

“Sumber Daya Pertanian Berkelanjutan dalam Mendukung Ketahanan dan Keamanan Pangan Indonesia pada Era Revolusi Industri 4.0”

Bobot Relatif Organ Limfoid Ayam Broiler yang Diberi Ekstrak Tomat sebagai Air Minum dan Diinfeksi Bakteri *Escherichia coli*

Roichana Zulfa, Hanny Indrat Wahyuni dan Sugiharto

*Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro
Kampus drh. Soejono Koesoemowardojo Tembalang Semarang 50275
Email : rzulfa31@gmail.com*

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak tomat sebagai air minum dan infeksi bakteri *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) terhadap bobot relatif organ limfoid ayam broiler. Materi yang digunakan meliputi 128 ekor *day old chick* (DOC) ayam broiler strain Lohman MB-202 *unsex* dengan bobot awal rata-rata $43,31 \pm 3,34$ g, limbah tomat dan bakteri APEC. Ayam ditempatkan secara acak ke dalam 4 perlakuan dan 4 ulangan dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Perlakuannya yaitu T0 (0 ml/hari ekstrak tomat + infeksi APEC), T1 (40 ml/hari ekstrak tomat + infeksi APEC), T2 (80 ml/hari ekstrak tomat + infeksi APEC) dan T3 (120 ml/hari ekstrak tomat + infeksi APEC). Perlakuan diberikan setiap pagi hari sesuai dosis sejak ayam broiler berumur 15 hari, setelah ekstrak tomat habis diganti dengan air minum. Ayam dipelihara selama 35 hari dan diinfeksi bakteri APEC 10^8 cfu/ml secara oral atau *force feeding* menggunakan *sput* dengan dosis 0,5 ml per ekor saat berumur 24, 26 dan 28 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak tomat 40 ml berpengaruh nyata ($P < 0,05$) meningkatkan bobot relatif *thymus* dan tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap bobot relatif *bursa fabricius* dan limpa ayam broiler yang diinfeksi bakteri APEC. Bobot relatif *thymus* yang diberi 40 ml ekstrak tomat adalah yang paling tinggi. Simpulan penelitian ini yaitu pemberian 40 ml ekstrak tomat dapat mempertahankan sistem kekebalan tubuh ayam broiler yang diinfeksi bakteri APEC yang ditunjukkan dengan peningkatan bobot relatif *thymus*.

Kata kunci: Ayam broiler, ekstrak tomat, *E. coli*, organ limfoid

Pendahuluan

Keberhasilan dalam usaha budidaya ayam broiler ditentukan oleh beberapa faktor antara lain bibit, pakan, manajemen, kesehatan dan keadaan lingkungan. Diantara faktor-faktor tersebut yang sangat penting yaitu kesehatan, karena ayam yang sehat akan lebih mampu dalam mengkonversi pakan menjadi daging dibandingkan dengan ayam yang tidak sehat. Kesehatan ayam berhubungan erat dengan sistem kekebalan tubuh dikarenakan sistem tersebut berperan dalam melawan agen infeksi yang menyerang tubuh ayam. Ayam broiler yang mengalami cekaman panas atau infeksi bakteri dan tidak memperoleh tambahan antioksidan eksogenus (yang ditambahkan dalam pakan)

dapat mengganggu pertumbuhan organ limfoid seperti *bursa fabricius* dan limpa, sehingga dapat menurunkan sistem ketahanan tubuh. Langkah untuk mengantisipasi masuknya penyakit atau menghadapi adanya radikal bebas di dalam tubuh adalah dengan mengoptimalkan pertahanan tubuh ayam melalui pemberian antioksidan yang berasal dari limbah tomat.

Tomat merupakan salah satu sumber antioksidan karena mengandung likopen, vitamin A dan C yang cukup tinggi. Tomat yang dihancurkan dan dimasak menjadi sumber likopen lebih baik, karena selama proses pemanasan tersebut terjadi isomerisasi dan oksidasi (Damayanthi *et al.*, 2010), sehingga senyawa likopen dibebaskan dan menjadi lebih tersedia. Likopen merupakan salah satu karotenoid yang relatif lebih efisien menangkap radikal bebas daripada karotenoid lainnya (Mu'nisa, 2012). Kandungan likopen yang terdapat di dalam tomat yaitu 30 - 200 mg/kg segar (Myong *et al.*, 2013), sedangkan kadar vitamin C di dalam tomat segar berkisar antara 14,60 - 22,40 mg/100 g (Novita *et al.*, 2012).

Sistem imunitas atau ketahanan tubuh merupakan salah satu indikator produktivitas ternak. Baik buruknya sistem imunitas dapat dilihat dari kondisi organ limfoid yaitu bursa fabricius, timus dan limpa dan juga sebagai indikator adanya penyimpangan fungsi organ, akibat adanya infeksi, masuknya benda asing atau kuman. Ketahanan tubuh dapat menurun akibat adanya infeksi bakteri *Escherichia coli* yang menyebabkan penyakit kolibasilosis yang berakibat pada tingginya morbiditas dan mortalitas ayam broiler. Strain *E. coli* umumnya non patogenik yang merupakan mikroflora normal pada usus hewan, tetapi beberapa galur bersifat seperti *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) yang dapat menginfeksi unggas secara sistemik dan menimbulkan bakteremia dengan tanda-tanda : diare pasta, bulu-bulu kasar, sayap menggantung dan kelemahan umum (Wibowo dan Wahyuni, 2008).

Bursa fabricius dan *thymus* merupakan tempat pembentukan sel limfosit yang berdiferensiasi menjadi *lymphoid stem cells* dan berperan dalam sistem ketahanan tubuh (Tizard, 1988). Adanya cekaman dapat menurunkan bobot relatif *bursa fabricius* dan *thymus* karena dipengaruhi oleh hormon kortikosteron (Kusnadi, 2009), sehingga terjadi deplesi atau pengecilan folikel limfoid. Di sisi lain, infeksi bakteri atau penyakit pada ayam menyebabkan ukuran limpa membesar karena limpa harus memproduksi sel limfosit dalam jumlah banyak sebagai upaya pertahanan tubuh (Tizard, 1988). Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak tomat sebagai air minum dan diinfeksi bakteri *Escherichia coli* terhadap bobot relatif organ limfoid ayam broiler. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah pemberian ekstrak tomat sebagai air minum dapat menjaga dan mempertahankan bobot relatif organ limfoid ayam broiler yang terinfeksi bakteri *Escherichia coli*.

Metodologi

Materi yang digunakan adalah DOC ayam broiler strain Lohman MB-202 *unsex* sebanyak 128 ekor dengan bobot badan awal rata-rata $43,31 \pm 3,34$ g, limbah tomat dan bakteri *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC). Rancangan penelitian menggunakan RAL dengan 4 perlakuan dan 4 ulangan pada setiap unit percobaan terdiri atas 8 ekor. Perlakuan yang dicobakan adalah ekstrak tomat sebagai air minum sebagai berikut : T0 (0 ml/hari ekstrak tomat + infeksi APEC), T1 (40 ml/hari ekstrak tomat + infeksi APEC), T2 (80 ml/hari ekstrak tomat + infeksi APEC) dan T3 (120 ml/hari ekstrak tomat + infeksi APEC).

Pakan yang digunakan yaitu pakan komersial starter dan finisher. Pakan starter dengan kandungan protein kasar 22% dan energi metabolisme (EM) 2.900 kkal/kg diberikan pada minggu pertama sampai minggu ketiga dan pakan finisher dengan kandungan protein kasar 21% dan EM 3.100 kkal/kg diberikan pada minggu keempat sampai akhir pemeliharaan. Pakan dan minum diberikan secara *ad libitum* dan setiap pagi sisa ditimbang dan dibersihkan.

Limbah tomat dari pasar tradisional dipilih dan dicuci dengan air, kemudian dipotong-potong dan diblender hingga halus, selanjutnya ditambah air dengan perbandingan 1 kg : 300 ml, disaring dan direbus sambil diaduk pada suhu 65 - 70 °C selama 5 menit. Ekstrak tomat didinginkan dan dimasukkan ke dalam wadah kemudian disimpan dalam *freezer*. Ekstrak tomat yang digunakan dalam penelitian ini dianalisis di laboratorium Universitas Katolik Semarang diketahui mengandung vitamin C sebesar 53,787 ppm dan aktivitas antioksidan sebesar 38,919%.

Ayam broiler dipelihara selama 35 hari dengan perlakuan ekstrak tomat dimulai pada saat ayam berumur 15 hari dan diberikan setiap pagi hari pukul 05.00 WIB sesuai dosis perlakuan, setelah ekstrak tomat habis diganti dengan air minum. Selain itu, ayam broiler juga diberikan perlakuan infeksi bakteri APEC 10^8 cfu/ml secara oral atau *force feeding* dengan dosis sekali pemberian 0,5 ml per ekor, yang dilakukan sebanyak tiga kali yaitu pada saat ayam broiler berumur 24, 26 dan 28 hari. Di akhir penelitian setiap unit percobaan diambil satu ekor ayam broiler secara acak sebagai pengukuran parameter bobot relatif *bursa fabricius*, *thymus* dan limpa. Bobot relatif organ limfoid merupakan hasil perbandingan antara bobot organ limfoid (gram) dengan bobot hidup (gram) dikalikan 100. Data diolah secara statistik dengan analisis ragam (uji F) pada taraf 5%, apabila terdapat pengaruh yang nyata maka dilanjutkan dengan uji beda Duncan (Steel and Torrie, 1993).

Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian tentang bobot relatif organ limfoid ayam broiler yang diberi ekstrak tomat sebagai air minum dan diinfeksi bakteri *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rerata Bobot Relatif *Bursa Fabricius*, *Thymus* dan Limpa Ayam Broiler Umur 35 Hari

Variabel	Perlakuan			
	T0	T1	T2	T3
<i>Bursa fabricius</i>	0,10 ± 0,03	0,13 ± 0,09	0,12 ± 0,06	0,09 ± 0,02
<i>Thymus</i>	0,21 ± 0,02 ^b	0,41 ± 0,10 ^a	0,31 ± 0,05 ^{ab}	0,30 ± 0,09 ^{ab}
Limpa	0,15 ± 0,05	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,13 ± 0,06

Keterangan : Superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$);

Pemberian berbagai level ekstrak tomat pada ayam broiler yang kemudian diinfeksi dengan APEC tidak memberikan pengaruh ($P > 0,05$) terhadap bobot relatif *bursa fabricius* dan limpa, tetapi berpengaruh nyata terhadap bobot relatif *thymus*.

Bobot relatif *bursa fabricius* hasil penelitian ini yaitu berkisar 0,09 – 0,13% (Tabel 1), yang lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Cazaban *et al.* (2015) yaitu sebesar 0,19%. Hal ini dimungkinkan karena infeksi bakteri APEC yang diberikan pada penelitian ini. Infeksi tersebut menyebar ke organ limfoid primer dan target utamanya adalah merusak sel limfosit B dan sebagian limfosit T, sehingga *bursa fabricius* bekerja keras menghasilkan antibodi untuk ketahanan tubuh yang menyebabkan folikel *bursa fabricius* mengalami deplesi yang berdampak pada bobot relatifnya menurun. Jamin (2012) menyatakan bahwa *bursa fabricius* yang bekerja keras membentuk antibodi untuk ketahanan tubuh lama kelamaan akan mengalami deplesi dan pengecilan folikel limfoid sehingga bobot relatifnya menurun.

Pemberian berbagai level ekstrak tomat tidak mempengaruhi bobot relatif *bursa fabricius* karena ekstrak tomat berfungsi menstimulasi sistem imunitas seluler sedangkan *bursa fabricius* merupakan sistem imunitas humoral yang menghasilkan sel limfosit B. Iswari (2013) menyatakan bahwa ekstrak tomat mempunyai efek menstimulasi sistem imunitas seluler. Sel limfosit B berperan sebagai imunitas humoral yang fungsi utamanya adalah mempertahankan tubuh dari infeksi ekstraseluler, bakteri, virus dan melakukan netralisasi toksin. Jamilah *et al.* (2013) menyatakan bahwa antibodi humoral merupakan sumber utama perlindungan untuk membunuh antigen sebelum menyebar ke dalam darah.

Uji beda Duncan pada bobot relatif *thymus* menunjukkan T0 nyata ($P < 0,05$) paling rendah dibandingkan T1, T2 dan T3, serta T1 nyata lebih tinggi dibandingkan T2 dan T3. Bobot relatif *thymus* hasil penelitian ini yaitu berkisar antara 0,21 – 0,41% (Tabel 1), yang tergolong normal

kecuali pada T0. Zhang *et al.* (2013) menyatakan bahwa bobot relatif *thymus* ayam broiler berkisar 0,26 - 0,38%, namun hasil penelitian Morales-Lopez (2009) sedikit lebih tinggi yaitu 0,43 - 0,58%. Bobot relatif T0 yang lebih rendah dikarenakan ayam pada T0 tidak diberi ekstrak tomat sebagai sumber antioksidan tambahan, sehingga mengalami stres oksidatif akibat infeksi bakteri APEC. Bikrisima *et al.* (2013) menyatakan bahwa pemberian antioksidan tambahan dapat menjaga pertumbuhan organ *thymus*, sehingga sistem kekebalannya dapat berfungsi dengan baik. Di sisi lain Kusnadi (2009) menyatakan bahwa adanya infeksi atau kondisi sakit menyebabkan terjadinya pengecilan organ timus.

Pemberian berbagai level ekstrak tomat dapat meningkatkan bobot relatif *thymus*. Hal ini karena *thymus* merupakan sistem imun seluler yang menghasilkan sel T dan ekstrak tomat yang mengandung vitamin C dan likopen berperan sebagai imunostimulan sistem imun seluler untuk meningkatkan pertumbuhan limfosit T. Iswari (2013) menyatakan bahwa ekstrak tomat mempunyai efek menstimulasi sistem imun seluler melalui peningkatan proliferasi sel T dan peningkatan indeks fagositosis makrofag. Pemberian ekstrak tomat meningkatkan bobot relatif *thymus* yang menandakan bahwa telah terjadi peningkatan sistem imunitas. Hal ini kemungkinan berhubungan dengan peningkatan penyerapan likopen yang terkandung dalam ekstrak tomat sebagai imunostimulan sel limfosit T. Ekstrak tomat yang digunakan dalam penelitian ini mengandung vitamin C sebesar 53,787 ppm dan aktivitas antioksidan sebesar 38,919%. Agarwal dan Rao (2000) menyatakan bahwa meningkatnya penyerapan likopen dapat dilihat dari peningkatan bobot relatif *thymus*, sehingga dapat dikatakan fungsi likopen sebagai agen pemacu kekebalan bekerja dengan baik. Salah satu mekanisme kerja likopen yaitu mekanisme non oksidatif melalui pengaturan fungsi gen, modulasi hormon, respon imun dan pengaturan metabolisme yang dapat menurunkan resiko penyakit kronis.

Bobot relatif *thymus* T1 sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan T2 dan T3 yang pemberian ekstrak tomatnya lebih banyak. Hal ini diduga karena pembuatan ekstrak tomat dengan suhu 65 – 70 °C selama 5 menit tidak dapat mematikan semua bakteri pada limbah tomat, seperti bakteri termofilik. Adanya bakteri pada ekstrak tomat dapat ikut serta menginfeksi tubuh ayam, sehingga selain terinfeksi oleh bakteri APEC juga terinfeksi oleh bakteri lain. Adrianto (2018) menyatakan bahwa bakteri termofilik tumbuh optimum pada suhu 50 – 100 °C. Selain itu, pemberian ekstrak tomat yang lebih banyak membutuhkan waktu lebih lama untuk habis, sehingga memicu bakteri patogen untuk berkembang biak dan ekstrak tomat yang terpapar udara dan cahaya terlalu lama dapat menyebabkan likopen terdegradasi, sehingga aktivitas antioksidannya menurun. Rahayu *et al.* (2014) menyatakan bahwa degradasi likopen dapat terjadi karena proses isomerisasi dan oksidasi oleh cahaya, oksigen, suhu tinggi, penyimpanan dan akibat proses atau isolasi isomerisasi reaksi dengan asam.

Bobot relatif limpa hasil penelitian ini yaitu berkisar antara 0,12 – 0,15% (Tabel 1), yang masih dalam kisaran normal seperti hasil penelitian Hermana *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa bobot relatif limpa ayam broiler umur lima minggu berkisar antara 0,09 - 0,14%. Hal ini dimungkinkan bahwa limpa tidak bekerja keras dalam menyaring darah, mendegradasi eritrosit yang sudah tua karena total eritrosit hasil penelitian Musa'id (2019) tergolong normal yaitu $2,26 \times 10^6/\text{mm}^3$ dan pendewasaan sel limfosit B dan T masih dilakukan oleh *bursa fabricius* dan *thymus*. Jamilah *et al.* (2013) menyatakan bahwa fungsi limpa unggas yaitu memfagositosis eritrosit yang sudah tua oleh makrofag dan pendewasaan sel limfosit B dan T.

Pemberian ekstrak tomat mampu memperbaiki imunitas tubuh sehingga makrofag berfungsi dengan baik dan mampu membunuh bakteri APEC sebelum sampai ke aliran darah, sehingga mengurangi kerja limpa. Jamilah *et al.* (2013) menyatakan bahwa makrofag yang berfungsi dengan baik akan berimbas pada berkurangnya antigen yang dapat mengurangi kerja limpa sehingga ukuran limpa normal. Selain itu, infeksi bakteri APEC dapat dihadang oleh sel B yang dihasilkan *bursa fabricius* sebagai pertahanan tubuh pertama sebelum infeksi menyebar, sehingga limpa tidak bekerja terlalu keras. Yuniwanti (2013) menyatakan bahwa adanya infeksi dapat menstimulasi sel B untuk menghasilkan antibodi sehingga meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag yang dapat menetralkan dan mencegah tersebarnya infeksi.

Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian 40 ml ekstrak tomat dapat mempertahankan sistem kekebalan tubuh ayam broiler yang diinfeksi APEC yang ditunjukkan dengan peningkatan bobot relatif *thymus*, bobot relatif limpa tetap normal, meskipun bobot relatif *bursa fabricius* di bawah normal.

Saran

Pembuatan ekstrak tomat perlu dilakukan peningkatan suhu dan lama perebusan agar optimal untuk mematikan bakteri patogen yang ada pada limbah tomat.

Daftar pustaka

- Adrianto, R. 2018. Pemantauan jumlah bakteri *Coliform* di perairan sungai Provinsi Lampung. *J. Teknologi Agro Industri*. 10 (1): 1 – 6.
- Agarwal, S. and A. V. Rao. 2000. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. 163 (6): 739 – 744.

- Bikrisima, S. H. L., L. D. Mahfudz dan N. Suthama. 2013. Ketahanan tubuh ayam broiler pada kondisi tropis yang diberi jambu biji merah (*Psidium guajava*) sebagai sumber antioksidan. *AgroMedia*. 31 (2): 46 – 57.
- Cazaban, C., N. M. Masferrer, R. D. Pascual, M. N. Espadamala, T. Costa dan Y. Gardin. 2015. Proposed bursa of fabricius weight ratio standard in commercial broilers. *J. Poultry Science*. 94 (9): 2088 – 2093.
- Damayanthi, E., L. Kustiyah, M. Khalid dan H. Farizal. 2010. Aktivitas antioksidan bekatul lebih tinggi daripada jus tomat dan penurunan aktivitas antioksidan serum setelah intervensi minuman kaya antioksidan. *J. Gizi dan Pangan*. 5 (3): 205 – 210.
- Hermana, W., D. I. Puspitasari, K. G. Wiryawan dan S. Suharti. 2008. Pemberian tepung daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) dalam ransum sebagai bahan antibakteri *Escherichia coli* terhadap organ dalam ayam broiler. *Media Peternakan*. 31 (1): 63 – 70.
- Iswari, R. S. 2013. Studi imunostimulan ekstrak tomat pada infeksi *Plasmodium berghei*. *J. Sains dan Teknologi*. 11 (2): 179 – 188.
- Jamilah, N. Suthama dan L. D. Mahfudz. 2013. Performa produksi dan ketahanan tubuh broiler yang diberi pakan *step down* dengan penambahan asam sitrat sebagai *acidifier*. *J. Ilmu Ternak Veteriner*. 18 (4): 251 – 257.
- Jamin, F. 2012. Akibat infeksi *Candida albicans* dan pemberian kortikosteroid menyebabkan kondisi immunosupresi organ *bursa fabricius* pada ayam pedaging. *J. Ilmiah Pendidikan Biologi*. 4 (2): 67 – 71.
- Kusnadi, E. 2009. Perubahan malonaldehida hati, bobot relatif *bursa fabricius* dan rasio Heterofil/Limfosit (H/L) ayam broiler yang diberi cekaman panas. *Media Peternakan*. 32 (2): 20 – 31.
- Morales-Lopez, R., E. Auclair, F. Garcia, E. Esteve-Garcia and J. Brufau. 2009. Use of yeast cell walls; -1, 3/1, 6-glucans and mannoproteins in broiler chicken diets. *Poultry Science*. 88 (3): 601 – 607.
- Musa'id, J. 2019. Pengaruh Pemberian Minum Ekstrak Tomat Terhadap Profil Darah Merah Ayam Broiler yang Diinfeksi Bakteri *Escherichia coli*. Fakultas Peternakan dan Pertanian. Universitas Diponegoro, Semarang. SKRIPSI.
- Mu'nisa, A. 2012. Analisis kadar likopen dan uji aktivitas antioksidan pada tomat asal Sulawesi Selatan. *J. Bionature*. 13 (1): 62 – 66.
- Myong R., Kyun, M. H. Jeon, J. N. Moon, W. S. Moon, S. M. Park dan J. S. Choi. 2013. A simple method for the isolation of lycopene from *Lycopersicon esculentum*. *Botanical Sciences*. 91 (2): 187 – 192.
- Novita, M., Satriana, Martunis, S. Rohaya dan E. Hasmarita. 2012. Pengaruh pelapisan kitosan terhadap sifat fisik dan kimia tomat segar (*Lycopersicon pyriforme*) pada berbagai tingkat kematangan. *J. Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*. 4 (3): 1 – 8.
- Steel, R. G. D. dan J. H. Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. Terjemahan Bambang Sumantri. Gramedia, Jakarta.
- Rahayu, F. A., D. Ishartani dan R. B. K. Anandito. 2014. Kajian umur simpan manisan tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) dengan pengawet natrium benzoat. *J. Teknosains Pangan*. 3 (1): 53 – 62.
- Tizard, I. 1988. *Veterinary Immunology, An Introduction*. 3 Ed. Airlangga University Press, Surabaya.
- Yuniwanti, E. Y. W., W. Asmara, W. T. Artama dan C. R. Tabbu. 2013. *Virgin Coconut Oil* meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag ayam pedaging pasca vaksinasi flu burung. *J. Veteriner*. 14 (2): 190 – 196.
- Wibowo, M. H. dan A. E. T. Wahyuni. 2008. Studi patogenisitas *Escherichia coli* isolat unggas pada ayam pedaging umur 15 hari. *J. Veteriner*. 9 (2): 87 – 93.
- Zhang, Z. F., J. F. Cho dan L. H. Kim. 2013. Effects of *Bacillus subtilis* UBT-MO2 on growth performances, relative immune organ weight, gas concentration in excreta, and intestinal microbial shedding in broiler chickens. *J. Livest. Sci*. 155: 343 – 347.