protein pada pita 6 saja yang bersifat sebagai antibakteri pada konsentrasi 50 µg/mL. Besarnya zona hambatan protein pita 6 hampir sama dengan kontrol antibiotik kloramfenikol pada konsentrasi masing-masing 25 µg/mL.

Selanjutnya diharapkan hasil penelitian ini dapat dikembangkan sebagai bahan pembuatan obat alternatif penyakit tipus dan penyakit infeksi oleh bakteri lain, sehingga akan membuka wawasan baru dalam upaya pemanfaatan bahan alam secara optimal. Penelitian berikutnya mengenai karakterisasi protein antibakteri yang meliputi berat molekul, susunan asam amino, suhu dan pH optimum sedang diteliti.

KESIMPULAN

Pheretima javanica dalam pelarut MOPS lebih berpotensi dibanding dengan pelarut NaCl dan bufer fosfat. Hasil purifikasi protein dari *Pheretima javanica* dengan kromatografi kolom DEAE didapatkan 114 fraksi dan diperoleh 3 puncak, puncak I dan puncak II tidak mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, sedang puncak ke III mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Purifikasi protein dari *Pheretima javanica* dengan kromatografi kolom Sephadex G-100 dihasilkan dua puncak kelompok protein, namun hanya puncak II yang mempunyai aktivitas antibakteri.

Pemurnian protein *Pheretima javanica* dengan Native-PAGE menghasilkan tujuh pita protein, pita protein ke 6 yang aktif sebagai antibakteri.

Ucapan terimakasih

Penelitian ini dilakukan di Pusat Penelitian Biologi Molekul Universitas Jember.

DAFTAR PUSTAKA

- Affandi, 1996. *Pengaruh penggunaan media sampah rumah tangga dengan berbagai tingkat umur pengomposan dan waktu pemeliharaan terhadap biota cacing tanah jenis Lumbricus rubellus*. Tesis yang tidak dipublikasikan, Jurusan Biologi, FMIPA, UNPAD, Bandung, pp14-17.
- Edwards C.A. dan Lofty J.R., 1972. *Biology of earthworms* Chapman and Hall LTD. London, pp 158-162.
- Hancock R.R.W, Lehrer R, 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics, *Trends Biotechnol.* **16**: 82-87.
- Ju Hyun Cho, Chan Bae Park, Young Geol Yoon, Sun Chang Kim. 1998. Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*. South Corea.
- Karsten GR dan Drake HL, 2002. Isolation and characterization enzim of the earthworm *Lumbricus terrestris*. **Pubmed** 76: 146-54.
- Michael R. Yeaman and Nannette Y. Yount, 2003. *Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance*.
- Muliasari I, 1996. *Kontaminasi bakteri Gram negatif pada makanan yang dijual di sekitar kampus pusat Unpad serta uji sensitifitasnya terhadap obat tradisional cacing tanah secara in vitro*. Penelitian yang tidak dipublikasikan, FMIPA, Unpad, Bandung, pp 43-47.
- Murray P. Deutscher, 1994. *Guide to protein purification*. New York.
- Poeloengan M, Sudarno dan Praptiwi, 2001. *Pengujian ekstrak Pheretima sp terhadap pertumbuhan Salmonella sp* Penelitian yang tidak dipublikasikan.
- Ratningsih N. dan Rustama M, 1998. *Peranan berbagai jenis cacing tanah terhadap*

- daya hambat pertumbuhan bakteri Gram positif penyebab diare. F.MIPA Universitas Pajajaran, Bandung.
- Simanjuntak A.K. dan Waluyo J. 1982. *Cacing tanah budidaya dan pemanfaatannya*. P.T. Penebar Swadaya.
- Stryer L, 2000. *Biochemistry*, Stanford University.
- Tim Penulis PS, 1992. *Cacing Tanah. Aneka cara budidaya, penanganan lepas panen, peluang campuran rangsum ternak dan ikan*. Jakarta.
- Waluyo J, 1994. *Distribusi dan kepadatan cacing tanah di daerah Jember*, Penelitian yang tidak dipublikasikan, Jember.
- Waluyo J, 1995. *Analisis cacing tanah dalam rangka menunjang peningkatan tentang gizi dan produksi pertanian masyarakat*, Penelitian yang tidak dipublikasikan, Jember.
- Waluyo J, 2003. Uji potensi berbagai macam pelarut ekstrak dan berbagai spesies cacing tanah terhadap pertumbuhan berbagai macam bakteri. *J. Saintika*. **4(3)**: 218-226.