

## Efektifitas Antioksidan Ekstrak Buah Kari (*Muraya koenigii*) terhadap Kadar Gula Darah Tikus Putih Diabetik

*Antioxidant Effectivity of Extract Kari Fruit (Muraya koenigii) that Induced Blood Sugar Levels of Diabetic White Rats*

Emni Purwoningsih<sup>1\*</sup> dan Zulfadly<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biokimia, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

### DATA NASKAH:

Masuk: 3 Mar 2017  
Direviu: 17 Apr 2017  
Direvisi: 15 Jun 2017  
Diterima: 25 Jun 2017

### \*KORESPONDENSI:

[emnipurwoningsih@umsu.ac.id](mailto:emnipurwoningsih@umsu.ac.id)

### DOI:

10.18196/mm.170201

### TIPE ARTIKEL:

Penelitian

**Abstrak:** Radikal bebas yang sangat reaktif dan tidak stabil di dalam tubuh dapat menyebabkan kerusakan seluler, jaringan dan mutasi gen. Buah kari (*Muraya koenigii*) memiliki konsentrasi antioksidan tertinggi sebesar 322,51 ppm dengan temperatur ekstraksi 70. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efektifitas antioksidan ekstrak buah *M. koenigii* terhadap kadar gula darah tikus putih diabetik. Penelitian ini adalah *true experimental pre and post with control group design*. Penelitian ini menggunakan tikus *wistar*, dibagi 5 kelompok masing-masing 5 ekor. Kelompok K1 (kontrol negatif) diberi aquades peroral, 1cc, K1 (kontrol positif) pemberian STZ secara ip dengan dosis 70 mg/kgBB, *single dose*, dan kelompok perlakuan (P)STZ secara ip dengan dosis 70 mg/kgBB, *single dose*, kemudian pemberian ekstrak *M. koenigii* secara oral sebanyak 1 cc pada hari ke tujuh selama 13 hari. Dosis ekstrak buah *M. koenigii* P1 (0,25 g/kgBB), P2 (0,5 g/kgBB), dan P3 (1g/kgBB). Hasil penelitian yang diperoleh adalah ada penurunan kadar gula darah pada kelompok KGD 2 dan KGD 3 jika dibandingkan dengan KGD 1. Kesimpulan penelitian ini bahwa pemberian ekstrak buah *M. koenigii* pada tikus putih jantan yang diinduksi *streptozotisin* tidak menurunkan kadar gula darah secara signifikan pada berbagai kelompok perlakuan.

**Kata kunci:** Diabetes Melitus, *Muraya Koenigii*; *Fructus*; *Streptozotisin*

**Abstract:** Free radicals are highly reactive and unstable in the body can cause cellular damage, tissue and gene mutations. Curry fruit (*Muraya koenigii*) has the highest antioxidant concentration of 322,51 ppm with extraction temperature 70. This research aims to test the effectiveness of antioxidant *M. koenigii* extract to blood sugar level of diabetic white rat. This research is *true experimental pre and post with control group design*. This study uses *wistar* rat, divided into 5 groups of 5 each. The K1 group (negative control) was given aquades peroral, 1cc, K1 (positive control) administration of STZ with ip dose 70 mg/kgBB, *single dose*, and STZ treatment group (P) ip with dose 70 mg / kgBB, *single dose*, Then administering *M. koenigii* extract as much as 1 cc on the seventh day for 13 days. Dose of *M. koenigii* extract fruit P1 (0,25 g/kgBB), P2 (0,5 g / kgBB), and P3 (1g/kgBB). The results of the study showed that there was a decrease in blood glucose levels in the KGD 2 and KGD 3 groups when compared to KGD 1. The conclusion of this study was that the administration of *M. koenigii* extract in *streptozotisin*-induced white male rats did not significantly decrease blood sugar levels in various treatment groups.

**Key words:** Diabetes Mellitus; *Muraya Koenigii*; *Fructus*; *Streptozotocin*

## PENDAHULUAN

Berdasarkan data dari *World Health Organization* (WHO), angka kematian di dunia yang disebabkan penyakit diabetes sebanyak 1,5 juta kematian pada tahun 2012. Lebih dari 80% kematian terjadi di negara-negara berpenghasilan rendah dan menengah.<sup>1</sup> Menurut Menteri Kesehatan RI, angka kematian akibat penyakit diabetes di Indonesia menempati urutan terbesar ketiga setelah stroke dan hipertensi.<sup>2</sup>

Hasil Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) tahun 2013 menunjukkan prevalensi diabetes yang terdiagnosis dokter di Indonesia sebesar 1,5%. Prevalensi diabetes yang terdiagnosis tertinggi terdapat di DI Yogyakarta (2,6%), DKI Jakarta (2,5%), Sulawesi Utara (2,4%), Kalimantan Timur (2,3%) dan Sumatera Utara (1,8%). Prevalensi diabetes yang terdiagnosis dokter atau gejala tertinggi terdapat di Sulawesi Tengah (3,7%), Sulawesi Utara (3,6%), Sulawesi Selatan (3,4%), Nusa Tenggara Timur (3,3%) dan Sumatera Utara (2,3%).<sup>3</sup>

Biasanya penderita diabetes diobati dengan cara pengobatan menggunakan obat-obatan. Berbagai jenis obat tersedia saat ini, termasuk insulin eksogen, insulin secretagogues (sulfonylurea dan meglitinides), inhibitor produksi glukosa di hati (biguanide), inhibitor absorpsi glukosa ( $\alpha$ -glucosidase inhibitor), analog amylin dan GLP-1, sensitizer kerja insulin (thiazolidinedione) dan DPP-4 inhibitor.<sup>4</sup>

Indonesia merupakan salah satu negara yang kaya akan tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat herbal. Salah satu di antara tanaman tersebut adalah pohon Kari (*Murraya koenigii*). Masyarakat memanfaatkan daun *M. koenigii* sebagai bumbu masak. Daun *M. koenigii* bisa digunakan sebagai antioksidan dalam diet tinggi lemak karena mereka mengandung antioksidan, tokoferol, beta karoten dan leutin.<sup>5, 6, 7, 8, 9</sup> Buah *M. koenigii* sampai saat ini belum banyak dimanfaatkan. Berdasarkan penelitian Tembhrne dan Sakarkhar (2009),<sup>8</sup> bahwa jus buah *M. koenigii* dapat digunakan untuk mengatasi penyakit diabetes.<sup>10</sup> Sejauh ini belum ditemukan penelitian ekstrak buah *M. koenigii* sebagai antidiabetes. Oleh sebab itu, perlu dilakukan penelitian tentang pemanfaatan ekstrak buah *M. koenigii* untuk mengatasi penyakit diabetes.

Pada penelitian sebelumnya, pemberian ekstrak daun *M. koenigii* telah terbukti dalam menurunkan kadar gula darah puasa tikus. Pemberian ekstrak daun *M. koenigii* sebanyak 200 mg/kgBB dosis tunggal selama 30 hari menurunkan kadar gula darah puasa tikus.<sup>10</sup> Pemberian ekstrak daun *M. koenigii* sebanyak 300 mg/kgBB selama 30 hari

menurunkan kadar gula darah puasa tikus.<sup>11</sup> Pemberian ekstrak daun *M. koenigii* sebanyak 100 mg/kgBB, 150 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB selama satu minggu dapat menurunkan kadar gula darah puasa tikus.<sup>12</sup> Pemberian ekstrak daun *M. koenigii* sebanyak 50 mg/kgBB dan 100 mg/kgBB perminggu selama 30 hari dapat menurunkan kadar gula darah puasa tikus.<sup>13</sup> Pemberian ekstrak daun *M. koenigii* sebanyak 200 mg/kgBB perhari selama 42 hari dapat menurunkan kadar gula darah puasa tikus.<sup>14</sup> Pemberian ekstrak daun *M. koenigii* sebanyak 300 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB selama 13 hari dapat menurunkan kadar gula darah puasa tikus.<sup>15</sup> Berdasarkan penelitian-penelitian terhadap ekstrak daun *M. koenigii* tersebut, peneliti ingin melakukan penelitian dengan menggunakan ekstrak buah *M. koenigii* dengan dosis 0,25 g/kgBB, 0,5 g/kgBB dan 1 g/kgBB.

Penelitian ini bertujuan untuk menjelaskan efektivitas ekstrak buah Kari (*Murraya koenigii* L) untuk menurunkan kadar gula darah tikus jantan yang diinduksi streptozotisin. Tujuan tersebut dapat dikembangkan ke dalam dua tujuan khusus yaitu untuk mengetahui efek pemberian ekstrak buah *M. koenigii* pada kadar 0,25 g/kgBB, 0,5 g/kgBB dan 1 g/kgBB terhadap penurunan kadar gula darah tikus putih jantan yang diinduksi streptozotisin (STZ) serta untuk mengetahui derajat penurunan kadar gula darah pada tikus putih jantan dari setiap kelompok perlakuan setelah pemberian ekstrak buah *M. koenigii* berbagai dosis.

## BAHAN DAN CARA

Jenis penelitian ini adalah eksperimental pada hewan coba tikus jantan (*Rattus norvegicus* L.) galur wistar, berjumlah 25 ekor, dan metode penelitian adalah kadar gula darah (KGD) 1 dan *Posttest with Control Group Design*, yang telah memperoleh ijin penelitian dari komisi etik penelitian hewan FMIPA USU No. 215/KEPH-FMIPA/2015.

Kriteria inklusi sampel yaitu: Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L.), dewasa (> 3 bulan), dengan berat badan 175g – 200 g, dan selama observasi 7 hari sebelum perlakuan tidak sakit, aktivitas dan tingkah laku normal.

Penelitian menggunakan 5 (lima) kelompok dengan 5 (lima) kali ulangan dengan pembagian kelompok:

K1 : kontrol negatif (Aquadest)

K2 : kontrol positif (induksi STZ 70 mg/kgBB, intraperitoneal, *single dose*)

P1 : Perlakuan 1 (induksi STZ 70 mg/kgBB, intraperitoneal, *single dose* + ekstrak buah *M. koenigii* 0,25 g/kg/hari peroral)

P2 : Perlakuan 2 (induksi STZ 70 mg/kgBB, intra-peritoneal, *single dose* + ekstrak buah *M. koenigii* 0,5 g/kg/hari peroral)

P3 : Perlakuan 3 (induksi STZ 70 mg/kgBB, intra-peritoneal, *single dose* + ekstrak buah *M. koenigii* 1 g/kg/hari peroral).

Pemberian ekstrak buah *M. koenigii* diberikan pada hari ke-7 setelah pemberian STZ, pemberian ekstrak buah dilakukan selama 13 hari.

Pemeriksaan KGD dilakukan dengan mengambil darah ekor, pemeriksaan dilakukan tiga kali yaitu: pemeriksaan pertama sebelum pemberian STZ (KGD 1), pemeriksaan kedua (KGD 2) dilakukan pada hari ke-6 setelah pemberian STZ, sedangkan pemeriksaan KGD 3 dilakukan pada hari ke-14 setelah pemberian ekstrak buah *M. koenigii*. Pemeriksaan KGD dilakukan dengan menggunakan strip tes *Accu check active*.

Penelitian dilakukan di Unit Pengelolaan Hewan Laboratorium (UPHL) Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara. Data yang didapat dari pengolahan data kemudian dianalisis dengan uji normalitas, untuk menentukan data berdistribusi normal atau tidak. Selanjutnya dilakukan uji tanda beda menggunakan uji ANOVA.<sup>16</sup>

## HASIL

Hasil pemeriksaan didapatkan perbedaan nilai rerata kadar gula darah. Pada kelompok kontrol negatif, rerata KGD 1 dengan KGD 2 mengalami peningkatan sebesar 1.80 mg/dl, kemudian antara KGD 2 dan KGD 3 mengalami peningkatan sebesar 17.20 mg/dl. Pada kelompok kontrol positif, rerata KGD antara KGD 1 dengan KGD 2 mengalami peningkatan sebesar 161.20 mg/dl, kemudian antara KGD 2 dan KGD 3 mengalami peningkatan sebesar 16.20 mg/dl. Pada kelompok perlakuan satu, rerata KGD antara KGD 1 dengan KGD 2 1 mengalami peningkatan sebesar 272.60 mg/dl, kemudian antara KGD 2 1 dan KGD 2 2 mengalami penurunan sebesar 24.80 mg/dl. Pada kelompok perlakuan dua, rerata KGD antara KGD 1 dengan KGD 2 1 mengalami peningkatan sebesar 189 mg/dl, kemudian antara KGD 2 1 dan KGD 2 2 mengalami peningkatan sebesar 26.40 mg/dl. Pada kelompok perlakuan tiga, rerata KGD antara KGD 1 dengan KGD 2 1 mengalami peningkatan sebesar 239.80 mg/dl, kemudian antara KGD 2 1 dan KGD 2 2 mengalami peningkatan sebesar 87.20 mg/dl.

**Kontrol Negatif.** Hasil pemeriksaan diperoleh nilai rerata KGD yang paling tinggi sebesar 120.80 mg/dl pada pemeriksaan KGD 2 2 dan yang terendah sebesar 101.80 mg/dl, pada pemeriksaan KGD 1.

Pada seluruh pemeriksaan didapati nilai  $p > 0.05$  (tidak berbeda nyata).

Pada pemeriksaan (1) KGD 1 dibandingkan dengan (2) pemeriksaan KGD 2 1 tidak didapati peningkatan yang signifikan dengan nilai  $p > 0.05$  (tidak berbeda nyata), kemudian pemeriksaan (2) KGD 2 1 dibandingkan dengan pemeriksaan (3) KGD 2 2 tidak menunjukkan peningkatan yang signifikan dengan nilai  $p > 0.05$  (tidak berbeda nyata).

**Kontrol Negatif.** Hasil pemeriksaan diperoleh nilai rerata KGD yang paling tinggi sebesar 298.80 pada pemeriksaan KGD 2 2 dan yang terendah sebesar 121.40 pada pemeriksaan KGD 1. Pada seluruh pemeriksaan didapati nilai  $p < 0.05$  (berbeda nyata). Pada pemeriksaan (1) KGD 1 dibandingkan dengan (2) pemeriksaan KGD 2 1 didapati peningkatan yang signifikan dengan nilai  $p < 0.05$  (berbeda nyata), kemudian pemeriksaan (2) KGD 2 1 dibandingkan dengan pemeriksaan (3) KGD 2 2 tidak menunjukkan peningkatan yang signifikan dengan nilai  $p > 0.05$  (tidak berbeda nyata).

**Perlakuan Satu.** Hasil pemeriksaan diperoleh nilai rerata KGD yang paling tinggi sebesar 390 mg/dl, pada pemeriksaan KGD 2 1 dan yang terendah sebesar 117.40 mg/dl, pada pemeriksaan KGD 1. Pada seluruh pemeriksaan didapati nilai  $p < 0.05$  (berbeda nyata). Pada pemeriksaan (1) KGD 1 dibandingkan dengan (2) pemeriksaan KGD 2 1 didapati peningkatan yang signifikan dengan nilai  $p < 0.05$  (berbeda nyata), kemudian pemeriksaan (2) KGD 2 1 dibandingkan dengan pemeriksaan (3) KGD 2 2 tidak menunjukkan penurunan yang signifikan dengan nilai  $p > 0.05$  (tidak berbeda nyata).

**Perlakuan Dua.** Hasil pemeriksaan diperoleh nilai rerata KGD yang paling tinggi sebesar 336 mg/dl, pada pemeriksaan KGD 2 2 dan yang terendah sebesar 120.60 mg/dl pada pemeriksaan KGD 1. Pada seluruh pemeriksaan didapati nilai  $p < 0.05$  (berbeda nyata). Pada pemeriksaan (1) KGD 1 dibandingkan dengan (2) pemeriksaan KGD 2 1 didapati peningkatan yang signifikan dengan nilai  $p < 0.05$  (berbeda nyata), kemudian pemeriksaan (2) KGD 2 1 dibandingkan dengan pemeriksaan (3) KGD 2 2 tidak menunjukkan peningkatan yang signifikan dengan nilai  $p > 0.05$  (tidak berbeda nyata).

**Perlakuan Tiga.** Hasil pemeriksaan diperoleh nilai rerata KGD yang paling tinggi sebesar 441.60 mg/dl, pada pemeriksaan KGD 2 2 dan yang terendah sebesar 114.60 mg/dl pada pemeriksaan KGD 1. Pada seluruh pemeriksaan didapati nilai  $p < 0.05$  (berbeda nyata). Pada pemeriksaan (1) KGD 1 dibandingkan dengan (2) pemeriksaan KGD 2 1 didapati peningkatan yang signifikan dengan nilai  $p < 0.05$  (berbeda nyata), kemudian pemeriksaan (2) KGD 2 1 dibandingkan dengan pemeriksaan (3) KGD 2 2 tidak

menunjukkan peningkatan yang signifikan dengan nilai  $p > 0.05$  (tidak berbeda nyata).

## DISKUSI

Data penelitian yang diperoleh, setelah dilakukan uji statistik dan diperoleh kadar gula darah puasa tikus pada kelompok KGD 1 dengan KGD 2 dan KGD 1 dengan KGD 3 ditemukan adanya perbedaan, namun pada kelompok KGD 2 dan KGD 3 tidak ditemukan adanya perbedaan. Ini berarti bahwa KGD puasa tikus mengalami kenaikan setelah diinjeksi dengan streptozotocin dengan dosis 70 mg/kgBB. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh El-Amin et al. (2013),<sup>16</sup> bahwa pemberian streptozotocin dalam dosis 70 mg/kgBB secara *intraperitoneal* dapat meningkatkan glukosa puasa tikus lebih dari 200 mg/dL setelah lima hari penyuntikan.

Setelah 13 hari pemberian ekstrak buah *M. koenigii* dengan dosis 0.25 g/kgBB sudah ada penurunan KGD meskipun penurunan yang terjadi tidak signifikan. Pada pemberian ekstrak buah *M. koenigii* dengan dosis 0.5 g/kgBB dan 1 g/kgBB tidak dapat menurunkan KGD puasa tikus tetapi KGD puasa tikus terus meningkat dari sebelumnya.

Hal ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Thimburne dan Sakarkar (2009),<sup>8</sup> yang menyatakan bahwa pemberian jus buah *M. koenigii* dapat menurunkan KGD mencit yang diinduksi oleh aloksan, karena adanya senyawa antioksidan yang ditemukan dalam buah *M. koenigii*.<sup>9</sup> Hasil penelitian yang dilakukan oleh Waghmare et al. (2015),<sup>17</sup> menyatakan bahwa skrining antioksidan buah *M. koenigii* yang dilakukan secara analisis fitokimia dan *in vitro* menunjukkan bahwa buah *M. koenigii* mengandung antioksidan yang besar, berupa flavonoid, yang dapat digunakan sebagai penangkal radikal bebas.

Pada kelompok perlakuan satu, gula darah tikus mengalami peningkatan setelah diinjeksikan streptozotocin. Setelah 13 hari pemberian ekstrak buah *M. koenigii* 0,25 g/kg/hari peroral gula darah tikus mengalami penurunan walaupun tidak signifikan. Hal tersebut didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh El-Amin et al. (2013),<sup>16</sup> menyebutkan bahwa pemberian ekstrak dengan dosis 100 mg/kgBB tikus dapat menurunkan KGD tikus. Begitu juga dengan penelitian yang dilakukan oleh Lawal et al. (2008),<sup>11</sup> pemberian ekstrak daun *M. koenigii* sebanyak 100 mg/kgBB, 150 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB selama satu minggu dapat menurunkan KGD puasa tikus.<sup>12</sup>

## SIMPULAN

Disimpulkan bahwa pemberian ekstrak buah *M. koenigii* pada tikus putih jantan dengan dosis 0,25, 0.5 dan 1 g/kgBB yang diinduksi streptozotocin menurunkan kadar gula darah secara tidak signifikan dengan nilai  $p > 0.05$ .

## DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. *Global Health Estimates: Deaths by Cause, Age, Sex and Country, 2000-2012*. Geneva: WHO. 2014.
2. Sedyaningsih ER. *Diabetes Penyebab Kematian Terbesar Ketiga di Indonesia*. 2011. Diakses dari <http://kesehatanutama.weebly.com/>. Di akses pada 17 Januari 2012.
3. Riskestdas. *Prevalensi Diabetes Mellitus*. Badan Penilitia dan Pengembangan Kementerian Kesehatan RI. 2013. p. 87-90.
4. Lim H. *Obat-obat yang Digunakan untuk Hiperglikemua*. Dalam buku Prinsip Farmakologi-Endokrin-Infeksi. Edisi 1. Softmedia. 2014. p. 101-110.
5. Choudhory PR, Grag AN. Variation in Essential, Trace and Toxic Elemental Contents in *Murraya koenigii* a Spice and Medicinal Herb from Different Indian States. *J Food Chem*, 2007; 104 (4): 1454-1463.
6. Khanum F, Anilakumar KR, Sudarshana KR, Viswanathan KR, Santhanam K. Anticarcinogenic Effect of Curry Leaves in Dimethylhydrazine-Treated Rats. *J Plant Food Hum Nutr*, 2000; 55 (4): 347-355.
7. Ningappa MB, Dhanajaya BL, Dinesha R, Harsha R, Srinivas L. Antioksidant and Free Radical Scavenging Activities of Polyphenol-Enriched Curry Leaf (*Murraya koenigii* L.) Extract. *Food Chem*, 2008; 106 (2): 720-728.
8. Tembume SV, Sakarkhar DM. Hypoglycemia Effects of Fruits Juice of *Murraya koenigii* (L) in Alloxan Induced Diabetic Mice. *Int J Pharm Tech Res*. 2009; 1 (4): 1589-1593.
9. Arulselvan P, Subiramanian. Effect of *Murraya koenigii* Leaf Extract on Carbohydrate Metabolism Studied Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Int J Biol Chem*, 2007; 1 (1): 21-28.
10. Kesari AN, Kesari S, Singh SK, Gupta RK, Watal G. Studies on the Glycemic and Lipidemic Effect of *Murraya koenigii* in Experimental Animals. *J Ethnopharmacol*. 2007; 112 (2): 305-311.
11. Lawal HA, Atiku MK, Khelpai DG, Wannang MM. Hypoglycaemic and Hypolipidaemic Effects of the Aqueous Leaf Extract of *Murraya*

- koenigiin* Normal and Alloxan–Diabetic Rats. *Niger J Physiol Sci.* 2008; 23 (1-2): 37-40.
12. Dineshkumar B, Mitra A, Mahadevappa M. Antidiabetic and Hypolipidemic Effects of Mahanimbine (Carbazole Alkaloid) from *Murraya koenigii* (Rutaceae) Leaves. *Int J Phytomedicine*, 2012; 2 (1): 22-30.
  13. Jafri SA, Rehman KU, Qasim M, Kalsoom. Effect of *Murraya koenigii*, *Catharanthus roseus* and *Psidium guajava* Leaves Extract on Blood Glucose in Alloxan Induced Diabetic Rats. *Am J Biol Life Sci*, 2014; 2 (1): 1-5.
  14. Tembhumne SV, Sakarkar DM. Influence of *Murraya koenigii* on Experimental Model of Diabetes and Progression of Neuropathic Pain. *Res Pharm Sci*, 2010; 5 (1): 41–47.
  15. Srinivasan K, Ramarao P. Animal Models in Type 2 Diabetes Research. *Indian J Med Res*, 2007; 125 (3): 451-472.
  16. El-Amin M, Virk P, Elobeid MA, Almarhoon ZM, Hassan ZK, Omer SA, et al. 2013. Anti-Diabetic Effect of *Murraya koenigii* (L) and *Olea europea* (L) Leaf Extracts on Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Pak J Pharm Sci*, 2013; 26 (2): 359-365.
  17. Waghmare AN, Tembhumne SV, Sakarkar DM. Phytochemical Analysis and in Vitro Antioxidant Properties of *Murraya koenigii* (L.) Fruits. *Am J Phytomed Clin Ther*, 2015; 3 (5): 403-416.