

Seroprevalensi Virus *Egg Drop Syndrome* pada Bebek Petelur di Kecamatan Negara, Kabupaten Jembrana, Provinsi Bali

(SEROPREVALENCE OF EGG DROP SYNDROME VIRUS IN LAYER DUCKS
IN NEGARA DISTRICT, JEMBRANA REGENCY, BALI PROVINCE)

**Gusti Ayu Yuniati Kencana¹,
I Made Kardena², Putu Mira Puspitayani³,**

¹Laboratorium Virologi Veteriner,

²Laboratorium Patologi Veteriner

³Mahasiswa Program Pendidikan Dokter Hewan
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,
Jln. Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesia 80234
Telpon 0361 223791; Email: yuniati_kencana@unud.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui seroprevalensi penyakit *egg drop syndrome* (EDS) pada bebek petelur di Kecamatan Negara, Jembrana, Bali. Sebanyak 180 sampel serum bebek petelur dengan sistem pemeliharaan yang berbeda digunakan untuk sampel penelitian. Dari 180 sampel serum, sebanyak 90 sampel diambil dari bebek dengan sistem pemeliharaan ekstensif (dilepas di sawah), sedangkan 90 sampel serum lainnya diambil dari bebek yang dipelihara secara intensif (dikandangkan) dari peternakan rakyat di enam enam desa di Kecamatan Negara yang diambil secara acak. Seluruh sampel diambil dari bebek yang tidak divaksinasi terhadap EDS. Pemeriksaan serum dilakukan dengan uji hemaglutinasi (HA/HI). Data dianalisis dengan menggunakan analisis chi-kuadrat (X^2). Hasil pengujian menunjukkan bahwa serum bebek petelur yang dipelihara di Kecamatan Negara memiliki titer antibodi EDS 2^3 sampai 2^9 HI unit. Pada bebek petelur yang dipelihara dengan cara ekstensif sebanyak 68 (75,56%) sampel serum positif mengandung titer antibodi terhadap virus EDS, sedangkan pada bebek yang dipelihara secara intensif sebanyak 18 (20%) positif mengandung titer antibodi virus EDS. Penelitian ini menunjukkan bahwa bebek petelur di enam desa di Kecamatan Negara baik yang dipelihara secara ekstensif maupun intensif walaupun tidak divaksinasi namun memiliki antibodi terhadap virus EDS dengan bebek petelur yang dipelihara dengan cara ekstensif memiliki persentase seroprevalensi lebih tinggi jika dibandingkan dengan cara intensif

Kata-kata kunci: *egg drop syndrome* (EDS); bebek; seroprevalensi

ABSTRACT

A study was conducted to determine disease seroprevalence of *egg drop syndrome* (EDS) virus in layer ducks in Negara district, Jembrana, Bali. A total of 180 samples of laying duck serum with different management systems were used in this research. A number of 90 serum out of 180 samples were taken from ducks with an extensive management system (reared in the ricefield), and 90 other serum samples were taken from intensive ducks (caged) from community farms in six villages randomly taken from Nagara districts. Serum sampel were collected from EDS un-vaccinated ducks. Serum samples were tested using an hemagglutination/inhibition test (HA/HI test). Data were analyzed using chi-quadrat analysis (X^2). The results showed that duck layers maintained in n Negara district had EDS antibody titer of 23 to 29 HI units. The results showed that 68 (75.56%) of layer ducks with an extensive management system have EDS antibody titer, whereas only 18 (20%) of layer ducks with an intensive management system have EDS antibody titer. This indicates

layer ducks in both management systems have antibody to EDS virus without EDS vaccination and that the layer ducks reared in ricefield has higher seroprevalence percentage than layer ducks reared in intensive cages.

Keywords: egg drop syndrome (EDS); duck; seroprevalence

PENDAHULUAN

Penyakit *egg drop syndrome* (EDS) merupakan salah satu penyakit unggas yang menyebabkan kerugian ekonomi cukup besar, salah satunya pada sektor peternakan bebek petelur. Penyakit EDS pada bebek disebabkan oleh *duck adenovirus A*, dari *genus Atadenovirus*, yang merupakan *family Adenoviridae* (Ivanics *et al.*, 2001). Penyakit EDS ini menyerang organ saluran urogenitalis unggas di antaranya pada itik, ayam, kalkun, burung puyuh dan angsa, yang ditandai dengan gangguan pada sistem reproduksi sehingga mengakibatkan penurunan produksi telur (Kencana, 2012). Pada kondisi sehat, bebek bertelur mulai umur 22 minggu, dan pada umur 28 hingga 72 mampu memproduksi secara optimal sampai pada umur 2 tahun memasuki fase akhir produksi telur. Namun, jika penurunan produksi telur terjadi sebelum bebek mencapai fase akhir, kemungkinan besar bebek terinfeksi oleh penyakit EDS (Kang *et al.*, 2017).

Penyakit EDS pertama kali ditemukan di Belanda pada tahun 1976 dan dilaporkan oleh Van Eck *et al.* (1976) sehingga disebut dengan *egg drop syndrome-76* atau EDS-76 (Kencana, 2012). Penyakit EDS pernah dilaporkan menjadi kasus luar biasa di Bangladesh karena telah terjadi wabah yang menyebabkan penurunan produksi telur lebih dari 50% (Alam *et al.*, 2009). Virus penyakit EDS yang berhasil diisolasi pada kasus tersebut memiliki titer berkisar 2^6 sampai 2^9 HA unit yang diisolasi dari ayam dan bebek petelur (Begum *et al.*, 2013). Di Indonesia, enam isolat lapang EDS juga telah berhasil dikarakterisasi dari sampel ayam yang terinfeksi EDS berasal dari peternakan ayam petelur di daerah Bogor, Medan dan Surabaya (Kencana *et al.*, 2017^a). Di antara ketiga isolat tersebut, isolat asal Medan telah diuji coba sebagai kandidat vaksin EDS yang dapat direkomendasikan untuk vaksin EDS (Kencana *et al.*, 2018). Pada umumnya untuk memproduksi vaksin EDS digunakan telur bebek berembrio, hal ini karena virus EDS dapat tumbuh dengan baik pada telur bebek berembrio sedangkan pada telur ayam berembrio

virus EDS tidak mau tumbuh (Gutter *et al.*, 2008).

Pencegahan penyakit EDS dilakukan dengan cara vaksinasi, baik itu dengan vaksin EDS tunggal maupun vaksin EDS yang dikombinasi dengan vaksin agen penyakit lain misalnya vaksin kombinasi ND-AI-EDS yang mampu menghasilkan titer antibodi $2^{6.4}$ HI unit, tiga minggu pascavaksinasi (Kencana *et al.*, 2017^b). Pemberian vaksin kombinasi ND-AI-EDS diharapkan dapat menanggulangi tiga penyakit virus sekaligus. Penggunaan vaksin kombinasi lebih efisien dan ekonomis karena dapat diberikan sekali untuk mencegah tiga penyakit sehingga menurunkan tingkat stres pada ayam akibat divaksinasi berulang-ulang.

Penyebaran penyakit EDS dapat terjadi secara vertikal dan horizontal (McFerran dan Smyth, 2000), selain itu pola pemeliharaan dengan cara dilepaskan di areal persawahan juga berpengaruh terhadap penyebaran virus EDS. Hasil *survey* serologis menunjukkan bahwa bebek yang dipelihara di lahan terbuka atau secara ekstensif berisiko 90% terpapar virus EDS dan memperlihatkan titer antibodi secara konsisten meskipun bebek tidak divaksinasi (Suresh *et al.*, 2013). Oleh karena itu bebek dapat dipandang sebagai indikator yang sangat peka terhadap persebaran virus EDS di suatu wilayah (McFerran dan Smyth, 2000). Penyakit EDS dapat diidentifikasi secara serologi dengan uji hemaglutinasi dengan menggunakan indikator darah ayam. Virus EDS hanya mengaglutinasi sel darah merah unggas tetapi tidak mengaglutinasi sel darah merah mamalia (Rasool *et al.*, 2005). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan seroprevalensi virus EDS antara bebek yang dipelihara secara ekstensif dan intensif di Kecamatan Negara, Jembrana, Bali.

METODE PENELITIAN

Pengambilan sampel

Pada penelitian ini dikoleksi 180 sampel serum bebek petelur yang diambil dari 18 peternakan bebek di Kecamatan Negara, yaitu sebanyak lima sampel serum darah bebek

petelur dari masing–masing peternakan dengan pola pemeliharaan yang berbeda, yaitu yang dipelihara dengan cara ekstensif (dilepaskan di sawah) atau yang dipelihara secara intensif (dikandangkan). Sampel serum diambil dari bebek-bebek peternak di enam desa meliputi: Desa Kaliakah, Baluk, Berambang, Banyubiru, Tegal Badeng Barat, dan Tegal Badeng Timur. Darah bebek diambil melalui *vena brachialis* dengan menggunakan spuit 2,5mL. Spuit yang telah berisi darah diletakkan pada posisi miring sampai seluruh serum keluar. Serum dipisahkan dari bekuan darah selanjutnya ditampung dengan tabung mikro steril. Sampel serum tersebut selanjutnya diuji dengan hambatan hemaglutinasi (*heamaglutination inhibition*= HI).

Pengujian *Haemaglutination Inhibition* terhadap Virus EDS

Pengujian HA/HI terhadap virus EDS dilaksanakan dengan metode mikrotiter standard (OIE, 2006) dengan menggunakan antigen (kontrol positif) berupa antigen virus EDS 76 dengan titer 4 unit HA (2⁴) dan kontrol positif serta negatif EDS antiserum (PT. Sanbio Laboratories, Bogor, Indonesia).

Analisis Data

Titer antibodi dihitung nilai rataannya untuk setiap desa. Seroprevalensi ditentukan dengan menghitung proporsi hasil uji sampel serum positif EDS dibandingkan dengan total sampel serum bebek yang diambil (Jewell *et al.*, 2004). Persentase seroprevalensi = [(jumlah serum positif (+) hasil uji) x (jumlah seluruh sampel)⁻¹] x 100%. Data persentase titer antibodi EDS yang diperoleh dari masing-masing desa dihitung dengan cara membagi jumlah sampel positif EDS dengan total sampel dan dianalisis menggunakan analisis chi-kuadrat (X²).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengujian serologi HI menunjukkan bahwa bebek petelur di Kecamatan Negara yang dipelihara secara ekstensif maupun intensif memiliki antibodi terhadap virus EDS dengan titer antara 8 sampai 512 HI unit. Rataan titer antibodi pada terhadap virus EDS pada bebek di setiap desa, disajikan pada Tabel 1.

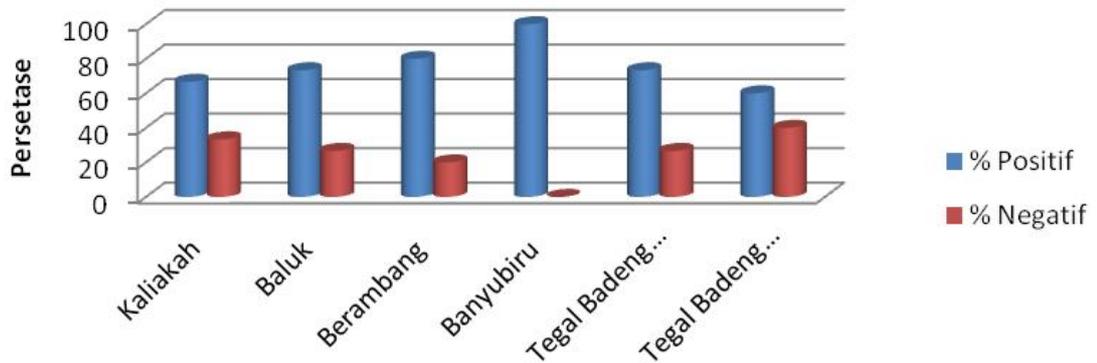
Nilai seroprevalensi terhadap virus EDS di masing–masing desa menunjukkan perbedaan nilai antar bebek yang dipelihara secara ekstensif dan intensif, seperti dimuat pada Gambar 1 dan 2

Ditinjau dari pola pemeliharaannya, bebek petelur yang dipelihara secara ekstensif memiliki prevalensi antibodi terhadap virus EDS sebesar 75,56%, sedangkan bebek petelur yang dipeliharannya secara intensif di kandang memiliki persentase seropositif terhadap virus EDS sebesar 20% (Gambar 3).

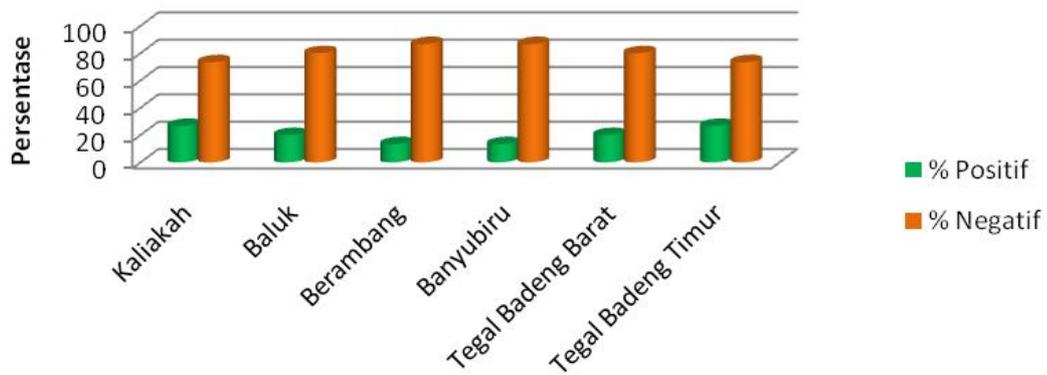
Berdasarkan hasil pemeriksaan antibodi terhadap virus EDS dengan uji HI (Tabel 1), seropositif ditemukan pada sampel yang diambil dari bebek yang digembalakan maupun dikandangkan dengan nilai rataannya titer antibodi bebek yang dipelihara intensif lebih rendah jika dibandingkan dengan titer antibodi bebek yang dipelihara secara ekstensif. Bebek petelur yang dikandangkan memiliki nilai rataannya titer antibodi tertinggi yang berasal dari sampel yang diambil dari desa Baluk dengan rataannya titer antibodi sebesar 6,40 ± 13,25 HI unit, sedangkan pada bebek petelur yang dipelihara secara ekstensif memiliki nilai rataannya titer antibodi tertinggi yang berasal dari sampel yang diambil di Desa Tegal Badeng Barat dengan rataannya titer antibodi 128,00 ± 14,05 HI unit. Hasil ini menunjukkan kemungkinan bahwa kandungan bebek petelur dapat mengurangi risiko tertularnya bebek dari virus EDS yang

Tabel 1. Nilai rataannya titer antibodi virus *egg drop syndome* (EDS) pada bebek petelur di Kecamatan Negara, Jembrana, Bali

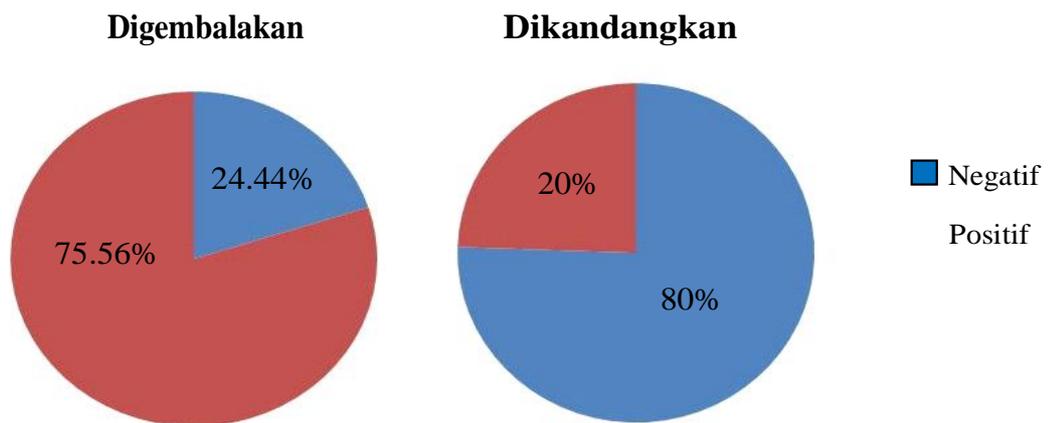
Desa	Rataan titer antibodi virus EDS (HI unit)	
	Dilepaskan di sawah (ekstensif)	Dikandangkan (intensif)
Kaliakah	59,73 ± 69,34	3,20 ± 5,89
Baluk	27,20 ± 42,20	6,40 ± 13,25
Berambang	74,67 ± 50,84	3,20 ± 8,97
Banyubiru	59,73 ± 37,99	3,20 ± 8,97
Tegal Badeng Barat	128,00 ± 14,05	5,33 ± 11,58
Tegal Badeng Timur	65,60 ± 82,27	4,80 ± 9,47



Gambar 1. Diagram perbandingan persentase seroprevalensi terhadap virus egg drop syndrome (EDS) pada bebek petelur yang digembalakan di sawah pada masing- masing desa



Gambar 2. Diagram perbandingan persentase seroprevalensi terhadap virus egg drop syndrome (EDS) pada bebek petelur yang dipelihara secara intensif pada masing-masing desa



Gambar 3. Diagram perbandingan nilai persentase prevalensi bebek petelur yang memiliki antibodi terhadap virus egg drop syndrome (EDS) berdasarkan pola pemeliharaannya

bersirkulasi di lingkungan luar. Nilai rata-rata titer antibodi EDS pada bebek tersebut menunjukkan titer protektif, karena nilai titer yang ditunjukkan angkanya di atas 2^4 HI unit (16 HI unit) (Chen *et al.*, 2013). Bebek petelur dengan titer antibodi protektif, memiliki kekebalan terhadap infeksi virus EDS, sehingga jika bebek terinfeksi virus EDS tidak akan menunjukkan gejala klinis (sub klinis).

Pada Gambar 1 disajikan persentase nilai seroprevalensi terhadap virus EDS pada bebek petelur yang dipelihara secara ekstensif, yaitu dengan persentase tertinggi berasal dari Desa Banyu biru dengan jumlah seropositif sebanyak 15 ekor (100%) dari 15 sampel serum yang diperiksa. Hal ini menunjukkan bahwa semua bebek petelur yang dipelihara dengan cara ekstensif di Desa Banyu biru yang diambil sampelnya telah terinfeksi virus EDS dari lingkungan karena bebek tersebut belum pernah mendapat vaksinasi. Hal ini diperkuat dengan informasi yang diberikan oleh peternak bahwa hampir setiap hari ditemukan telur bebek yang tidak memiliki kerabang atau memiliki kerabang yang sangat tipis. Yang perlu mendapat perhatian adalah bahwa Desa Banyu biru merupakan tempat pembibitan bebek petelur dan selanjutnya didistribusikan ke desa-desa lain di Kecamatan Negara (bahkan ke luar Kecamatan Negara), sehingga bebek di Desa Banyubiru berpotensi menyebarkan virus EDS lebih tinggi dibandingkan bebek dari desa lainnya. Tingginya nilai seroprevalensi di wilayah Banyu biru menunjukkan bahwa ada banyak virus EDS yang bersirkulasi di lingkungan tempat pemeliharaan dan wilayah pemeliharaan bebek petelur (Dessie dan Ogle, 2001), walaupun hal ini belum dibuktikan dengan diisolasinya virus EDS dari kasus klinis maupun sub-klinis EDS pada bebek di desa tersebut.

Pada Gambar 2 disajikan persentase nilai seroprevalensi terhadap virus EDS pada bebek petelur yang dipelihara dengan cara intensif walaupun bebek-bebek ini tidak pernah diberi vaksinasi EDS. Dari hasil uji serologi HA/HI, bebek-bebek Desa Tegal Badeng Timur dan Desa Kaliakah menunjukkan nilai seroprevalensi yang lebih tinggi dibandingkan desa lainnya. Bebek petelur yang memiliki seropositif EDS di desa tersebut sebanyak empat ekor (26,67%). Hal ini menunjukkan bahwa bebek petelur yang dipelihara secara intensif juga memiliki peluang meskipun rendah untuk terinfeksi virus EDS. Nilai prevalensi seropositif EDS dari bebek di

masing-masing desa kurang dari 30%, artinya bebek petelur yang dipelihara secara intensif memiliki peluang terinfeksi virus EDS kurang dari 30%.

Pada Gambar 3 disajikan nilai seoprevalensi bebek petelur terhadap virus EDS di Kecamatan Negara berdasarkan pola pemeliharaan. Bebek-bebek yang dipelihara secara ekstensif memiliki prevalensi sebesar 75,56%, sedangkan pada yang dipelihara secara intensif prevalensinya hanya 20%. Hal ini menunjukkan bahwa bebek petelur yang digembalakan di sawah memiliki seroprevalensi lebih tinggi dibandingkan dengan bebek yang dipelihara dengan cara dikandangkan. Hal ini menunjukkan bahwa bebek petelur yang dipelihara secara ekstensif (digembalakan di sawah) lebih rentan terinfeksi virus EDS daripada yang dipelihara secara intensif. Menurut Suresh *et al.* (2013) dan Rasool *et al.* (2005) titer antibodi-unggas yang dipelihara secara liar atau dilepaskan di area yang terbuka menunjukkan titer antibodi EDS secara konsisten meskipun belum divaksinasi, sehingga dapat dijadikan sebagai indikator untuk menentukan kepekaan terhadap virus EDS

Wilayah penggembalaan yang digunakan tidak hanya berada pada satu area persawahan, tetapi berpindah-pindah sesuai dengan musim panen padi tiba. Proses pemeliharaan ekstensif ini memerlukan alat transportasi untuk mengangkut bebek dari satu area sawah ke area sawah lainnya. Selain itu kontak dengan unggas liar, misalnya burung di sawah juga merupakan faktor yang dapat menyebabkan penularan virus EDS secara cepat. Dewasa ini EDS dapat ditularkan melalui kontak langsung antara bebek yang terinfeksi dengan bebek yang sehat. Virus EDS menular lewat *droplet* dan feses bebek ataupun unggas yang terinfeksi (Kencana, 2012).

Penularan EDS juga dapat terjadi pada bebek petelur yang dipelihara intensif secara vertikal melalui telur tetas yang terinfeksi, sehingga *day old duck* (DOD) terinfeksi virus EDS. Jika embrio atau bebek yang terinfeksi belum mencapai dewasa kelamin maka virus dapat bersifat laten dan dapat ditemukan sampai bebek mencapai dewasa kelamin (McFerran dan Smyth, 2000). Virus EDS aktif setelah bebek mencapai umur 18 minggu atau pada saat bebek mulai bertelur akibat pengaruh dari hormon-hormon reproduksi, seperti *follicle stimulating hormone* (FSH), *luteinizing hormone* (LH), estrogen dan progesteron, yang berkontribusi

terhadap perbanyak virus EDS (Liu *et al.*, 2003; Ilyas *et al.*, 2004).

SIMPULAN

Bebek petelur yang diambil sampelnya dari enam (6) desa di Kecamatan Negara baik yang dipelihara dipelihara secara ekstensif maupun intensif walaupun tidak pernah divaksinasi EDS memiliki antibodi terhadap virus EDS dengan tingkat seroprevalensi lebih tinggi pada bebek yang dipelihara ekstensif yakni sebesar 75,56% dan bebek yang dipelihara secara intensif sebesar 20%. Selain prevalensi lebih tinggi, nilai rata-rata titer antibodi terhadap virus EDS di masing-masing desa pun lebih tinggi pada bebek yang dipelihara ekstensif dibandingkan dengan bebek yang dipelihara secara intensif

SARAN

Vaksinasi sangat disarankan untuk bebek petelur yang dipelihara baik dengan cara dikandangkan maupun digembalakan untuk menekan EDS, khususnya di Kecamatan Negara. Selain itu perlu dilakukan isolasi virus EDS yang bersirkulasi di daerah tersebut.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada PT. Sanbio Laboratories yang telah memfasilitasi antigen dan antiserum EDS dan kepada staf Laboratorium Virologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana dan para peternak bebek petelur di Kecamatan Negara yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam J, Mamun MA, Samad MA, Ullah MR, Giasuddin M, Taimur MJFA. 2009. Outbreak of Egg Drop Syndrome in Bangladesh. *International Journal of Biology* 1(1): 56-64.
- Begum JA, Chowdhury EH, Parvin R, Matin MA, Glasuddin M, Bari ASM, Islam MR. 2013. Detection of Egg Drop Syndrome Virus by Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Livestock Research*. 3(2): 112-116.
- Chen SY, Kang M, Park CK, Choi KS, Jang HK. 2013. Epidemiology of Egg Drop Syndrome Virus in Ducks from South Korea. *Poultry Science* 92: 1783-1789.
- Dessie T, Ogle B. 2001. Village poultry production system in the Central Highlands of Ethiopia. *Trop Anim Health Prod* 33: 521-537.
- Gutter B, Fingerut E, Gallili G, Eliahu D, Perelman B, Finger A, Pitcovski J. 2008. Recombinant Egg Drop Syndrome Subunit Vaccine Offers An Alternative To Virus Propagation In Duck Eggs. *J Avian Pathol* 37(1): 33-37.
- Ilyas MA, Husaain I, Siddique M, Rasool MH, Mansoor MK, Manzoor S. 2004. Evaluation of Egg Drop Syndrome Virus Vaccines by Measuring Antibody Levels in Egg Yolk in Layer. *Int J Agri Biol* 6(6): 981-983.
- Ivanics E, Palya V, Glávits R, Dán Á, Pálfi V, Révész T, Benkö M. 2001. The role of egg drop syndrome virus in acute respiratory disease of goslings. *Avian Pathol* 30:201-308.
- Jewell NP, Chapman, Hall. 2004. Statistic for epidemiology. *Journal of Epidemiologi & Community Health*. 59(7): 433.
- Kang M, Cha S, Jang HK. 2017. Tropism and infectivity of duck-derived egg drop syndrome virus in chickens. *Plos ONE* 12(5): e0177236.
- Kencana GAY. 2012. *Penyakit Virus Unggas*. Udayana University Press. Denpasar. Cetakan pertama. Hlm. 110-118.
- Kencana GAY, Suartha IN, Nurhandayani A, Syamsidar. 2017^a. The Characteristic of Egg Drop Syndrome Virus of Medan Isolate. *J Vet Med Anim Sci* 1(1): 15-19.
- Kencana GAY, Suartha IN, Wibawa IPWA. 2017^b. Respon Imun Primer Ayam Petelur Pasca Vaksinasi *Egg Drop Syndrome*. *Buletin Veteriner Udayana*. 9(2): 164-170.
- Kencana GAY., Suartha N, Kardena, IM, Kristina Dewi GAM, Nurhandayani A., Syamsidar and Kadek Karang Agustina, KK. 2018. Potential and safety tests of egg drop syndrome candidate vaccine from Medan isolate, Indonesia. *Veterinary World* 1(1): 1637-1640.
- Liu H, Naismith J, Hay R. 2003. Adenovirus DNA replication, In: Adenoviruses: Model and Vectors in Virus-Host Interactions. *Curr Top Microbiol Immunol* 272: 131-164.
- McFerran JB, Smyth JA. 2000. Avian Adenovirus. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 19(2): 589-601.

- Office International des Epizooties (OIE). 2006. Egg Drop Syndrome. Animal Disease Factsheets, The Center for Food Security and Public Health. Iowa State University, Ames, IA, USA.
- Rasool MH, Rahman SU, Mansoor MK. 2005. Isolation of egg drop syndrome virus and its molecular characterization using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *Pakistan Vet J* 25(4): 155-158.
- Suresh P, Shoba K, Rajeswar JJ. 2013. Incidence of egg drop syndrome – 1976 in Namakkal district, Tamil Nadu, India. *Vet World* 6(6):350-353.
- Van Eck JHH, Davelar FG, Van den Heuvel-Plesman TAM, Van Kol N, Kouwenhoven B, Guldic FHM. 1976. Dropped Egg Production, Soft Shell and Shell-less Egg Associated with Appearance of Preciriatins to Adenovirus in Flock of Laying Fowls. *Avian Pathol* 5: 261-276.