
PROFIL OSMOTIK GELONDONGAN IKAN BANDENG (*Chanos chanos* Forsskal) SELAMA PROSES KULTIVASI DI TAMBAK BANDENG DESA WONOREJO KABUPATEN KENDAL

OSMOTIC PROFILE OF MILKFISH (*Chanos chanos* Forsskal) FINGERLING DURING THE CULTIVATION PROCESS AT BRACKISHWATER POND OF MILKFISH AT WONOREJO VILLAGE DISTRICTS OF KENDAL

Anita Karolina^{1*}, Sutrisno Anggoro², Supriharyono³

¹Program Studi Manajemen Sumber Daya Perairan Fakultas Perikanan Universitas Islam Ogan Komering Ilir, Kayuagung

^{2,3} Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro, Semarang

*Korespondensi : akarolina.msdp@gmail.com

Abstract

Milkfish is euryhaline fish that can live in wide range salinity, so it will affect with osmoregulation processes. This research aimed to examine the osmotic response of milkfish fingerling during cultivation processes in brackishwater ponds at Wonorejo Village district of Kendal. The research was conducted on July-October 2016. The cultivation process of milkfish fingerling has been cultured for 60 days in 2000 m² brackishwater pond. The initial density of milkfish larvae was 100 individuals/m² with a lenght size of 10 mm on average and 15 days old. Samples of milkfish fingerling were taken on the 20th, 40th and 60th days, the number of samples was 3 individuals every size. The measurement result of blood osmolarity was 460, 05 to 490,10 mOsm / l H₂O higher than media osmolarity 38,98 – 194,5 mOsm/l H₂O. The osmotic response of milkfish fingerling were hyperosmotic to the hypotonic environment and osmoregulator fish.

Keywords : Hyperosmotic, Milkfish fingerling, Osmotic response, Osmoregulator

I. Pendahuluan

Ikan bandeng merupakan jenis ikan yang bersifat euryhaline (Swanson, 1998). ikan euryhaline dapat hidup pada toleransi salinitas dengan rentang yang luas Kemampuannya hidup pada toleransi salinitas dengan rentang yang luas tersebut tentunya akan berpengaruh terhadap beberapa proses fisiologis di dalam tubuh ikan, salah satunya adalah proses osmoregulasi (Kim *et al.*, 1998).

Pengaturan osmoregulasi penting untuk ikan bertahan pada berbagai habitat. Kelangsungan hidup organisme dipengaruhi oleh keseimbangan antara kandungan ion cairan tubuh dengan kandungan ion dari lingkungannya. Apabila gradien osmotik antara cairan tubuh dengan media lingkungannya terlalu tinggi, maka akan menyebabkan proses fisiologis terganggu, stress bahkan dapat menyebabkan kematian (*mortalitas*) (Porchase *et al.* 2009). Proses osmoregulasi membutuhkan energi yang besar sesuai dengan tingkat beban osmotiknya. Semakin besar perbedaan osmotik akan semakin besar energi yang digunakan untuk proses osmoregulasinya dan pada akhirnya akan mempengaruhi sintasan dan pertumbuhannya (Carrión *et al.* 2005).

Salinitas merupakan salah satu faktor lingkungan yang memiliki peranan penting bagi respon fisiologis dan pertumbuhan ikan. Proses metabolisme tidak optimal akibat perbedaan gradien osmotik yang terlalu besar, hal ini akan menyebabkan ikan tidak memiliki kelebihan energi yang dapat digunakan untuk pertumbuhan. Menurut Anggoro *et al.*, (2013) pertumbuhan yang optimum pada ikan akan dicapai pada kondisi salinitas isoosmotik, hal tersebut terjadi karena pada kondisi tersebut ikan tidak memerlukan energi yang besar untuk proses osmoregulasi sehingga energi yang digunakan untuk pertumbuhan lebih banyak. Menurut hasil penelitian Jana *et al.*, (2006), pertumbuhan gelondongan bandeng meningkat pada kondisi isoosmotik yaitu dengan adanya peningkatan kadar salinitas. Hal ini diperkuat dengan laporan Barman *et al.*, (2012), bahwa kelulusan hidup dan pertumbuhan ikan bandeng meningkat pada salinitas 25 ‰ dibandingkan pada salinitas 10‰. Oleh karena itu penting untuk mengetahui respon osmotik gelondongan bandeng selama kultivasi dengan adanya perbedaan salinitas air tambak.

II. Metode Penelitian

Bahan dan Alat

Bahan penelitian meliputi sampel air tambak dan gelondongan bandeng. Alat yang digunakan dalam penelitian seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Alat yang digunakan dalam Penelitian

No	Nama Alat	Kegunaan
1	Jaring Ikan ukuran 1-2,5 inchi	Mengambil sampel gelondongan ikan bandeng
2	<i>Automatic Microosmometer Roebling Type 13/13 DR Autocal</i>	Mengukur osmolaritas air dan darah ikan
3	Penggaris ketelitian 1 mm	Mengukur panjang ikan
4	Alat Bedah	Membedah ikan
5	<i>Cool box</i>	Menyimpan sampel ikan
6	Botol Poli etilen	Menyimpan sampel air

Metode Penelitian

Pengambilan Sampel Ikan

Pengambilan sampel ikan selama penelitian dilakukan sebanyak tiga kali, yaitu pada umur kultivasi 20 hari, 40 hari dan 60 hari. Ikan yang menjadi sampel diambil sesuai dengan ukuran ikan yang mewakili setiap populasi pada setiap umur kultivasi. Setiap ukuran diambil 3 ekor untuk pengukuran osmolaritas darah. Sampel air diambil untuk pengukuran osmolaritas media (air tambak).

Pengukuran Tingkat Kerja Osmotik

Pengukuran tingkat kerja osmotik ikan bandeng dengan mengukur osmolaritas darah dan air media dengan menggunakan *Automatic Osmometer Roebling Type 13/13 DR Autocal*. Pengukuran osmolaritas darah dilakukan dengan cara mengambil darah ikan bandeng sebanyak 0,01 ml. Gelondongan ikan bandeng dianestasi, selanjutnya sampel darah diambil pada bagian dorsoventral. Darah

gelondongan bandeng di masukkan ke obyek gelas yang telah diberi EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 10% untuk mencegah penggumpalan. Kemudian darah diambil menggunakan *syringe/spuit* ukuran 0,5 ml dan dimasukkan ke dalam *microtube* ukuran 0,5 ml Lalu ditambahkan reagen. Setelah itu *microtube* diletakkan di *termistor* lalu ditekan. Osmometer akan menampilkan angka pengukuran yang naik turun. Data hasil pengujian ditandai dengan angka yang tidak berubah pada osmometer.

Analisis Data

Tingkat Kerja Osmotik

Perhitungan tingkat kerja osmotik menggunakan rumus berikut (Anggoro and Nakamura, 2006) :

$$\text{TKO} = [\text{osmolaritas darah} - \text{osmolaritas media}]$$

Keterangan : :

TKO : tingkat kerja osmotik, mOSM/l H₂O

osmolaritas darah : tekanan osmotik darah, mOSM/l H₂O

osmolaritas media : tekanan osmotik media pemeliharaan, mOSM/l H₂O

Analisis Regresi

Analisis korelasi digunakan untuk mencari arah dan kuatnya hubungan antara dua variabel atau lebih, sedangkan analisis regresi digunakan untuk memprediksi seberapa jauh perubahan nilai variabel dependen bila nilai variabel independen berubah (Sugiyono, 2013). Kedua variabel tersebut adalah salinitas air tambak (variabel independen) dan tingkat kerja osmotik gelondongan bandeng (variabel dependen). Hubungan kedua variabel tersebut dalam persamaan regresi :

$$Y = a + bx$$

Koefisien determinasi (r^2) digunakan untuk melihat besarnya pengaruh variabel salinitas air tambak terhadap tingkat osmotik gelondongan bandeng.

Analisis Kovarians

Ankova merupakan kombinasi metode anova dengan regresi. Pada analisis regresi, analisis menentukan apakah ada perlakuan menunjukkan perbedaan respon dengan perubahan variabel dependen, jika ada hubungan, kovarians menghilangkan pengaruh faktor luar dengan mengatur pengaruhnya pada variabel dependen (Bhujel, 2008).

Analisis kovarians digunakan untuk menganalisis perbedaan respon osmotik dan faktor kondisi gelondongan bandeng selama kultivasi. Pada analisis perbedaan respon osmotik, variabel independen adalah umur kultiasi, osmolaritas darah, dan osmolaritas media; sedangkan variabel dependen adalah tingkat kerja osmotik.

Model ANCOVA dengan satu covariate

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta x_{ij} + \varepsilon_{ij}, \quad i = 1, 2, \dots, a \\ j = 1, 2, \dots, n_i$$

Keterangan :

- y_{ij} : nilai peubah respon pada perlakuan ke-i observasi ke-j
x_{ij} : nilai covariate pada observasi yang bersesuaian dengan y_{ij}
τ_i : pengaruh perlakuan ke-i
β : koefisien regresi linier

Pengujian untuk mengetahui pengaruh perbedaan perlakuan terhadap peubah respon, dengan menghilangkan pengaruh covariate.

III. Hasil dan Pembahasan

Osmolaritas Media, Osmolaritas Darah dan Salinitas Tambak

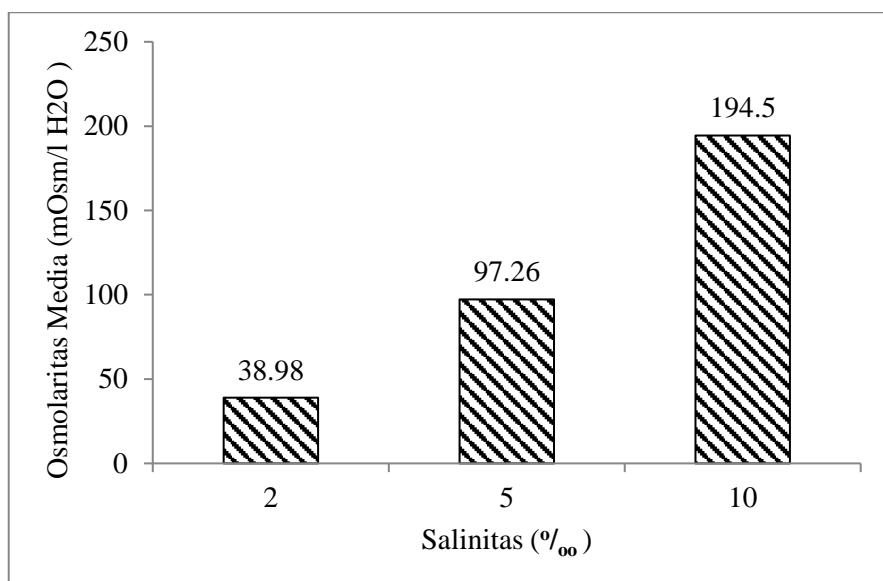
Proses kultivasi gelondongan bandeng di tambak tradisional berlangsung selama 60 hari. Salinitas air tambak pada 20 hari pertama proses kultivasi adalah 5 ‰. Gelondongan bandeng mengalami pertambahan ukuran dari ukuran awal setelah 20 hari kultivasi. Sehingga gelondongan bandeng dipindah ke petak tambak lain untuk mengurangi kepadatan. Salinitas pada periode ini adalah 2 ‰. Setelah 40 hari gelondongan bandeng juga dipindah ke petak tambak lain. Salinitas pada periode ini adalah 10 ‰.

Hasil pengukuran komponen elektrolit terlarut dari media kultivasi bandeng disajikan pada Tabel 2. Komponen elektrolit utama media (air tambak) adalah Cl⁻, Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ dan K⁺. Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan konsentrasi komponen elektrolit dari salinitas 2 ‰, 5 ‰ dan 10 ‰,. Menurut Pamungkas (2012) konsentrasi komponen elektrolit akan semakin besar dengan semakin meningkatnya salinitas.

Nilai osmolaritas media (air tambak) selama kultivasi terendah pada salinitas 2 ‰ yaitu 38,98 mOsm/l dan tertinggi pada salinitas 10 ‰ yaitu 194,5 mOsm/l H₂O (Gambar 1). Nilai osmolaritas media (air tambak) semakin besar dengan semakin meningkatnya salinitas. Menurut Kultz (2015) salinitas mewakili ukuran kandungan garam terlarut (terionisasi) yang mempengaruhi sifat termodinamika air, termasuk tekanan osmotik air. Boeuf dan Payan (2001) menambahkan ion Na⁺ dan Cl⁻ dominan dalam menentukan tekanan osmotik (osmolaritas) air laut dengan porsi 3,061% dan 55,04% dari total konsentrasi ion-ion terlarut.

Tabel 2. Data hasil pengukuran komponen elektrolit utama media penelitian

Komponen elektrolit (g/kg)	Salinitas (‰)		
	2	5	10
Cl ⁻	0,8	2	4
Na ⁺	0,57	1,43	2,86
Mg ²⁺	0,17	0,43	0,86
Ca ²⁺	0,17	0,43	0,86
K ⁺	0,11	0,29	0,57



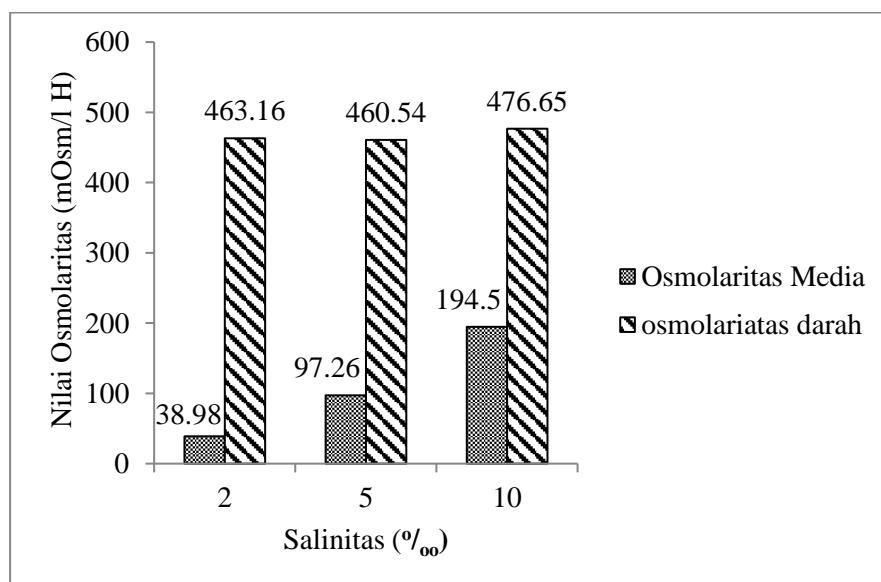
Gambar 1. Grafik osmolaritas media (air tambak).

Tabel 3. Data Rerata Hasil Pengukuran Osmolaritas Darah (mOsm/l H₂O) Gelondongan Bandeng selama Proses Kultivasi

Hari Ke-	Salinitas (%oo)	Panjang Ikan	Osmolaritas Darah (mOsm/l H ₂ O)	Rerata	SD	SE	CV
20	5	2	460,08	460,54	0,62	0,03	0,00
		3	460,30				
		4	461,25				
40	2	4	461,29	463,16	1,79	0,08	0,00
		5	462,00				
		6	464,33				
		7	465,00				
60	10	7	465,05	476,65	10,57	0,48	0,02
		8	469,98				
		9	472,90				
		10	485,26				
		11	490,08				

Nilai rerata osmolaritas darah gelondongan ikan bandeng selama kultivasi sebesar 461,25 - 490,08 mOSM/l H₂O (Tabel 3), sedangkan osmolaritas media (air tambak) sebesar 38,98-194,5 mOsm/l H₂O (Gambar 2). Osmolaritas darah gelondongan ikan bandeng pada salinitas 2 %oo , 5 %oo dan 10 %oo bersifat hiperosmoregulasi artinya pengaturan secara aktif konsentrasi cairan tubuh yang lebih tinggi dari konsentrasi media. Hal ini merupakan respon osmotik dari gelondongan bandeng akibat adanya perbedaan tekanan osmotik lingkungan dengan tekanan osmotik tubuhnya. Menurut Fujaya (2004) organisme akuatik

harus melakukan mekanisme osmoregulasi di dalam tubuhnya sebagai upaya menyeimbangkan tekanan osmotik tubuh dengan tekanan osmotik lingkungan di luar tubuh. Menurut Lantu (2010) bagi ikan yang bersifat hiperosmotik, air bergerak ke dalam dan ion-ion keluar ke lingkungan perairan melalui cara difusi. Pada media air tambak yang hipotonik, maka gelondongan ikan bandeng harus melakukan kerja hiperosmoregulasi untuk mempertahankan homeostatisnya. Kemampuan gelondongan ikan bandeng dalam mengatur osmolaritas (kandungan garam dan air) pada cairan internalnya menunjukkan gelondongan ikan bandeng bersifat osmoregulator. Sifat osmoregulator ini menyebabkan ikan bandeng ditemukan secara luas di perairan tropik dan subtropik Indo-Pasifik (Bagarinao, 1991). Hal ini juga menunjukkan bandeng memiliki toleransi yang luas terhadap salinitas sehingga dapat dibudidayakan di air tawar sampai salinitas tinggi (air laut) (Su *et al.*, 2002)



Gambar 2. Grafik perbandingan rerata osmolaritas media (air tambak) dan osmolaritas darah gelondongan bandeng.

Berdasarkan hasil analisis kovarians menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan nyata pada osmolaritas darah gelondongan bandeng selama kultivasi yang disebabkan perbedaan osmolaritas media ($\text{sig} > 0.05$). Hal ini berarti gelondongan ikan bandeng mampu mempertahankan osmolaritas darah dalam tubuhnya meski terdapat perubahan salinitas pada lingkungannya. Mekanisme mempertahankan osmolaritas darah juvenil bandeng juga telah dilaporkan oleh Tang (2010) dalam penelitiannya bahwa osmolaritas plasma darah juvenile ikan bandeng yang diaklimasi pada air tawar, air laut (35 ‰) dan air hipersalin (60 ‰) selama dua minggu tidak berbeda nyata. Demikian halnya Lin (2003) yang mengadaptasikan juvenil ikan bandeng pada air tawar (0 ‰), air payau (10 - 20 ‰), dan air laut (35 ‰) menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata pada osmolaritas darah.

Salinitas dan Tingkat Kerja Osmotik

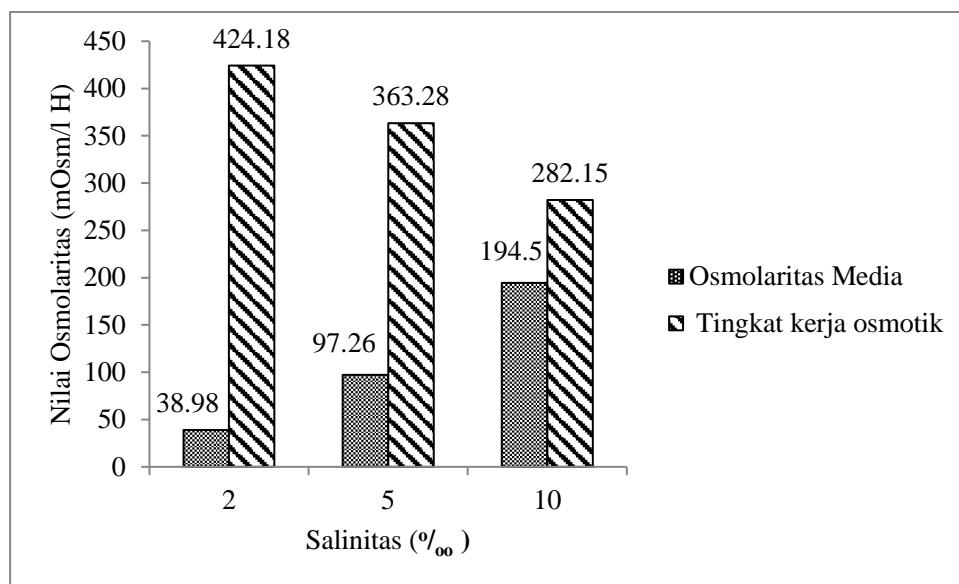
Respon osmotik gelondongan bandeng selama kultivasi diukur berdasarkan nilai osmolaritas darah gelondongan bandeng dan osmolaritas media (air tambak). Hasil pengukuran tingkat kerja osmotik disajikan pada tabel 4.

Tabel 4. Data Rerata Hasil Pengukuran Tingkat Kerja Osmotik (mOsm/l H₂O) Gelondongan Bandeng selama Proses Kultivasi.

Hari	Salinitas	Panjang	TKO	Rerata	SD	SE	CV
Ke-	(% _{oo})	Ikan	(mOsm/ 1 H ₂ O)				
20	5	2	362,82				
		3	363,04	363,28	0,62	0,03	0,00
		4	363,99				
40	2	4	422,32				
		5	423,03	424,18	1,79	0,09	0,00
		6	425,36				
		7	426,03				
60	10	7	270,55				
		8	275,48				
		9	278,40	282,15	10,57	0,62	0,04
		10	290,76				
		11	295,58				

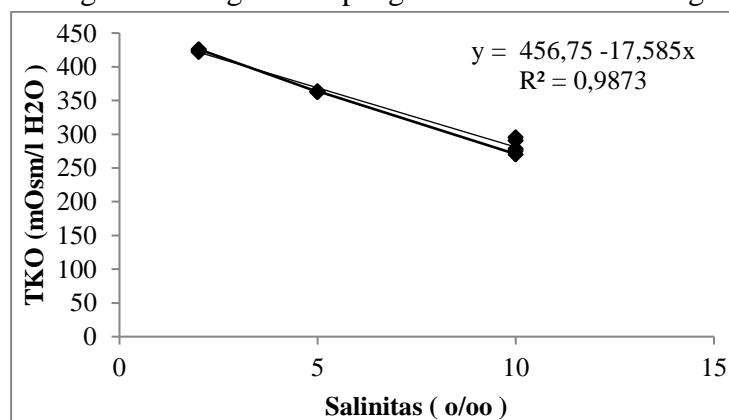
Berdasarkan hasil penelitian, nilai tingkat kerja osmotik (TKO) gelondongan bandeng semakin kecil dengan meningkatnya salinitas lingkungan. TKO gelondongan bandeng pada salinitas 10 %_{oo} yaitu 270,55 mOsm/L H₂O yang merupakan TKO paling rendah dibanding pada salinitas 2 %_{oo} dan 4 %_{oo} yaitu sebesar 426,03 mOsm/L H₂O dan 363,99 mOsm/L H₂O (Gambar 3). Besarnya tingkat kerja osmotik sebanding dengan perbedaan osmolaritas antara media eksternal (air tambak) dengan darah internal ikan. Salinitas media yang berubah selama kultivasi yaitu dengan kisaran 2-10 %_{oo} berpengaruh terhadap tingkat kerja osmotik gelondongan bandeng. Tingkat kerja osmotik bandeng semakin besar dengan semakin rendahnya salinitas. Perubahan salinitas pada air tambak tersebut menyebabkan gelondongan ikan bandeng membutuhkan banyak energi untuk melakukan proses osmoregulasi. Besarnya tingkat kerja osmotik mengakibatkan perubahan alokasi energi di dalam tubuh gelondongan bandeng. Sebagaimana penelitian Jana *et al.*, (2006) menjelaskan bahwa paparan bandeng terhadap perlakuan salinitas tidak hanya menekan pertumbuhan tetapi juga mempengaruhi kecernaan dan parameter fisiologis lainnya seperti efisiensi konversi pakan, aktivitas enzim pencernaan, kadar glikogen hati dan otot. Menurut Pamungkas (2012) energi yang seharusnya untuk pertumbuhan akan digunakan untuk melakukan aktivitas metabolisme yang meningkat sebagai akibat perubahan kondisi lingkungan. Selain itu menurut Tseng dan Hwang (2008) terjadi kebutuhan

energi yang meningkat pada ikan untuk merangsang mekanisme pengangkutan ion serta perubahan jalur metabolisme ikan berkaitan dengan perubahan salinitas.



Gambar 3. Grafik perbandingan rerata osmolaritas media (air tambak) dan tingkat kerja osmotik gelondongan bandeng.

Hubungan antara salinitas media dengan tingkat kerja osmotik gelondongan bandeng disajikan pada Gambar 4. Berdasarkan hasil analisis regresi, nilai TKO berbanding lurus negatif dengan salinitas media mengikuti persamaan $Y = 456,75 - 17,585x$, dengan nilai $R^2 = 0,987$, hal ini berarti perubahan nilai tingkat kerja osmotik gelondongan bandeng 98% dipengaruhi oleh salinitas lingkungan.



Gambar 4. Hubungan antara salinitas media dengan tingkat kerja osmotik gelondongan bandeng.

Nilai signifikansi Corrected Model menunjukkan adanya pengaruh salinitas dan umur kultivasi terhadap tingkat kerja osmotik gelondongan bandeng. Berdasarkan hasil analisis nilai signifikansi corrected model adalah 0,000. Hal ini berarti terdapat perbedaan pada tekanan osmotik gelondongan bandeng selama proses kultivasi. Demikian juga dengan umur kultivasi memiliki sig < 0,05 yang berarti berpengaruh terhadap nilai tingkat kerja osmotik gelondongan bandeng.

IV. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa selama proses kultivasi gelondongan bandeng memberikan respon hiperosmotik dan bersifat osmoregulator karena adanya perbedaan tekanan osmotik tubuh gelondongan bandeng dengan tekanan osmotik lingkungan (air tambak).

Daftar Pustaka

- Anggoro, S. and Nakamura. 2006. Osmotic Response and Feeding Pattern of Kuruma Shrimp (*Penaeus japonicus*) at Various Molting Stages. *Research Report. Lab. Of Propagation Physiology. Scientific article 11. Fisheries Fac. Kagoshima University, Kagoshima.*
- Anggoro, S., Rudiyanti, S, dan Rahmawati. I. Y. 2013. Domestikasi Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) Melalui Optimalisasi Media dan Pakan. *Journal of Management of Aquatic Resources*. 2(3): 119-127.
- Barman, UK., Garg, SK., and Bhatnagar, A. 2012. Effect of Different Salinity and Ration Levels on Growth Performance and Nutritive Physiology of Milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal) Field and Laboratory Studies. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 2012: FAJ-53.
- Bagarinao, T. U. 1991. *Biology of Milkfish (Chanos chanos Forsskal)*.: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries. Development Center. SEAFDEC/AQD Institutional Repository (SAIR) 2013. Philippines, 105 hlm.
- Bhujel, RC. 2008. *Statistics for Aquaculture*. A John Wiley & Sons, New York.
- Boeuf, G., and Payan, P. 2001. How Should Salinity Influence Fish Growth?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 130: 411-423.
- Carrion RL, Avarellos S.S., Guzma'n J.M. Martin, Ri'o M.D. Soengas, J.L. and Mancera J.M. 2005. Growth Performance of Gilthead Sea Bream *Sparus aurata* in Different Osmotic Conditions: Implication for Osmoregulation and Energy Metabolism. *Aquaculture*. 250: 849-861.
- Fujaya, Y. 2004. *Fisiologi Ikan Dasar Pengembangan Teknik Perikanan*. Rineka Cipta: Jakarta.
- Jana, S.N., Garg, S.K., and Patra, B.C. 2006. Effect of Inland Water Salinity on Growth Performance and Nutrition Physiology in Growing Milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal): field and laboratory studies. *Journal of Applied Ichthyology*. 22: 25-34.
- Kim, W. S., Kim, J. M., Kim, M. S., Park, C. W dan Huh, H. T. 1998. Effects of Sudden Changes in Salinity on Endogenous Rhythms of the Spotted Sea Bass *Lateolabrax* Sp.. *Marine Biology*. 131: 219-228.
- Kultz, D. 2015. Physiological Mechanisms used by Fish to Cope with Salinity Stress. *The Journal of Experimental Biology*. 218:1907–1914. doi:10.1242/jeb.118695.
- Lantu, S. 2010. Osmoregulasi pada Hewan Akuatik. Jurnal *Perikanan dan Kelautan*. VI(1):46-50.

- Lin, Y.M., Chen, C.N dan Lee, T.H.. 2003. The expression of gill Na⁺K⁺-ATPase in milkfish, *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackish water and fresh water. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 135:489–497.
- Pamungkas, W. 2012. Aktivitas Osmoregulasi, Respon Pertumbuhan dan *Energetic Cost* Pada Ikan yang Dipelihara dalam Lingkungan Bersalinitas. *Media Akuakultur*. 7(1): 44-51.
- Purchase MM, Luis R, Martines C, and Ramos R. 2009. Cortisol and Glucose Reliable indicator of Fish. *American Journal of Aquatic Sciences*. 4(2): 157 – 178.
- Su, M.S., Lee, C.S., and Liao, I.C. 2002. Technical Responses to Challenges in Milkfish Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*. 10(3&4): 451-464.
- Sugiyono. 2013. *Statistik untuk Penelitian*. CV Alfabeta, Bandung.
- Swanson, C. 1998. Interactive Effects of Salinity on Metabolic, Activity, Growth and Osmoregulation in Euryhaline Milkfish (*Chanos chanos*). *Journal of Experimental Biology*. 201: 3355-3366.
- Tang, C.H., Wu., W.Y., Tsai, S.C., Yoshinaga, T., and Lee, T.H. 2010. Elevated Na⁺/K⁺-ATPase Responses and its Potential Role in Triggering Ion Reabsorption in Kidneys for Homeostasis of Marine Euryhaline Milkfish (*Chanos chanos*) when Acclimated to Hypotonic Fresh Water. *Journal Comp. Physiol. B*. 180: 813-824.
- Tseng, Y, C., and Hwang, P.P. 2008. Some Insights into Energy Metabolism for Osmoregulation in Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 148: 419-429.