

**IMUNOGENISITAS ANTIGEN *HEAT KILLED Aeromonas hydrophila* STRAIN
LOKAL DESA SUNGAI BATANG DAN MANDIANGIN TERHADAP IKAN
LELE DUMBO (*Clarias gariepinus*)**

**IMMUNOGENICITY OF HEAT KILLED ANTIGEN *Aeromonas hydrophila* LOCAL
STRAINS OF SUNGAI BATANG AND MANDIANGIN VILLAGES ON AFRICAN
CATFISH (*Clarias gariepinus*)**

Alna Chairunisa¹, Olga^{2*}, Siti Aisiah³

^{1,2,3}Program Studi Akuakultur Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Lambung Mangkurat,
Jl.A.Yani km 36 Banjarbaru Kalimantan Selatan
Email: olga@ulm.ac.id*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi dan mendapatkan antigen bakteri *A. hydrophila* strain lokal desa Sungai Batang dan Mandiangin Kalimantan Selatan yang bersifat imunogenik terhadap ikan lele dumbo. Antigen diinaktif menggunakan metode pemanasan (*heat killed*). Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan acak lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan 3 ulangan yang meliputi perlakuan vaksinasi dengan antigen *Aeromonas hydrophila* strain P5.1 (A), strain AM01 (B), strain P1.1 (C), strain P3.1 (D), strain P4.1 (E) dan kontrol diinjeksi dengan PBS pH 7,0 (K). Antigen diinjeksi secara *intramuscular* sebanyak 0.1 ml (kepadatan bakteri 10⁹ sel/ml) per ekor ikan uji (A,B,C,D,E). Hasil uji imunogenisitas antigen strain lokal P5.1 dan P1.1 bersifat lebih imunogenik terhadap lele dumbo dibandingkan dengan antigen lainnya berdasarkan kemampuannya meningkatkan antibodi pasca vaksinasi. Uji reaksi silang antigen *A. hydrophila* strain lokal AM01, P1.1 dan P5.1 mampu bereaksi silang dengan antigen lainnya. Antigen P1.1 mampu mengenali antigen lebih banyak dibandingkan P5.1 dan AM01, sehingga dapat direkomendasikan menjadi kandidat vaksin.

Kata kunci: *Aeromonas hydrophila*, antibodi, imunogenisitas, *Clarias gariepinus*.

ABSTRACT

This study aims to select and obtain antigens of the local strain *A. hydrophila* bacteria in Sungai Batang and Mandiangin villages, South Kalimantan, which are immunogenic to African catfish. Antigen is inactivated using the heating method (*heat killed*). The design of this study used a completely randomized design (CRD) with 6 treatments and 3 replications which included vaccination with the antigen *Aeromonas hydrophila* strain P5.1 (A), strain AM01 (B), strain P1.1 (C), strain P3.1 (D), strain P4.1 (E) and control were injected with PBS pH 7.0 (K). Antigen was injected *intramuscularly* as much as 0.1 ml (bacterial density 10⁹ cells/ml) per test fish (A, B, C, D, E). The results of the antigen immunogenicity test of local strains P5.1 and P1.1 were more immunogenic to African catfish compared to other antigens based on their ability to increase post-vaccination antibodies. Antigen cross-reaction test *A. hydrophila* local strains AM01, P1.1 and P5.1 are capable of cross-reacting with other antigens. P1.1 antigen is able to recognize more antigens than P5.1 and AM01, so it can be recommended as a vaccine candidate.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, antibodies, immunogenicity, *Clarias gariepinus*

PENDAHULUAN

Desa Sungai Batang dan Mandiangin Kabupaten Banjar banyak dilakukan pembudidayaan ikan, salah satunya ikan lele. Namun di tengah meningkatnya budi daya ikan, pembudidaya ikan harus selalu waspada terhadap kendala yang dapat merugikan produksi budi daya. Permasalahan yang belum cukup baik untuk ditanggulangi, yaitu resiko penyebaran penyakit ikan. Resiko terjadinya penyakit dan penyebaran wabah penyakit semakin meningkat. Pembudidaya ikan yang melakukan pembenihan maupun pembesaran sering menemukan salah satu jenis penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Bakteri yang dijumpai sebagian besar merupakan bakteri patogen seperti *Aeromonas hydrophila*, *A.salmonicida*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Edwardsiella ictaluri*, *Streptococcus*, *Pasteurella*, *Yersinia ruckeri*, dan *Cytophaga* yang merupakan bakteri Gram negatif (Muslikha *et al.*, 2016).

Aeromonas hydrophila merupakan penyebab *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) (Olga & Fatmawati, 2013). Bakteri ini berasal dari lingkungan perairan. *A. hydrophila* termasuk ke dalam kelompok bakteri patogen dengan virulensi yang tinggi (Mulia *et al.*, 2016). MAS umumnya dapat

ditanggulangi melalui tindakan pencegahan dengan pemberian imunostimulan untuk mengembalikan ketidakseimbangan sistem kekebalan tubuh yang terganggu dengan cara merangsang dan memperbaiki. Pemberian imunostimulan dapat diberikan melalui injeksi, pakan (oral), dan perendaman (Maqsood *et al.*, 2011 dalam Rosidah *et al.*, 2018).

Vaksin merupakan salah satu produk imunostimulan yang mampu merangsang kekebalan spesifik yang dapat diberikan dalam berbagai macam metode vaksinasi. Menurut Tauhid *et al.* (2018) vaksinasi merupakan salah satu upaya pencegahan terhadap infeksi patogen yang efektif dan menjamin peningkatan produksi akuakultur yang berkelanjutan. Salah satu keunggulan yang dimiliki oleh vaksin tersebut adalah kemampuannya untuk bereaksi silang terhadap varian bakteri heterologi terdapat di sentra budi daya ikan air tawar.

Vaksinasi merupakan suatu upaya untuk menimbulkan ketahanan tubuh yang bersifat spesifik melalui pemberian vaksin (Aliffudin, 2002). Hal serupa dinyatakan Nur (2006) bahwa vaksinasi dapat merangsang munculnya imun spesifik, khususnya respon imun humoral (antibodi) yang timbul terhadap antigen tertentu. Keberhasilan vaksinasi dipengaruhi beberapa faktor, yaitu

kualitas *strain* bakteri. Strain bakteri yang diambil dari tempat yang berbeda akan memiliki susunan genetik yang berbeda, sehingga menghasilkan karakteristik yang berbeda. Strain lokal yang digunakan sebagai kandidat vaksin diambil dari strain lokal Kalimantan Selatan yang berlokasi di kabupaten Banjar, yaitu di desa Sungai Batang dan Mandiangin.

Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan penelitian uji imunogenisitas kandidat calon vaksin dari bakteri *A. hydrophila* strain lokal Kalimantan Selatan pada lele dumbo (*Clarias gariepinus*). Penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi dan mendapatkan antigen bakteri *A. hydrophila* strain lokal desa Sungai Batang dan Mandiangin Kalimantan Selatan yang bersifat imunogenik terhadap ikan lele dumbo.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Hama dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru Kalimantan Selatan.

Alat dan Bahan Penelitian

A. hydrophila strain, Ikan lele dumbo, media GSP agar (*Glutamat Starch Phienile agar; Merck-Germany*) dan TSB (*Tryptone Soya Broth; Merck-Germany*), inkubator, pH meter, DO meter.

Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian meliputi persiapan sterilisasi alat dan bahan. Selanjutnya, koleksi bakteri *A. hydrophila* strain lokal Sungai Batang dan Mandiangin diremajakan dengan dikultur ke dalam media GSP agar (*Glutamat Starch Phienile agar; Merck-Germany*) dan TSB (*Tryptone Soya Broth; Merck-Germany*) diinfeksi ke ikan yang sehat dengan dosis kepadatan suspensi 10^9 sel/ml. Ikan uji yang menunjukkan gejala sakit atau mati diisolasi bakterinya, dikultur ke medium GSP agar. Seose koloni bakteri yang dominan ditumbuhkan ke medium TSB untuk diinfeksi lagi ke ikan uji yang sehat. Proses ini dilakukan sebanyak 3 kali.

Koloni bakteri murni hasil reisolasi yang ketiga dibuat menjadi antigen. Bakteri dikultur ke media TSB dan diinkubasi selama 18-24 jam secara bertingkat. Selanjutnya sel bakteri dipanen, dipisahkan antara media dengan selnya dengan cara disentrifuse dengan kecepatan 3.500 rpm selama 15 menit, Kemudian sel dicuci dan dibilas

dengan larutan PBS pH 7 sebanyak 3 kali. Sel bakteri yang telah dicuci dan dibilas kemudian dipanaskan pada suhu 100° C selama 60 menit. Untuk mengetahui aktif atau tidaknya sel bakteri tersebut, maka diuji viabilitasnya secara duplo di medium GSP agar selama *overnight*.

Imunogenisitas antigen diuji melalui proses vaksinasi pada lele dumbo perlakuan yang berukuran panjang total 12-15 cm secara injeksi *intramuscular* dengan dosis 0,1 ml/ekor (kepadatan bakteri 10⁹ sel/ml). sedangkan untuk kontrol disuntik dengan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 7. Pengambilan darah untuk uji titer antibodi dilakukan 12 hari setelah vaksinasi awal untuk keperluan uji titer antibodi. Setelah itu, ikan *dibooster* dengan dosis yang sama dengan vaksinasi awal dan dipelihara lagi selama 12 hari ke depan, lalu ikan diambil lagi darahnya untuk uji titer antibodi.

Analisis data

Rancangan penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) terdiri dari 5 perlakuan vaksinasi dan 1 perlakuan kontrol dengan 3 ulangan, yaitu ikan divaksinasi dengan antigen *A. hydrophila strain* P5.1 (A), *strain* AM01 (B), *strain* P1.1 (C), *strain* P.3.1 (D), *strain* P4.1 (E) dan kontrol (K, diinjeksi dengan

PBS pH 7,0). Analisis data meliputi analysis of varians (anova) untuk data titer antibodi uji imunogenisitas, sedangkan untuk reaksi silang antar antigen pasca vaksinasi dan kualitas air diamati secara deskriptif.

Parameter pengamatan adalah sebagai berikut:

a. Titer Antibodi

Pengamatan titer antibodi menggunakan metode aglutinasi (Anderson, 1974) dilakukan untuk mengamati imunogenisitas dan reaksi silang antar antigen

b. Kualitas air

Pengamatan kualitas air dilakukan di akhir perlakuan. Parameter yang diamati adalah suhu, derajat keasaman (pH), oksigen terlarut (DO).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Imunogenisitas

Uji imunogenisitas lele dumbo menggunakan antigen *heat killed* bakteri *A. hydrophila strain* lokal Sungai Batang dan Mandiangin disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Imunogenisitas ikan lele dumbo selama pengamatan

Perlakuan	Titer Antibodi sampling ke		
	0	1	2
A	1	725.33	1194.67
B	1	1024	66901.33
C	1	405.33	10986.67
D	1	234.67	11434.67
E	1	277.33	8.19
K-A	1	1	1
K-B	1	1	1
K-C	1	1	1
K-D	2	1	1,33
K-E	2	1	5,33

Keterangan: A= strain P.5.1, B= strain AM01, C= strain P.1.1, D= strain P.3.1, E=strain P.4.1, K= Kontrol/PBS pH 7,0

Hasil uji imunogenisitas ikan lele dumbo dalam penelitian ini menggunakan antigen bakteri *A. hydrophila heat killed* strain Sungai Batang dan Mandiangin menggunakan dosis 0,1 ml/ekor dengan kepadatan suspensi bakteri 10^9 sel/ml menunjukkan terjadinya peningkatan titer antibodi pasca 12 hari vaksinasi awal dan 12 hari vaksinasi *booster*. Menurut Rukyani *et al.* (1997) bahwa ikan biasanya membutuhkan waktu 2 minggu untuk melakukan tanggap kebal dalam bentuk peningkatan produksi antibodi.

Titer antibodi yang dihasilkan dalam tiap perlakuan menunjukkan yang berbeda meskipun dosis yang diberikan sama (Tabel 1.). Hal ini menunjukkan bahwa antigen dari strain lokal *A. hydrophila* yang berbeda dapat memberikan nilai ikatan reaksi yang berbeda dengan antibodi pada ikan uji. Meski

demikian, berdasarkan hasil uji anova titer antibodi lele dumbo diperoleh F hitung (1.4203) < F Tabel 5% (4,0661) dan 1% (7,5909), maka dapat disimpulkan bahwa pemberian antigen bakteri *A. hydrophila heat killed* strain lokal Sungai Batang dan Mandiangin tidak berpengaruh nyata terhadap uji imunogenisitas lele dumbo.

Hasil uji anova titer antibodi sampling kedua menunjukkan lele diperoleh F hitung (0.5770) < F Tabel 5% (4,0661) dan 1% (7,5909) dapat disimpulkan bahwa pemberian antigen bakteri *A. hydrophila heat killed* strain lokal Sungai Batang dan Mandiangin tidak berpengaruh nyata terhadap imunogenisitas lele dumbo.

Ikan setelah divaksinasi menunjukkan terjadinya peningkatan titer antibodi pada semua perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa vaksin bakteri *A. hydrophila* strain lokal mampu berikatan dengan antibodi ikan. Pendapat tersebut didukung Trilia *et al.* (2014) bahwa terjadinya peningkatan nilai titer antibodi dikarenakan antibodi mampu mengeliminasi antigen yang masuk ke dalam tubuh ikan.

Vaksinasi *booster* dapat meningkatkan antibodi ikan. Peningkatan titer antibodi terlihat pada perlakuan A (P5.1), B (AM01), C (P1.1) dan D (P3.1) terjadi setelah pemberian *booster*. Vaksinasi *booster*

mampu merangsang produksi titer antibodi sehingga antibodi bereaksi mengenali antigen (vaksin *heat killed*) yang masuk ke dalam tubuh ikan.

Penurunan titer antibodi, yaitu terjadi di strain E (P4.1) bila dibandingkan saat ikan uji belum divaksinasi *booster*. Hal tersebut diduga, karena ikan stres akibat terlalu sering mendapatkan perlakuan pada saat penyuntikan dan pengambilan darah yang dilakukan secara berurutan. Menurut Nugroho. (2017) perlakuan yang demikian itu diduga dapat mempengaruhi perubahan titer antibodi. Pengukuran titer antibodi dapat diketahui berdasarkan kemampuan antibodi di dalam serum dapat melakukan aglutinasi terhadap antigen *A. hydrophila*. Berdasarkan hasil (Tabel 1) menunjukkan bahwa vaksin *heat killed* strain A (P5.1), strain B (AM01), strain C (P1.1) dan strain D (P3.1) yang diberikan mampu meningkatkan respons imun dengan terdeteksinya reaksi aglutinasi pada titer antibodi. Kekebalan yang dihasilkan setelah vaksinasi akan melibatkan pertahanan spesifik yang terdiri imunitas humoral dan imunitas seluler. Antibodi merupakan suatu agen yang diperlukan untuk mencegah serangan patogen. Terbentuknya antibodi merupakan suatu proses yang terjadi dalam limfosit B sebagai reaksi yang mampu menyerang kehadiran molekul asing

penginfeksi dalam darah. Sistem imun seluler difasilitasi oleh limfosit T disebut sel T.

Reaksi silang antara antigen dan antibodi

Pengujian terhadap reaksi silang juga digunakan untuk mencari antigen yang mampu bereaksi positif tidak hanya dengan antigen yang sama (satu jenis), namun dapat bereaksi terhadap antigen dari strain yang lain.

Uji reaksi silang merupakan uji yang mereaksikan suatu antigen dengan antibodi secara *in vitro* untuk mengetahui imunogenisitas antigen *A. hydrophila* dari beberapa strain yang diberikan pada ikan (Mulia *et al.*, 2016). Uji reaksi silang dilakukan pada antibodi ikan yang telah divaksinasi dengan antigen *heat killed* strain lokal *A. hydrophila* Sungai Batang dan Mandiangin disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Reaksi Silang antara Antigen dan Antibodi.

Perlakuan	Antigen sampling ke-									
	A		B		C		D		E	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
A	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
B	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : antigen dan antibodi bereaksi silang (+); tidak ada reaksi silang (-). A= strain P.5.1, B= strain AM01, C= strain P.1.1, D= strain P.3.1, E=strain P.4.1, K= Kontrol/PBS pH 7,0

Hasil reaksi silang antara antigen beberapa strain bakteri *A. hydrophila* dan antibodi lele dumbo menunjukkan bahwa antibodi lele dumbo yang divaksinasi dengan *A. hydrophila* strain P1.1 bereaksi positif dapat mengenali antigen *A. hydrophila* strain P5.1 dan AM01. Sedangkan antibodi lele dumbo yang divaksinasi dengan strain P5.1 mampu mengenali antigen P1.1, dan yang divaksinasi dengan AM01 mampu mengenali antigen P1.1. Berbeda dengan antibodi lele dumbo dari strain Sungai Batang lainnya (P4.1 dan P3.1), antibodi yang diproduksi tidak mampu mengenali antigen strain *A. hydrophila* yang lain selain dari antigennya sendiri (Tabel 2).

Kemampuan antibodi lele dumbo yang divaksinasi dengan strain P1.1 bereaksi positif dengan antigen strain P5.1 dan AM01 menunjukkan bahwa strain ini memiliki kemampuan yang lebih banyak dalam melindungi ikan terhadap serangan bakteri *A. hydrophila* dengan strain yang berbeda darinya. Pendapat ini didukung Mulia (2012) bahwa kandidat vaksin yang baik adalah yang mampu bereaksi terhadap antigen yang sama (satu jenis) dan mampu bereaksi dengan antigen dari strain lain, sehingga dapat dijadikan kandidat vaksin.

Kualitas air

Hasil pengukuran kualitas air selama masa penelitian disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Kualitas air penelitian selama penelitian

Parameter	Rerata hasil pengukuran	Literatur Penunjang
Suhu (°C)	26,4 26,5 °C	24 °C – 30 °C (Kesuma <i>et al.</i> , 2019) 6 – 9
pH	6,23 – 6,90	(Syahrizal <i>et al.</i> , 2019).
DO (mg/l)	3,40- 4,10 mg/l	Tidak < 5 mg/l (Rosmawati & Muarif, 2010).

Berdasarkan hasil pengamatan suhu air, pH air dan DO pada Tabel 3. masih berada pada kisaran normal untuk pemeliharaan dan pertumbuhan lele dumbo. Syahrizal *et al.* (2019) menyatakan bahwa proses biokimiawi perairan seperti nitrifikasi sangat dipengaruhi oleh nilai pH. Proses nitrifikasi akan berakhir jika pH bersifat asam. Kisaran pH yang kurang dari 6 – 9 bagi sangat berpengaruh pada perkembangan ikan lele, karena dapat menghambat pertumbuhan dan menurunkan nafsu makan. Menurut Rosmawati dan Muarif (2010) Kisaran oksigen terlarut untuk kelangsungan hidup dan pertumbuhan, oksigen terlarut yang dianjurkan tidak kurang dari 5 mg/l.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Antigen *Aeromonas hydrophila* strain lokal AM01, P1.1, P3.1, P4.1, dan P5.1 bersifat imunogenik, sedangkan uji reaksi silang menunjukkan bahwa antigen *A. hydrophila* strain lokal AM01, P1.1 dan P5.1 mampu bereaksi silang dengan antigen lainnya. Antigen P1.1 mampu mengenali antigen lebih banyak dibandingkan P.5.1 dan AM01, sehingga dapat direkomendasikan menjadi kandidat vaksin. Kualitas air masih berada pada kisaran normal untuk pemeliharaan dan pertumbuhan lele dumbo.

Saran

-

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, D.P. 1974. *Fish Immunology*. TFH Publications, Inc. United States.
- Alifuddin, M. 2002. Immunostimulan on aquatic organisms. *Jurnal Akuakultur Indonesia*.1(2):87-92.
- Kesuma, B.W., Budiyanto, & B. Brata. 2019. Efektivitas pemberian probiotik dalam pakan terhadap kualitas air dan laju pertumbuhan pemeliharaan ikan lele sangkuriang (*Clarias gariepinus*) sistem terpal. *Jurnal Penelitian Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan*. 8(2): 24-25.
- Mulia, D.S. 2012. *Vaksinasi Lele Dumbo*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Mulia, D.S., C. Windarti, & H.Maryanto, 2016. Imunogenisitas *heat killed* untuk *Aeromonas hydrophila* strain GB-01, GPD-02, dan GPL-05 sebagai kandidat vaksin. *Techno*.17(2):094-100.
- Muslikha., S.Pujiyanto, S.N.Jannah, & H.Novita. 2016. Isolasi, karakterisasi *Aeromonas hydrophila* dan deteksi gen penyebab penyakit *motile aeromonas septicemia* (MAS) dengan 16s rRNA dan aerolysin pada ikan lele (*Clarias sp.*). *Jurnal Biologi*. 5 (4):1-7
- Nugroho, D.A. 2017. Imunogenisitas *heat killed* vaksin *A. hydrophila* strain GPI-03, GL-02, dan GK-01, ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*). *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Purwokerto.
- Nur, I. 2006. Respon humoral ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang divaksinasi dengan konsentrasi bakteri *Aeromonas hydrophila* yang berbeda. *Jurnal WARTA-WIPEK*. 14(2): 60-66.
- Olga & Fatmawati. 2013. Efikasi rute vaksin *Aeromonas hydrophila* ASB-01 ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*). *Fish Scientiae*. 4(2):131-144.
- Rosidah., I.D.Buwono, W.Lili, I.B.Suryadi, & A.R.Triandika. 2018. Ketahanan ikan lele sangkuriang (*Clarias gariepinus*) burchell 1822 terhadap *Aeromonas hydrophila* pasca pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera L.*). *Jurnal Iktiologi Indonesia*. 19(1): 97-113.
- Rukyani, A., E.Silvia, A.Sunarto, & Taukhid. 1997. Peningkatan respon kebalnon spesifik pada ikan lele dumbo (*Clarias sp.*) dengan pemberian imunostimulan (glucan). *Jur.Penelitian Perikanan Indonesia*. 4(1):11-14.
- Syahrizal., M.Sugihartono & A.Jasa. 2019. Respon ikan lele (*Clarias gariepinus*, b) dalam wadah jaring hapa yang diberi pakan kombinasi pellet dan usus ayam. *Jurnal Akuakultur Sungai Dan Danau*. 4(2): 50-59.
- Taukhid, T., Sumiati & Andriyanto, S. 2018. Efektivitas metode aplikasi vaksin trivalen untuk pencegahan penyakit bakteri potesial pada budidaya ikan air tawar. *Jurnal Riset Akuakultur*. 13(1): 67-76.
- Trilia, N.A.O., A.Setyawan, Y.T.Adiputra, & Wardiyanto. 2014. Imunogenisitas kombinasi vaksin inaktif whole cell *A. salmonicida* dan jintan hitam (*Nigella sativa*) lihat ikan mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*. 2(2):32-34.