

Perkembangan sel telur ikan seriding, *Ambassis nalua* (Hamilton 1822)

[Oocyte development of scalloped perchlet, *Ambassis nalua* (Hamilton 1822)]

Nisha Desfi Arianti¹✉, M.F. Rahardjo^{2,4}, Ahmad Zahid^{3,4}

¹ Program Studi Pengelolaan Sumber Daya Perairan, Sekolah Pascasarjana IPB

²Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB

³Pusat Kajian Sumberdaya Pesisir dan Lautan, IPB

⁴Masyarakat Iktiologi Indonesia (MII)

Diterima: 27 Oktober 2016; Disetujui: 31 Januari 2017

Abstrak

Ikan seriding (*Ambassis nalua*) merupakan salah satu jenis ikan di perairan Teluk Pabean, Indramayu yang berukuran kecil, transparan dan tersedia dalam jumlah melimpah. Penelitian ini bertujuan untuk melihat perkembangan sel telur secara histologis dan menentukan tipe pemijahan ikan seriding. Ikan seriding didapatkan dari hasil tangkapan nelayan di Teluk Pabean, kemudian gonad contoh diawetkan dengan menggunakan larutan BNF (*Buffer Neutral Formalin*). Preparat histo-logis sel telur dibuat dengan metode pewarnaan HE, kemudian diamati dibawah mikroskop berkamera. Tahapan perkembangan oosit pada ikan seriding yaitu kromatin nukleus dan perinuklear (tahap pertumbuhan awal), kortikal alveoli, vitelo-genesis, dan pematangan. Tahapan tersebut menunjukkan bahwa ikan seriding merupakan tipe ikan yang memijah secara bertahap.

Kata penting: gonad, histologi, pemijah bertahap, seriding

Abstract

Scalloped perchlet (*Ambassis nalua*) is a small, transparent, and abundant species inhabit in Pabean Bay, Indramayu. The present study aims to describes oosit development stages histologically and determine the spawning type of the Scalloped perchlet. Scalloped perchlet obtained from fishermen in Pabean bay, then gonads preserved by using a solution of BNF (*Buffer Neutral Formalin*). The gonadal histology of oosit made by HE staining method, then observed in microscope camera. The development of the oocytes was classified into four stages i.e initial growth stage (the chromatin of the nucleus and perinuclear), cortical alveoli, vitellogenesis, and ripe. Based on the stages of oocytes, scalloped perchlet categorized as partial spawner.

Keywords: gonads, histology, partial spawner, scalloped perchlet

Pendahuluan

Reproduksi merupakan upaya untuk menghasilkan individu baru melalui proses pemijahan. Siklus reproduksi masing-masing ikan bervariasi, dilihat dari perkembangan oosit dan musim pemijahan. Beberapa jenis ikan melakukan pemijahan dalam jangka panjang, jangka pendek, dan ada ikan yang memijah sepanjang tahun dengan pelepasan telur secara bertahap. Tipe pemijahan ikan dapat ditentukan dengan melihat perkembangan oosit pada histologi ovarium ikan betina.

Perkembangan oosit terdiri atas beberapa tahapan; yaitu tahap perkembangan awal (ditandai dengan terbentuknya nukleus kromatin dan perinuklear), tahap kortikal alveoli, tahap vitellogenesis, dan tahap pematangan (pematangan awal dan pematangan akhir) (McMillan 2007). Perkembangan oosit yang terjadi juga tidak harus mengikuti tahapan yang sudah ada, dapat disesuaikan dengan periode perkembangan oosit ikan.

Menurut Selman & Wallace (1989), ovarium ikan dapat diklasifikasikan dalam tiga tipe berdasarkan bentuk perkembangan oositnya yaitu tipe berkembang bersamaan (*asynchronous*), berkembang bersamaan secara berkelompok (*group synchronous*), dan berkembang tidak bersamaan

✉ Penulis korespondensi
Alamat surel: nishadesfia67@gmail.com

(*asynchronous*). Tipe perkembangan oosit tidak bersamaan (*asynchronous*) dapat ditemukan dalam ovarium yang memiliki beberapa kelompok oosit dengan tingkat perkembangan kematangan yang berbeda-beda (Nagahama 1983; Nejedli *et al.* 2004).

Selama ini masih sedikit penelitian terkait dengan biologi ikan seriding. Zahid *et al.* (2011) mengungkap tentang makanan ikan seriding di perairan Segara Menyan, Jawa Barat. Tahapan perkembangan sel telur secara histologis merupakan dasar untuk kajian reproduksi terkait strategi reproduksi. Marques *et al.* (2000) menjelaskan bahwa kajian mengenai reproduksi ikan dapat digunakan untuk mendukung manajemen dan program konservasi ikan yang dirancang untuk mempertahankan atau meningkatkan stok ikan. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan mempertelakan tahapan perkembangan sel telur (osit) dan tipe pemijahan ikan seriding.

Bahan dan metode

Contoh ikan diambil pada bulan April hingga Oktober 2015 di Teluk Pabean, Kabupaten Indramayu, Provinsi Jawa Barat. Ikan seriding ditangkap menggunakan alat tangkap sero (panjang sayap 60 m; tinggi 1,2 m; mata jaring 2 mm). Sero dipasang pada malam hari dan diangkat pada pagi hari oleh nelayan. Ikan seriding yang tertangkap kemudian dibedah dan dikelompokkan berdasarkan jenis kelamin.

Gonad dipisahkan dari isi perut lainnya. Gonad yang mewakili tingkat kematangan gonad

yang berbeda secara morfologi kemudian dipisahkan kedalam plastik klip, diawetkan menggunakan larutan BNF (*Neutral Buffered Formalin*). Penentuan tingkatan kematangan gonad pada ikan seriding secara morfologi dilakukan dengan memperhatikan ukuran, warna, dan butiran telur yang terlihat secara kasat mata.

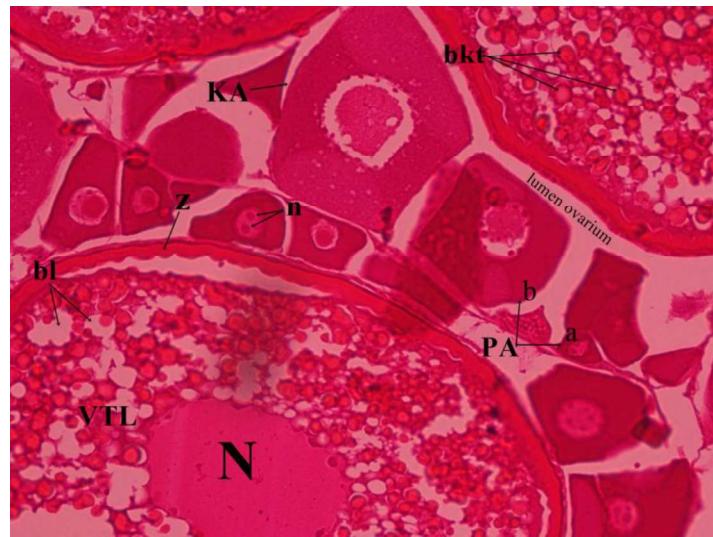
Preparat histologis gonad dibuat dengan metode pewarnaan hematoxylin dan eosin dengan ketebalan pengirisan 3-5 μm pada posisi melintang. Pengamatan gonad dilakukan di Laboratorium Histopatologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Preparat gonad diamati di bawah mikroskop berkamera (perbesaran 40x) di Laboratorium Terpadu Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif mengacu kepada Murua & Rey (2003), McMillan (2007), dan Genten *et al.* (2009).

Hasil

Dalam satu penampang oosit ikan seriding betina terdapat dua hingga tiga perkembangan telur. Pada Gambar 1 terlihat adanya tahap pertumbuhan awal (kromatin nukleus dan perinuklear), kortikal alveoli, dan vitelogenesis. Ukuran oosit pada setiap tahap perkembangannya sangat bervariasi. Hal ini terlihat dari diameter telur yang teramat melalui preparat histologis perkembangan oosit (Tabel 1).

Tabel 1. Kisaran diameter telur perkembangan oosit ikan seriding

Tahapan Perkembangan Oosit	Ukuran (μm)
Pembentukan kromatin nukleus	30 – 500
Pembentukan perinuklear	600 – 1300
Kortikal alveoli	1000 – 2500
Vitelogenesis	1500 – 7300
Matang	3700 – 5000



Gambar 1. Penampang histologi oosit ikan seriding. KA, kortikal alveoli; N, nukleus; VTL, vitelogenesis; n, nukleolus; PA, pertumbuhan awal (primer) (a, kromatin nukleus dan b, perinuklear); bl, butiran lemak; bkt, butiran kuning telur; z, zona radiata.

Tahap kromatin nukleus

Kromatin nukleus merupakan tahapan awal ketika oogonia mengalami pembelahan meiosis profase. Dari pembelahan tersebut kemudian muncul oosit di lumen ovarium. Oosit dikelilingi beberapa sel folikel skuamosa dan memiliki inti yang dikelilingi lapisan sitoplasma yang tipis, disebut dengan nukleus (Gambar 2, kromatin nukleus).

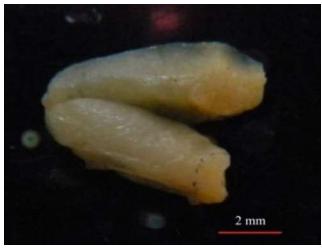
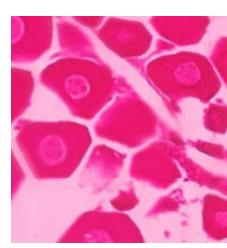
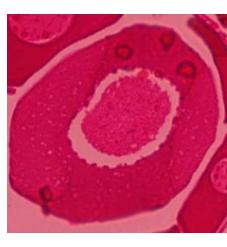
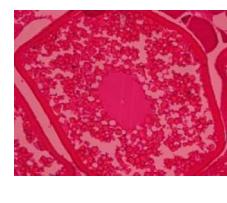
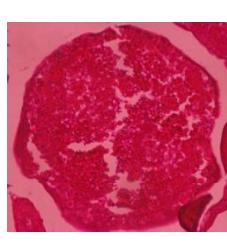
Tahap perinuklear

Bersamaan dengan berkembangnya oosit, nukleolus tumbuh di dalam nukleus dengan jumlah yang berbeda pada setiap masing-masing oosit, umumnya berjumlah lebih dari dua nukleolus yang berada di pinggiran lapisan inti. Kemudian terbentuk cincin putih yang mengelilingi nukleus. Pada akhir tahap ini akan terlihat beberapa pembentukan butiran kuning telur dan

lemak di sitoplasma. Hal ini menunjukkan oosit akan menuju ke tahapan kortikal alveolus. Hampir rata-rata pada tahap ini oosit belum mengalami matang gonad (Gambar 2, perinuklear).

Tahap kortikal alveoli

Pada tahap ini ovarium mengalami perkembangan sitoplasma, disebabkan oleh adanya pembentukan butiran lemak dan butiran kuning telur di sekeliling nukleus. Nukleus masih berada di posisi inti dengan beberapa nukleolus yang melekat di membran (Gambar 2, kortikal alveoli). Kortikal alveoli (*yolk vesicle*) terbentuk dengan ukuran yang bervariasi dan memiliki bentuk yang tidak beraturan. Pada tahap ini zona radiata terlihat lebih jelas. Memasuki tahap vitelogenesis, kortikal alveoli akan bermigrasi ke pinggiran oosit.

Tahapan	Karakteristik Morfologis	Karakteristik Histologis
Kromatin nukleus		
Perinuklear		
Kortikal alveoli		
Vitellogenesis		
Matang		

Gambar 2. Tahap perkembangan oosit ikan seriding (*Ambassis nalua*) secara makroskopik dan mikroskopik (skala: 500 μ m) / (400 x)

Tahap vitelogenesis

Setelah kortikal alveoli, terjadi pertambahan ukuran serta jumlah butiran kuning telur dan lemak mengisi sitoplasma. Tahap ini disebut awal vitelogenesis (*early vitellogenesis*). Selanjutnya pada tahap akhir vitelogenesis (*late*

vitellogenesis) terjadi pengendapan butiran kuning telur pada sisi tepi oosit yang matang dan kemudian menyebar ke seluruh sitoplasma mendekati nukleus (Gambar 2, vitelogenesis). Proses ini membuat ukuran nukleus semakin mengecil dengan bentuk yang tidak beraturan.

Butiran kuning telur mulai mengalami pencairan sejalan dengan berkembangnya sitoplasma. Selain itu zona radiata terlihat lebih tebal dan jelas antara teka internal dan teka eksternal.

Tahap matang

Pada tahap ini nukleus menghilang dan nukleolus keluar ke sitoplasma, sehingga oosit sulit diidentifikasi. Butiran kuning telur mengalami pencairan dan terlepas ke lumen ovarium. Zona radiata (teka internal dan teka eksternal) mengalami penipisan karena peningkatan ukuran sel sehingga epitel folikular menjadi pecah dan ini disebut dengan tahap matang (Gambar 2, matang).

Pembahasan

Ikan yang mengeluarkan telurnya secara bersamaan (*synchronous spawner*) hanya ada satu tahap perkembangan oosit dalam penampang ovarium seperti pada *Mallotus villosus* (Forberg 1982) dan *Anguilla rostrata* (Krueger & Oliveira 1997). Ikan yang mengeluarkan telur secara berkelompok (*group-synchronous spawner*) memiliki dua tahapan perkembangan dalam penampang ovarium, yaitu oosit berukuran besar (homogen) dan oosit berukuran kecil (heterogen) seperti pada ikan *Sardina pilchardus sardina* (Ganias *et al.* 2004). Berbeda dengan ikan seriding, tahapan perkembangan oosit menunjukkan keunikan yaitu dalam satu perkembangan ovarium terdapat dua hingga tiga tahap perkembangan oosit dalam penampang ovarium. Hal ini menunjukkan bahwa perkembangan oosit ikan seriding tergolong kedalam berkembang tidak bersamaan (*asynchronous spawner*), seperti pada ikan *Oligosarcus hepse-*

tus (Santos *et al.* 2005) dan *Danio rerio* (Ucuncu 2009). Ikan-ikan dengan tipe pemijahan tidak bersamaan (*asynchronous spawner*) memiliki musim pemijahan yang panjang dan biasanya pemijahan terjadi sepanjang tahun terlepas dari pengaruh kondisi lingkungan (Durham & Wilde 2008).

Jumlah tahapan perkembangan gonad dan sub-tahap pada ikan dapat bervariasi sesuai dengan perkembangan ovarium untuk setiap spesies dan juga sesuai dengan kriteria berbeda yang di-gunakan oleh masing-masing penulis (Santos *et al.* 2005). Dari hasil pengamatan yang telah dilakukan ditemukan lima tahapan perkembangan oosit pada ikan seriding yaitu 1. kromatin nukleus; 2. perinuklear; 3. kortikal alveoli; 4. vitelogenesis; dan 5. matang. Karakter morfologis dan histologis tahapan perkembangan oosit terangkum pada Tabel 2.

Simon *et al.* (2012) menggolongkan tahap kromatin nukleus dan perinuklear sebagai tahap pertumbuhan awal. Menurut Begovac & Wallace (1988), tahapan perinuklear pada sebagian ikan ditandai dengan adanya cincin (*perinuclear ring*) seperti pada ikan *Tilapia nilotica* dan *Sygnathus scovelli*. Pada tahap pertumbuhan awal, ukuran oosit pada ikan seriding semakin meningkat, mulai dari munculnya oosit de-ngan nukleus hingga awal terbentuknya butiran kuning telur dan lemak di sitoplasma. Ukuran oosit meningkat sejalan dengan meningkatnya ukuran nukleus dengan jumlah nukleolus menjadi lebih banyak (Ünver & Saraydin 2004, Honji *et al.* 2006, Santos *et al.* 2006). Tahap pertumbuhan awal ini merupakan tahapan awal yang sering dijumpai pada setiap perkembangan sel telur ikan.

Tabel 2. Karakteristik morfologi gonad ikan seriding

Tahapan	Karakter morfologis	Karakter histologis
Kromatin nukleus	Ukuran ovarium kecil, tipis, berwarna jingga dan terlihat seperti mi-nyak.	Sel kecil dengan inti sel (nukleus) ditengah dan bentuk tidak beraturan.
Perinuklear	Ukuran ovarium membesar, warna kekuningan tetapi butiran telur belum terlihat.	Sel lebih besar sejalan dengan perkembangan sitoplasma, nukleus semakin membesar disertai dengan munculnya nukleolus. Ditemukan seperti cincin putih yang mengelilingi nukleus.
Kortikal alveoli	Ukuran ovarium semakin membesar, berwarna kuning dan mulai terlihat adanya butiran telur.	Ditandai dengan munculnya pembentukan butiran kuning telur dan butiran lemak di sitoplasma. Zona radiata dan lapisan folikel mulai terlihat jelas.
Vitelogenesis	Butiran telur terlihat dengan jelas dan rongga ovarium rapat dengan telur. Pembuluh darah terlihat sangat jelas.	Nukleus mulai terdesak dengan semakin meningkatnya jumlah dan ukuran butiran kuning telur di sitoplasma. Zona radiata semakin tebal dan terlihat jelas.
Matang	Butiran telur terlihat dan rongga ovarium mulai merenggang, terdapat bagian yang transparan.	Pada tahap ini, nukleus menghilang dan nukleolus keluar ke sitoplasma. Pembentukan butiran kuning telur telah berhenti dan sitoplasma didominasi oleh butiran kuning telur.

Pada tahap kortikal alveoli, butiran kuning telur dan lemak mulai muncul memenuhi sitoplasma. Kortikal alveoli memiliki peranan penting dalam menuju tahap vitelogenesis karena peningkatan ukuran kortikal alveoli (butiran kuning telur dan lemak) akan bergeser ke pinggiran sitoplasma dan menguatkan dinding sitoplasma. Ravaglia & Maggese (2002) mengungkapkan bahwa perpindahan kortikal alveoli ke pinggiran sitoplasma disebabkan oleh akumulasi butiran kuning telur yang meningkat.

Selanjutnya pada tahap vitelogenesis, hormon gonadotropin (GTH) seperti LH (*luteinizing hormone*) dan FSH (*follicle stimulating hormone*) berperan dalam pertumbuhan dan pematangan oosit pada ikan seperti pada ikan *Carassius auratus*, *Trichogaster trichopterus*, dan *Gasterosteus aculeatus* yang juga memiliki tahapan perkembangan oosit yang tidak bersamaan (Shi *et al.* 2015). Meskipun ada beberapa hormon yang tidak bekerja secara langsung dalam perkembangan oosit, seperti hormon pertumbuhan yang memacu pertumbuhan tubuh

pada ikan agar ikan tumbuh lebih cepat dan mengalami matang gonad.

Pada beberapa ikan, perpaduan butiran kuning telur dan lemak menjadi sulit dibedakan pada saat proses pematangan dan oosit menjadi sulit ditemukan saat akan pembubaran inti. Hal ini disebabkan oleh penyusutan dan distorsi dari oosit selama pemrosesan kembali normal. Yön *et al.* 2008 mengungkapkan bahwa pada tahap matang, nukleus tidak dapat diamati karena butiran kuning telur dan lemak mengisi seluruh sitoplasma secara homogen dengan ukuran yang lebih besar.

Tahapan perkembangan oosit juga dapat dihubungkan dengan tingkat kematangan gonad pada ikan. Butiran kuning telur tersebut akan terlihat berwarna jingga karena adanya pigmen karotenoid. Ikan yang belum matang gonad dengan warna kuning muda disebabkan pada tahap pertumbuhan awal (kromatin nukleus dan perinuklear) butiran kuning telur dan lemak belum muncul. Warna jingga dapat terlihat pada ikan yang telah matang gonad.

Tumpang tindih ukuran antara tahap vitelogenesis dan tahap matang disebabkan perbedaan ukuran tubuh dan bobot tubuh pada ikan seriding. West (1990) menegaskan bahwa bias pada ukuran oosit mungkin terjadi karena sampel yang digunakan dari ukuran tubuh yang berbeda. Assem *et al.* (2015) juga menjelaskan bahwa pada habitat yang berbeda (perairan laut dan payau) ikan *Mugil cephalus* memiliki tumpang tindih ukuran diameter oosit antara tahap matang dan tahap penyerapan. Tumpang tindih ukuran oosit juga dijumpai pada ikan *Gerres equulus* (Iqbal *et al.* 2007).

Simpulan

Ikan seriding memiliki tiga tahapan perkembangan oosit dalam ovarium. Tipe ovarium demikian digolongkan kedalam tipe ovarium yang memiliki perkembangan oosit berkembang tidak bersamaan. Adapun tahapan perkembangan oosit pada ikan seriding yaitu 1. kromatin nukleus; 2. perinuklear; 3. kortikal alveoli; 4. vitelogenesis; dan 5. matang.

Daftar pustaka

- Assem SS, Rahman SHA, AlAbsawey MA, Mourad MM. 2015. Biological, histological and ultra-structural studies of female mullet, *Mugil cephalus*, ovaries collected from different habitats during annual reproduction cycle. *African Journal of Biotechnology*, 14(3): 2400-2414.
- Begovac PC, Wallace RA. 1988. Stage of oocyte development in the pipefish, *Syn-gnathus scovelli*. *Journal of Morphology*, 197(3): 353-369.
- Durham BW, Wilde GR. 2008. Asynchronous and synchronous spawning by smalleye shiner *Notropis buccula* from the Brazos River, Texas. *Ecology of Freshwater Fish*, 17(4): 528-541.
- Forberg KG. 1982. A histological study of development of oocytes in capelin, *Mallotus villosus* (Muller). *Journal of Fish Biology*, 20(2):143-154.
- Ganias K, Somarakis S, Machias A, Theodorou A. 2004. Pattern of oocyte development and batch fecundity in the Mediterranean sar-dine. *Fisheries Research*, 67(1): 13-23.
- Genten F, Terwinghe E, Danguy, A. 2009. *Atlas of Fish Histology*. Science Publishers. Enfield, NH, United States of America. 215 p.
- Honji RM, Vaz-dos-Santos AM, Rossi-Wongtschowski CLDB. 2006. Identification of the stages of ovarian maturation of the Argentine hake *Merluccius hubbsi* Marini, 1933 (Teleostei: Merlucciidae): advantages and disadvantages of the use of the macroscopic and microscopic scales. *Neotropical Ichthyology*, 4(3): 329-337.
- Iqbal KM, Ohtomi J, Suzuki H. 2007. Reproductive biology of the Japanese silver-biddy, *Gerres equulus*, in western Kyushu, Japan. *Fisheries Research*, 83(2-3): 145-150.
- Krueger WH, Oliveira K. 1997. Sex, size, and go-nad morphology of Silver American eels *Anguilla rostrata*. *Copeia*, 1997(2): 415-420.
- Marques DKS, Rosa IL, Gurgel HCB. 2000. Descrição histológica de gônadas de traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch) (Osteichthyes, Erythrinidae) da barragem do rio Gramame, Alhandra, Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 17(3): 573-582.
- McMillan DB. 2007. *Fish Histology: Female Reproductive Systems*. Springer Netherlands. Netherlands 598 p.
- Murua H & Rey FS. 2003. Female reproductive strategies of marine fish species of the North Atlantic. *Journal of the Northwest Atlantic Fishery Science*, 33 :23-31.
- Nagahama Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM. (eds.). *Fish Physiology*. Vol. IX Reproduction, Part A (Endocrine Tissues and Hormones). Academic Press. New York. pp. 223-275.
- Nejedli S, Petrinec Z, Ku Ir S, Srebocan E. 2004. Annual oscillation of ovarian morphology in European pilchard (*Sardina pilchardus* Walbaum) in the North-ern Adriatic Sea. *Veterinarski Arhiv*, 74(2): 97-106.
- Ravaglia MA, Maggese MC. 2002. Oogenesis in the swamp eel *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795) (Teleostei; Synbranchidae). Ovarian anatomy, stages of oocyte

- deve-lopment and mrocopyle structure. *Biocell*, 26(3): 325-337.
- Santos RN, Andrade CC, Santos AF, Santos LN, Araujo FG. 2005. Histological analy-sis of ovarian development of the characi-form *Oligosarcus hepsetus* (Cuvier, 1829) in a Brazilian Reservoir. *Brazilian Journal of Biology*, 65(1): 169-177.
- Santos JE, Padilha GEV, Junior OB, Santos GB, Rizzo E, Bazzoli N. 2006. Ovarian follicle growth in the catfish *Iheringichthys labro-sus* (Siluriformes: Pimelodidae). *Tissue and Cell* 38(5): 303–310.
- Selman K, Wallace RA. 1989. Cellular aspects of oocyte growth in Teleosts. *Zoological Science*, 6: 211-231.
- Shi B, Liu X, Xu Y, Wang S. 2015. Molecular characterization of three gonadotropin sub-units and their expression patterns du-ring ovarian maturation in *Cynoglossus semilaevis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2): 2767-2793.
- Simon KD, Bakar Y, Mazlan AG, Zaidi CC, Samat A, Arshad A, Temple SE, Brown-Peterson NJ. 2012. Aspects of the reproductive biology of two archer fishes *Toxotes chatareus*, (Hamilton 1822) and *Toxotes jaculatrix* (Pallas 1767). *Envi-ronmental Biology of Fishes*, 93(4):491-503.
- Ucuncu SI, Ozlem C. 2009. Atresia and apop-tosis in preovulatory follicles in the ovary of *Da-nio rerio* (Zebrafish). *Turkish Jour-nal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 9(2): 215-221.
- Ünver B, Saraydin SU. 2004. Histological examination of ovarium development of shemaya *Chalcalburnus chalcooides* living in Lake Tödürge (Sivas/Turkey). *Folia Zoologica*, 53(1): 99-106.
- West G. 1990. Methods of assessing ovarian development in Fishes: a Review. *Aus-tralian Journal of Marine and Fresh-water Research*, 41(2):199-222.
- Yön NDK, Aytekin Y, Yüce R. 2008. Ovary maturation stages and histological investi-gation of ovary of the zebrafish (*Danio rerio*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(3): 513-522.
- Zahid A. 2011. Variasi makanan ikan Seriding, *Ambassis nalua* (Hammilton, 1822) di ekosistem estuari Segara Menyan, Jawa Barat. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 11(2): 159–168.