

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL  
DAUN MANGKOKAN (*Polyscias scutellaria* (Burn.f.)Fosberg)**

**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MANGKOKAN LEAVES  
(*Polyscias scutellaria* (Burn.f.)Fosberg) METHANOLIC EXTRACT**

**Willy Tirza Eden\*<sup>1</sup>, Buanasari<sup>2</sup>, Shihabuddin<sup>2</sup>, Nilam Kencana Badahdah<sup>2</sup>**

**<sup>1</sup>Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Negeri Semarang (UNNES)**

**<sup>2</sup>Akademi Farmasi Nusaputera Semarang**

**\*Email: willytirzaeden@mail.unnes.ac.id**

**ABSTRAK**

*Serangan radikal bebas sangat merisaukan di zaman sekarang. Antioksidan memegang peranan penting dalam kehidupan untuk melindungi dan mengurangi efek negatif dari serangan radikal bebas tersebut. Daun mangkoka (*Polyscias scutellaria* (Burn.f.)Fosberg) mengandung metabolit sekunder yang potensial sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa aktif dan aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol, fraksi kloroform, fraksi n-heksana dan fraksi air daun mangkoka.*

*Penyarian secara maserasi dengan metanol 70%, dilanjutkan fraksinasi menggunakan kloroform, dan n-heksana. Uji fitokimia dilakukan pada ekstrak dan fraksi yang meliputi alkaloid, flavonoid, fenolik dan saponin sehingga diketahui senyawa apa yang terdapat pada daun mangkoka. Ekstrak metanol, fraksi kloroform, fraksi n-heksana, fraksi air daun mangkoka diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH dan tiosianat.*

*Hasil penelitian menunjukkan fraksi kloroform mempunyai aktivitas antioksidan tertinggi dengan nilai rata – rata  $IC_{50}$  19,58 ppm menggunakan metode DPPH. Sebaliknya, rata - rata persen aktivitas antioksidan tertinggi ditunjukkan oleh fraksi air sebesar 25,78% setelah diinkubasi selama 72 jam menggunakan metode tiosianat. Hal tersebut diduga karena senyawa flavonoid polar yang terdapat pada fraksi air berperan dengan baik melindungi asam linoleat yang bersifat non polar. Sedangkan fraksi kloroform diduga mengandung senyawa flavonoid lebih banyak dan lebih murni dibanding sampel yang lain, sehingga aktivitas penangkapan radikal DPPH tinggi.*

***Kata kunci:*** antioksidan, mangkoka, DPPH, tiosianat

**PENDAHULUAN**

Kerusakan pada sel dan jaringan yang merupakan akar dari sebagian besar penyakit disebabkan oleh spesies kimia yang sangat aktif dan berbahaya yang disebut

radikal bebas (oksidan). Radikal bebas berperan penting pada terjadinya arterosklerosis, penyakit jantung koroner, stroke, kanker, gagal ginjal, dan proses penuaan manusia (Kumalaningsih, 2006;

Youngson, 2005). Radikal bebas dapat masuk dan terbentuk ke dalam tubuh melalui pernafasan karena kondisi lingkungan yang tidak sehat, dan makanan berlemak. Beberapa contoh radikal bebas antara lain radikal hidroksil (OH•), radikal superoksida (O<sub>2</sub>•-) dan radikal peroksida lipid (ROO•) (Kumalaningsih, 2006).

Salah satu tumbuhan yang telah diteliti oleh Tjitrosoepomo (1991) adalah daun mangkokan, yang mengandung kalsium oksalat, peroksidase, amigdalin, fosfor, besi, lemak, protein, vitamin A, B1, C, saponin, tannin dan flavonoid. Jenis flavonoid yang terkandung di dalam daun mangkokan adalah flavonol (kuersetin, kaempferol dan mirisetin) dan flavon (luteolin dan apigenin) yang diduga memiliki aktivitas antioksidan.

Metode yang digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan peroksida lipid salah satunya menggunakan metode tiosianat. Peroksidasi lipid merupakan proses yang bersifat kompleks akibat reaksi asam lemak tak jenuh ganda penyusun fosfolipid membran sel dengan senyawa oksigen reaktif (SOR), yang membentuk hidroperoksida (Robles, *et al.*, 2001). SOR ialah senyawa turunan oksigen yang lebih reaktif dibandingkan oksigen pada kondisi dasar (*ground state*) (Halliwell and Whiteman, 2004). Penangkapan radikal 2,2

difeul -1-pikrilhidrazil (DPPH) digunakan untuk menguji aktivitas penangkal radikal nitrogen (•N). DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna violet gelap (Sunarni, 2005). Metode DPPH merupakan metode yang sederhana, cepat, dan mudah untuk skrining aktivitas penangkap radikal beberapa senyawa, selain itu metode ini terbukti akurat dan praktis (Prakash *et al.*, 2001). Berdasarkan uraian tersebut, penulis tertarik untuk meneliti aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol dan fraksi daun mangkokan (*Polyscias scutellaria* (Burn.f.)Fosberg) dengan metode DPPH dan tiosianat.

## METODE

### Bahan

Bahan utama adalah daun mangkokan (*Polyscias scutellaria* (Burn.f.)Fosberg) yang diperoleh dari perkebunan Bawen Kabupaten Semarang dan metanol 70%. Bahan untuk fraksinasi ekstrak adalah kloroform dan n-heksana. Berbagai reagen untuk uji fitokimia sampel, silica gel GF<sub>254</sub>, berbagai fase gerak dan reagen visualisasi bercak. Bahan uji aktivitas antioksidan meliputi asam linoleat (minyak wijen), etanol, FeSO<sub>4</sub> 0,014 M, NH<sub>4</sub>SCN 30%, vitamin C, DPPH 80 ppm, metanol p.a dan pembanding flavonoid Rutin.

### **Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, seperangkat alat gelas, *heating mantle*, batang pengaduk, kertas saring, cawan poselin, corong pisah, pipa kapiler, *chamber*, papan penyemprot, lampu UV, botol semprot, pipet volume, *micropipette*, *ependorf tube*, inkubator, kuvet dan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-Vis).

### **Penyiapan Simplisia**

Sampel daun mangkokan dilakukan sortasi basah kemudian ditimbang. Dipilih daun mangkokan yang masih utuh dan tidak rusak. Daun dicuci dengan menggunakan air mengalir, setelah itu daun dikeringkan. Pengeringan daun dilakukan di bawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam. Setelah kering, simplisia disortasi kering, diserbukkan dan diayak dengan ayakan no.30/40. Simplisia yang digunakan adalah simplisia yang lolos pada ayakan no.30 dan tidak lolos pada ayakan no.40. Serbuk simplisia selanjutnya diekstraksi dengan metode maserasi.

### **Ekstraksi**

Simplisia daun mangkokan ditimbang kurang lebih 200 gram, kemudian dimasukkan dalam bejana tertutup, lalu

ditambahkan 1500 ml metanol 70% sebagai cairan penyari hingga simplisia terendam seluruhnya. Perendaman dilakukan selama 5 hari kemudian disaring (filtrat I), selanjutnya dilakukan remaserasi dengan 500 ml metanol 70%, lalu disaring (filtrat II). Filtrat I dan II dijadikan satu dan didiamkan semalam. Gabungan filtrat dipekatkan dengan *heating mantle* pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental.

### **Fraaksinasi**

Ekstrak metanol ditimbang 5 gram, ditambahkan ke dalam 100 ml akuadest hangat, diaduk dalam Bekker hingga homogen, ditunggu hingga dingin, kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Campuran dipartisi menggunakan 10 ml kloroform lalu dikocok kuat dan dibiarkan sampai terbentuk dua lapisan. Kedua lapisan tersebut dipisahkan (dipartisi berulang sebanyak 5 kali), sehingga didapatkan fraksi larut kloroform dan fase tak larut kloroform. Fase tak larut kloroform selanjutnya dipartisi menggunakan *n*-heksan sehingga didapatkan fraksi larut *n*-heksan dan fraksi air. Setelah didapat ketiga fraksi tersebut, kemudian masing – masing fraksi diuapkan hingga didapatkan fraksi bebas pelarut (Sarastani *et al.*, 2002).

### Uji Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan

Pengujian ini dilakukan pada sampel ekstrak metanol, fraksi kloroform, fraksi n-heksana dan fraksi air. Konsentrasi sampel yang digunakan adalah 1 mg/ml dalam metanol 70%, kecuali pada uji saponin digunakan sampel utuh tanpa pengenceran dan hanya dilakukan pada identifikasi menggunakan reagen kimia. Pengujian fitokimia dilakukan menggunakan reagen kimia dan secara kromatografi lapis tipis (KLT) untuk membuktikan adanya senyawa aktif alkaloid, flavonoid, saponin, dan fenol pada sampel sesuai dengan Depkes RI (1995).

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode penangkapan radikal DPPH (Sunarni, 2005) dan menggunakan metode tiosianat yang dimodifikasi sesuai dengan Yen *et al.* (1998).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penyiapan Simplisia

Tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah tanaman mangkogan (*Polyscias scutellaria* (Burn.f.) Fosberg), sedangkan bagian tanaman yang digunakan adalah daun.

Determinasi dilakukan terlebih dahulu untuk memperoleh kepastian bahwa

tanaman yang digunakan pada penelitian berasal dari tanaman yang dimaksud, sehingga kemungkinan timbulnya kesalahan dalam pengumpulan bahan penelitian dapat dihindari. Identifikasi dan determinasi tanaman mangkogan dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM.

Daun mangkogan segar dicuci hingga bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel, selanjutnya dilakukan pengeringan dengan tujuan mengurangi kadar air pada daun. Pengeringan dilakukan dengan cara pemanasan tidak langsung dengan ditutup kain hitam, agar panas tidak merusak senyawa aktifnya.

Simplisia yang telah kering disortasi, tujuannya untuk memisahkan benda – benda asing seperti bagian – bagian tanaman yang tidak dibutuhkan dan pengotor lain, termasuk daun yang busuk atau berjamur, untuk menghindari kualitas daun kering yang buruk. Simplisia yang telah disortir kemudian dihaluskan menggunakan *blender* hingga menjadi serbuk dan disimpan di dalam wadah yang bersih, kering dan terlindung cahaya untuk mencegah kerusakan dan penurunan mutu simplisia.

### Ekstraksi dan Fraksinasi

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi yang mana penyarian zat aktif yang dilakukan dengan cara merendam sampel dalam pelarut organik pada temperatur ruang dan disimpan terlindung dari cahaya langsung. Hal ini bertujuan untuk mencegah reaksi yang dikatalis cahaya atau perubahan warna. Prinsip dari ekstraksi ini adalah berdasarkan kelarutan, adanya perbedaan konsentrasi antara di luar dan di dalam sel menyebabkan adanya pemecahan dinding dan membran sel, sehingga metabolit sekunder yang terdapat di dalam sitoplasma akan terlarut ke dalam pelarut organik (Sudjadi, 1986). Maserasi dihentikan ketika terjadi titik keseimbangan konsentrasi atau jenuh.

Hasil rendemen ekstrak yang didapat dari 400 gram sampel yaitu 13,85%. Ekstrak

metanol kemudian difraksinasi dengan berbagai pelarut dan diuapkan hingga kering. Rendemen fraksi kloroform, fraksi n-heksan dan fraksi air berturut-turut adalah 0,43%; 18,7% dan 49,07%.

### Identifikasi Senyawa Aktif Siplisia

Identifikasi dilakukan untuk mengetahui keanekaragaman dari jenis metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak metanol daun mangkokan. Golongan metabolit sekunder ditentukan dengan melihat perubahan warna sesuai pereaksi yang digunakan, pengendapan dan pembentukan busa serta didukung dengan teknik kromatografi lapis tipis. Hasil skrining fitokimia pada ekstrak metanol, fraksi kloroform, fraksi n-heksan dan fraksi air daun mangkokan dapat dilihat pada Tabel 1.

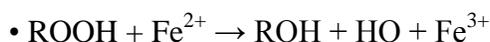
**Tabel 1. Skrining Fitokimia Daun Mangkokan**

Jenis Senyawa	Ekstrak Metanol	Fraksi Kloroform	Fraksi n-Heksan	Fraksi Air
<b>Alkaloid</b>	-	-	-	-
<b>Flavonoid</b>	+	++++	+	++
<b>Fenolik</b>	-	-		
<b>Saponin</b>	+	++	+++	+

Keterangan : Intensitas sangat kuat (++++), kuat (+++), sedang (++) , rendah (+)

### Aktivitas Antioksidan Tiosianat

Pengukuran aktivitas antioksidan yang dilakukan dengan metode feritiosianat didasarkan pada terbentuknya peroksida lemak yang merupakan hasil oksidasi asam linoleat. Peroksida lemak ini akan mengoksidasi ion fero menjadi feri membentuk kompleks feritiosianat karena



**Gambar 1. Reaksi Oksidasi Ion Fero Menjadi Feri**

Analisis ekstrak metanol dan ragam jenis fraksi memberikan pengaruh nyata terhadap aktivitas antioksidan. Prinsip pengujian dengan menggunakan metode tiosianat adalah pengukuran aktivitas antioksidan dalam menghambat terbentuknya senyawa-senyawa radikal yang bersifat reaktif. Pada metode tiosianat ini, asam linoleat dimasukkan dalam tabung Eppendorf yang berisi etanol yang mana pada penelitian ini sumber asam linoleat yang digunakan berasal dari minyak wijen.

Asam linoleat merupakan asam lemak tak jenuh dengan dua ikatan rangkap yang mudah mengalami oksidasi menghasilkan peroksida aktif. Salah satu karakteristik minyak wijen adalah memiliki stabilitas oksidatif yang tinggi. Hal ini

adanya ion tiosianat yang dapat dilihat pada Gambar 1. Ion tiosianat tersebut dapat dideteksi dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm. Semakin tinggi absorbansi menunjukkan semakin tingginya jumlah peroksida, yang berarti oksidasi asam linoleat semakin tinggi (Lestario *et al.*, 2005).

karena adanya komponen antioksidan seperti komponen lignan, polifenol, dan tokoferol.

Larutan sampel yang berisi etanol dan asam linoleat kemudian diinkubasi dalam keadaan gelap pada suhu 36°C selama 24 jam dan 72 jam. Proses oksidasi asam linoleat dikatalisis oleh cahaya, suhu, pH, oksigen, ion logam dan radikal lipid. Oleh karena itu, inkubasi asam linoleat dikondisikan pada suhu tinggi agar dapat mengkatalisis oksidasi asam linoleat. Inkubasi bertujuan agar asam linoleat dalam sampel mengalami oksidasi, dimana semakin lama waktu inkubasi maka nilai absorbansi semakin meningkat.

Setelah diinkubasi larutan sampel ditambahkan larutan  $\text{FeSO}_4$  dan  $\text{NH}_4\text{SCN}$ . Penggunaan larutan tersebut bertujuan agar peroksida ini dapat mengoksidasi ion fero

(Fe<sup>2+</sup>) menjadi ion feri (Fe<sup>3+</sup>) yang kemudian bereaksi dengan ion tiosianat membentuk kompleks feritiosianat (Fe(SCN)<sub>3</sub>) yang berwarna merah. Semakin tinggi intensitas warna merah menunjukkan bahwa semakin banyak peroksida aktif yang terbentuk. Asam askorbat digunakan sebagai kontrol positif dengan mekanisme kerja sebagai antioksidan sekunder dalam menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai.

Absorbansi yang rendah menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi dikarenakan radikal yang terbentuk selama peroksidasi lemak membentuk produk akhir yang stabil. Radikal yang terbentuk relatif stabil karena resonansi dan tidak mudah untuk ikut dalam reaksi berantai (Nijveldt *et al.*, 2001). Persen aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan penurunan absorbansi sampel terhadap absorbansi blanko minyak wijen yang dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2. Persen Aktivitas Antioksidan**

Sampel	Absorbansi Blangko Wijen		Absorbansi Sampel		% Aktivitas Antioksidan	
	24 jam	72 jam	24 jam	72 jam	24 jam	72 jam
<b>Ekstrak metanol</b>	1,0047	0,8405	0,9337	0,6469	7,07	23,03
<b>Fraksi n-heksan</b>	0,9872	0,8140	0,9751	0,7380	1,23	9,34
<b>Fraksi Kloroform</b>	0,9805	0,8092	0,9042	0,6649	7,78	17,83
<b>Fraksi Air</b>	1,1057	0,9353	0,9750	0,6942	11,82	25,78
<b>Vitamin C</b>	1,1818	1,0105	1,1018	0,8921	6,69	11,72

Persen penghambatan oksidasi fraksi air lebih besar dibanding ekstrak metanol, fraksi kloroform, fraksi n-heksan dan vitamin C. Semakin lama waktu penyimpanan maka semakin besar pula

persen penghambatan oksidasi. Senyawa flavonoid polar dapat berperan dengan baik melindungi asam linoleat, karena asam linoleat bersifat non polar, sehingga fraksi

air yang bersifat polar ternyata lebih mampu melindungi asam linoleat.

### Aktivitas Antioksidan Dengan Penangkapan Radikal DPPH

Senyawa 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil bereaksi dengan senyawa antioksidan melalui pengambilan atom hidrogen dari senyawa antioksidan untuk mendapatkan pasangan elektron, yang mana akan menghasilkan bentuk tereduksi difenil pikril

hidrazin dan senyawa bukan radikal yaitu DPP Hidrazin yang stabil (Pokorni *et al.*, 2001). Uji aktivitas antioksidan ini membandingkan nilai  $IC_{50}$  (*Inhibitory Concentration 50*) dari ekstrak metanol, fraksi kloroform, fraksi n-heksana, fraksi air, dan flavonoid Rutin yang dapat dilihat pada Tabel 3. Menurut Ariyanto (2006) suatu sampel dikatakan memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat apabila nilai  $IC_{50} < 50$  ppm.

**Tabel 3. Rata-Rata Nilai  $IC_{50}$**

Sampel	$IC_{50}$ (ppm)
Ekstrak metanol	283,47
Fraksi kloroform	19,58
Fraksi n-heksana	270,32
Fraksi air	715,72
Flavonoid Rutin	714,17

Fraksi kloroform memiliki nilai  $IC_{50}$  lebih besar daripada ekstrak metanol, fraksi n-heksana, fraksi air dan pembanding Rutin. Pada percobaan KLT menyatakan bahwa semua sampel positif mengandung flavonoid, diduga pada fraksi kloroform mengandung senyawa flavonoid lebih banyak dibandingkan ekstrak dan fraksi lainnya. Jenis flavonoid pada fraksi kloroform diduga isoflavon, flavonol, dan

flavanon yang mempunyai karakteristik kimia lebih baik dari sampel yang lain. Flavonoid dapat juga sebagai salah satu penangkal radikal bebas. Sifat antioksidan dari flavonoid berasal dari kemampuan untuk mentransfer sebuah elektron ke senyawa radikal bebas (Porat *et al.*, 2006).

## SIMPULAN

Ekstrak metanol daun mangkokan (*Polyscias scutellaria* (Burn.f.) Fosberg) mengandung flavonoid dan saponin. Fraksi air memiliki aktivitas antioksidan tertinggi, yakni sebesar 23,03% pada waktu inkubasi 72 jam. Waktu inkubasi sangat berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas antioksidan metode tiosianat. Fraksi kloroform mempunyai nilai IC<sub>50</sub> terbesar, yakni 19,58 ppm. Diduga jenis flavonoid pada fraksi kloroform memiliki struktur paling baik dalam menangkap radikal bebas dibandingkan flavonoid dari fraksi lainnya.

## DAFTAR PUSTAKA

Ariyanto, R., 2006, Uji Aktivitas Antioksidan, Penentuan Kandungan Fenolik dan Flavonoid Total Fraksi Kloroform dan Fraksi Air Ekstrak Metanolik Pegagan (*Centella asiatica* L. Urban), Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada (Skripsi).

Astarina, N. W. G., Astuti, K. W., Warditiani, N. K., 2013, Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.), Jurnal Farmasi Udayana, **2** (4), 1-7.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995, *Materia Medika Indonesia*

*Jilid IV*, Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- Halliwell B. and Whiteman M., 2004, Measuring Reactive Species and Oxidative Damage In Vivo and In Cell Culture : How Should You Do It and What Do The Results Mean?, *British Journal of Pharmacology*, **142** (2), 231-255.
- Kumalaningsih, 2006, *Antioksidan Alami Terong Belanda (Tamarillo)*, 16, Surabaya : Trubus Agrisarana.
- Lestario, L. N., Rahardjo, S., Tranggano, 2005, Sifat Antioksidatif Ekstrak Buah Duwet (*Syzygium cumini*). *Agritech*, **25** (1), 24-31.
- Nijveldt, R., Nood, E.V., Hoorn, D.E.C.V., Boelens, P.G., Norren, K.V., Leeuwen, P.A.M.V., 2001, Flavonoids : A Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Application, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **74** (4), 418-425.
- Pokorni, J., Yanishlieva, N., Gordon, M., 2001, *Antioxidant in Food : Practical Applications*, CRC Press, New York.
- Porat Y., Abramowitz A., Gazit E., 2006, Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Polyphenols:

- Structural Similarity and Aromatic Interactions as a Common Inhibition Mechanism, *Chemical Biology & Drug Design*, **67** (1), 27-37.
- Prakash, A., Rigelhof, F., Miller E, 2001, *Antioxidant Activity*, Medallion Laboratories, Minnesota.
- Robles R., Palomino N., Robles A., 2001, Oxidative stress in the neonate, *Early Human Development*, **65**, S75-S81.
- Sarastani, D., Suwarna T.S., Muchtadi, T.R., Fardiaz, D., Apriyanto, A., 2002, Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Ekstrak Biji Atung, *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, **13** (2), 149-156.
- Sudjadi, 1986, *Metode Pemisahan*, UGM Press, Yogyakarta.
- Sunarni, T., 2005, Aktivitas antioksidan penangkap radikal bebas beberapa kecambah dari biji tanaman familia papilionaceae, *Jurnal Farmasi Indonesia*, **2** (2), 53-61.
- Susanti, A.D., Ardiana, D., Gumelar, G.P., Bening, Y.G., 2012, Polaritas Pelarut Sebagai Pertimbangan Dalam Pemilihan Pelarut Untuk Ekstraksi Minyak Bekatul Dari Bekatul Varietas Ketan (*Oriza sativa glantinosa*), Simposium Nasional RAPI XI FT UMS ISSN : 1412-9612.
- Tjitrosoepomo, G., 1991, *Taksonomi Tumbuhan Spermatophyta*, Yogyakarta : UGM.
- Yen, G.C., Cheng, H., Duh, P.D., 1998, Extraction and identification of an antioxidative component from Jue Ming Zi (*Cassia tora* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 820-824.
- Youngson, R., 2005, *Antioksidan : Manfaat Vitamin C dan E bagi Kesehatan*, diterjemahkan oleh Susi Purwoko, Jakarta : Arcan.