

KARAKTERISTIK BAKTERI ASAM LAKTAT PADA FESES LUWAK DI BEBERAPA WILAYAH PULAU BALI

I Gde Pangestu Putrama Winatha¹, Made Agus Hendrayana², I Dewa Made Sukrama³, Ni Nyoman Sri Budayanti⁴

¹Program Studi Sarjana Kedokteran dan Profesi Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

²Departemen Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

korespondensi: putramawinatha@student.unud.ac.id

ABSTRAK

Kopi luwak merupakan kopi yang difermentasi pada saluran pencernaan luwak yang dapat memberikan cita rasa yang khas pada kopi tersebut. Pada proses saluran pencernaan hewan luwak terdapat bakteri yang memegang peranan penting dalam proses fermentasi biji kopi, yaitu bakteri asam laktat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik bakteri asam laktat pada feses luwak yang memegang peranan penting dalam saluran pencernaan hewan luwak. Penelitian ini adalah penelitian deskriptif dengan rancangan penelitian observasional. Penelitian ini adalah penelitian deskriptif dengan rancangan penelitian observasional. Pada penelitian ini digunakan sebanyak 18 sampel yang diambil dari agrowisata di setiap kabupaten di Pulau Bali. Seluruh sampel diperiksa di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dan Laboratorium Kesehatan Provisinsi Bali. Sampel dikultur pada media MRS-CaCO₃ dan hasil positif bakteri asam laktat akan dilakukan uji gas CO₂, uji pH, uji katalase, uji pewarnaan gram, serta diidentifikasi menggunakan metode *semi automatic BD BBL Crystal*. Dari 18 sampel feses luwak yang dikultur ditemukan 16 diantaranya merupakan bakteri gram positif dan berkatalase negatif yang merupakan ciri ciri bakteri asam laktat. Pada uji gas CO₂ ditemukan 9 koloni bakteri yang bersifat homofermentatif, dan 7 bersifat heterofermentatif. Pada uji pH keseluruhan koloni bakteri berada pada suasana asam dengan rentang pH 4-5. Pada pengamatan di bawah mikroskop ditemukan bentuk bakteri bulat dan batang. Kemudian terdapat beberapa spesies yang ditemukan, yaitu: *Corynebacterium Genitalium*, *Kytococcus sedentarius*, *Streptococcus sanguinis*, dan *Streptococcus faecium*. Pada penelitian ini ditemukan beberapa karakteristik bakteri asam laktat yaitu bakteri gram positif dengan katalase negatif, memiliki suasana pH yang asam, memiliki bentuk bervariasi dari batang hingga bulat, serta dapat bersifat heterofermentatif atau homofermentatif.

Kata Kunci : Kopi luwak, Bakteri asam laktat, Karakteristik

ABSTRACT

Luwak coffee is a coffee that is fermented in the civet's digestive system which can give a distinctive taste to the coffee. Inside of their digestive tract there are bacteria that play an important role in the coffee fermentation process, which is lactic acid bacteria. This study aims to determine the characteristics of lactic acid bacteria in civet feces which play an important role in their digestive tract. This research is a descriptive study with an observational research design. In this study, 18 samples were used from agro-tourism in each district of Bali Island. All sample were examined at the Microbiology Laboratory, Faculty of Medicine, Udayana University, and Bali Public Health Laboratory. All samples were cultured on MRS-CaCO₃ media and positive results of lactic acid bacteria will be tested for CO₂ gas, pH test, catalase test, gram staining test, and identified using semi-automatic method, BD BBL Crystal. Of the 18 samples of civet feces cultured, 15 of them were gram-positive and catalase-negative bacteria, which are the characteristic features of lactic acid bacteria. The CO₂ gas test found 9 bacterial colonies that were homofermentative, and 7 were heterofermentative. In the pH test, the entire bacterial colony was in an acidic environment with a pH range of 4-5. On observation under the microscope found some of them were rod-shaped and round shaped. From the identification process, there were several species found, which are: *Corynebacterium Genitalium*, *Kytococcus sedentarius*, *Streptococcus sanguinis*, dan *Streptococcus faecium*. In this study, characteristics of lactic acid bacteria were found, which are: gram-positive bacteria with negative catalase, acidic pH, have shapes that vary from rods to round, and can be heterofermentative or homofermentative.

Keywords : Civet Coffee, Lactic acid bacteria, Characteristics

PENDAHULUAN

Kopi merupakan salah satu komoditi hasil perkebunan yang memegang peran penting dalam perekonomian Indonesia. Sebagai produsen Indonesia dikenal sebagai negara penghasil

kopi yang menduduki peringkat 4 dunia, setelah Brazil, Vietnam, dan Columbia. Pada tahun 2017 produksi biji kopi di Indonesia mencapai 666,992 ribu ton dan sekitar 467,800 ribu ton yang di ekspor ke luar negeri.¹

Kopi luwak adalah salah satu ciri khas kopi Indonesia. Kopi luwak merupakan kopi yang difermentasi pada saluran pencernaan luwak yang dapat memberikan cita rasa yang khas pada kopi tersebut. Dewasa ini kopi luwak diproduksi dengan jumlah yang terbatas, ditambah lagi dengan permintaan konsumen yang cukup tinggi, hal tersebut menjadikan kopi luwak sebagai salah satu kopi termahal di dunia. Harga kopi luwak perkilogramnya dapat mencapai sekitar Rp. 1.600.000 juta rupiah.²

Dibalik tingginya harga tersebut, proses untuk mendapatkan biji kopi luwak tidaklah mudah. Sebelum menjadi biji kopi luwak yang siap untuk dikonsumsi, banyak tahapan yang harus dilewati. pertama buah kopi yang masih segar disortir terlebih dahulu sebelum diberikan kepada luwak. Setelah disortir, buah kopi tersebut akan diberikan kepada luwak untuk dikonsumsi. Setelah dikonsumsi luwak, mekanisme kimiawi dan biologis pada saluran pencernaan luwak akan merubah komposisi dari buah biji kopi tersebut. Pada umumnya proses fermentasi yang terjadi merupakan proses fermentasi oleh bakteri flora normal pada saluran pencernaan luwak. Proses pencernaan pada luwak tidaklah sempurna, sehingga biji kopi yang dikonsumsi tidak ikut tercerna dan akan dikeluarkan utuh bersamaan dengan kotoran luwak. Pada kotoran luwak tersebut diduga kuat mengandung mikroba maupun enzim yang sangat berperan dalam proses fermentasi biji kopi.

Salah satu mikroba yang berperan penting dalam proses fermentasi ialah bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat dapat membantu proses fermentasi dengan cara menghasilkan enzim-enzim seperti, enzim protease, xilanase, dan selulase yang dapat membantu proses penguraian senyawa-senyawa kompleks dalam biji kopi, menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana.

Untuk menghasilkan biji kopi luwak yang siap dikonsumsi diperlukan waktu yang cukup lama, hal tersebut membuat para peneliti tertarik untuk menghasilkan kopi luwak sintesis dengan kualitas yang setara. Selain mengharapkan kualitas yang setara, tentunya kopi luwak sintesis memiliki tingkat produktivitas yang lebih tinggi daripada kopi luwak dengan proses alami. Oleh karena itu diperlukanya penelitan ini untuk mengetahui karakteristik bakteri pada saluran pencernaan luwak yang berperan penting dalam proses fermentasi biji kopi luwak. Dalam proses identifikasi bakteri asam laktat peneliti menggunakan metode *semi-automatic* BD BBL Crystal untuk mengkonfirmasi karakteristik Bakteri Asam Laktat yang dikultur.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menerapkan jenis penelitian deskriptif dengan rancangan penelitian observasional. Populasi terjangkau penelitian ini adalah beberapa agrowisata yang memproduksi kopi luwak di setiap kabupaten di Pulau. Sedangkan, untuk sampel penelitian yang digunakan yaitu feses luwak yang mengandung biji kopi serta memenuhi kriteria inklusi. Penelitian ini menggunakan teknik *cluster purposive sampling* dengan jumlah sampel sebanyak 18 sampel yang diambil dari 2 agrowisata disetiap kabupaten di Pulau Bali.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dan UPTD Laboratorium Kesehatan Provinsi Bali untuk pengambilan sampel penelitian dilakukan di Pulau Bali. Penelitian telah mendapat <http://ojs.unud.ac.id/index.php/eum>
doi:10.24843.MU.2022.V11.i7.P12

kelaikan etik dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dengan rincian No:449/UN14.2.2.VII.14/LT/2021.

Kultur Bakteri pada Sampel Feses Luwak

Sampel feses luwak dihaluskan dan diambil sebanyak 0,5 gram, lalu dimasukkan kedalam pot cream yang telah berisi larutan *MRS Broth* sebanyak 450 ml, lalu diinkubasi secara anaerob dengan suhu 37°C selama 1x24 jam. Setelah diinkubasi, sebanyak 50 ml suspensi tersebut lalu diencerkan dalam tabung reaksi berisi 450 ml aquades steril, lalu digojok hingga homogen dan dibuat pengenceran 10⁻¹ hingga 10⁻⁶. Setelah diencerkan, dilakukan inokulasi pada cawan petri dengan teknik spread plate dengan volum sebanyak 50 ml. Setelah diinkubasi pada media *MRS-CaCo₃ Agar* ditemukan pertumbuhan bakteri asam laktat dengan ditandai adanya zona bening pada media *MRS-CaCo₃ Agar*. Setelah didapatkan pertumbuhan bakteri asam laktat dilakukan subkultur dengan media yang sama dan langkah yang sama.

Uji Karakteristik Bakteri Asam Laktat pada Sampel Feses Luwak

Dalam proses identifikasi tahap pertama akan dilakukan uji gas untuk mengetahui tipe fermentasi dari bakteri tersebut, lalu dilakukan uji pH untuk mengetahui keadaan pH bakteri yang tumbuh, serta uji pewarnaan gram, dan uji katalase untuk mengetahui morfologi koloni bakteri tersebut secara umum. Setelah dilakukan uji secara konvensional beberapa sampel akan dilakukan proses identifikasi dengan metode *semi-automatic* BD BBL Crystal.

HASIL

Berdasarkan hasil penelitian ini, jumlah sampel feses luwak yang ditemukan adanya pertumbuhan bakteri asam laktat sebanyak 16 dari 18 sampel yang telah memenuhi kriteria inklusi.



Gambar 1. Zona bening akibat reaksi asam-basa pada plate *MRS-CaCo₃* ditunjukkan oleh panah berwarna merah

Dari hasil kultur sampel feses luwak pada media *MRS-CaCo₃* keseluruhan sampel ditemukan adanya pertumbuhan bakteri yang memproduksi asam dengan gambaran zona bening pada media tumbuh yang merupakan hasil reaksi asam-basa antara produk fermentasi yang dihasilkan bakteri dengan media.

Tabel 1. Hasil uji gas dan uji pH dari hasil kultur sampel feses luwak pada media *MRS-CaCO₃*

Sampel	Uji Gas CO ₂	Uji pH
01	+	5
02	-	4
03	-	5
04	+	4
05	+	4
06	+	5
07	-	4
08	+	5
09	-	4
10	+	4
11	+	5
12	+	4
13	-	4
14	-	4
15	-	4
16	-	4
17	-	4
18	-	4

Dapat dilihat pada Tabel 1 merupakan hasil uji pH dan uji gas pada keseluruhan sampel yang telah disubkultur dan diinkubasi secara anaerob selama 1x24 jam.

Tabel 2. Hasil Uji Pewarnaan Gram dan Uji Katalase

Sampel	Uji Pewarnaan Gram		Uji Katalase
	Warna	Bentuk	
01	Ungu	Batang	-
02	Ungu	Batang	-
03	Ungu	Batang	-
04	Ungu	Batang	+
05	Ungu	Batang	-
06	Ungu	Bulat	-
07	Ungu	Batang	-
08	Ungu	Batang	-
09	Ungu	Batang	-
10	Ungu	Batang	-
11	Ungu	Batang	-
12	Ungu	Bulat	-
13	Ungu	Bulat	-
14	Ungu	Bulat	-
15	Ungu	Bulat	-
16	Ungu	Bulat	+
17	Ungu	Bulat	-
18	Ungu	Bulat	-

Selanjutnya sampel dilakukan uji katalase dan uji pewarnaan gram untuk melihat morfologi dari koloni yang akan diidentifikasi. Hasil uji pewarnaan gram dan uji katalase dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 3. Hasil identifikasi menggunakan metode *semi-automatic* BD BBL Crsytal

Sampel	Kultur Identifikasi Bakteri	Ket.
02	<i>Corynebacterium genitalinum</i>	
03	<i>Corynebacterium genitalinum</i>	
06	<i>Kytococcus sedentarius</i>	
07	<i>Corynebacterium genitalinum</i>	
08	<i>Streptococcus sanguinis</i>	
	<i>Corynebacterium genitalinum</i>	
09	<i>Corynebacterium genitalinum</i>	
13	<i>Streptococcus faecium</i>	
14	<i>Streptococcus faecium</i>	
15	<i>Streptococcus faecium</i>	
17	<i>Streptococcus faecium</i>	
18	<i>Streptococcus faecium</i>	

Tahap identifikasi bakteri selanjutnya dilakukan di UPTD Laboratorium Kesehatan Provinsi Bali menggunakan metode *semi-automatic* BD BBL Crystal. Adapula hasil yang didapatkan sebagai berikut: *Corynebacterium genitalinum*, pada sampel nomor (02), (03), (07), (08), (09); *Streptococcus sanguinis* pada sampel nomor (08); dan *Kytococcus sedentarius* pada sampel no (06). Selain itu, ditemukan juga bakteri dengan spesies *Streptococcus faecium* pada sampel nomor (13), (14), (15), (17), dan (18) yang bisa dilihat pada Tabel 3.

PEMBAHASAN

Penelitian bakteri asam laktat pada feses luwak ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengetahui karakteristik bakteri yang berada pada feses luwak di beberapa agrowisata luwak yang tersebar di Pulau Bali. Bakteri asam laktat merupakan bakteri gram positif dengan katalase negatif, yang memegang peranan penting dalam proses fermentasi biji kopi luwak.

Bakteri asam laktat yang diisolasikan ke media *MRS-CaCO₃* akan menghasilkan tampilan bening pada media, yang dimana berasal dari reaksi antara kalsium karbonat dan asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri yang diisolasi. Dari hasil isolasi sampel yang diteliti di Laboratorium Mikrobiologi FK Unud ditemukan penampakan media yang bening yang dapat dilihat pada Gambar 1. Selanjutnya, dilakukan uji pH dan uji gas untuk membantu mengetahui karakteristik dari koloni bakteri yang tumbuh. Pada uji pH dapat menentukan salah satu ciri bakteri asam laktat yaitu, tumbuh pada kondisi asam dengan pH 3-5.³⁻⁵ Untuk uji gas CO₂ bertujuan untuk mengetahui jenis fermentasi yang dihasilkan antara *homofermentative* atau *heterofermentative* yang dimana juga dilakukan pada penelitian belakangan ini.⁶ Berdasarkan hasil uji yang telah dilaksanakan, seluruh isolat bakteri didapatkan memiliki pH asam, golongan fermentasi bakteri tersebut dapat dilihat dari hasil pengujian gas CO₂ dengan hasil yang dapat dilihat pada tabel 1, dengan hasil sebagai berikut: koloni yang termasuk golongan *heterofermentative* yaitu sampel dengan no (01), (04), (05), (06), (08), (10), (11), (12), sementara yang termasuk golongan *homofermentative* yaitu sampel dengan no (02), (03), (07), (09), (13), (14), (15), (16), (17), (18).

Kemudian seluruh sampel dilakukan uji katalase dan pewarnaan gram untuk mengetahui karakteristik lebih lanjut. Uji katalase sendiri bertujuan untuk mengetahui salah satu ciri-ciri

bakteri asam laktat yaitu pada umumnya tidak memiliki katalase.⁵⁻⁷ Didapatkan hasil katalase negative pada seluruh sampel, kecuali pada sampel nomor (04), dan (16). Dari hasil pewarnaan gram sendiri, dapat dibedakan bakteri gram negative yang akan menunjukkan warna merah, dan warna biru/ungu pada bakteri gram positif di bawah pengamatan mikroskop. Hal tersebut disebabkan oleh bakteri gram negatif yang memiliki lapisan peptidoglikan lebih tipis daripada bakteri gram positif. Pada saat pengamatan dapat terlihat bentuk dari isolat yaitu beberapa ada yang batang (*bacil*) dan ada yang bulat (*coccus*).

Dari beberapa sampel yang telah diuji, selanjutnya akan dilakukan identifikasi menggunakan metode semi-automatic BD BBL Crystal. Ditemukan koloni bakteri antara lain *Corynebacterium Genitalium* pada sampel no (02), (03), (07), (09), *Kytococcus sedentarius* pada sampel no (06), *Streptococcus sanguinis* pada sampel no (08), dan *Streptococcus faecium* pada sampel no (13), (14), (15), dan sampel no (17), (18). Dari beberapa spesies tersebut diketahui genus *Streptococcus sp* merupakan genus bakteri yang termasuk dalam ordo *Lactobacillales* yaitu ordo bakteri yang dapat memproduksi asam laktat sebagai produk akhir dari fermentasi karbohidrat.⁸

Spesies *Streptococcus* yang teridentifikasi pada penelitian ini, juga teridentifikasi sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Fauzi³, yang dimana terdapat *S. faecium* yang berasal dari sampel berupa feses luwak. Sementara itu, *S. sanguinis* sendiri merupakan bakteri komensal yang terdapat pada rongga mulut yang biasanya dapat menyebabkan infeksi oportunistik.⁹ *Kytococcus sedentarius*¹⁰ merupakan spesies bakteri yang diisolasi dari lingkungan perairan. Bakteri ini merupakan bakteri gram positif, yang dapat hidup bebas dan bersifat non motil. *K. sedentarius* sendiri merupakan sumber dari antibiotik monensin A dan B karena kemampuannya untuk menghasilkan antibiotik oligoketide, serta dapat menjadi patogen oportunistik pada tubuh manusia.^{10,11} Sementara itu, *Corynebacterium sp* merupakan bakteri gram positif, berbentuk batang atau *club-shaped*, non motil. Bakteri ini tersebar luas di alam dan biasanya bersifat komensal dengan hostnya. Bakteri ini juga dapat bersifat patogen pada manusia yang biasanya dikenal dapat menyebabkan penyakit difteri (*C. diphtheriae*).¹²

Beberapa spesies bakteri diatas tidak disebutkan pada penelitian serupa oleh Fauzi, Sritamin yang tentunya hal tersebut dapat dipengaruhi oleh banyak faktor.^{3,13} Perbedaan media yang digunakan merupakan salah satu faktor yang menyebabkan perbedaan hasil identifikasi dari bakteri terkait. Pada penelitian ini media yang digunakan merupakan media non-selective MRS yang dikombinasikan dengan kalsium karbonat (CaCO₃). Sementara itu, penelitian oleh Fauzi³, menggunakan media agar tegak miring PGY-CaCO₃. itu, tahap pengenceran yang dilakukan juga berbeda. Hal ini dapat menyebabkan jumlah serta jenis bakteri yang tumbuh dapat berkurang.^{3,13}

Selain subjek penelitian yang kurang, pengujian yang dilakukan pada penelitian ini juga masih bisa dikatakan kurang untuk menunjang penelitian bakteri asam laktat yang utuh. Hal tersebut dikarenakan keterbatasan biaya, fasilitas dan waktu peneliti dalam pengusulan penelitian ini.

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dipaparkan diatas dari 18 sampel, semua isolat bakteri merupakan bakteri gram positif. Pada uji katalase, hanya terdapat 2 bakteri yang bersifat katalase positif, maka dari itu 16 isolat bakteri dengan katalase negatif lainnya merupakan bakteri asam laktat. Pada tahap uji pH ditemukan keseluruhan sampel berada pada rentang pH 4-5 yang merupakan suasana asam. Dari 16 sampel tersebut 7 diantaranya bersifat heterofermentatif, dan 9 lainnya merupakan homofermentatif. Pada uji pewarnaan gram didapatkan bentuk bakteri bervariasi terdapat bentuk batang dan bulat. Spesies bakteri yang ditemukan dari 16 sampel yang diduga BAL, yaitu: *Corynebacterium Genitalium*, *Kytococcus sedentarius*, *Streptococcus sanguinis*, dan *Streptococcus faecium*

Berdasarkan simpulan diatas, peneliti ingin memberikan saran untuk dilakukan penelitian lebih lanjut dengan sampel feses luwak yang lebih banyak sehingga hasil yang didapat lebih mempresentasikan keadaan. Selain itu, untuk penelitian lebih lanjut juga disarankan untuk melakukan pengujian lebih banyak dan lebih mendalam untuk mengetahui kemampuan serta karakteristik bakteri asam laktat lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Badan Statistik Indonesia. Statistik Kopi Indonesia [Internet]. Sub Direktorat Statistik Tanaman Perkebunan, editor. Vol. 91. 2017 [dikutip 26 April 2019]. 399–404 hal. Tersedia pada: <https://www.bps.go.id/publication/download.html?nrbvfeve=NzFIN2FkYTYxYjEzZTU5YmUwYjFiZjgw&xzmn=aHR0cHM6Ly93d3cuYnBzLmdvLmlkL3B1YmxpY2F0aW9uLzIwMTgvMTIvMjAvNzFIN2FkYTYxYjEzZTU5YmUwYjFiZjgwL3N0YXRpc3Rpay1rb3BpLWluZG9uZXNpYS0yMDE3Lmhh0bWw%3D&twoadfnoraufeuf=M>
2. Jpw Coffee. Jpw Pricelist 2018 [Internet]. 2018 [dikutip 27 April 2019]. Tersedia pada: <https://drive.google.com/file/d/17hcjCOiwniRLpwdaE8KC2iXInRDB4jXc/view>
3. Fauzi M. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Biji Kopi Luwak (Civet Coffe) [Internet]. [Jember]: Fakultas Teknologi Pertanian; 2008 [dikutip 25 April 2019]. Tersedia pada: <https://repository.unej.ac.id/bitstream/handle/123456789/59366/ISOLASI.pdf?sequence=1>
4. Amaliah ZZN, Bahri S, Amelia P. Limbah Cair Rendaman Kacang Kedelai. J Agroekoteknologi. 2018;5(1):253–7.
5. Utama CS, Zuprizal, Hanim C, Wihandoyo. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Selulolitik yang Berasal dari Jus Kubis Terfermentasi. J Apl Teknol Pangan. 2018;7(1):1–6.

6. Suardana IW, Sukoco H, Antara NS. Identifikasi Bakteri Asam Laktat Isolat 18A Secara Fenotipik. *Bul Vet Udayana*. 2018;10(1):1.
7. Amelia R, Philip K, Pratama YE, Purwati E. Characterization and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from dadiah sampled in West Sumatra. *Food Sci Technol*. 2020;2061:4–10.
8. Du Toit M, Huch M, Cho GS, Franz CMAP. The genus *Streptococcus*. *Lact Acid Bact Biodivers Taxon*. 2014;9781444333:457–505.
9. Pramesti HT. *Streptococcus sanguinis* as an opportunistic bacteria in human oral cavity: Adherence, colonization, and invasion. Vol. 28, *Padjadjaran Journal of Dentistry*. 2016.
10. Sims D, Brettin T, Detter JC, Han C, Lapidus A, Copeland A, et al. Complete genome sequence of *Kytococcus sedentarius* type strain (541). *Stand Genomic Sci*. Juli 2009;1(1):12–20.
11. Lim KR, Son JS, Moon S. Case Report of Infectious Spondylitis Caused by *Kytococcus sedentarius*. 2021;2–5.
12. Zasada AA. Contemporary microbiology and identification of *Corynebacteria* spp . causing infections in human. 2018;(May 2010).
13. Sritamin M, Studi P, Fakultas A, Universitas P. Nandur. 2021;1(3):139–47.