

PROFIL GEN GROWTH HORMONE (GH) SAPI HASIL PERSILANGAN MADURA DAN LIMOUSIN DENGAN METODE PCR-RFLP

GROWTH HORMONE (GH) GENE PROFILE OF MADURA CATTLE CROSS BREEDING LIMOUSIN CATTLE WITH PCR RFLP METHOD

Ghea Aquatica Puteri¹⁾, *Budi Utomo S²⁾, Roesno Darsono³⁾

¹⁾Student, ²⁾Department of Veterinary Reproduction, ³⁾Departement of Veterinary Pathology
Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga

*Corresponding author: budi_reprovet@yahoo.com; gheaaquatica@yahoo.co.id

ABSTRACT

The purpose of this research was to find out the Growth Hormone (GH) gene profile of the cross breeding between Madura cattle and Limousin cattle (Madrasin). Sampl in the form of cattle blood for this research was obtained from 14 Madrasin cattles in the area of Bangkalan, Madura, East Java. DNA extraction was performed then to provide the result for PCR RFLP, which then indicated that Madrasin cattle's GH gene profile has 432 base pair fragment length and the RFLP result indicated that Madrasin cattle's GH genetic was cut off into 180 base pair, 250 base pair, 300 base pair, and 400 base pair. Moreover, there was no V genetic to be found in GH genetic of Madura cattle.

Keyword : Madura cattle, Limousin cattle, cross breeding, Growth Hormone, PCR-RFLP.

Latar Belakang

Salah satu sapi potong lokal Indonesia yang banyak dipilih oleh masyarakat Indonesia untuk ditanakan khususnya di daerah Jawa Timur adalah sapi Madura. Sapi Madura merupakan sapi lokal Indonesia yang memiliki kemampuan berkembang biak yang baik dalam lingkungan dan agroekosistem yang kering di Pulau Madura (Wijono dkk., 2004). Keunggulan genetik sapi Madura adalah mampu beradaptasi di lingkungan beriklim tropis, mampu beradaptasi terhadap pakan bernilai gizi rendah, dan tahan terhadap penyakit (Nurgiartiningsih, 2011). Namun dari beberapa keunggulan yang dimiliki, sapi Madura memiliki kelemahan yaitu jarak kelahiran anak yang panjang, rendahnya kinerja biologis, dan laju pertumbuhan yang lambat. Hal ini sering menjadi masalah bagi para peternak sapi Madura (Rifai dkk., 2012). Presentase laju pertumbuhan sapi Madura hanya mencapai 1% per tahun, sedangkan persilangan sapi Madura dan sapi Limousin presentase laju partumbuhannya mencapai 2,26% per tahun (Dinas Peternakan Kabupaten Pamekasan, 2011) Dalam waktu 3 – 4 tahun sapi hasil persilangan Madura dan Limousin atau yang biasa disebut Madrasin memiliki bobot 850 kg (Kutsiyah, 2012).

Salah satu faktor yang mempengaruhi adanya perubahan dari presentase laju pertumbuhan adalah *Growth Hormone* (GH). *Growth Hormone* sendiri dibutuhkan dalam pertumbuhan jaringan, metabolisme lemak, reproduksi, dan laju pertumbuhan tubuh (Beauchemin *et al.*, 2006). Pertumbuhan pada sapi dikendalikan oleh sistem yang komplek dari *somatropic axis*. Gen yang menjalankan *somatropic axis* bertanggung jawab terhadap pertumbuhan setelah kelahiran (*post natal*), terutama GH yang berperan terhadap pertumbuhan tulang dan otot yang dimediasi oleh IGF-1 (Sellier, 2000).

Banyaknya kejadian perkawinan silang pada sapi, hal ini menimbulkan variasi dari *Growth Hormone* yang salah satunya telah dilaporkan oleh Schlee *et al.*, (1994) yang menemukan adanya variasi gen pengkode hormon pertumbuhan pada sapi pedaging jenis Bavarian Simmental. Adanya variasi dari gen *Growth Hormone* pada sapi dapat mempengaruhi produksi sapi seperti susu dan penambahan berat badan (Yao *et al.*, 1996; Schlee *et al.*, 1994).

Variasi lokus gen hormon pertumbuhan berhubungan dengan terjadinya variasi rerata pertumbuhan. Schlee *et al.*, (1994) menyatakan bahwa terjadinya variasi pada lokus gen hormon pertumbuhan menye-

babkan perbedaan genotipe dari gen pertumbuhan yang menyebabkan perubahan konsentrasi sirkulasi gen hormon pertumbuhan dan IGF-1 yang terjadi pada sapi jenis Simmental. Variasi dari *Growth Hormone* dapat menimbulkan pengaruh yang positif maupun negatif. Adanya teknologi biomolekuler variasi dari *Growth Hormone* dapat di deteksi secara lebih akurat (Cunningham, 1994; Hoj *et al.*, 1993). Salah satu teknik biomolekuler yang dapat mengidentifikasi adanya variasi *Growth Hormone* adalah *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) dengan menggunakan enzim restriksi (Unanian *et al.*, 1994). RFLP sendiri memiliki kemampuan untuk mendeteksi tingkat polimorfisme yang tinggi dan telah banyak digunakan sebagai alat untuk mengidentifikasi gen-gen yang menghasilkan sifat yang penting (Montaldo *et al.*, 1998).

Gen GH sapi atau *bovine growth hormone* terletak kromosom ke 19 (Tatsuda *et al.*, 2008). Ditemukan adanya polimorfisme pada gen GH (Dario *et al.*, 2005), salah satunya adalah dengan substitusi dari *Leucine* (L) ke *Valine* (V) pada posisi 127 di exon 5 pada gen GH yang mana dapat diketahui setelah dilakukannya PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi *AluI* (Hradecka *et al.*, 2008). Enzim restriksi *AluI* akan memunculkan asam amino *Leusine* (L) pada posisi 127 di rantai polipeptida dari GH, jika tidak adanya *Leusine* (L) pada rantai polipeptida maka mengindikasikan adanya *Valine* (V) pada posisi yang sama (Lucy *et al.*, 1993; Switonski, 2002).

Mengingat pentingnya kajian biologi molekuler dan terbatasnya tentang pengetahuan dari profil gen *Growth Hormone* sapi hasil persilangan Madura dan sapi Limousin sehingga terdapat perbedaan dalam laju pertumbuhan antara sapi Madura dan sapi hasil persilangan Madura dan Limousin, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui profil gen *Growth Hormone* sapi hasil persilangan Madura dan sapi Limousin dengan metode PCR-RFLP.

Materi dan Metode

Waktu dan Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni – Oktober 2017. Tempat pelaksanaan PCR-RFLP dilaksanakan pada Balai Besar

Veteriner Denpasar, Bali. Sedangkan untuk pengambilan sampel darah sapi hasil persilangan Madura dan Limousin diambil di Kabupaten Bangkalan, Madura, Jawa Timur.

Pengambilan Sampel

Sampel yang diambil berupa darah dari sapi hasil persilangan Madura dan Limousin jenis kelamin jantan dan berumur kurang lebih 2 tahun. Sampel diambil sebanyak 14 ekor yang diambil acak di kabupaten Bangkalan. Pengambilan darah melalui vena jugularis sapi Madura hasil persilangan sebanyak 5 ml yang kemudian dimasukan ke dalam tabung EDTA.

Ekstraksi DNA

DNA dari sample darah sapi hasil persilangan Madura dan Limousin di ekstraksi dengan cara memasukan 10 ml sample darah ke dalam *ependorf tube* steril kemudian ditambahkan dengan 180 uL *buffer ATL* dan 20 uL protease yang kemudian vortex sebentar dan inkubasi pada suhu 56°C dalam waktu 1 – 3 jam. Selama inkubasi tube diangkat sebentar dan digoyangkan. Vortex kembali selama 15 detik kemudian ditambahkan 200 uL *buffer AL*, lalu vortex sebentar. Tambahkan ethanol 96 - 100% lalu vortex sebentar.

Semua campuran diatas dimasukan ke dalam *tube Dneasy Mini Spin Column* yang disangga oleh *tube 2 ml*, kemudian ditambah 500 uL larutan buffer AW 1 lalu *centrifuge* dengan kecepatan 8000 rpm dalam waktu 1 menit. Campuran yang berada dalam *tube Dneasy Mini Spin Column* dipindahkan ke tube 2 ml yang baru, kemudian ditambahkan 500 uL buffer AW 2 dan *centrifuge* kembali dengan kecepatan 1400 rpm selama 3 menit. Kemudian *tube 2 ml* yang digunakan sebagai penyangga dibuang dan diganti oleh tube 1,5 ml yang baru. Campuran yang berada di dalam *tube DneasyMini Spin Column* ditambahkan 200 uL *buffer AE* kemudian diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruangan. Untuk langkah terakhir dilakukan *centrifuge* dengan kecepatan 8000 rpm dalam waktu 1 menit untuk mengambil DNA.

Primer *Growth Hormone*

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi ruas gen GH berpacu pada pene-

litian sebelumnya dari Sumantri (2010) tentang Pemanfaatan Famili Gen Hormon Pertumbuhan (GH, GHR, GHRH dan PIT-1) untuk Mendeteksi Keragaman Genetik Kerbau di Kabupaten Pandeglang dan Lebak Provinsi Banten dan Misrianti (2011) tentang Growth Hormone Gene Polymorphism and Its Association with Partial Cumulative Milk Yields of Holstein Friesian Dairy Cattle yang diambil dari Balogh., et al (2009)

*Forward:*5"AGAATCAGGCCAGCAGA AATC-3"

*Reverse:*5"GTCGTCCTGCGCATGTTTG-3" Yang menghasilkan produk amplikasi sepanjang 432 *basepair* (bp).

Amplifikasi ruas gen GH dengan Metode PCR

Amplifikasi gen GH dilakukan dengan metode PCR dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 94°C selama 2 menit, diikuti dengan 35 siklus berikutnya masing-masing denaturasi 94°C selama 45 detik, dengan suhu annealing : 65°C x 30 detik, yang dilanjutkan dengan satu siklus ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit dengan menggunakan *GeneAmp PCR System 24000 ThermoCycler* (Perkin Elmer).

Deteksi situs pemotongan dengan metode PCR RFLP

Produk PCR yang diperoleh dari masing-masing gen target kemudian dianalisis menggunakan RFLP melalui pemotongan menggunakan enzim restriksi yang memiliki situs pemotongan pada gen GH|*AluI*. Sebanyak 4 uL DNA produk PCR ditambahkan 0,5 uL, selanjutnya diinkubasi selama 17 jam pada suhu 37°C.

Elektroforesis

DNA dilihat oleh elektroforesis horizontal dengan 1,5 % gel agarosa. Gel agarosa dibuat untuk mencampur agarosa ke penyangga 1 X TAE dan mendidih di microwave selama 30 detik kemudian meninggalkannya sampai suhu 60°C dan menambahkan 0,12 ml / ml ethidium-bromide sehingga DNA dapat dilihat dibawah sinar UV. Melakukan elektroforesis selama 90 menit (tergantung pada konsentrasi gel dan voltatio), 55 volt. DNA dapat dilihat di ruang gelap dengan sinar UV dan

mengambil gambar dengan Gel Doc 2000 menggunakan filter merah.

Penyajian Data

Profil dari gen hormon pertumbuhan pada sapi hasil persilangan Madura dan Limousin dapat diketahui setelah melakukan PCR yang dilanjutkan dengan RFLP kemudian hasil akan disajikan secara deskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Sample darah sebanyak 14 ekor sapi hasil persilangan Madura dan Limousin (Madrasin) dilakukan PCR untuk mendeteksi adanya gen *Growth Hormone* (GH), hasil dari PCR menunjukkan adanya 14 *band* gen GH dengan menggunakan primer gen GH. Hasil positif ditunjukkan dengan Gambar 1.

Hasil penelitian *Polymerase Chain Reaction* – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR RFLP)

Setelah terdeteksi adanya gen GH pada sapi hasil persilangan Madura dan Limousin (Madrasin) menggunakan metode PCR, selanjutnya dilakukan RFLP atau pemotongan DNA gen GH dengan menggunakan enzim restriksi *AluI* (5'-AG | CT – 3'). Hasil dari RFLP adalah 14 sample gen GH terbagi menjadi 4 band, yaitu 180 bp, 250 bp, 300 bp, dan 400 bp. Metode RFLP ini memotong gen GH sapi Madrasin dengan enzim restriksi *AluI*. Tujuan pemotongan ini adalah untuk mengetahui profil dan perbedaan gen GH sapi Madrasin. Dilihat dari Gambar 2. gen GH terbagi dalam 2 genotipe yaitu LL (180 bp, 250 bp, dan 400 bp) dan LV (180 bp, 250 bp, 300 bp dan 400 bp). Untuk lajur 4 diduga mengalami mutasi karna ditemukan gen GH pada dengan panjang 300 bp, hal ini dapat disebabkan karna susunan kimia gen atau kromosom gen GH sapi Madrasin lajur 4.

Enzim restriksi dapat mengenali gen GH pada tempat pemotongan, hal ini disebabkan sekuen DNA pada tempat pemotongan tidak mengalami mutasi. Sehingga kodon triplet yang terbentuk adalah CTG yang menyandi alel *Leusin* (L) (Woychick *et al.*, 1982). Alel L sendiri ditunjukkan

dengan panjang fragmen 180 bp, 250 bp, dan 400 bp.

Keanekaragaman pada gen GH sapi Madrasin ditunjukkan dengan adanya alel V yang dihasilkan karna adanya mutasi atau perubahan basa yang menyebabkan terjadinya perubahan asam amino *serine* (C) menjadi *glycine* (G). Akibat perubahan ini terbentuk kodon triplet GTG yang menyandi asam amino *valine* (V) (Zhang *et al.*, 1992). Alel V sendiri ditunjukkan dengan panjang fragmen 180 bp, 250 bp, 300 bp dan 400 bp. Menurut penelitian Lesmana (2017) tentang *receptor Growth Hormone* yang diretriaksi menggunakan enzim *AluI* didapatkan situs pemotongan yang juga disebabkan karna adanya perubahan asam amino *serine* (C) menjadi *glycine* (G) yang di deteksi pada fragment sepanjang 81 bp dikenal sebagai alel G.

Pada hasil RFLP dari *Growth Hormone* sapi hasil persilangan Madura dan Limousin didapatkan *band* yang memiliki tebal tipis yang berbeda-beda. Hal ini dapat disebabkan karna berbagai hal sesuai dengan pernyataan Todd (2012), salah satunya adalah waktu *annealing* yang terlalu singkat, sehingga primer tidak memiliki cukup waktu untuk mengikat template. Waktu yang disarankan adalah 1-2 menit dan temperatur saat *annealing* terlalu tinggi sehingga primer tidak dapat mengikat template. Suhu yang disarankan adalah 55°C – 60°

Frekuensi Genotipe dan Alel gen GH

Hasil perhitungan alel seperti yang dijelaskan pada Tabel 1. menunjukkan populasi sapi hasil persilangan Madura dan Limousin bersifat polimorfik atau memiliki keragaman alel. Ditunjukkan dengan frekuensi alel L sapi Madrasin 0,96. Menurut

Harris (1994), jika frekuensi alel yang umum tidak lebih dari 0,99 maka populasi sapi yang diteliti bersifat polimorfik. Hal ini berbeda dengan penelitian Volkandari (2013) tentang Frekuensi alel sapi Madura yang menunjukkan 1,00 yang berarti populasi sapi yang diteliti bersifat monomorfik.

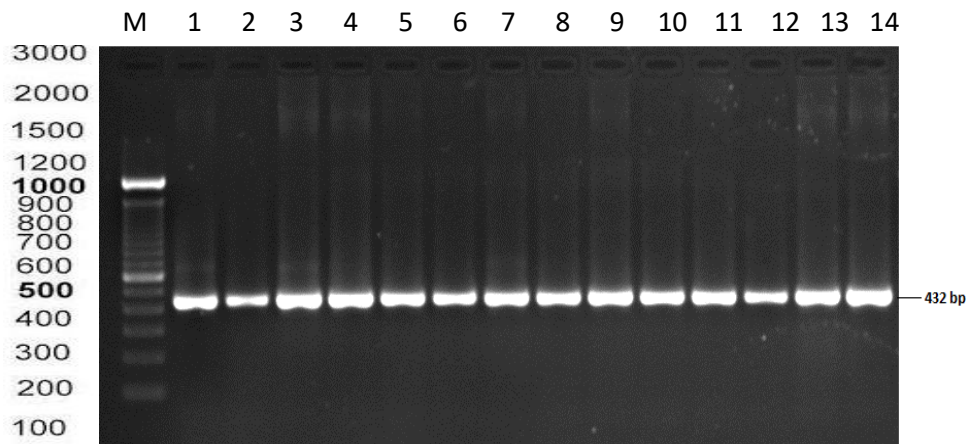
Hasil analisis gen GH sapi hasil persilangan Madura dan Limousin ditemukan frekuensi alel V sebesar 0,075, sedangkan pada hasil penelitian Volkandari., dkk (2013) frekuensi alel V pada sapi Madura menunjukkan 0,00 atau tidak ditemukan adanya alel V. Hal ini sesuai dengan penelitian Rachman (2011), yang menemukan genotipe semen beku sapi Limousin yang digunakan dalam IB di kecamatan Larangan, Kabupaten Pamekasan. Secara berturut-turut alel L dan V yang terdeteksi memiliki frekuensi 0,67 dan 0,33 dan 0,82 dan 0,18. Hal ini membuktikan bahwa sapi Limousin memiliki alel V yang tidak dimiliki oleh sapi Madura.

Kesimpulan

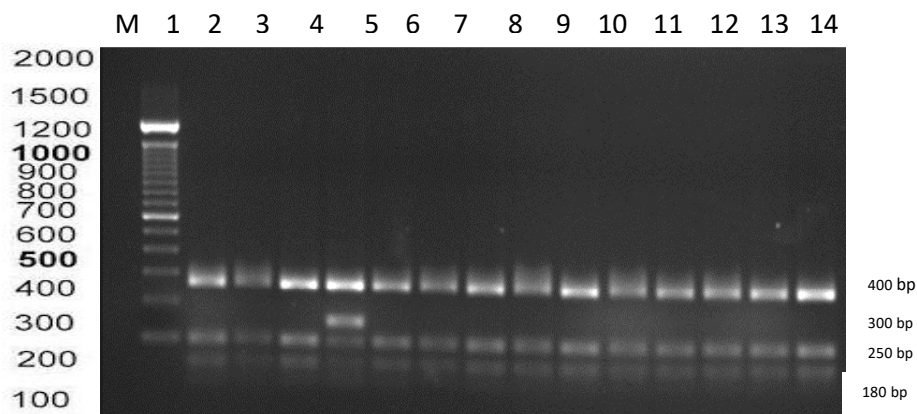
Hasil *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dari gen *Growth Hormone* (GH) sapi hasil persilangan Madura dan Limousin (Madrasin) mendapatkan panjang fragmen 432 bp. Berdasarkan hasil *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) yang memotong fragmen gen GH sapi hasil persilangan Madura dan Limousin menjadi genotipe LL (180 bp, 250 bp, dan 400 bp) dan genotipe LV (180 bp, 250 bp, 300 bp dan 400 bp). Hasil dari PCR RFLP sapi hasil persilangan Madura dan Limousin (Madrasin) memiliki alel V yang dimiliki juga oleh sapi Limousin, sedangkan tidak dimiliki oleh sapi Madura.

Tabel 1. Frekuensi genotip dan alel gen GH pada sapi Madrasin. Keterangan LL, LV dan VV = genotip homozigot L dan V = Alel

Bangsa (<i>breed</i>)	N	Frekuensi genotip (<i>genotype frequency</i>)			Frekuensi alel (<i>allele frequency</i>)	
		LL	LV	VV	L	V
Madrasin	14	0,928	0,017	0,000	0,96	0,075



Gambar 1. Hasil elektroforesis PCR dengan primer gen GH sapi Madrasin. Lajur M : Marker, Lajur 1-14 merupakan hasil elektroforesis gen GH sapi madrasin dengan panjang 432 bp.



Gambar 2. Hasil elektroforesis dari PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi *AluI* gen GH sapi Madrasin. Lajur M : Marker, Lajur 1-3 dan 5-14 genotip LL (180 bp, 250 bp, dan 400 bp), Lajur 4 genotip LV (180 bp, 250 bp, 300 bp dan 400 bp).

Daftar Pustaka

- Balogh, O., K. Kovacs, M. Kulcsar, A. Gaspardy, H. Febel, A. Zsolnai, L. Fesus, C. Delavaud, Y. Chilliard, R. O. Gilbert, and Gy. Huszenicza. 2009. Interrelationship of growth hormone *AluI* polymorphism and hyperketonemia with plasma hormones and metabolites in the beginning roles. *Annual Review of Physiology*. 63: 141-164.
- Beauchemin, V.R., M.G. Thomas, D.E. Franke and G.A. Silver. 2006. Evaluation of DNA polymorphisms involving growth hormone relative to growth and carcass characteristics in Brahman steers. *Genet. Mol. Res.* 5:438-447.
- Cunningham, E.P. 1994. The use of bovine somatotropin in milk production a review [Review]. *Irish Veterinary Journal*. 47: 207-210.
- Dario, C Carnicella D, Bufano G. 2005 . A note on the growth hormone (GH1-*AluI*) polymorphism in Podolian cattle in Southern Italy. *Anim Sci Pap Rep.* 23: 43-49.
- Dinas Peternakan Kabupaten Pamekasan. 2011. Data Populasi Ternak. Dinas Peternakan Kabupaten Pamekasan. Pamekasan.
- Harris, H. 1994. *Dasar-Dasar Genetika Biokemis Manusia*. Edisi Ketiga, diperbaharui penerjemah: dr. Abdul Salam M. Sufro, Ph.D. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Hoj, S., M. Fredholm, N.J. Larsen, and V.H. Nielsen. 1993. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in

- lines of cattle. *Animal Genetics*. 24: 91-96.
- Hradecka, E., J. Čitek, L. Panicke, V. Řehout, L. Hanusova. 2008. The relation of GH1, GHR and DGAT1 polymorphisms with estimated breeding values for milk production traits of German Holstein sires. *Czech J Anim Sci*. 53: 238-245.
- Kutsiyah, F. 2012. Analisis Pembibitan Sapi Potong di Pulau Madura. Fakultas Pertanian. Universitas Madura.
- Lesmana, G.A. 2017. Profil reseptor Growth Hormone (rGH) pada sapi Madrasin [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Lucy, M.C., S.D. Hauser, P.J. Eppard, G.G. Krivi, J.H. Clark, D.E. Bauman and R.J. Collier. 1993. Variants of somatotropin allele in cattle: Gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. *Dom. Anim. Endocrinol*. 10: 325-333
- Misrianti, R., C. Sumantri and A. Farajallah. 2010. Identification polymorphism of pituitary-specific positive transcription factor1 (Pit1) gene in Indonesian local buffalo (*Bubalus bubalis*) and Holstein-Friesian cows. *Media Petern*. 33: 131-136.
- Montaldo, H.H. and C.A.M. Herrera. 1998. Use of Molecular Markers and Major Genes in The Genetic Improvement of Livestock. *EJB Unversidad Catolica de Valparaso-Chili*.
- Nurgiartiningsih, V. M. A. 2011. Peta Potensi Genetik Sapi Madura Murni di Empat Kabupaten di Madura. *Jurnal Ternak Tropika*. 12 (2): 23-32.
- Rachman, M. P. 2011. Polimorfisme gen Growth Hormone (GH) pada sapi Madura dan Persilangan Limousin-Madura. Tesis. Program Studi Bioteknologi, Jurusan Antar Bidang, Program Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Rifai, Ahmad dan F. Kutsiyah. 2012. Service per Conception Sapi Madura yang dikawinkan dengan Sapi Limousin di Kecamatan Proppo Kabupaten Pamekasan. Fakultas Pertanian Universitas Madura. Pamekasan.
- Sellier, P. 2000. Genetically caused retarded growth in animals. *Journal Domestic Animal Endocrinology*. 19: 105-119.
- Schlee, P., R. Graml, O. Rottmann, and F. Pirchner. 1994. Influence of growth-hormone genotypes on breeding values of simmental bulls. *Journal of Animal Breeding and Genetics Zeitschrift fur Tierzuchtung und Zuchtungsbiologie*. 111: 253-256.
- Switonski, M. 2002. Molecular genetics in beef cattle breeding – A review. *Anim. Sci. Pap. Rep*. 20: 7-18.
- Tatsuda K, Oka A, Iwamoto E, Kuroda Y, Takeshita H, Kataoka H, Kouno S. . 2008. Relationship of the bovine growth hormone gene to carcass traits in Japanese black cattle. *J Anim Breed Gene*; 125: 45-49.
- Todd, C. Lorenz. 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J Vis Exp*. 63: 3998.
- Unanian, MM. DeNise SK, Zhang HM, and Ax RL, 1994. Rapid Communication: Polymerase Chain Reaction-Restriction Length Polymorphism in the Bovine Growth Hormone Gene. *J. Anim. Sci*. 72: 2203.
- Volkandari S., Hartatik T, Sumadi. 2013. Growth hormone (GH) gene polymorphism of Limura cattle. *Buletin Peternakan*. 37(2): 67-73.
- Wijono, D B., B. Setiadi. 2004. Potensi Keragaman Sumberdaya Genetik Sapi Madura. *Lokakarya Sapi Potong Pasuruan*. 42.
- Woychick, RP., S.A. Camper, R.H. Lyons. 1982. Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. *Nucleic Acid Res*. 10(22): 7197-7210.
- Yao, J.; Anggrey, S.E.; Zadworny, D.; Hayes, J.F. and Kunhlein, U. 1996. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single strand confirmation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production trait in Holstein. *Genetics*. 144: 1809-1816.
- Zhang, HK., KC Maddock, DR Brown, SK DeNise and RL Ax. 1992. Bovine Growth Hormone Gene Frequencies in Samples of U.S. AI Bulls. *J. Anim. Sci*. 71 (Suppl.1): 93.