

MULTIPLIKASI TUNAS KULTUR UBI KAYU DENGAN TEKNIK SAMBUNG PUCUK (*GRAFTING*) *IN VITRO*

Nurhamidar Rahman*, Hani Fitriani, N. Sri Hartati dan Enny Soedarmonowati

Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI
Jalan raya Bogor KM.46 Kode Pos 16911
Telpon: 0218754587, Fax: 0218754588
*E-mail: nurhamidarr@yahoo.com

Diterima: 13/10/2017

Direvisi: 22/12/2017

Disetujui: 31/12/2017

ABSTRAK

Mikrografting *in vitro* adalah salah satu teknik perbanyak vegetatif yang dilakukan secara aseptik dengan teknik kultur sebelum menggabungkan keunggulan batang bawah dan daun tanaman. Perbanyak ubi kayu secara konvensional, sebagai salah satu makanan pokok penting di dunia, memiliki keterbatasan karena ketergantungannya terhadap waktu dan musim. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan metode yang tepat dan efektif untuk mikrografting singkong *in vitro*. Dua genotipe singkong yaitu varietas Adira 4 dan genotipe Gebang digunakan sebagai sumber batang bawah dan daun dengan melakukan sayatan V secara aseptik. Eksplan dikultur pada media Murashige Skoog (MS0) tanpa zat pengatur tumbuh dalam dua bentuk media yang berbeda yaitu medium cair dan medium padat. Setiap media perlakuan terdiri dari satu tanaman sambung pucuk *in vitro* dengan dua ulangan pada masing-masing kombinasi. Parameter pertumbuhan termasuk tingkat kelangsungan hidup tunas sambung pucuk, jumlah daun dan tinggi tunas serta panjang akar batang bawah telah diamati secara intensif per minggu selama 11 minggu. Aklimatisasi tanaman sambung pucuk dilakukan pada medium yang terdiri dari tanah: kompos: pasir (1:1:1). Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase tunas sambung pucuk pada media MS padat dan cair diperoleh 33,3%. Kinerja pertumbuhan terbaik diperoleh pada tanaman sambung pucuk yang dikultur di media cair, yang dapat dilihat dari semua parameter yang diamati. Tanaman sambung pucuk menunjukkan 100% bertahan hidup setelah di aklimatisasi di rumah kaca. Penelitian ini menunjukkan keberhasilan kali pertama dalam teknik sambung pucuk *in vitro* dengan menggunakan berbagai bentuk media kultur, walaupun keefektifan metode ini harus ditingkatkan lebih lanjut.

Kata kunci: Medium, genotip ubikayu, teknik sambung

MICROPAGATION OF SHOOT CULTURE OF CASSAVA WITH MICROGRAFTING TECHNIQUE IN VITRO

ABSTRACT

In vitro micrografting is one of the vegetative propagation techniques performed aseptically with culture techniques before combining the benefits of rootstock and plant leaves. Conventional propagation of cassava, as one of the most important staples in the world, has its limitations due to its dependence on time and seasons. The purpose of this study was to determine the appropriate and effective method for cassava micrografting in vitro. Two cassava genotypes of Adira 4 and Gebang genotypes were used as rootstock and leaf sources by performing an aseptical V incision. Eksplan was cultured on Skoog Murashige (MS0) medium without growth regulator in two different media form ie medium medium and solid liquid. Each treatment medium consisted of

one shoot in vitro plant with two replicates in each combination. Growth parameters including shoot spawning survival rate, leaf number and shoot height and root root length were observed intensively per week for 11 weeks. The acclimatization of shoot grafting is done on a medium consisting of soil: compost: sand (1: 1: 1). The results showed that the percentage of bud shoots on MS medium solid and liquid obtained 33.3%. The best growth performance was obtained in shoots plant cultured in liquid medium, which can be seen from all parameters observed. Buddy shoot plants show 100% survival after acclimatization in greenhouses. This study demonstrates first-time success in in vitro shoot connect technique using various forms of culture media, although the effectiveness of this method should be further improved.

Keywords : Connection technique, medium, cassava genotype

PENDAHULUAN

Ubi kayu termasuk tanaman tropis yang mampu beradaptasi dan tumbuh dengan baik di lahan marginal dan di daerah sub tropis. Secara umum tanaman ini tidak menuntut iklim yang spesifik untuk pertumbuhannya (Lokko *et al.*, 2007). Di Indonesia, kebutuhan ubi kayu diperkirakan akan meningkat sebanyak 5 juta ton per tahun (Hermiati *et al.*, 2012). Karena itu, berbagai upaya untuk memenuhi kebutuhan ubi kayu nasional dilakukan diantaranya dengan teknik perbanyak stek dengan cara konvensional. Namun demikian, propagasi dengan cara konvensional membutuhkan waktu yang cukup lama, selain itu tidak dihasilkan material yang seragam dan bebas penyakit.

Teknik kultur jaringan merupakan salah satu alternatif untuk perbanyak tanaman dengan hanya mengambil bagian akar atau bagian lainnya yang khusus. Begitu pula dengan perkembangbiakannya akan lebih terkontrol dan cepat. Tumbuhan baru yang dihasilkan sama dengan induknya dan tidak menimbulkan dampak negatif pada lingkungan. Selain itu, teknik kultur jaringan dapat digunakan untuk menggabungkan dua sifat unggul tanaman yang berbeda yang dikenal dengan teknik sambung pucuk mikro *in vitro* atau mikrografting. Sambung mikro *in vitro* ini dilakukan dalam kondisi aseptik melalui teknik kultur *in vitro* yang bertujuan untuk

menggabungkan keunggulan sifat batang bawah dan batang atas. (Miguel-Sierra *et al.*, 2017). Teknik sambung mikro *in vitro* sama seperti teknik pada setek sambung normal konvensional dengan menyambung batang atas dan batang bawah sehingga berbentuk sambungan huruf V, tapi dengan ukuran yang lebih kecil dan diikat dengan aluminium foil. Mekanisme terjadinya pertautan pada sambung mikro sama dengan yang terjadi secara *in vivo* yaitu terjadinya kontak kambium antara batang atas dan batang bawah dengan tepat. Umumnya, teknik sambung mikro dilakukan antara ubi kayu karet sebagai batang atas dan batang bawahnya jenis ubi kayu lainnya.

Keuntungan dengan cara teknik sambung mikro pada tanaman ubi kayu ini adalah dapat mempersingkat waktu penyediaan bibit dan dapat diproduksi dalam jumlah yang banyak dimana tanaman yang dihasilkan lebih seragam, dan memiliki *inkompatibilitas* yang rendah serta lebih ekonomis. Menurut Estrada-Luna *et al.* (2002), teknik sambung mikro secara *in vitro* memiliki kelebihan antara lain dapat meremajakan tanaman, meregenerasi tanaman, menghasilkan tanaman yang bebas penyakit dan mempersingkat waktu dalam penyediaan bibit untuk dapat dipindah ke lapang. Teknik sambung mikro juga merupakan alternatif teknik produksi yang dapat dilakukan apabila tunas mikro sulit untuk berakar. Sambung mikro secara *in vitro* ini

telah diaplikasikan pada beberapa jenis tanaman diantaranya *Pistacia vera* L. cv. ÔSiirtÓ (Onay *et al.*, 2002), pada tanaman jeruk dan anggur bebas virus (Naz *et al.* 2007), Seperti percobaan sambung mikro pada tanaman cherry (*Prunus avium* L.) yang dilakukan oleh Amiri (2006) adalah untuk meremajakan jaringan dewasa dan perbanyak tanaman bebas penyakit.

Varietas Adira 4 dan genotip Gebang merupakan dua dari 117 koleksi unggul yang ada di Kebun Plasma Nutfah Ubi Kayu Pusat Penelitian (Puslit) Bioteknologi, LIPI. Varietas Adira-4 merupakan salah satu varietas ubi kayu unggul nasional. Hasil umbi dapat mencapai sekitar 35 ton/ha. Di Kediri Jawa Timur hasil Adira-4 berkisar antara 26 – 34 ton/ha dan di Lampung 30 - 41 ton/ha. Selain berdaya hasil dan berkadar pati tinggi, Adira-4 juga lebih genjah, tahan terhadap penyakit layu yang merupakan penyakit penting ubikayu, dan sesuai dikembangkan dalam pola tumpang sari. Sedangkan, ubi kayu genotip Gebang mempunyai kandungan amilopektin tinggi dan bermanfaat sebagai pengganti gelatin dalam pembuatan cangkang kapsul dimana umumnya gelatin diproduksi dari bahan yang kaya akan kolagen seperti tulang dan kulit yang proses pembuatannya lama dan membutuhkan biaya yang mahal. Dalam penelitian ini, Adira 4 digunakan sebagai batang atas dan Gebang sebagai batang bawah. Saat ini teknik sambung mikro *in vitro* di tanaman ubi kayu belum banyak dilakukan. Karena itu, penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan dalam rangka untuk memperoleh metode sambung mikro *in vitro* yang tepat untuk perbanyak ubi kayu.

METODE

Bahan tanaman

Eksplan yang digunakan adalah ubi kayu *in vitro* dari varietas Adira 4 sebagai batang atas dan genotip Gebang sebagai batang bawah yang telah berumur tiga

bulan di kultur dengan metode penyambungan dengan sayatan seperti huruf V.

Media Kultur untuk Sambung Mikro *in Vitro* dan Kondisi Pengkulturan

Media kultur yang digunakan adalah Murashige-Skoog tanpa zat pengatur tumbuh (MS0) yang terdiri dari dua jenis yaitu padat dan cair. Eksplan kemudian dikultur di kedua media tersebut lalu diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu 25 ± 2 °C dengan penyinaran menggunakan lampu TL.

Sambung Mikro

Penyambungan mikro *in vitro* dilakukan antara planlet Adira 4 sebagai batang atas dengan planlet Gebang sebagai batang bawah. Tipe sambung yang digunakan adalah tipe V. Bagian planlet yang digunakan untuk batang bawah dipotong sepanjang dua buku dari pangkal batang bawah, sedangkan untuk batang atas dipotong dua buku dari tajuk. Batang bawah yang dipersiapkan harus seragam yaitu memiliki diameter yang sama atau sedikit lebih besar dari batang atas. Bagian tajuk batang bawah dipangkas kemudian dibuat sayatan berbentuk huruf V dengan menggunakan pisau skalpel. Sayatan batang atas dibuat sesuai dengan ukuran sayatan batang bawah, baik bentuk maupun besarnya. Batang atas kemudian disambungkan (disisipkan) ke batang bawah yang sudah disayat menggunakan pinset. Untuk memperkokoh sambungan, eksplan diikat dengan menggunakan alumunium foil yang sudah disterilkan. Selanjutnya, kultur hasil penyambungan ditumbuhkan pada media MS (Murashige dan Skoog, 1962) padat dan cair tanpa zat pengatur tumbuh dan diinkubasi pada suhu 25 ± 2 °C dengan penyinaran menggunakan lampu TL. Pada media cair, kultur hasil sambung mikro ditanam dengan menggunakan kertas steril yang dilubangi bagian tengahnya dengan ukuran yang sesuai dengan ukuran kultur sebagai penyangga berdirinya kultur. Dalam satu

botol kultur berisi satu tunas hasil sambung mikro, pengulangannya sebanyak 2 kali. Persentase daya hidup dilakukan setiap minggu selama 11 minggu setelah penyambungan. Pengamatan terhadap batang atas dilakukan terhadap jumlah daun dan tinggi tunas, sedangkan batang bawah dilakukan pengamatan panjang akar.

Aklimatisasi

Komposisi media yang digunakan untuk aklimatisasi yaitu tanah : kompos : pasir (1 : 1 : 1). Media aklimatisasi dimasukkan ke dalam polybag setinggi 10 cm. Pada setiap polybag yang telah diisi media tanam, ditanam satu planlet dan diberi sungkup plastik transparan untuk menjaga kelembaban. Selanjutnya planlet ditempatkan di ruang terbuka, setelah 2 minggu sungkup dibuka. Percobaan ini dilakukan selama 2 bulan. Peubah yang diukur adalah persentase planlet yang dapat bertahan hidup dengan baik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Media Kultur Pada Tanaman Hasil Sambung Mikro *In Vitro*

Berdasarkan pengamatan sejak Minggu ke-1 hingga ke-11 terhadap tunas hasil penyambungan mikro *in vitro* menunjukkan tingkat keberhasilan penyambungan memiliki persentase yang sama antara media padat dan cair yaitu 33,3%. Tingginya tingkat kematian pada tanaman hasil sambung *in vitro* pada kedua media yang digunakan diduga disebabkan tidak menempelnya secara sempurna tunas pucuk dengan jaringan kambium batang bawah ubi kayu Karet. Estrada-Luna *et al.* (2002) menyatakan bahwa kematian pada penyambungan *in vitro* disebabkan karena tidak menempelnya jaringan kambium antara batang bawah dan batang atasnya, juga adanya fenol pada jaringan di tempat pertautannya yang mendorong terjadinya proses pengeringan jaringan tersebut. Senada dengan yang disampaikan oleh

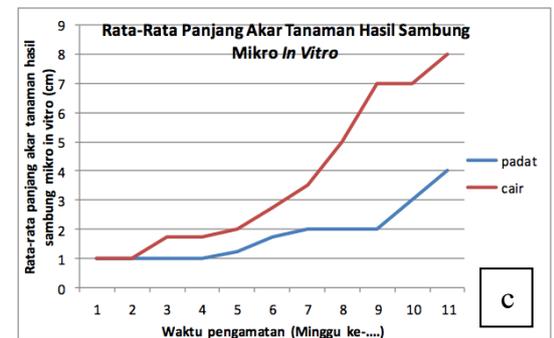
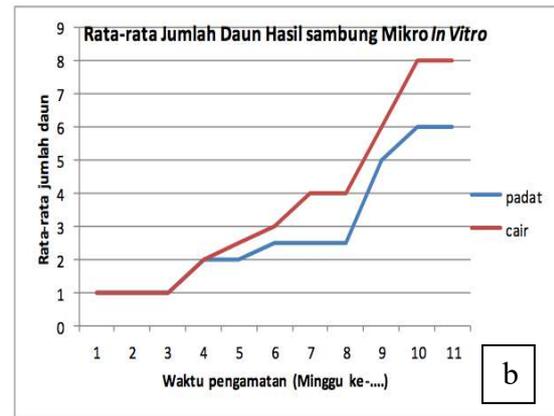
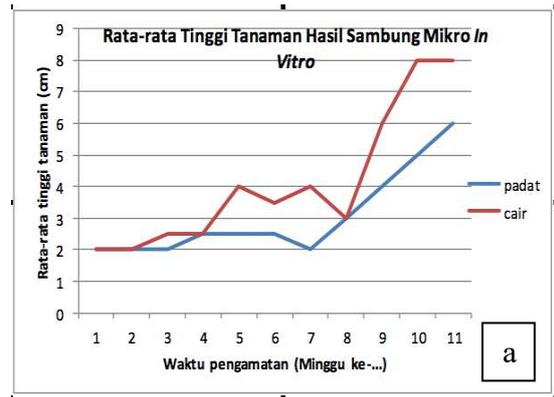
Thimmappaiah *et al.* (2002) tanaman yang tumbuh pada teknik sambung mikro terjadi apabila kedua jaringan pembuluh batang atas dan bawah tersambung dengan baik, hal ini ditandai dengan adanya pertumbuhan kalus pada luka sambungan pada minggu ke-3 serta diikuti oleh berkembangnya daun pada minggu ke-5 – ke-6. Dengan tidak bersatunya jaringan kambium maka jaringan pembuluh kedua batang tersebut tidak tersambung dan akan mendorong matinya jaringan tanaman tersebut (Yildirim *et al.*, 2010).

Penggunaan jenis media dalam sambung mikro *in vitro* menentukan keberhasilan dari tanaman yang disambung. Pertumbuhan tunas, daun dan akar pada media cair lebih cepat dibanding pada media padat untuk tanaman hasil sambung mikro yang dicobakan antara varietas Adira 4 – genotip Gebang (Gambar 1). Hasil ini sama dengan penelitian pada tanaman sayuran bunga kol yang dilakukan oleh Suthar *et al.* (2011) dimana pertumbuhan tanaman tersebut jauh lebih cepat di media cair dibanding pada media padat. Selain itu, tanaman bunga kol yang ditanam di media cair jauh lebih segar dan sehat daripada di media padat. Hal ini karena media cair mempunyai kelebihan dalam proses transfer nutrisi dari media ke jaringan tumbuhan yang lebih baik dibandingkan dengan media padat (Vyas *et al.*, 2008). Sependapat dengan Wawrosch *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa media kultur MS cair dapat mengurangi hidrasi pada kultur *in vitro* dan menghasilkan tunas dalam jumlah banyak. Seperti pada tanaman kultur *Boswellia serrata*, media cair merupakan media yang sesuai untuk menginduksi pembentukan tunas (Suthar dan Purohit, 2011).



Gambar 1. Perbedaan pertumbuhan tanaman hasil sambung mikro *in vitro* umur 8 MST pada media tanam padat (A) dan cair (B)

Tinggi tanaman merupakan peubah yang sering diamati baik sebagai indikator pertumbuhan maupun untuk mengukur pengaruh lingkungan atau perlakuan yang diterapkan. Hal ini didasarkan karena tinggi tanaman merupakan ukuran pertumbuhan yang paling mudah dilihat. Berdasarkan pengamatan terhadap tinggi tanaman, terlihat bahwa pada media cair, tanaman lebih tinggi dibandingkan pada media padat terutama memasuki minggu ke-8 hingga ke-11 (Gambar 2a). Kecepatan pertumbuhan panjang tunas terlihat saat usia sambung mikro ubi kayu umur 2 minggu setelah tanam. Menurut Vyas *et al.* (2008), kultur cair pada umumnya menghasilkan laju pertumbuhan yang lebih efisien karena semakin banyak permukaan eksplan yang kontak dengan media cair.



Gambar 2. Perbedaan pertumbuhan rata-rata (a) tinggi, (b) jumlah daun dan (c) panjang akar tanaman hasil sambung mikro *in vitro* pada media tanam yang berbeda (padat dan cair).

Pada peubah jumlah daun dan panjang akar hasil sambung mikro *in vitro*, terdapat peningkatan pada kedua peubah tersebut. Peningkatan ini mulai terjadi di minggu ke-4 hingga akhir pengamatan (Gambar 2b-c). Begitu pula untuk jumlah daun dari tanaman hasil sambung mikro *in vitro* lebih banyak dihasilkan saat ditanam di media cair (Gambar 3). Sama seperti hasil penelitian yang telah dilakukan oleh

Hussien *et al.* (2014) untuk kultur tanaman jahe, pertumbuhan di media cair dapat memberi lebih banyak tunas dan daun per planletnya. Pada beberapa hasil penelitian lainnya juga telah dilaporkan bahwa media cair dapat meningkatkan pertumbuhan tunas dan akar di banyak spesies tanaman (Preece, 2011; Sandal *et al.*, 2001).



Gambar 3. Pertumbuhan pada akar dari tanaman hasil penyambungan secara *in vitro* pada media padat (A) dan media cair (B) pada umur 11 MST

Aklimatisasi Tanaman Ubi Kayu Hasil Penyambungan

Setelah planlet tersambung sempurna yang ditandai dengan pertumbuhan tinggi, daun dan akar, maka planlet kemudian diaklimatisasi. Aklimatisasi merupakan tahap yang paling kritis karena perubahan lingkungan dari laboratorium ke lapangan seringkali menyebabkan kematian planlet. Planlet yang dihasilkan melalui teknik kultur jaringan telah dikondisikan dalam lingkungan yang kaya nutrisi, suhu, kelembaban tinggi, serta bebas dari gangguan hama dan penyakit sehingga planlet memiliki daun yang relatif tipis, lapisan kutikulanya dan akar yang tidak terlalu banyak jumlahnya. Dengan demikian planlet memerlukan perubahan-perubahan secara bertahap melalui proses adaptasi ketika dipindahkan ke lingkungan normal (*ex vitro*) (Seelye *et al.*, 2003).

Aklimatisasi planlet hasil penyambungan 100% dapat bertahan hidup (Gambar 4). Luka akibat penyambungan

akan hilang setelah terjadinya pertautan antara jaringan kambium batang bawah dan atas dengan sempurna Menurut Miguelez-Sierra *et al.* (2017) dalam proses penyembuhan jaringan yang terluka, masing-masing sel pada planlet batang bawah dan batang atas saling kontak, menyatu dan membaaur, sel-sel parenkim yang terbentuk dan terdeferensiasi membentuk kambium sebagai lanjutan dari lapisan kambium batang bawah dan batang atas yang lama. Dari lapisan kambium akan terbentuk jaringan pembuluh sehingga proses translokasi hara dari batang bawah ke batang atas atau sebaliknya hasil fotosintesis dari batang atas ke batang bawah berlangsung sebagaimana mestinya.



Gambar 4. Aklimatisasi planlet hasil penyambungan *in vitro*

KESIMPULAN

Iniasiasi teknik sambung mikro *in vitro* ubi kayu antara Adira 4 dan Gebang menunjukkan kemampuan bertahan yang baik di media MS cair dan padat. Pertumbuhan tanaman meliputi tinggi tunas, jumlah daun dan jumlah akar pada ubi kayu hasil sambung mikro *in vitro* lebih cepat saat ditanam di media kultur cair. Aklimatisasi di media yang terdiri dari tanah, kompos dan pasir (1:1:1) menunjukkan pertumbuhan planlet dan daya hidup yang tinggi. Meskipun, perkembangan dan pertumbuhan lebih lanjut di lapang masih perlu diobservasi lebih lanjut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Projek ini merupakan bagian dari kegiatan DIPA Pusat Penelitian Biologi tahun anggaran 2011-2014. Ucapan terima kasih ditujukan kepada yang Bapak Nawawi dalam penyiapan material di lapang.

DAFTAR PUSTAKA

- Amiri, M.E. 2006. *In vitro techniques to study the shoot-tip grafting of Prunus avium L. (cherry) var. Seeyahe Mashad*. International Journal of Food. Agriculture and Environment, Vol. 4. (1): 151 – 154.
- Estrada-Luna, A.A., C. Lopez-Peralta dan E. Cardenas-Soriano. 2002. *In Vitro Micrografting and Histology of Graft Union Formation of Selected Species of Prickly Pear Cactus (Opuntia spp.)*. Scientia Horticulturae, Vol. 92 (3 – 4): 317 – 327.
- Hermiati E, D. Mangunwidjaja, T.C. Sunarti, O. Suparno dan B. Prasetya. 2012. *Potential Utilization of Cassava Pulp for Ethanol Production in Indonesia*. Scientific Research and Essays, Vol. 7 (2): 100 – 106.
- Hussien, F.A., Osman, M.A., and Idris, T.I.M. 2014. *The Influence of Liquid Media Support, Gelling Agents and Liquid Overlays on Performance of In Vitro Cultures of Ginger (Zingiber officinale)*. International Journal of Scientific and Research Publications, Volume 4, Issue 10, October 2014. ISSN 2250-3153.
- Lokko Y, J.V. Anderson, S. Rudd, A. Raji, A. Horvath, M.A. Mikel, R. Kim, L. Liu, A. Hernandez, A.G.O. Dixon dan I.L. Ingelbrecht. 2007. *Characterization of an 18,166 EST Dataset for Cassava (Manihot esculenta Crantz) Enriched for Drought-responsive Genes*. Plant Cell Reports, Vol. 26 (9): 1605 – 1618.
- Migueluez-Sierra, Y., A. Hernández-Rodríguez, Y. Acebo-Guerrero, M. Baucher dan M. El Jaziri. 2017. *In Vitro Micrografting of Apical and Axillary Buds of Cacao*. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, Vol. 92(1): 25 – 30.
- Murashige, T., and Skoog, F. 1962. *A Rivesed Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures*. Physiologia plantarum 15.
- Naz, A.A., M.J. Jaskani, H. Abbas dan M. Qasim. 2007. *In Vitro Studies on Micrografting Technique in Two Produce Cirus Free Plant*. Pak. J. Bot, Vol. 39 (5): 1773 – 1778.
- Onay, A., V. Pirinc, F. Adiyaman, C. Isikalan, E. Tilkat dan D. Basaran. 2003. *In Vivo and In Vitro Micrografting of Pistachio, Pistacia vera L.cv."Siirt"*. Turk J. Biol., Vol. 27: 95 – 100.
- Preece, J.E. 2011. *Micropropagation in Stationary Liquid Media*. Propagation of Ornamental Plants, Vol. 10(4): 183 – 187.
- Sandal, I., Bhattacharya, A., Ahuja, P.S. 2001. *An Efficient Liquid Culture System for Tea Shoots Proliferation*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Vol. 65 (1): p. 75 - 80.
- Seelye, J. F., Burge, G. K., & Morgan, E. R. (2003). *Acclimatizing Tissue Culture Plants: Reducing the Shock© the Shock*. In Combined Proceedings International Plant Propagators' Society Vol. 53: 85 – 90.
- Suthar, R. K., N. Habibi dan S.D. Purohit. 2011. *Influence of agar concentration and liquid medium on in vitro propagation of Boswellia serrata Roxb*. Indian Journal of Biotechnology, Vol. 10: 224 – 227.
- Thimmappaiah, G.T. Puthra dan S.R. Anil. 2002. *In Vitro Grafting of Cashew (Anacardium occidentale L.)*. Scientia Horticulturae, Vol. 92 (2): 177 – 182.
- Vyas, S., M.S. Rao, R.K. Suthar, S.D. Purohit. 2008. *Liquid Culture System Stimulates in Vitro Growth and Shoot Multiplication in Four Medicinally Important Plants*. Medicinal and

- Aromatic Plant Science and Biotechnology, Vol. 2 (2): 96 – 100.
- Wawrosch, C.H., Kongbangkerd, A., Kopf, A., And Kopp, B. 2005. *Shoot regeneration from nodules of Charybdis sp. A comparison of semisolid, liquid and temporary immersion culture systems*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 81 (3): 319 – 322.
- Yildirim, H., A. Onay, V. Süzerer, E. Tilkat, Y. Ozden-Tokatli dan H. Akdemir. 2010. *Micrografting of almond (Prunus dulcis Mill.) cultivars "Ferragnes" and "Ferraduel"*. Scientia Horticulturae, Vol. 125 (3): 361 – 367.