

Pertumbuhan Kalus Tanaman Markisa (*Passiflora* sp.) dengan Penambahan *Naphtalene Acetic Acid* (NAA) dan *6-Benzyl Amino Purine* (BAP)

Mariamah¹, Mukarlina¹, Riza Linda¹

¹Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura, Jl. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi Pontianak, email korespondensi: mariamahawaw123@gmail.com

Abstract

Passiflora sp. is one of the herbaceous plants whose leaves contain secondary metabolites. This plant is widely exploited by the community for use as pharmaceuticals. Accordingly another alternative is required to isolate its metabolites and one of the alternatives that can be applied is technique of tissue culture. The purpose of this study is to investigate the effect of NAA, BAP and combination of NAA and BAP on callus growth of *Passiflora* sp.. This study is conducted in Aloe Vera Center Laboratory of Pontianak. Completely Randomized Design with 4 concentration levels of NAA and BAP specifically 0 M, 10^{-7} M, 5×10^{-7} M and 10^{-6} M was employed 3 times and 48 units of experiments were obtained. The findings indicate that all treatments yield callus with dense texture and generate a variety of color specifically tawny, green and greenish white. NAA, BAP and combination of NAA and BAP has no significant effect on the average time of callus growth. The combination of NAA and BAP has substantial effect on the average of callus wet basis. Concentration of NAA 5×10^{-7} + BAP 10^{-6} M and NAA 5×10^{-7} + BAP 10^{-7} M produce the highest wet basis in particular 2,4380 g and 2,2420 g. the combination of NAA and BAP has remarkable effect on callus dry basis and concentration of NAA 5×10^{-7} + BAP 10^{-6} M produce the highest average of dry basis particularly 0,0160 g.

Keywords: *Passiflora* sp., callus, NAA (*Naphtalene Acetic Acid*), BAP (*6-Benzyl Amino Purine*).

PENDAHULUAN

Markisa (*Passiflora* sp.) termasuk ke dalam famili *Passifloraceae*. Markisa merupakan tumbuhan semak atau pohon yang hidup menahun (*perennial*) dan bersifat merambat atau menjalar hingga sepanjang 20 meter atau lebih (Rukmana, 2003). Daun markisa digunakan sebagai obat tradisional yang dapat menyembuhkan berbagai penyakit seperti obat penenang, hipertensi, diare, sakit tenggorokan, demam dan penyakit kulit. Secara ilmiah daun markisa mengandung flavonoid, alkaloid, saponin, karetenoid dan polifenol (Karsinah & Mansyur, 2007).

Kecenderungan masyarakat untuk menggunakan bahan obat-obatan yang berasal dari alam dapat menyebabkan terjadinya eksploitasi tanaman markisa. Mengantisipasi hal tersebut, maka diperlukan alternatif pemecahan untuk mengisolasi metabolit sekunder dari tanaman yaitu melalui teknik kultur jaringan, sehingga sebagian besar komponen kimia berasal dari tanaman dapat digunakan sebagai obat atau bahan obat.

Penanaman daun markisa secara *in vitro* dapat menghasilkan kalus. Pertumbuhan kalus sangat dipengaruhi oleh kombinasi dan konsentrasi ZPT (Zat Pengatur Tumbuh) yang diberikan pada suatu

media. ZPT yang biasa digunakan dalam media kultur adalah auksin dan sitokinin. Hendaryono & Wijayani (1994) menyatakan bahwa salah satu golongan auksin dan sitokinin yang paling banyak digunakan pada teknik kultur *in vitro* adalah *Naphtalene Acetic Acid* (NAA) dan BAP (*6-Benzyl Amino Purine*). Penelitian tentang penanaman markisa secara *in vitro* masih sangat terbatas. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh penambahan NAA dan BAP untuk pertumbuhan kalus tanaman markisa.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan selama 6 bulan dari bulan Mei sampai dengan Oktober 2016 di Laboratorium Kultur Jaringan Aloe Vera Center (AVC) Pontianak.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial dan terdiri atas 4 taraf konsentrasi NAA dan BAP yaitu 0 M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M dan 10^{-7} M.

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah aluminium foil, autoklaf, botol kultur, botol semprot, bunsen, cawan petri, gelas piala, gelas ukur 10 ml dan 50 ml, *hot plate*, inkubator, kapas,

kertas indikator pH, kertas label, kertas sampul, kertas saring, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), *magnetic stirrer*, pinset bengkok, pinset lurus, pipet tetes, tabung reaksi, timbangan digital, scalpel dan spuit ukuran 3 cc/mL dan 1 cc/mL.

Bahan

Bahan yang digunakan adalah agar-agar, akuades steril, alkohol 70%, BAP, daun markisa yang kedua dan ketiga dari pucuk, detergen, larutan stok, media Murashige Skoog (MS), NAA, Natrium Hipoklorit (NaClO) 5% dan 10%, spiritus, sukrosa dan Tween 20%.

Sterilisasi Ruang Kerja dan Alat

Ruangan tempat kerja dibersihkan dengan alkohol 70% kemudian UV dihidupkan. Alat-alat yang digunakan dicuci dengan detergen lalu dibilas hingga bersih dan dikeringkan dan disterilisasi dengan autoklaf selama kurang lebih 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm.

Persiapan Media Tumbuh

Media yang digunakan adalah media *Murashige Skoog* (MS). Sebelum membuat media MS, terlebih dahulu dilakukan pembuatan stok yang terdiri dari stok makronutrien, mikronutrien, vitamin, agar-agar dan sukrosa dengan penambahan kombinasi ZPT berupa NAA dan BAP. Larutan stok selanjutnya digunakan untuk membuat media MS.

Sterilisasi dan Penanaman Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah daun markisa yang masih muda. Tahap pra sterilisasi, dimulai dengan mencuci eksplan menggunakan detergen dan kemudian dicuci di bawah air mengalir selama 30 menit selanjutnya dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali (Kurniati, 2010).

Sterilisasi selanjutnya dilakukan dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC). Eksplan direndam ke dalam larutan NaClO 10% yang telah ditambahkan 2 tetes Tween 20% selama 15 menit, setelah itu direndam kembali ke dalam larutan NaClO 5% yang telah ditambahkan 2 tetes Tween 20% selama 10 menit, selanjutnya eksplan dicuci dengan akuades steril sebanyak 3 kali masing-masing selama 3 menit (Khan *et al.*, 2004).

Eksplan yang telah disterilkan dipotong dengan ukuran $\pm 0,5 \times 0,5$ cm, setelah itu ditanam dalam botol kultur yang berisi media MS yang telah ditambahkan ZPT dengan perlakuan sebanyak 3 ulangan. Penanaman dilakukan di LAFC. Botol-

botol kultur yang telah berisi eksplan ditutup. Botol-botol tersebut ditempatkan pada rak kultur. Penanaman eksplan dilakukan selama 4 minggu kemudian dilakukan subkultur.

Subkultur

Subkultur adalah pemindahan kultur ke media baru dengan komposisi yang sama dengan media sebelumnya. Subkultur ini dilakukan untuk menyediakan nutrisi untuk pertumbuhan eksplan. Pelaksanaan subkultur pada penelitian ini dilakukan sebanyak satu kali selama 4 minggu.

Pengukuran Berat Basah dan Berat Kering Kalus

Berat basah dan berat kering kalus diukur pada akhir subkultur. Kalus ditimbang dengan timbangan analitik sesuai dengan masing-masing perlakuan yang dinyatakan sebagai berat basah. Kalus yang ditimbang kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C sampai beratnya konstan yang dinyatakan sebagai berat kering.

Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati yaitu tekstur kalus dan warna kalus, waktu muncul kalus (hst), rerata berat basah dan berat kering kalus (g) yang dihitung pada akhir subkultur (60 hst).

Analisis Data

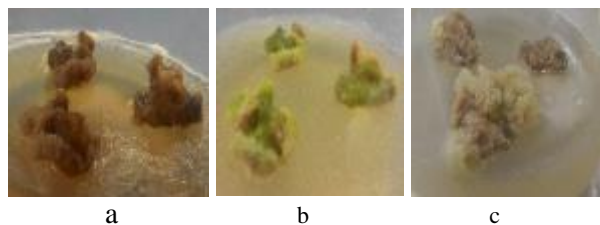
Analisis data menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan program SPSS 18. Hasil yang menunjukkan beda nyata dilanjutkan dengan Uji Duncan pada taraf kepercayaan 95% (Soleh, 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Warna Kalus dan Tekstur Kalus

Warna daun markisa dengan pemberian NAA dan BAP (Gambar 1 dan Tabel 1).



Gambar 1. Warna kalus daun markisa pada 60 hst
a. Kuning b. Hijau c. Putih kehijauan

Berdasarkan penelitian, kalus yang dihasilkan pada semua perlakuan bertekstur kompak, sedangkan warna kalus yang dihasilkan yaitu kuning

kecoklatan, hijau dan putih kehijauan (Tabel 1) dan (Gambar 1).

Tabel 1. Tekstur dan warna kalus daun markisa dengan kombinasi NAA dan BAP 60 (hst)

Perlakuan	Tekstur	Warna Kalus
NAA 0 + BAP 0	Kompak	Hijau
NAA 0 + BAP 10 ⁻⁶	Kompak	Hijau
NAA 0 + BAP 5x10 ⁻⁷	Kompak	Putih kehijauan
NAA 0 + BAP 10 ⁻⁷	Kompak	Kuning kecoklatan
NAA 10 ⁻⁶ + BAP 0	Kompak	Kuning kecoklatan
NAA 10 ⁻⁶ + BAP 10 ⁻⁶	Kompak	Hijau
NAA 10 ⁻⁶ + BAP 5x10 ⁻⁷	Kompak	Putih kehijauan
NAA 10 ⁻⁶ + BAP 10 ⁻⁷	Kompak	Kuning kecoklatan
NAA 5x10 ⁻⁷ + BAP 0	Kompak	Hijau
NAA 5x10 ⁻⁷ + BAP 10 ⁻⁶	Kompak	Kuning kecoklatan
NAA 5x10 ⁻⁷ + BAP 5x10 ⁻⁷	Kompak	Kuning kecoklatan
NAA 5x10 ⁻⁷ + BAP 10 ⁻⁷	Kompak	Kuning kecoklatan
NAA 10 ⁻⁷ + BAP 0	Kompak	Kuning kecoklatan
NAA 10 ⁻⁷ + BAP 10 ⁻⁶	Kompak	Hijau
NAA 10 ⁻⁷ + BAP 5x10 ⁻⁷	Kompak	Hijau
NAA 10 ⁻⁷ + BAP 10 ⁻⁷	Kompak	Hijau

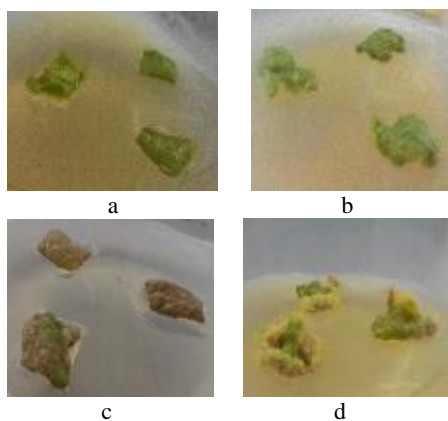
Waktu Muncul Kalus

Rerata waktu muncul kalus daun markisa dengan pemberian NAA dan BAP (Tabel 2).

Tabel 2. Rerata waktu muncul kalus (hari) daun markisa dengan kombinasi NAA dan BAP 60 (hst)

BAP (M)	NAA (M)			
	0	10 ⁻⁶	5x10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
0	13,67 ^a	13,00 ^a	12,00 ^a	13,33 ^a
10 ⁻⁶	13,67 ^a	12,33 ^a	12,00 ^a	12,67 ^a
5x10 ⁻⁷	13,33 ^a	12,33 ^a	12,33 ^a	12,33 ^a
10 ⁻⁷	13,67 ^a	12,33 ^a	12,00 ^a	12,67 ^a

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf sama menunjukkan hasil tidak berbeda nyata menurut uji Duncan pada taraf kepercayaan 5%



Gambar 2. Waktu muncul kalus daun markisa
 a. Hari ke-3 b. Hari ke-6
 c. Hari ke-12 d. Hari ke-60

Hasil analisis ANAVA pada perlakuan BAP tunggal (F_{15,48} = 0,174, p = 0,844; ANAVA), NAA tunggal (F_{15,48} = 0,143, p = 0,931; ANAVA) dan

kombinasi antara NAA dan BAP (F_{15,48} = 1,343, p = 0,235; ANAVA) tidak berpengaruh nyata terhadap waktu muncul kalus daun markisa. Eksplan pada hari ke-3 mulai mengalami pembesaran dan pemanjangan sel, (Gambar 2a dan b) dan terbentuk kalus pada hari ke-12 (Gambar 2c).

Berat Basah Kalus

Rerata berat basah kalus daun markisa dengan pemberian NAA dan BAP (Tabel 3).

Tabel 3. Rerata berat basah kalus (g) daun markisa dengan kombinasi NAA dan BAP 60 (hst)

BAP (M)	NAA (M)			
	0	10 ⁻⁶	5x10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
0	0,6980 ^a	0,9280 ^a	0,8876 ^a	0,9270 ^a
10 ⁻⁶	0,7860 ^a	1,6380 ^b	2,4380^c	1,7866 ^b
5x10 ⁻⁷	0,8453 ^a	1,8713 ^b	1,9046 ^b	1,8380 ^b
10 ⁻⁷	0,7813 ^a	1,7860 ^b	2,2420^c	1,8060 ^b

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf sama menunjukkan hasil tidak berbeda nyata menurut uji Duncan pada taraf kepercayaan 5%

Berdasarkan hasil ANAVA bahwa pemberian NAA tunggal (F_{15,48} = 1,599, p = 0,264; ANAVA) dan BAP tunggal (F_{15,48} = 17,213, p = 0,003; ANAVA) tidak berpengaruh nyata terhadap berat basah kalus, sedangkan pada perlakuan kombinasi NAA dan BAP (F_{15,48} = 44,070, p = 0,000; ANAVA) berpengaruh nyata terhadap berat basah kalus daun markisa. Berat basah kalus pada konsentrasi NAA 5x10⁻⁷ + BAP 10⁻⁶ M dan NAA 5x10⁻⁷ + BAP 10⁻⁷ M berbeda nyata dengan kontrol dan perlakuan lainnya dan menghasilkan kalus dengan berat basah masing-masing 2,4380 g dan 2,2420 g.

Berat Kering Kalus

Rerata berat kering kalus daun markisa dengan pemberian NAA dan BAP (Tabel 4).

Tabel 4. Rerata berat kering kalus (g) daun markisa dengan kombinasi NAA dan BAP 60 (hst)

BAP (M)	NAA (M)			
	0	10 ⁻⁶	5x10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
0	0,0093 ^a	0,0115 ^{ab}	0,0112 ^{ab}	0,0094 ^a
10 ⁻⁶	0,0090 ^a	0,0133 ^{ab}	0,0160^b	0,0091 ^a
5x10 ⁻⁷	0,0107 ^{ab}	0,0125 ^{ab}	0,0108 ^{ab}	0,0093 ^a
10 ⁻⁷	0,0091 ^a	0,0125 ^{ab}	0,0135 ^{ab}	0,0091 ^a

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf sama menunjukkan hasil tidak berbeda nyata menurut uji Duncan pada taraf kepercayaan 5%

Hasil analisis statistik ANAVA menunjukkan faktor NAA tunggal dan BAP tunggal masing-masing (F_{15,48} = 2,469, p = 0,136; ANAVA) dan (F_{15,48} = 1,102, p = 0,905; ANAVA) tidak berpengaruh nyata

terhadap berat kering kalus, sedangkan pada perlakuan kombinasi NAA dan BAP ($F_{15,48} = 1,400$, $p = 0,206$; ANAVA) berpengaruh nyata terhadap berat kering kalus daun markisa. Konsentrasi NAA 5×10^{-7} + BAP 10^{-6} M berbeda nyata dengan kontrol, semua perlakuan dengan kombinasi NAA 10^{-7} M, NAA 0 + BAP 10^{-6} M dan NAA 0 + BAP 10^{-7} M, tetapi tidak berbeda nyata dengan semua perlakuan kombinasi NAA 10^{-6} dan NAA 5×10^{-7} serta menghasilkan berat kering kalus sebesar 0,0160 g.

Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian bahwa kalus yang dihasilkan memberikan warna bervariasi, yaitu berwarna hijau, kuning kecoklatan dan putih kehijauan. Perbedaan warna kalus diduga adanya perbedaan respon terhadap ZPT yang diberikan. Menurut Lestari & Mariska (1997); Andaryani (2010) warna kalus yang berbeda dipengaruhi oleh sitokinin dalam perkembangan plastid, yaitu kloroplas. Warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya.

Beberapa kombinasi ZPT pada penelitian menghasilkan kalus berwarna kecoklatan (Tabel 1). Respon terhadap perlakuan pada jaringan memicu adanya produksi metabolit sekunder, terutama fenol. Pierik (1987) mengatakan bahwa warna kecoklatan pada kalus merupakan hasil metabolit sekunder umumnya berupa senyawa fenol.

Kalus yang dihasilkan pada penelitian bertekstur kompak (*non friable*), (Tabel 1). Terbentuknya kalus yang bertekstur kompak menurut Mahadi, *et al.*, (2016); Yelnititis (2012) disebabkan karena kalus mengalami lignifikasi. Pierik (1987) menyatakan tekstur pada kalus dapat bervariasi dari kompak hingga meremah (*friable*), tergantung pada jenis tanaman yang digunakan, komposisi nutrisi pada media, zat pengatur tumbuh dan kondisi lingkungan kultur.

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa pemberian kombinasi ZPT (NAA dan BAP) pada media MS memberikan pengaruh terhadap induksi kalus daun markisa. Semua eksplan dapat memunculkan kalus dalam waktu yang bervariasi (Tabel 1). Kalus daun markisa pertama kali terbentuk pada bagian eksplan yang mengalami kontak langsung dengan media, diawali dengan pembesaran sel pada eksplan dihari ke-0 sampai ke-

3 (Gambar 2a), selanjutnya sel-sel eksplan mengalami pemanjangan pada hari ke-4 sampai ke-11 (Gambar 2b) dan kemudian pada hari ke-12 mulai membentuk massa sel yang tidak terdiferensiasi. Menurut Hendaryono & Wijayani (1994), massa sel atau kalus terbentuk pada seluruh permukaan irisan eksplan, kalus biasanya muncul pada sepanjang tulang daun atau di antara tulang daun. Induksi kalus disebabkan oleh luka atau irisan eksplan sebagai respon terhadap hormon baik secara eksogen maupun endogen.

Semua perlakuan tidak berpengaruh nyata terhadap waktu muncul kalus, hal ini diduga karena interaksi antara ZPT (NAA dan BAP) yang ditambahkan dengan ZPT endogen belum dapat memicu pembelahan sel secara cepat pada sel daun markisa. Semua perlakuan NAA tunggal, BAP tunggal dan interaksi antara NAA dan BAP dapat memicu munculnya kalus antara hari ke-12 sampai ke-13,67. Adanya interaksi antara NAA dan BAP yang ditambahkan pada media dengan kombinasi yang tepat akan menyebabkan munculnya kalus.

Beberapa perlakuan kombinasi NAA dan BAP dapat memicu tumbuhnya kalus tercepat 12 hari yaitu, NAA 5×10^{-7} + BAP 0 M, NAA 5×10^{-7} + BAP 10^{-6} M dan NAA 5×10^{-7} + BAP 10^{-7} M. Kecepatan induksi kalus yang terjadi pada eksplan daun markisa berbeda pada setiap perlakuan, hal ini bergantung dari respon setiap eksplan, karena selain penambahan ZPT berupa NAA dan BAP pada media, respon sel-sel eksplan juga dipengaruhi hormon endogen dan potensi sel yang berbeda dalam merespon ZPT (Santoso & Nursandi, 2002).

Perlakuan NAA 5×10^{-7} + BAP 10^{-6} M dan NAA 5×10^{-7} + BAP 10^{-7} M menghasilkan berat basah tertinggi, yaitu 2,4380 g dan 2,2420 g dan kalus berwarna kuning kecoklatan. Berat kering tertinggi pada kombinasi NAA 5×10^{-7} + BAP 10^{-6} M sebesar 0,0160 g (Tabel 4). Menurut Endres (1994) hal ini diduga pertumbuhan kalus sejalan dengan produksi metabolit sekunder. Beberapa perlakuan berwarna kuning kecoklatan, seperti NAA 0 + BAP 10^{-7} M dan NAA 10^{-6} + BAP 0 M menghasilkan berat kalus yang rendah, hal ini diduga karena pertumbuhan kalus tidak sejalan dengan produksi metabolit sekunder, selain itu pertumbuhan kalus lambat karena eksplan lebih memproduksi metabolit sekunder dibandingkan pertumbuhan kalus.

Media dengan perlakuan NAA 5×10^{-7} + BAP 10^{-6} M mampu menghasilkan berat basah dan berat kering

tertinggi diduga karena pemberian konsentrasi NAA dan BAP merupakan perimbangan konsentrasi yang tepat antara ZPT eksogen dan ZPT endogen yang terkandung dalam eksplan. Allan (1991) menyatakan bahwa perimbangan konsentrasi yang tepat antara auksin dan sitokinin diketahui dapat memacu pembentukan kalus melalui interaksi dalam pembesaran dan pembelahan sel.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak UPTD Agribisnis, Dinas Pertanian, Perikanan dan Kehutanan Pontianak yang telah memberikan ijin untuk melakukan penelitian di Laboratorium Kultur Jaringan Aloe Vera Centre (AVC).

DAFTAR PUSTAKA

Allan, E, 1991, Plant Cell and Tissue Culture, Wiley Publisher, Singapore

Andaryani S, 2010, *Kajian Penggunaan Berbagai Konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar (Jatropha curcas L.) secara In Vitro*, Skripsi, Universitas Sebelas Maret, Surakarta

Endres, R, 1994, Plant Cell Biotechnology, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York

Hendaryono, DPS & Wijayani, A, 1994, Teknik Kultur Jaringan Pengenalan dan Petunjuk Perbanyak Tanaman Secara Vegetatif Modern, Kanisius, Yogyakarta

Karsinah, FHS & Mansyur, A, 2007, Eksplorasi dan Karakteristik Plasma Nutfah Tanaman Markisa, *J. Hort*, vol.17, no.4, hal 297-306

Khan, S, Nasib, A & Saeed, BA, 2004, Employment of In Vitro Technology for Large Scale Multiplication of Pineapples (*Ananas comosus*), *Pak. J. Bot*, vol. 36, no. 3, hal. 611-2004

Kurniati, H, 2010, *Pengaruh Penambahan Naphthalene Acetic Acid (NAA) dan 6-Benzyl Amino Purin (BAP) terhadap Pertumbuhan Kalus Tanaman Melati Putih (Jasminum sambac L.)*, Skripsi, Universitas Tanjungpura, Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Pontianak

Lestari, EG, & Mariska, 1997, Kultur *in vitro* sebagai Metode Pelestarian Tumbuhan Obat Langka, *Buletin Plasma Nutfah*, vol. 2, no. 1, hal 298-305

Mahadi I, Syafi'i, W & Sari, Y, 2016, Induksi Kalus Jeruk Kasturi (*Citrus microcarpa*) Menggunakan Hormon 2,4-D dan BAP dengan Metode *in vitro*, *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)*, vol.21, no.2, hal 84-89

Pierik, RLM, 1987, In vitro Culture of Higher Plant, Kluwer Academic Publisher, London

Rukmana, H, 2003, Usaha Tani Markisa, Edisi Ke-1, Yogyakarta

Santoso, U & Nursandi, F, 2002, Kultur Jaringan Tanaman, UMM Press, Malang

Soleh, AZ, 2005, Ilmu Statistika: Pendekatan Teoritis dan Aplikasi disertai Contoh Penggunaan SPSS, Cetakan Pertama, Penerbit Rekayasa Sains, Bandung.

Yelnititis, 2012, Pembentukan Kalus Remah Dari Eksplan Daun Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.) *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, vol. 6, hal 181 – 194