



Isolasi Bakteri Patogen Penyebab Penyakit Moko Pada Daging Buah Pisang Cavendish (*Musa acuminata* Colla) Muda di PT Great Giant Pineapple, Lampung

Khusnul Nur Afifah¹, Mahfut^{1*}, Ratdiana²

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung

²Laboratorium, Mikrobiologi, *Research and Development*, PT Great Giant Pineapple, Lampung Tengah

*Corresponding Author: mahfut.mipa@fmipa.unila.ac.id

ABSTRACT

Cavendish (Musa acuminata Colla) is a type of banana that is widely cultivated in Lampung, Indonesia, and is a major product of PT Great Giant Pineapple (GGP). However, the cultivation of Pisang Cavendish is often hindered by various diseases, including Moko disease caused by the bacterium Ralstonia solanacearum. To control the pathogenic bacteria that infect Pisang Cavendish, a study was conducted to isolate the pathogenic bacteria from young Pisang Cavendish fruit flesh. The bacteria were isolated and purified using a special medium called Tripheny Tetrazolium Chloride (TZC). The final step was to perform a Total Plate Count (TPC) test to determine the number of bacterial colonies. The results showed that the pathogenic bacteria causing Moko disease in young Pisang Cavendish fruit flesh at PT GGP were obtained from samples that showed symptomatic fruit flesh containing a white-grayish to reddish-brown mucus-like liquid that contained many bacteria. The macroscopic characterization of the bacteria showed that they had a single colony shape that was irregular, convex, and had a smooth edge. The center of the colony was red, while the edge was opaque white and had a diameter of less than 1µm during the 24-48 hour incubation period on TZC media.

Keywords: *Cavendish, Isolation, Infection, Moko, Pathogen.*

Abstrak

Cavendish (*Musa acuminata* Colla) merupakan salah satu jenis pisang yang banyak dibudidayakan di Lampung. Salah satu perusahaan di Lampung telah banyak menghasilkan buah pisang Cavendish yaitu PT Great Giant Pineapple (GGP). Dalam proses pembudidayaan pisang Cavendish, terdapat kendala atau hambatan yaitu terinfeksi beberapa penyakit atau patogen tanaman yang dapat menurunkan kualitas buah pisang. Salah satu penyakit tanaman yang menjadi kendala utama dalam pembudidayaan pisang Cavendish adalah penyakit moko. Tanaman yang terkena infeksi penyakit moko disebabkan oleh bakteri *Ralstonia Solanacearum*. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan upaya dalam mengendalikan bakteri patogen yang menginfeksi pada tanaman pisang cavendish yaitu dengan melakukan isolasi bakteri patogen pada daging buah pisang cavendish muda sehingga dapat diketahui karakteristik bakteri patogen tersebut. Media yang digunakan untuk isolasi dan pemurnian isolat bakteri patogen tersebut menggunakan media khusus yaitu *Tripheny Tetrazolium Chloride* (TZC), Langkah akhir yang dilakukan adalah uji *Total Plate Count* (TPC) untuk mengetahui jumlah koloni bakteri. Hasil isolasi bakteri patogen penyebab penyakit moko pada daging buah pisang Cavendish muda di PT GGP diperoleh dari sampel yang menunjukkan daging buah pisang bergejala yaitu berisi cairan seperti lendir berwarna putih keabuan hingga coklat kemerahan yang mengandung banyak bakteri. Hasil karakterisasi yang telah dilakukan secara makroskopis didapatkan karakter morfologi yaitu memiliki bentuk koloni tunggal berbentuk bulat tidak beraturan, cembung, pinggir rata, berwarna merah pada bagian tengah koloni, sedangkan pada bagian tepi berwarna putih keruh dan diameter kurang dari 1µm selama masa inkubasi 24 - 48 jam pada media TZC.

Kata Kunci : *Cavendish, Isolasi, Infeksi, Moko, Patogen*

PENDAHULUAN

Pisang (*Musa spp.*) merupakan tanaman yang banyak ditanam di Indonesia, dan buahnya banyak dikonsumsi oleh masyarakat. Saat ini pisang dijadikan buah unggulan nasional dan upaya untuk meningkatkan hasil serta mutu terus dilakukan⁽¹⁾. Pisang merupakan salah satu buah yang memberikan banyak manfaat bagi tubuh. Buah pisang mengandung banyak serat, antioksidan dan vitamin yang baik bagi tubuh selain itu pisang juga dapat meningkatkan kesehatan pencernaan⁽²⁾.

Produksi buah pisang di Lampung pada tahun 2017 mencapai 1.642.000 ton. Selain untuk keperluan konsumsi lokal, buah ini juga diekspor ke luar negeri terutama ke Tiongkok, Singapura dan Spanyol. Pisang Cavendish (*Musa acuminata Colla*) merupakan salah satu kultivar pisang yang komersial di dunia selain *Baby banana* dan *Monkey*. Pengembangan kultivar kelompok Cavendish di Indonesia menghadapi kendala adanya beberapa infeksi penyakit pada tanaman pisang⁽¹⁾

Salah satu masalah utama dalam budidaya tanaman pisang cavendish di Lampung, bahkan di Indonesia, adalah terinfeksi penyakit moko yang disebabkan oleh bakteri *Ralstonia sp.*⁽³⁾. Penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* pada tanaman pisang dalam kondisi rumah kaca, menghasilkan kerugian serius pada banyak tanaman ekonomi penting di seluruh dunia. Layu bakteri ini dikenal dengan penyakit Moko^(3,4).

Kerusakan yang diakibatkan oleh bakteri ini berasal dari kemampuannya untuk berkolonisasi dan menyumbat sistem pembuluh darah, yang mengakibatkan gejala layu dan akhirnya kematian inangnya⁽⁴⁾. Gejala penyakit Moko dan penyakit darah memiliki kemiripan. Gejala infeksi berupa daun menguning dan lembek dan akhirnya roboh, buah hancur dan menunjukkan perubahan warna pembuluh darah internal, dan infeksi bersifat sistemik⁽⁵⁾.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, Tanaman pisang yang terinfeksi penyakit moko memiliki gejala spesifik tanaman yaitu terdapatnya lendir bakteri yang berbau, berwarna putih abu-abu sampai coklat kemerahan keluar dari potongan buah atau bonggol, tangkai buah, tangkai tandan dan batang^(3,5). Adapun ciri pohon pisang yang terinfeksi penyakit moko yaitu memiliki gejala perubahan warna daun muda yaitu pada ibu tulang daun terlihat garis coklat

kekuningan ke arah tepi daun. Daun yang terinfeksi kemudian menguning atau berwarna coklat, dan akhirnya menjadi layu^(4,6).

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengetahui karakter morfologi bakteri patogen yang ada pada daging buah pisang yang terinfeksi penyakit moko adalah dilakukannya isolasi bakteri patogen yang ditumbuhkan menggunakan media khusus yaitu *Tripheny Tetrazolium Chloride* (TZC). Isolasi dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu metode cawan tuang (*pour plate*) atau cawan gores (*streak plate*). Setelah dilakukan isolasi maka dilakukan karakterisasi makroskopis yaitu diamati kakakter morfologi bakteri patogen tersebut.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Kegiatan penelitian ini dilaksanakan pada Januari – Februari 2023. Lokasi penelitian berada di Laboratorium Mikrobiologi, PT Great Giant Pineapple, Departement Sustainable Agri Material, Development & Protection, Jl. Raya Arah Menggala No.77, Terbanggi Besar, Lampung Tengah.

Alat dan Bahan

Alat yang dibutuhkan adalah cawan petri, pinset, jarum ose, bunsen, pisau scapel, mikrotube, pipet volumetrik, tabung reaksi dan rak, erlenmeyer, beaker glass, gelas ukur, vortex, plastik wrap, timbangan analitik, Laminar Air Flow (LAF), autoklaf, oven, spektrofotometer UV-Vis.

Bahan yang digunakan adalah 2 sampel daging pisang Cavendish (*Musa acuminata Colla*) muda di PT Great Giant Pineapple yang diduga terinfeksi bakteri patogen moko (Pisang P & R), alkohol, aquades, media *Lactose Broth* (LB), media *Tripheny Tetrazolium Chloride* (TZC).

Koleksi Sampel

Sampel buah pisang Cavendish muda (*Musa acuminata Colla*) diambil dari dua macam pohon pisang yang berbeda di Plantation Group 4, PT GGP, Lampung Timur. Sampel buah pisang dipotong menggunakan pisau kemudian dimasukkan kedalam plastik. Didapatkan dua sampel buah pisang yang berbeda yaitu dengan kode sampel pisang P & R.

Pengecekan Ooze Bakteri

Pada sampel daging buah pisang yang terinfeksi penyakit moko dilakukan pengecekan ooze yang berfungsi untuk mengetahui ada atau tidaknya bakteri dalam daging pisang, jika positif terdapat bakteri maka akan muncul cairan berwarna putih (Marsuni, 2021).

Pembuatan media *Tripheny Tetrazolium Chloride* (TZC) dan Pembuatan Air Ooze

Komposisi dari media TZC sebanyak 500 ml yaitu larutan TZC 1 % 0,05 g/5 ml, Casein 0.5 g, pepton 5 g, glukosa 2.5 g, Agar Bacterial 10 g. Kemudian menimbang bahan-bahan tersebut sebanyak yang dibutuhkan dan dimasukkan kedalam erlenmeyer dan dituangkan aquades sebanyak 500 ml kedalam erlenmeyer, kemudian dihomogenkan dan disterilisasikan dalam autoklaf dengan suhu 121°C. Setelah itu didinginkan terlebih dahulu dan dituangkan ke dalam petridish. Selanjutnya pembuatan air ooze dengan memotong bagian daging buah pisang antara yang sakit dan sehat, melisiskan daging buah pisang ke dalam mikrotube yang telah berisi air aquades steril sebanyak 1 ml.

Isolasi dan Pemurnian Isolat Bakteri

Isolasi bakteri patogen penyebab moko pada daging buah pisang, dengan mengambil 1 lup bakteri dari air ooze kemudian di gores/streak pada media TZC yang telah padat. Diinkubasi selama 48 jam. Pemurnian isolat bakteri dilakukan pada media TZC yang baru dan diinkubasi selama 48 jam, kemudian diamati secara makroskopis yaitu meliputi bentuk, warna, tepian dan elevasi. Metode penelitian ini menggunakan modifikasi penelitian Marsuni⁽⁸⁾.

Uji *Total Plate Count* (TPC)

Metode uji TPC dilakukan berdasarkan modifikasi dari penelitian Marsuni⁽⁸⁾, Inokulasi bakteri menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) menggunakan media *Lactose Broth* (LB), pada masing masing erlenmeyer berisi 50 ml, kemudian diambil isolat bakteri yang telah dilakukan pemurnian sebanyak 5 ose kedalam erlenmeyer, kemudian di homogenisasi dengan vortex dan dilakukan pengukuran nilai *Optical Density* (OD) yang optimal yaitu 0,3 nm.

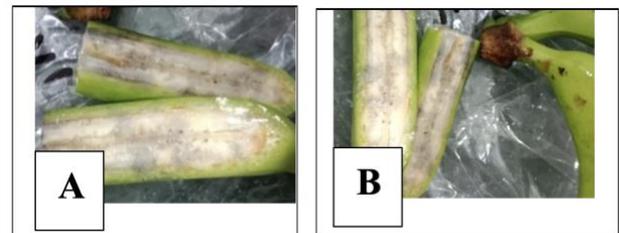
Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat, yaitu diambil 1 ml isolat bakteri pada media LB. Selanjutnya dimasukkan kedalam tabung reaksi steril yang berisikan 9 ml aquades steril sehingga

didapatkan pengenceran 10^{-1} . Kemudian dilakukan sampai dengan 10^{10} dibuat dengan cara yang sama. Kemudian 1 ml suspensi yang didapatkan pada pengenceran 10^{-9} – 10^{-10} ditambahkan ke dalam cawan petri. Kemudian media TZC sebanyak 15 – 20 ml dituangkan ke dalam masing- masing cawan petri yang berisi suspensi. Agar semua komponen tercampur rata, cawan digerakkan ke arah depan dan belakang atau membentuk angka delapan (*pour plate*). Setelah itu diinkubasi pada temperatur 37°C selama 48 jam dengan posisi cawan terbalik. Setelah diinkubasi, masing masing cawan dihitung jumlah koloni pada cawan yang mempunyai jumlah koloni 25- 250 dan dilakukan perhitungan jumlah total bakteri.

HASIL PENELITIAN

Koleksi Sampel

Hasil koleksi sampel diperoleh dua sampel pisang Cavendish (*Musa acuminata* Colla) yang diduga terinfeksi Penyakit moko dengan kode P & R. Sampel diambil dari lokasi /plot yang berbeda di lokasi Plantation Group 4, PT GGP Lampung Timur.



Gambar 1. Koleksi sampel pisang Cavendish (*Musa acuminata* Colla) yang diduga terinfeksi Penyakit moko: A. Sampel P dan B. Sampel R

Isolasi Bakteri

Hasil isolasi bakteri pada daging pisang P & R yang dilakukan secara duplo, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil isolasi bakteri pada daging pisang

Kode Sampel	10 ¹	10 ²
P		
R		

Peremajaan Bakteri

Berikut ini adalah hasil dari peremajaan bakteri pada daging buah pisang cavendish.

Tabel 2. Hasil peremajaan bakteri

Kode Sampel	Hari ke -9	Hari ke-10
P		
R		

Pengamatan Karakter Morfologi Bakteri Secara Makroskopis

Hasil pengamatan karakterisasi morfologi bakteri dilakukan secara makroskopis pada koloni bakteri. Hasil pengamatan karakter morfologi bakteri ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil karakter morfologi bakteri secara makroskopis

Kode Isolat	Bentuk	Tepi	Elevasi	Warna
P	Circular	Entire	Convex	Merah (Bagian tepi berwarna putih keruh)
R	Circular	Entire	Convex	Merah (Bagian tepi berwarna putih keruh)

Perhitungan Jumlah Total Bakteri

Hasil perhitungan jumlah total bakteri patogen penyebab penyakit moko pada daging buah pisang menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). Hasil menunjukkan beberapa sampel daging pisang P & R dengan pengenceran 10⁴ – 10⁵ terlalu banyak koloni yang tumbuh sehingga Tidak Bisa Untuk Dihitung (TBUD). Sehingga didapatkan bahwa pada pengenceran 10⁶ saja yang dapat dihitung koloninya, ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 3. Perhitungan jumlah total bakteri

Kode Sampel	Rerata jumlah koloni (Cfu/gram)	Hasil Pengamatan
P	1,95 X 10 ⁶	
R	8,5 X 10 ⁶	

PEMBAHASAN

Hasil koleksi sampel buah pisang cavendish (*Musa acuminata* Colla) muda yang diduga terinfeksi penyakit moko diperoleh 2 sampel yaitu sampel dengan kode P & R. Sampel diambil dari lokasi /plot yang berbeda di lokasi Plantation Group 4, PT Great Giant Pineapple, Lampung Timur. Kedua samoel menunjukkan gejala umum yaitu layu secara keseluruhan tanaman. Gejala yang muncul dan diperlihatkan pada tanaman pisang sangat mencirikan kekhasan tersendiri, yaitu tanaman yang terinfeksi memperlihatkan gejala layu secara mendadak.

Gejala layu ini disebabkan oleh patogen penyebab moko menginfeksi jaringan pengangkut air sehingga mengganggu transportasi. Akibatnya tanaman pisang menjadi layu, kering dan kerdil. Infeksi penyakit ini terjadi pada tanaman pisang mulai dari tanaman masih muda. Hal ini disebabkan bakteri ini dapat hidup dalam tanah selama beberapa bulan atau tahun, dengan temperatur 21 - 35° C dan kandungan air tanah yang tinggi. Bakteri ini bisa masuk ke dalam tanaman lain yang masih sehat melalui aliran air, pengemburan tanah, dan pemindahan tanaman⁽⁷⁾.

Bakteri patogen bertahan di tanah setidaknya selama satu tahun pada sisa tanaman yang terinfeksi. Buah yang terinfeksi bakteri ini akan masuk ke tanaman melalui akar. Selain itu, tanah, peralatan, dan kendaraan yang terinfestasi memindahkan patogen di dalam perkebunan. Sedangkan perpindahan buah dan bahan tanam yang terinfeksi memungkinkan penyebaran jarak jauh. Serangga yang berkunjung pada *Musa* spp. pada saat pembunga juga dapat menyebarkan patogen dengan cepat dalam jarak yang jauh.⁽⁸⁾

Setelah dilakukan pengecekan ooze (massa bakteri) yang telah keluar lendir warna putih dari daging buah pisang. Hal ini menandakan bahwa pisang tersebut terkena patogen bakteri sehingga dapat dilakukannya isolasi bakteri pada media khusus yaitu TZC. Isolasi bakteri patogen dari daging buah pisang memperlihatkan warna kemerahan dan pertumbuhan bakteri patogen sangat banyak dan cepat pada media TZC. Isolat bakteri patogen penyebab penyakit moko memiliki koloni tunggal berbentuk bulat tidak beraturan, cembung, pinggir rata, berwarna merah pada bagian tengah koloni. Sedangkan pada bagian tepi berwarna putih keruh, dan diameter kurang dari 1 µm⁽³⁾.

Media *Tetrazolium Chloride* (TZC) adalah media khusus untuk pertumbuhan bakteri *Ralstonia Solanacearum* (penyebab moko). Berdasarkan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan Safni *et al.*⁽⁸⁾ menunjukkan hasil yang sama yaitu patogen yang ditumbuhkan pada media TZC terdapat koloni berwarna putih dengan pusat merah muda yang menandakan isolat tersebut mempunyai tingkat virulensi yang tinggi. Warna putih bagian pinggir koloni adalah Ekstraseluler Polisakarida (EPS) yang berfungsi sebagai pertahanan diri bakteri dari faktor lingkungan yang kurang mendukung, sebagai cadangan makanan⁽⁶⁾.

Pengujian *Total Plate Count* (TPC) digunakan untuk mengetahui jumlah mikroba yang terdapat dalam suatu produk dengan cara menghitung koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media agar. Prinsip dari metode ini adalah jika sel mikroba masih hidup ditumbuhkan pada medium agar, maka sel tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung tanpa menggunakan mikroskop⁽⁹⁾.

Metode teknik pengenceran merupakan hal yang harus dikuasai. Tujuan dari pengenceran sampel yaitu mengurangi jumlah kandungan mikroba dalam sampel sehingga nantinya dapat diamati dan diketahui jumlah mikroorganisme secara spesifik sehingga didapatkan perhitungan yang tepat. Tahapan pengenceran dimulai dari membuat larutan sampel sebanyak 10 ml (campuran 1 ml/1 gr sampel dengan 9 ml aquades steril). Dari larutan tersebut diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan kedalam 9 ml aquades yang steril sehingga didapatkan pengenceran 10². Dari pengenceran 10⁻² diambil lagi 1 ml dan dimasukkan kedalam tabung berisi 9 ml aquades steril sehingga didapatkan pengenceran 10³, begitu seterusnya sampai mencapai pengenceran yang diinginkan⁽⁶⁾.

Menurut penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Marsuni⁽⁶⁾ bahwa Setelah dilakukan penguangan suspensi sebanyak 1 ml dari masing masing pengenceran dan dituangkan sebanyak 15-20 ml media TZC kemudian diinkubasi selanjutnya cawan petri yang dihitung adalah cawan petri yang memiliki jumlah koloni bakteri 25 – 250 koloni bakteri. Perhitungan jumlah koloni bakteri dilakukan pada cawan yang mengandung 25 hingga 250 koloni bakteri sesuai dengan SNI 01- 2332.3-2006 tentang pengujian angka lempeng total⁽⁷⁾.

Untuk menentukan nilai TPC dari sampel, dapat menggunakan rumus perhitungan dimana

jumlah koloni mikroba pada suatu cawan dikalikan dengan faktor pengenceran. Disebabkan pengujian cemaran mikroba dilakukan secara duplo, maka untuk memperoleh nilai rerata jumlah koloni mikroba dilakukan dengan menambahkan nilai TPC dari kedua cawan petri dan dibagikan dengan jumlah dari cawan petri tersebut⁽⁸⁾.

Berdasarkan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Nur Aeny⁽³⁾ tanaman pisang yang terinfeksi patogen layu bakteri mengalami menguningnya daun yang kemudian menyebabkan seluruh daunnya kering dan akhirnya tanaman mati, Bagian dalam buah tampak berwarna coklat kehitaman, disertai cairan agak kental yang berwarna coklat kekuningan. Apabila dibuat potongan melintang bagian batang, maka akan terlihat perubahan warna kecoklat-coklatan pada batang aslinya dan setelah beberapa saat akan muncul eksudat bakteri berwarna putih kotor atau coklat kehitaman pada permukaan irisan. Hasil tersebut menyebutkan bahwa gejala patogen layu bakteri pada tanaman pisang Cavendish (*Musa acuminata* Colla) muda di PT GGP memiliki gejala yang sama seperti penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Nur Aeny⁽³⁾.

KESIMPULAN

Hasil isolasi bakteri patogen penyebab penyakit moko pada daging buah pisang Cavendish (*Musa acuminata* Colla) muda di PT Great Giant Pineapple (GGP) diperoleh dari sampel yang menunjukkan daging buah pisang yang bergejala berisi cairan seperti lendir berwarna putih keabu-abuan hingga coklat kemerahan yang mengandung banyak bakteri. Hasil karakterisasi morfologi bakteri patogen penyebab penyakit moko pada daging buah pisang cavendish muda di PT GGP secara makroskopis yaitu memiliki karakter morfologi koloni tunggal berbentuk bulat tidak beraturan, cembung, pinggir rata, berwarna merah pada bagian tengah koloni, sedangkan pada bagian tepi berwarna putih keruh dan diameter kurang dari 1µm selama masa inkubasi 24 - 48 jam pada media *Tetrazolium Chloride* (TZC).

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Nawangsih AA. The Use of Endophytic Bacteria From Banana To Control. *J Ilmu Pertan Indones*. 2007;12(1):43–9.
- [2] Pranita E. Analisis Karakterisasi Penyakit pada Tanaman Pisang Menggunakan Kamera Termal dengan Metode Tresholding. *Electrician*. 2022;16(1):73–80.
- [3] Nur Aeny T, Suharjo R, Mujim S. Skrining Bakteri Antagonis *Ralstonia* Sp., Penyebab Penyakit Layu Bakteri Pisang Di Lampung. *J Hama dan Penyakit Tumbuh Trop*. 2007;7(2):100–10.
- [4] Ramírez M, Neuman BW, Ramírez CA. Bacteriophages as promising agents for the biological control of Moko disease (*Ralstonia solanacearum*) of banana. *Biol Control*. 2020;149 (February) : 104238. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104238>
- [5] Jamaluddin MA, Widodo WD, Suketi K. Pengelolaan Perkebunan Pisang Cavendish Komersial di Lampung Tengah, Lampung. *Bul Agrohorti*. 2019;7(1):16–24.
- [6] Marsuni Y. Isolasi Bakteri *Ralstonia Solanacearum* Penyebab Penyakit Layu Tanaman Tomat Yang Ditumbuhkan Secara In-Vitro. *Semin Nas Biol [Internet]*. 2021;111–7. Available from: <https://proceeding.unnes.ac.id/index.php/semnasbiologi/article/view/769>
- [7] Champoiseau PG, Jones JB, Allen C. *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2 Causes Tropical Losses and Temperate Anxieties . *Plant Heal Prog*. 2009;10(1).
- [8] Safni I, Subandiyah S, Fegan M. Ecology, epidemiology and disease management of *Ralstonia syzygii* in Indonesia. *Front Microbiol*. 2018;9(MAR):1–11.
- [9] Yunita M, Hendrawan Y, Yulianingsih R, Keteknikan J, Fakultas P–, Kunci K. Analisis Kuantitatif Mikrobiologi Pada Makanan Penerbangan (Aerofood ACS) Garuda Indonesia Berdasarkan TPC (Total Plate Count) Dengan Metode Pour Plate. *J Keteknikan Pertan Trop dan Biosist*. 2015;3(3):237–48.