

PENGGUNAAN EKSTRAKSI FASA PADAT UNTUK ANALISIS TETRASIKLIN DALAM CONTOH UDANG

Evita Boes, Julia Kantasubrata dan A.T. Karossi

Pusat Penelitian dan Pengembangan Kimia Terapan – LIPI
Jalan Cisu – Sangkuriang, Bandung 40135

INTISARI

Udang beku Indonesia banyak diekspor ke Jepang dan Amerika Serikat, akan tetapi produk ini seringkali ditolak karena mengandung cemaran derivat tetrasiklin. Analisa kualitatif yang dilakukan terhadap contoh udang yang akan diekspor menggunakan HPLC menunjukkan adanya cemaran oksitetrasiklin dan tetrasiklin. Analisis kuantitatif cemaran tersebut mengalami gangguan karena terdapat beberapa puncak yang berasal dari bahan matriks, yang terelusi berdekatan dengan puncak senyawa yang akan dianalisa. Dalam penelitian ini telah dicoba penggunaan ekstraksi fasa padat (Solid Phase Extraction, disingkat SPE) untuk menghilangkan puncak senyawa yang berasal dari bahan matriks, sehingga analisis kuantitatif dapat dilakukan dengan lebih teliti. Perlakuan pendahuluan contoh menggunakan SPE, selain dapat memisahkan senyawa yang akan dianalisa dari ketidakmurnian yang terdapat dalam bahan matriks, juga dapat mengkonsentrasikan kandungan derivat tetrasiklin dalam ekstrak contoh yang akan dianalisis. Perolehan kembali dari proses elusi kolom SPE cukup baik ($\pm 90\%$) dan kapasitas kolom SPE - Octadecyl 1 ml berkisar dari 2,4-7,9 μg ; 3,5-11,8 μg ; 3,4-11,2 μg dan 17,3-57,5 μg berturut-turut untuk oksitetrasiklin, tetrasiklin, demeklosiklin dan dosisiklin.

ABSTRACT

A great quantity of Indonesian frozen prawns were exported to Japan and America. Unfortunately these products have often been rejected due to their content of tetracycline derivative residues. Qualitative analysis of frozen prawn samples being exported by means of HPLC, indicated that they are contaminated by oxytetracycline and tetracycline residues. A problem of quantitative analysis of such residues could be due to several peaks of the matrix being eluted closely to the peaks of the tetracycline derivatives. An experiment was carried out to eliminate the peaks of the matrix origin using SPE (Solid Phase Extraction) in order to quantify the derivatives more accurately. Application of SPE in the sample pretreatment is useful not only for separating the solute being analyzed from the matrix, but also for concentrating the tetracycline derivatives of the extract. The recovery of SPE column elution process was about 90% and the SPE octadecyl (1 ml) column capacity for oxytetracycline, tetracycline, demeclocycline and doxycycline i.e. 2.4-7.9 μg ; 3.5-11.8 μg ; 3.4-11.2 μg and 17.3-57.5 μg respectively.

PENDAHULUAN

Direktorat Jendral Perikanan menghimbau para petani tambak udang untuk tidak menggunakan antibiotik pada kegiatan produksi udang, mulai dari pembibitan, budidaya tambak, dan pembuatan pakan. Penggunaan antibiotik yang berupa derivat tetrasiklin dikhawatirkan akan menimbulkan

pencemaran terhadap udang yang dihasilkan, karena antibiotik berkadar tinggi dapat merusak jaringan sel otak (6). Himbauan tersebut dilontarkan sehubungan dengan terjadinya penolakan udang beku ekspor dari Indonesia ke Jepang, karena ternyata mengandung tetrasiklin. Udang yang ditolak tersebut berasal dari Sumatera Utara yang pada tanggal 4 Desember 1991 ditemukan mengandung residu tetrasiklin dengan kadar 3,4 ppm. Akibatnya setiap ekspor udang ke Jepang dikenakan pemeriksaan dan pengujian laboratorium oleh pihak Jepang. Untuk itu diperlukan suatu metode analisa pengujian antibiotik dalam udang, karena memang belum tercantum dalam metoda standar pengujian nasional untuk produk perikanan (7,8). Dikenal beberapa macam antibiotik tetrasiklin diantaranya minosiklin, oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin, demeklosiklin, dan dosisiklin. Derivat-derivat ini sering digunakan sebagai antibiotik untuk ternak (1,2).

Dari hasil penelitian terdahulu telah didapat kondisi pemisahan derivat tetrasiklin menggunakan kromatografi cairan tekanan tinggi (HPLC). Kondisi ini diaplikasikan untuk memantau adanya residu tetrasiklin didalam udang. Sebelum ekstrak contoh udang diinjeksikan kedalam kolom HPLC, terlebih dahulu dilakukan proses ekstraksi untuk menarik tetrasiklin yang terikat, menggunakan campuran metanol dan bufer McIlvaine. Pada kromatogram contoh, dihasilkan banyak puncak yang berasal dari bahan matriks dan keluarnya puncak-puncak tersebut berdekatan dengan puncak senyawa yang dianalisis.

Masalah lain yang timbul adalah persyaratan kandungan tetrasiklin didalam udang ada dalam orde ppb. Agar tetrasiklin dalam contoh dapat terdeteksi, maka sebelum diinjeksikan ke dalam kolom HPLC, kandungan tetrasiklin dalam contoh perlu dipekatkan terlebih dahulu. Untuk mengurangi gangguan matriks dan untuk mengkonsentrasikan senyawa yang dianalisa dilakukan preparasi contoh menggunakan Ekstraksi Fase Padat (Solid Phase Extraction, disingkat SPE). SPE adalah salah satu teknik preparasi contoh yang didasarkan pada mekanisme pemisahan kromatografi cairan. Didalam kromatografi cairan, kelarutan dan interaksi gugus fungsi dari contoh, fasa diam dan pelarut akan menyebabkan terjadinya pemisahan. Pada SPE interaksi tersebut tergambar dalam proses ekstraksi

dan elusi pada sebuah kolom mini. Pada proses ekstraksi, komponen yang mempunyai kepolaran relatif sama dengan fasa diam akan terikat pada fasa diam, sedangkan komponen lain atau bahan matriks dengan kepolaran berbeda akan keluar bersama filtrat atau dengan kata lain tidak diikat oleh fasa diam. Akan tetapi, komponen pengganggu yang mempunyai kepolaran hampir sama dengan fasa diam akan ikut terikat pada kolom mini, namun pada saat elusi, eluen yang spesifik hanya dapat mengelusi komponen yang dianalisis dan diharapkan komponen pengganggu akan tetap tinggal pada kolom mini (4). Didalam penelitian ini SPE yang digunakan berupa kolom mini dari SPE fasa terikat Octadecyl (C₁₈) BAKER-10.

Tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari penggunaan kolom SPE untuk mengurangi gangguan-gangguan matriks dan pemekatan senyawa yang dianalisa dengan mencari pelarut untuk mengelusi senyawa yang terikat pada kolom SPE.

PERCOBAAN

Peralatan yang digunakan berupa satu unit peralatan HPLC yang terdiri dari Pompa BECKMAN 110B, detektor UV BECKMAN M163, kolom analitik μ -Bondapak C₁₈ dan Integrator SPECTRA PHYSICS 4290 serta satu unit peralatan HPLC SHIMADZU LC 6A dengan detektor Photodiode Array SPD M6A, Komputer IBM dan Printer P 5300. Peralatan lain yang digunakan untuk preparasi contoh adalah satu unit sistem BAKER-10 SPE yang terdiri dari wadah BAKER-10 EXTRACTION SYSTEM, rak tabung koleksi contoh, tabung 2 ml untuk koleksi contoh, penampung dan kolom 1 ml Octadecyl BAKER-10 SPE.

Bahan kimia yang digunakan adalah standar murni minosiklin-HCl (MC), tetrasiklin-HCl (TC), oksitetrasiklin-HCl (OTC), demeklosiklin-HCl (DMC) dan dosisiklin-HCl (DC) dari SIGMA. Metanol, asetonitril, asam oksalat, asam sitrat, asam fosfat dan disodium hidrogen fosfat adalah produksi EMERCK.

Bufer McIlvaine pH 4,5 dibuat dengan melarutkan 21,014 gr asam sitrat dan 35,598 gr disodium hidrogen fosfat masing-masing dalam 1 L air suling. Kemudian dicampurkan 538 ml larutan asam sitrat dan 462 ml disodium hidrogen fosfat dan campuran siap digunakan pada proses ekstraksi (9).

Pemisahan berbagai standar derivat tetrasiklin dilakukan dengan teknik HPLC. Larutan larutan standar ini dibuat dengan melarutkan masing-masing 1 mg MC/ml; 2,5 mg OTC/ml; 3,06 mg TC/ml; 5 mg DMC/ml dan 2,5 mg DC/ml dalam metanol. Masing-masing standar sebanyak 100 μ l, 50 μ l, 50 μ l, 50 μ l dan 175 μ l berturut-turut untuk MC, OTC, TC, DMC dan DC, diencerkan menjadi 1 ml. Campuran larutan standar ini diinjeksikan ke kolom HPLC untuk mengetahui waktu retensi (t_r) masing-masing derivat tetrasiklin, menggunakan campuran metanol : asetonitril :

0,01 M asam oksalat dengan perbandingan (1:1,5:7) sebagai eluen. Untuk proses ekstraksi, contoh udang yang akan dianalisis dipotong dan dihancurkan dengan menggunakan blender, kemudian ditimbang kira-kira 10 gr. Contoh ini dimasukkan kedalam erlemeyer dan ditambahkan 5 ml metanol, dikocok sebentar dan ditambahkan 45 ml larutan bufer McIlvaine. Campuran ini kemudian dikocok selama 1 jam dengan kecepatan 2500 rpm, lalu disaring menggunakan kertas saring Whatman No 40 dan filtratnya diinjeksikan ke kolom HPLC. Apabila dari kromatogram pemisahan yang dihasilkan, didapat puncak senyawa yang mempunyai t_r yang sama dengan t_r dari salah satu standar derivat tetrasiklin, maka dilakukan konfirmasi puncak menggunakan detektor diode array. Spektrum serapan dari senyawa yang diduga ditumpangstuhkan pada spektrum serapan standar, untuk melihat apakah puncak dengan t_r yang sama berasal dari senyawa yang sama.

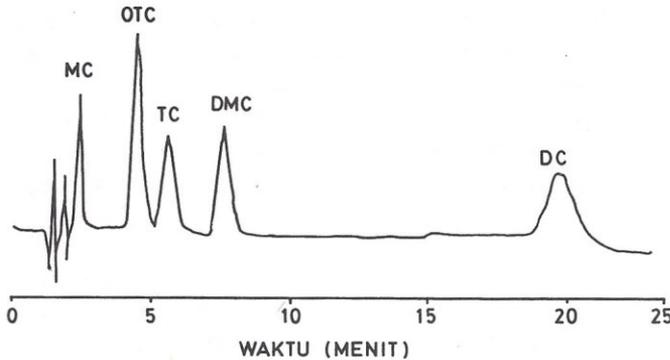
Preparasi contoh menggunakan kolom SPE dilakukan sebagai berikut :

1. Untuk terlebih dahulu mengaktifkan kolom SPE yang digunakan, kedalam kolom dialirkan metanol menggunakan bantuan pompa vakum. Apabila metanol sudah melewati fasa diam, pompa vakum dihentikan dan kolom dibilas dengan air suling, dan bufer McIlvaine. Pompa vakum dimatikan sebelum semua bufer melewati fasa diam.
2. Sejumlah tertentu larutan contoh udang di pipet kemudian dimasukkan kedalam kolom dan pompa vakum dijalankan kembali. Senyawa yang dianalisis akan terikat pada kolom. Kecepatan alir larutan contoh diatur kira-kira 5 ml/menit.
3. Kolom SPE kemudian dicuci dengan air suling dan pada proses pencucian hanya dapat melarutkan senyawa pengganggu. Dengan bantuan pompa vakum kolom dikeringkan selama 1-5 menit.
4. Senyawa tetrasiklin yang terikat pada fasa diam dielusi menggunakan campuran pelarut yang ditentukan jenisnya melalui percobaan kecil dengan menambahkan sejumlah tertentu standar derivat tetrasiklin kedalam contoh udang. Apabila setelah melewati prosedur butir 1, 2, dan 3 contoh buatan dielusi dengan 1 ml metanol, ternyata diperoleh persen-perolehan kembali yang kecil. Nilai persen-perolehan kembali dapat ditingkatkan apabila sebagai larutan pengelusi digunakan campuran metanol dan asetonitril (1:1). Untuk mengetahui terlebih dahulu kapasitas dari kolom ekstraksi dilakukan percobaan dengan cara membuat larutan standar dengan konsentrasi yang bervariasi dalam pelarut yang sama dengan pelarut untuk contoh udang. Terhadap larutan standar ini dilakukan tahapan pengerjaan butir 1, 2, 3 dan 4 diatas dan ternyata kolom ekstraksi dengan volume 1 ml mempunyai kapasitas muat tertentu.

Apabila kedalam kolom dilewatkan senyawa dengan konsentrasinya yang lebih tinggi dari kapasitas muatnya maka senyawa tersebut akan lolos.

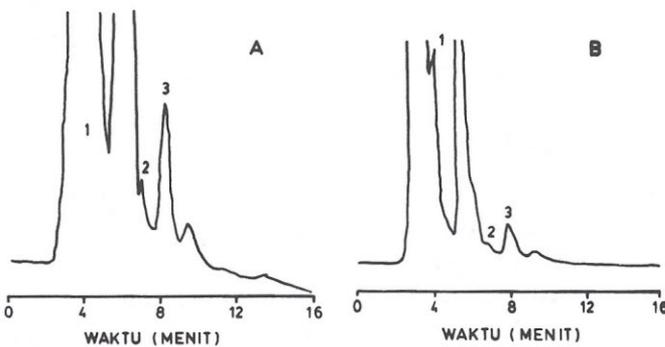
HASIL DAN DISKUSI

Pemisahan derivat standar tetrasiklin berupa MC, TC, OTC, DMC dan DC dan bentuk kromatogram telah dilaporkan sebelumnya (3) sebagaimana tergambar di bawah ini.



Gambar 1. Pemisahan 6 derivat standar tetrasiklin Kolom: μ Bondapak C_{18} , detektor: UV. Eluen: metanol-asetonitril-0,01 M asam oksalat (1:1,5:7). Kecepatan aliran 1 ml/menit dan kecepatan kertas 0,5 cm/mnt.

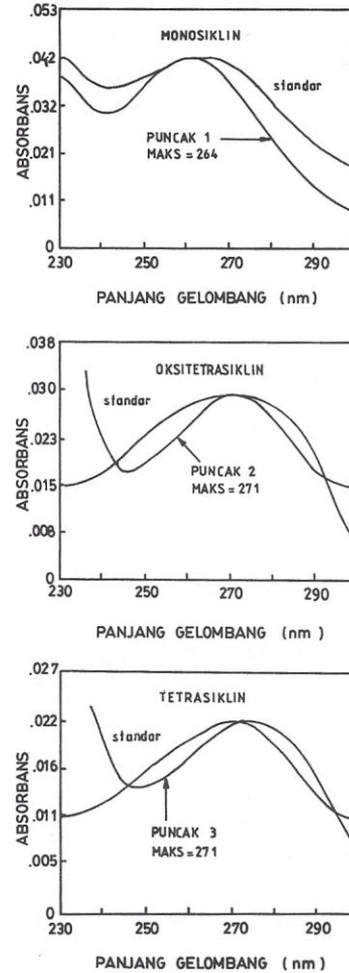
Pada Gambar 2 ekstraksi residu tetrasiklin dalam contoh udang yang diduga mengandung residu senyawa tetrasiklin langsung diinjeksikan kedalam kolom HPLC.



Gambar 2. Kromatogram pemisahan dari contoh udang. Kolom: μ Bondapak C_{18} , detektor: Diode Array. Eluen: metanol-asetonitril-0,01 M asam oksalat (1:1,5:7). Kecepatan aliran 1 ml/menit dan kecepatan kertas 0,5 cm/mnt. A = contoh sebelum pengenceran; B = contoh sesudah pengenceran.

Pada kromatogram 2A terdapat beberapa puncak dan berdasarkan waktu retensi diduga puncak 1 = MC, 2 = OTC dan 3 = TC. Puncak 1 keluar bersamaan dengan puncak yang sangat besar yang kemungkinan berasal dari pengotor

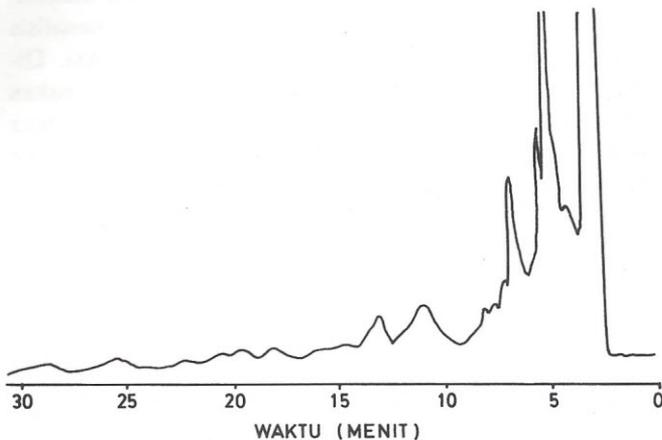
dalam bahan matriks. Dengan faktor pengenceran akan didapat puncak 1 yang relatif lebih jelas (Gambar 2B). Pada gambar 2B diperoleh puncak 1, 2 dan 3 yang mempunyai t_r sama atau hampir sama dengan t_r standar MC, OTC dan TC. Untuk mengkonfirmasi puncak-puncak tersebut digunakan detektor diode array. Apabila spektrum serapan puncak yang diduga ditumpangstuhkan pada spektrum serapan standar terlihat adanya perbedaan, seperti tampak pada Gambar 3.



Gambar 3. Spektrum serapan standar MC, OTC, TC dan spektrum serapan puncak 1, 2 dan 3.

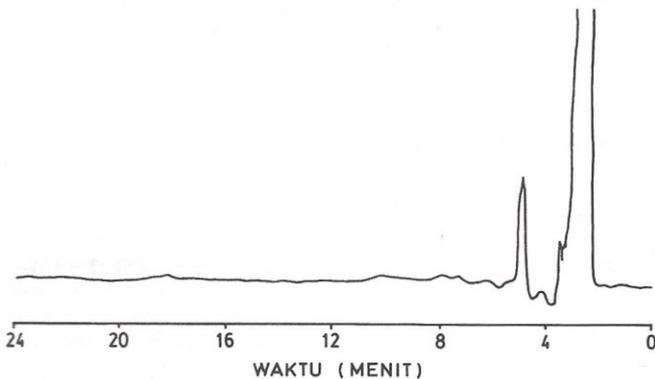
Dari Gambar 3 terlihat panjang gelombang maksimum standar MC, OTC dan TC berturut-turut 264, 271 dan 271 nm, sedangkan panjang gelombang maksimum senyawa yang diduga MC (puncak 1), OTC (puncak 2) dan TC (puncak 3) berturut-turut adalah 262, 272 dan 276 nm. Besar kemungkinan perbedaan panjang gelombang maksimum dari setiap puncak, disertai dengan bentuk spektrum yang juga berbeda, disebabkan karena puncak 1, 2 dan 3 terelusi bersamaan dengan puncak lain yang berasal dari bahan matriks. Terdapatnya senyawa pengganggu semacam itu dapat dikurangi dengan suatu perlakuan pendahuluan pada contoh udang. Untuk itu digunakan SPE yang dapat mengeliminasi senyawa-senyawa pengganggu (4).

Untuk melihat kemampuan dari SPE, mula-mula dibuat kromatogram yang diperoleh dari contoh udang yang tidak dilewatkan ke dalam kolom SPE (Gambar 4), dalam hal ini ekstrak langsung diinjeksikan kedalam kolom HPLC.



Gambar 4. Kromatogram dari contoh udang yang tidak dilewatkan ke dalam kolom SPE. Kolom: μ Bondapak C₁₈, detektor: UV. Eluen: metanol-asetonitril-0,01 M asam oksalat (1:1,5:7). Kecepatan aliran 1 ml/menit dan kecepatan kertas 0,5 cm/mnt.

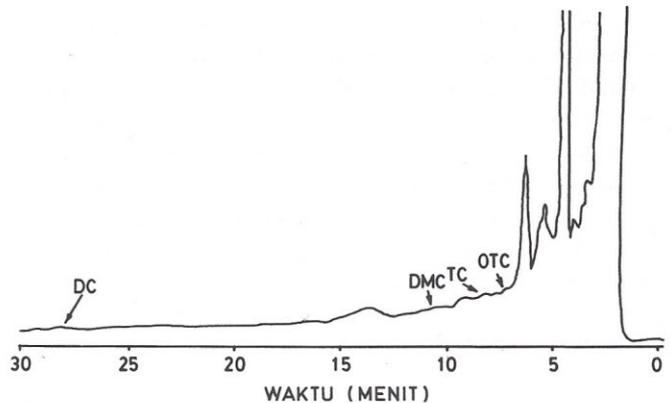
Kromatogram yang diperoleh memberikan banyak puncak pengganggu. Apabila sebelum diinjeksikan contoh udang tersebut dilewatkan terlebih dahulu pada SPE, maka dapat dihasilkan kromatogram dengan garis dasar yang relatif mendatar (Gambar 5), yang berarti contoh tidak lagi mengandung senyawa pengganggu yang berasal dari bahan matriks.



Gambar 5. Kromatogram dari contoh udang yang mengalami perlakuan pendahuluan menggunakan kolom SPE. Kolom: μ Bondapak C₁₈, Detektor: UV. Eluen: metanol-asetonitril-0,01 M asam oksalat (1:1,5:7). Kecepatan aliran: 1 ml/mnt dan kecepatan kertas 0,5 cm/mnt.

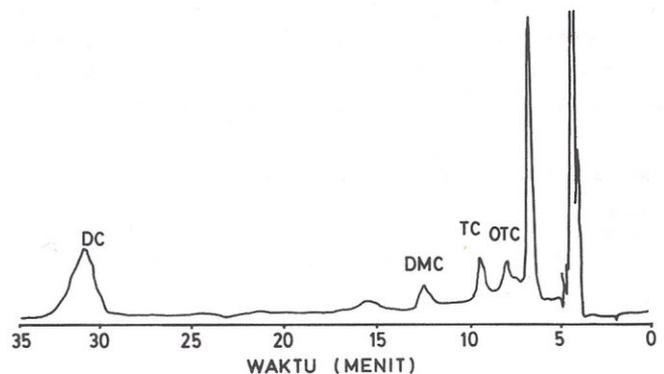
Untuk melihat pentingnya tahapan pemekatan, dilakukan percobaan terhadap contoh sebagai berikut : kedalam sejumlah tertentu contoh udang (± 10 gr) ditambahkan standar OTC, TC, DMC dan DC masing-masing sebesar 3,97; 5,88; 5,61 dan 28,76 μ g. Jumlah standar yang

ditambahkan disesuaikan dengan perkiraan jumlah pencemar derivat tetrasiklin yang umumnya terdapat dalam udang, dan hasil kromatogramnya dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Kromatogram contoh udang yang ditambah standar. Kolom: μ Bondapak C₁₈, Detektor: UV. Eluen: metanol-asetonitril-0,01M asam oksalat (1:1,5:7). Kecepatan aliran: 1 ml/menit kecepatan kertas 0,5 cm/mnt.

Seharusnya pada kromatogram, puncak OTC, TC, DMC dan DC terlihat pada tempat-tempat seperti yang ditunjukkan oleh anak panah. Ternyata pada cara penambahan standar ini analisis kualitatif dan kuantitatif tidak dapat dilakukan karena puncaknya tidak begitu jelas. Selain dari pada itu, terlihat juga banyaknya puncak-puncak senyawa pengganggu yang terelusi sebelum puncak OTC dan salah satu t_r puncak pengganggu berdekatan dengan t_r standar MC. Apabila contoh yang sama dengan contoh pada Gambar 6 dilewatkan terlebih dahulu pada SPE sebelum diinjeksikan ke dalam kolom analitik, maka puncak-puncak OTC, TC, DMC dan DC dapat terdeteksi (Gambar 7).



Gambar 7. Kromatogram contoh udang yang ditambah standar, dan dilewatkan ke kolom SPE. Kolom: μ Bondapak C₁₈, Detektor: UV. Eluen: metanol-asetonitril-0,01M asam oksalat (1:1,5:7). Kecepatan aliran: 1ml/menit dan kecepatan kertas 0,5 cm/mnt.

Apabila dibandingkan dengan Gambar 6 bagian muka kromatogram pada Gambar 7 (daerah puncak senyawa senyawa pengganggu) menjadi relatif bersih. Dengan demikian terlihat jelas bahwa kolom SPE selain dapat menghilangkan puncak-puncak senyawa pengganggu, juga dapat memekatkan kandungan residu dalam contoh.

Pada penggunaan kolom SPE, larutan pengelusi yang baik dicari untuk dapat mengelusi komponen yang akan dianalisa dari ikatannya dengan fasa diam pada kolom tersebut. Metanol pernah digunakan sebagai larutan pengelusi (1), akan tetapi pada percobaan disini apabila digunakan larutan pengelusi metanol didapatkan nilai perolehan kembali yang rendah ($\pm 30\%$). Karena metanol tidak cukup kuat untuk mengelusi senyawa tetrasiklin yang terikat pada kolom SPE. Apabila kita bekerja pada kromatografi fasa terbalik maka pelarut yang relatif lebih kuat adalah pelarut yang bersifat relatif tidak polar (5). Berdasarkan pedoman ini dicoba menggunakan larutan pengelusi metanol : asetonitril (1:1), dan ternyata dapat memberikan perolehan-kembali yang baik ($\pm 90\%$). Data-data perolehan-kembali dari proses elusi kolom SPE dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Perolehan kembali dari proses elusi pada kolom SPE.

Larutan pengelusi	Perolehan kembali (%)			
	OTC	TC	DMC	DC
Metanol	37,9	38,6	42,4	38,3
Metanol : asetonitril (1 : 1)	97,8	92,9	89,7	91,7

Untuk mengetahui kapasitas dari kolom SPE, dicoba mengelusi standar derivat tetrasiklin dengan konsentrasi yang bervariasi. Sebelum dilewatkan pada kolom SPE, larutan standar diinjeksikan ke kolom HPLC, dan luas puncak kromatogram yang diperoleh digunakan sebagai pembandingan, untuk menghitung perolehan-kembali setelah masing-masing larutan standar dilewatkan ke dalam kolom SPE. Kandungan standar sebelum dan sesudah dilewatkan kedalam kolom SPE dapat dilihat pada Tabel 2. Apabila jumlah yang dilewatkan melebihi kapasitas kolom, maka sebagian senyawa yang lewat ke dalam kolom SPE akan lolos bersama filtrat, yang menunjukkan bahwa senyawa tidak diikat oleh kolom. Hal ini dapat ditandai dengan rendahnya nilai perolehan kembali ($< 75\%$). Sebagai patokan perolehan kembali yang baik adalah 85-90 %.

Tabel 2. Kapasitas kolom SPE- Octadecyl 1 ml

Derivat Tetrasikl	Jumlah (μg)		
	Sebelum SPE	Sesudah SPE	Perolehan kembali (%)
OTC	2,38	2,12	88,9
	3,97	3,88	97,8
	7,93	7,41	93,4
	11,90	7,41	62,3
TC	3,53	3,15	89,0
	5,88	5,46	92,9
	11,76	10,50	89,3
	17,64	10,50	59,5
DMC	3,37	3,25	96,5
	5,61	5,03	89,7
	11,22	10,83	96,5
	16,83	11,92	70,8
DC	17,28	16,78	97,1
	28,77	26,37	91,7
	57,53	52,74	91,7
	86,30	63,49	73,6

KESIMPULAN

Dari hasil-hasil percobaan yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa penggunaan SPE untuk analisis residu tetrasiklin dalam udang dapat mengurangi gangguan puncak-puncak senyawa yang berasal dari bahan matriks, dan dapat memekatkan senyawa yang akan dianalisis sehingga jumlah relik residu akan dapat terdeteksi. Disamping itu kolom SPE-Octadecyl 1ml yang digunakan mempunyai keterbatasan kapasitas pengikatan, sehingga apabila akan digunakan untuk kandungan residu yang relatif besar, kemungkinan dapat menggunakan kolom SPE yang mempunyai volume lebih besar yaitu kolom SPE-Octadecyl 3 atau 6 ml.

UCAPAN TERIMA KASIH

Makalah ini telah disampaikan pada Seminar Nasional X Perhimpunan Biokimia Indonesia, Ujung Pandang 3 - 4 Juli 1993 dengan fasilitas yang diberikan oleh Puslitbang Kimia Terapan - LIPI, Bandung.

PUSTAKA

1. Y.Ikai, H.Oka, N.Kawamura and M.Yamada. Systematic Simultaneous Analysis of Residual Tetracyclines in Animal Tissues Using Thin Layer and High Performance Liquid Chromatography. *J. of Chromatogr.*404: 313-323 (1988).
2. H.Oka, Y.Ikai, N.Kawamura, K.Ono and M.Yamada. A Simple Method for Residual Tetracyclines Analysis in Honey Using A Tandem Cartridge Clean-Up System. *J. of Chromatogr.*389: 417-426 (1987).
3. E.Boes, J.Kantasubrata dan A.T.Karossi. Teknik Analisa Tetrasiklin dengan HPLC Dan Penggunaannya Dalam Monitoring Proses Fermentasi. *Warta kimia Analitik*. No:9 hal. 10-12 (Juli 1991).
4. Baker-10 SPETM Applications Guide Vol.II, Life Science Edition, 96-121 (1982).
5. N. Hadden, F. Baumann, F. MacDonald, M. Munk, R. Suvenson, D. Gere, F. Zamaroni and R. Majors. *Basic liquid Chromatography*. 1971 pp 5.25 - 5.29
6. Udang Indonesia tidak terbukti mengandung antibiotik. Surat Kabar Pikiran Rakyat 18 Maret 1991.
7. Dirjen Perikanan: Jangan gunakan antibiotik dalam pembudidayaan udang. Surat Kabar Kompas 23 Maret 1992.
8. Lagi Udang Indonesia Tercemar Tetrasiklin, Surat Kabar Kompas 5 Juni 1992.
9. *Buffer Substances*, Risalat MERCK, 22/11 23/13771/5/584R, hal. 12.