

Patogenitas *Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrosis Virus (*SpltMNPV*) dengan Bahan Pembawa Tepung Bengkuang yang Terpapar Sinar Matahari terhadap Lama Hidup Larva *Spodoptera litura*

Aprilianti Nindya Machfiroh, Mahanani Tri Asri, Yuni Sri Rahayu
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Surabaya

ABSTRAK

Spodoptera litura Multiple Nucleopolyhedrosis Virus (*SpltMNPV*) merupakan salah satu patogen serangga yang menginfeksi ulat grayak sehingga termasuk musuh alami ulat grayak. *SpltMNPV* sangat peka terhadap sinar matahari sehingga dapat menurunkan tingkat patogenitasnya. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi tepung bengkuang yang efektif untuk melindungi *SpltMNPV* dari paparan sinar matahari terhadap lama hidup ulat grayak. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL). Perlakuan dalam penelitian terdiri dari 1 faktor yaitu penambahan konsentrasi tepung bengkuang, sehingga diperoleh 4 perlakuan. Perlakukannya adalah *SpltMNPV* + kaolin (1:4) yang ditambah dengan konsentrasi tepung bengkuang 0%; 1%; 2,5%; dan 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada perlakuan *SpltMNPV* + kaolin (1:4) yang ditambah dengan konsentrasi tepung bengkuang 0%; 1%; 2,5%; dan 5% lama hidup ulat grayak berturut-turut sebesar 7 hari, 7 hari, 6 hari, dan 5 hari dengan persentase ulat grayak yang masih hidup sebesar 25%, 25%, 20%, dan 5%. Perlakuan *SpltMNPV* + kaolin (1:4) yang ditambah dengan konsentrasi tepung bengkuang 5% adalah perlakuan yang efektif melindungi *SpltMNPV* dari paparan sinar matahari

Kata kunci: ulat grayak; *SpltMNPV*; lama hidup; tepung bengkuang

ABSTRACT

Spodoptera litura Multiple Nucleopolyhedrosis Virus (*SpltMNPV*) is one of insects pathogens that infect armyworm so they can be as a natural armyworm enemies. The *SpltMNPV* are sensitive against the sun so that could reduce its pathogenicity level. This research aimed to determine the effective concentration of bengkuang flour to protect *SpltMNPV* against the sun exposure to maintain the length of life against armyworms. This research used a completely randomized design (CRD). The treatment consisted of one factors, namely bengkuang flour concentration with 4 treatments. The treatments were *SpltMNPV* + kaolin 1:4 added by bengkuang flour concentrations 0%, 1%, 2.5%, and 5% respectively. The result showed that *SpltMNPV* + kaolin 1:4 added by bengkuang flour concentrations of 0%, 1%, 2.5%, and 5% affected the length of armyworm life in 7 day, 7 day, 6 day, and 5 day respectively with percentage of armyworms 25%, 25%, 20%, and 5% respectively. The 5% concentration of bengkuang flour was the effective concentration to protect of *SpltMNPV* against the sun exposure.

Key words: armyworm; *SpltMNPV*; the length of life; bengkuang flour

PENDAHULUAN

Pengendalian hama ulat grayak dapat dilakukan dengan memanfaatkan musuh alami dari ulat grayak yaitu dengan menggunakan *Spodoptera litura* Multiple Nucleopolyhedrosis Virus (*SpltMNPV*). *SpltMNPV* termasuk famili Baculoviridae dari genus *Baculovirus*. *SpltMNPV* merupakan salah satu patogen serangga yang menginfeksi ulat grayak sehingga termasuk musuh alami ulat grayak.

Dalam pengaplikasian di lapang, *SpltMNPV* memiliki kelemahan yaitu *SpltMNPV* sangat peka terhadap sinar matahari sehingga dapat menurunkan tingkat patogenitasnya. Sinar matahari merupakan salah satu faktor yang dapat menurunkan tingkat patogenitas *SpltMNPV* yang

diaplikasikan di lapang. Sinar UV mempunyai panjang gelombang mulai 200 nm hingga 400 nm dengan efisiensi tertinggi untuk pengendalian mikroorganisme adalah pada 365 nm (Suwahyono dkk., 2003). Oleh karena itu, diperlukan suatu perlindungan terhadap radiasi sinar matahari agar tidak merusak organisme yang terpapar.

Arifin dkk. (1999) melaporkan bahwa dengan formulasi *SINPV* dengan dosis virus $4,8 \times 10^9$ PIBs/ml sebanyak 25 ml ditambah dengan 0,1% Triton x-100 dan 100 g kaolin pada dosis aplikasi 9×10^8 PIBs/ml di lapang, tingkat kematian ulat 70% dicapai pada hari ke-7. Hasil penelitian Bedjo (1997) *SINPV* dosis $1,5 \times 10^{11}$ PIBs/ml yang ditambah kaolin 5% mortalitas ulat grayak di lapang 45%, kaolin 20% mortalitas ulat grayak

53%, kaolin 40% mortalitas ulat grayak 70%. Berdasarkan penelitian tersebut maka perlu ditambah bahan pelindung lain untuk meningkatkan patogenitas *SpltMNPV*. Bahan yang dapat digunakan adalah tepung bengkuang.

Tepung bengkuang yang merupakan umbi dari tanaman bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) yang dibuat dalam bentuk tepung. Umbi bengkuang merupakan tanaman pangan dan sering dimanfaatkan sebagai masker pencerah kulit. Berdasarkan hal tersebut, umbi bengkuang memiliki potensi sebagai pelindung UV. Umbi bengkuang mengandung alkaloid dan saponin (Samsudin, 2009). Saponin bila bercampur dengan air akan menjadi busa dan dapat menurunkan tegangan permukaan. Busa yang dihasilkan akan membentuk selaput tipis yang melindungi virus dari paparan sinar matahari. Sinar matahari yang mengenai lapisan tipis sabun, sebagian berkas sinar matahari dipantulkan dan sebagian lagi dibiaskan kemudian dipantulkan lagi. Hal tersebut mirip dengan cara kerja deterjen dan pencerah optik yang telah terbukti dapat digunakan sebagai pelindung UV dengan cara memantulkan sinar UV (Tarigan *dkk.*, 2008). *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrosis Virus (*SeNPV*) dengan konsentrasi bahan pelindung tepung bengkuang dalam suspensi virus sebesar 1% yang dipaparkan sinar matahari selama 30 menit mampu menyebabkan kematian pada larva *Spodoptera exigua* sebesar 49,65% pada hari ke-6 setelah aplikasi (Samsudin, 2009).

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi tepung bengkuang yang efektif untuk melindungi *SpltMNPV* dari paparan sinar matahari untuk menjaga patogenitas *SpltMNPV* terhadap lama hidup ulat grayak.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan dalam skala laboratorium di Laboratorium Mikrobiologi Gedung C-9 Jurusan Biologi, FIMPA, Universitas Negeri Surabaya dan dilakukan pada bulan Juli 2012-Maret 2013. *SpltMNPV* berasal dari Wonosobo dan diperbanyak secara *in vivo* di Laboratorium Mikrobiologi UNESA. Tepung bengkuang dibuat dari umbi bengkuang (*Pachyrhizus erosus*) dengan ciri-ciri umbi yang sudah matang berwarna putih kecoklatan.

Penelitian ini menggunakan rancangan dasar RAL (Rancangan Acak Lengkap atau *Completely Randomized Design*). Perlakuan terdiri atas 1 faktor, yaitu penambahan konsentrasi tepung bengkuang sehingga diperoleh 4 perlakuan dengan 2 kali pengulangan setiap ulangan menggunakan 10 ekor ulat.

Persiapan suspensi virus: *SpltMNPV* sebanyak 7×10^8 PIBs/ml yang akan digunakan dalam perlakuan dihitung terlebih dahulu dengan menggunakan *haemocytometer* (Indrayani, 2002). Suspensi virus *SpltMNPV* diperoleh dari hasil perbanyakan secara *in vivo* yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, FMIPA-Universitas Negeri Surabaya.

Formulasi *SpltMNPV*: dilakukan dengan cara suspensi virus dengan konsentrasi 7×10^8 PIBs/ml sebanyak 2,5 ml ditambah Triton X-100 0,1% dari jumlah suspensi virus, suspensi ini selanjutnya ditambah dengan tepung bengkuang (0%; 1%; 2,5%; 5% dari volume virus) dan tepung kaolin dengan perbandingan virus dan kaolin 1:4 secara bertahap sambil diaduk sampai rata.

Pakan buatan dibuat berdasarkan cara pembuatan pakan buatan yang diperoleh dari Balittas, Malang 2011. Pakan buatan dimasukkan ke dalam botol kapsul sebanyak 0,2 ml.

Kontaminasi pakan *SpltMNPV*: virus dalam formulasi sebanyak 1 g dilarutkan dalam aquades sampai volume 10 ml dan diteteskan di atas permukaan pakan buatan sebanyak 0,2 ml. Botol kapsul yang berisi pakan yang terkontaminasi virus tersebut ditutup dengan plastik dan dipaparkan pada sinar matahari selama 12 jam. Ulat grayak yang akan diletakkan dalam botol vial dipuaskan selama 6 jam. Ulat grayak dipelihara secara individual. Setelah pakan yang terkontaminasi dengan *SpltMNPV* habis, maka ulat diberi pakan baru (pakan buatan) yang bebas virus.

Pengamatan lama hidup ulat dilakukan setiap 24 jam sekali dengan menghitung jumlah larva *S. litura* yang hidup dari setiap perlakuan dan diakhiri sebelum fase prepupa.

HASIL

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, lama hidup ulat grayak instar III yang telah terinfeksi *SpltMNPV* dengan bahan pembawa kaolin (1:4) dan tepung bengkuang tepung bengkuang bervariasi sesuai pemberian tepung bengkuang (Tabel 1.)

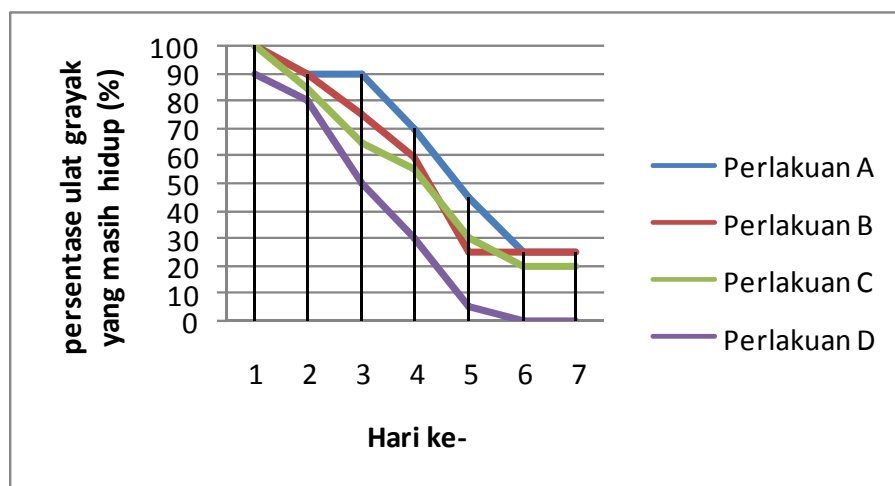
SpltMNPV yang diformulasikan dengan kaolin dan berbagai konsentrasi tepung bengkuang memberikan efek yang berbeda terhadap lama hidup ulat grayak, yaitu persentase ulat grayak yang masih hidup sampai pada hari ke-7 (Tabel 1.). Pada hari ke-5 persentase ulat grayak yang masih hidup pada perlakuan tepung bengkuang 0%; 1%; 2,5%; dan 5% secara berturut-turut sebesar 45%, 25%, 30%, dan 5%. Persentase ulat grayak yang hidup semakin kecil setiap harinya. Pada perlakuan tepung bengkuang 0%;

1%; 2,5%; dan 5% persentase ulat grayak yang masih hidup menunjukkan penurunan (70% menjadi 45%; 60% menjadi 25%; 55% menjadi 30%; dan 50% menjadi 5%) pada hari ke-5 (Gambar 1.). Pada hari ke-6 dan ke-7 persentase ulat grayak yang masih hidup pada perlakuan tepung bengkuang 0%; 1%; 2,5%; dan 5% berturut-turut sebesar 25%, 25%, 20%, 0%. Pada

hari ke-5 persentase ulat grayak yang masih hidup sudah di bawah 20% (tidak merusak tanaman secara ekonomi) pada perlakuan tepung bengkuang 5%. Pada hari ke-6 perlakuan tepung bengkuang 5% semua ulat uji mati. Setelah hari ke-7 semua ulat grayak yang masih hidup masuk stadia prepupa.

Tabel 1. Hasil pengamatan lama hidup ulat grayak setelah diberi pakan yang terinfeksi *SplMNPV* dengan bahan pembawa kaolin (1:4) dan tepung bengkuang dalam berbagai konsentrasi dalam satuan hari

Perlakuan tepung bengkuang (%)	Persentase ulat grayak yang masih hidup pada hari ke-						
	1	2	3	4	5	6	7
0	100	90	90	70	45	25	25
1	100	90	75	60	25	25	25
2,5	100	85	65	55	30	20	20
5	90	80	50	50	5	0	0



Gambar 1. Grafik persentase ulat grayak yang masih hidup setelah diberi pakan yang terinfeksi *SplMNPV* dengan bahan pembawa Kaolin (1:4) dan tepung bengkuang dalam berbagai konsentrasi

PEMBAHASAN

Berdasarkan Tabel 1 dan Gambar 1 dapat dilihat bahwa pada hari ke-1 sampai ke-4 pengaruh pemberian tepung bengkuang masih belum terlihat dengan baik pada semua perlakuan yang dapat dilihat dari persentase ulat grayak yang masih hidup masih diatas 20% (masih merusak tanaman secara ekonomi). Pengaruh pemberian tepung bengkuang terlihat pada hari ke-5.

Pada perlakuan tepung bengkuang 0% dengan penambahan kaolin 1:4 lama hidup ulat grayak 7 hari dengan persentase ulat grayak yang masih hidup sebesar 25%. Pada perlakuan ini formulasi bahan yang ditambahkan hanya kaolin dengan perbandingan virus dan kaolin 1:4. Perlindungan virus dari paparan sinar matahari

hanya pada kaolin sehingga lama hidup ulat semakin panjang.

Pada perlakuan tepung bengkuang 0% dan 1% lama hidup ulat grayak 7 hari dengan persentase ulat grayak yang masih hidup sebesar 25%. Ulat grayak mampu bertahan hidup sampai hari ke-7 disebabkan karena konsentrasi tepung bengkuang yang terlalu sedikit dan adanya enzim ekdisteroid UDP-glukosiltransferase (EGT). Enzim EGT diproduksi virus untuk menonaktifkan hormon molting serangga sehingga dapat memblokir ganti kulit dan pembentukan pupa dan larva. Pergantian kulit pada serangga (*molting*) dapat menyebabkan stress sehingga saat molting banyak serangga yang tidak mampu bertahan hidup. Virus menghasilkan enzim EGT dengan tujuan agar serangga tidak mengalami stress dengan cara

menghalangi pergantian kulit, dengan demikian memperpanjang lama hidup serangga. Semakin lama hidup serangga maka memungkinkan virus untuk melakukan replikasi pada waktu yang lama pada larva yang lebih besar juga sehingga jumlah virus yang dihasilkan lebih banyak (Rohrmann, 2008). Ulat yang sudah terserang virus masih dapat bertahan hidup dan terus makan sampai mati.

Pada perlakuan tepung bengkung 2,5% lama hidup ulat grayak 6 hari dengan persentase ulat yang masih hidup sebesar 20%. Pada perlakuan ini konsentrasi tepung bengkung sudah dapat melindungi virus dari paparan sinar matahari yang dapat dilihat dari jumlah ulat grayak yang masih hidup, yaitu sebesar 20%. Jumlah ulat grayak yang masih hidup sebesar 20% tidak merusak tanaman secara ekonomi.

Lama hidup ulat grayak pada perlakuan tepung bengkung 5% yang terpendek dari semua perlakuan. Hal tersebut dapat terjadi karena konsentrasi tepung bengkung yang terdapat pada perlakuan tersebut konsentrasi tepung bengkung 5% merupakan konsentrasi yang tertinggi dari semua perlakuan sehingga *SpltMNPV* yang terpapar sinar matahari terlindungi secara optimal dan tidak menurunkan patogenitasnya.

Pada perlakuan tepung bengkung 0%; 1%; 2,5%; dan 5% menyebabkan ulat grayak mati karena virus dengan ciri-ciri tubuh ulat menjadi lunak, rapuh, mudah robek, dan bila robek akan mengeluarkan cairan kental berwarna coklat susu yang merupakan *SpltMNPV*. Ulat uji yang masih hidup memasuki stadia prepupa dengan ciri-ciri tubuh ulat yang mulai memendek pada tiap segmennya. Saat memasuki masa pupa, ulat yang masih bertahan hidup menunjukkan gejala terinfeksi *SpltMNPV* yaitu pupa yang terbentuk menjadi abnormal sehingga pupa tersebut mati. Kematian ulat grayak akibat infeksi *SpltMNPV* bisa terjadi saat stadia larva, bila saat stadia larva masih dapat bertahan hidup, maka perkembangannya akan terganggu sampai stadia pupa dan imago.

Proses *SpltMNPV* menginfeksi ulat grayak dimulai dari masuknya *SpltMNPV* ke dalam tubuh ulat yang tertelan bersama-sama pakan yang telah mengandung *SpltMNPV*, kemudian melalui alat pencernaan inilah *SpltMNPV* menginfeksi nukleus sel yang peka terutama lapisan epitel ventrikulus dan hemosit yang berada dalam haemocoel ulat grayak. Infeksi *SpltMNPV* dalam tubuh ulat dapat terjadi jika usus ulat pada kondisi alkalis (pH > 9). Pada kondisi alkalis PIB akan melepaskan virion dari

selubung protein kemudian virion menembus jaringan peritrofik, dan mikrovili, kemudian akan memisahkan sel-sel kolumnar dan goblet sehingga pada akhirnya akan merusak seluruh jaringan usus dan kondisi di dalam haemolimfa akan terlihat seperti cairan keruh penuh *SpltMNPV*. Cairan *SpltMNPV* tersebut merupakan replikasi virion-virion yang baru terbentuk di dalam sel-sel haemocoel (rongga tubuh) dan jaringan lain seperti sel lemak, sel epidermis, hemolimfa dan trakea. Jaringan-jaringan tersebut dipenuhi oleh virion-virion sehingga terjadi lisis pada sel. Ulat akan mati setelah sebagian besar jaringan tubuhnya terinfeksi *SpltMNPV* (Smits, 1987).

SpltMNPV yang terpapar sinar matahari patogenitasnya akan menurun. Hal ini terjadi karena sinar matahari merupakan faktor utama yang membatasi persistensi virus pada lingkungan. Inaktivasi Virus oleh sinar matahari terutama disebabkan oleh sinar ultraviolet (UV) (Young, 2000). Radiasi ultraviolet merupakan suatu sumber energi yang mempunyai kemampuan untuk melakukan penetrasi ke dinding sel mikroorganisme dan mengubah komposisi asam nukleatnya. Absorpsi ultraviolet oleh DNA (atau RNA pada beberapa virus) dapat menyebabkan mikroorganisme tersebut tidak mampu melakukan replikasi akibat pembentukan ikatan rangkap dua pada molekul-molekul pirimidin (timin dan sitosin). Radiasi ultraviolet yang diabsorpsi oleh protein pada membran sel akan menyebabkan kerusakan membran sel dan kematian sel (Snider *et al.*, 1991 dalam Cahyonugroho, 2010). Pada penelitian ini radiasi ultraviolet diabsorpsi oleh protein yang terdapat pada selubung virus (*envelope*) akan menyebabkan kerusakan pada selubung tersebut sehingga terjadi kerusakan pada polihedra virus.

Umbi bengkung baik dalam bentuk filtrat maupun tepung memiliki potensi sebagai pelindung UV (Samsudin, 2009). Umbi bengkung mengandung alkaloid dan saponin. Saponin bila bercampur dengan air akan menjadi busa dan dapat menurunkan tegangan permukaan. Busa yang dihasilkan akan membentuk selaput tipis yang melindungi virus dari paparan sinar matahari. Sinar matahari yang mengenai lapisan tipis sabun, sebagian berkas sinar matahari dipantulkan dan sebagian lagi dibiarkan kemudian dipantulkan lagi. Hal tersebut mirip dengan cara kerja deterjen dan pencerah optik yang telah terbukti dapat digunakan sebagai pelindung UV dengan cara memantulkan sinar UV (Tarigan *dkk.*, 2008).

Kaolin termasuk bahan yang dapat memantulkan sinar matahari sehingga dapat digunakan sebagai pelindung organisme dari paparan sinar matahari. Kaolin merupakan salah satu bahan tabir surya yang dapat melindungi organisme dari paparan sinar matahari dengan menyerap radikal bebas oksigen dengan bantuan silikon sehingga sinar matahari yang terpapar dapat dipantulkan (Sridhar, 2008). Mineral penyerta lain yang terdapat pada kaolin seperti titanium dioksida (TiO_2) termasuk bahan yang dapat digunakan sebagai tabir surya karena bahan tersebut dapat memantulkan cahaya matahari (Harun, 2011). Kaolin yang disemprotkan pada tanaman akan menjadi semacam lapisan film yang melindungi tanaman atau buah-buahan dari hama sejenis serangga (Rahmawati, 2009).

Perlakuan tepung bengkuang 5% lama hidup ulat grayak 5 hari dan persentase ulat grayak yang masih hidup sebesar 5%, perlakuan tersebut merupakan perlakuan yang paling efektif untuk melindungi *SpLtMNPV* dari paparan sinar matahari sehingga dapat mengendalikan hama ulat grayak.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil simpulan bahwa konsentrasi tepung bengkuang 5% yang efektif sebagai bahan tambahan yang melindungi *SpLtMNPV* dari paparan sinar matahari. Sebagai saran untuk penelitian lebih lanjut perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh lama penyimpanan *SpLtMNPV* dengan bahan pembawa kaolin dan tepung bengkuang terhadap patogenitas *SpLtMNPV* dalam skala laboratorium maupun dalam skala lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

Arifin M, Villayanti I, dan Alwi A, 1999. Keefektifan SINPV pada Berbagai Bahan Formulasi Terhadap Ulat Grayak, *Spodoptera litura* (F.) pada Kedelai, p. 149-158. Dalam I. Prasadja *et al.*, *Prosiding Seminar Nasional Peranan Entomologi dalam Pengendalian Hama yang Ramah Lingkungan dan Ekonomis*. Bogor, 16 Februari 1999. PEI Cabang Bogor.

- Cahyonugroho OH, 2010. Pengaruh Intensitas sinar Ultraviolet dan Pengadukan Terhadap Reduksi Jumlah Bakteri *E. coli*. *Skripsi*. Tidak dipublikasikan. Surabaya: Universitas Pembangunan Nasional "Veteran".
- Harun ES, 2011. *Peranan tabir surya di Negara tropis*. <http://jurnal.pdii.lipi.go.id/admin/jurnal/64952531.pdf>. Diunduh tanggal 07 Nopember 2012.
- Indrayani IGAA, Hadiastono T, Mudjiono G, 2002. Dosis Sub Letal SINPV Dan Pengaruhnya Terhadap Transmisi Vertikal Pada Larva *Spodoptera litura* F. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*, 9 (2): 55-62.
- Rahmawati R, 2009. *Kaolin dalam Industri*. <http://oke.or.id/wp-content/plugins/downloads-manager/upload/APPLICATION%20KAOLIN.pdf>. Diunduh tanggal 01 April 2012.
- Rohrmann G, 2008. *The Baculovirus replication cycle: effect on the cell and insects*. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1765/. Diunduh tanggal 20 Februari 2013.
- Samsudin, 2009. *Keefektifan Bahan Pelindung Alami dalam Mempertahankan Virulensi Spodoptera litura Nucleopolyhedrovirus (SeNPV)*. http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/51665/2011sam_BAB%20V%20Pembahasan%203.pdf?sequence=7. Diunduh pada tanggal 25 Maret 2012.
- Smits PH, 1987. Nuclear Polyhedrosis Virus as Biological Control Agent of *Spodoptera exigua*. *Dissertation*. Wageningen University. Unpublished. 127 p.
- Sridhar, M. 2008. Photoprotection. *Internet Journal of Medical Update*, Vol 3 No. 1 Jan-Jun 2008.
- Suwahyono U, Wahyudi P, Laksmi FGK, 2003. Pengaruh Pemaparan Sinar Ultraviolet terhadap Pertumbuhan *Trichoderma harzianum* dan Kemampuan Mikoparasitiknya terhadap *Fusarium oxysporum*. <http://www.iptek.net.id/ind/?mnu=8&ch=jsti&id=31>. Diunduh tanggal 25 Januari 2012.
- Tarigan JB, Zuhro CF, Sihotang H, 2008. Skrining fitokimia tumbuhan yang digunakan oleh pedagang jamu gendong untuk merawat kulit wajah di Kecamatan Medan Baru. *J Biol Sumatera*, 3: 1-6.
- Young SY, 2000. *Persistence of Viruses in the Environment* (Online Review). <http://www.agctr.lsu.edu/s265/young.htm>. Diunduh pada tanggal 15 Agustus 2011.