

UJI TOKSISITAS DENGAN METODE BSLT PADA NANOPARTIKEL KOMBINASI OBAT CISPLATIN, BOVINE SERUM ALBUMIN DAN ASAM FOLAT

Ersalina Nidianti*, Ary Andini

Prodi Analisis Kesehatan, Fakultas Kesehatan, Universitas Nahdlatul Ulama
Surabaya

Email*: ersalinanidianti@unusa.ac.id

Artikel diterima: 30 September 2020; Disetujui: 22 Maret 2021

DOI: <https://doi.org/10.36387/jiis.v6i1.609>

ABSTRAK

Kanker adalah penyakit tidak menular yang menyebabkan morbiditas dan mortalitas di seluruh wilayah dunia. Pengobatan kanker menjadi hal penting dalam mengurangi tingginya jumlah angka kematian (mortalitas) karena penderita penyakit kanker. Salah satu pengobatan kanker adalah dengan menggunakan obat kemoterapi cisplatin. Akan tetapi obat cisplatin memiliki efek samping yaitu nefrotoksisitas, ototoksisitas, neurotoksisitas, hemotologistoksisitas, kardiotoxiksisitas, dan hepatotoksisitas. Oleh karena itu kombinasi cisplatin dalam nanopartikel albumin dan modifikasi ikatan menggunakan asam folat sebagai solusi alternatif meminimalisir efek toksik yang dihasilkan. Tujuan penelitian untuk mengetahui efek toksisitas formulasi obat cisplatin dengan kombinasi nanopartikel bovine serum albumin (BSA) dan asam folat melalui metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode penelitian yang dilakukan yaitu sintesis nanopartikel BSA (NP-BSA), Sintesis NP-BSA dengan Obat Cisplatin (CP-NP-BSA), Sintesis Asam Folat dengan Kombinasi CP-NP-BSA (As-CP-NP-BSA). Kemudian dilakukan uji toksisitas dengan metode BSLT untuk mengetahui kadar toksisitas nanopartikel BSA serta pengaruh penambahan asam folat dalam obat cisplatin dalam nanopartikel. Hasil diperoleh bahwa absorbansi dari Spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 358 nm As-CP-NP-BSA sebesar 0,86. Kadar toksisitas pada NP-BSA dengan nilai LC_{50} 69,23 ppm sedangkan kadar toksisitas As-CP-NP-BSA LC_{50} 56,56 ppm. Nanopartikel yang terdiri dari kombinasi bovine serum albumin, cisplatin dan asam folat dapat dijadikan sebagai kandidat obat antikanker.

Kata kunci: Cisplatin, Antikanker, Nanopartikel, Toksisitas

ABSTRACT

Cancer is a non-communicable disease that causes morbidity and mortality in all regions of the world. Cancer treatment is important in reducing the high number of deaths (mortality) due to cancer sufferers. One of the cancer treatments is using chemotherapy drug cisplatin. However, cisplatin drug has side effects, namely nephrotoxicity, ototoxicity, neurotoxicity, hemotoxicity, cardiotoxicity, and hepatotoxicity. Therefore, the combination of cisplatin in albumin nanoparticles and modification of the bond using folic acid as an alternative solution minimizes

the resulting toxic effects. This study aimed to determine the toxicity effect of the cisplatin drug formulation with a combination of bovine serum albumin (BSA) nanoparticles and folic acid through the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. The research methods used were BSA nanoparticle synthesis (NP-BSA), NP-BSA Synthesis with Cisplatin Drug (CP-NP-BSA), Folic Acid Synthesis with CP-NP-BSA Combination (As-CP-NP-BSA). Then, a toxicity test was carried out using the BSLT method to determine the toxicity level of BSA nanoparticles and the effect of adding folic acid in the cisplatin drug in the nanoparticles. The results showed that the absorbance of the 358 nm As-CP-NP-BSA UV-Vis spectrophotometer was 0.86. The toxicity level of the NP-BSA with the LC50 value was 69.23 ppm while the As-CP-NP-BSA LC50 toxicity level was 56.56 ppm. Nanoparticles consisting of a combination of bovine serum albumin, cisplatin and folic acid can be used as candidates for anticancer drugs.

Keywords: *Cisplatin, Anticancer, Nanoparticles, Toxicity*

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit tidak menular yang menyebabkan morbiditas dan mortalitas di seluruh wilayah dunia. Data dari laporan Global Burden Cancer (Globocan) pada tahun 2018 menunjukkan bahwa ada 18,1 juta kasus baru kanker dengan 9,6 juta kasus kematian disebabkan kanker (Bray et al. 2018). Berdasarkan data Riskesdas pada tahun 2018 prevalensi kanker di Indonesia menunjukkan adanya peningkatan dari 1,4 per 1.000 penduduk ditahun 2013 menjadi 1,79 per 1.000 penduduk ditahun 2018.

Penyebab terjadinya kanker karena adanya perubahan struktur dan fungsi secara genetik. Penyakit kanker dikarenakan kondisi sel mengalami

pertumbuhan yang tidak normal dan tidak terkendali. Penyakit ini ditandai sel-sel dalam tubuh manusia terus berkembang biak dan tidak mampu dikendalikan atau dihentikan sehingga terbentuk tumor atau sel-sel ganas yang berpotensi menjadi metastasis (Rahmani et al. 2014). Pengobatan kanker dilakukan secara intensif seperti: pembedahan, kemoterapi, radioterapi. Pengobatan kanker secara kemoterapi merupakan salah satu pengobatan yang digunakan untuk menghancurkan sel-sel kanker dengan menghambat pertumbuhan dan perkembangan sel kanker. Kemoterapi melibatkan penggunaan obat dengan berat molekul yang rendah untuk menghancurkan sel tumor secara selektif (Mutiah, Suryadinata, and

Nurani 2018).

Salah satu obat kemoterapi yang digunakan untuk pengobatan kanker adalah cisplatin. Cisplatin dapat digunakan untuk pengobatan berbagai jenis kanker pada manusia seperti kanker ovarium, paru-paru, testis, kandung kemih, payudara, otak dll. Cisplatin diberikan melalui intervena sebagai infus jangka pendek dalam larutan saline untuk pengobatan kanker ganas. Pemberian cisplatin pada pengobatan kanker dapat memicu proses pembelahan sel yang tidak normal & berpotensi menyerang sel yang berdekatan (Aldossary 2019). Penggunaan secara klinis cisplatin dibatasi karena adanya efek samping yang bersifat toksik yang bergantung pada dosis. Toksisitas cisplatin yaitu nefrotoksisitas, ototoksisitas, neurotoksisitas, hemotologis toksisitas, kardiotoxsisitas, dan hepatotoksisitas. Karena efek samping yang dihasilkan tersebut dibuatlah obat berbasis nanopartikel (Qi et al. 2019).

Obat dengan sistem penghantar obat (*drug delivery*) berbasis nano telah dikaji dan diteliti untuk meminimalkan efek samping dari obat cisplatin, mengurangi toksisitas obat

serta mampu meningkatkan efisiensi antineoplastik dan meningkatkan kemanjuran obat. (Alam et al. 2015). Penelitian yang telah dilakukan oleh (Kettering et al. 2009) penggunaan cisplatin dengan kombinasi nanopartikel magnetik menunjukkan aktivitas kemoterapi akan tetapi menghasilkan efek samping tubuh terasa panas. Oleh karena itu, dalam penelitian ini digunakan nanopartikel dari bahan polimer organik seperti albumin, yang diperoleh dari *bovine serum albumin* (BSA) dikombinasi dengan obat cisplatin dan modifikasi ikatan menggunakan asam folat untuk meminimalisir toksisitas obat.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek toksisitas formulasi obat cisplatin dengan kombinasi nanopartikel bovine serum albumin (BSA) dan asam folat melalui metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian yaitu: erlenmeyer 600 ml, neraca analitik, magnetik stirer, gelas ukur 100 ml, pipet tetes, pipet volume, hot plate, sentrifuse, Spektrofotometer

UV-Vis.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian: Etanol 95 %, Cisplatin, larutan Bovine Serum Albumin (BSA), NaOH, larutan Phosphat Buffer Saline (PBS), Gluteraldehid, Asam folat, aquades, aquabidest, dan pelarut kimia lainnya.

Sintesis Nanopartikel Bovine Serum Albumin (NP-BSA)

Sintesis nanopartikel bovine serum albumin (BSA) dilakukan dengan menggunakan teknik desolvasi. Larutan BSA (4% w/v) dengan pH 7 ditambahkan etanol (0,5 ml/menit dengan interval 2 menit) dilakukan pengadukan menggunakan magnetik stirrer 600 rpm. Kemudian ditambahkan 8% gluteraldehid (1,7 µl/mg BSA) didiamkan selama 6 jam pada temperatur ruang dengan pengadukan magnetik stirrer (600 rpm) hingga terbentuk larutan keruh. Nanopartikel yang dihasilkan dimurnikan dengan menggunakan sentrifugasi, kemudian dicuci dengan menggunakan Phosphat Buffer Saline (PBS) steril. Kemudian nanopartikel yang terbentuk disimpan dalam desikator (Alam et al. 2015).

Sintesis Nanopartikel Bovine Serum Albumin dengan Obat Cisplatin (CP-NP-BSA)

Obat cisplatin diinkubasi selama 24 jam kemudian ditambahkan larutan BSA (4% w/v) pada suhu 37 °C dan dilakukan pengadukan stirer kemudian ditambahkan NaOH 0,1 N (Alam et al. 2015).

Sintesis Asam Folat dengan Kombinasi Nanopartikel Bovine Serum Albumin dengan Obat Cisplatin (As-CP-NP-BSA)

Nanopartikel BSA (NP-BSA) dan cisplatin nanopartikel BSA (CP-NP-BSA) dimodifikasi dengan asam folat. Asam folat ditambahkan dengan PBS & Sorbitol dengan perbandingan (1:2:2) kemudian distirer 15 menit pada temperatur ruang. Jumlah NP-BSA dan CP-NP-BSA yang ditambahkan sebanyak 20 mg/ml dan distirer dengan magnetik stirer selama 4-5 jam. Hasil disentrifugasi dan siap untuk analisis (Alam et al. 2015).

Uji Toksisitas Metode BSLT

Telur *Artemia Salina* (*A.salina*) 0.5 g ditetaskan dalam media air laut (35% kadar garam), bersirkulasi udara yang baik dan pencahayaan yang terang dan suhu 24-26 °C. Setelah 12-

48 jam telur menetas, salinitas dikurangi hingga 5% untuk uji BSLT, tidak boleh umur 7 hari dan tidak boleh kurang dari 3 hari. Untuk senyawa murni dibuat konsentrasi 1, 10 dan 100 ppm.

Disiapkan beberapa vial (tabung reaksi) yang masing-masing diisi dengan 5 ml air laut dan 5 ml larutan sampel dengan konsentrasi (1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ppm) serta 10 ekor *A. salina*. Lakukan hal yang sama untuk kontrol dengan pelarut (etanol atau DMSO). Waktu kontak dilihat 1 jam hingga 6 jam. Replikasi dilakukan sebanyak 3X, hitung nilai LC_{50} dengan SPSS. Karena *A. salina* langsung kontak dengan sampel, maka dapat diketahui jumlah *A. salina* yang hidup dan jumlah yang mati, berdasarkan rumus

Evaluasi:

$$\% \text{Kematian} = \frac{\text{Total kematian } A. \text{salina} - \text{Kontrol}}{\text{Total larva hewan coba}} \times 100$$

(Meyer et al. 1982).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sintesis Nanopartikel Bovine Serum Albumin (NP-BSA)

Preparasi nanopartikel bovine serum albumin (BSA) dilakukan dengan metode desolvasi (yaitu teknik

pembuatan nanopartikel berdasarkan perbedaan kelarutan antara *desolvating agent* dengan pelarut air yang bercampur BSA). Kelarutan BSA dalam air tinggi bila ditambahkan *desolvating agent*/ pelarut pendesolvasi seperti (etanol, aseton, dan DMSO) sehingga membentuk agregat dari BSA dan ditambahkan *crosslinker* yang didasarkan pada karakteristik fisiko kimia (Ambarwati 2019). Sintesis dilakukan dengan mencampur larutan BSA, etanol 96% (sebagai *desolvating agent*) dan gluteraldehid 8% (sebagai *crosslinker*) distirerr 600 rpm selama 6 jam. Kemudian nanopartikel dicuci dengan PBS pH 7.4 steril dan disentrifugasi 2000 rpm selama 5 menit. Terbentuk dua lapisan yaitu filtrat dan endapan kemudian dipisahkan dan disimpan dalam desikator (Usreg, Husein, and Fahmi, Ph.D 2019), (Alam et al. 2015). Parameter optimasi pada penelitian ini bergantung pada jenis *desolvating agent*, jumlah pelarut pendesolvasi, jumlah larutan BSA yang digunakan, jumlah *desolvating agent*, lama pengadukkan dan pH pelarut (Ambarwati 2019).

Sintesis Nanopartikel Bovine Serum Albumin dengan Obat Cisplatin (CP-NP-BSA)

Cisplatin sebagai agen kemoterapi yang dianggap penting dalam pengobatan kanker. Pemberian cisplatin dalam waktu lama dapat mempengaruhi efektivitas organ dan menghasilkan efek samping sehingga perlu dilakukan kombinasi cisplatin untuk mengurangi toksisitas obat tersebut salah satunya dalam bentuk nanopartikel (Syame et al. 2018). Sintesis nanopartikel BSA dengan obat cisplatin dilakukan dengan penambahan NP-BSA yang terbentuk kemudian ditambahkan NaOH 0,1 N dan dilakukan pengadukan stirer 600 rpm (Alam et al. 2015).

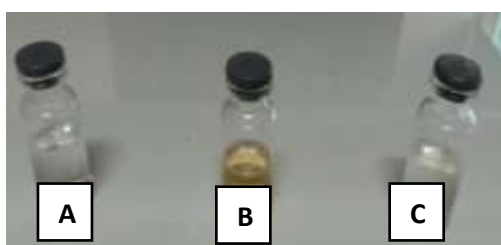
Sintesis Asam Folat dengan Kombinasi Nanopartikel Bovine Serum Albumin dengan Obat Cisplatin (As-CP-NP-BSA)

Albumin banyak ditemukan dalam bentuk Bovine Serum Albumin (BSA) atau Human Serum Albumin (HSA). Albumin merupakan polimer alami dengan sifat fisik dan kimianya yang unik, serta banyak digunakan didalam preparasi nanopartikel karena mampu membawa protein serbaguna

untuk penargetan obat dan memperbaiki profil farmakokinetik berbasis peptida atau obat berbasis protein (Das et al. 2011). Bovine Serum Albumin (BSA) merupakan polimer yang terdiri dari asam amino yang terhubung oleh adanya ikatan peptida. BSA mampu meningkatkan biodegradabilitas dan stabilitas. Nanopartikel yang menggunakan BSA memiliki karakteristik untuk meningkatkan efek terapeutik antitumor dan *drug delivery* (Yang et al. 2014). Asam folat yang mengandung protein disebut sebagai reseptor folat. Reseptor folat sangat menjanjikan sebagai ligan target untuk pengobatan kanker karena mampu memelihara fungsi sel, meningkatkan sistem kekebalan, serta memiliki penyerapan nanopartikel yang baik (Yang et al. 2014). Asam folat yang dikombinasi dengan nanopartikel cisplatin dan BSA kemudian disentrifugasi dan supernatannya disimpan untuk analisis lebih lanjut. Sampel dicuci dengan PBS, diliofilisasi dan disimpan.

Sampel NP-BSA, CP-NP-BSA dan As-CP-NP-BSA dilakukan pengukuran absorbansi dengan

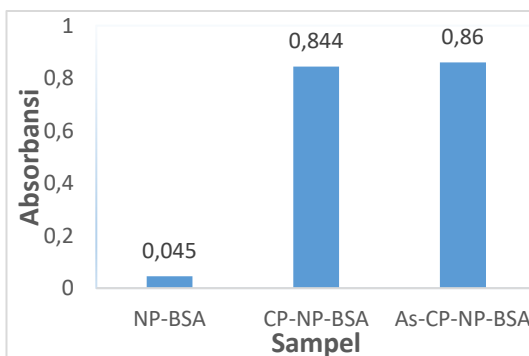
menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 358 nm. Dari hasil pengukuran bahwa Asam folat, Cisplatin dan Nanopartikel BSA memiliki absorbansi yang lebih tinggi dibandingkan dengan Nanopartikel BSA dan Cisplatin nanopartikel BSA. Data dapat dilihat padad tabel 1, gambar 2.



Gambar 1. Hasil Filtrat Setelah Sentrifugasi Pada Sintesis A.) NP-BSA, B.) CP-NP-BSA C.) AS-CP-NP-BSA

Tabel 1. Hasil pengukuran Spektrofotometer UV-Vis

Sampel	Absorbansi
NP-BSA	0,045
CP-NP-BSA	0,844
As-CP-NP-BSA	0,86



Gambar 2. Spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 358 nm

Uji Toksisitas Metode BSLT

Toksisitas dapat diartikan sebagai kemampuan suatu zat untuk menimbulkan kerusakan pada organisme hidup (Millati 2016). Uji toksisitas metode BSLT dilakukan dengan menggunakan larva udang *Artemia salina*. Kategori toksisitas dari suatu bahan yaitu sebagai berikut (Millati 2016):

Tabel 2. Kategori toksisitas

Kategori	LC ₅₀ (ppm)
Sangat Toksik	< 30
Toksik	30-1000
Tidak Toksik	> 1000

Tabel 3. Pengaruh konsentrasi terhadap kematian larva (NP-BSA)

Konsentrasi	Rata-Rata Larva Mati	Total Larva	% Mortalitas
0	0	10	0
1	1,3	10	13
10	2	10	20
20	2,3	10	23
30	3,3	10	33
40	3,7	10	37
50	4,3	10	43
60	5,3	10	53
70	7,7	10	77
80	10	10	100

Hasil uji toksisitas menunjukkan konsentrasi yang dapat membunuh larva *A.Salina* dengan variasi konsentrasi 1,10,20,30,40,50,60,70,80 ppm. Jumlah larva yang diuji adalah

10 ekor tiap konsentrasi dilakukan pengulangan/replikasi sebanyak 3X. Hasil pengujian dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 4. Pengaruh konsentrasi terhadap kematian larva (As-CP-NP-BSA)

Konsentrasi	Rata-Rata Larva Mati	Total Larva	% Mortalitas
0	0	10	0
1	1	10	10
10	2	10	20
20	3	10	30
30	4	10	40
40	5	10	50
50	6	10	60
60	7	10	70
70	8	10	80
80	10	10	100

Berdasarkan tabel 3 dan 4 terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi maka semakin besar tingkat kematian larva *A.Salina*. Tingkat kematian dapat ditentukan secara langsung dengan membandingkan konsentrasi terendah hingga konsentrasi tertinggi. Hal ini dapat diartikan bahwa kematian larva *A.Salina* meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi dalam sampel. Gambar larva *A.Salina* yang digunakan dalam uji toksisitas metode BSLT dapat dilihat dalam gambar 3. (Runtuwene and Wewengkang 2016)



Gambar 3. Larva *Artemia Salina*

Berdasarkan tabel 3 dilakukan analisis probit menggunakan SPSS menunjukkan nilai LC_{50} dari NP-BSA adalah 69,23 ppm. Sedangkan berdasarkan tabel 4 hasil analisis probit menggunakan SPSS menunjukkan nilai LC_{50} dari As-CP-NP-BSA 56,56 ppm. Menurut (Meyer et al. 1982) bahwa suatu larutan menunjukkan aktivitas toksik dalam uji toksisitas jika larutan tersebut dapat menyebabkan kematian 50% hewan uji pada konsentrasi <1000 ppm. Berdasarkan tabel 2 bahwa NP-BSA dan As-CP-NP-BSA bersifat toksik. NP-BSA memiliki nilai LC_{50} pada konsentrasi yang lebih tinggi (69,23 ppm) dibandingkan dengan As-CP-NP-BSA (56,56 ppm) hal ini berarti kombinasi asam folat & obat cisplatin dapat menurunkan toksisitas (Maukar, Runtuwene, and Pontoh 2013).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa nanopartikel yang terdiri dari kombinasi bovine serum albumin, cisplatin dan asam folat dapat dijadikan sebagai kandidat obat antikanker. Kadar toksisitas pada NP-BSA dengan nilai LC_{50} 69,23 ppm sedangkan kadar toksisitas As-CP-NP-BSA LC_{50} 56,56 ppm. Semakin tinggi kadar konsentrasi maka semakin tinggi toksisitas yang dihasilkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diberikan kepada RISTEK-BRIN Program Kompetitif Nasional, Skema PDP yang telah memberikan dana hibah penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, Noor et al. 2015. "Reduced Toxicological Manifestations of Cisplatin Following Encapsulation in Folate Grafted Albumin Nanoparticles." *Life Sciences* 142: 76–85.
- Aldossary, Sara A. 2019. "Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin." *Biomedical and Pharmacology Journal* 11(1): 07–15.
- Ambarwati, Rini. 2019. "Pembuatan Nanopartikel Albumin Menggunakan Metode Desolvasi Sebagai Alternatif Sistem Pembawa." *FITOFARMAKA: Jurnal Ilmiah Farmasi* 9(1): 35–39.
- Bray, Freddie et al. 2018. "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68(6): 394–424.
- Das, Saikat et al. 2011. "Nanotechnology in Oncology: Characterization and in Vitro Release Kinetics of Cisplatin-Loaded Albumin Nanoparticles: Implications in Anticancer Drug Delivery." *Indian Journal of Pharmacology* 43(4): 409–13.
- Kettering, Melanie et al. 2009. "Characterization of Iron Oxide Nanoparticles Adsorbed with Cisplatin for Biomedical Applications." *Physics in Medicine and Biology* 54(17): 5109–21.
- Maukar, Morein A, Max R.J. Runtuwene, and Julius Pontoh. 2013. "Analisis Kandungan Fitokimia Dari Uji Toksisitas Ekstrak Metanol Daun Soyogik (Sauraula Bracteosa DC) Dengan Menggunakan Metode Maserasi." *Jurnal Ilmiah Sains* 13(2): 98.
- Meyer, B. N. et al. 1982. "Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents." *Planta Medica*

- 45(1): 31–34.
- Millati, Nuria. 2016. “Uji Toksisitas Dengan Metode BSLT Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella Sp.*” *Skripsi*: 1–10.
- Mutiah, Roihatul, Arief Suryadinata, and Prasasti Swara Nurani. 2018. “Uji Sitotoksik Kombinasi Cisplatin Dengan Ekstrak Etanol Benalu Aalpuakat (*Dendrophthoe Pentandra (L) Miq.*) Pada Sel Hela.” *Majalah Kesehatan* 5(3): 133–43.
- Qi, Luyu et al. 2019. “Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin.” *Chemical Research in Toxicology*: acs.chemrestox.9b00204.
- Rahmani, Arshad H., Mohammad A. Al Zohairy, Salah M. Aly, and Masood A. Khan. 2014. “Curcumin: A Potential Candidate in Prevention of Cancer via Modulation of Molecular Pathways.” *BioMed Research International* 2014(Figure 1).
- Runtuwene, Max Revolta, and Defny Wewengkang. 2016. “Uji Aktivitas Antioksidan Dan Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Foki Sabarati (*Solanum Torvum*).” *Pharmacon* 5(3): 94–101.
- Syame, Sohier M et al. 2018. “Synthesis and Characterization of Cisplatin-Loaded BSA (Bovine Serum Albumin) Nanoparticles as Drug Delivery System against Pancreatic Cancer Cells.” 8(9): 39–48.
- Usreg, Handjani Sri Usreg, Albari Husein, and Mochamad Zakki Fahmi, Ph.D. 2019. “Uji Sitotoksik Terhadap Sintesis Dan Karakterisasi Magnetik Nanopartikel CuFe_2O_4 Yang Dilingkupi Bovine Serum Albumin (BSA).” *Jurnal Kimia Riset* 4(1): 7.
- Yang, Rui et al. 2014. “Preparation of Folic Acid-Conjugated, Doxorubicin-Loaded, Magnetic Bovine Serum Albumin Nanospheres and Their Antitumor Effects in Vitro and in Vivo.” *International journal of nanomedicine* 9: 4231–43.