

KERAGAMAN GENETIK, FENOTIPE DAN HERITABILITAS PADA GENERASI F₂ HASIL PERSILANGAN TANAMAN PADI (*Oryza sativa* L.)

THE DIVERSITY OF GENETIC, PHENOTYPE AND HERITABILITY IN F₂ GENERATION AS THE RESULT OF CROSSING RICE (*Oryza sativa* L.)

Mernita Napitupulu*), Damanhuri

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Brawijaya University
Jalan Veteran, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia

*) Email: mernitanapitupulu@gmail.com

ABSTRAK

Padi merupakan golongan tumbuhan *Gramineae* yang memiliki batang beruas-ruas dan bersifat merumpun. Salah satu upaya untuk meningkatkan produksi padi adalah dengan melakukan persilangan tanaman untuk mendapatkan varietas unggul sehingga seleksi tanaman sangat diperlukan untuk mendapatkan karakter yang diinginkan. Kegiatan seleksi sangat ditentukan oleh tersedianya keragaman genetik yang luas dan heritabilitas yang tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik, fenotipe, heritabilitas dan pola pewarisan sifat warna biji pada populasi F₂. Penelitian ini dilaksanakan di lahan Fakultas Pertanian, Kelurahan Jatimulyo, Kecamatan Lowokwaru, Malang pada bulan Januari sampai bulan Juni 2016. Penelitian dilakukan dengan menanam populasi F₂ dan tetua pada lingkungan yang sama tanpa ulangan. Pengamatan dilakukan berdasarkan individu pada populasi F₂. Analisis data pada parameter kualitatif dilakukan dengan analisis segregasi menggunakan analisis Chi-square test sedangkan pada parameter kuantitatif analisis data yang dilakukan adalah dengan menghitung nilai Koefisien Keragaman Fenotipe, Koefisien Keragaman Genetik dan Heritabilitas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa keragaman genetik yang luas pada keempat populasi F₂ terdapat pada

karakter jumlah anakan produktif, bobot gabah/rumpun sedangkan keragaman fenotipe yang luas terdapat pada karakter jumlah anakan, jumlah daun, jumlah anakan produktif, dan bobot gabah/rumpun. Nilai heritabilitas yang tinggi pada keempat populasi F₂ terdapat pada karakter jumlah daun, jumlah anakan produktif dan bobot gabah/rumpun. Warna biji pada keempat populasi F₂ dikendalikan oleh gen dominan tak lengkap dengan perbandingan 1:2:1. Pada persilangan ini tidak dipengaruhi oleh *maternal effect* (tetua betina).

Kata Kunci: Padi, Keragaman Genetik, Keragaman Fenotipe, Heritabilitas, Gen Pengendali

ABSTRACT

Rice is *Gramineae* plant groups that have segmented stem and have clumps. An effort to increase rice production is by breeding program to get improved varieties. One of the effort to increase rice production is by doing crossbred plants to obtain varieties so that plant selection is very necessary to get the desired character. Selection activity is determined by the availability of high genetic diversity and high heritability. This research aims to determine the genetic of diversity, phenotypes, heritability and patterns of inheritance of seed color in F₂ population. The

research was conducted on Agriculture Faculty Field, Jatimulyo Village, Lowokwaru sub-district, Malang in January until June 2016. This research was conducted by planting F_2 generation and parent in the same environment without replication. Observations were made on individuals in F_2 population. Analysis of the data on qualitative parameters was analyzed with Chi-square-test while the quantitative parameter analysis by calculating the Coefficient of Variation of phenotype, Coefficient of Genetic, and heritability. The results showed that the high value of genetic diversity are number of productive tiller, weight of grain/clump while the high value of phenotypes are number of tillers, number of leaves, number of productive tillers and weight of grain/clump. The high value of heritability are number of leaves, number of productive tiller and grain weight / clump. The seed colour in all F_2 populations are controlled by uncomplited dominant gene (single gene) with a ratio is 1: 2: 1. In this cross is not influence by genotype mother (maternal effect).

Keywords: Rice, Genetic diversity, Phenotype diversity, Heritability, Number of Genes

PENDAHULUAN

Padi merupakan golongan tumbuhan *Gramineae* yang memiliki batang beruas-ruas dan bersifat merumpun. Berdasarkan warna bijinya padi dibedakan menjadi tiga jenis yaitu padi putih, padi merah, dan padi hitam (Aryana, 2007). Padi hitam di Indonesia belum banyak dibudidayakan karena produksi yang rendah dan umur tanaman yang panjang akan tetapi padi hitam mengandung pigmen yang berbeda dengan padi putih. Menurut Suardi dan Ridwan (2009), beras hitam berkhasiat meningkatkan daya tahan tubuh terhadap penyakit, memperbaiki kerusakan sel hati, mencegah gangguan fungsi ginjal, mencegah kanker, memperlambat penuaan, membersihkan kolesterol dalam darah dan mencegah anemia.

Kebutuhan bahan pangan beras di Indonesia meningkat setiap tahunnya seiring dengan bertambahnya jumlah penduduk, akan tetapi produksi beras di Indonesia tidak stabil sehingga pemerintah melakukan impor beras untuk memenuhi kebutuhan dalam negeri. Upaya untuk mengurangi impor beras adalah dengan meningkatkan produksi padi melalui program pemuliaan, salah satunya adalah dengan melakukan persilangan tanaman. Persilangan tanaman adalah salah satu pemuliaan tanaman untuk memperluas keragaman genetik dan menggabungkan karakter-karakter yang diinginkan dari para tetua (Mangoendidjojo, 2003). Oleh sebab itu dilakukan persilangan padi hitam dengan padi putih. Menurut Crowder (1997), populasi F_2 tanaman hasil persilangan akan mengalami segregasi sesuai dengan hukum Mendel sehingga akan menyebabkan keragaman. Keragaman yang ditimbulkan dapat disebabkan oleh faktor genetik maupun faktor lingkungan. Pada populasi F_2 perlu dilakukan seleksi untuk mendapatkan tanaman sesuai dengan karakter yang diinginkan. Menurut Yulianah (2007), bahwa sebelum dilakukan seleksi perlu diketahui keragaman genetik, heritabilitas, dan jumlah gen yang berperan dalam mengendalikan suatu karakter yang diinginkan. Kegiatan seleksi sangat ditentukan oleh tersedianya keragaman genetik yang luas dan heritabilitas yang tinggi. Suatu karakter yang memiliki nilai heritabilitas tinggi menandakan bahwa penampilan karakter kurang dipengaruhi oleh lingkungan sehingga seleksi dapat berlangsung secara efektif (Falconer dan Mackay, 1996).

Penelitian ini menggunakan populasi F_2 hasil persilangan resiprok. Persilangan resiprok tersebut bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh tetua betina (*Maternal Effect*) terhadap pola pewarisan warna biji. Adanya pengaruh tetua betina (*Maternal Effect*) merupakan indikasi bahwa suatu karakter tersebut dikendalikan oleh gen-gen diluar inti yang diwariskan secara sitoplasmik.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di lahan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Kelurahan Jatimulyo, Kecamatan Lowokwaru, Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2016 sampai bulan Juni 2016. Bahan tanam yang digunakan pada penelitian ini yaitu Pandan Wangi, Ciharang, dan Jawa Melik dan populasi F₂ hasil persilangan (JM x PW), (PW x JM), (JM x CH) dan (CH x JM). Penelitian ini dilakukan dengan menanam populasi F₂ dan tetua pada lingkungan yang sama dengan metode pengamatan dilakukan secara individu pada populasi F₂. Pengamatan dilakukan pada karakter kualitatif dan kuantitatif. Karakter kualitatif yang diamati yaitu warna biji, sedangkan karakter kuantitatif yang diamati yaitu: (a) Tinggi tanaman, (b) Jumlah daun, (c) Jumlah anakan, (d) Jumlah anakan produktif, (e) Jumlah bulir/malai, (f) umur panen, (g) Bobot gabah/rumpun dan (h) Bobot 100 biji. Karakter kualitatif (warna biji) dianalisis dengan menggunakan analisis segregasi (Chi-square Test) sedangkan karakter kuantitatif dianalisis dengan menghitung nilai KKG, KKF dan Heritabilitas pada populasi F₂. Rumus perhitungan KKG, KKF dan heritabilitas adalah sebagai berikut:

$$h^2 = \frac{\sigma_{F_2}^2 - \sqrt{(\sigma_{p1}^2)(\sigma_{p2}^2)}}{\sigma_{F_2}^2}$$

Kisaran nilai heritabilitas adalah sebagai berikut : nilai h² > 0,5 tinggi; 0,2 ≤ h² ≤ 0,5 sedang; h² < 0,2 rendah.

$$KKG = \frac{\sqrt{\sigma_g^2}}{\bar{X}} \times 100\%, \quad KKF = \frac{\sqrt{\sigma_p^2}}{\bar{X}} \times 100\%$$

Kriteria KKG dan KKF yaitu: 0% ≤ x ≤ 25% (rendah), 25% ≤ x ≤ 50% (agak rendah), 50% < x ≤ 75% (cukup tinggi) dan 75% < x ≤ 100% (tinggi) . Menurut Sofi (2008) bahwa kriteria KKG dan KKF didasarkan pada nilai tertinggi dari hasil analisis. Kriteria KKG rendah adalah (0-11,42), agak rendah (11,43-22,84), cukup tinggi (22,85-34,26) dan tinggi (34,27-45,68) sedangkan kriteria KKF rendah adalah (0- 12,86), agak rendah (12,87-25,73), cukup tinggi (25,74-38,59) dan tinggi (38,60-51,45). Menurut Stansfield (1991) perhitungan X² (Chi-square test) menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{\sum (O_i - E_i - 0,5)^2}{E_i}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil perhitungan KKG, KKF dan heritabilitas pada populasi F₂ adalah sebagai berikut:

Tabel 1 Keragaman Genetik, Fenotipe dan Heritabilitas pada Populasi F₂

Karakter	Populasi JM x PW			Populasi PW x JM			Populasi JM x CH			Populasi CH x JM		
	KKG	KKF	h ²									
TT	8,58	11,56	0,55	7,89	11,20	0,50	4,48	8,63	0,27	4,71	8,88	0,28
JA	35,79	43,56	0,68	15,25	28,01	0,30	28,30	35,77	0,63	20,27	33,92	0,36
JD	31,75	36,31	0,76	20,80	27,60	0,57	20,92	26,27	0,63	22,50	29,47	0,58
JAP	26,99	35,16	0,59	24,59	32,20	0,58	28,42	36,30	0,61	27,25	35,83	0,58
JBPR	11,00	15,89	0,48	17,30	21,54	0,64	12,46	18,34	0,46	15,42	19,25	0,64
BGPR	29,86	37,67	0,63	43,15	48,80	0,78	39,48	45,77	0,74	45,68	51,45	0,79
BB	3,04	4,96	0,37	9,70	10,57	0,84	5,05	6,35	0,63	2,84	4,58	0,38

Keterangan: TT=Tinggi Tanaman, JA= Jumlah Anakan, JD= Jumlah Daun, JAP= Jumlah Anakan Produktif, JBPR= Jumlah Bulir/Malai, BGPR= Bobot Gabah/Rumpun, BB= Bobot 100 biji, KKG= Koefisien Keragaman Genetik, KKF= Koefisien Keragaman Fenotipe, h²= Heritabilitas.

Hasil perhitungan KKG diperoleh bahwa karakter tinggi tanaman, jumlah bulir/malai dan bobot 100 biji memiliki keragaman genetik yang sempit pada keempat populasi F_2 , sedangkan karakter jumlah anakan produktif dan bobot gabah/rumpun memiliki keragaman genetik yang luas. Karakter jumlah anakan dan jumlah daun bervariasi pada keempat populasi F_2 . Hal ini sesuai penelitian Herawati *et al.* (2009) bahwa karakter tinggi tanaman, bobot 100 butir juga memiliki keragaman genetik yang sempit sedangkan karakter jumlah anakan produktif, bobot gabah/rumpun memiliki keragaman genetik yang luas. Berdasarkan penelitian Kristamtini *et al.* (2013) bahwa karakter jumlah bulir/malai memiliki keragaman genetik yang sempit. Keragaman genetik yang sempit mengindikasikan bahwa suatu karakter terdiri dari individu-individu dengan genotipik yang sama atau tidak memiliki perbedaan dalam hal komposisi gen (Sadimantara *et al.*, 2013). Menurut Wicaksana (2001) keragaman genetik yang luas merupakan salah satu keberhasilan seleksi terhadap karakter yang diinginkan.

Hasil perhitungan KKF diperoleh bahwa karakter tinggi tanaman, jumlah bulir/malai dan bobot 100 biji memiliki keragaman fenotipe yang sempit pada keempat populasi F_2 sedangkan karakter jumlah anakan, jumlah daun, jumlah anakan produktif, bobot gabah/rumpun memiliki keragaman fenotipe yang luas pada keempat populasi F_2 . Menurut Sofi (2008), karakter tinggi tanaman memiliki keragaman fenotipe yang sempit sedangkan menurut penelitian Buhaira *et al.* (2014) menyatakan bahwa karakter jumlah anakan, bobot gabah/rumpun memiliki keragaman genetik yang luas yang diikuti oleh keragaman fenotipe yang luas. Nilai keragaman fenotipe yang rendah menunjukkan bahwa individu-individu dalam populasi yang diuji cenderung seragam sedangkan nilai keragaman fenotipe yang tinggi menunjukkan tingkat keragaman yang tinggi pada suatu karakter.

Pada populasi F_2 hasil persilangan JM x PW diketahui bahwa karakter tinggi tanaman, jumlah anakan, jumlah daun, jumlah anakan produktif, dan bobot gabah/rumpun memiliki nilai heritabilitas tinggi, sedangkan pada karakter jumlah bulir/malai dan bobot 100 biji memiliki nilai heritabilitas sedang. Karakter jumlah daun, jumlah anakan produktif, jumlah bulir/malai, bobot gabah/rumpun dan bobot 100 biji pada populasi F_2 PW x JM memiliki nilai heritabilitas yang tinggi, sedangkan karakter tinggi tanaman dan jumlah anakan memiliki nilai heritabilitas sedang. Populasi F_2 hasil persilangan JM x CH memiliki nilai heritabilitas yang bervariasi. Karakter jumlah anakan, jumlah daun, jumlah anakan produktif, bobot gabah/rumpun dan bobot 100 biji memiliki nilai heritabilitas tinggi, sedangkan pada karakter tinggi tanaman dan jumlah bulir/malai memiliki nilai heritabilitas sedang. Karakter jumlah daun, jumlah anakan produktif, jumlah bulir/malai dan bobot gabah/rumpun pada populasi F_2 CH x JM memiliki nilai heritabilitas yang tinggi, sedangkan karakter tinggi tanaman, jumlah anakan dan bobot 100 biji memiliki nilai heritabilitas sedang. Nilai heritabilitas yang tinggi menunjukkan bahwa pengaruh faktor genetik lebih besar dibandingkan dengan faktor lingkungan (Syukur *et al.*, 2011). Menurut Machfud dan Sulistiowati (2009), nilai heritabilitas yang tinggi mengindikasikan bahwa gen pada suatu karakter diwariskan secara genetik oleh kedua tetuanya. Nilai heritabilitas tinggi juga menunjukkan bahwa faktor lingkungan pada suatu karakter lebih kecil dibandingkan dengan faktor genetik. Menurut Zen (2012) bahwa seleksi dapat berlangsung secara efektif terhadap suatu karakter yang diinginkan apabila suatu karakter memiliki nilai keragaman genetik yang luas dan heritabilitas yang tinggi.

Tabel 2 Perhitungan Chi-square (χ^2) pada populasi F₂ JM x PW

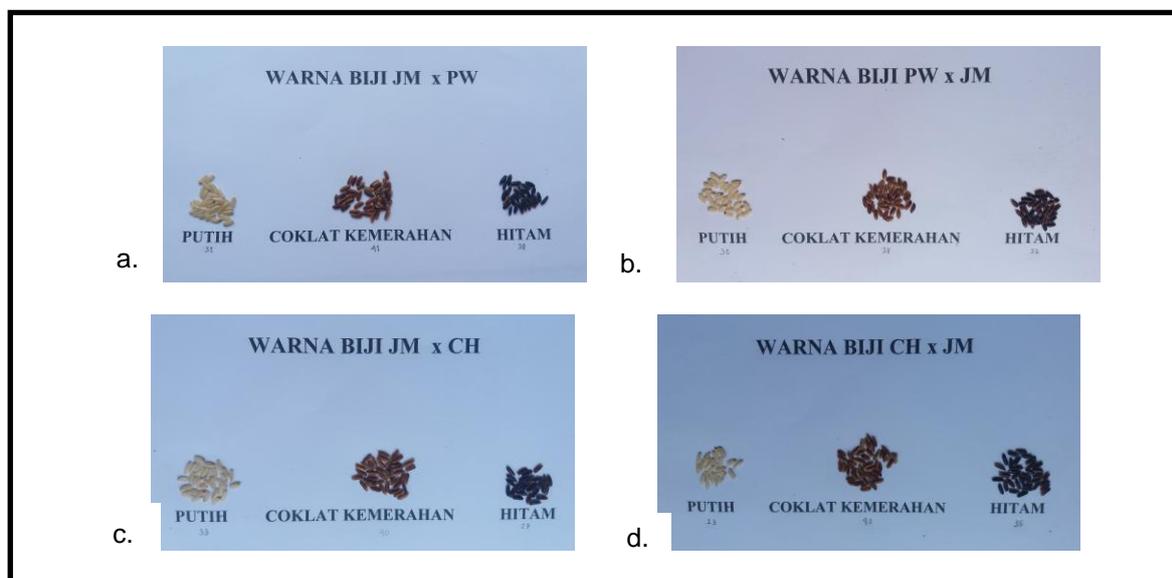
Populasi	Nisbah Mendel	Pengamatan			Harapan			χ^2	
		H	CK	P	H	CK	P	χ^2 Hitung	χ^2 Tabel
JM X PW	1.2.1	34	42	24	25	50	25	4.03 ^{tn}	5.99
	9.4.3	34	42	24	56.25	25	18.75	20.50*	5.99
	9.6.1	34	42	24	56.25	37.5	6.25	56.45*	5.99
	12.3.1	34	42	24	75	18.75	6.25	97.08*	5.99
PW x JM	1.2.1	31	38	31	25	50	25	5.07 ^{tn}	5.99
	9.4.3	31	38	31	56.25	25	18.75	24.50*	5.99
	9.6.1	31	38	31	56.25	37.5	6.25	104.98*	5.99
	12.3.1	31	38	31	75	18.75	6.25	138.07*	5.99
JM X CH	1.2.1	28	40	32	25	50	25	3.75 ^{tn}	5.99
	9.4.3	28	40	32	56.25	25	18.75	30.77*	5.99
	9.6.1	28	40	32	56.25	37.5	6.25	115.81*	5.99
	12.3.1	28	40	32	75	18.75	6.25	153.81*	5.99
CH x JM	1.2.1	32	44	24	25	50	25	2.31 ^{tn}	5.99
	9.4.3	32	44	24	56.25	25	18.75	24.92*	5.99
	9.6.1	32	44	24	56.25	37.5	6.25	58.60*	5.99
	12.3.1	32	44	24	75	18.75	6.25	104.36*	5.99

Keterangan : H: Hitam, CK: Coklat Kemerahan, P: Putih tn = tidak berbeda nyata taraf 5% (*) = berbeda nyata taraf 5%.

Pada hasil penelitian menunjukkan bahwa warna biji pada populasi keempat populasi (Tabel 2.) menghasilkan warna biji yang sama yaitu hitam, coklat kemerahan dan putih. Hal ini ketahu bahwa pada populasi F₂ JM x PW serta resiproknya dan JM x CH serta resiproknya tidak dipengaruhi oleh *maternal effect*. Menurut Murti *et al.* (2000) jika fenotipe suatu karakter pada suatu populasi dan resiproknya tidak menunjukkan perbedaan maka dapat dinyatakan bahwa pada pewarisan suatu karakter tidak dipengaruhi oleh *maternal effect* (tetua betina). Hal ini sesuai dengan penelitian Oktarisna *et al.* (2013) menyatakan bahwa karakter warna biji pada suatu populasi yang menghasilkan warna biji yang sama dengan

resiproknya tidak dipengaruhi oleh *maternal effect*.

Hasil perhitungan χ^2 (Chi-square) warna biji pada keempat populasi F₂ tidak berbeda nyata pada nisbah Mendel 1:2:1 pada taraf 5%. Hal ini menyebabkan bahwa gen warna biji pada JM x PW dan resiproknya serta JM x CH dan resiproknya dikendalikan oleh gen dominan tak lengkap. Menurut Crowder (1997), tipe interaksi gen dibedakan menjadi dua yaitu Intra-allelic dan Inter-allelic. Interaksi Intra-allelic dengan perbandingan 1:2:1 dikendalikan oleh gen dominan tak lengkap (gen tunggal).



Gambar 1 Warna Biji Populasi F₂

Menurut Alia *et al.* (2004) Pola pewarisan sifat suatu karakter seperti ada tidaknya pengaruh tetua betina (*Maternal Effect*), jumlah gen pengendali, aksi gen dan heritabilitas merupakan parameter genetik yang penting untuk melakukan seleksi.

KESIMPULAN

Keragaman genetik yang luas pada keempat populasi F₂ terdapat pada karakter jumlah anakan produktif, bobot gabah/rumpun dan jumlah daun populasi JM x PW. Keragaman fenotipe yang luas pada keempat populasi F₂ terdapat pada karakter jumlah anakan, jumlah daun, jumlah anakan produktif, dan bobot gabah/rumpun. Nilai heritabilitas yang tinggi pada keempat populasi F₂ terdapat pada karakter jumlah daun, jumlah anakan produktif dan bobot gabah/rumpun. Pada pengamatan warna biji populasi F₂ dikendalikan oleh gen tunggal yang sesuai dengan Hukum Mendel I. Warna biji pada keempat populasi F₂ dikendalikan oleh gen dominan tak lengkap dengan perbandingan 1:2:1. Pada persilangan ini tidak dipengaruhi oleh *maternal effect* (tetua betina).

DAFTAR PUSTAKA

- Alia, Y., A. Baihaki, N. Hermiati, dan Y. Yuwariah. 2004. Pola Pewarisan Karakter Jumlah Berkas Pembuluh Kedelai. *Zuriat*. 15 (1):4-30.
- Buhaira, S. Nusifera, Ardiyaningsih, Y. Alia. 2014. Penampilan Dan Parameter Genetik Beberapa Karakter Morfologi Agronomi Dari 26 Aksesori Padi (*Oryza Spp L.*) Lokal Jambi. *Jurnal Penelitian Universitas Jambi: Seri Sains*. 16 (2): 33-42.
- Crowder, C. V. 1997. Genetika Tumbuhan. Gajah Madah University Press. Yogyakarta.
- Falconer, D. S. and T. F. C. Mackay. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. Fourth Edition. Lognam. Harlow.
- Herawati, R., B. S. Purwoko, I. S. Dewi. 2009. Keragaman Genetik dan Karakter Agronomi Galur Haploid Ganda Padi Gogo dengan Sifat-Sifat Tipe Baru Hasil Kultur Antera. *Agronomi Indonesia*. 37 (2): 87-94.
- Kristantini, S. Widayanti, Sutarno dan Sudarmaji. 2013. Keragaman Genetik Lima Kultvar Lokal Padi Beras Hitam Asal Yogyakarta Berdasarkan Sifat Morfologi. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian. *Prosiding Seminar Nasional Sumber Daya 90 Genetik Pertanian*: 90-100.

- Machfud, M., E. Sulistiowati.** 2009. Pendugaan Aksi Gen Dan Daya Waris Ketahanan Kapas Terhadap *Amrasca Biguttula*. Balai Penelitian Tanaman Tembakau dan Serat. Malang. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*. 15 (3): 131-138.
- Murti, R. H., E. Ambarwati, dan Supriyana.** 2000. Genetika Sifat Komponen Hasil Tanaman Tomat. *Mediagama*. 2 (2):58-64.
- Oktarisna, F.A., A. Soegianto, A. N. Sugiharto.** 2013. Pola Pewarisan Sifat Warna Polong pada Hasil Persilangan Tanaman Buncis (*Phaseolus Vulgaris* L.) Varietas Introduksi Dengan Varietas Lokal. *Jurnal Produksi Tanaman*. 1 (2):81-89.
- Sadimantara, G. R., T. Tanti, Muhidin, N. Wayan, S. Suliartini dan T. Wijayanto.** 2013. Pendugaan Diversitas Genetik Dan Korelasi Antar Karakter Agronomi Padi Gogo (*Oryza Sativa* L.) Lokal Sulawesi Tenggara. *Agripplus*. 23 (3): 242-250.
- Sofi, L.** 2008. Keragaman Fenotipe Beberapa Galur Padi Hibrida (*Oryza Sativa* L.) Di Desa Karangduren, Sawit, Boyolali. Skripsi. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Suardi, D. dan I. Ridwan.** 2009. Beras Hitam, Pangan Berkhasiat yang Belum Populer. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 31 (2): 9-10.
- Syukur, M., S. Sujiprihati, R.Yunianti dan D. A. Kusumah.** 2011. Pendugaan Ragam Genetik Dan Heritabilitas Karakter Komponen Hasil Beberapa Genotipe Cabai. Institut Pertanian Bogor. *Agrivigor*. 10 (2): 148-156.
- Wicaksana, N.** 2001. Penampilan Fenotipik dan Beberapa Parameter Genetik 16 Genotipe Kaentang pada Lahan Sawah di Dataran Medium. *Zuriat: Komunikasi Pemuliaan Indonesia*. 12 (1) : 15-21.
- Yulianah, I.** 2007. Studi Pewarisan Karakter Ketahanan Cabai (*Capsicum annum* L.) Terhadap Layu Bakteri (*Ralstonia solanacearum*). Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Zen, S.** 2012. Parameter Genetik Padi Sawah Dataran Tinggi. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sumatera Barat. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*. 12 (3): 196-201.