

# Penggunaan Probiotik dan Kromium Organik terhadap Kondisi Lingkungan Rumen *In Vitro*

WULANSIH DWI ASTUTI, RONI RIDWAN dan BAHARUDDIN TAPPA

Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Jalan Raya Bogor Km 46, Cibinong  
Telp: 021-8754587; Fax: 021-8754588  
E-mail: [wulan\\_nie@yahoo.com](mailto:wulan_nie@yahoo.com)

(Diterima dewan redaksi 12 September 2007)

## ABSTRACT

ASTUTI, W.D., R. RIDWAN and B. TAPPA. 2007. Utilization of Probiotic and Organic-Cr on Ruminant Ecosystem *In Vitro*. *JITV* 12(4): 262-267.

Improvement of nutrient intake was needed to increase cattle productivity. Probiotics and organic Cr, as feed additives, might have beneficially improve ruminant microbial ecosystem, and optimize digestion process by rumen microbes. The objective of this study was to examine the effects of combination between probiotic or mixed probiotics and organic Cr on rumen fermentation activity. An *in vitro* study was held based on randomized block design with 5 treatments and 3 replications. The treatments were (A) Control ration, (B) Control ration + probiotic TSD 10, (C) Control ration + probiotic TSD 10 + organic Cr, (D) Control ration + mixed probiotics, and (E) Control ration + mixed probiotics + organic Cr. Organic Cr concentration was supplemented 2 ppm, whereas probiotics supplement contained  $10^9$  cfu/g. Supplementation of probiotic and organic Cr increased dry matter and organic matter digestibility but decreased total VFA and  $\text{NH}_3$  concentration. Treatment E (combination between mixed probiotics and organic Cr) gave the highest dry matter (52.45 %) and organic matter (51.96 %) digestibilities. It also tended to increase  $\text{NH}_3$  and total VFA production. Supplementation of single or mixed probiotics showed no difference for dry matter and organic matter digestibilities, and proportion of individual VFA. Mixed probiotics gave higher VFA and  $\text{NH}_3$  concentration compared to single probiotic. Probiotics supplementation resulted in a tendency for higher acetate proportion, while organic Cr supplementation resulted in a tendency of higher propionate proportion.

**Key Words:** Probiotic, Organic Cr, Ruminant Microbes, VFA

## ABSTRAK

ASTUTI, W.D., R. RIDWAN dan B. TAPPA. 2007. Penggunaan Probiotik dan Kromium Organik terhadap Kondisi Lingkungan Rumen *In Vitro*. *JITV* 12(4): 262-267.

Peningkatan produktivitas ternak dapat dilakukan melalui perbaikan asupan nutrisi. Probiotik dan kromium (Cr) organik merupakan pakan aditif yang digunakan untuk memperbaiki ekosistem mikroba rumen sehingga meningkatkan efisiensi penggunaan pakan oleh mikroba rumen. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh penggunaan probiotik tunggal maupun campuran yang dikombinasikan dengan Cr organik terhadap kinerja mikroba rumen. Penelitian dilakukan secara *in vitro* menggunakan rancangan acak kelompok dengan 5 perlakuan dan 3 ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah (A). ransum kontrol, (B) ransum kontrol + probiotik TSD 10, (C) Ransum kontrol + probiotik TSD 10 + Cr organik, (D) ransum kontrol + probiotik campuran, dan (E) Ransum kontrol + probiotik campuran + Cr organik. Konsentrasi Cr organik yang digunakan sebesar 2 ppm, sedangkan probiotik yang digunakan mengandung  $10^9$  cfu/g. Pemberian probiotik dan Cr meningkatkan pencernaan pakan, tetapi menurunkan konsentrasi VFA dan  $\text{NH}_3$  dalam rumen. Nilai pencernaan (KCBK dan KCBO) paling tinggi diperoleh pada penggunaan kombinasi probiotik campuran dan Cr organik (52,45 dan 51,96%). Pemberian probiotik tunggal maupun campuran tidak memberikan hasil yang berbeda pada nilai pencernaan pakan maupun komposisi VFA individual. Probiotik campuran menghasilkan konsentrasi VFA total dan  $\text{NH}_3$  yang lebih tinggi dibandingkan dengan probiotik tunggal. Penggunaan probiotik menghasilkan fermentasi rumen yang mengarah ke produksi asetat, sedangkan penggunaan Cr organik menghasilkan fermentasi rumen yang mengarah ke produksi propionat.

**Kata Kunci:** Probiotik, Cr Organik, Mikroba Rumen, VFA

## PENDAHULUAN

Kebutuhan protein hewani, khususnya yang berasal dari ternak ruminansia, di Indonesia belum dapat dipenuhi dari produksi daging dalam negeri. Oleh

karena itu produktivitas ternak di Indonesia masih harus ditingkatkan. Salah satu faktor yang menentukan tingkat produktivitas ternak adalah asupan nutrisi. Pada umumnya ternak ruminansia di peternakan rakyat, belum dapat berproduksi secara optimal karena

kekurangan asupan nutrisi. Hal tersebut disebabkan pakan hijauan yang diberikan umumnya mempunyai nilai energi yang rendah. Rendahnya kualitas hijauan di daerah tropis tersebut diindikasikan dengan kandungan lignin, silika dan cutin yang tinggi. Kondisi demikian menyebabkan rendahnya daya cerna, dan menyebabkan ketidakseimbangan produk hasil fermentasi (tinggi asetat dan rendah propionat) dalam rumen. Rendahnya kualitas hijauan tropis ditandai oleh rendahnya kandungan mineral sehingga terjadi kekurangan asupan mineral pada ternak, terutama mineral mikro (*trace mineral*) (SANTRA dan KARIM, 2003). Masalah tersebut dapat ditanggulangi antara lain dengan pemberian pakan aditif yang dapat memperbaiki ekosistem mikroba rumen sehingga meningkatkan fungsi pencernaan rumen yang pada akhirnya meningkatkan produktivitas ternak.

Probiotik merupakan pakan aditif berupa mikroba hidup yang dapat memberikan efek positif terhadap ternak melalui peningkatan fungsi mikroba rumen. Probiotik yang umum digunakan pada ternak dibagi menjadi 2 kelompok yaitu, yang berasal dari bakteri dan fungi. Bakteri yang umum digunakan sebagai probiotik pada ternak berasal dari genus *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* dan *Streptococcus*. Sementara itu, fungi yang umum digunakan adalah *Aspergillus oryzae* dan *Saccharomyces cerevisiae*. Beberapa genus lain seperti *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Propionibacterium* dapat juga digunakan sebagai probiotik pada ternak (FULLER, 1992). Mikroba tersebut dapat digunakan sebagai probiotik baik dalam bentuk tunggal maupun kombinasi beberapa spesies.

Kromium (Cr) dikelompokkan dalam mineral mikro (*trace mineral*) yang esensial. Secara fisiologis peran utama Cr berkaitan dengan metabolisme glukosa, yaitu meningkatkan potensi aktivitas insulin. Kromium merupakan komponen aktif dari GTF (*Glucose Tolerance Factor*), suatu kompleks yang tersusun atas  $Cr^{3+}$  dengan 2 molekul asam nikotinat dan 3 asam amino yang terkandung dalam glutathion seperti glutamat, glisin dan sistein. Ketiadaan Cr dalam GTF akan mengakibatkan GTF tidak dapat berfungsi. Kromium dalam bentuk GTF telah diketahui dapat meningkatkan potensi aktivitas hormon insulin yang memegang peran penting dalam transpor glukosa dan asam amino (VINCENT, 2000). Meskipun belum sepenuhnya dipahami, Cr juga dibutuhkan dalam metabolisme lemak dan protein. Defisiensi Cr dapat menyebabkan rendahnya inkorporasi asam amino pada protein hati. Asam amino yang dipengaruhi oleh Cr dalam sintesis protein adalah metionin, glisin dan serin (VINCENT, 2004).

Saat ini suplementasi Cr organik banyak digunakan karena ketersediaannya (*bioavailability*) lebih tinggi dibandingkan dengan Cr anorganik. Cr organik yang diinkorporasikan ke dalam khamir (*yeast*) dikenal

dengan sebutan *high Cr-yeast*. Dalam beberapa kasus Cr anorganik yang dikonsumsi lewat makanan sekitar 98% tidak diserap dan dikeluarkan melalui feses. Sebaliknya ketersediaan Cr organik pada ternak sapi cukup tinggi yaitu 25-30% (MORDENTI *et al.*, 1997)

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat pengaruh penggunaan probiotik tunggal maupun campuran yang dikombinasikan dengan kromium organik terhadap kinerja mikroba rumen. Hipotesis penelitian ini adalah penggunaan probiotik dan kromium organik dapat mengoptimalkan sistem fermentasi rumen dalam proses pencernaan pakan ruminansia sehingga dapat meningkatkan produktivitas ternak.

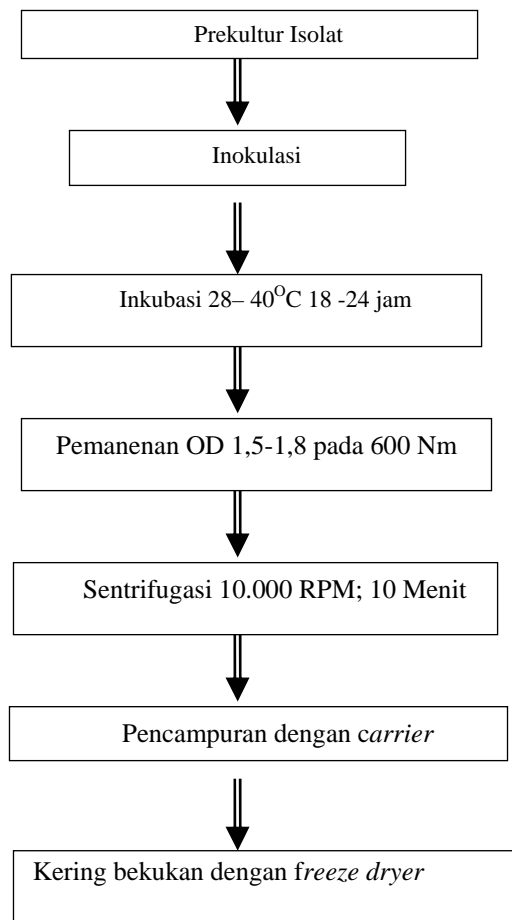
## MATERI DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Puslit Bioteknologi LIPI, menggunakan rancangan acak kelompok dengan 5 perlakuan dan 3 ulangan dengan teknik *in vitro* yang menggunakan cairan rumen ternak sapi potong yang diperoleh dari rumah pemotongan hewan (RPH). Perlakuan yang digunakan adalah (A) Ransum kontrol, (B) Ransum kontrol + probiotik TSD 10, (C) Ransum kontrol + probiotik TSD 10 + Cr organik, (D) Ransum kontrol + probiotik campuran, dan (E) Ransum kontrol + probiotik campuran + Cr organik. Probiotik campuran yang digunakan terdiri dari 7 spesies mikroorganisme yaitu *Leuconostoc citreum* TSD 10, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* 1A-2, *Bacillus pumilus* 55, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, dan *Pediococcus pentosus* DSS-21.

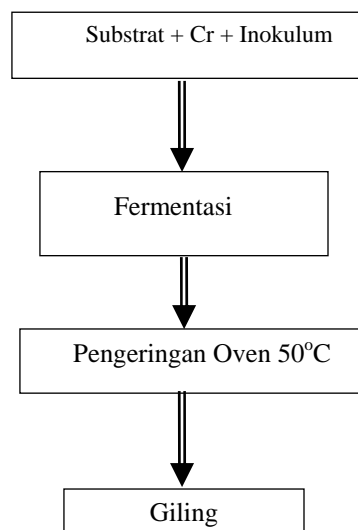
Konsentrasi Cr organik yang digunakan sebesar 2 ppm, sedangkan probiotik yang digunakan mengandung  $10^9$  cfu/g. Bahan dasar ransum yang digunakan adalah rumput lapang dan konsentrat komersial dengan perbandingan 70 : 30, dengan kandungan protein kasar 9,5%, serat kasar 32,3%, lemak kasar 2,1%, dan BETN 36,25.

Probiotik dan Cr organik diproduksi menggunakan biakan mikroba yang tersedia. Pembuatan probiotik menggunakan skim milk sebagai *carrier*, kemudian dikeringkan menggunakan *freeze dryer* sehingga didapatkan hasil akhir berupa serbuk halus. Pembuatan Cr organik menggunakan singkong sebagai substrat dan ragi tape sebagai *starter* dalam proses fermentasi. Setelah kering, produk digiling sampai menjadi tepung. Proses pembuatan probiotik dan Cr organik dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.

Metode *in vitro* dilakukan secara anaerobik dengan fermentor selama 48 jam. Setelah ditambahkan 0,2 ml  $H_2SO_4$  pekat, fermentasi dilanjutkan secara aerob selama 24 jam. Parameter yang diukur adalah pencernaan bahan kering dan bahan organik, VFA total,  $NH_3$  dan



**Gambar 1.** Proses pembuatan probiotik



**Gambar 2.** Proses pembuatan Cr organik

VFA individual. Uji pencernaan dilakukan dengan metode TILLEY dan TERRY (1963), VFA total diukur dengan metode destilasi uap dan  $\text{NH}_3$  diukur dengan metode mikrodifusi Conway. Komposisi VFA individual dilakukan dengan menggunakan gas kromatografi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses pencernaan makanan utama bagi ternak ruminansia adalah proses pencernaan dalam rumen dan dilakukan oleh mikroba. Koefisien cerna bahan kering (KCBK) dan bahan organik (KCBO) ransum dapat dilihat pada Tabel 1. Semua perlakuan yang diberikan meningkatkan nilai KCBK dan KCBO menjadi lebih tinggi dibandingkan dengan ransum kontrol (KCBK 49,35% dan KCBO 48,98%) walaupun tidak cukup signifikan. Probiotik maupun Cr organik yang diberikan mengandung mikroba, baik bakteri asam laktat maupun fungi yang berguna bagi fungsi pencernaan rumen. Suplementasi kultur fungi akan menimbulkan efek stimulan pada beberapa bakteri rumen secara spesifik (MILLER-WEBSTER *et al.*, 2002). Peningkatan populasi dan biodiversitas mikroba rumen akan meningkatkan aktivitas mikroba sehingga daya cerna ransum meningkat. Peningkatan sumber protein terdegradasi dari probiotik dan Cr organik sebagai bahan baku sintesis mikroba juga dapat meningkatkan populasi mikroba rumen sehingga aktivitas pencernaan meningkat (FU *et al.*, 2001).

**Tabel 1.** Koefisien cerna bahan kering (KCBK) dan bahan organik (KCBO) ransum

Perlakuan	KCBK (%)	KCBO (%)
A	49,35	48,98
B	50,64	49,73
C	51,18	50,46
D	50,64	49,71
E	52,40	51,96

Pemberian probiotik, baik tunggal TSD 10 maupun campuran, tanpa Cr organik menghasilkan nilai KCBK dan KCBO yang lebih rendah. Ransum B dengan pemberian probiotik tunggal mempunyai nilai KCBK 50,64% dan KCBO 49,73%, sedangkan ransum C (Ransum kontrol + TSD 10 + Cr organik) mempunyai nilai KCBK 51,18% dan KCBO 50,46%. Hal ini menunjukkan bahwa mikroba rumen membutuhkan Cr organik sebagai sumber mineral. Pemberian probiotik tunggal TSD 10 ataupun probiotik campuran memberikan nilai KCBK dan KCBO yang setara (50,64 vs 50,65% dan 49,73 vs 49,71%). Perlakuan yang mempunyai nilai KCBK dan KCBO paling tinggi

(52,40% dan 51,96%) adalah ransum yang diberi probiotik campuran dan Cr organik (perlakuan E). Nilai tersebut menunjukkan bahwa kombinasi mikroba dalam probiotik campuran dengan penambahan Cr organik dapat mengoptimalkan kerja mikroba rumen.

*Volatile fatty acids* (VFA) merupakan produk utama hasil pencernaan karbohidrat pada ruminansia, sedangkan  $\text{NH}_3$  merupakan produk utama dari perombakan protein. Konsentrasi VFA total dalam cairan rumen berkisar antara 70–150 mM, sedangkan kisaran konsentrasi  $\text{NH}_3$  yang baik adalah 6–12 mM. Konsentrasi  $\text{NH}_3$  yang kurang dari 3,57 mM dapat menghambat pertumbuhan mikroba rumen (MCDONALD *et al.*, 1995).

Perlakuan yang diberikan, tidak berpengaruh signifikan terhadap produksi VFA total dan  $\text{NH}_3$  rumen, meskipun terlihat bahwa semua perlakuan menurunkan produksi VFA dan  $\text{NH}_3$  dibandingkan dengan ransum kontrol (Tabel 2).

**Tabel 2.** Produksi VFA total dan  $\text{NH}_3$  ransum

Perlakuan	VFA Total	$\text{NH}_3$
	mM	
A	170,72	8,27
B	155,49	6,91
C	158,65	6,97
D	162,50	7,60
E	146,90	6,59

$\text{NH}_3$  merupakan sumber nitrogen utama dalam sintesis mikroba rumen. Konsentrasi  $\text{NH}_3$  dalam rumen dipengaruhi oleh tingkat produksinya yang berkaitan dengan pencernaan protein pakan, dan dipengaruhi pula oleh laju penggunaannya oleh mikroba rumen. Penurunan konsentrasi  $\text{NH}_3$  dalam penelitian disebabkan oleh peningkatan laju penggunaan oleh mikroba rumen. Aktivitas mikroba rumen yang meningkat karena pemberian probiotik dan kromium organik menyebabkan konsumsi  $\text{NH}_3$  meningkat. Konsentrasi  $\text{NH}_3$  ransum kontrol adalah 8,27 mM, sedangkan pada perlakuan B,C,D, dan E adalah 6,91; 6,97; 7,59 dan 6,59 mM.

VFA yang dihasilkan dalam proses fermentasi rumen terdiri dari beberapa macam asam lemak (*fatty acids*), yang proporsinya dapat dianalisis dengan menggunakan kromatografi. Banyak hal yang mempengaruhi komposisi VFA, salah satunya adalah komposisi populasi mikroba rumen. Dalam penelitian ini hampir semua VFA yang dihasilkan meningkat proporsinya, terutama asetat, propionat dan valerat (Tabel 3).

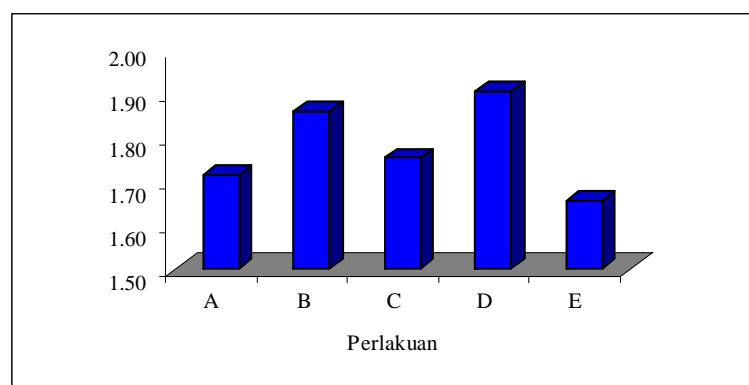
Penggunaan probiotik tunggal TSD 10 (B) maupun campuran (D) tidak memberikan hasil yang berbeda terhadap proporsi VFA individual. Namun penggunaan Cr organik merubah proporsi beberapa asam lemak. Penggunaan Cr organik (perlakuan C dan E) menghasilkan proporsi asetat yang lebih rendah dibandingkan dengan penggunaan probiotik tanpa tambahan Cr organik (perlakuan B dan D). Sementara penggunaan Cr organik meningkatkan proporsi propionat. Peningkatan proporsi propionat pada penggunaan Cr organik dapat disebabkan penggunaan ragi sebagai *starter*. *Saccharomyces cerevisiae* yang terdapat dalam ragi meningkatkan proporsi propionat seperti dalam penelitian LYNCH dan MARTIN (2002). BESONG *et al.* (2001) menyatakan bahwa suplementasi Cr organik pada dosis yang tepat akan mempengaruhi produksi propionat, butirir, dan isobutirat dalam cairan rumen, dimana pemakaian 1,6 mg Cr/kg ransum dapat meningkatkan proporsi molar isobutirat.

Asetat dan propionat merupakan komponen VFA individual yang paling besar, sehingga konsentrasi dan proporsi keduanya dapat menunjukkan arah sistem fermentasi rumen. Dari data proporsi asetat dan propionat dapat diketahui nisbah antara asetat dan propionat (nisbah A/P) (Gambar 3). Semakin tinggi nilai nisbah A/P berarti fermentasi rumen mengarah ke produksi asetat, sebaliknya nisbah A/P yang kecil menunjukkan fermentasi yang menghasilkan propionat. Dalam penelitian ini penggunaan probiotik tunggal

maupun campuran akan meningkatkan proporsi asetat, sebaliknya penggunaan Cr organik akan membuat fermentasi rumen mengarah ke produksi propionat. Hal itu berhubungan dengan fungsi Cr organik yang berperan dalam metabolisme glukosa (HAYIRI *et al.*, 2001). Pemberian probiotik campuran dalam penelitian GHORBANI *et al.* (2002) menunjukkan peningkatan produksi asetat secara signifikan, dan menurunkan produksi propionat. Sementara pemberian Cr organik dalam penelitian ASTUTI *et al.* (2006) juga menyebabkan sistem fermentasi rumen yang mengarah ke sintesis propionat. Propionat merupakan VFA yang bersifat glukogenik karena dapat dikatabolisme menjadi glukosa, sedangkan asetat dan butirir merupakan VFA non glukogenik (ketogenik). Sistem fermentasi rumen yang mengarah ke propionat akan menghasilkan nilai *non glucogenic ratio* (NGR) yang kecil. NGR adalah perbandingan antara asam lemak terbang yang bersifat non-glukogenik dan glukogenik. Nilai NGR berkorelasi positif dengan produksi metan, artinya semakin rendah nilai NGR semakin rendah pula produksi metan. Rendahnya produksi metan akan meningkatkan nilai efisiensi konversi heksosa, karena semakin sedikit energi yang terbuang dalam bentuk metan. Sistem fermentasi rumen yang mengarah ke sintesis asam propionat akan lebih menguntungkan karena energi yang terbuang sebagai gas metan akan berkurang (KREHBIEL *et al.*, 2003).

**Tabel 3.** Komposisi VFA individual ransum

Perlakuan	Asetat	Propionat	Butirat	Iso-Butirat	Iso-Valerat	Valerat
	%mM					
A	49,09	28,60	18,77	1,15	0,86	1,52
B	52,11	27,97	16,83	0,89	0,79	1,41
C	51,20	29,18	16,19	0,93	0,79	1,70
D	52,88	27,69	16,48	0,79	0,76	1,62
E	50,03	30,21	16,57	0,80	0,76	1,62



**Gambar 3.** Nilai nisbah asetat/propionat (A/P) ransum penelitian

## KESIMPULAN

Pemberian probiotik dan Cr organik meningkatkan pencernaan pakan, tetapi menurunkan konsentrasi VFA dan NH<sub>3</sub> dalam rumen. Nilai pencernaan paling tinggi diperoleh pada penggunaan kombinasi probiotik campuran dan Cr organik. Pemberian probiotik tunggal maupun campuran tidak memberikan hasil yang berbeda pada nilai pencernaan pakan maupun komposisi VFA individual. Probiotik campuran menghasilkan konsentrasi VFA total dan NH<sub>3</sub> yang lebih tinggi dibandingkan dengan probiotik tunggal.

Penggunaan probiotik menghasilkan fermentasi rumen yang mengarah ke produksi asetat, sedangkan penggunaan Cr organik menghasilkan fermentasi rumen yang mengarah ke produksi propionat.

## DAFTAR PUSTAKA

- ASTUTI, W.D., T. SUTARDI, D. EVVYERNIE dan T. TOHARMAT. 2006. Penggunaan kromium organik dari beberapa jenis fungi terhadap aktivitas fermentasi rumen secara *in vitro*. *Media Peternakan* 29: 121-132.
- BESONG, S., J.A. JACKSON, D.S. TRAMMELL and V. AKAY. 2001. Influence of supplemental chromium on concentration of liver triglyceride, blood metabolites and rumen VFA profil in steers fed a moderately high fat diet. *J. Dairy Sci.* 84: 1679-1685.
- FU, C.J., E.E.D. FELTON, J.W. LEHMKUHLER and M.S. KERLEY. 2001. Ruminal peptide concentration required to optimize microbial growth and efficiency. *J. Anim. Sci.* 79: 1305-1312.
- FULLER, R. 1992. Probiotics: The Scientific Basis. Chapman and Hall. London.
- GHOORBANI, G.R., D.P. MORGAVI, K.A. BEAUCHEMIN, and J.A.Z. LEEDLE. 2002. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 80: 1977-1985.
- HAYIRI, A., D.R. BREMMER, S.J. BERTICS, M.T. SOCHA and R.R. GRUMMER. 2001. Effect of chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84: 1218-1230.
- KREHBIEL, C.R., S.R. RUST, G. ZHANG and S.E. GILLILAND. 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J. Anim. Sci.* 81: E120-E132.
- LYNCH, H.A. and S.A. MARTIN. 2002. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. *J. Dairy Sci.* 85: 2603-2608.
- MCDONALD, P., R. EDWARDS, J.F.D. GREENHALGH and C.A. MORGAN. 1995. Animal Nutrition. 5<sup>th</sup> Ed. Longman Scientific and Technical. New York.
- MILLER-WEBSTER, T., W.H. HOOVER, M. HOLT and J.E. NOCEK. 2002. Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 85: 2009-2014.
- MORDENTI, A., A. PIVA and G. PIVA. 1997. The european perspective on organic chromium in animal nutrition. In: LYONS, T.P. and K.A. JACQUES (Eds.) Biotechnology in The Feed Industry. Proc. of Alltech 13<sup>th</sup> Annual Symposium. Nottingham Univ. Press: 227-240.
- SANTRA, A. and S.A. KKRIM. 2003. Rumen manipulation to improve animal productivity. *J. Anim. Sci.* 5: 748-763.
- TILLEY, J.M.A. and R.A. TERRY. 1963. Two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. British Grassland Soc.* 18: 104-110.
- VINCENT, J.B. 2000. The biochemistry of chromium. *J. Nutr.* 130: 715-718.
- VINCENT, J.B. 2004. Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. Proceedings of the Nutrition Society. CABI Publishing. 63(1): 41-47(7).