

Analisis Pangan

- Umar Santoso
- Widiastuti Setyaningsih
- Andriati Ningrum
- Aulia Ardhi
- Sudarmanto



Gadjah Mada University Press



DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Pentingnya Analisis Kimia.....	1
B. Kecenderungan dan Tuntutan	2
1. Konsumen	2
2. Industri Pangan	3
C. Tipe Sampel.....	3
D. Langkah-Langkah dalam Analisis.....	3
1. Pemilihan dan Preparasi Sampel.....	3
2. Karakteristik Metode.....	4
E. Evaluasi Data	4
F. Pengukuran Kecenderungan Pusat.....	5
1. Reliabilitas Analisis.....	5
2. Akurasi dan Presisi.....	6
3. Kesalahan (<i>Error</i>)	9
G. Penolakan Data.....	9
H. Analisis Regresi.....	10
Regresi Linier	11

BAB II	VALIDASI METODE	15
	A. Spesifisitas	17
	B. Linieritas dan Rentang Kerja	19
	C. Batas Deteksi	22
	D. Batas Kuantifikasi	24
	E. Presisi	25
	F. Akurasi	29
BAB III	LANGKAH-LANGKAH ANALISIS PANGAN	33
	A. Penentuan Masalah	33
	B. Pengambilan Sampel	34
	C. Preparasi Sampel	36
	1. Penggilingan	36
	2. Inaktivasi Enzim	36
	3. Pencegahan Oksidasi Lipid	37
	4. Pengawetan Sampel	37
BAB IV	ANALISIS PROKSIMAT	39
	A. Penentuan Kadar Air	39
	1. Metode Pengeringan	40
	2. Metode Distilasi	42
	3. Metode Kimiawi (<i>Titration Karl Fischer</i>)	44
	4. Metode Fisik	45
	B. PENENTUAN KADAR ABU DAN GARAM NaCl	48
	1. Analisis Kadar Abu	48
	2. Analisis Kadar Garam NaCl	49
	C. Analisis Protein	50
	1. Analisis Kualitatif	54
	2. Analisis Kuantitatif	54
	D. Analisis Lipida	61
	1. Metode Soxhlet	61
	2. Metode Mojonnier	63
	3. Metode Folch	64
	4. Metode Babcock	64
	5. Metode Goldfish	65
	E. Analisis Karbohidrat	66
	1. Uji Kualitatif	67

	2. Uji Kuantitatif	70
BAB V	KARAKTERISASI LIPIDA	77
	A. Jenis-Jenis Reaksi pada Lemak dan Minyak.....	78
	1. Reaksi Hidrolisis.....	78
	2. Reaksi Esterifikasi	79
	3. Reaksi Alkoholisis	80
	4. Reaksi Hidrogenasi	80
	5. Reaksi Oksidasi.....	81
	6. Reaksi Polimerisasi	81
	B. Pengujian Sifat Fisik Lemak dan Minyak	81
	1. Penentuan Titik Leleh	82
	2. Penentuan Berat Jenis	83
	3. Kekeruhan	84
	4. Indeks Bias.....	85
	5. Viskositas	85
	6. Warna	86
	7. Titik Asap, Titik Nyala, dan Titik Api.....	87
	C. Pengujian Sifat Kimia Lemak dan Minyak	87
	1. Uji Ketengikan (<i>Kreist</i>).....	87
	2. Penetapan Bilangan TBA (Thiobarbituric Acid).....	88
	3. Angka Peroksida	89
	4. Nilai Anisidin dan Nilai Totoks.....	90
	5. Bilangan Asam (<i>Acid Value</i>)	90
	6. Angka Iodin.....	92
	7. Angka Penyabunan	93
	8. Analisis Rancimat	94
	9. Angka Kirschner Baru (<i>New Kirschner Value, NKV</i>).....	94
BAB VI	KARAKTERISASI PROTEIN	95
	A. Elektroforesis	95
	B. SDs-Page (<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)	96
	1. SDS (<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>)	96
	2. Poliakrilamida (<i>Polyacrilamyde</i>) Gel	97

BAB VII VITAMIN	105
A. Vitamin Larut Lemak	106
1. Vitamin A (Retinol).....	107
2. Vitamin D.....	115
3. Vitamin E	116
4. Vitamin K	117
B. Vitamin Larut Air	118
1. Vitamin B1 (Tiamin).....	118
2. Vitamin B ₂ (Riboflavin)	120
3. Vitamin B ₅ (Asam Pantotenat).....	121
4. Vitamin B ₆ (Piridoksin)	122
5. Vitamin B ₁₂ (Sianokobalamin).....	124
6. Vitamin C (Asam Askorbat).....	125
 BAB VIII SPEKTROFOTOMETRI	 129
A. Pendahuluan	129
B. Cahaya.....	129
C. Tingkatan Energi Materi/Zat	134
1. Sifat Alamiah Kuantum Materi.....	134
2. Tingkatan Energi Elektronik, Vibrasional, dan Rotasional.....	135
3. Tingkatan Energi Inti dalam Bidang Magnetik Terapan.....	137
D. Tingkat Energi Transisi dalam Spektrofotometri	137
1. Absorpsi atau Radiasi.....	137
2. Emisi Radiasi	140
E. Spektrofotometri Ultraviolet, Sinar Tampak, dan Fluoresen	141
1. Spektrofotometri Absorpsi Sinar Ultraviolet dan Sinar Tampak	142
2. Deviasi Hukum Beer.....	146
3. Pertimbangan Prosedur	147
4. Kurva Kalibrasi	149
5. Instrumentasi.....	150
6. Karakteristik Zat/Senyawa yang Menyerap Spektral UV-Vis	156
7. Aplikasi Spektrofotometer UV-Vis.....	158

8. Contoh Analisis dengan Metode Spektrofotometri	158
F. Spektrofotometri Fluoresen.....	161
G. Spektrofotometri Inframerah (IR).....	163
1. Prinsip-Prinsip Spektrofotometri Inframerah (IR)..	164
2. Spektrofotometri <i>Mid-IR</i>	166
3. Spektrofotometri Inframerah Dekat (<i>Near-Infrared</i>).....	174
 BAB IX APLIKASI SPEKTROSKOPI UNTUK ANALISIS	
MINERAL.....	185
Prinsip-Prinsip Umum.....	186
Transisi Energi dalam Atom.....	187
Atomisasi.....	188
A. Spektrofotometri Serapan Atomik.....	189
1. Prinsip-Prinsip Spektrofotometri Absorpsi <i>Flame Atomic</i>	190
2. Prinsip Spektrofotometri Serapan Atom Elektrotermal (<i>Graphite Furnace AAS</i>).....	192
3. Instrumentasi untuk Spektrofotometri Absorpsi Atomik.....	192
4. Prosedur Umum untuk Analisis Absorpsi Atomik..	196
5. Pengoperasian Instrumen <i>Flame Atomic Absorption</i>	196
6. Kalibrasi.....	197
7. Interferensi pada Spektrofotometri Serapan Atom..	197
B. Spektrofotometri Emisi Atomik.....	199
1. Prinsip-Prinsip Spektrofotometri Emisi Nyala Api.	201
2. Prinsip-Prinsip Spektrofotometri <i>Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission</i>	201
3. Instrumentasi untuk Spektrofotometri Emisi Nyala Api.....	201
4. Instrumentasi untuk <i>ICP-AES</i>	202
5. Masuknya Sampel ke Plasma dan Eksitasi Sampel	204
6. Tampilan Radial dan Aksial.....	204
7. Detektor dan Sistem Optikal.....	205
8. Perbandingan antara <i>AAS</i> dan <i>ICP-AES</i>	206
C. Spektrofotometri <i>ICP-MS</i>	209

BAB X	KROMATOGRAFI	215
A.	Kromatografi Gas	217
1.	Preparasi Sampel untuk Analisis Kromatografi Gas	218
2.	Isolasi Zat Terlarut dari Bahan Makanan	218
3.	Ekstraksi dengan Pelarut.....	221
4.	Ekstraksi Fase Padat.....	221
B.	Kromatografi Cair	225
1.	Kromatografi Kertas.....	225
2.	Kromatografi Lapis Tipis	226
3.	Kromatografi Kolom Cair	228
C.	Kromatografi Adsorpsi Cair-Padat	228
D.	Kromatografi Partisi Cair-Cair	230
1.	Bahan dan Lapisan Pendukung	230
2.	Bahan Pengikat Pendukung (<i>Bonded Supports</i>)	231
E.	Kromatografi Penukar Ion.....	231
F.	Kromatografi Eksklusi Ukuran (<i>Size-Exclusion Chromatography</i>)	233
G.	Kromatografi Afinitas.....	235
H.	Perangkat dan Kolom Kromatografi Gas	237
1.	Sistem Suplai Gas	238
2.	<i>Port</i> Injeksi.....	238
3.	Oven.....	239
4.	Kolom dan Fase Tetap.....	240
5.	Detektor.....	242
I.	Aplikasi GC.....	244
1.	Penentuan Ester Asam Lemak dengan Kromatografi Gas	244
2.	Senyawa Residu Volatil pada Bahan Pengemas.....	245
3.	Analisis Etilen Oksida pada Bumbu	246
4.	Analisis Senyawa Aroma pada Mentega (<i>Butter</i>) ...	247
J.	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	249
1.	Komponen HPLC.....	250
3.	Ringkasan.....	265

BAB XI BAHAN TAMBAHAN PANGAN DAN BAHAN KIMIA YANG TIDAK DIIZINKAN.....	267
A. Pewarna Sintetis	268
1. Analisis Zat Warna Sintetis.....	268
2. Analisis Rhodamin B	268
B. Pemanis Buatan.....	270
1. Analisis Pemanis Buatan.....	270
2. Analisis Siklamat	271
C. Bahan Pengawet Kimia	271
D. Analisis Pengawet	271
1. Natrium Benzoat	271
2. Formalin.....	273
3. Metode Reaksi Kromatofat	274
4. Metode Reaksi Cermin Perak	274
5. Metode Nash	274
E. Penguat Rasa	274
F. Antikempal.....	275
1. Silika dengan Metode Gravimetri	276
2. Aluminium secara Kolorimetri	276
DAFTAR PUSTAKA.....	278
GLOSARIUM.....	283
INDEKS	288
TENTANG PENULIS.....	291

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1	Contoh penentuan standar deviasi.....	8
Tabel 1.2	Nilai Q untuk penolakan data (Q-tabel)	10
Tabel 2.1	Parameter validasi metode menurut USP.....	16
Tabel 2.2	Parameter validasi metode menurut ICH	16
Tabel 2.3	Data hasil pengukuran asam ferulat pada seri larutan standar	21
Tabel 2.4	Parameter regresi kurva kalibrasi untuk penentuan asam ferulat.....	21
Tabel 2.5	Hasil pengujian suatu analit dengan beberapa instrumen dengan resolusi yang berbeda.....	26
Tabel 2.6	Hasil pengujian kadar asam ferulat pada 4 jenis sampel (ppm)	27
Tabel 2.7	Pengujian $Q_{\text{-Dixon}}$ terhadap data ulangan analisis	28
Tabel 2.8	Pengujian $F_{\text{max-Hartley}}$ terhadap data ulangan analisis	28
Tabel 2.9	Batas penerimaan untuk parameter presisi	29
Tabel 2.10	Batas penerimaan untuk parameter akurasi.....	30
Tabel 4.1	Kadar protein pada beberapa bahan pangan.....	51
Tabel 4.2	Nilai faktor konversi beberapa bahan hasil pertanian	56
Tabel 4.3	Contoh pengujian sakarida dengan metode Barfoed.....	68
Tabel 6.1	Resep untuk gel dengan konsentrasi 5% (diskontinu, nongradien).....	101

Tabel 7.1	Kehilangan vitamin (%) melalui pengolahan/pengalengan sayuran.....	105
Tabel 7.2	Kehilangan vitamin (%) melalui pengolahan/pengalengan buah	106
Tabel 7.3	<i>Relative activity</i> provitamin A dari beberapa jenis karoten and xantofil	108
Tabel 7.4	Aktivitas biologis dari beberapa jenis tokoferol.....	117
Tabel 8.1	Sifat-sifat cahaya	133
Tabel 8.2	Daerah panjang gelombang, metode spektrofotometri, dan transisi terkait	140
Tabel 8.3	Spektrum sinar tampak (<i>visible</i>), warna, dan warna kompleenter	142
Tabel 8.4	Contoh beberapa serapan maksimum panjang gelombang di atas 200 nm.....	157
Tabel 8.5	Hasil pengamatan analisis	160
Tabel 8.6	Frekuensi absorpsi berbagai gugus fungsional senyawa organik.....	169
Tabel 8.7	Absorpsi pita near-IR berbagai komponen pangan	175
Tabel 9.1	Unsur-unsur dalam pangan yang dikelompokkan menurut kepentingan nutrisi, potensi risiko beracun, dan penyertaan dalam database USDA untuk referensi standar	186
Tabel 9.2	Metode atomisasi analit.....	189
Tabel 9.3	Perkiraan batas deteksi ($\mu\text{g/l}$) unsur-unsur yang dipilih untuk berbagai instrumen ^a	208
Tabel 10.1	Karakteristik metode kromatografi.....	217
Tabel 10.2	Aplikasi HPLC dalam analisis pangan.....	260

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1	Perbandingan akurasi dan presisi: (a) Akurasi tidak bagus, presisi tidak bagus, (b) Akurasi bagus, presisi tidak bagus, (c) Akurasi tidak bagus, presisi bagus, dan (d) Akurasi bagus, presisi bagus.....	6	Gambar
Gambar 1.2	Kurva standar regresi linier.....	11	Gambar
Gambar 2.1	Perbedaan selektivitas dan spesifisitas. (a) Persentase sinyal diukur disebabkan analit (pada sumbu y) diberikan sebagai fungsi dari tingkat selektivitas. (b) Sebuah metode yang benar-benar selektif merupakan metode yang spesifik.	18	Gambar
Gambar 2.2	Resolusi (R_s) dari pemisahan puncak A dan puncak B oleh metode kromatografi (a) adalah $R_s < 1,0$ sedangkan R_s dari pemisahan puncak A dan puncak B oleh metode kromatografi (b) adalah $R_s > 1,0$	19	Gambar
Gambar 2.3	Kurva kalibrasi menggambarkan hubungan antara respons instrumen (S_{st}) dan konsentrasi analit (C_{st}) dalam larutan standar pada rentang tertentu. Kuantifikasi analit dalam matriks sampel (C_a) dilakukan dengan plot sinyal (S_a) terhadap kurva kalibrasi tersebut.	20	Gambar
Gambar 2.4	Kurva kalibrasi menggambarkan hubungan antara respons instrumen (area puncak asam ferulat pada kromatogram, mAU s) dan konsentrasi asam ferulat dalam larutan standar pada rentang 1 hingga 10 ppm..	22	Gambar

Gambar 2.5	Penentuan LOD asam ferulat berdasarkan evaluasi visual. Perbandingan spektra dan retensi antara senyawa asam ferulat standar (a) dan sinyal senyawa dengan konsentrasi minimal (b).....	23
Gambar 2.6	Penentuan LOD menggunakan rasio <i>signal-to-noise</i> 2:1.....	23
Gambar 2.7	Skema umum validasi metode.....	31
Gambar 4.1	Skema proses distilasi pada penentuan kadar air	44
Gambar 4.2	Alat ekstraksi Soxhlet.....	62
Gambar 4.3	Tabung Mojonnier	63
Gambar 4.4	Pemisahan campuran cairan dengan corong pemisah..	64
Gambar 4.5	Botol Babcock.....	65
Gambar 5.1	Struktur umum trigliserida yang merupakan ester dari gliserol dan asam lemak	77
Gambar 5.2	Reaksi hidrolisis lemak	78
Gambar 5.3	Reaksi hidrolisis lemak dengan basa.....	79
Gambar 5.4	Reaksi esterifikasi.....	79
Gambar 5.5	Reaksi alkoholisis.....	80
Gambar 5.6	Reaksi hidrogenasi	81
Gambar 5.7	Piknometer yang digunakan dalam penentuan berat jenis	83
Gambar 5.8	Viskometer untuk mengukur viskositas lemak/minyak	86
Gambar 5.9	Ilustrasi titrasi bilangan asam: (a) sebelum mencapai titik ekuivalen, (b) setelah mencapai titik ekuivalen....	91
Gambar 6.1	Foto gel elektroforesis.....	103
Gambar 7.1	Beberapa struktur kimia karotenoid sebagai prekursor vitamin A	107
Gambar 7.2	Reaksi pemecahan enzimatis dari β -karoten sebagai prekursor vitamin A (retinol).....	108
Gambar 7.3	Serapan maksimum senyawa karotenoid pada rentang panjang gelombang tampak.....	109
Gambar 7.4	Variasi serapan gelombang maksimum beberapa jenis karotenoid. Likopen (—), β -karoten (.....), dan kapsantin (----).....	109

Gambar 7.5	Contoh hasil TLC dari prekursor vitamin A (karotenoid) dari ekstrak rumput laut. Spot TLC sebelah kiri adalah β -karoten standar, spot TLC sebelah kanan adalah ekstrak rumput laut.....	110
Gambar 7.6	Kromatogram HPLC-DAD untuk karotenoid dari sampel daun pandan	111
Gambar 7.7	Struktur vitamin D ₃ (A) dan vitamin D ₂ (B).....	116
Gambar 8.1	Bidang radiasi elektromagnetik terpolarisasi yang bergerak sepanjang sumbu X. Bidang elektrik dan bidang magnetik dalam satu fase tegak lurus satu terhadap lainnya, dan tegak lurus terhadap arah geraknya	130
Gambar 8.2	(A) Muka gelombang, rentet gelombang, dan berkas sinar; (B) interferensi antara gelombang-gelombang yang identik, di mana (a) fase sama, (b) 90° keluar fase, (c) 180° keluar fase	131
Gambar 8.3	Spektra elektromagnetik.....	134
Gambar 8.4	Diagram parsial tingkatan energi molekuler menggambarkan tiga kondisi elektronik	136
Gambar 8.5	Spektrum absorpsi 0,0005 M benzena dalam larutan air.....	138
Gambar 8.6	Diagram parsial tingkat energi molekuler, yang meliputi transisi elektronik, vibrasional, dan rota	139
Gambar 8.7	Penyerapan radiasi cahaya sewaktu lewat/menembus kuvet yang berisi larutan yang dapat menyerap	143
Gambar 8.8	Faktor-faktor yang turut berkontribusi pada peredaman radiasi cahaya sewaktu menembus sel yang berisi larutan zat penyerap	145
Gambar 8.9	Kurva kalibrasi linier (a) dan non-linier (b) yang khas pada spektrofotometri absorbansi kuantitatif	149
Gambar 8.10	Skema hubungan bagian-bagian penting spektrofotometer.....	150
Gambar 8.11	Skema monokromator yang terdiri atas cermin cekung dan reflektor kisi berputar. Sinar polikromatik masuk lewat satu celah sempit dan didispersi oleh cermin	

	<i>grating</i> , kemudian difokuskan keluar lewat celah sempit lain.....	151
Gambar 8.12	(a) Skema desain detektor <i>phototube</i> ; dan (b) rangkaian katoda-dinoda-anoda pada desain detektor <i>photomultiplier</i>	153
Gambar 8.13	Skema rangkaian komponen pada spektrofotometer UV-vis <i>double beam</i>	155
Gambar 8.14	Skema sistem optik spektrofotometer <i>single beam</i> SPECTRONIC® 20 (Thermo Spectronic, Rochester, N.Y. Thermo Electron Spectroscopy).....	155
Gambar 8.15	Skema sistem optik spektrofotometer <i>single beam</i> dan <i>double beam</i>	156
Gambar 8.16	Skema yang menggambarkan rangkaian sumber cahaya, selektor panjang gelombang eksitasi dan emisi, sel sampel, detektor fotoelektrik, dan alat baca pada fluorometer atau spektrofluorometer	162
Gambar 8.17	Hubungan antara konsentrasi analit fluoresen dan intensitas atau daya (P) fluoresen larutannya	163
Gambar 8.18	Mode vibrasi molekul air. Frekuensi dari vibrasi fundamental untuk peregangan simetris, peregangan asimetris, serta gerak menggunting (<i>scissoring</i>) masing-masing adalah 3.652 cm^{-1} , 3.756 cm^{-1} , dan 1.596 cm^{-1} ..	165
Gambar 8.19	Diagram blok suatu interferometer dan komponen elektronik yang terhubung, yang secara khas digunakan pada instrumen FTIR.....	168
Gambar 8.20	Spektra minyak kedelai asli dan terhidrogenasi parsial yang diukur dengan ATR.....	170
Gambar 8.21	Spektrum NIR untuk keju, gandum, dan putih telur kering yang diplot sebagai $\log(1/R)$ vs panjang gelombang (nm)	176
Gambar 8.22	Geometri yang khas pada instrumen untuk mengukur pantulan difusi dari sampel makanan padat. Radiasi dari monokromator (I) diarahkan oleh cermin ke sampel (S). Radiasi yang terpantul secara difusi diukur langsung oleh detektor (D) yang dipasang pada satu sudut 45°	

	terhadap berkas sinar datang (a) atau dikumpulkan oleh satu bola integrasi dan difokuskan ke detektor (b). Pada kedua kasus, radiasi terpantul secara spekulat tidak diukur	178
Gambar 9.1	Spektrum natrium. Spektrum atas (a) absorpsi dan spektrum bawah (b) emisi.	188
Gambar 9.2	Penyajian skema atomisasi suatu unsur dalam nyala api atau plasma. Lingkaran besar di bagian dasar menggambarkan tetesan kecil larutan yang mengandung unsur (M) sebagai bagian dari senyawa.	189
Gambar 9.3	Diagram spektrofotometer absorpsi atomik <i>double beam</i>	190
Gambar 9.4	Skema presentasi absorpsi radiasi oleh sampel saat pengukuran absorpsi atomik. Spektrum radiasi sumber sinar (a) radiasi saat lewat sampel (b) sebagian telah diserap oleh unsur. Intensitas radiasi yg keluar dari sampel (c) telah berkurang karena absorpsi oleh sampel.	191
Gambar 9.5	Diagram sederhana spektrofotometer emisi atom.....	200
Gambar 9.6	Skema spektrofotometer <i>ICP-ES simultaneous (PMT=photo multiplier tube)</i>	202
Gambar 9.7	Plasma ICP: (a) bagaimana plasma terbentuk dan bertahan (b) distribusi temperatur plasma.....	203
Gambar 9.8	Komponen utama dan <i>layout</i> tipikal (a) pandangan radial plasma pada instrumen ICP-AES; (b) pandangan aksial plasma pada instrumen ICP-AES.....	204
Gambar 9.9	Skema sederhana dari spektrofotometer Echelle. Bagian penting alat ini menggabungkan dua pendispersi cahaya dalam satu seri. <i>Pertama</i> , prisma yang mendispersikan cahaya dengan arah-X tanpa adanya overlap; dan <i>kedua</i> , <i>grating</i> yang mendispersikan cahaya dengan arah-Y menghasilkan citra dua dimensi pada detektor	205
Gambar 9.10	Skema yang disederhanakan dari ICP-MS	210
Gambar 10.1	Klasifikasi kromatografi baik berdasarkan teknik maupun prinsip-prinsip fisikokimia dalam pemisahan	216

Gambar 10.2	Metode ekstraksi dengan menggunakan teknik SPME..	223
Gambar 10.3	Penentuan senyawa volatil dengan menggunakan SPME-GC DYNAMIC	223
Gambar 10.4	Metode teknik ekstraksi dengan menggunakan <i>solid bar sorptive extraction</i>	224
Gambar 10.5	Diagram sistem gas kromatografi.....	237
Gambar 10.6	Kromatogram asam-asam lemak.....	245
Gambar 10.7	Kromatogram senyawa residu volatil pada pengemas makanan jenis film	246
Gambar 10.8	Kromatogram hasil analisis senyawa aroma pada mentega	248
Gambar 10.9	Skema sistem <i>high-performance liquid chromatography</i>	250
Gambar 10.10	Reaksi antara silika dan organoklorosilan.....	255
Gambar 10.11	Tipe bahan pengemas yang digunakan pada HPLC. (a) <i>Bonded-phase silica</i> ; (b) <i>pellicular packing</i> ; (c) <i>microporous polymeric resin</i> ; (d) <i>macroporous polymeric resin</i>	257