



PRODUKSI BIOETANOL LIMBAH NASI AKING FERMENTASI MENGUNAKAN *Zymomonas mobilis* DENGAN PERLAKUAN KONSENTRASI *CRUDE ENZIM Bacillus amyloliquefaciens*

Sekar Widyastanti¹ dan Trianik Widyaningrum^{2*}

^{1&2}Program Studi Pendidikan Biologi, FKIP, Universitas Ahmad Dahlan,
Indonesia

*E-Mail : trianik.widyaningrum@pbio.uad.ac.id

DOI : <https://doi.org/10.33394/bioscientist.v10i2.6249>

Submit: 21-10-2022; Revised: 05-11-2022; Accepted: 10-11-2022; Published: 30-12-2022

ABSTRAK: Bahan bakar bioetanol memiliki keunggulan lebih ramah lingkungan dibanding BBM. Bioetanol terbuat dari bahan organik yang mengandung glukosa. Nasi aking memiliki kandungan karbohidrat 83,19% (b/b) dan amilosa 29,70% (b/b) yang dapat diubah menjadi bioetanol melalui tahap hidrolisis dan fermentasi. Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimen, tahap awal yang dilakukan yaitu tahap hidrolisis untuk memperoleh gula reduksi menggunakan *crude* enzim *Bacillus amyloliquefaciens* dengan konsentrasi 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, dan 17,5% selama 6 hari. Yang selanjutnya dilakukan tahap fermentasi untuk mengubah gula reduksi menjadi etanol menggunakan *Zymomonas mobilis* konsentrasi 10% selama 4 hari. Dan hasil akhir dilakukan tahap destilasi serta perhitungan kadar bioetanol menggunakan alat alkohol meter. Selama proses hidrolisis dan fermentasi, diukur kadar gula menggunakan metode DNS (*Dinitrosalicylic acid*) diperoleh rerata kadar gula tertinggi pada konsentrasi *Bacillus amyloliquefaciens* 10% yaitu 1,417 g/mL. Hasil kadar bioetanol yang diperoleh paling tinggi yaitu 3,03% pada konsentrasi *Bacillus amyloliquefaciens* 10% dan kadar bioetanol terendah yaitu 0,61% pada konsentrasi *Bacillus amyloliquefaciens* 0%.

Kata Kunci: Bioetanol, Nasi Aking, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Zymomonas mobilis*.

ABSTRACT: Bioethanol fuel has the advantage of being more environmentally friendly than petroleum. Bioethanol is made from organic materials containing glucose. Baking rice contains 83.19% (w/w) carbohydrates and 29.70% (w/w) amylose which can be converted into bioethanol through hydrolysis and fermentation stages. This type of research is an experimental research, the initial stage carried out is the hydrolysis stage to obtain reducing sugars using *crude Bacillus amyloliquefaciens* enzymes with concentrations of 0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15 %, and 17.5% for 6 days. The next step is the fermentation stage to convert reducing sugar into ethanol using *Zymomonas mobilis* at a concentration of 10% for 4 days. And the final result is the distillation stage and the calculation of bioethanol levels using an alcohol meter. During the hydrolysis and fermentation processes, the sugar content was measured using the DNS (*Dinitrosalicylic acid*) method and the highest average sugar content was obtained at 10% *Bacillus amyloliquefaciens* concentration, namely 1.417 g/mL. The highest bioethanol content obtained was 3.03% at 10% *Bacillus amyloliquefaciens* concentration and the lowest bioethanol content was 0.61% at 0% *Bacillus amyloliquefaciens* concentration.

Keywords: Bioethanol, Aking Rice, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Zymomonas mobilis*.



Bioscientist : Jurnal Ilmiah Biologi is Licensed Under a CC BY-SA [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).





PENDAHULUAN

Kebutuhan bahan bakar fosil memiliki peningkatan dari tahun ke tahun, namun tidak sebanding dengan ketersediaan energi fosil. Penggunaan energi fosil yang terus meningkat akan menyebabkan semakin tingginya tingkat pencemaran udara yang akan berdampak negatif terhadap lingkungan, sehingga diperlukan energi yang ramah lingkungan. Bioetanol menjadi pilihan utama karena memiliki sifat yang ramah lingkungan, mengandung emisi gas CO lebih rendah dan memiliki kandungan oksigen yang tinggi, sehingga terbakar lebih sempurna (Kusumaningati *et al.*, 2013). Bioetanol merupakan bahan kimia berupa cairan berasal dari hasil fermentasi karbohidrat (pati) dengan bantuan mikroorganisme. Pembuatan bioetanol menggunakan limbah yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku bioetanol, salah satunya limbah rumah tangga yaitu nasi aking.

Nasi aking merupakan istilah yang digunakan untuk menyebut makanan yang berasal dari nasi sisa tidak termakan, pada nasi aking memiliki kandungan karbohidrat 83,19% (b/b), amilosa 29,70% (b/b), lemak 0,40% (b/b), protein 3,36% (b/b), serat 0,11% (b/b), dan air 12,37% (b/b) (Muin *et al.*, 2015). Pembuatan bioetanol dengan cara mengkonversi karbohidrat pada nasi aking menjadi glukosa melalui proses hidrolisis dan diubah menjadi etanol melalui proses fermentasi.

Kandungan karbohidrat dan amilosa pada nasi aking dapat dimanfaatkan pada pembuatan bioetanol melalui proses hidrolisis dengan memanfaatkan enzim amilase, *crude* enzim amilase *Bacillus amyloliquefaciens* memproduksi jenis enzim α -Amilase yang memiliki aktivitas hidrolisis pati yang dapat menghasilkan sumber energi alternatif atau etanol (Soeka, 2015). Proses pembuatan etanol perlu tahap pengubahan glukosa menjadi etanol dengan bantuan mikroorganisme *Zymomonas mobilis* yang mampu menghasilkan etanol dengan produktivitas yang tinggi dari jenis karbohidrat glukosa, fruktosa, dan sukrosa.

Dalam industri etanol *Zymomonas mobilis* mempunyai beberapa keuntungan, antara lain: kemampuan untuk tumbuh secara anaerob fakultatif, hasil produksi lebih tinggi, dan kemampuan fermentasi lebih spesifik dibandingkan dengan khamir (Albert *et al.*, 2015). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui potensi dan konsentrasi yang paling berpengaruh konsentrasi *crude* enzim amilase *Bacillus amyloliquefaciens* terhadap kadar gula dan etanol hasil fermentasi nasi aking menggunakan *Zymomonas mobilis*.

METODE

Penelitian menggunakan jenis penelitian eksperimen merupakan metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi yang terkendali (Sugiyono, 2017). Menggunakan rancangan percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL), yaitu perbandingan konsentrasi *crude* enzim amilase *Bacillus amyloliquefaciens* 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, dan 17,5% (V/V) dengan tiga kali ulangan.

Variabel bebas pada penelitian ini *crude* enzim amilase *Bacillus amyloliquefaciens* yaitu 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, dan 17,5%, dan variabel terikat kadar gula hasil hidrolisis dengan *crude* enzim amilase *Bacillus*





amyloliquefaciens dan kadar etanol hasil fermentasi *Zymomonas mobilis*. Percobaan dilakukan di Laboratorium Biologi, Universitas Ahmad Dahlan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan SPSS uji *One Way ANOVA* dan uji Duncan ($\alpha = 0,05$).

Persiapan Sampel

Nasi aking yang diperoleh dari limbah rumah makan atau rumah tangga dikeringkan dengan bantuan sinar matahari sampai kering, kemudian dihaluskan dengan cara diblender dan diayak. Bubuk nasi aking ditimbang sebanyak 300 gram dan dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer 2000 mL, dan ditambah aquades sebanyak 3000 mL (diulang dua kali). Kemudian direbus hingga mendidih dan disaring, hingga diperoleh bubur nasi aking (Widyaningrum & Parahadi, 2020).

Pembuatan Crude Enzim

Bubuk nasi aking 20 g/L ditambahkan 100 mL larutan nutrisi, kemudian goreskan dengan bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* dan diinkubasi selama 24 jam. Kemudian tambahkan larutan *tween 80* 0,1% sebanyak 100 mL *magnetic stirrer* selama 2 jam. Larutan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit, dan filtratnya digunakan sebagai ekstrak enzim kasar (Ningsih *et al.*, 2012).

Proses Hidrolisis

Bubuk nasi aking dipanaskan dengan aquades 1:10 dimasukkan dalam 24 botol UC masing-masing 100 mL. Tambahkan *crude* enzim dengan perbandingan konsentrasi 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, dan 17,5% untuk 3 kali pengulangan pada masing masing botol UC. Inkubasi dengan suhu 37°C selama 144 jam (Vyas *et al.*, 2016). Hasil hidrolisis diukur kadar gula reduksinya.

Penumbuhan *Zymomonas mobilis*

Bakteri *Zymomonas mobilis* disubkulturkan pada media NA (*Nutrient Agar*) miring, dan diinkubasi selama 24 jam. Biakan bakteri *Zymomonas mobilis* pada media miring dibiakkan kembali pada media cair NB (*Nutrient Broth*) 100 ml dan disimpan dalam inkubator selama 48 jam (Santi & Widyaningrum, 2022).

Proses Fermentasi

Bubur nasi aking hasil hidrolisis (24 erlenmayer), masing-masing ditambahkan kultur *Zymomonas mobilis* dengan konsentrasi 10%, kemudian dilakukan proses fermentasi dengan waktu 96 jam (Rahmadani *et al.*, 2017). Hasil perlakuan fermentasi diukur kadar gula reduksi.

Pengukuran Kadar Gula

Pengukuran kadar gula menggunakan metode DNS. Hasil hidrolisis masing-masing diambil 0,5 mL, ditambahkan aquades 0,5 mL, dan larutan DNS 0,5 mL. Panaskan dengan *waterbath* selama 5 menit, lalu ditambahkan 0,5 mL *garam rochelle* dan divortex. Larutan sudah bisa diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 540 nm (Widyaningrum & Parahadi, 2020).

Pengukuran Kadar Bioetanol

Bioetanol didapatkan dari proses destilasi pada 24 botol UC. Cara pengukurannya yaitu dengan memasukkan destilat sebanyak 80 mL ke dalam gelas ukur, kemudian alkohol meter dicelupkan ke dalam destilat. Alkohol meter



akan tenggelam dan batas cairan pada permukaan destilat menunjukkan kadar etanol pada sampel yang diuji. Kadar bietanol diukur dengan rumus berikut ini.

$$\frac{\text{Volume destilasi}}{\text{Volume substrat}} \times \text{Hasil Pengukuran dengan Alkohol Meter}$$

Sumber: Mailool *et al.* (2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengukuran Kadar Gula Reduksi Kontrol

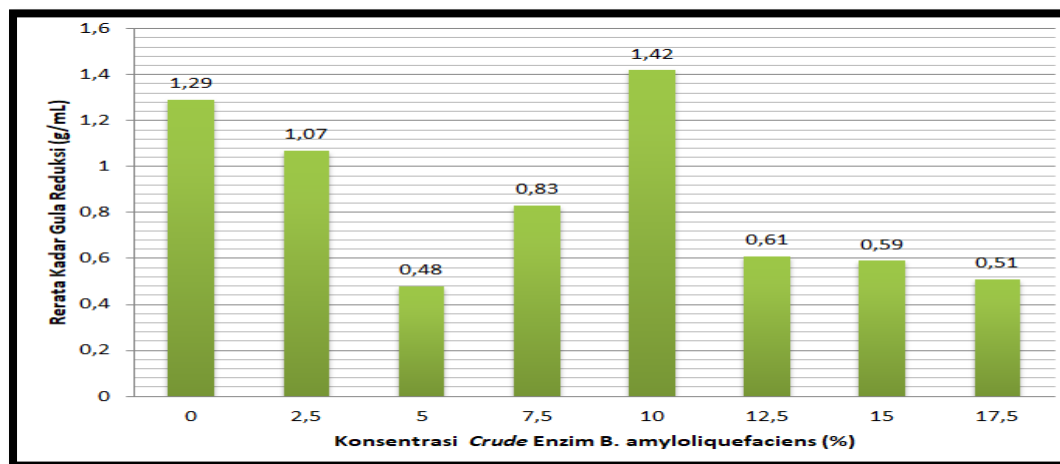
Sebelum dilakukan perlakuan hidrolisis dan fermentasi, diukur kadar gula reduksi terhadap 3 kontrol, diperoleh hasil seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Kadar Gula Reduksi Nasi Aking.

Perlakuan	Kadar Gula Reduksi (g/mL)			Kadar Gula Reduksi (g/mL)
	U1	U2	U3	
Kontrol	0.86	1.01	1.02	0.96

Kadar Gula Reduksi Nasi Aking Menggunakan Konsentrasi *Crude Enzim Amilase Bacillus amyloliquefaciens*

Hasil kadar gula setelah perlakuan konsentrasi 0%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, dan 17,5% diperoleh kadar gula tertinggi yaitu sebesar 1,42 g/mL pada perlakuan P4 (konsentrasi 10%), dan diperoleh rerata gula reduksi terendah yaitu 0,48 g/mL pada perlakuan P2 (konsentrasi 5%).



Gambar 1. Diagram Pengaruh Konsentrasi *Crude Enzim Amilase Bacillus amyloliquefaciens* terhadap Kadar Gula Reduksi Nasi Aking.

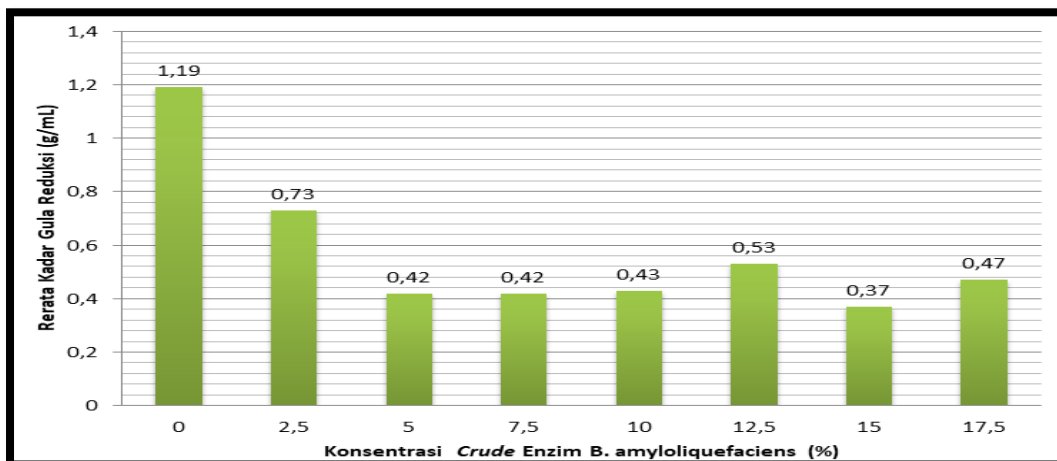
Proses hidrolisis bertujuan memperoleh glukosa dengan mengubah serat dari suatu substrat. Jumlah glukosa yang dihasilkan bergantung pada konsentrasi yang digunakan. Kadar gula reduksi memiliki peningkatan setelah penambahan konsentrasi *Bacillus amyloliquefaciens* disebabkan *crude* enzim amilase *Bacillus amyloliquefaciens* mampu menghidrolisis pati dan glikogen melalui pemotongan internal ikatan α -1,4-glikosida secara acak untuk menghasilkan glukosa (Robia & Sutrisno, 2015).

Hidrolisis pada masing masing perlakuan dipengaruhi oleh aktivitas enzim amilase pada konsentrasinya. Kadar gula reduksi tertinggi dari konsentrasi 10%. Lebih dari konsentrasi 10% menghasilkan kadar gula reduksi yang rendah. Semakin tinggi konsentrasi enzim, maka proses reaksi akan semakin meningkat hingga batas konsentrasi tertentu. Namun, hasil hidrolisis akan konstan dengan tingginya konsentrasi enzim, sehingga penambahan enzim sudah tidak efektif lagi (Ratna *et al.*, 2018).

Berdasarkan hasil pengukuran pada Gambar 1 dilakukan uji ANOVA *One Way* untuk mengetahui perbedaan kadar gula reduksi antara perlakuan dengan hasil yang diketahui nilai signifikansi sebesar 0,000 yang berarti nilai $0,000 < 0,05$, sehingga H_0 diterima dan H_1 ditolak. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat beda nyata gula reduksi pada setiap perlakuan dan dilanjutkan uji Duncan untuk mengetahui beda nyata pada tiap perlakuan.

Kadar Gula Reduksi Nasi Aking Menggunakan *Zymomonas mobilis*

Hasil pengukuran kadar gula reduksi nasi aking setelah fermentasi menggunakan *Zymomonas mobilis*, dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Diagram Pengaruh Konsentrasi Crude Enzim Amilase *Bacillus amyloliquefaciens* terhadap Kadar Gula Reduksi dari Nasi Aking setelah Fermentasi *Zymomonas mobilis*.

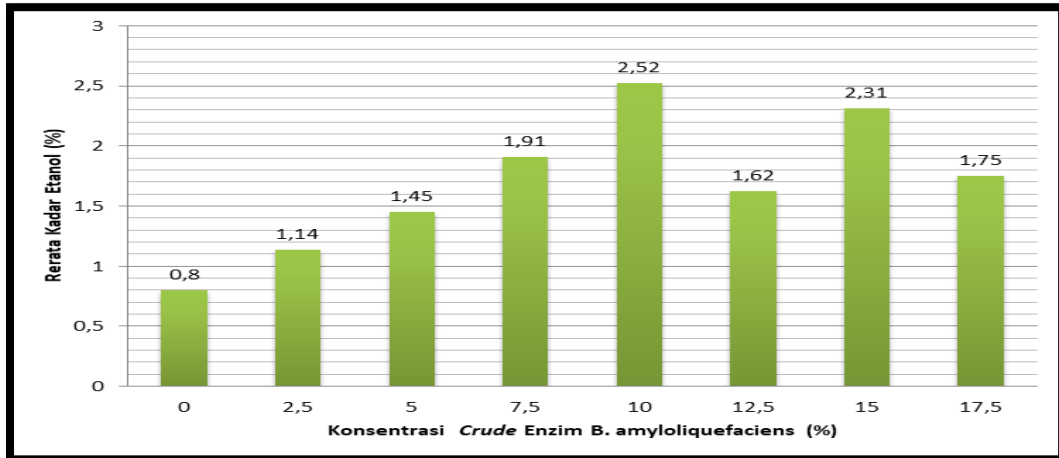
Proses fermentasi menggunakan *Zymomonas mobilis* dilakukan dengan konsentrasi 10%. Diperoleh hasil rerata kadar gula reduksi tertinggi pada perlakuan P0 (konsentrasi 0%) yaitu 1,19 g/mL, dan rerata kadar gula reduksi terendah pada perlakuan P6 (konsentrasi 15%) yaitu 0,37 g/mL. Pada proses fermentasi menyebabkan menurunnya kadar gula reduksi disebabkan *Zymomonas mobilis* memerlukan substat untuk tumbuh. Glukosa dimanfaatkan *Zymomonas mobilis* sebagai sumber energi untuk menghasilkan etanol dan CO₂, sehingga menyebabkan kadar gula menurun (Kusumaningati *et al.*, 2013).

Selanjutnya, dilakukan uji ANOVA *One Way* untuk mengetahui perbedaan kadar gula reduksi yang dihasilkan setelah fermentasi menggunakan *Zymomonas mobilis* diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,002, artinya nilai $0,002 < 0,05$, sehingga H_0 diterima dan H_1 ditolak. Berdasarkan hal ini dinyatakan bahwa terdapat beda nyata antara rerata kadar gula dengan gula reduksi pada

setiap perlakuan, dan dilanjutkan uji Duncan dengan hasil pemberian *Zymomonas mobilis* dapat menghasilkan kadar gula reduksi yang berbeda secara signifikan pada sampel nasi aking.

Kadar Bioetanol Nasi Aking

Hasil pengukuran kadar bioetanol nasi aking menggunakan alkohol meter dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Diagram Pengaruh Konsentrasi Crude Enzim Amilase terhadap Kadar Etanol.

Setelah dilakukan destilasi, diukur kadar bioetanol diperoleh hasil rerata kadar bioetanol tertinggi sebesar 2,52% pada perlakuan P4 (konsentrasi *crude* enzim amilase *Bacillus amyloliquefaciens* 10%) dan diperoleh rerata kadar bioetanol terendah sebesar 0,80% pada perlakuan P0 (konsentrasi *crude* enzim 0%). Hal ini sesuai dengan penelitian Azhari (2020) yang menyatakan bahwa kadar pati yang tinggi akan menghasilkan glukosa tinggi, tingginya kadar glukosa yang diperoleh akan menyebabkan tingginya reproduksi kadar bioetanol yang diperoleh. Pada P0, konsentrasi 0% memiliki kadar gula reduksi yang tinggi namun rendah dalam memproduksi kadar bioetanol. Hal ini disebabkan etanol yang telah diproduksi telah terkonversi menjadi ester, sehingga menyebabkan menurunnya kadar etanol yang dihasilkan (Herawati *et al.*, 2016).

Tabel 2. Hasil Uji *One Way* ANOVA Kadar Etanol Nasi Aking.

	Jumlah Kuadrat	Df	Rata-rata Kuadrat	F	Sig.
Antar Kelompok	4.555	7	.651	1.729	.172
Dalam Kelompok	6.021	16	.376		
Total	10.576	23			

Selanjutnya, dilakukan uji *One Way* ANOVA untuk melihat perbedaan pada tiap perlakuan menunjukkan sig. 0,172 > 0,05, sehingga H1 diterima dan H0 ditolak. Berdasarkan hal ini dinyatakan bahwa rata-rata pemberian konsentrasi *crude* enzim amilase *Bacillus amyloliquefaciens* tidak berpengaruh secara



signifikan/tidak memiliki beda nyata terhadap produksi bioetanol, sehingga tidak perlu dilanjutkan dengan uji Duncan.

SIMPULAN

Konsentrasi *crude* enzim amilase *Bacillus amyloliquefaciens* berpengaruh terhadap kadar gula dan etanol hasil fermentasi nasi aking menggunakan *Zymomonas mobilis*. Konsentrasi yang paling berpengaruh yaitu konsentrasi 10% dengan kadar gula 1,42 g/mL, kadar etanol tertinggi pada konsentrasi 10% yaitu 3,03%, dan kadar etanol terendah pada konsentrasi 0% yaitu 0,62%.

SARAN

Penulis berharap peneliti yang akan melakukan penelitian terkait produksi bioetanol menggunakan konsentrasi *crude* enzim *Bacillus amyloliquefaciens* dan fermentasi menggunakan *Zymomonas mobilis*, lebih teliti terkait variasi waktu hidrolisis dan fermentasi yang akan dilakukan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada seluruh pihak yang terlibat, terutama Ibu Dr. Trianik Widyaningrum, M.Si., dan Universitas Ahmad Dahlan.

DAFTAR RUJUKAN

- Albert, Idiawati, N., dan Rudyansyah. (2015). Pembuatan Bioetanol Menggunakan *Zymomonas mobilis*. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 4(2), 72-75.
- Azhari, H. (2020). Pengaruh Volume Inokulum *Zymomonas mobilis* terhadap Konsentrasi Bioetanol dari Pati Buah Lindur (*Burquieria gymnorhiza*) yang Dihidrolisis Menggunakan Asam Klorida 25%. *Repositori Institusi*. Universitas Sumatera Utara.
- Herawati, D.A., Kusumawardhani, E., dan Puspawati, N. (2016). Pemanfaatan Limbah Ampas Pati Aren menjadi Bioetanol secara Enzimatis Metode Konvensional dan SFF (*Simultaneous of Saccarification and Fermentation*). In *Simposium Nasional RAPI XV* (pp. 37-45). Surakarta, Indonesia: Fakultas Teknik, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Kusumaningati, M.A., Nurhatika, S., dan Muhibuddin, A. (2013). Pengaruh Konsentrasi Inokulum Bakteri *Zymomonas mobilis* dan Lama Fermentasi pada Produksi Etanol dari Sampah Sayur dan Buah Pasar Wonokromo Surabaya. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 2(2), 218-223.
- Mailool, J.C., Molenaar, R., Tooy, D., dan Longdong, I.A. (2013). Produksi Bioetanol dari Singkong (*Manihot utilissima*) dengan Skala Laboratorium. *Cocos*, 2(1), 1-11.
- Muin, R., Hakim, I., dan Febriyansyah, A. (2015). Enzim terhadap Kadar Bioetanol dalam Proses Fermentasi Nasi Aking sebagai Substrat Organik. *Jurnal Teknik Kimia*, 21(3), 56-66.
- Ningsih, D.R., Rastuti, U., dan Kamaludin, R. (2012). Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri *Bacillus amyloliquefaciens*. In *Seminar Nasional*





"Pengembangan Sumber Daya Pedesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan II" (pp. 39-45). Purwokerto, Indonesia: Universitas Jenderal Soedirman.

- Permanasari, A.R., Yulistiai, F., Tsagila, M.A., Alami, D., dan Wibowo, A. (2018). Pengaruh Konsentrasi Substrat dan Enzim terhadap Produk Gula Reduksi pada Pembuatan Gula Cair dari Tepung Sorgum Merah secara Hidrolisis Enzimatis. In *Seminar Nasional Teknik Kimia Kejuangan* (pp. 1-8). Yogyakarta, Indonesia: Jurusan Teknik Kimia, FTI, UPN "Veteran" Yogyakarta.
- Rahmadani, S., Muria, S.R., dan Utami, S.P. (2017). Produksi Bioetanol dari Mahkota Nanas Menggunakan Bakteri *Zymomonas mobilis* dengan Variasi Konsentrasi Inokulum dan Penambahan Nutrisi. *Jom FTEKNIK*, 4(2), 1639-1642.
- Robia dan Sutrisno, A. (2015). Karakteristik Sirup Glukosa dari Tepung Ubi Ungu (Kajian Suhu Likuifikasi dan Konsentrasi α -Amilase): Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3(4), 1531-1537.
- Santi, S.N., dan Widyaningrum, T. (2022). Produksi Bioetanol dari Limbah Bayang Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis*) Menggunakan *Zymomonas mobilis* dengan Perlakuan Crude Enzim *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*. *Jurnal Biologus*, 5(1), 18-23.
- Soeka, Y.S. (2015). Kemampuan *Bacillus licheniformis* dalam Menghasilkan Enzim α -Amilase. In *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia* (pp. 1162-1166). Surakarta, Indonesia: Masyarakat Biodiversitas Indonesia.
- Sugiyono. (2017). *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif, dan R&D*. Bandung: CV. Alfabeta.
- Vyas, A., Putatunda, C., Singh, J., and Vyas, D. (2016). Cellulase Production by *Bacillus subtilis* M1 Using Pretreated Groundnut Shell Based Liquid State Fermentation. *BIOTROPIA*, 23(1), 28-34.
- Widyaningrum, T., dan Parahadi, M. (2020). Bioethanol Levels of Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*) Peel with the Addition of Blend Crude Cellulase Enzyme from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 5(1), 01-05.
- _____. (2020). Kadar Bioetanol Kulit Mangga (*Mangifera indica*) dengan Perlakuan Enzim Selulase dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*. *Life Science*, 9(2), 194-203.