

Analisis Kadar Timbal dan Gambaran Darah Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) di Pusat Latihan Gajah Sebang Riau

*(ANALYSIS OF BLOOD LEAD (Pb) CONCENTRATION AND HEMATOLOGY PERFORMANCE
OF SUMATRAN ELEPHANTS (*Elephas maximus sumatranus*)
IN SEBANGA ELEPHANT TRAINING CENTER RIAU)*

Hamdani Budiman¹, Al Azhar², Irwandi Yusuf³

¹Laboratorium Patologi, ²Laboratorium Biokimia, ³Laboratorium Klinik,
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala,
Jalan Syech Abdul Rauf No. 4 Darussalam, Banda Aceh, 23111
Fax. (0651) 7551536. Email : *kedokteranhewan61unsyiah@yahoo.com*

ABSTRACT

The aim of this research was to determine the lead concentration in blood and hematological profiles of Sumatran elephants. Eight out of 57 captivated Sumatran elephants in Sebang Elephant Training Center (ETC) Riau were examined for the lead concentration in the blood and for hematological profiles. The results showed that their lead concentration in blood was 0.3425 – 0.4633 ppm with the average of 0.3905 ± 0.373 ppm. Their hemoglobin level was 9.60 – 12.10 g/dl with the average of 10.39 ± 1.20 g/dl. Hematocrit levels was 31 – 47% with the average of 37.50 ± 5.21%. In male, their average levels of hemoglobin and hematocrit were 10.85 ± 1.28 g/dl and 41.00 ± 4.90%, respectively which were higher than those in female (9.93 ± 1.06 g/dl and 34.00 ± 2.53%, respectively). Their lead concentration was higher in the younger elephant than in the older elephants. Although, the lead concentration in blood of Sumatran elephants was high, it appeared to be not related either with their hemoglobin or hematocrit levels. There was, however, relationship between the lead level in blood with the age of elephants.

Key words : Lead, hemoglobin, hematocrit, *Elephas maximus sumatranus*.

PENDAHULUAN

Pusat Latihan Gajah (PLG) Sebang, Riau merupakan salah satu pusat latihan gajah di Indonesia yang memiliki masalah kesehatan cukup menonjol. Pada tahun 2001-2003 terjadi kematian 14 ekor gajah pasca penangkaran. Reliegh dan Simbolon (1985) melaporkan tingkat kematian gajah di PLG ini mencapai 18%, terutama pada gajah yang baru dilahirkan atau ditangkap. Selanjutnya Mikota *et al.*, (2000) melaporkan 47% gajah di PLG Sebang menderita gangguan gizi dan 38% menunjukkan gejala anemia, kurus dan hasil biakan dari jaringan abses menunjukkan positif *enterobacter*. Salah satu gajah yang sakit tersebut menunjukkan anemia nonregeneratif, normokromik dengan peningkatan jumlah trombosit sehingga diduga ada kaitannya dengan keracunan plumbum (Pb).

Dugaan tersebut didasarkan pada kenyataan bahwa PLG Sebang Riau terletak di daerah industri pembuatan pipa, pupuk, transportasi, dan peralatan rumah tangga yang sangat tergantung pada mineral. Menurut Arms (1990), salah satu sumber energi mineral yang paling penting adalah petroleum yang merupakan material untuk menghasilkan polimer sintetik termasuk plastik dan fiber. Hasil analisis air sumur yang menjadi sumber air minum gajah di PLG tersebut memiliki kadar Pb di atas ambang batas indikasi keracunan (Mikota *et al.*, 2000). Sebagai logam yang bersifat akumulatif dan bila terpapar oleh Pb atau senyawanya dapat menyebabkan keracunan pada hewan liar (DEQ, 2006). Rateliffe (1981) menyatakan bahwa paparan Pb non-okupasional biasanya melalui tertelannya makanan atau minuman yang tercemar logam tersebut. Plumbum dan senyawanya masuk ke

dalam tubuh terutama melalui saluran cerna dan saluran pernafasan (Clayton dan Clayton, 1994; DeRoos, 1997). Terkonsumsinya Pb dalam waktu lama akan menyebabkan gangguan pada sistem organ umum dan anemia (Mathew dan Lawson, 1979; Martin, 1985). Anemia yang disebabkan oleh keracunan Pb biasanya bersifat normokromik dan normositik (Manbir, 2006). Akan tetapi, minimnya sarana dan prasa-rana kesehatan di PLG Sebang, menyebabkan penegasan terhadap dugaan ini belum dapat dilakukan.

Penelitian ini dilakukan untuk menentukan kadar logam Pb dan gambaran darah gajah Sumatera di PLG Sebang agar dapat digunakan sebagai salah satu dasar penetapan kebijakan kesehatan dalam program *biomonitoring* guna peningkatan manajemen pemeliharannya.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan sampel darah dari 8 ekor gajah Sumatera yang ada di PLG Sebang, Riau (5jantan dan 3 betina). Sebanyak 10 ml darah diambil dari vena aurikularis posterior setiap gajah dengan menggunakan venoject vakum yang mengandung antikoagulan heparin (Terumo®). Sampel darah disimpan dalam suhu dingin (4-6°C) lalu dibawa ke Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala,

Banda Aceh untuk pemeriksaan kadar hemoglobin (Hb) dan hematokrit (PCV) dan juga ke Laboratorium Kimia Analisis Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Syiah Kuala untuk penentuan konsentrasi plumbum darah.

Penentuan kadar hemoglobin dan hematokrit masing-masing dilakukan dengan metode Sahli dan mikrohematokrit (Kolmer *et al.*, 1986). Pemeriksaan kadar Pb darah dilakukan dengan spektrofotometer sinar tampak (UV/Vis) yang menggunakan *ditizon* yang membentuk kompleks dengan plumbum. *Ditizon* berfungsi membentuk kompleks dengan Pb Penggunaan *ditizon* juga untuk meminimalisasi gangguan dari logam lain di dalam analit. Senyawa kompleks bis-*ditizon*-Pb harus memiliki warna sehingga dapat diukur dengan UV/Vis. (Arnold dan Grenberg, 1992). Data hasil penelitian ketiga parameter tersebut dianalisis secara diskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data hasil pemeriksaan kadar Pb, hemoglobin dan haematokrit selengkapnya disajikan pada Tabel 1. Sedangkan rata-rata hasil pemeriksaan kadar Pb, hemoglobin dan hematokrit darah gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) di PLG Sebang Riau tertera pada Tabel 2.

Tabel 1. Kadar Plumbum (Pb), Hemoglobin (Hb), dan Hematokrit (PCV) Darah Gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) di Pusat Latihan Gajah (PLG) Sebang Riau

No.	Nama Gajah	Umur (Tahun)	Jenis Kelamin	Kadar		
				Pb (ppm)	Hb (g/dl)	PCV(%)
1	Yanti	12	Betina	0,37	8,6	33
2	Lia	5	Betina	0,46	10,0	31
3	Pedro	12	Jantan	0,39	11,8	47
4	Cola	13	Betina	0,39	12,1	41
5	Laras	8	Betina	0,41	9,9	37
6	Kadir	12	Jantan	0,38	9,9	35
7	Jopi	16	Jantan	0,34	9,6	41
8	Vera	10	Betina	0,36	11,2	35
$\bar{\Sigma}x$				3,12	83,1	300,00
x				0,39	10,4	37,50
SD				0,03	1,2	5,21

Kadar Plumbum Darah

Kadar Pb dalam darah gajah Sumatera di PLG Sebang Riau berkisar dari 0,34 sampai 0,46 ppm, dengan rata-rata $0,39 \pm 0,03$ ppm. Kadar Pb dalam darah gajah jantan ($0,38 \pm 0,02$) ppm lebih rendah daripada dalam darah gajah betina ($0,40 \pm 0,04$ ppm). Kadar Pb ini tergolong tinggi karena Ariello (1998) menyatakan bahwa seekor hewan sudah dikatakan keracunan Pb jika kadar logam ini di dalam darahnya mencapai 0,35 ppm atau lebih. Sementara menurut Mitema *et al.*, 1990 bahwa kadar Pb darah 0,4-0,5 ppm menunjukkan indikasi keracunan plumbum disertai dengan gejala klinis anemia dan perubahan hematologis. Sebagai perbandingan, hasil pemeriksaan kadar Pb pada gajah Sumatera di PLG Aceh diperoleh sebesar 0,12 – 0,25 ppm (Al-Azhar dan Irwandi, 2002, tidak dipublikasikan). Selain itu, meskipun belum diketahui kisaran kadar Pb darah yang dianggap normal pada gajah Sumatera, menurut Mikota *et al.*, (1994) bahwa kadar Pb dalam darah gajah dianggap normal jika masih berada di bawah 0,30 ppm. Hasil penelitian ini menunjukkan kadar Pb darah gajah Sumatera tergolong tinggi terutama pada gajah umur muda dan jenis kelamin betina. Hal ini sesuai dengan pernyataan Schaedler (1994) bahwa retensi logam berat di dalam jaringan tubuh lebih tinggi pada hewan muda daripada hewan dewasa. Pada hewan muda jumlah mikroflora pencernaan yang berperan dalam proses biometilasi senyawa organik lebih rendah daripada hewan dewasa. Biometilasi senyawa metal organik dipengaruhi oleh jumlah mikroflora di dalam saluran pencernaan. Ekskresi senyawa metal ditentukan oleh jumlah atau ada/tidaknya mikroflora di dalam usus. Apabila jumlah ekskresi rendah, maka retensi logam di dalam jaringan tubuh akan meningkat.

Menurut Wood *et al.*, (1998) ekskresi Pb lebih cepat pada hewan mamalia tua daripada

hewan muda, sehingga pada hewan tua kadar Pb di dalam tubuh lebih rendah. Walaupun hasil suatu penelitian menunjukkan bahwa waktu paruh (*half-life*) eliminasi Pb lebih lama pada hewan tua (≥ 100 hari) dibandingkan dengan hewan muda (6-10 hari). Kadar Pb darah juga ditentukan oleh konsumsi Ca (Six dan Goyer, 1985). Defisiensi Ca akan meningkatkan absorpsi Pb dan menurunkan ekskresinya. Konsumsi Ca tinggi menyebabkan kadar Pb tinggi di dalam tulang femur dan kadar Fe jaringan sangat menurun. Undrewood (1977) melaporkan bila kadar Fe diet rendah, maka konsentrasi Pb di dalam tubuh meningkat mencapai 20 kali dibandingkan dengan kontrol. Retensi Pb di dalam tubuh meningkat bila kadar Ca diet menurun. Defisiensi Ca dan Fe sangat peka terhadap keracunan Pb. Defisiensi Fe menyebabkan absorpsi Pb meningkat. Konsentrasi Fe akan menurun sangat nyata di dalam jaringan tubuh bila Ca diet meningkat (Bodgen *et al.*, 1990).

Gambaran Darah Gajah

Kadar hemoglobin gajah Sumatera yang diperiksa berkisar 9,60 – 12,10 g/dl dengan rata-rata (\pm SD) $10,39 \pm 1,20$ g/dl. Kadar hemoglobin pada gajah jantan ($10,85 \pm 1,28$ g/dl) lebih tinggi daripada gajah betina ($9,92 \pm 1,06$ g/dl). Kadar hematokrit gajah yang diperiksa berkisar 31 – 47% dengan rata-rata (\pm SD) $37,50 \pm 5,21\%$. Kadar hematokrit pada gajah jantan ($41,00 \pm 4,90\%$) lebih tinggi daripada gajah betina ($34,00 \pm 2,53\%$).

Baik kadar hemoglobin maupun hematokrit yang diperoleh pada penelitian ini tergolong rendah dibandingkan Mikota *et al.*, (1994) yang melaporkan kadar hemoglobin gajah Asia jantan dan betina masing-masing adalah $13,34 \pm 2,15$ g/dl dan $13,61 \pm 1,54$ g/dl, sedangkan kadar hematokritnya adalah $39,97 \pm 5,50\%$ untuk gajah jantan dan $37,80 \pm 6,26\%$ untuk gajah

Tabel 2. Rata-rata kadar Plumbum, Hemoglobin dan hematokrit darah gajah Sumatera (*Elephas maximus sumatranus*) di PLG Sebang, Riau

Gajah Sumatera	Kadar		
	Plumbum (ppm)	Hemoglobin (g/dl)	Hematokrit (%)
Jantan	$0,38 \pm 0,02$	$10,8 \pm 1,28$	$41,0 \pm 4,9$
Betina	$0,40 \pm 0,04$	$9,9 \pm 1,06$	$34,0 \pm 2,5$
Rata-rata total	$0,39 \pm 0,03$	$10,4 \pm 1,20$	$37,5 \pm 5,2$

betina. Kadar hemoglobin dan hematokrit yang rendah ini sesuai dengan hasil pemeriksaan gejala klinis yang menunjukkan bahwa kebanyakan gajah PLG Sebanga yang diperiksa menderita anemia berkaitan dengan toksikasi, kadar nutrisi, dan infeksi sekunder.

Hubungan Kadar Pb dan Gambaran Darah

Penelitian ini dilakukan berdasarkan dugaan bahwa kondisi anemia dan gangguan kesehatan pada gajah di PLG Sebanga Riau mungkin disebabkan oleh keracunan Pb. Oleh sebab itu, pada penelitian ini dianalisis kemungkinan adanya kaitan antara tingginya kadar Pb dalam darah gajah yang diperiksa dengan gambaran darahnya.

Mikota *et al.* (2000) melaporkan bahwa kadar Pb dalam air kelima sumur yang menjadi sumber air minum gajah di PLG Sebanga berkisar antara 0,13 – 0,19 ppm. Menurut laporan Morse *et al.*, (1992) hasil penelitian pada hewan coba menunjukkan bahwa kadar Pb 0,6 ppm atau lebih merupakan batas ketentuan diagnostik meskipun tanpa menunjukkan gejala klinis. Selain itu, menurut Darmono (1995) anemia merupakan salah satu akibat utama keracunan Pb. Goldberg (1988) menyatakan bahwa paling sedikit 3 enzim terlibat dalam biosintesis heme akan dihambat oleh Pb di dalam mitokondria dan sitoplasma sel eritroid.

Ketiga enzim tersebut adalah 5-aminolevulinat dehidratase, ferroselatase (FERRO-C) dan koproporfirinogen oksidase (KOPRO-O). Enzim d-ALAD merupakan enzim yang berperan dalam sintesis heme yang paling sensitif terhadap Pb. Plumbum juga menghambat enzim ferroselatase (hemesintetase) dengan mengikat pada ikatan sulfidril (-SH) sehingga akan muncul sel eritrosit muda yang masih berinti di dalam sirkulasi perifer. Gangguan sistem enzim ini akan menurunkan kemampuan tubuh untuk mensintesis Hb sebagai pembawa O₂ yang diperlukan dalam proses respirasi (Koay dan Walmsley, 1989; Arms, 1990; Mitema *et al.*, 1990; WHO (1995).

Pada sel darah merah menurunkan sintesis monooksigenase (sitokrom-P450) mengikat haemoglobin. Anemia pada keracunan Pb terjadi akibat gangguan sintesis heme (Campbell *et al.*, 1987; Goldberg, 1988; Saryan dan Zenz, 1994; Goldstein dan Kipen, 1994;). Inhibisi terhadap d-ALAD berhubungan dengan konsentrasi Pb dalam darah. Kadar Pb darah sebesar 15 mg/dl dapat menghambat aktivitas d-ALAD hampir 50% (DeRoos, 1997). Keracunan Pb juga

diperkirakan menghambat enzim pirimidin-5' nukleotidase sehingga masa hidup eritrosit lebih singkat, suatu kondisi yang memicu terjadinya anemia hemolitik akibat destruksi eritrosit (Rugo dan Damon, 1990). Hal inilah yang menyebabkan penetapan kadar Pb darah merupakan pemeriksaan laboratorium yang paling dipercaya untuk diagnosis keracunan Pb (Lewis, 1990). Terhambatnya jalur sintesis heme ini tidak hanya mempengaruhi sintesis eritrosit atau sel darah yang lain, tetapi juga sistem sitokrom dan respirasi selular. Efek Pb juga dapat menghambat pompa Na⁺/K⁺-ATP dan menempel pada membran eritrosit sehingga melisiskannya (Habal, 2006).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tingginya kadar Pb darah gajah yang diperiksa tidak berpengaruh baik langsung ataupun tidak langsung, dengan variasi dan rendahnya kadar hemoglobin atau hematokrit. Oleh karena itu, diperkirakan kondisi anemia yang diderita oleh gajah tersebut bukan hanya sebagai akibat keracunan Pb saja melainkan akibat faktor lain seperti adanya infeksi sekunder seperti kuman dan parasit darah serta rendahnya kadar gizi. Hal ini didukung oleh laporan Mikota *et al.*, (2000) sebelumnya bahwa semua gajah yang ada di PLG Sebanga menderita parasit darah (*Anaplasmosis*, *Theileriasis* dan/atau *Babesiosis*), infeksi bakteri *enterobacter* dan 47% di antaranya kekurangan gizi. Menurut Underwood (1977) bahwa hewan yang terpapar Pb lebih peka terhadap infeksi.

Meskipun demikian, peningkatan Pb dalam darah gajah tersebut perlu diwaspadai karena Pb adalah racun multiorgan, sedangkan perhatian yang menyeluruh terhadap gajah yang ada di PLG untuk mengidentifikasi gejala klinis penyakit secara lengkap belum dapat dilakukan. Matthew dan Lawson (1979) menyatakan bahwa akumulasi Pb dalam waktu lama akan berpengaruh pada sistem pencernaan, syaraf, sistem kardiovaskular dan pada sumsum tulang belakang. Keracunan Pb ringan pada anak-anak umumnya terlihat secara klinis sebagai sakit gastrointestinal non-spesifik dan gangguan neurobehavior atau abnormalitas perkembangan, dan pada orang dewasa hal ini terwujud sebagai anoreksia, *fatigue*, nyeri perut abdominal, muntah, konstipasi, diare, nyeri kepala, tidak mampu berkonsentrasi dan melaksanakan tugas rumit, depresi dan penurunan libido.

Kemungkinan bahwa peningkatan Pb sebesar 0,34 - 0,46 ppm belum mengganggu sis-

tem eritropoiesis pada sumsum tulang sehingga pengaruh atau kaitannya dengan perubahan kadar hemoglobin dan hematokrit belum terlihat nyata. Pengaruh toksisitas Pb berbeda menurut spesies. Pada tikus putih kadar Pb darah 0,5 ppm menunjukkan indikasi keracunan disertai dengan perubahan hematologis. Sementara manusia sudah dianggap keracunan Pb apabila kadar Pb darah melebihi 1 ppm (Habal, 2006).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kadar plumbum darah gajah sumatra yang diamati melampaui batas indikasi keracunan Pb. Kadar hemoglobin (Hb) dan hematokrit (Ht) darah lebih rendah daripada kadar Hb dan Ht normal. Kadar Hb dan Ht lebih tinggi pada gajah jantan daripada gajah betina.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Proyek DASK Program Peningkatan Pendidikan Tinggi Universitas Syiah Kuala. No: 437. 3 Oktober 2003. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada petugas PLG Riau dan staf laboratorium FMIPA dan FKH Unsyiah.

DAFTAR PUSTAKA

- Aiello SE. 1998. The Merck Veterinary Manual. New Jersey, US. 8th ed. Merck and Co. Inc., Whitehouse Station,
- Arms. 1990. Environmental Science. 4th. Ed. Philadelphia. Saunders Collage Publishing.
- Arnold E. and Grenberg A. 1992. Standard methods for examination of water and waste product. 6th ed. New York. Scott, Foresman and Co.,
- ATSDR, 199. Toxicological profile for lead. Agency for toxic substances and disease registry. Washington D. C., USA.
- Bodgen JD, Gertner SB, Kemp FW, McLeod R, Bruening KS and Chung HR. 1991. Dietary lead and calcium; Effects on blood pressure and renal neoplasia in Wistar rats. *J Nutr.* 121: 718-728.
- Campbell BC, Brodie MJ, Thomsonson GG. 1987. Alterations the activity of enzymes of heme biosynthesis in lead poisoning and acute hepatic porphria. *Clin Sci Mol Med* 63:435-440
- Clayton GD and Clayton FE. 1994. Patty's Industrial Hygiene and Toxicology. 4th ed. New York. John Wiley and Sons Inc.
- Darmono A. 1995. Logam dalam Sistem Biologi Makhluk Hidup. Jakarta. UI Press.
- DEQ. Department of Environmental Quality. 2006. Lead Toxicity. <http://www.michigan.gov/deg>.
- DeRoos FJ. 1994. Smelters and metal reclaimers in occupational, industrial and environmental toxicology. New York. Pergamon Press,
- Goldberg A. 1988 Lead poisoning as a disorder of hem synthesis. *Semin Hematol.* 25:425-433.
- Goldstein BD, Kipen HM. 1994. Hematologic disorders. In: levy and Wegman (eds): Occupational Health, Recognizing and Preventing Work-Related Diseases. 3rd ed. Little Brown and Co., USA.
- Talavera F, Sharma OP, Rice TD and Pinsky MR, e-medicine. <http://www.eMedicine.com>. 19 September 2007.
- Koay ESC, Walmsley RN. 1989. Handbook of Chemical Pathology. 4th. Ed. Singapore. P.G. Publishing.
- Kolmer JA, Spaulding EH, Robinson HW. 1986. Approved Laboratory technic. 8th. Ed. New York. Appleton Century-Crofts. Inc.
- Lewis R. 1990. Metals. In LaDou, J. (ed). Occupational Medicine. Connecticut. Appleton and Lange.
- Martin DW. 1985. Porphyrins and Bile Pigments in Martin DW, PA Mayes, VW Rodwell. Harper's Review of Biochemistry. 19th Ed. New York. Lange Medical Publication.
- Matthew H, Lawson AAH. 1979. Penanggulangan Keracunan Akut. Edisi ke-4. Jakarta. Medipress,
- Mikota SK, Sargent EL, Ranglack GS. 1994. Medical Management of the Elephant. Indira Publishing House, Michigan. USA.
- Mikota SK, Hammatt H, Azmi W and Manullang BO. 2000. Medical evaluation of Captive elephants Sebang, Duri. Elephants Conservation Center Riau Province, Sumatra, Indonesia. Report of Sumatran Elephants Conservation.

- Morse BS, Germano GJ, Giuliani DG. 1992. Abnormal erythroid maturation following acute lead toxicity in mice. *Blood* 69:813-820.
- Oser BL. 1976. Hawk's Physiological Chemistry. 14th ed. New Delhi. TATA McGraw-Hill Publishing Co.Ltd.
- Ralfe S. 2003. Lead Toxicity. Health, Wealth and Happiness. <http://www.detoxamin.com>. 26 August 2006.
- Rateliffe JM. 1981. Lead in the environment. Ellis Horwood, New York.
- Reliegh A, Simbolon P. 1985. Elephant in Northern Sumatra. Prepared for The Directorate General of Forest Protection and Nature Conservation IUCN/ WWF Conservation for Development Programmed Bogor, Mey 1985.
- Rugo HS, Damon LE. 1990. Occupational Hematology. In: LaDou J. (ed): Occupational Medicine. Connecticut. Appleton and Lange,
- Saryan LA, Zenz C. 1994. Leads and its compounds. In: Zenz C. Occupational Medicine. Connecticut. Appleton and Lange.
- Schaedler RW. 1993. The relationship between the host and its intestinal microflora. *Proc Nutr Soc.* 57: 241-247.
- Six KM, Goyer RA. 1985. Experimental enhancement of lead toxicity by low dietary calcium. *J Lab Clin Med.* 96:1033-1042.
- Underwood EJ. 1977. Trace Elements in Human and Animal Nutrition. 4th. Ed. New York. Academic Press.
- WHO. 1977. Lead. Environmental Health Criteria 3 Geneva. World Health Organization.
- WHO. 1995. Inorganic Lead Environmental Health Criteria 165. World Health Organization Geneva.
- Wood JM, Chech, Dizikes A, Ridley LJ, PRakow WS, Lakowicz JR. 1998. Mechanisms for biomethylation of metals and metalloids. *Fed Proc* 57:66-71.