



Karakteristik Enzim Invertase dari *Saccharomyces cerevisiae* pada Berbagai Kondisi

Rozalia^{1*}, Deivy Andhika Permata¹, Dini Novita Sari¹, Ayulian Sara²

¹Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Andalas, Indonesia

²Program Studi Rekayasa Pertanian, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Insititut Teknologi Bandung, Indonesia

ABSTRAK

Sukrosa merupakan disakarida umum yang banyak digunakan dalam berbagai industri, termasuk industri molase. Sukrosa dapat dihidrolisis menjadi fruktosa dan glukosa dengan bantuan enzim invertase. Gula invert sangat dibutuhkan dalam industri karena memiliki tingkat kemanisan yang lebih tinggi dibandingkan sukrosa. Enzim invertase berperan penting dalam proses pemecahan sukrosa tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi hubungan antara aktivitas enzim invertase dengan variasi konsentrasi substrat, pH, suhu, serta pengaruh penghambatan aktivitas enzim oleh CuSO_4 . Tahapan penelitian dimulai dengan penyiapan larutan enzim invertase sebesar 0,04 g/L dan larutan sukrosa. Selanjutnya dilakukan pengujian terhadap pengaruh variasi konsentrasi substrat (0,0–3 mL), pengaruh pH (rentang pH 3 hingga pH 9), pengaruh suhu (18 °C, 30 °C, dan 95 °C), serta pengaruh penghambatan oleh CuSO_4 pada konsentrasi sukrosa 50 g/L dan 200 g/L terhadap aktivitas enzim invertase. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemecahan sukrosa oleh enzim invertase memiliki pH optimum pada kisaran 3–4,5. Suhu optimum aktivitas enzim berada pada 30 °C. Peningkatan konsentrasi substrat menghasilkan peningkatan aktivitas enzim, ditandai dengan meningkatnya kadar gula pereduksi. Enzim menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi ketika jumlah substrat meningkat karena lebih banyak substrat yang dapat berikatan dengan sisi aktif enzim. Peningkatan konsentrasi CuSO_4 menunjukkan korelasi positif dengan peningkatan kadar gula sisa, yang mengindikasikan efek penghambatan terhadap aktivitas enzim.

KATA KUNCI

CuSO_4 ; enzim invertase; pH; sukrosa; suhu

PENULIS KORESPONDEN

Alamat e-mail penulis koresponden: rozalia@ae.unand.ac.id

I. Pendahuluan

Sukrosa merupakan disakarida umum yang sering digunakan dalam industri seperti molase. Molase merupakan produk sampingan yang banyak digunakan sebagai sumber mineral dan vitamin yang baik dalam proses fermentasi. Sukrosa memerlukan keberadaan enzim invertase ekstraseluler yang dapat memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa [1]. Sukrosa merupakan karbohidrat pertama yang dapat disintesis oleh organisme dengan menggunakan enzim [2]. Sukrosa merupakan disakarida yang dibentuk dari seua molekul α -D-glukosa dan molekul β -D-fruktosa yang dihubungkan dengan ikatan α -1, β -2 glikosidik [3].

Ketika ikatan α -1, β -2 glikosidik terputus oleh reaksi hidrolisis akan terbentuk campuran glukosa dan fruktosa. Sukrosa dapat dihidrolisis dengan bantuan enzim sukrase atau invertase [4]. Sukrosa juga dapat terhidrolisis relatif lebih mudah dalam kondisi lingkungan asam tanpa enzim invertase. Proses degradasi sukrosa menjadi gula invert sering terjadi karena waktu menunggu yang lama sebelum nira tebu diproses. Kerusakan ini terjadi akibat adanya mikroorganisme dan enzim-enzim dalam nira. Salah satu enzim yang terdapat pada nira dan dapat merusak sukrosa adalah invertase.

Invertase merupakan enzim pengkatalis yang dapat memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa (gula invert). Gula invert sangat banyak digunakan dalam industri makanan karena fruktosa hasil hidrolisis memiliki tingkat kemanisan yang lebih tinggi dibandingkan dengan sukrosa. Hal ini diperlukan dalam industri karena dapat meningkatkan masa simpan



produk dan jumlah pemakaian pemanis dapat dikurangi [5]. Enzim invertase dapat diisolasi dari produk yang mengandung *Saccharomyces cerevisiae* dan ditemukan di dalam sel.

Degradasi sukrosa akibat proses inversi oleh invertase perlu dilakukan penghambatan pada proses produksi gula agar menghasilkan rendemen gula meningkat. Kemampuan enzim dalam mengkatalisis reaksi kimia dipengaruhi oleh kondisi lingkungan meliputi pH, suhu, waktu inkubasi dan konsentrasi substrat serta adanya penambahan inhibitor dari garam logam CuSO_4 . Enzim invertase yang dihasilkan oleh *Saccharomyces cerevisiae* memiliki aktivitas paling tinggi pada pH 5.5 dan suhu 40°C pada waktu inkubasi 4-8 jam [6]. Nilai Michaelis-Menten dari berbagai enzim bervariasi, tapi kebanyakan enzim bernilai K_m diantara 2 mM dan 5 mM. Nilai K_m Michaelis-Menten untuk enzim bebas diperkirakan sebesar 10 hingga 54.7 mM [4]. Perlakuan terhadap beberapa faktor tersebut perlu dilakukan untuk dapat mengetahui aktivitas invertase optimum dalam mendegradasi sukrosa sehingga menghasilkan gula pereduksi yang lebih tinggi. Penelitian yang dilakukan untuk mengetahui hubungan antara aktivitas enzim terhadap pengaruh konsentrasi substrat, pH, suhu dan penghambatan aktivitas enzim menggunakan CuSO_4 .

II. Metode Penelitian

2.1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan selama praktikum yaitu labu erlenmeyer, gelas piala, gelas ukur, pipet (0.1, 1, 5 ml), tabung reaksi, *water bath*, thermometer, timbangan, spektrophotometer. Bahan yang digunakan yaitu Enzyme Invertase dari Baker's yeast, 32 units/mg, Larutan stok: 1 g/l (konsentrasi invertase yang akan digunakan pada penelitian ini 0.04 g/l), Sukrosa, larutan 50 g/l solution dan 200 g/l, Buffer potassium phosphate, Buffer asetat, DNS untuk analisis gula pereduksi, Larutan tembaga sulfat 0.1 M.

2.2. Prosedur Kerja

2.2.1 Larutan kerja

Larutan enzim invertase 0.04 g/L disediakan dengan mengencerkan larutan stok dengan buffer 0.05 M pada pH 7. Lalu dipersiapkan berbagai konsentrasi larutan sukrosa dengan air.

2.2.2. Hubungan antara aktivitas enzim dan konsentrasi enzim

Sebanyak 3 mL larutan enzim invertase 0.04 g/L disediakan dengan berbagai variasi konsentrasi (Tabel 1). Pertama 0.04 g/L invertase di sedotan ke dalam masing-masing tabung yang telah diberi tanda. Kemudian larutan buffer ditambahkan ke dalam tabung reaksi untuk mengencerkan larutan enzim awal menjadi tingkat konsentrasi yang bervariasi. Sebagai catatan bahwa tabung 1 digunakan sebagai blanko tanpa enzim, dan tabung 9 digunakan untuk mendeteksi pengaruh gula pereduksi sisa. Selain itu, tabung 10 digunakan untuk memverifikasi kemampuan DNS dalam memberhentikan hidrolisis. Dilakukan pra-inkubasi larutan pada suhu ruang selama 5 menit. Setelah itu catat waktu dimulai, dan tambahkan 3 mL larutan sukrosa 50 g/L ke dalam tiap-tiap tabung reaksi. Tambahkan 3 mL DNS ke dalam Tabung 10 sesegera mungkin setelah reaksi enzimatis dimulai. Larutan diinkubasi selama tepat 5 menit, setelah inkubasi selesai tambahkan DNS sebanyak 6 ml ke dalam masing-masing tabung (Tabel 1) untuk menghentikan reaksi. Lakukan pencampuran larutan di dalam tabung. Amati konsentrasi gula pereduksi dengan metode DNS. Panaskan tabung tersebut dalam *water bath* dengan suhu 95°C selama 10 menit. Ukur absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.



Tabel 1. Pengaruh Konsentrasi Enzim

Tabung reaksi	Larutan invertase 0.04 g/l [mL]	Larutan buffer pH 7 [mL]	Larutan sukrosa 50 g/l [mL]
1	0.0	3.0	3.0
2	0.1	2.9	3.0
3	0.5	2.5	3.0
4	1.0	2.0	3.0
5	1.5	1.5	3.0
6	2.0	1.0	3.0
7	2.5	0.5	3.0
8	3.0	0.0	3.0
9	3.0	3.0	0.0
10	3.0	0.0	3.0

2.2.3 Pengaruh Konsentrasi Substrat

Larutan sukrosa disiapkan dengan variasi konsentrasi 0.0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0 mL ke dalam masing-masing tabung yang kemudian ditambahkan aquades hingga total semua larutan masing-masing menjadi 3 mL. Selanjutnya dimasukkan larutan invertase (0.04 g/L) sebanyak 3 mL. Kemudian diukur konsentrasi sukrosa akhir untuk mengetahui laju hidrolisis enzimatis dari enzim invertase tersebut dengan metode DNS.

2.2.4 Pengaruh pH

Larutan buffer 0.1 M disiapkan dari pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9. Buffer fosfat hanya efektif untuk pH 4.5-9. Buffer asetat digunakan untuk mencapai pH dibawahnya. Setelah itu larutan invertase (0.04 g/L) disiapkan dengan mengencerkan larutan enzim stok dalam variasi buffer pH. Lakukan pemipetan 3 mL larutan enzim pada masing-masing tabung. Kemudian diukur konsentrasi sukrosa akhir untuk mengetahui laju hidrolisis enzimatis dari enzim invertase tersebut dengan metode DNS.

2.2.5 Pengaruh Suhu

Siapkan *water bath* yang telah di atur suhu dari 18 °C, 30 °C dan 95°C. Lalu disiapkan juga air dingin dengan es untuk menurunkan suhu. Larutan sukrosa dipipet 3 mL ke dalam masing-masing tabung dan dilakukan pra-inkubasi selama 5 menit sehingga suhu larutan setimbang dengan air didalam *water bath*. Kemudian diukur konsentrasi sukrosa akhir untuk mengetahui laju hidrolisis enzimatis dari enzim invertase tersebut dengan metode DNS.

2.2.6 Penghambatan Aktivitas Enzim

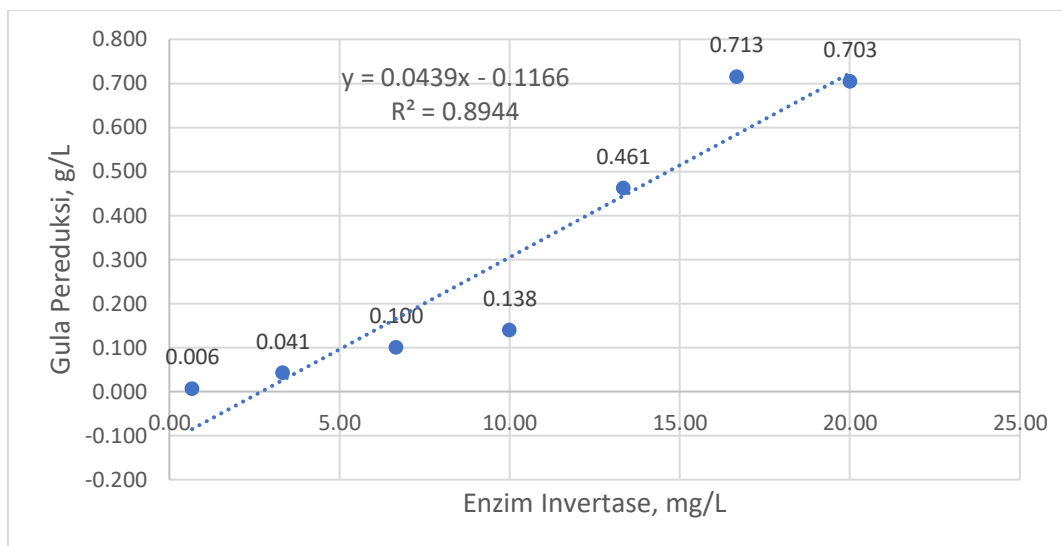
Siapkan 2 mL larutan tembaga sulfat dengan konsentrasi yang bervariasi dari 0.2 mM hingga 10 mM ke dalam tabung reaksi. Masing-masing tabung ditambahkan 1 mL larutan sukrosa 50 g/L. Dan disiapkan larutan sukrosa dengan konsentrasi yang lebih tinggi 200 g/L dengan menggunakan perlakuan yang sama dengan sebelumnya. Mulai reaksi dengan menambahkan 3 mL larutan invertase 0.04 g/L secara berurutan dan catat waktu. Reaksikan campuran tersebut selama tepat 5 menit dan tentukan laju reaksi dengan metode DNS.

III. Hasil dan Pembahasan

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu konsentrasi substrat, pH, suhu dan adanya inhibitor atau penghambat aktivitas enzim. Penelitian ini dilakukan dengan pengujian terhadap hubungan aktivitas enzim dan konsentrasi enzim, pengaruh konsentrasi substrat, pengaruh pH, pengaruh suhu, penghambatan aktivitas enzim dengan CuSO_4 .

3.1 Hubungan Aktivitas enzim dan konsentrasi enzim

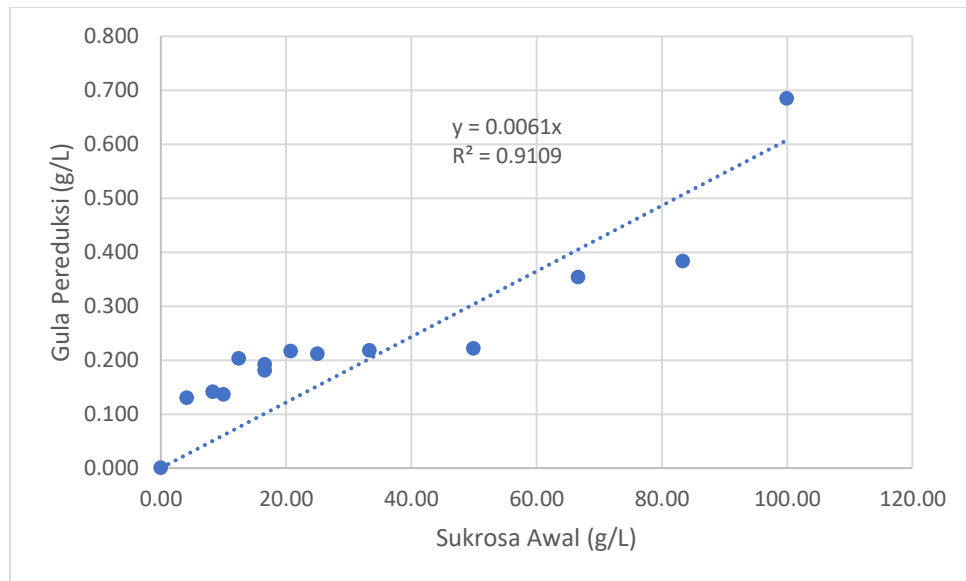
Pengujian hubungan aktivitas enzim dan konsentrasi enzim diperoleh bahwa semakin tinggi konsentrasi enzim invertase maka semakin meningkat gula pereduksi yang dihasilkan. Hal ini karena makin banyak sisi aktif enzim yang berikatan dengan substratnya (sukrosa). Peningkatan hidrolisis substrat menjadi produk berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi enzim [7]. Kecepatan reaksi tergantung dengan konsentrasi enzim yang ditambahkan dalam sampel. Substrat dapat berperan sebagai inhibitor, jika substrat berlebih akan membatasi laju reaksi katalisis enzim[8]. Konsentrasi enzim yang lebih tinggi menunjukkan lebih banyak sisi aktif yang tersedia untuk dapat berinteraksi dengan substrat, sehingga dapat meningkatkan laju reaksi.



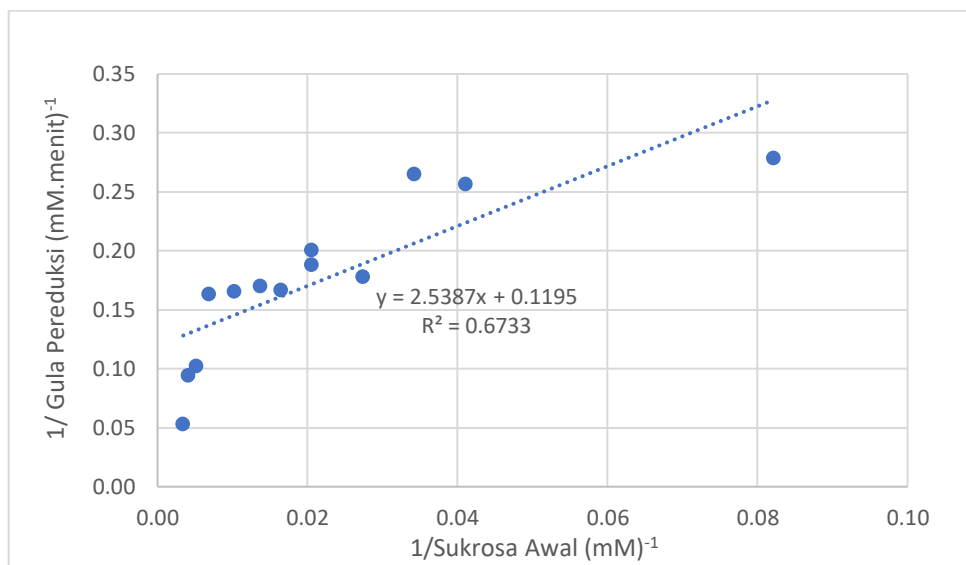
Gambar 1. Hubungan antara Enzim Invertase dan Gula Pereduksi

3.2 Hubungan Konsentrasi Substrat dgn terhadap aktivitas enzim intervase

Berdasarkan Gambar 2 hubungan antara konsentrasi substrat dan produk gula pereduksi diperoleh bahwa peningkatan konsentrasi sukrosa akan meningkatkan gula pereduksi dari produk. Peningkatan tajam terjadi pada konsentrasi suksrosa 33.33 hingga 100 g/L. Enzim akan bekerja lebih aktif dengan adanya peningkatan substrat, karena semakin banyaknya substrat maka akan berikatan dengan sisi aktif dari enzim. Menurut[9], kecepatan reaksi akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat, begitu pula sebaliknya konsentrasi substrat yang rendah akan memperlambat reaksi yang terjadi. Seperti reaksi enzim invertase dengan sukrosa [8].



Gambar 2. Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap aktivitas enzim intervasa



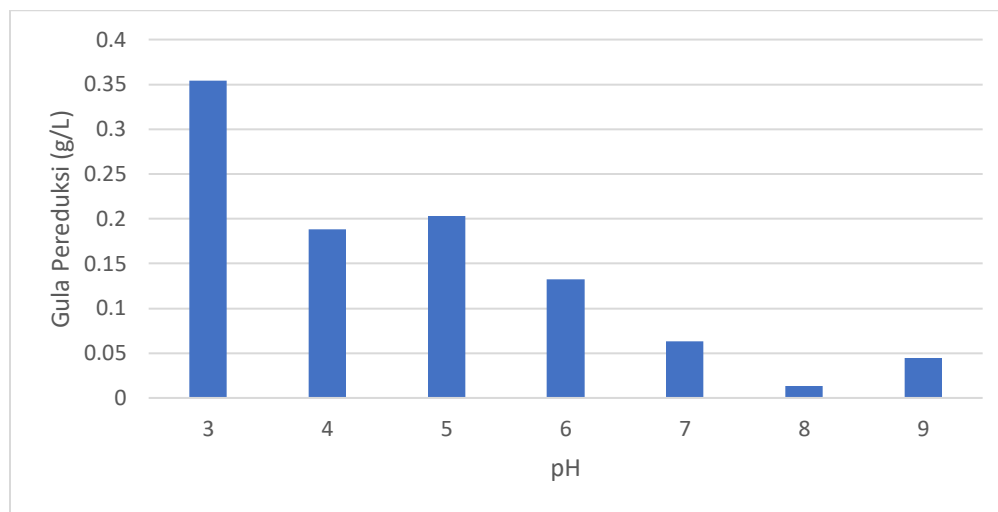
Gambar 3. Hubungan Substrat dengan Laju Reaksi

Reaksi yang dikatalis oleh enzim akan menyebabkan laju reaksi awal (V_0) meningkat dengan adanya peningkatan konsentrasi substrat awal (S_0) sampai mencapai laju maksimum (V_{max}). hubungan antara konsentrasi substrat dan kecepatan reaksi enzimatis dinyatakan sebagai K_M (ketetapan Michaelis-Menten). Nilai K_M merupakan konsentrasi substrat yang dibutuhkan oleh suatu enzim agar menghasilkan kecepatan reaksi setengah dari kecepatan maksimumnya ($V_0 = \frac{1}{2} V_{max}$). Gambar 3 menunjukkan hubungan substrat dan laju reaksi dari aktivitas enzimnya. Persamaan garis linier $y = bx + a$ dari penelitian yaitu $y = 2,5387x + 0.1195$, jika di note yang sebagai persamaan Michaelis Menten ($1/V = [(K_M /$

$V_{\max})(1/S) + 1/V_{\max})$. Sehingga Laju reaksi maksimum (V_{\max}) yang diperoleh dari pengujian yaitu sebesar 8.368 mM/menit dan nilai K_M sebesar 21.237. Hal ini sesuai dengan beberapa penelitian mengenai enzim invertase yang melaporkan bahwa K_M dari enzim invertase dari berbagai bakteri berkisar antara 10 – 54.7mM [6], [10], [11]. Konsentrasi substrat yang tinggi dapat menghambat laju konversi menjadi produk. Laju enzim akan meningkat seiring dengan meningkatkan konsentrasi enzim. Untuk mencapai setengah kelajuan maksimum dari suatu enzim, konsentrasi substrat diperlukan untuk mengetahui nilai K_M dari aktivitas enzim tersebut[9].

3.3 pH Optimum enzim intervase

Penelitian dilakukan pada pH 3 hingga 9. Berdasarkan Gambar 4 dapat dilihat bahwa pada pH 3 memberikan nilai gula pereduksi yang tinggi, dan saat pH 4 dan 5 terdapat titik pH optimum serta mengalami penurunan ketika pH mendekati basa. Perubahan pH menyebabkan perubahan muatan pada gugus residu asam amino dan sisi aktif enzim. Gugus asam amino merupakan asam atau basa lemah yang dapat terionisasi oleh pengaruh pH lingkungan. Reaksi dapat dipercepat apabila pH optimum muatan gugus samping asam amino berada pada keadaan yang sesuai. Nilai pH yang ekstrem dapat merusak protein yang merupakan komponen penyusun enzim. Pada pH terlalu asam atau basa, enzim dapat menjadi tidak aktif. Berdasarkan penelitian beberapa peneliti Invertase mempunyai pH optimum yaitu pH 4-5 [10], pH 4.5 [11], pH 6 [6] sehingga data yang diperoleh sesuai dengan literatur. Perlakuan pH dapat menurunkan laju degradasi sukrosa karena perubahan pH dapat merubah permukaan sisi aktif enzim sehingga mengganggu proses pengikatan enzim dengan substrat pada sisi aktif enzim dan pada akhirnya tidak terbentuk produk.

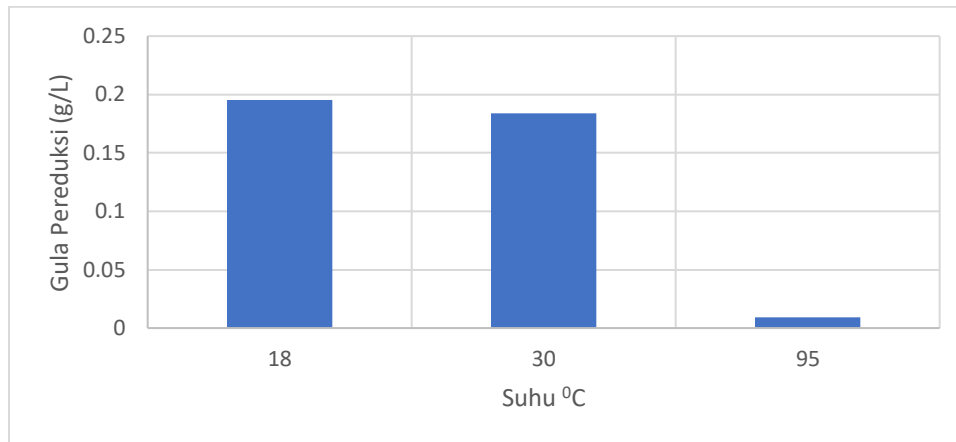


Gambar 4. pH optimum enzim invertase

3.4 Suhu optimum enzim intervase

Penelitian ini dilakukan terhadap suhu 18 °C, 30 °C, dan 90 °C. Berdasarkan data (Gambar 5) diperoleh suhu optimum yaitu pada suhu 30°C. Penelitian [6] melaporkan bahwa suhu optimum pada suhu 30-40 °C. Sehingga hasil penelitian menunjukkan kesesuaian. Pada suhu yang terlalu tinggi (95°C) aktivitas invertase meningkat hingga mencapai aktivitas maksimum. Gambar 5 menunjukkan terjadinya denaturasi karena grafik mengalami penurunan secara signifikan pada suhu yang lebih tinggi. Kenaikan suhu berpengaruh pada penurunan laju degradasi sukrosa yang dibuktikan dengan menurunnya jumlah gula pereduksi yang dihasilkan. Hal ini dapat terjadi karena rusaknya ikatan-ikatan yang

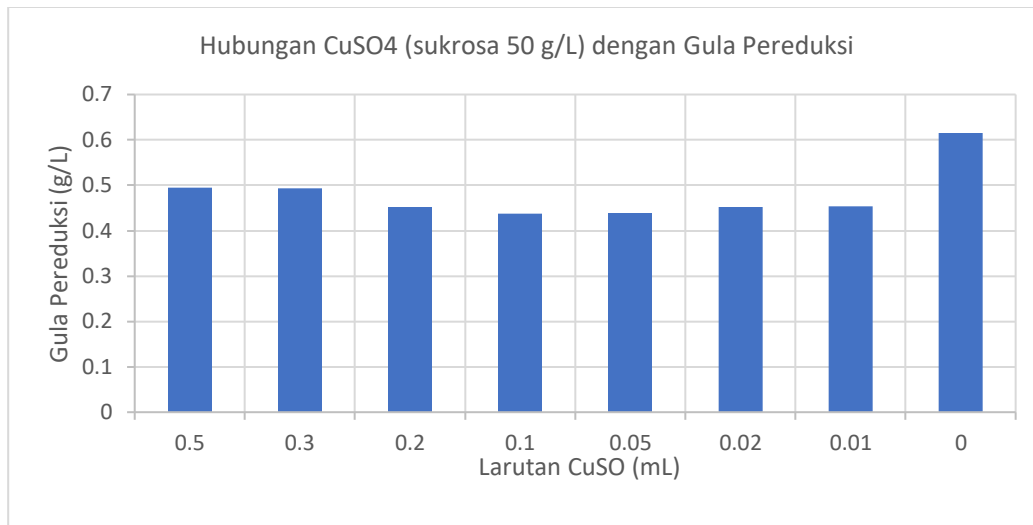
mempertahankan struktur enzim. Suhu yang tinggi pada titik enzim itu sendiri akan terjadi tidak stabil dan mulai terjadinya denaturasi. Rusaknya struktur enzim dapat menyebabkan enzim kehilangan aktivitas biologisnya yang disebut dengan denaturasi enzim oleh suhu tinggi.



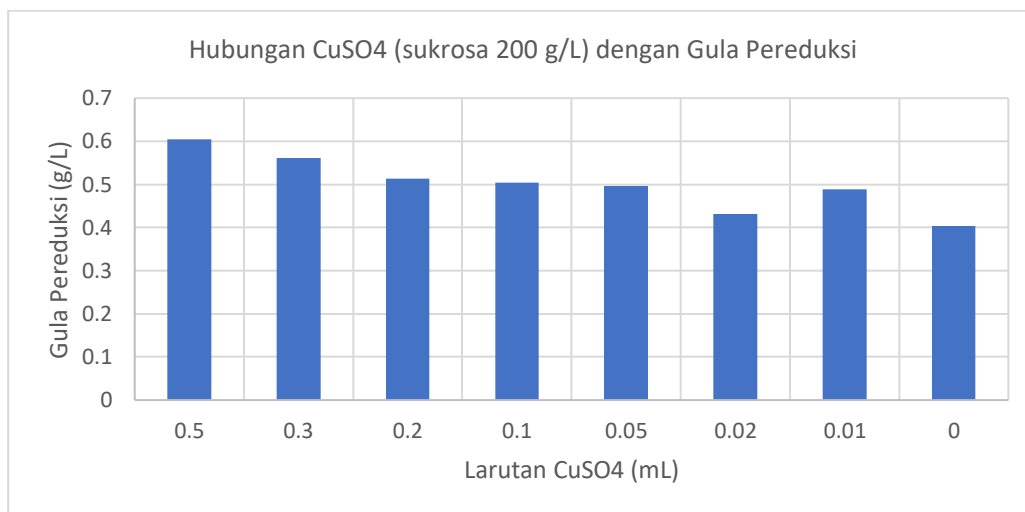
Gambar 5. Suhu optimum enzim invertase

3.5 Inhibisi Enzim Invertase Oleh CuSO_4

Pengujian yang dilakukan terhadap inhibitor CuSO_4 pada konsentrasi sukrosa 50 g/L dan 200 g/L. Adanya inhibisi invertase ditunjukkan dengan meningkatnya gula sisa yang dihasilkan dari hidrolisis sukrosa oleh invertase. Hasil uji daya inhibisi menunjukkan bahwa tidak semua konsentrasi CuSO_4 yang menunjukkan adanya penghambatan aktivitas invertase. Gula sisa meningkat dengan meningkatnya jumlah konsentrasi CuSO_4 . Hal ini menunjukkan bahwa CuSO_4 pada konsentrasi yang rendah tidak memberikan pengaruh inhibisi terhadap aktivitas invertase. Kemampuan enzim untuk mengikat substrat akan menurun dengan meningkatnya konsentrasi CuSO_4 , sehingga gula sisa yang dihasilkan akan meningkat. Penghambatan dapat terjadi pada sisi aktif enzim maupun sisi sekunder dari enzim. Inhibitor yang terikat pada sisi aktif enzim, substrat tidak dapat membentuk kompleks dengan enzim, sehingga produk tidak akan terbentuk [11]. Penelitian yang dilakukan [10] melaporkan bahwa inhibitor untuk enzim invertase yaitu Cu^{2+} . Sehingga penggunaan CuSO_4 dapat dijadikan sebagai inhibitor dari aktivitas enzim invertase. Perbedaan konsentrasi substrat 50 g/L (Gambar 6) dan 200 g/L (Gambar 7) memperlihatkan pengaruh yang nyata, di mana dengan penambahan substrat akan berpengaruh terhadap gula sisa yang dihasilkan. Konsentrasi substrat yang meningkat dan konsentrasi CuSO_4 yang meningkat dapat meningkatkan gula sisa dari produk. Karena pada konsentrasi substrat yang tinggi, laju pembentukan enzim-substrat akan rendah dan menghasilkan nilai gula sisa yang tinggi.



Gambar 6. Inhibisi enzim invertase oleh CuSO_4 pada sukrosa 50 g/L



Gambar 7. Inhibisi enzim invertase oleh CuSO_4 pada sukrosa 200 g/L

IV. Kesimpulan

Degradasi sukrosa oleh invertase dipengaruhi oleh pH, suhu, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, dan penghambatan enzim oleh CuSO_4 . Pemecahan sukrosa oleh invertase mempunyai pH optimum sekitar 3-4.5 dan suhu optimum berada pada suhu 30 °C. Semakin tinggi tingkat konsentrasi enzim, maka semakin tinggi pula gula pereduksi yang dihasilkan. Enzim akan bekerja lebih aktif dengan adanya peningkatan substrat, karena semakin banyaknya substrat maka akan berikatan dengan sisi aktif dari enzim. Gula sisa meningkat dengan meningkatnya jumlah konsentrasi CuSO_4 .



V. Referensi

- [1] R. Ledesma-Amaro and J. M. Nicaud, "Metabolic Engineering for Expanding the Substrate Range of *Yarrowia lipolytica*," *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 10, pp. 798–809, 2016, doi: 10.1016/j.tibtech.2016.04.010.
- [2] M. Songpim, P. Vaithanomsat, W. Vanichsiratana, and S. Sirisansaneeyakul, "Enhancement of inulinase and invertase production from a newly isolated *Candida guilliermondii* TISTR 5844," *Kasetsart J. - Nat. Sci.*, vol. 45, no. 4, pp. 675–685, 2011.
- [3] V. Lombard, H. Golaconda Ramulu, E. Drula, P. M. Coutinho, and B. Henrissat, "The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. D1, 2014, doi: 10.1093/nar/gkt1178.
- [4] R. Sindhu *et al.*, *Enzyme Technology in Food Processing: Recent Developments and Future Prospects*, vol. 3. Elsevier, 2020.
- [5] H. Manoochchhri, N. F. Hosseini, M. Saidijam, M. Taheri, H. Rezaee, and F. Nouri, "A review on invertase: Its potentials and applications," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 25, p. 101599, 2020, doi: 10.1016/j.bcab.2020.101599.
- [6] T. Chand Bhalla, Bansuli, N. Thakur, Savitri, and N. Thakur, "Invertase of *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612: Production, characterization and application in synthesis of fructo-oligosaccharides," *Lwt*, vol. 77, pp. 178–185, 2017, doi: 10.1016/j.lwt.2016.11.034.
- [7] M. Zelvi, A. Suryani, and D. Setyaningsih, "HIDROLISIS *Eucommia cottonii* Dengan Enzim K-Karagenase Dalam Menghasilkan Gula Reduksi Untuk Produksi Bioetanol," *J. Teknol. Ind. Pertan.*, vol. 27, no. 1, pp. 33–42, 2017, doi: 10.24961/j.tek.ind.pert.2017.27.1.33.
- [8] A. Suryani and D. Mangunwidjaja, *Rekayasa Proses*. Bogor: IPB Press, 2014.
- [9] G. Puspitasari and W. S. Atikah, "Studi Kinetika Reaksi Dari Enzim A- Amilase Pada Proses Penghilangan Kanji Kain Kapas," *Arena Tekst.*, vol. 34, no. 1, pp. 1–6, 2019, doi: 10.31266/at.v34i1.5097.
- [10] R. L. de Oliveira, M. F. da Silva, A. Converti, and T. S. Porto, "Biochemical characterization and kinetic/thermodynamic study of *Aspergillus tamaris* URM4634 β -fructofuranosidase with transfructosylating activity," *Biotechnol. Prog.*, vol. 35, no. 6, pp. 1–12, 2019, doi: 10.1002/btpr.2879.
- [11] M. L. P. Fernandes, J. A. Jorge, and L. H. S. Guimarães, "Characterization of an extracellular β -d-fructofuranosidase produced by *Aspergillus niger* during solid-state fermentation (SSF) of cassava husk," *J. Food Biochem.*, vol. 42, no. 1, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1111/jfbc.12443.