

Penambahan Fruktosa Mempertahankan Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Kalkun yang Disimpan pada Suhu 4 °C

(FRUCTOSE SUPPLEMENTATION MAINTAIN THE MOTILITY OF TURKEY SPERMATOZOA STORED AT 4 °C)

Wahyu Kusuma Atmaja¹, Made Kota Budiassa², Wayan Bebas²

¹Mahasiswa Program Profesi Dokter Hewan

²Laboratorium Reproduksi Veteriner

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana.

Jln. P.B. Sudirman Denpasar Bali tlp 0361-223791

Email : wahyudjayadiningrat@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui akibat penambahan fruktosa pada pengencer kuning telur fosfat terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa kalkun yang disimpan pada suhu 4 °C. Sumber semen berasal dari seekor kalkun berumur 1,5 tahun yang diambil dengan teknik penampungan semen menggunakan metode pemijatan. Kemudian semen diencerkan dengan pengencer kuning telur fosfat yang ditambahkan fruktosa 0 w/v%, 0,3 w/v%, 0,6 w/v %, dan 0,9 w/v %. Pengamatan dilakukan setiap 12 jam dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x dimulai pada waktu penyimpanan sampai 84 jam. Hasil pengujian menunjukkan bahwa penambahan fruktosa memberikan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa kalkun yang disimpan pada suhu 4 °C, kemudian uji lanjutan *Duncan* menunjukkan bahwa penambahan fruktosa dengan konsentrasi 0,6 w/v % memberikan hasil terbaik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa kalkun hingga 46 w/v % dan daya hidup mencapai 51,33 w/v % selama 72 jam penyimpanan pada suhu 4 °C. Kesimpulannya adalah penambahan fruktosa pada pengencer kuning telur fosfat mampu mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa kalkun yang disimpan pada suhu 4 °C.

Kata kunci : semen kalkun, fruktosa, penyimpanan suhu 4 °C.

ABSTRACT

The purpose of this research is to find out additional fructose in egg yolks phosphate diluent motility and endurance of turkey spermatozoa stored at 4 °C. Semen derived from a turkeys 1,5 year old taken with semen collection by abdominal massage method. Semen diluted with egg yolk phosphate then fructose added 0 w/v%, 0,3 w/v%, 0,6 w/v %, and 0,9 w/v %. The observation taken every 12 hours using a light microscope that enlarged 400x began in storage until 84 hours. The result indicating that the addition of fructose give the real difference ($p < 0.05$) to motility and endurance of turkey spermatozoa that stored at 4 °C, the next *Duncan* test to show that addition fructose by concentration of the 0,6 w/v % give the best result to maintain motility of turkey spermatozoa up to 46 w/v % and the endurance up to 51,33 w/v % during 72 hours storage at 4 °C. Conclusions additional fructose in egg yolks phosphate diluent supplementation maintain the motility of turkey spermatozoa stored at 4 °C

Key word: turkey's semen, fructose, stored at 4 °C.

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang berlimpah, diantaranya adalah jenis-jenis ayam, baik ayam lokal asli Indonesia maupun ayam lokal yang telah lama beradaptasi di Indonesia. Beberapa rumpun ayam di Indonesia merupakan plasmanutfah atau sumberdaya genetik yang masih perlu digali potensinya baik sebagai penghasil daging, telur ataupun klangenan (*fancy*). (Nataamijaya, 2000).

Kalkun adalah salah satu jenis unggas yang berukuran besar dari ordo *Galliformes* genus *Meleagris*. Kalkun domestikasi yang dternakkan untuk diambil dagingnya adalah spesies *Meleagris gallopavo* yang juga dikenal sebagai kalkun liar dan memiliki sepasang pial (*Wild Turkey*). Kalkun sendiri memiliki bobot tubuh yang bisa mencapai 5 kilogram dengan rentang sayap 1,5-1,8 meter per ekor, sehingga cocok sebagai ternak pedaging. Melihat perkembangan akhir-akhir ini kalkun mulai diperhitungkan untuk dternakkan, karena daging kalkun di Indonesia sudah mulai diminati dan disajikan sebagai salah satu menu di pesta-pesta, hotel, bahkan restoran.

Masalah utama yang sering timbul pada produktivitas kalkun adalah rendahnya fertilitas dan daya tetas telur. Salah satu faktor yang mempengaruhi fertilitas dan daya tetas telur adalah proses perkawinan pada saat kawin alami, karena adanya perbedaan berat badan yang mencolok antara jantan dan betina. Oleh karena itu untuk pengembangan varietas ternak kalkun perlu dilakukannya teknologi inseminasi buatan (IB) sehingga bisa dilakukan proses seleksi genetik serta dapat menghasilkan produk bibit yang unggul.

Dalam penerapan inseminasi buatan kualitas semen harus tetap dipertahankan sampai semen tersebut diinseminasikan. Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap kualitas semen adalah sifat-sifat fisik dan kimia bahan pengencer (pH, tekanan osmose, elektrolit yang terkandung), kadar pengencer, cahaya, suhu, dan lama penyimpanan (Toelihere, 1985).

Penggunaan bahan pengencer kuning telur fosfat untuk keperluan IB jangka panjang selama penyimpanan berfungsi sebagai sumber energi bagi *spermatozoa*, sebagai agen pelindung terjadinya kejutan dingin (*cold shock*), sebagai penyangga (*buffer*) bila terjadinya perubahan pH, untuk mempertahankan tekanan osmotik, memperbanyak volume, keseimbangan elektrolit, dan mencegah pertumbuhan kuman dan bakteri. Pengenceran semen adalah upaya untuk memperbanyak volume semen, mengurangi kepadatan spermatozoa serta menjaga kelangsungan

hidup spermatozoa sampai batas waktu penyimpanan tertentu pada kondisi penyimpanan di bawah atau di atas titik beku (Situmorang, 2002).

Menurut Yildiz *et al.* (2000) fungsi gula dalam larutan pengencer adalah bertindak sebagai krioprotektan, mempertahankan tekanan osmosis larutan pengencer dan sebagai sumber energi bagi spermatozoa selama inkubasi pada proses pembuatan semen. Fruktosa merupakan monosakarida yang telah terbukti dapat meningkatkan daya tahan spermatozoa (Maxwell dan Salamon, 1993). Dan juga kadar fruktosa mempunyai korelasi yang positif dengan motilitas semen (Chakrabarti dan Guha, 1993).

Berdasarkan latar belakang diatas, dapat dibuat rumusan masalah sebagai berikut: Apakah dengan penambahan fruktosa pada pengencer mampu mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa kalkun yang disimpan pada suhu 4°C.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh penambahan fruktosa pada pengencer kuning telur terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa kalkun yang disimpan pada suhu 4°C. Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bahwa penambahan fruktosa pada pengencer kuning telur fosfat dapat mempertahankan kualitas semen dalam kurun waktu tertentu, sehingga upaya inseminasi buatan (IB) pada kalkun bisa dilakukan setiap waktu.

METODE PENELITIAN

Hewan Percobaan

Penelitian ini menggunakan seekor kalkun jantan dengan umur 1,5 tahun sebagai sumber semen yang dimana sebelum dilakukan penampungan semen dilakukan adaptasi terhadap kalkun terlebih dahulu selama 1 minggu.

Pembuatan Pengencer Kuning Telur Fosfat dengan Penambahan Fruktosa

Pengencer kuning telur fosfat dibuat dengan cara melarutkan 1 tablet buffer fosfat kedalam 100 ml aquadestilata dan dipanaskan diatas kompor listrik selama 10 menit sambil diaduk agar homogen dan selanjutnya didinginkan. Untuk membuat pengencer kuning telur fosfat dilakukan dengan memecahkan telur dibagian tengah untuk mendapatkan kuning telur yang masih utuh dan terpisah dari putih telur. Agar kuning telur benar-benar bebas dari putih telur maka kuning telur digelindingkan diatas kertas saring steril kemudian kuning telur

ditempatkan pada gelas beker dan dilakukan tusukan kuning telur agar pecah. Campurkan kuning telur kedalam larutan PBS dengan konsentrasi 20%, tambahkan kanamycin dengan dosis 80 mg/l kedalam bahan pengencer fosfat kuning telur untuk melindungi spermatozoa dari kontaminasi mikroorganisme. Fruktosa sebelum ditambahkan kedalam kuning telur fosfat, terlebih dahulu dilakukan penimbangan dengan menggunakan neraca analitik sesuai dengan rancangan. Kemudian campurkan fruktosa kedalam pengencer kuning telur fosfat.

Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 kelompok perlakuan yaitu: Kelompok I (T_0) sebagai kontrol menggunakan bahan pengencer kuning telur fosfat tanpa fruktosa, Kelompok II (T_1) menggunakan bahan pengencer kuning telur fosfat + fruktosa 0,3 w/v %, Kelompok III (T_2) menggunakan bahan pengencer kuning telur fosfat + fruktosa 0,6 w/v %, Kelompok IV (T_3) menggunakan bahan pengencer kuning telur fosfat + fruktosa 0,9 w/v %. Konsentrasi fruktosa 0,3 w/v %. Pembuatan dengan cara menimbang 0,3 g fruktosa lalu dilarutkan dalam 100 ml pengencer kuning telur fosfat. Konsentrasi fruktosa 0,6 w/v % dibuat dengan menimbang 0,6 g fruktosa lalu dilarutkan dalam 100 ml pengencer kuning telur fosfat, sedangkan untuk konsentrasi fruktosa 0,9 w/v % dibuat dengan menimbang 0,9 g fruktosa lalu dilarutkan dalam 100 ml pengencer kuning telur fosfat.

Teknik Penampungan Semen

Penampungan semen dilakukan dengan menggunakan metode pengurutan pada ujung belakang tubuh pejantan tepat di bawah tulang pubis. Penampungan sebaiknya dilakukan oleh 2 orang (Suprijatna *et al.*, 2005), satu orang memegang kalkun dan lainnya melakukan pengurutan dan penampungan semen. Pemijatan itu sendiri dilakukan secara cepat dan kontinyu pada punggung kalkun sampai pejantan memberi respon dengan mengangkat ekor dan mengeluarkan papilae. Setelah papilae keluar, jari telunjuk kanan dan kiri bekerjasama memerah keluarnya semen sampai refleksi ejakulasi menghilang. Semen yang keluar ditampung dengan cawan petri dan dihindarkan dari kontaminan. Setelah itu dilakukan pemeriksaan semen secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan semen secara makroskopis meliputi volume, warna, bau, konsistensi dan pH. Sedangkan pemeriksaan secara mikroskopis meliputi gerakan massa, konsentrasi, motilitas dan persentase hidup atau mati.

Pengenceran Semen

Pengenceran semen dilakukan dengan memasukkan semen kedalam bahan pengencer, kemudian semen yang telah diencerkan disimpan pada refrigerator dengan suhu 4°C untuk dilakukan pengamatan selanjutnya.

Pengamatan Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa

Pengamatan terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa dilakukan setiap 12 jam sampai motilitasnya 40% dan daya hidup spermatozoa dibawah 45%. Pengamatan terhadap motilitas dilakukan dengan menghomogenkan semen terlebih dahulu lalu ditetaskan diatas *object glass* dan ditutup dengan *cover glass* selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop untuk melihat jumlah spermatozoa yang bergerak. Sedangkan pengamatan terhadap daya hidup spermatozoa dilakukan dengan pewarnaan eosin sitrat dengan cara semen diambil dan ditetaskan 1 tetes pada *object glass* kemudian ditetaskan pewarna eosin sitrat sebanyak 1 tetes selanjutnya dibuat preparat hapus dan dianginkan sampai kering, kemudian preparat diperiksa dibawah mikroskop untuk menghitung jumlah spermatozoa yang masih hidup.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian penambahan fruktosa pada pengencer kuning telur fosfat terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa kalkun yang disimpan pada suhu 4°C dapat dilihat pada tabel 1 dan 2.

Tabel 1 Rata-rata ($\bar{x} \pm SD$) motilitas spermatozoa kalkun pada pengencer kuning telur fosfat dengan penambahan fruktosa yang disimpan pada suhu 4°C

Waktu Pengamatan	Motilitas ($^w/v$ %)			
	Kontrol	Fruktosa 0,3	Fruktosa 0,6	Fruktosa 0,9
0 jam	85.00 ± 0.00	85.00 ± 0.00	85.00 ± 0.00	85.00 ± 0.00
12 jam	78.33 ± 0.57	80.67 ± 1.52	82.33 ± 0.57	81.00 ± 1.00
24 jam	72.00 ± 2.00	74.67 ± 1.52	79.00 ± 1.00	76.33 ± 1.52
36 jam	65.67 ±	68.00 ±	76.67 ±	70.00 ±

jam	1.52	2.00	0.57	1.00
48	55.00 ±	61.33 ±	70.00 ±	62.00 ±
jam	5.00	3.05	5.00	4.58
60	38.67 ±	52.33 ±	57.67 ±	52.33 ±
jam	1.52	2.51	2.51	2.51
72	29.67 ±	41.00 ±	46.00 ±	42.33 ±
jam	5.03	6.55	4.00	5.50
84	19.67 ±	29.00 ±	37.67 ±	34.00 ±
jam	0.57	1.00	1.15	1.00

Tabel 2 Rata-rata ($\bar{x} \pm SD$) daya hidup spermatozoa kalkun pada pengencer kuning telur fosfat dengan penambahan fruktosa yang disimpan pada suhu 4 °C

Waktu Pengamatan	Daya Hidup ($^w/v$ %)			
	Kontrol	Fruktosa 0,3	Fruktosa 0,6	Fruktosa 0,9
0 jam	94.00 ± 1.00	94.00 ± 1.00	94.67 ± 0.57	94.67 ± 0.57
12 jam	91.00 ± 1.00	91.67 ± 0.57	91.67 ± 0.57	91.00 ± 1.00
24 jam	83.67 ± 4.50	84.00 ± 5.00	89.33 ± 0.57	87.67 ± 1.52
36 jam	72.33 ± 4.04	71.00 ± 4.58	83.67 ± 4.50	80.33 ± 4.50
48 jam	60.67 ± 2.08	59.00 ± 4.58	70.33 ± 5.50	68.67 ± 4.04
60 jam	51.67 ± 4.72	48.33 ± 2.51	60.00 ± 3.00	59.33 ± 1.52
72 jam	40.00 ± 4.58	41.00 ± 1.00	51.33 ± 2.51	50.33 ± 5.13
84 jam	31.33 ± 1.52	36.67 ± 2.51	40.67 ± 4.04	40.33 ± 2.51

Hasil pengujian statistik menggunakan uji *General Linear Model (Multivariate)* menunjukkan bahwa penambahan fruktosa memberikan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa kalkun yang disimpan pada suhu 4 °C, kemudian uji lanjutan *Duncan* menunjukkan bahwa penambahan fruktosa dengan konsentrasi 0,6 $^w/v$ % memberikan hasil terbaik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa kalkun hingga 46 $^w/v$ % dan daya hidup mencapai 51,33 $^w/v$ % selama 72 jam penyimpanan pada suhu 4 °C.

Penggunaan bahan pengencer kuning telur fosfat untuk keperluan IB jangka panjang selama penyimpanan berfungsi sebagai sumber energi bagi spermatozoa, sebagai agen pelindung terjadinya kejutan dingin, dan juga sebagai penyangga (*buffer*). Disamping bahan pengencer, penyimpanan pada suhu dingin (4°C) diperlukan agar spermatozoa dapat disimpan lebih lama (Rizal, 2005). Penyimpanan semen pada suhu dingin dapat menyebabkan kejutan dingin yang dapat merusak membran plasma sel dan mengakibatkan kematian pada spermatozoa (*Souhoka et al., 2009*). Karbohidrat merupakan senyawa yang dapat berperan sebagai krioprotektan ekstraseluler yang berfungsi melindungi membran plasma sel dari kerusakan. Gula baik monosakarida, disakarida maupun polisakarida dapat berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler yang berperan dalam melindungi spermatozoa selama proses penyimpanan pada suhu dingin (Rizal *et al.*, 2003). Fruktosa merupakan monosakarida yang telah terbukti dapat meningkatkan daya tahan spermatozoa (Maxwell dan Salamon, 1993). Semakin banyak fruktosa yang terdapat dalam semen maka akan semakin tinggi motilitasnya karena fruktosa akan menghasilkan ATP yang sangat penting untuk kontraksi fibril-fibril pada ekor sperma yang berfungsi untuk menimbulkan pergerakan pada spermatozoa (Hammerstedt, 1993).

Pada penelitian ini dilakukan penambahan konsentrasi fruktosa ($0\text{ }^{\text{w/v}}\%$, $0,3\text{ }^{\text{w/v}}\%$, $0,6\text{ }^{\text{w/v}}\%$ dan $0,9\text{ }^{\text{w/v}}\%$) ke dalam bahan pengencer kuning telur fosfat untuk penyimpanan spermatozoa kalkun pada suhu 4°C . Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara umum penambahan fruktosa pada pengencer kuning telur fosfat mampu mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa kalkun yang disimpan pada suhu 4°C . Hal ini terbukti dari hasil penelitian yang menunjukkan bahwa penambahan fruktosa secara nyata ($p<0,05$) serta dapat mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa kalkun pada pengencer kuning telur fosfat yang disimpan pada suhu 4°C bila dibandingkan dengan kontrol.

Uji lanjutan dengan menggunakan uji Duncan menunjukkan bahwa penambahan fruktosa dengan konsentrasi $0,6\text{ }^{\text{w/v}}\%$ memberikan hasil yang terbaik terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa kalkun pada pengencer kuning telur fosfat yang disimpan pada suhu 4°C . Hal ini diperkuat dengan hasil penelitian *Souhoka et al., (2009)* bahwa perlakuan laktosa $0,6\text{ }^{\text{w/v}}\%$ mampu mempertahankan persentase spermatozoa motil kambing etawah hingga 40% selama empat hari. Pada konsentrasi fruktosa $0,3\text{ }^{\text{w/v}}\%$ terjadi penurunan terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa, kemungkinan ini disebabkan karena senyawa krioprotektan ekstraseluler pada konsentrasi tersebut belum maksimal untuk mencegah terjadinya kejutan dingin terhadap

spermatozoa. Sedangkan pada konsentrasi fruktosa 0,9 % juga terjadi penurunan motilitas dan daya hidup spermatozoa, diduga hal ini karena penambahan senyawa krioprotektan ekstraseluler dalam jumlah banyak dapat mengakibatkan peningkatan tekanan osmotik larutan pengencer dan kurang bisa diadaptasi dengan baik oleh spermatozoa sehingga berakibat buruk terhadap berlangsungnya proses metabolisme spermatozoa.

Disamping fruktosa sebagai krioprotektan ekstraseluler, fruktosa juga dapat berfungsi sebagai sumber energi cadangan bagi spermatozoa. Dimana dalam proses penyimpanan pada suhu dingin (4°C), proses metabolisme spermatozoa akan tetap berlangsung meskipun terjadi penurunan metabolisme. Sehingga spermatozoa akan selalu membutuhkan energi untuk dapat bermetabolisme selama proses penyimpanan. Hal tersebut menyebabkan lama waktu penyimpanan berpengaruh terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa.

Selain sebagai sumber energi fruktosa diduga mampu mempertahankan tekanan osmotik dari larutan pengencer serta mempertahankan integritas membran plasma utuh (Maxwell dan Salamon, 1993). Selain penambahan fruktosa integritas membran dapat pula dipertahankan dengan menambahkan kuning telur fosfat pada pengencer karena dalam kuning telur terdapat lipoprotein dan lesitin yang dapat melapisi membran plasma sel sehingga mampu mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein spermatozoa dan melindunginya dari cekaman dingin (Feradis, 1999).

SIMPULAN

Dari hasil pembahasan diatas dapat disimpulkan bahwa: Penambahan fruktosa pada pengencer kuning telur fosfat memberikan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa kalkun yang disimpan pada suhu 4°C, motilitas dan daya hidup spermatozoa penambahan fruktosa yang terbaik terdapat pada konsentrasi 0,6 % , lama waktu penyimpanan menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap penurunan motilitas dan daya hidup spermatozoa kalkun pada pengencer kuning telur fosfat dengan penambahan fruktosa yang disimpan pada suhu 4°C.

SARAN

Dari kesimpulan diatas dapat disarankan : Perlu dilakukan penelitian yang lebih lanjut terhadap fertilitas telur kalkun yang diinseminasikan dengan semen yang disimpan pada suhu 4°C dengan penambahan fruktosa pada pengencer kuning telur fosfat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Laboratorium Reproduksi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana yang telah memberikan fasilitas sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

- Chakrabati A, Guha S. 1993. Indian Journal of Veterinary Medicine. Departement of Veterinary Medicine, Punjab Agricultural University. New Delhi. Vol. 10-16.
- Feradis. 1999. Penggunaan Antioksidan dalam Pengencer Semen Beku dan Metode Sinkronisasi Estrus pada Program Inseminasi Buatan Domba St. Croix, Disertasi Doktor. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Hammerstedt RH. 1993. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod Fertil Dev* 5(6):675-690.
- Maxwell, WMC., Salamon S. 1993. Liquid storage of ram semen : a Review. *Reprod Fertil Dev* 5: 601-612.
- Nataamijaya, A.G. 2000. The native chicken of Indonesia. Bull. Plasma Nutfah 6(1): 1-6.
- P. Situmorang. 2002. Pengaruh jenis dan aras krioprotektan terhadap daya hidup spermatozoa entog. JITV 7: 244 – 250.
- Rizal, M. 2005. Efektivitas Berbagai Konsentrasi Betakarotein terhadap Kualitas Semen Beku Domba Garut. Animal Production, 7 (1) Januari 2005:6-13.
- Rizal, M., M. R. Toelihere, T. L. Yusuf, B. Purwantara dan P. Situmorang. 2003. Kriopreservasi Semen Domba Garut dalam Pengencer Tris dengan Konsentrasi Laktosa yang berbeda. Media Kedokteran Hewan. 19 (2) : 79-83

Souhoka, D. F., M. J. Matatula, W. M. Mesang-Nalley, M. Rizal. 2009. Laktosa Mempertahankan Daya Hidup Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah yang Dipreservasi dengan Plasma Semen Domba Priangan. *J Vet.* 10 (3) : 135-142

Toelihere, M. R. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Angkasa, Bandung.

Yildiz, C., A. Kaya, M. Aksoy and T. Tekeli. 2000. *Influence of Sugar Supplementation of the Extender on Motility, Viability and Acrosomal Integrity of Dog Spermatozoa During Freezing.* *Theriogenology.* 54 : 579-585.