

**Gangguan Reproduksi Ternak Sapi di Pulau Lombok,
Provinsi Nusa Tenggara Barat**
(Cattle Reproductive Disorders in Lombok Island West Nusa Tenggara
Province)

I Nyoman Dibia, Ni Luh Dartini, Ni Made Arsani
Balai Besar Veteriner Denpasar

ABSTRAK

Kegiatan penanggulangan gangguan reproduksi tahun 2015 yang bertujuan untuk mengidentifikasi, menangani kasus gangguan reproduksi serta mengetahui situasi Brucellosis dan *Infectious Bovine Rhinotracheitis* (IBR) pada ternak yang mengalami gangguan reproduksi di Pulau Lombok, Nusa Tenggara Barat, telah dilaksanakan. Metode penanggulangan gangguan reproduksi meliputi identifikasi gangguan reproduksi dan penanganan gangguan reproduksi, serta melakukan uji laboratorium terhadap sampel (serum dan swab nasal/vagina) yang diambil. Jumlah kasus gangguan reproduksi yang ditemukan adalah sebanyak 2.127 kasus. Identifikasi kasus menunjukkan endometritis ditemukan paling tinggi yaitu sebanyak 533 kasus (25,1%), selanjutnya repeat breeder 530 kasus (24,9%), hypofungsi ovarium 517 kasus (24,3%), silent heat 368 kasus (17,3%), corpus luteum persisten 89 kasus (4,2%), sistik folikel 72 kasus (3,3%), dan pyometra 18 kasus (0,8%). Tingkat kesembuhan dari penanganan kasus gangguan reproduksi secara keseluruhan sangat baik yaitu 96,33%. Uji Real Time PCR terhadap sampel swab nasal/vagina dari sapi yang mengalami gangguan reproduksi untuk mendeteksi keberadaan antigen virus penyebab IBR menunjukkan hasil negatif. Pengujian terhadap sampel serum dari sapi yang mengalami gangguan reproduksi menunjukkan hasil negatif antibodi *Brucella abortus*. Hal ini berarti tidak ditemukan adanya reaktor brucellosis, sehingga hasil pengujian ini dapat memperkuat bahwa sampai saat ini Pulau Lombok masih bebas brucellosis.

Kata kunci: Pulau Lombok, Gangguan Reproduksi, Brucellosis, *Infectious Bovine Rhinotracheitis*.

ABSTRACT

Reproductive disorders prevention activities in 2015 which aims to identify, handle cases of reproductive disorders as well as knowing the situation of Brucellosis and Infectious Bovine Rhinotracheitis in cattle in Lombok Island West Nusa Tenggara have been done. Reproductive disorders prevention method include the identification, treatment of reproductive disorders, and conduct laboratory tests on samples (serum, nasal and vagina swab) are taken. The number of cases of reproductive disorders found were 2,127 cases. Identification of cases showed endometritis was 533 cases (25,1%), repeat breeder 530 cases (24,9%), hypofungsi of ovary 517 cases (24,3%), silent heat 368 cases (17,3%), corpus luteum persisten 89 cases (4,2%), cystic of follicular 72 cases (3,3%) and the pyometra 18 cases (0,8%). The cure rate of handling cases of reproductive disorders overall is excellent i.e. 96,33%. Real Time PCR test to detect the presence of virus causes IBR on nasal and vaginal swab samples of cattle that having reproductive disorders were negative. Tests on samples of serum from cattle that causes reproductive disorders showed negative results of antibody of *Brucella abortus*. This means, there were no brucellosis reactors, so that the results of this testing can strengthen that until now Lombok Island is free of brucellosis.

Keyword: Lombok Island, Reproductive disorders, Brucellosis, *Infectious Bovine Rhinotracheitis*.

PENDAHULUAN

Latar belakang

Kebutuhan konsumsi daging cenderung meningkat sejalan dengan meningkatnya jumlah penduduk dan kesadaran masyarakat akan pentingnya protein hewani. Status kesehatan hewan yang optimal pada populasi ternak khususnya sapi/kerbau sangat penting dalam upaya penyediaan daging dan produk asal hewan yang sehat. Namun usaha sapi potong di peternakan rakyat masih mengalami banyak kendala, sehingga menghambat pencapaian swasembada daging sapi/kerbau yang telah dicanangkan pemerintah sejak beberapa tahun yang lalu. Salah satu faktor penghambat yang dipandang cukup serius adalah terjadinya gangguan reproduksi. Dari berbagai pemeriksaan yang dilakukan diseluruh wilayah Indonesia, kasus gangguan reproduksi pada ternak ruminansia besar (sapi potong, sapi perah dan kerbau) sebanyak 47%, yang umumnya disebabkan karena masalah pakan, lingkungan, genetik dan penyakit hewan. Tentunya faktor-faktor tersebut dapat berdiri sendiri atau bersinergi dalam menimbulkan gangguan reproduksi.

Berbagai faktor penyebab terjadinya gangguan reproduksi di atas, secara umum dapat menimbulkan kerugian ekonomi

yang sangat besar bagi pelaku usaha peternakan terutama peternakan rakyat kecil. Kerugian yang sering terjadi dapat berupa kegagalan bunting, pengulangan inseminasi, dan biaya pengobatan. Oleh karena itu masalah gangguan reproduksi harus dapat ditangani secara baik dan benar. Penanganan gangguan reproduksi terutama ditingkat peternakan rakyat masih belum optimal. Akibat keadaan ini, beberapa peternak terpaksa menjual sapi miliknya yang secara fisiologis masih produktif dengan harga murah karena ketidaktahuannya dalam mengatasi masalah tersebut. Adanya kesenjangan ini memerlukan sosialisasi teknologi inovatif penanggulangan gangguan reproduksi pada sapi/kerbau, dengan harapan agar induk yang masih produktif dapat memproduksi kembali, sehingga memacu semangat beternak.

Pelaksanaan gertak berahi dan IB yang didukung dengan penanggulangan gangguan reproduksi yang dilaksanakan secara berkesinambungan dan terkoordinasi dapat menjadi langkah yang tepat dalam upaya percepatan peningkatan populasi ternak di Indonesia. Terkait dengan hal tersebut, Kementerian Pertanian melalui Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan pada tahun 2015 berupaya mewujudkan ketahanan pangan hewani asal ternak berbasis sumberdaya domestik melalui peningkatan populasi dan produksi ternak sapi dan kerbau. Kegiatan penanggulangan gangguan

reproduksi di Pulau Lombok, Provinsi Nusa Tenggara Barat yang bertujuan untuk mengidentifikasi kasus gangguan reproduksi, menangani kasus gangguan reproduksi, dan mengetahui situasi Brucellosis dan *Infectious Bovine Rhinotracheitis* pada ternak yang mengalami gangguan reproduksi didiskusikan.

MATERI DAN METODE

Materi

Beberapa bahan dan peralatan yang dipergunakan dalam penanganan gangguan reproduksi antara lain hormon (GnRH, HCG/LH, PMSG, prostaglandin), antibiotika, multivitamin, mineral, antiparasit gastrointestinal, povidon iodine, kalsium borogluconas, infuset, spuit, glove, ice box. Untuk deteksi IBR digunakan real time PCR kit (2x qPCR Master Mix, VetMax™ IBR/BHV-1 reagent, Xeno™ DNA control, nuclease free water, VetMax™ IBR/BHV-1 control), dengan seperangkat peralatan real time PCR, sedangkan untuk deteksi reaktor brucellosis digunakan kit RBPT (antigen, kontrol positif dan negatif RBPT) dengan peralatan mikropipet, WHO plate, rotary agglutinator) dan kit CFT (antigen, buffer, komplemen, hemolisin, sel darah merah domba) dengan peralatan mikropipet, mikropipet, inkubator, waterbath, dan kaca pembaca.

Metode

Penanggulangan gangguan reproduksi meliputi identifikasi gangguan reproduksi dan penanganan gangguan reproduksi. Kriteria ternak yang

akan dilakukan penanganan untuk pemeriksaan gangguan reproduksi adalah ternak dengan anamnesa sebagai berikut: ada *discharge* abnormal, ada siklus estrus abnormal, estrus tidak teramati setelah 50 hari melahirkan, dikawinkan 2 kali tidak bunting, sapi yang bunting lebih dari 280 hari, sapi yang pernah mengalami retensi plasenta, abortus, melahirkan prematur atau lahir mati dan tak pernah estrus lagi.

Pemeriksaan dilakukan terhadap sapi betina produktif yang memperlihatkan kriteria gangguan reproduksi untuk menentukan status reproduksinya dan status kesehatan ternak khususnya terhadap ada tidaknya penyakit reproduksi (Brucellosis dan IBR). Pemeriksaan status reproduksi dilakukan oleh medik veteriner lapangan dengan cara: inspeksi melalui *body condition score* dan *present status*, palpasi per rektum, dan secara laboratoris dengan pengambilan dan pemeriksaan sampel darah (serum) dan swab nasal / vagina. Penentuan diagnosa gangguan reproduksi dilakukan oleh medik veteriner reproduksi. Hasil pemeriksaan dan diagnosa digunakan sebagai dasar pengobatan terhadap gangguan reproduksi dan untuk menentukan ternak tersebut dapat disembuhkan (*fausta*) atau tidak dapat disembuhkan (*infausta*). Kasus gangguan reproduksi yang bersifat tidak permanen masih bisa disembuhkan gangguan reproduksinya melalui tindakan / pengobatan sehingga dapat birahi secara normal. Sementara kasus gangguan reproduksi yang bersifat permanen, tidak bisa

disembuhkan sehingga dilakukan tindakan *culling*.

Pada sapi yang mengalami gangguan reproduksi dilakukan pengambilan sampel. Dari sampel tersebut dilakukan pengujian laboratorium terhadap penyakit hewan yang menimbulkan gangguan reproduksi yaitu Brucellosis dan IBR. Sampel yang diambil adalah serum untuk pengujian brucellosis dan swab nasal / vagina untuk pengujian IBR. Sampel serum diuji secara bertahap dengan *Rose Bengal Plate Test* (RBPT) sebagai uji pendahuluan / *screening* dan apabila ada yang positif dilanjutkan dengan uji konfirmasi *Complement Fixation Test* (CFT) dengan prosedur pengujian standar (Alton *et al.*, 1975; OIE, 2009). Pengujian sampel swab nasal / vagina untuk deteksi

antigen virus penyebab IBR digunakan VetMaxTM Real Time PCR kit IBR/BHV-1. Prosedur pengujian sesuai dengan yang direkomendasikan dari produsen.

HASIL

Jumlah Kasus Gangguan Reproduksi

Pada kegiatan penanggulangan gangguan reproduksi percepatan tahun 2015, sapi yang teridentifikasi mengalami gangguan reproduksi di lokasi Gertak Birahi dan Inseminasi Buatan (GBIB) di Pulau Lombok, Provinsi Nusa Tenggara Barat ditemukan sebanyak 2.127 kasus (39,39%) dari target, seperti disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1.

Jumlah Kasus Gangguan Reproduksi yang ditemukan di Pulau Lombok, Provinsi Nusa Tenggara Barat Tahun 2015.

No	Kabupaten	Target Kasus Gangrep	Jumlah Kasus	Persentase
1	Lombok Tengah	1.500	381	25,40
2	Lombok Timur	1.500	1.049	69,93
3	Lombok Barat	1.200	498	41,50
4	Lombok Utara	1.200	199	16,58
Jumlah		5.400	2.127	39,39

Hasil identifikasi jenis gangguan reproduksi di masing-masing kabupaten disajikan pada Tabel 2. Berdasarkan hasil pemeriksaan oleh medik veteriner gangguan reproduksi diperoleh bahwa kasus endometritis ditemukan paling tinggi yaitu sebanyak 533 kasus

(25,1%), selanjutnya repeat breeder 530 kasus (24,9%),

hypofungsi ovari 517 kasus (24,3%), silent heat 368 kasus (17,3%), corpus luteum persisten 89 kasus (4,2%), sistik folikel 72

kasus (3,3%), dan pyometra 18 kasus (0,8%).

Tabel 2.

Hasil identifikasi jenis gangguan reproduksi yang ditangani di Pulau Lombok, Provinsi Nusa Tenggara Barat tahun 2015.

No	Kabupaten	Jenis Kasus Gangguan Reproduksi							Total
		CLP	SF	Endo	HO	RB	SH	PIO	
1	Lombok Tengah	22	11	99	87	68	90	4	381
2	Lombok Timur	41	11	277	323	186	200	11	1.049
3	Lombok Barat	21	23	140	75	188	48	3	498
4	Lombok Utara	5	27	17	32	88	30	-	199
Jumlah		89	72	533	517	530	368	18	2.127
Persentase		4,2	3,3	25,1	24,3	24,9	17,3	0,8	100

Keterangan :

CLP = Corpus Luteum Persisten

SF = Sistik Folikel

End = Endometritis

HO = Hipofungsi Ovary

RB = Repeat Breeder

SH = Silent Heat

PIO = Pyometra

Hasil Penanganan Kasus Gangguan Reproduksi dan Tingkat Kesembuhannya.

Keberhasilan penanganan kasus gangguan reproduksi ditentukan dengan tingkat kesembuhan atau

ternak yang ditangani mengalami birahi yang normal kembali. Dari 2.127 kasus yang ditangani di Pulau Lombok, Provinsi Nusa Tenggara Barat sebanyak 2.049 kasus (96,33%) berhasil sembuh, seperti pada Tabel 3.

Tabel 3.

Hasil Penanganan dan Tingkat Kesembuhan Kasus Gangguan Reproduksi di Pulau Lombok, Provinsi Nusa Tenggara Barat Tahun 2015.

No	Kabupaten	Jumlah Kasus	Kasus Sembuh	Kasus Tidak Sembuh	Persentase Sembuh
1	Lombok Tengah	381	381	0	100,00
2	Lombok Timur	1.049	979	70	93,33
3	Lombok Barat	498	495	3	99,40
4	Lombok Utara	199	194	5	97,49

Jumlah	2.127	2.049	78	96,33
---------------	--------------	--------------	-----------	--------------

negatif di seluruh kabupaten /kota lokasi GBIB.

Hasil Pengujian Laboratorium terhadap Brucellosis dan IBR

Uji Real Time PCR terhadap 195 sampel swab nasal/ vagina dari sapi yang mengalami gangguan reproduksi untuk mendeteksi keberadaan antigen virus penyebab IBR menunjukkan hasil

Demikian pula halnya pengujian terhadap sampel serum dari sapi yang mengalami gangguan reproduksi juga menunjukkan hasil negatif antibodi *Brucella abortus* (Tabel 4).

Tabel. 4.

Jumlah Sampel Kasus Gangguan Reproduksi dan Hasil Uji Brucellosis serta IBR di Pulau Lombok, Provinsi Nusa Tenggara Barat, Tahun 2015.

No	Kabupaten	Sampel		Hasil Uji	
		Serum	Swab Nasal / Vagina	Brucellosis	IBR
1	Lombok Tengah	70	15	Negatif	Negatif
2	Lombok Timur	149	90	Negatif	Negatif
3	Lombok Barat	115	72	Negatif	Negatif
4	Lombok Utara	43	18	Negatif	Negatif
Jumlah		377	195	Negatif	Negatif

PEMBAHASAN

Penanganan Gangguan Reproduksi

Jumlah kasus gangguan reproduksi berdasarkan hasil pemeriksaan pada kelompok ternak di lokasi GBIB dalam program percepatan pada tahun 2015 di Pulau Lombok, Provinsi Nusa Tenggara Barat adalah sebanyak 2.127 kasus. Identifikasi kasus menunjukkan endometritis ditemukan paling tinggi yaitu sebanyak 533 kasus (25,1%), disusul repeat breeder 530 kasus (24,9%). Hasil ini mengindikasikan bahwa endometrium telah mengalami peradangan yang kemungkinan disebabkan karena

terjadi kontaminasi mikroba penyebab peradangan pada saat melakukan IB, mengingat kegiatan IB di Pulau Lombok, Provinsi NTB telah berjalan sangat intensif. Kejadian endometritis dapat berlanjut menjadi pyometra (0,8%) seperti Tabel 2. bila terkontaminasi bakteri pembentuk nanah. Kemungkinan lain terjadinya endometritis adalah pasca penanganan retensi plasenta, atau saat membantu proses kesulitan melahirkan (distokia) yang kurang atau tidak legeartis. Kejadian distokia terjadi umumnya pada kelahiran pedet akibat persilangan sapi Bali (induk) yang di IB dengan semen dari breed sapi berukuran lebih besar seperti simental dan limousin. Hasil penanganan gangguan reproduksi di Pulau Lombok, NTB ini sesuai dengan pendapat Putro (2013), yang menyatakan bahwa kasus kawin berulang pada akseptor IB diperkirakan 80% akibat endometritis sub klinis.

Tingginya kejadian kasus hypofungsi ovarium (menurunnya fungsi ovarium) yakni 517 kasus (24,3%), dan silent heat 368 kasus (17,3%), merupakan fakta masih rendahnya kinerja reproduksi. Kondisi ini sangat mungkin disebabkan oleh kurangnya pakan atau menurunnya kualitas pakan. Menurut Baker (2014), kualitas dan kuantitas pakan merupakan komponen paling utama dalam keberhasilan usaha peternakan. Kondisi ternak yang mengalami defisiensi nutrisi atau malnutrisi sangat umum dijumpai di Indonesia, terutama pada musim kemarau panjang sehingga terjadi kelangkaan hijauan pakan ternak maupun limbah pertanian lainnya. Asupan nutrisi berpengaruh langsung pada kemampuan reproduksi sapi. Jumlah nutrisi yang mencukupi akan mendorong proses biologis sapi. Kekurangan pakan khususnya untuk daerah tropis merupakan salah satu penyebab kemajiran pada ternak betina. Adanya infertilitas metabolik sangat erat kaitannya dengan malnutrisi yang pada akhirnya akan menyebabkan rendahnya kinerja reproduksi ternak sapi tersebut (Donalson, 2014). Faktor lain yang perlu dikaji dan mungkin berkontribusi terhadap tingginya kasus hypofungsi ovarium adalah betina produktif (induk) hasil perkawinan silang.

Kriteria keberhasilan penanganan gangguan reproduksi adalah apabila kondisi ternak yang telah dilakukan penanganan gangguan reproduksi dapat menunjukkan estrus secara normal dan siap untuk di IB. Tingkat kesembuhan dari kasus gangguan reproduksi di Pulau Lombok Provinsi NTB, secara keseluruhan sangat baik yaitu 96,33%. Capaian tingkat kesembuhan ini berada di atas yang ditargetkan secara

nasional yakni 40%. Hasil ini menunjukkan bahwa penanganan gangguan reproduksi telah sesuai dengan prosedur operasional dan ditangani secara profesional.

Pengujian terhadap *Infectious Bovine Rhinotracheitis* dan Brucellosis

Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) merupakan penyakit virus yang sangat menular yang disebabkan oleh bovine herpes virus-1 (BHV-1) (Rola *et al.*, 2005). Penyakit ini mempunyai manifestasi klinis yang diantaranya berupa infeksi saluran pernafasan dan atau infeksi saluran reproduksi yang menyebabkan keguguran. Uji Real Time PCR terhadap sampel swab nasal / vagina dari sapi yang mengalami gangguan reproduksi untuk mendeteksi keberadaan antigen virus penyebab IBR menunjukkan hasil negative, walaupun PCR dinyatakan sebagai perangkat uji yang sensitif dan spesifik (Rola *et al.*, 2005). Tidak terdeteksinya antigen virus tersebut mengindikasikan sapi yang mengalami gangguan reproduksi di lokasi GBIB memang terbebas IBR. Kemungkinan lain yang perlu diperhatikan adalah sifat virus penyebab IBR yang bersifat laten pada sel host yang tidak mudah untuk dideteksi. Berdasarkan pathogenesis, setelah infeksi, virus penyebab IBR akan menyebar dari infeksi lokal ke sistem saraf melalui sel saraf tepi hingga mencapai ganglia trigeminal dan menetap (bersifat laten). Selain itu limfoglandula dan mukosa hidung juga disebut sebagai tempat virus menjadi laten. Hewan yang terinfeksi secara laten bertindak sebagai pembawa virus (carrier) dan merupakan sumber penyebaran penyakit. Walaupun kondisi ternak sapi tidak menunjukkan gejala klinis, shedding virus dengan interval yang tidak teratur dapat terjadi bila terjadi reaktivasi virus. Reaktivasi virus dapat dipicu oleh kondisi ternak stress, pemberian obat corticosteroid, atau adanya infeksi mikroorganisme pathogen.

Brucellosis merupakan salah satu penyakit hewan menular strategis di Indonesia karena dapat menimbulkan kerugian ekonomi yang sangat besar. Pulau Lombok sudah berhasil bebas dari Brucellosis sejak tahun 2002, yang dipertegas dengan Keputusan Menteri Pertanian Nomor 444/Kpts/TN.540/7/2002. Walaupun demikian monitoring status bebas tetap perlu dilakukan sebagai bentuk implementasi *early warning system*. Pengujian terhadap sampel serum dari sapi yang mengalami gangguan reproduksi di Pulau Lombok, Provinsi NTB menunjukkan hasil negatif antibodi brucella. Hal ini berarti tidak ditemukan adanya reaktor brucellosis, yang mengindikasikan bahwa sapi yang mengalami gangguan reproduksi tidak terinfeksi *Brucella abortus*. Dengan demikian, hasil pengujian ini dapat memperkuat bahwa sampai saat ini Pulau Lombok masih bebas dari brucellosis.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

1. Gangguan reproduksi yang ditemukan pada lokasi program GBIB tahun 2015 di Pulau Lombok, NTB sebanyak 2.127 kasus, terdiri atas endometritis 533 kasus (25,1%), repeat breeder 530 kasus (24,9%), hypofungsi ovari 517 kasus (24,3%), silent heat 368 kasus (17,3%), corpus luteum persisten 89 kasus (4,2%), sistik folikel 72 kasus (3,3%), dan pyometra 18 kasus (0,8%).

2. Tingkat kesembuhan dari penanganan kasus gangguan reproduksi secara keseluruhan sangat baik yaitu 96,33%.
3. Agen virus penyebab IBR dan reaktor brucellosis tidak ditemukan pada sampel yang dikoleksi dari sapi yang mengalami gangguan reproduksi.

Saran

1. Faktor risiko yang berasosiasi dengan kejadian gangguan reproduksi pada kelompok ternak di lokasi program GBIB perlu dikaji lebih lanjut.
2. Perlu dilakukan surveilans berkelanjutan sebagai langkah deteksi dini agen virus penyebab IBR dan pemetaan reaktor Brucellosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kepala Balai Besar Veteriner Denpasar atas dukungan yang diberikan pada kegiatan penanganan gangguan reproduksi di Pulau Lombok, Nusa Tenggara Barat, serta kepada Kepala Dinas Provinsi dan Kabupaten / Kota yang membidangi fungsi peternakan dan kesehatan hewan beserta staf atas dukungan, bantuan dan kerjasamanya yang baik selama pelaksanaan kegiatan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D., Verger, J. M., 1975. Techniques for The Brucellosis Laboratory : 81-87.
- Baker, J. J., 2014. Beef Cattle Production in Tropics. Florentina Publishing Co, Glassgow.
- Direktorat Kesehatan Hewan, 2014. Pedoman Teknis Pelaksanaan Penanganan Gangguan Reproduksi Ternak Sapi dan Kerbau. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Kementerian Pertanian.
- Donaldson, R., 2014. Beef cattle breeding: Principles and problems. Rockwell Press, Sydney.
- Kementerian Pertanian, 2015. Peraturan Menteri Pertanian No.373/Kpts/HK.030/F/04/2015 tentang Pedoman Teknis Percepatan Peningkatan Populasi Melalui Gertak / Sinkronisasi Berahi dan Optimalisasi Inseminasi Buatan (GBIB) serta Penanggulangan Gangguan Reproduksi pada Ternak Sapi dan / atau Kerbau APBNP tahun 2015.
- OIE (2009). Bovine Brucellosis. Chapter 11.3, article 11.3.2 dan 11.3.3: 581 - 584.
- Putro, P. P., 2013. Bentuk gangguan reproduksi sapi akseptor IB di Indonesia. *Journal Sain Veteriner* 15: 36-41.

Rola, J., Larska, M., and Polak, M. P., 2005. Detection of Bovine Herpesvirus 1 from an Outbreak of Infectious Bovine Rhinotracheitis. *Bull Vet Inst Pulawy* 49 : 267-271.