

## PEMANFAATAN *Nannochloropsis salina* SEBAGAI BIOSORBEN UNTUK MENGATASI PENCEMARAN Ni<sup>2+</sup>

Grace Imelda Sarubang\*, Paulina Taba, dan Yusafir Hala

Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin, Makassar 90245

**ABSTRAK.** Penelitian mengenai pemanfaatan *Nannochloropsis salina* sebagai biosorben untuk mengatasi pencemaran Ni<sup>2+</sup> telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pola pertumbuhan *N. salina* pada medium yang tercemar Ni<sup>2+</sup>, menentukan efisiensi penjerapan Ni<sup>2+</sup> oleh *N. salina*, dan menentukan gugus fungsi yang terlibat dalam penjerapan Ni<sup>2+</sup> oleh *N. salina*. Pada penelitian ini, pemaparan Ni<sup>2+</sup> dilakukan di awal pertumbuhan *N. salina*. Pertumbuhan *N. salina* diamati setiap hari dengan cara menghitung jumlah populasi *N. salina*. Konsentrasi Ni<sup>2+</sup> dalam filtrat ditentukan dengan menggunakan SSA. Gugus fungsi yang terlibat dalam penjerapan diidentifikasi dengan menggunakan FT-IR. Pola pertumbuhan *N. salina* pada medium yang tercemar Ni<sup>2+</sup> berbeda dengan pola pertumbuhan *N. salina* pada medium tanpa dicemari Ni<sup>2+</sup>. Efisiensi penjerapan berbanding terbalik dengan konsentrasi logam yang dipaparkan pada medium pertumbuhan *N. salina*. Efisiensi penjerapan maksimum Ni<sup>2+</sup> 5 ppm oleh *N. salina* sebesar 64,80 %, Ni<sup>2+</sup> 10 ppm sebesar 46,80 %, dan Ni<sup>2+</sup> 15 ppm sebesar 34,40 %. Gugus fungsi yang berperan dalam proses penjerapan Ni<sup>2+</sup> oleh *N. salina* adalah gugus karboksil.  
Kata kunci: *N. salina*, Ni<sup>2+</sup>, penjerapan, SSA, FT-IR.

**ABSTRACT.** A research on utilization of *Nannochloropsis salina* as biosorben to overcome Ni<sup>2+</sup> pollution has been carried out. This research aimed to determine the pattern of *N. salina* growth on contaminated medium of Ni<sup>2+</sup>, the adsorption efficiency by *N. salina*, and the functional groups involved in Ni<sup>2+</sup> adsorption by *N. salina*. In this research, exposure of Ni<sup>2+</sup> conducted in the early growth of *N. salina*. Growth of *N. salina* was observed every day by counting the number of *N. salina* population. Concentration of Ni<sup>2+</sup> in the filtrate was determined by AAS. Functional groups involved in adsorption are identified by FT-IR. Growth pattern of *N. salina* on medium contaminated with Ni<sup>2+</sup> differ from growth patterns of *N. salina* on medium without Ni<sup>2+</sup>. Adsorption efficiency was inversely proportional to the concentration of metals in the growth medium described *N. salina*. The maximum adsorption efficiency of Ni<sup>2+</sup> 5 ppm by *N. salina* was 64.80%, Ni<sup>2+</sup> 10 ppm of 46.80%, and Ni<sup>2+</sup> 15 ppm of 34.40%. Functional groups that play a role in the adsorption process of Ni<sup>2+</sup> by *N. salina* is a carboxyl group.

Keywords : *N. salina*, Ni<sup>2+</sup>, adsorption, AAS, FT-IR

---

\*Penulis koresponden.

Alamat E-mail: [gracenajono@yahoo.com](mailto:gracenajono@yahoo.com)

## PENDAHULUAN

Penggunaan nikel secara terus menerus dalam bidang industri menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan karena pembuangan limbah yang mengandung nikel mengakibatkan pencemaran [1,2]. Efek beracun nikel mungkin terutama dari kemampuannya untuk menggantikan ion logam lainnya pada enzim dan protein atau untuk mengikat senyawa seluler mengandung -O, -S, dan -N, seperti enzim dan asam nukleat yang kemudian dihambat kerjanya [3].

Menurut penelitian yang telah dilakukan di perairan Indonesia, pencemaran nikel terus meningkat dalam kurun waktu beberapa tahun belakangan ini. Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengurangi tingkat pencemaran logam berat di perairan, antara lain dengan pengendapan secara kimia, pertukaran ion, ultrafiltrasi, osmosis balik, dan masih banyak lagi, namun metode tersebut memiliki membutuhkan modal besar, biaya operasional yang mahal, dan cenderung menimbulkan pencemaran baru karena dalam prosesnya menggunakan bahan kimia [4,5].

Metode alternatif yang dapat digunakan untuk mengatasi masalah ini adalah biosorpsi dengan menggunakan mikroalga *Nannochloropsis salina*. Mikroalga ini mudah diamati karena gerakannya lambat, sangat produktif, dan mudah berkembang biak dengan kebutuhan gizi yang sederhana [6]. Mikroalga *Nannochloropsis salina* memiliki kemampuan untuk mengakumulasi logam berat di dalam jaringan tubuhnya dan memiliki toleransi yang tinggi terhadap konsentrasi logam yang tinggi di dalam perairan [7]. Mikroalga ini memiliki gugus fungsi yang dapat bertindak sebagai ligan dan berikatan dengan logam yang diadsorpsi. Logam dan gugus fungsi yang berikatan bergantung pada teori *Hard-Soft Acid Base* (HSAB).

## BAHAN DAN METODA

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret-Juli 2013 di Laboratorium Kimia Anorganik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin.

### Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah larutan medium Conwy, vitamin, air laut steril, biakan murni *N. salina* yang diperoleh dari Balai Penelitian Pengembangan Budidaya Air Payau (BPP-BAP) Maros,  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , larutan  $\text{HNO}_3$  p.a., akuabides, dan aluminium foil. Larutan induk  $\text{Ni}^{2+}$  10.000 ppm dibuat dengan cara menimbang 12,3791 g  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  kemudian dilarutkan dengan  $\text{HNO}_3$  p.a. Larutan diencerkan dengan akuabides hingga tanda batas dalam labu ukur 250 mL kemudian dihomogenkan .

### Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat gelas yang umum digunakan di laboratorium, aerator merek Amara, alat pencacah hemositometer merek Marienfeld LOT-No 4551, *hand counter*, mikroskop Nikon SE dengan perbesaran sampai dengan 125 kali, oven merek SPNISOSFD, sentrifus yang merupakan alat-alat pada Laboratorium Kimia Anorganik Jurusan Kimia FMIPA Unhas, Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) *Buck Scientific* model 205 VGP pada Laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia FMIPA Unhas, autoklaf merek *All American* model No. 1925X dan filtrat membran sellulosa nitrat merek *Millipore* ukuran 0,45  $\mu\text{m}$  pada BPP-BAP Maros, serta *Fourier Transform Infra Red* (FT-IR) merek SHIMADZU 820 1PC pada Laboratorium Terpadu Jurusan Kimia FMIPA Unhas.

### Prosedur Kerja

Penelitian ini dilakukan 3 tahap yaitu : (1) Penentuan pola pertumbuhan *N. salina* pada medium tercemar  $\text{Ni}^{2+}$ , (2)

Pengukuran dengan menggunakan SSA, dan (3) Identifikasi gugus fungsi *N. salina* menggunakan FT-IR.

### Penentuan pola pertumbuhan *N. salina* pada medium tercemar Ni<sup>2+</sup>

Penentuan pola pertumbuhan *N. salina* pada medium tercemar Ni<sup>2+</sup> dilakukan dengan menggunakan air laut steril dan medium Conwy pada kondisi : salinitas 25 ‰, pencahayaan kontinu, aerasi, dan suhu ruangan 20 °C. Air laut steril dimasukkan ke dalam 4 buah stoples 1 L, kemudian ditambahkan Ni<sup>2+</sup> dengan variasi konsentrasi 5; 10; dan 15 ppm serta satu stoples sebagai kontrol. Selanjutnya, masing-masing stoples ditambahkan 2 mL larutan Conwy, vitamin ± 2 tetes, 4 mL biakan *N. salina* dengan kepadatan awal  $30 \times 10^4$  sel/mL, dan volume larutan dicukupkan hingga 1 L dengan air laut steril. Larutan dikocok dan dihubungkan dengan aerator. Stoples ditutup dengan penutup yang bagian tengahnya telah dilubangi sekitar 0,5 cm untuk tempat masuknya slang dari aerator kemudian didiamkan dalam ruangan bersuhu tetap (20 °C) dengan pencahayaan yang cukup. Pengamatan pertumbuhan *N. salina* dilakukan dengan cara menghitung jumlah sel *N. salina* per milliliter media setiap hari dengan menggunakan hemositometer. Jumlah populasi dengan 4 bidang pengamatan pada hemositometer (A, B, C, dan D) dihitung berdasarkan persamaan (1).

$$\sum \text{sel} = \frac{A+B+C+D}{4} \times 10^4 \text{ sel mL}^{-1} \quad (1)$$

### Pengukuran dengan menggunakan SSA Pembuatan larutan standar

Untuk membuat larutan standar 100 ppm, sebanyak 1 mL larutan induk Ni<sup>2+</sup> 10.000 ppm dipipet ke dalam labu ukur 100 mL, selanjutnya ditambahkan akuabides hingga tanda batas. Dibuat variasi konsentrasi larutan standar dengan konsentrasi Ni<sup>2+</sup> berturut-turut : 0,5 ppm;

1 ppm; 2 ppm; 4 ppm; 6 ppm; 8 ppm; dan 10 ppm. Larutan standar ini berfungsi untuk menentukan kurva standar.

### Pengukuran dengan SSA

Pengukuran dengan SSA dilakukan dengan memilih lampu katode berongga untuk nikel dan menentukan panjang gelombang maksimum. Selanjutnya, 5–10 mL sampel diukur absorbansinya sehingga konsentrasi logam dapat dihitung berdasarkan kurva standar. Kurva standar penentuan konsentrasi logam dibuat dari hubungan absorbansi dengan konsentrasi logam. Pengukuran konsentrasi logam dilakukan pada filtrat medium yang telah ditambahkan Ni<sup>2+</sup> dari awal pertumbuhan fitoplankton *N. salina* dengan menggunakan SSA melalui persamaan 2.

$$A = a \times b \times C \quad (2)$$

dimana C adalah konsentrasi, a adalah absorptivitas (L/g x cm), b adalah panjang medium absorpsi dan A adalah absorbans.

### Penentuan efisiensi penjerapan Ni<sup>2+</sup>

Efisiensi penjerapan ion logam Ni<sup>2+</sup> oleh mikroalga dihitung berdasarkan perbandingan konsentrasi ion logam Ni<sup>2+</sup> yang terjerap dengan konsentrasi logam mula-mula. Nilai efisiensi penjerapan (Ep) diperoleh dari persamaan (4), di mana C<sub>s</sub> adalah konsentrasi ion logam yang terjerap oleh mikroalga, C<sub>0</sub> adalah konsentrasi awal ion logam, dan C<sub>f</sub> adalah konsentrasi ion logam dalam filtrat medium. Dengan membandingkan nilai C<sub>0</sub> dan C<sub>s</sub> diperoleh nilai Ep.

$$C_s = C_0 - C_f \quad (3)$$

$$Ep = \frac{C_s}{C_0} \times 100 \% \quad (4)$$

### Identifikasi Gugus Fungsi *N. salina* Menggunakan FT-IR

Identifikasi gugus fungsi sebelum dan sesudah proses penjerapan Ni<sup>2+</sup>

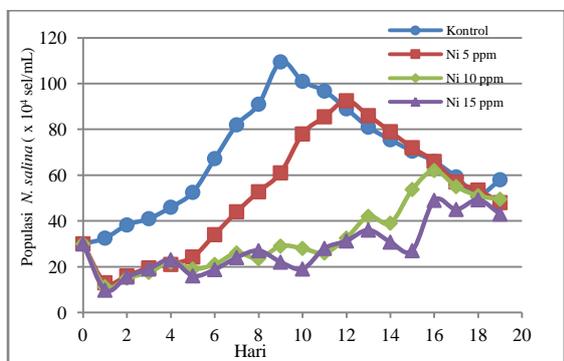
dilakukan pada medium pertumbuhan *N. salina* tanpa dan dengan paparan  $\text{Ni}^{2+}$  pada konsentrasi yang mempunyai nilai efisiensi penjerapan ion logam paling tinggi. Setelah hari terakhir pengamatan (hari ke-19), residu total *N. salina* dipisahkan dari filtrat dengan cara disentrifugasi hingga filtrat tidak berwarna. Residu yang diperoleh dikeringkan di dalam oven selama 1 hari pada suhu  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Residu yang telah kering dihaluskan di dalam lumpang dan dicampurkan dengan serbuk KBr (5-10 % sampel dalam serbuk KBr). Selanjutnya, ditentukan langsung menggunakan *diffuse reflectance measuring* (DRS-8000) yang dipasang pada tempat sampel. Serbuk KBr dimasukkan ke dalam *sample pan* dan *background* ditentukan. Spektrum sampel ditentukan dengan cara memasukkan sampel yang telah dicampur dengan KBr pada *sample pan*.

## HASIL DAN DISKUSI

### Pola Pertumbuhan *N. salina* pada

#### Medium yang Tercemar $\text{Ni}^{2+}$

Pola pertumbuhan *N. salina* pada medium yang tercemar  $\text{Ni}^{2+}$  dapat dilihat pada Gambar 1. Grafik tersebut menghubungkan antara jumlah populasi *N. salina* ( $\times 10^4$  sel/mL) terhadap waktu pertumbuhan (hari) yang diamati setiap 24 jam selama 19 hari.



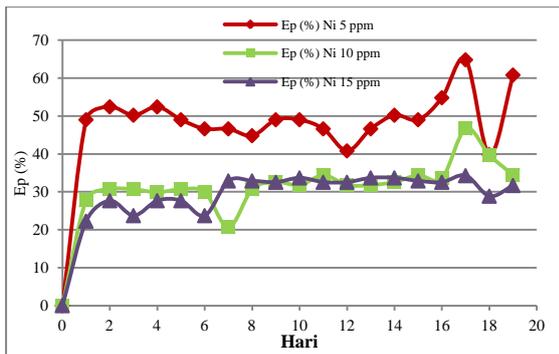
Gambar 1. Grafik pertumbuhan *N. salina* pada medium pertumbuhan tanpa dan dengan paparan  $\text{Ni}^{2+}$

Grafik pertumbuhan pada Gambar 1 menunjukkan bahwa tahap adaptasi *N. salina* dengan medium pertumbuhan terjadi pada hari pertama hingga keempat yang mengakibatkan proses pembelahan sel masih berjalan lambat. Setelah beradaptasi, *N. salina* mulai mengalami pembelahan sel hingga mencapai pertumbuhan optimum. Pada medium pertumbuhan dengan paparan  $\text{Ni}^{2+}$ , pertumbuhan *N. salina* lebih lambat daripada kontrol karena adanya sejumlah  $\text{Ni}^{2+}$  yang diserap oleh mikroalga sehingga mengganggu proses pertumbuhan akibat sistem perlindungan organisme yang tidak mampu mengimbangi efek toksisitas logam pada konsentrasi yang tinggi, mengganggu fungsi kerja enzim dan asam amino di mana nikel akan berikatan dengan senyawa-senyawa yang mengandung oksigen, dan juga dapat menggantikan ion logam lain yang terdapat pada enzim dan protein [3, 8, 9].

Setelah pertumbuhan optimum tercapai, populasi *N. salina* mengalami penurunan yang disebabkan oleh berkurangnya nutrisi di dalam medium pertumbuhan karena telah dikonsumsi oleh mikroalga. Selain itu, terjadinya blooming *N. salina* juga menyebabkan kurangnya oksigen di dalam medium pertumbuhan dan adanya bahan organik mati yaitu residu mikroalga menjadi kompetitor baru bagi *N. salina* yang masih hidup dalam penggunaan oksigen terlarut di dalam medium pertumbuhan.

#### Efisiensi Penjerapan $\text{Ni}^{2+}$ oleh *N. salina*

Efisiensi penjerapan (Ep) ion logam  $\text{Ni}^{2+}$  oleh mikroalga dihitung berdasarkan perbandingan konsentrasi ion logam  $\text{Ni}^{2+}$  yang terjerap dengan konsentrasi logam mula-mula (persamaan 4). Grafik Ep oleh *N. salina* setiap hari dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Grafik Ep Ni<sup>2+</sup> 5 ppm, 10 ppm, dan 15 ppm oleh *N. salina*

Pada konsentrasi 5 ppm hari pertama, konsentrasi terjerap yang tertinggi terjadi pada hari ke-17 sebesar 3,24 dengan Ep sebesar 64,80 %. Pada konsentrasi Ni<sup>2+</sup> 10 ppm, penjerapan tertinggi juga terjadi pada hari ke-17 di mana konsentrasi Ni<sup>2+</sup> yang terjerap sebesar 4,68 ppm dengan Ep sebesar 46,80 %. Pada konsentrasi 15 ppm, sama halnya dengan konsentrasi 5 ppm dan 10 ppm, penjerapan tertinggi terjadi pada hari ke-17 dengan konsentrasi logam yang terjerap sebesar 5,16 ppm dengan nilai Ep sebesar 34,40 %.

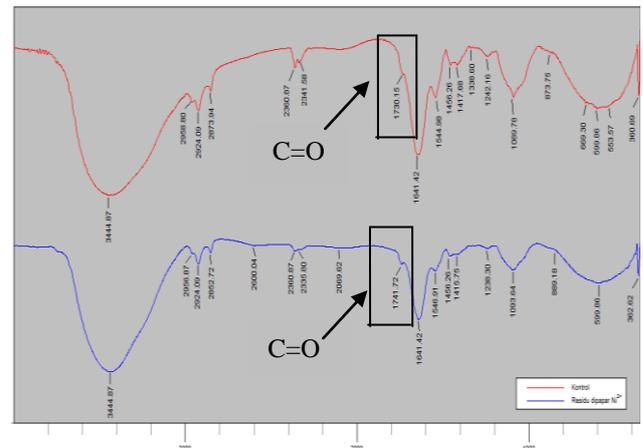
Nilai Ep tertinggi terjadi pada medium pertumbuhan *N. salina* dengan paparan Ni<sup>2+</sup> 5 ppm kemudian medium pertumbuhan *N. salina* dengan paparan Ni<sup>2+</sup> 10 ppm dan yang terendah medium pertumbuhan *N. salina* dengan paparan Ni<sup>2+</sup> 15 ppm. Hasil pengukuran SSA terhadap filtrat medium ini menunjukkan bahwa penjerapan meningkat sejalan dengan meningkatnya ketersediaan ion logam di dalam medium pertumbuhan. Terlihat juga pada gambar bahwa Ep berbanding terbalik dengan konsentrasi logam yang dipaparkan pada medium pertumbuhan *N. salina*. Hal ini karena setiap sel mikroalga mempunyai toleransi terhadap ion logam pada konsentrasi tertentu sehingga konsentrasi logam yang tinggi dapat menurunkan kemampuan atau kapasitas penjerapan sel mikroalga [10].

Konsentrasi logam yang terjerap setiap hari pada masing-masing konsentrasi mengalami perbedaan. Pada hari-hari tertentu mengalami kenaikan dan

ada pula yang mengalami penurunan. Hal ini terjadi karena dalam proses penjerapan ini berusaha dicari titik kesetimbangan. Titik kesetimbangan atau kondisi penjerapan maksimum dicapai pada saat diperoleh Ep tertinggi dan sisi aktif yang menjerap logam dalam proses ini telah jenuh [11]. Pada penelitian ini, penjerapan maksimum diperoleh pada hari ke-17 pada masing-masing konsentrasi.

### Gugus Fungsi yang Terlibat dalam Penjerapan Ni<sup>2+</sup> oleh *N. salina*

Analisis gugus fungsi *N. salina* dilakukan pada residu *N. salina* tanpa paparan logam dan dengan paparan Ni<sup>2+</sup> 5 ppm yang memiliki Ep paling tinggi dan residu paling banyak jika dibandingkan dengan residu *N. salina* dengan paparan Ni<sup>2+</sup> 10 ppm dan 15 ppm. Spektra infra merah (IR) dari residu *N. salina* tanpa dan dengan paparan Ni<sup>2+</sup> 5 ppm dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Spektra infra merah residu *N. salina* tanpa paparan Ni<sup>2+</sup> (kontrol) dan residu *N. salina* dengan paparan Ni<sup>2+</sup> 5 ppm

Residu kontrol menunjukkan bahwa terdapat gugus fungsi karboksil pada bilangan gelombang 1730 cm<sup>-1</sup> berupa regang C=O, sedangkan pada residu dengan paparan Ni<sup>2+</sup> 5 ppm regang C=O ditemukan pada bilangan gelombang 1741 cm<sup>-1</sup>. Hal ini berarti paparan Ni<sup>2+</sup> menyebabkan pergeseran bilangan gelombang sekitar 11 cm<sup>-1</sup>. Pergeseran

puncak ini menunjukkan adanya proses pengikatan ion logam pada gugus fungsi yang dimiliki oleh *N. salina*. Gugus karboksil berpotensi untuk mengikat ion logam karena memiliki elektron bebas.

Setelah membandingkan spektra IR antara residu *N. salina* tanpa dan dengan paparan  $\text{Ni}^{2+}$  5 ppm, gugus fungsi yang dominan berperan dalam proses penjerapan  $\text{Ni}^{2+}$  oleh *N. salina* adalah gugus karboksil. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya bahwa logam nikel yang diserap oleh mikroalga berikatan dengan senyawa-senyawa kimia atau gugus fungsi yang mengandung oksigen, seperti gugus karboksil [8]. Ikatan antara gugus fungsi dengan ion logam berpeluang terjadi melalui reaksi pertukaran ion maupun pembentukan kompleks.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

1. Pola pertumbuhan *N. salina* pada medium yang tercemar  $\text{Ni}^{2+}$  berbeda dengan pola pertumbuhan *N. salina* pada medium tanpa dicemari  $\text{Ni}^{2+}$ .
2. Efisiensi penjerapan maksimum  $\text{Ni}^{2+}$  5 ppm oleh *N. salina* sebesar 64,80 %,  $\text{Ni}^{2+}$  10 ppm sebesar 46,80 %, dan  $\text{Ni}^{2+}$  15 ppm sebesar 34,40 %.
3. Gugus fungsi yang berperan dalam proses penjerapan  $\text{Ni}^{2+}$  oleh *N. salina* adalah gugus karboksil.

## REFERENSI

1. Hashim, N.B., 2008, *Removal of Nickel From Aqueous Solution by Using Dried Water Hyacinth (Eichhornia Crassipes)*, Skripsi dipublikasikan, Chemical Engineering, Faculty of Chemical Engineering Natural Resources, Universiti Malaysia Pahang, (Online), ([http://umpir.ump.edu.my/528/1/Norhaslin\\_Hashim.pdf](http://umpir.ump.edu.my/528/1/Norhaslin_Hashim.pdf), diakses 7 Desember 2012).
2. Sari, R.S., 2008, Analisis Nikel Menggunakan Metode Uji Noda dengan Dimetilglioksim, Skripsi dipublikasikan, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Diponegoro, (Online), ([http://eprints.undip.ac.id/7505/1/Abstrak\\_RiskaSartikaS.pdf](http://eprints.undip.ac.id/7505/1/Abstrak_RiskaSartikaS.pdf), diakses 16 Desember 2012).
3. Cempel, M., and Nikel, G., 2006, Nickel: A Review of Its Sources and Environmental Toxicology, *Polish. J. Environ. Stud.*, **15** (3), 375-382.
4. Hui, K.S., Chao, C.Y.H., and Kot, S.C., 2005, Removal of Mixed Heavy Metal Ions in Wastewater by Zeolite 4A and Residual Products from Recycled Coal Fly Ash, *J. Hazard. Mater.*, **B127**, 89-101.
5. Khasanah, E.N., 2009, Adsorpsi Logam Berat, *Oseana*, **34** (4), 1-7.
6. Balan, S.A., Kausch, M.F., Stueken, E.E., and Appen, W.V., 2006, *The Effects of Microgravity on the Photosynthetic Yield of Nannochloropsis salina and Spirulina platensis*, (Online), ([mit.edu/~wilken/www/Papers/Neptunas\\_Poster.pdf](http://mit.edu/~wilken/www/Papers/Neptunas_Poster.pdf), diakses 30 Oktober 2012).
7. Doshi, H., Seth, C., Ray, A. and Kothari, I.L., 2008, Bioaccumulation of Heavy Metals by Green Algae, *Curr. Microbiol.*, **56**, 246-255.
8. Raize, O., Argaman, Y., and Yannai, S., 2004, Mechanisms of Biosorption of Different Heavy Metals by Brown Marine Macroalgae, *Biotechnol. Bioeng.*, **87** (4), 451-458.
9. Suadi, A., 2012, *Interaksi Bi-logam  $\text{Pb}^{2+}$  dan  $\text{Zn}^{2+}$  dengan *N. salina* dalam Medium Conway*, Skripsi

Tidak Dipublikasikan Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Hasanuddin, Makassar.

10. Hala, Y., Raya, I., dan Suryati, E., 2004, Interaksi Ion Cu(II) dengan *Chaetoceros calcitrans* dalam Lingkungan Perairan Laut, *Mar. Chim. Acta*, **5** (2), 11-14.
11. Sembiring, Z., Buhani, Suharso, dan Sumadi, 2009, Isoterm Adsorpsi Ion Pb(II), Cu(II) dan Cd(II) Pada Biomassa *Nannochloropsis sp.* yang Dienkapsulasi Akuagel Silika, *Indo. J. Chem.*, **9** (1), 1-5.