

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI *HAND SANITIZER* DARI EKSTRAK ETANOL BUNGA ROSELLA (*Hibiscus Sabdariffa* L) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Staphylococcus aureus*

TESTING OF HAND SANITIZER ANTI-BACTERIAL ACTIVITY FROM ROSELLA FLOWER (*Hibiscus Sabdariffa* L) ETHANOL EXTRACT ON THE GROWTH OF *Staphylococcus aureus* BACTERIA

^{1*}Adiansyah, ²Siti Maimunah, ¹Elly Nurita Sitorus, ¹Nurul Hazlinda

¹Program Studi S1 Farmasi, Universitas Sari Mutiara Indonesia

²Program Studi D3 ANAFARMA, Universitas Sari Mutiara Indonesia

Korespondensi penulis: Universitas Sari Mutiara

Email: adiansyah_skd@yahoo.com

Abstrak. Di Indonesia dengan iklim tropis, rosella dapat tumbuh dengan subur. Tanaman Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang sangat dikenal karena kelopaknya yang dapat digunakan sebagai minuman kesehatan yang dapat menyembuhkan berbagai penyakit. Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) mengandung zat berkhasiat seperti alkaloid, flavonoid, tanin, terpenoid, yang memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui *Hand sanitizer* antibakteri ekstrak etanol bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) mempunyai mutu dan stabilitas yang baik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini bersifat eksperimental, meliputi pengumpulan sampel bunga rosella, pengeringan simplisia, pembuatan ekstrak menggunakan *rotary evaporator*, skrining fitokimia, karakteristik sediaan uji aktivitas antibakteri *hand sanitizer* dengan metode difusi agar menggunakan pecadang kertas cakram. Ekstrak etanol bunga Rosella dapat dibuat *Hand sanitizer* sediaan spray dan mempunyai aktivitas antibakteri. Perbedaan konsentrasi ekstrak etanol 2,5% besar zona hambat 6,8 mm, 5% besar zona hambat 7,27 mm, 7,5% besar zona hambat 7,72 mm dan 10% besar zona hambat 12,35 mm. Ekstrak etanol bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) dapat dijadikan sebagai sediaan *Hand sanitizer* memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* serta yang paling efektif pada konsentrasi 10% sebesar 12,35 mm.

Kata Kunci: Antibakteri, Ekstrak, *Hand Sanitizer*, *Hibiscus sabdariffa* L, *Staphylococcus aureus*.

Abstract. In Indonesia with a tropical climate, rosella can thrive. Roselle plant (*Hibiscus sabdariffa* L.) is well known for its petals which can be used as a health drink that can cure various diseases. Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) contains nutritious substances such as alkaloids, flavonoids, tannins, terpenoids, which have antibacterial properties. The purpose of this study was to determine the antibacterial hand sanitizer ethanol extract of Rosella flower (*Hibiscus sabdariffa* L) had good quality and stability against *Staphylococcus aureus* bacteria. This research was experimental, including rosella flower sample collection, simplicia drying, extract making using a rotary evaporator, phytochemical screening, characteristics of the antibacterial activity test preparation of hand sanitizer with agar diffusion method using paper discs. Roselle flower ethanol extract can be made as *Hand sanitizer* in spray preparations and has antibacterial activity. The difference in the concentration of the ethanol extract is 2.5%, the inhibition zone is 6.8 mm, 5% is the inhibition zone is 7.27 mm, 7.5% is the inhibition zone is 7.72 mm and 10% is 12.35 mm. The ethanolic extract of the Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L) can be used as a hand sanitizer preparation. It has antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* bacteria and is the most effective at a concentration of 10% of 12.35 mm.

Keywords: Antibacterial, Extract, *Hand Sanitizer*, *Hibiscus sabdariffa* L, *Staphylococcus aureus*.

PENDAHULUAN

Di Indonesia dengan iklim tropis, rosella dapat tumbuh dengan subur. Tanaman rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dikenal karena kelopaknya yang dapat digunakan sebagai minuman kesehatan yang dapat menyembuhkan berbagai penyakit seperti hipertensi, diabetes, dan diuretik[1]. Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah kesehatan terbesar didunia. Menurut WHO 2015 berdasarkan data YLL (*Years Of Life Lost*) dinegara berkembang. Penyakit infeksi masih merupakan penyebab kematian utama. Infeksi disebabkan oleh bakteri, virus, jamur, dan parasit. *Staphylococcus aureus* merupakan penyebab utama infeksi bernanah pada manusia yang terdapat di rongga hidung dan

kulit sebagian besar populasi manusia. Salah satu penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* adalah bisul[2]. Cara pemutusan penyebaran mikroba masih menjadi tantangan bagi masyarakat, salah satu cara yang sederhana untuk memutus penyebaran mikroba adalah dengan mencuci tangan yang merupakan pertahanan awal untuk mencegah penyebaran dan perkembangan kuman yang menyebabkan berbagai penyakit sampai 90% dari jumlah semula dan akan kembali dalam 8 jam. Pada saat ini telah umum digunakan sediaan gel *hand sanitizer* yang mengandung antiseptik oleh masyarakat yang peduli kesehatan, sebagai jalan keluar untuk menjaga kesehatan dan kebersihan tangan yang praktis dan mudah dibawa [4]. Antiseptik tangan bertujuan untuk menghilangkan kotoran dan flora pada tangan [3]. Beberapa sediaan antiseptik tangan dapat dijumpai di pasaran. Salah satu bahan antiseptik yang digunakan dalam suatu sediaan adalah dari golongan alkohol dengan konsentrasi 50% sampai 70% dan jenis disinfektan yang lain seperti klorheksidin, triklosan [5]. Rosella merupakan salah satu tanaman yang sering digunakan oleh sebagian masyarakat Indonesia sebagai tanaman obat, diantaranya sebagai obat untuk mencegah terjadinya infeksi. Infeksi disebabkan oleh bakteri, virus, jamur, dan parasit. *Staphylococcus aureus* merupakan penyebab utama infeksi bernanah pada manusia yang terdapat di rongga hidung dan kulit sebagian besar populasi manusia. Rostinawati melaporkan bahwa bunga rosella terbukti memiliki kandungan kimia alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin [6].

METODE PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah aluminium foil, autoklaf (Biobase), batang pengaduk, beaker gelas (Iwaki Pyrex), benang wol, bunsen, cawan penguap, cawan petri, corong, deg gelas, eksikator, erlen meyer (Iwaki Pyrex), gelasukur (Iwaki Pyrex), hot plate, inkubator (Memmert), jangka sorong, jarumose, kaca arloji, kaca objek, kain kasa, kapas kertas perkamen, kertas saring, kompor gas (Rinnai), krusporcelin, lemari pendingin (Mitsubishi), mikro pipet, mikroskop (Olympus), neraca analitik, oven (Mammert), penan gas air, pecadang kertas, penjepit krus porcelin, penjepit tabung, pinset, pipet tetes, rak tabung, spatula, tanur (Thermo), tabung reaksi (Iwaki Pyrex) dan vial.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah biji pinang muda biji pinang tua, etanol 96% dan air suling, pereaksi Bouchardat, pereaksi Dragendrof, pereaksi Mayer, besi (III) klorida, kloralhidrat, NaCl proanalisis, bakteri *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, media Nutrient agar (NA), dan media Mueller-Hinton agar (MHA), serta bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.).

Prosedur Kerja

1. Pembuatan Ekstrak Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa* L.)

Sebanyak 8 kg bunga rosella tanpa biji dicuci bersih lalu diangin-anginkan, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dibawah sinar matahari. Kemudian diremas dan dihaluskan sampai menjadi serbuk menggunakan blender. Serbuk bunga rosella ditimbang 500 gram, lalu dimaserasi dengan etanol 70% 5 liter, maserasi dilakukan selama (5 hari), terlindung dari sinar matahari langsung, setelah di angin anginkan sampel dikeringkan di lemari pengering dengan suhu 40°C. Sampel yang kering lalu ditimbang sebagai berat kering. Tujuan pengeringan yaitu untuk menghilangkan kandungan dari air yang ada didalam biji agar mencegah terjadi pertumbuhan bakteri dan jamur, selanjutnya dilakukan penyerbukan yaitu membuat biji pinang menjadi partikel yang lebih kecil, disini dilakukan dengan cara diblender, kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring, sehingga diperoleh maserat. Selanjutnya dilakukan pemekatan dengan evaporator sampai diperoleh ekstrak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa*L.) [7].

2. Pembuatan *Hand Sanitizer*

Masukkan hidrogen piroksida dan gliserin kedalam beker glass kemudian tambahkan ekstrak bunga rosella ke dalam beker glass lalu aduk hingga homogen. Kemudian di *ad* kan dengan etanol 10 % hingga 250 ml. Dipindahkan campuran ke dalam botol bersih yang telah disediakan, disimpan selama 72 jam untuk memastikan tidak ada kontaminasi organisme dari wadah botol, *handsanitizer* siap digunakan.

Tabel 1.Formula Dalam Sediaan 250 ml

| No | Sampel | Konsentrasi | | | |
|----|-----------------------|-------------|--------|---------|--------|
| | | F1 % | F2 % | F3 % | F4 % |
| 1 | Ekstrak bunga rosella | 6,25 g | 12,5 g | 18,75 g | 25 g |
| 2 | Hidrogen piroksida | 10 ml | 10 ml | 10 ml | 10 ml |
| 3 | Gliserin | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml |
| 4 | Aquadest | 250 ml | 250 ml | 250 ml | 250 ml |

Keterangan : F1 : Formulasi dengan Konsentrasi ekstrak bunga rosella 2,5%

F2 : Formulasi dengan Konsentrasi ekstrak bunga rosella 5%

F3 : Formulasi dengan Konsentrasi ekstrak bunga rosella 7,5%

F4 : Formulasi dengan Konsentrasiekstrak bunga rosella 10%

3. Teknik Pembuatan *Nutrien Agar*(NA)

Sebanyak 10 gram NA ditimbang dengan timbangan analitik. Lalu NA dilarutkan dalam 500 ml aquadest steril. Kemudian larutan dipanaskan di hot plate stirrer hingga homogen. Media yang telah homogeny disimpan dalam Erlenmeyer steril berukuran 250 ml. Erlenmeyer yang berisi larutan disterilkan didalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 ATM selama 15 menit. Larutan yang telah steril kemudian dituang kedalam tabung reaksi secara miring. Media yang telah jadi digunakan sebagai stok media untuk kultur bakteri uji. Larutan lainnya dituang dalam cawan petri sebanyak 10 ml dan digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri [3].

4. Teknik Pembuatan Media Agar Miring

Sebanyak 10 ml media *Nutrien Agar* (NA) yang telah dimasak dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditutup dan dibungkus lalu disterilkan didalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Tabung reaksi diletakkan sedemikian rupa sehingga kemiringan permukaan media lebih kurang 45°C. Diperhatikan bahwa media *Nutrien Agar* (NA) tidak menyentuh tutup tabung reaksi. *Nutrien Agar* (NA) dibiarkendingin dan memadat[3].

5. Pembuatan Stok Kultur Bakteri (*Staphylococcus aureus*)

Satu koloni bakteri diambil dengan menggunakan jarumo steril, lalu ditanam pada media *Nutrien Agar* miring dengan cara menggoreng. Kemudian diinkubasi dalam incubator pada suhu 20-30°C selama 48 jam [8].

6. Pembuatan Inokulum Bakteri (*Staphylococcus aureus*)

Koloni bakteri diambil dari stok kultur padat dengan jarumo sesteril lalu disuspensikan dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl 0,9%. Kemudian diukur kekeruhan pada larutan sesuai standart Mc farland Dewi[3].

7. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri ditanam pada media pertumbuhan *nutrien agar* (NA) miring dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian bakteri yang akan diuji di suspensikan dengan cara menumbuhkan bakteri dalam media cair yaitu NaCl fisiologis, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

8. Pengujian Aktivitas Antibakteri *HandSanitizer* Dari Ekstrak Etanol Bunga Rosella

Pada pengujian aktivitas antibakteri digunakan metode difusi agar dengan sumur. Sebanyak 200µl masing-masing suspensi bakteri ditambahkan kedalam 20 ml. Media *Nutrien Agar* (NA) untuk

bakteri. Campuran diputar sampai homogen, didinginkan dan menjadi padat dalam cawan Petri steril. Setelah itu dibuat sumur yang berdiameter ± 6 mm dengan menggunakan prevorator. Selanjutnya dimasukkan 50 μ l masing-masing ekstrak uji kedalam sumur. Dengan konsentrasi 2,5%, 5% ,7,5%, 10%.Sebelumnya dilakukan prainkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Inkubasi dilakukan pada suhu 37⁰C selama 48 jam untuk bakteri. Diameter hambat diamati setelah periode inkubasi(Niken,2017).

HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL

Tabel 1 . Pemeriksaan Karakterisasi Serbuk Simplisia Bunga Rosella

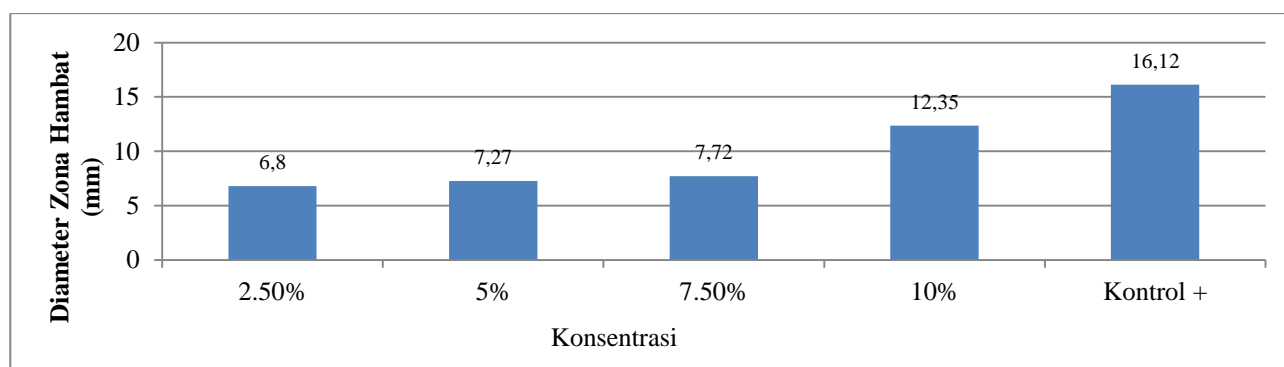
| No | Karakterisasi Simplisia | Hasil | Persyaratan (%) |
|----|----------------------------------|--------|-----------------|
| 1 | Kadar air | 8,60 % | $\leq 10\%$ |
| 2 | Kadar abu total | 9,6% | $\leq 15\%$ |
| 3 | Kadar abu tidak larut dalam asam | 0,6% | $\leq 1\%$ |
| 4 | Kadar sari larut dalam air | 24,45% | $\geq 7\%$ |
| 5 | Kadar sari laut dalam etanol | 27,45% | $\geq 3\%$ |

Tabel2. Hasil Skrining Fitokimia Bunga Rosella

| No | Senyawa Metabolit Sekunder | Pereaksi | Hasil |
|----|----------------------------|--|-------|
| 1 | Alkaloid | Meyer Dragendrof Bouchart | + |
| 2 | Tanin | Air Panas+FeCl ₃ 10% | + |
| 3 | Saponin | Air Panas +HCL 2N | + |
| 4 | Flavonoid | HCL pekat+serbuk Mg Merah | + |
| 5 | Steroid/Tripenoid | Lieberman-buchard | + |
| 6 | Glikosida | Aquadest+ LP molish Lieberman - buchard | - |

Tabel 3. Hasil pengukuran Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*.

| Konsentrasi | Diameter ZonaHambat (mm) | | | | | Zona Hambat Rata-Rata (mm) | Responden Harapan |
|-------------|--------------------------|-----|-----|------|------|----------------------------|-------------------|
| | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | | |
| 2,5% | 5,1 | 6,5 | 7,4 | 8,4 | 6,6 | 6,8 | Lemah |
| 5% | 6,2 | 7,3 | 7,6 | 10,5 | 7,7 | 7,27 | Lemah |
| 7,5% | 6,4 | 7,5 | 8,4 | 15,7 | 7,8 | 7,72 | Lemah |
| 10% | 6,4 | 7,8 | 7,5 | 14,8 | 12,5 | 12,35 | Kuat |
| Kontrol (+) | | | | | | 16,12 | Kuat |
| Aquades (-) | | | | | | - | Tidak ada |



Gambar 1. Hasil pengukuran Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*

Tabel 4. Pemeriksaan pH Spray *Hand Sanitizer* Ekstrak Bunga Rosella (*Hibiscussabdariffa L*) Dengan Konsentrasi Berbeda

| Konsentrasi | pH |
|-------------|----|
| 2,5% | 5 |
| 5% | 4 |
| 7,5% | 5 |
| 10% | 4 |

Tabel 5. Uji Organoleptis Sediaan *HandSanitizer* Bunga Rosella (*Hibiscussabdariffa L*)

| Pemeriksaan | Konsentrasi 2,5% | Konsentrasi 5% | Konsentrasi 7,5% | Konsentrasi 10% |
|-------------|------------------|----------------|------------------|------------------|
| Warna | Putih kekuningan | Coklat muda | Coklat | Coklat kemerahan |
| Bau | Etanol | Etanol | Etanol | Etanol |

Tabel 6. Uji Homogenitas Sediaan *HandSanitizer* Pada Bunga Rosella

| Sediaan | Homogenitas |
|------------------|-------------|
| Konsentrasi 2,5% | Homogen |
| Konsentrasi 5% | Homogen |
| Konsentrasi 7,5% | Homogen |
| Konsentrasi 10% | Homogen |

Tabel 7. Hasil Uji Viskositas Sediaan

| Sediaan | Nilai Viskositas (cp) |
|------------------|-----------------------|
| Konsentrasi 2,5% | 0,01 cp |
| Konsentrasi 5% | 0,14 cp |
| Konsentrasi 7,5% | 0,16 cp |
| Konsentrasi 10% | 0,19 cp |

Tabel 8. Uji Daya Sebar dari *Handsanitizer* Bunga Rosella

| Sediaan | Daya Sebar (cm) |
|------------------|-----------------|
| Konsentrasi 2,5% | 5 cm |
| Konsentrasi 5% | 6 cm |
| Konsentrasi 7,5% | 7 cm |
| Konsentrasi 10% | 8 cm |

Tabel 9. Uji Daya Lekat dari *HandSanitizer* Bunga Rosella

| Sediaan | Daya lekat |
|------------------|-------------|
| Konsentrasi 2,5% | 05.85 detik |
| Konsentrasi 5% | 06.57 detik |
| Konsentrasi 7,5% | 06.60 detik |
| Konsentrasi 10% | 10.39 detik |

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan Uji Aktivitas Antibakteri *Handsanitizer* Ekstrak Etanol bunga rosella (*Hibiscussabdariffa L.*). Bunga Rosella (*Hibiscussabdariffa L.*) diuji terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil identifikasi menunjukkan bunga rosella masuk kedalam famili *malvaceae* dan species (*Hibiscussabdariffa L.*). Pemeriksaan karakteristik bunga rosella meliputi kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut dalam air, kadar sari larut etanol, kadar air. Dari hasil penapisan fitokimia pada bunga rosella (*Hibiscussabdariffa L.*) didapat hasil adanya flavonoid dan tanin, diantara senyawa yang terdeteksi salah satunya mempunyai aktivitas sebagai antibakteri [6]. Rosella mengandung berbagai senyawa berkhasiat yang dimilikinya. Pada bunga terdapat senyawa alkaloid, antosianin, flavonoid, saponin, dan tanin. Senyawa flavonoid mampu

menghambat fungsi membran sitoplasma dan metabolisme energi bakteri. Saponin memiliki molekul hidropfilik dan lipofilik sehingga dapat menurunkan tegangan permukaan sel yang dapat menyebabkan hancurnya bakteri. Tanin dapat menyerang polipeptida dinding sel sehingga menyebabkan kerusakan sel[3].Aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol bunga rosella (*Hibiscussabdariffa* L.) ini mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang dinding selnya terdiri dari peptidoglikan, asam teikoat, teikuronat, polisakarida dan protein. Kerusakan lapisan ini mengakibatkan kerusakan dinding sel bakteri. Maka data tersebut dapat diasumsikan bahwa ekstrak etanol bunga rosella (*Hibiscussabdariffa* L.) dapat membunuh bakteri[6]. Hasil uji dari konsentrasi keempat *handsanitizer* dengan ekstrak etanol bunga rosella (*Hibiscussabdariffa* L.), kontrol positif, dan kontrol negatif terdapat pengaruh penggunaan besar dan kecilnya konsentrasi ekstrak etanol bunga rosella (*Hibiscussabdariffa* L.) yang dimasukkan kedalam *handsanitizer* berpengaruh ada besar dan kecilnya daya hambat bakteri *Staphylococcus aureus*. Semakin besar konsentrasi ekstrak etanol bunga rosella (*Hibiscussabdariffa* L.) yang digunakan pada *handsanitizer*, maka semakin besar daya hambatnya[5].

KESIMPULAN

Ekstrak etanol bunga rosella (*Hibiscussabdariffa* L.) dapat dibuat sebagai sediaan *handsanitizer* dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol bunga rosella dan mempunyai mutu dan fisik yang baik. Sediaan *handsanitizer* ekstrak etanol bunga rosella (*Hibiscussabdariffa* L.) dengan konsentrasi 2,5%, 7,5%, 5% dan 10%. Memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* serta yang paling efektif pada konsentrasi 10%.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] S. Patel, *Hibiscus sabdariffa*: An ideal yet under-exploited candidate for nutraceutical application. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4, 23- 27. 2014.
- [2] F. Tedy, Status Gizi Berhubungan Dengan Kejadian ISPA Pada Balita di Wilayah Kerja Puskesmas Wonosari I Kabupaten Gunung kidul 2014, *Jurnal Gizi dan Dietetik Indonesia*, 3 (2), 113–118. 2019.
- [3] Irianto, Koes, *Mikrobiologi Medis (Medical Microbiology)*, pp. 71-3, Penerbit Alfabeta, Bandung. 2013.
- [4] Retnosari, D. Isadiartuti, Studi Efektivitas Sediaan Gel Antiseptik Tangan Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L.). *Majalah farmasi Indonesia*. 2006.
- [5] R. Sari, S.Y.F, N.O. Fissy, L. Pratiwi, Efektivitas Gel Anti Jerawat Ekstrak Etanol Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Rosc. Var. *rubrum*) terhadap *Propioni bacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis*, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 12, 193-201. 2014.
- [6] T. Rostinawati, Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Terhadap *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* Dan *Staphylococcus aureus* Dengan Metode Difusi Agar, Penelitian Mandiri : Fakultas Farmasi, Universitas Padjajaran. 2019.
- [7] H. Sa'diyah, Pengaruh Invigorasi menggunakan Polietilena Glikol (PEG) 6000 terhadap Viabilitas Benih Rosella (*Hibiscus sabdariffa* var. *altissima*). Skripsi Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. 2015.
- [8] R.I. Depkes, Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Cetakan Pertama. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. 2013.