

Pengaruh Garam Monovalen (NaCl dan KCl) dan Divalen (CaCl₂ dan MgCl₂) Terhadap Aktivitas Protease Ekstraseluler Bakteri Halofilik Isolat *Bittern* Tambak Garam Madura

Siti Anisa^a, Nies Suci Mulyani^a, Mukhammad Asy'ari^{a,*}

^a Biochemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

* Corresponding author: asyari@live.undip.ac.id

Article Info	Abstract
<p>Keywords: halophilic bacteria, halostable proteases, <i>bittern</i>, monovalence and divalence salts</p>	<p>Halophilic bacteria grows and survives on the environment with high salinity value, for example is the <i>bittern</i>. Halophilic bacteria can produce enzymes which resist to salt, one of the enzyme is halostable proteases. The halostable proteases can be used to waste degradation process on the saline area. This research is to get the extracellular proteases from halophilic bacteria isolated from <i>bittern</i> at Madura salt pond and to determine the effect of monovalence salts (NaCl and KCl) and divalence salts (CaCl₂ and MgCl₂) in activity and its profile activity of proteases halostable. Based on this experiment, it is found that protease halostable has the highest activity in the first fraction (0–20%) with the specific activity about 220,83 unit/mg of protein. The present of salts such as NaCl, CaCl₂ and MgCl₂ increase the proteases activity, while KCl decreases the protease activity. The effect of salt addition to protease activity is increasing in KCl, NaCl, CaCl₂, MgCl₂ respectively.</p>
<p>Kata kunci: bakteri halofilik, protease halostabil, <i>bittern</i>, garam monovalen dan divalen</p>	<p>Abstrak</p> <p>Bakteri halofilik mampu tumbuh dan bertahan hidup pada lingkungan dengan kadar garam tinggi, seperti dalam air pekatan sisa tambak garam (<i>bittern</i>). Bakteri halofilik dapat menghasilkan enzim protease yang tahan terhadap garam (halostabil). Protease halostabil dapat dimanfaatkan pada proses degradasi limbah pada kawasan yang mengandung garam. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh protease ekstraseluler bakteri halofilik isolat <i>bittern</i> tambak garam Madura dan menentukan pengaruh garam monovalen (NaCl dan KCl) dan divalen (CaCl₂ dan MgCl₂) terhadap aktivitas dan profil aktivitas protease halostabil. Berdasarkan penelitian diperoleh protease halostabil memiliki aktivitas spesifik tertinggi pada fraksi 1 (0–20%) sebesar 220,83 Unit/mg protein. Pengaruh garam NaCl, CaCl₂ dan MgCl₂ akan cenderung meningkatkan aktivitas proteasenya sebaliknya KCl akan menurunkan aktivitas protease. Profil pengaruh penambahan garam terhadap aktivitas protease semakin meningkat sesuai dengan urutan KCl, NaCl, CaCl₂, MgCl₂.</p>

1. Pendahuluan

Bakteri halofilik merupakan jenis bakteri yang membutuhkan konsentrasi garam tinggi untuk tumbuh dan bertahan hidup [1]. Salah satu habitat bakteri halofilik adalah di dalam pekatan air garam yang biasa

disebut *bittern* [2, 3]. Bakteri ini mampu menghasilkan enzim hidrolitik yang salah satunya adalah protease. Protease berfungsi mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan peptida protein menjadi oligopeptida dan asam – asam amino [4]. Protease halostabil dapat dimanfaatkan

pada degradasi limbah pada kawasan yang mengandung garam [1].

Penelitian sebelumnya telah berhasil mengisolasi dan mengkarakterisasi protease bakteri halofilik-alkalofilik dari habitat yang mengandung kadar garam sedang di wilayah Coastal Gujarat, India. Bakteri halofilik-alkalofilik ditumbuhkan pada media *Enrichment Halophile Broth* (EHB) dengan konsentrasi NaCl 10% [3]. Norberg dan Hofsten [5] juga berhasil mengisolasi protease dari *Halobacterium Salinarum sp* hasil fermentasi saus ikan yang ditumbuhkan pada media M73 dengan menggunakan substrat azokasein.

Aktivitas protease halostabil dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah adanya garam [6, 7]. Kation dari garam akan mempertahankan kestabilan struktur protease halostabil. Penstabilan struktur protein terjadi melalui ikatan antara kation garam dengan muatan-muatan negatif pada permukaan protein [1]. Selain itu, adanya kation juga dapat memberikan efek perlindungan (*shielding effect*) protein terhadap pengaruh kondisi lingkungannya [1]. Pada konsentrasi garam NaCl (3,4 M), CaCl₂ (100 mM) dan MgCl₂ (1mM) dapat meningkatkan aktivitas protease serin ekstraseluler dari bakteri *Halogeometricum borinquense* strain TSS101 sebesar 100%, 121%, dan 62% [8]. Kation-kation lain yang diketahui dapat mempengaruhi aktivitas enzim adalah K⁺, Rb⁺, Cs⁺, Zn²⁺, Hg²⁺, Mn²⁺, Ba²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, dan Ni²⁺ [8]. Pada umumnya ion-ion ditambahkan dalam bentuk garamnya.

Berdasarkan terdahulu diketahui bahwa kestabilan enzim bakteri halofilik dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi garamnya [1, 8]. Sehingga dalam penelitian ini perlu dilakukan penentuan pengaruh jenis garam yaitu garam monovalen (NaCl dan KCl) dan divalen (CaCl₂ dan MgCl₂) terhadap aktivitas dan profil aktivitas protease ekstraseluler bakteri halofilik isolat *bittern* tambak garam Madura.

2. Metode Penelitian

Sampel stok bakteri halofilik koloni tunggal isolat *bittern* tambak garam Madura.

Pembuatan Artificial Sea Water (ASW)

Sebanyak 2,4 g NaCl; 1,1g MgCl₂.6H₂O; 0,2 g Na₂SO₄; 0,07 g KCl; 0,02 g NaHCO₃; 0,01 g KBr; 4,0 mg SrCl₂.6H₂O; 0,5 mg Na₂SiO₃.9H₂O; 0,3 mg NaF kemudian diencerkan kedalam 100 mL aquades

Pembuatan Media *Halophile Synthetic Broth* (HSB)

Sebanyak 1 g glukosa; 0,5 g tripton; 0,5 g ekstrak ragi; 0,5 g NaHPO₄; 10 g NaCl; 10 mL ASW dan diencerkan kedalam 100 mL aquades kemudian di autoklaf.

Peremajaan Isolat Bakteri Halofilik pada Media *Enrichment Halophile Broth* (EHB)

Proses peremajaan dilakukan terhadap stok bakteri halofilik isolat *bittern* tambak garam Madura. Bakteri koloni tunggal tersebut ditumbuhkan pada media

Enrichment Halophile Broth (EHB) agar diperoleh kultur bakteri pada kondisi yang aktif. Pada media ini terdapat bittern untuk pengkondisian lingkungan alamiah dari bakteri halofilik yaitu pada kadar garam tinggi. Selain itu juga diberikan bahan tambahan sebagai nutrisi seperti glukosa, tripton, ekstrak ragi, KH₂PO₄, dan NaCl 10% yang dibutuhkan untuk pertumbuhan bakteri. Penginkubasian dilakukan selama 24 jam pada 250 rpm dan 37°C. Kekeruhan pada media menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri.

Adaptasi bakteri pada media *Halophile Synthetic Broth* (HSB)

Sebanyak 10 µL stok bakteri halofilik hasil peremajaan pada media EHB ditumbuhkan ke dalam 100 mL media HSB [9]. Penginkubasian dilakukan pada 250 rpm dan temperatur 37°C selama 24 jam. Kekeruhan pada media menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri halofilik.

Uji morfologi dan pewarnaan gram

Sebanyak 2-3 tetes kultur bakteri halofilik diteteskan di atas slide mikroskop yang sudah disterilkan dengan alkohol. Slide kemudian dikeringkan dengan melewati di atas api dan mengangin-anginkannya sehingga diperoleh preparat. Sebanyak 2-3 tetes larutan kristal ungu ditambahkan ke dalam preparat dan diamkan selama 1 menit. Preparat dicuci dengan akuades dan diangin-anginkan sampai kering. Tambahkan 1 tetes reagen gram's iodine dan diamkan selama 1 menit. Setelah itu preparat dicuci dengan akuades dan dikeringkan. Larutan alkohol-aseton ditambahkan sebanyak 2 tetes. Setelah pendiaman 2-3 menit preparat dibilas dengan air kemudian ditambahkan 1 tetes safranin dan diamkan selama 30 detik. Pengamatan morfologi menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1500x [10].

Produksi, Isolasi dan Pemurnian Protease Halostabil

Sebanyak 200 µL kultur hasil peremajaan diinokulasikan ke dalam 1 L media HSB dan diinkubasi dalam shaker inkubator pada 250 rpm, 37°C selama 32 jam dan penambahan inducer kasein setelah 12 jam. Kemudian diisolasi enzim ekstraselulernya. Enzim ekstraseluler kemudian dimurnikan dengan fraksinasi amonium sulfat bertingkat dan dilanjutkan dengan dialisis.

Uji aktivitas enzim

Penentuan aktivitas protease

Untuk larutan sampel, sebanyak 2,25 mL bufer fosfat 0,05 mM pH 8 ditambahkan aquades 0,625 mL dan dicampurkan dengan 0,125 mL larutan azokasein 2%, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit dalam *shaker water bath inkubator*, kemudian ditambahkan 0,5 mL larutan enzim, dan diinkubasi kembali pada kondisi optimum yaitu 37°C selama 30 menit dalam *shaker water bath inkubator*. Setelah itu ditambahkan 1,5 mL larutan TCA 10%. Campuran dikocok dan didiamkan didalam air es. Untuk larutan blanko (t₀), sebanyak 2,25 mL Bufer fosfat 0,05 mM pH 8 ditambahkan dengan aquades 0,625 mL dicampurkan

dengan 0,125 mL larutan azokasein 2%, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dalam *shaker water bath inkubator*, setelah itu ditambahkan 1,5 mL TCA 10% dan 0,5 mL larutan enzim yang sudah dimatikan dengan cara pemanasan. Campuran dikocok dan didiamkan didalam es. Larutan blanko dan larutan sampel disentrifus pada 6000 rpm selama 30 menit. Masing-masing supernatan diukur absorbansinya pada 440 nm [11, 12].

Pengaruh garam NaCl, KCl, CaCl₂, dan MgCl₂ terhadap aktivitas protease

Penambahan larutan garam NaCl, KCl, CaCl₂, dan MgCl₂ dengan variasi konsentrasi 0,7; 1,4; 2,1; 2,8 mM. Setelah itu dilakukan pengukuran aktivitas pada sampel dan blankonya.

3. Hasil dan Pembahasan

Adaptasi Bakteri Halofilik pada Media *Halophile Synthetic Broth* (HSB)

Bakteri halofilik koloni tunggal dari *bittern* tambak garam Madura ditumbuhkan pada media *Enrichment Halophile Broth* (EHB) agar diperoleh kultur bakteri pada kondisi yang aktif kemudian diadaptasikan pada media *Halophile Synthetic Broth* (HSB). Komposisi media HSB dibuat mirip dengan media EHB. Namun pada media HSB, digunakan *artificial sea water* (ASW) sebagai pengganti *bittern*. Komposisi mineral yang terkandung di dalamnya dibuat mirip seperti komposisi *bittern*.

Proses adaptasi pertumbuhan bakteri halofilik dilakukan secara bertahap sampai semua *bittern* dalam media dapat digantikan dengan ASW. Keberhasilan pertumbuhan bakteri pada media HSB ditunjukkan oleh adanya kekeruhan pada media. Bakteri yang tumbuh selanjutnya dilakukan uji morfologi dan pewarnaan gram [13, 14], untuk memastikan bahwa bakteri yang tumbuh pada media HSB sama dengan bakteri halofilik stok awal. Berdasarkan penelitian diperoleh bakteri halofilik berbentuk kokus dan bersifat gram negatif sama dengan bakteri stok awal.

Produksi Enzim Protease halostabil

Produksi enzim protease dari bakteri halofilik dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri halofilik pada media HSB kemudian diinkubasi selama 32 jam sesuai dengan kurva pertumbuhan bakteri halofilik dan ditambahkan induser kasein setelah inkubasi 24 jam. Protease diisolasi dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 menit. Kemudian diambil supernatannya yang merupakan enzim ekstrak kasar yang selanjutnya dilakukan proses pemurnian protease.

Pemurnian Protease Halostabil

Pemurnian enzim dilakukan dengan cara fraksinasi amonium sulfat bertingkat dilanjutkan dengan dialisis. Enzim ekstrak kasar yang diperoleh dimurnikan dengan mengendapkan protein menggunakan garam amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan berbeda untuk memisahkan protein enzim dari protein lainnya sehingga diperoleh fraksi-fraksi protein [15, 16]. Cara

ini berdasarkan prinsip *salting out*. Proses pemurnian berikutnya adalah dialisis menggunakan membran selofan dengan perbedaan konsentrasi bufer fosfat di luar dan di dalam membran 0,05x10⁻²M dan 0,05M hingga semua garam amonium sulfat terbebaskan.

Penentuan Unit Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Protease halostabil

Protease halostabil hasil isolasi ditentukan aktivitasnya dengan mereaksikan enzim tersebut menggunakan substrat azokasein. Penentuan aktivitas protease halostabil dilakukan melalui identifikasi bertambahnya produk hasil hidrolisis azokasein. Degradasi dari azokasein akan membebaskan warna yang terikat pada azokasein sehingga dapat diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada pajang gelombang 440nm. Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghidrolisis azokasein sehingga menghasilkan perubahan absorbansi sebesar 1% per mL pada panjang gelombang 440 nm pada kondisi percobaan [12]. Kemudian ditentukan kadar protein pada tiap fraksi dengan metode Lowry dan dihitung aktivitas spesifiknya.

Tabel 1 hasil uji aktivitas dan aktivitas spesifik protease

Fraksi enzim	Aktivitas enzim (unit/mL)	Kadar protein (mg/mL)	Aktivitas spesifik (Unit/mg protein)
(EK)	4,5	0,080	56,25
F 1	5,3	0,024	220,83
F 2	6,3	0,070	90,57
F 3	4,7	0,106	44,34
F 4	4,1	0,100	41,00
F 5	4,2	0,069	60,87

Berdasarkan tabel 1, aktivitas spesifik tertinggi protease halostabil pada fraksi F1 (0-20%) sebesar 209,2 unit/mg protein. Hal ini menunjukkan bahwa komposisi protease pada F1 lebih tinggi dibandingkan fraksi enzim yang lain.

Pengaruh Garam Terhadap Aktivitas Protease Halostabil

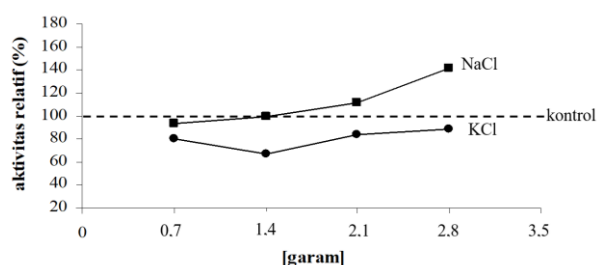
Penentuan pengaruh garam terhadap aktivitas protease halostabil dilakukan dengan menentukan aktivitas protease dengan penambahan berbagai garam dengan variasi konsentrasi tertentu, kemudian dibandingkan dengan aktivitas protease halostabil tanpa penambahan garam (kontrol). Garam yang ditambahkan yaitu garam monovalen NaCl dan KCl dan garam divalen MgCl₂ dan CaCl₂ dengan variasi konsentrasi 0,7 mM; 1,4 mM; 2,1 mM, dan 2,8 mM.

Pengaruh penambahan garam monovalen NaCl dan KCl terhadap aktivitas protease halostabil

NaCl dan KCl merupakan garam monovalen yang kationnya mempunyai muatan +1. Kation pada garam akan berikatan dengan gugus-gugus asam (muatan negatif) pada permukaan enzim sehingga struktur

enzim menjadi lebih stabil dan akan berpengaruh terhadap aktivitasnya. Garam NaCl dan KCl memberikan pengaruh yang berbeda terhadap aktivitas protease halostabil. Pada konsentrasi yang sama, NaCl cenderung meningkatkan aktivitas protease halostabil sedangkan KCl akan menurunkan aktivitas (Gambar 1).

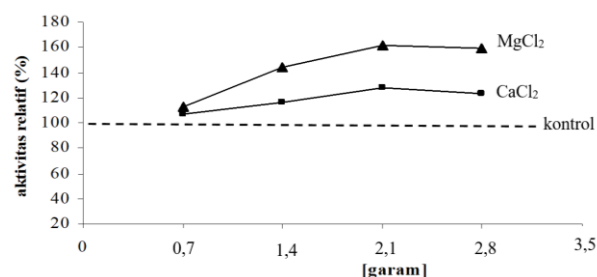
Penurunan aktivitas protease halostabil pada penambahan K⁺ ini dikarenakan ikatan antara muatan negatif pada permukaan enzim dengan ion K⁺ lebih lemah dibandingkan ikatan dengan ion Na⁺. Hal ini dikarenakan tarikan muatan inti dari K⁺ lebih lemah sehingga ikatan antara K⁺ dengan anion lebih mudah lepas. Jari-jari ion K⁺ yang besar juga menyebabkan ukuran ion K⁺ semakin besar sehingga berpengaruh pada banyaknya muatan negatif yang mampu dinetralkan oleh kation tersebut. Pada konsentrasi garam yang sama, muatan negatif pada permukaan protease halostabil yang dinetralkan oleh ion K⁺ lebih sedikit (dibandingkan oleh ion Na⁺), sehingga struktur menjadi kurang stabil dan aktivitasnya menurun.



Gambar 1 Profil pengaruh penambahan garam monovalen NaCl dan KCl terhadap aktivitas protease halostabil.

Pengaruh penambahan garam divalen CaCl₂ dan MgCl₂ terhadap aktivitas protease halostabil

Garam divalen: CaCl₂ dan MgCl₂ memiliki muatan positif lebih banyak daripada monovalen. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan garam divalen dapat meningkatkan aktivitas protease halostabil dan mencapai konsentrasi optimum pada 2,1 mM (Gambar 2).



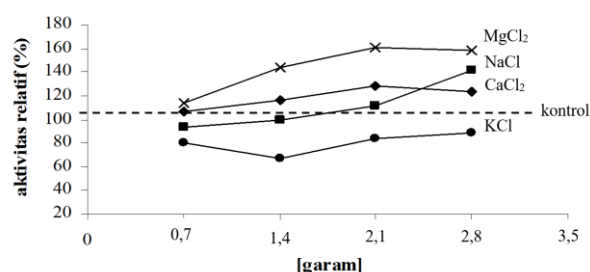
Gambar 2 Profil pengaruh penambahan CaCl₂ dan MgCl₂ terhadap aktivitas protease halostabil

Pada konsentrasi yang sama, garam monovalen dan divalen memiliki profil aktivitas relatif yang mirip. Keunikan terjadi pada penambahan garam MgCl₂ yaitu dapat meningkatkan aktivitas protease lebih tinggi dibandingkan CaCl₂. Hal ini dikarenakan ikatan antara ion Mg²⁺ dengan muatan negatif pada permukaan

protease lebih kuat dibandingkan dengan ion Ca²⁺. Ion Mg²⁺ mempunyai jari-jari ion lebih kecil daripada Ca²⁺ sehingga tarikan muatan intinya lebih kuat. Sebaliknya, ikatan ion Ca²⁺ dengan muatan negatif permukaan protease lebih lemah sehingga akan menyebabkan ikatan lebih mudah lepas dan membuat struktur protease menjadi kurang stabil.

Pengaruh penambahan garam monovalen (NaCl dan KCl), dan garam divalen (CaCl₂ dan MgCl₂) terhadap aktivitas protease halostabil

Pengaruh penambahan garam monovalen dan divalen dengan berbagai konsentrasi secara umum memperlihatkan profil aktivitas yang sama terhadap kontrol (Gambar 3). Penambahan garam NaCl, CaCl₂ dan MgCl₂ menunjukkan profil aktivitas protease meningkat, sedangkan KCl profil aktivitasnya menurun. Peningkatan aktivitas paling tinggi pada penambahan MgCl₂.



Gambar 3 Profil pengaruh penambahan berbagai garam terhadap aktivitas protease

Garam monovalen NaCl dan KCl memiliki muatan kation lebih sedikit dibandingkan garam divalen CaCl₂ dan MgCl₂ sehingga pada konsentrasi yang sama, anion pada permukaan enzim yang ternetralkan oleh ion Na⁺ maupun ion K⁺ akan lebih sedikit. Konsentrasi garam untuk uji aktivitas adalah 0,7 - 2,8 mM yang didasarkan pada rentang konsentrasi optimal CaCl₂ dan MgCl₂.

Pengaruh variasi konsentrasi NaCl terhadap aktivitas protease menunjukkan profil yang linear. yaitu dengan semakin tinggi konsentrasi NaCl semakin tinggi pula aktivitasnya. Perbedaan linearitas profil [konsentrasi garam-aktivitas] antara garam NaCl, KCl, MgCl₂ dan CaCl₂ menunjukkan bahwa pola adaptasi protease halostabil terhadap NaCl lebih baik daripada garam lainnya. Hal ini diprediksi berkaitan dengan kondisi alami dari bakteri halofilik yang mampu hidup pada konsentrasi garam NaCl tinggi.

4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, diperoleh protease ekstraseluler dari bakteri halofilik isolat *bittern* tambak garam Madura memiliki aktivitas spesifik 220,83 unit/mg protein pada fraksi 1 (0-20%). Pengaruh penambahan garam NaCl, CaCl₂, dan MgCl₂ dapat meningkatkan aktivitas protease halostabil, sedangkan penambahan KCl cenderung menurunkan aktivitas protease halostabil. Profil aktivitas protease halostabil semakin meningkat sesuai dengan urutan KCl, NaCl, CaCl₂, MgCl₂.

5. Daftar Pustaka

- [1] Aharon Oren, *Halophilic Microorganisms and their Environments*, Springer Science & Business Media, 2002.
- [2] Shiladitya DasSarma, Priya DasSarma, *Halophiles*, in: *Encyclopedia of Life Science*, Wiley, 2006.
- [3] Mital S. Dodia, Rupal H. Joshi, Rajesh K. Patel, Satya P. Singh, Characterization and stability of extracellular alkaline proteases from halophilic and alkaliphilic bacteria isolated from saline habitat of coastal Gujarat, India, *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, (2006) 276-282
<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000300015>
- [4] Neil D. Rawlings, *Protease Families, Evolution and Mechanism of Action*, in: K. Brix, W. Stöcker (Eds.) *Proteases: Structure and Function*, Springer Vienna, Vienna, 2013, pp. 1-36.
- [5] P. Norberg, B. V. Hofsten, *Proteolytic Enzymes from Extremely Halophilic Bacteria*, *Microbiology*, 55, 2, (1969) 251-256
<http://dx.doi.org/10.1099/00221287-55-2-251>
- [6] Janos K. Lanyi, Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria, *Bacteriological Reviews*, 38, 3, (1974) 272-290
- [7] Janos K. Lanyi, Joann Stevenson, Studies of the Electron Transport Chain of Extremely Halophilic Bacteria: IV. Role of Hydrophobic Forces in The Structure of Menadione Reductase, *Journal of Biological Chemistry*, 245, 16, (1970) 4074-4080
- [8] Malashetty Vidyasagar, S Prakash, Carol Litchfield, K Sreeramulu, Purification and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from the extreme halophilic archaeon *Haloquadratum walsbyi* strain TSS101, *Archaea*, 2, 1, (2006) 51-57
- [9] Ronald M. Atlas, Richard Bartha, *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*, 3 ed., Benjamin/Cummings Publishing Company, 1993.
- [10] John P. Harley, Lansing M. Prescott, *Laboratory Exercises in Microbiology*, 5 ed., McGraw-Hill, 2001.
- [11] Werasit Kanlayakrit, Preeyanuch Bovornreungroj, Takuji Oka, Masatoshi Goto, Production and characterization of protease from an extremely halophilic *Halobacterium* sp. PB407, *Kasetsart Journal: Natural Science*, 38, 5, (2004) 15-20
- [12] J. Charney, R. M. Tomarelli, A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice, *Journal of Biological Chemistry*, 171, (1947) 501-505
- [13] Terry J. Beveridge, Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles, *Journal of Bacteriology*, 181, 16, (1999) 4725-4733
- [14] R. McClelland, Gram's stain: the key to microbiology, *MLO Med Lab Obs*, 33, 4, (2001) 20-22, 25-28; quiz 30-21
- [15] Clive Dennison, *A Guide to Protein Isolation*, Kluwer Academic Publishers, 1999.
- [16] Tim Bugg, *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*, John Wiley & Sons, 2004.