



Profil Ketoksikan Akut SNEDDS Propolis

(Acute toxicity profile of SNEDDS propolis formulation)

Arba Pramundita Ramadani*, Yandi Syukri, Sherina Nabila Putri Hakim, & Annisa Fitria

Department of Pharmacy Universitas Islam Indonesia, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta,

ABSTRACT: Propolis has been widely published on its immunostimulant activity. Due to its poor solubility and bioavailability, nano formulation may resolve its problem. A study found that SNEDDS propolis enhanced its immunostimulant activity, but also raised its toxicity event. So, this study is designed to evaluate the acute toxicity effect on SNEDDS propolis. Using the standard method OECD 425, male Wistar rats were employed in this study. The assay started with a limit test (dose 2000 mg/kg BW) followed by a main test with starting dose of 175 mg/kg BW using factor 1.3. Intensive observation of toxic clinical signs was performed and continued by periodic observation for 14 days. At the end of the study, the rats were sacrificed and had their liver and kidneys for histopathological examination. Based on the result, there were no toxic clinical signs found nor reduction on animal body weight. The LD₅₀ value was > 2000 mg/kg BW. There were no abnormalities on both histopathological observation of liver and kidneys. In conclusion, the SNEDDS propolis was not toxic on male Wistar rats (po).

Keywords: LD₅₀; acute toxicity; propolis; nanoparticle; SNEDDS.

ABSTRAK: Propolis memiliki efek imunostimulan yang tinggi namun tidak larut air dan memiliki bioavailabilitas yang rendah. Formulasi propolis dalam bentuk SNEDDS terbukti mampu meningkatkan aktivitas imunostimulannya, namun juga memberikan potensi ketoksikan dikarenakan kecilnya ukuran partikel nano dan akumulasi nya di dalam tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efek ketoksikan akut SNEDDS propolis. Dengan metode standar OECD 425, tikus Wistar jantan digunakan sebagai hewan uji. Pengujian diawali dengan uji batas dosis 2000 mg/kgBB dan dilanjutkan uji utama yang diawali dengan dosis 175 mg/kgBB serta mengikuti faktor 1,3 untuk kenaikan maupun penurunan dosisnya. Pengamatan gejala klinis ketoksikan secara intensif dilakukan 4 jam pertama setelah pemejanaan dan dilanjutkan secara periodik mulai 24 jam hingga 14 hari dengan pengukuran berat badan tiap minggunya. Pada akhir penelitian, tikus dikorbankan dan diisolasi hepar maupun ginjalnya untuk pembuatan preparat histopatologis. Hasil uji menunjukkan tidak adanya gejala ketoksikan, berat badan hewan uji meningkat dan nilai LD₅₀ > 2000 mg/kgBB. Pengamatan histopatologis juga tidak menemukan adanya abnormalitas di hepar maupun ginjal. Sehingga dapat disimpulkan bahwa SNEDDS propolis tidak menimbulkan efek koetoksikan akut pada tikus jantan secara per oral.

Kata kunci: LD₅₀; ketoksikan akut; propolis; nanopartikel; SNEDDS.

Pendahuluan

Pandemi Covid-19 mendorong banyak peneliti mengkaji aktivitas imunostimulan sebagai salah satu alternatif dalam penanganannya [1]. Salah satu bahan alam yang telah diketahui efek imunostimulannya adalah propolis yang berasal dari resin lebah [2,3]. Kandungan aktif *caffeic acid phenethyl ester* (CAPE) terbukti bertanggungjawab pada aktivitas imunostimulan propolis [4]. Senyawa tersebut secara signifikan mampu meningkatkan berbagai mediator yang terlibat dalam respon imun [5] dan mengaktifkan makrofag [6].

Propolis diketahui relatif tidak larut dalam air sehingga menurunkan bioavailabilitas dan efek farmakologinya. Pengembangan sediaan dalam bentuk nano formulasi dinyatakan mampu meningkatkan

kelarutan dan ketersediaan hayatinya [7]. Penelitian Fitria (2021) membuktikan bahwa pengembangan formulasi nano propolis dalam bentuk *Self Nano Emulsifying Drug Delivery System* (SNEDDS) tercatat mampu meningkatkan efek imunostimulannya [8]. Namun, peningkatan efek pada formulasi SNEDDS memungkinkan peningkatan absorpsi sekaligus potensi ketoksikan karena akumulasi senyawa aktif [9,10]. Terlebih, belum ada penelitian terkait evaluasi keamanan dari SNEDDS propolis, sehingga studi ini ditujukan untuk melihat profil ketoksikan akutnya.

Metode Penelitian

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah SNEDDS propolis (Laboratorium

Article history

Received: 14 Juli 20212

Accepted: 03 Agust 2022

Published: 24 Okt 2022

Access this article



*Corresponding Author: Arba Pramundita Ramadani

Department of Pharmacy Universitas Islam Indonesia, Jl. Kaliurang No.Km. 14,5, Krawitan, Kec. Ngemplak, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55584 | Email: arba.pramundita@uii.ac.id

Nanoteknologi, Farmasi, UII), ketamin (Dexamedica), BNF 10%, cat HE, dan hewan uji tikus Wistar (Laboratorium Farmakologi, Farmasi, UII).

Pengujian Ketoksikan Akut

Hewan yang digunakan adalah tikus Wistar jantan, sehat, berusia 8-12 minggu, dan berat badan 140-250 gram. Selama pengujian, hewan ditempatkan di dalam kandang berbahan propilen terpisah dengan suhu 22-25°C, kelembapan 55±10%, 12 jam siklus gelap/terang, dan diberi pakan normal serta minum *ad libitum*. Pengujian diawali dengan uji batas (*limit test*) yang memberikan pemejanaan SNEDDS propolis sebesar 2000 mg/kgBB (po) pada 1 ekor tikus. Pemejanaan dilanjutkan ke 4 tikus berikutnya dengan dosis yang sama jika dalam 8 jam tikus pertama tidak mengalami kematian. Jika tikus pertama mati, maka uji batas dihentikan dan lanjut ke uji utama dengan perkiraan LD₅₀ < 200 mg/kgBB. Adapun perkiraan LD₅₀ > 2000 mg/kgBB jika minimal kematian hewan uji <3 pada uji batas ini.

Uji utama dilakukan dengan memejankan SNEDDS propolis pada dosis awal 175 mg/kgBB pada 1 hewan uji. Untuk tikus selanjutnya akan mendapatkan dosis yang lebih tinggi jika tikus 1 hidup dan dosis yang lebih rendah jika tikus 1 mati. Penentuan naik dan turunnya dosis berdasar faktor 1,3. Segera setelah dipejankan senyawa uji, tikus diamati gejala klinis ketoksikannya meliputi abnormalitas sistem syaraf pusat, aktivitas somatomotor (pergerakan dan sensitivitas terhadap stimulus), syaraf otonom, pernafasan, detak jantung, warna dan konsistensi fesem warna dan tekstur kulit maupun bulu dan performa secara umum. Pengamatan gejala ketoksikan dilakukan secara intensif dalam 4 jam pertama setelah pemejanaan dan secara periodik dalam 48 jam hingga 14 hari. Pengukuran berat badan dilakukan setiap seminggu sekali sebagai parameter lain dalam penentuan efek toksik. Pada akhir pengujian, hewan uji dikorbankan (euthanasia dengan ketamin dan xylazine) dan dinekropsi untuk diisolasi hepar dan ginjalnya. Segera setelah diambil, hepar dan ginjal diproses untuk pembuatan preparat histopatologis dengan difiksasi menggunakan BNF 10% selama 2 hari. Jaringan selanjutnya dipotong dan disusun dalam *tissue cassette* untuk dehidrasi dan infiltrasi paraffin menggunakan *automatic tissue processor*. Blok paraffin yang dihasilkan selanjutnya dipotong dan diletakkan diatas *object glass*. Setelah inkubasi selama 24 jam, preparate diwarnai dengan pewarna haemotoksilin eosin (HE) dan diamati dengan mikroskop perbesaran 200 dan 400x.

Analisis Data

Hasil dari penelitian ini meliputi data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif yang didapatkan meliputi pengamatan gejala klinis ketoksikan dan gambaran histopatologi hepar maupun ginjal. Adapun data kuantitatif meliputi berat badan hewan uji, nilai LD₅₀, dan skoring gambaran histopatologis hepar. Analisis statistik *one-way Anova* digunakan untuk mengetahui perbedaan berat badan antar kelompok perlakuan, AOT425StatPgm untuk penentuan nilai LD50, dan kategorisasi untuk hasil skoring menggunakan sistem NASH CRN (Non-Alcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network) [11].

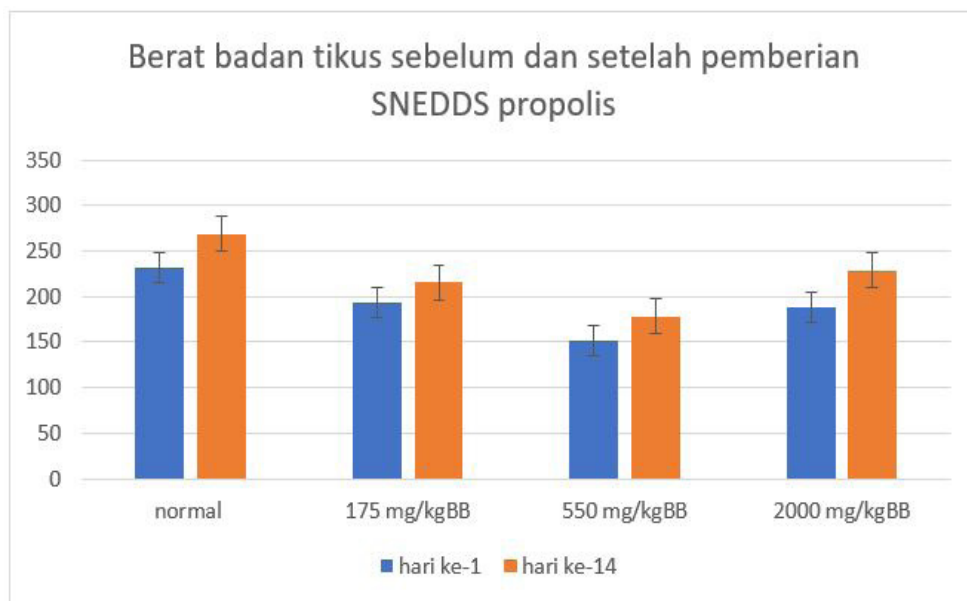
Hasil dan Diskusi

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi profil keamanan sediaan SNEDD propolis yang telah diketahui efeknya sebagai imunostimulan. Metode yang digunakan adalah prosedur standar uji ketoksikan akut OECD 425 dan telah mendapat persetujuan komite etik Fakultas Kedokteran UII (no:18/Ka.Kom.Et/70/KE/II/2021). Pengujian diawali dengan melakukan uji pendahuluan (*limit test*) yang didapatkan hasil berupa seluruh hewan uji tidak mengalami kematian pada pemejanaan dosis 2000 mg/kgBB. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan rentang nilai LD₅₀ > 2000 mg/kgBB.

Melanjutkan uji pendahuluan, uji utama dilakukan dengan dosis awal sebesar 175 mg/kgBB (po) dengan pengamatan hingga 14 hari. Salah satu pengamatan yang dilakukan adalah tanda dan gejala ketoksikan pada sistem saraf otonom, somatomotor, sistem pernapasan, mata, saluran cerna, dan terjadinya kematian [12]. Pada studi ini, gejala ketoksikan klinis yang teramati (Tabel 1) pada hampir seluruh hewan uji dari dosis terendah hingga tertinggi adalah lesu, terengah-engah, dan lokomotor menurun. Gejala tersebut muncul sesaat setelah pemberian sediaan uji. Untuk gejala terengah-engah, berdasar pengamatan didapatkan bahwa gejala ini muncul karena faktor tidak nyaman hewan uji saat dilakukan pemejanaan, memberikan sediaan uji menggunakan sonde oral. Adapun gejala lesu

Tabel 1. Frekuensi gejala ketoksikan SNEDDS propolis pada tikus Wistar jantan

Asam Amino (%)	GB
L-Aspartic acid	5,25
L-Serine	3,21
L-Glutamic acid	8,22
Triptophan	0,00



Gambar 1. Berat badan tikus sebelum dan setelah pemejanan SNEDDS propolis

muncul kemungkinan disebabkan karena sediaan yang dipejankan sangat kental (terutama dosis tertinggi 2000 mg/kg BB), sehingga menyebabkan rasa tidak nyaman. Gejala lain yang teramati adalah penurunan lokomotor yang berkorelasi dengan kondisi lesu pada tikus.

Meskipun ada beberapa gejala ketoksikan klinis yang teramati pada penelitian ini, namun gejala tersebut secara bertahap berkurang dan hewan uji kembali normal setelah pengamatan intensif 4 jam paska pemejanan. Sehingga dapat disimpulkan bahwa gejala yang muncul adalah bentuk adaptasi hewan uji saat pemberian sediaan namun bukan gejala ketoksikan klinis akibat sediaan yang dipejankan. Hal ini sejalan dengan penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya bahwa tidak terdapat perubahan signifikan perilaku tikus yang diberi ekstrak propolis dan kelompok normal [13]. Sehingga dari hasil pengamatan gejala ketoksikan klinis, didapatkan bahwa pembuatan formulasi dalam bentuk SNEDDS tidak toksik seperti halnya dalam bentuk ekstrak.

Selain pengamatan gejala klinis, karakteristik lain adanya efek toksik adalah penurunan berat badan hewan uji minimal 10% pada tikus [14]. Pada penelitian ini, berat badan hewan uji diamati sebelum (hari ke-1) dan sesudah pemejanan SNEDDS propolis (hari ke-14). Hasil pengukuran berat badan (Gambar 1) terlihat bahwa berat badan tikus cenderung mengalami peningkatan di akhir pengujian dibandingkan hari ke-1 ($p > 0,05$). Kondisi tersebut membuktikan bahwa jumlah pakan yang dikonsumsi tikus tidak terpengaruh oleh pemejanan sediaan uji yang berkorelasi dengan tidak adanya efek toksik terhadap pemejanan tersebut [15]. Lebih lanjut,

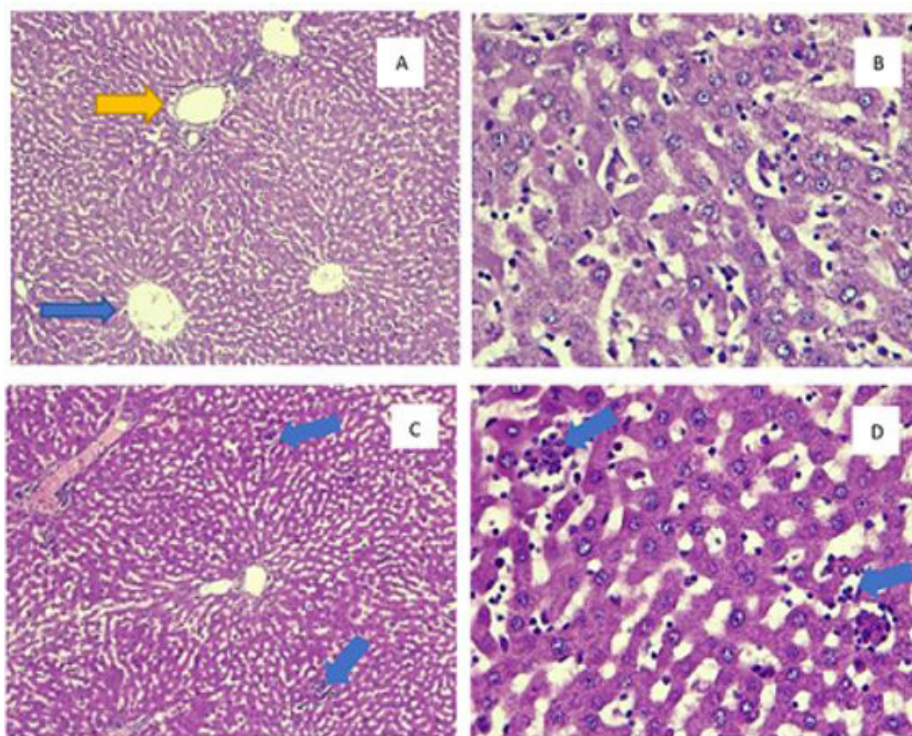
hasil studi ini serupa dengan hasil uji ketoksikan ekstrak propolis yang tidak berpengaruh terhadap penurunan berat badan [16].

Melengkapi hasil pengamatan gejala klinis dan berat badan, untuk memastikan level keamanan sediaan propolis dalam bentuk SNEDDS maka ditentukan nilai LD_{50} menggunakan *software* AOT425StatPgm [17]. Perhitungan LD_{50} didasarkan pada dosis yang menyebabkan kematian hewan uji. Dikarenakan hingga dosis tertinggi tidak ada tikus yang mati, maka nilai LD_{50} dari SNEDDS propolis adalah > 2000 mg/kg BB (po). Berdasarkan klasifikasi GHS (*Global Harmonized System*), sediaan yang memiliki nilai $LD_{50} > 2000$ mg/kg BB masuk kategori lima yang berarti toksisitas rendah, sehingga tidak menyebabkan gejala ketoksikan pada hewan uji. Meskipun sediaan nanopartikel memungkinkan absorpsi zat aktifnya yang lebih banyak dan menimbulkan potensi ketoksikan, namun berdasar studi oleh Wolfram (2016) menyatakan bahwa keamanan sediaan nanopartikel sangat terkait dengan

Tabel 2. Skoring histopatologis hepar tikus setelah pemberian SNEDDS propolis

Asam Amino (%)	GB
L-Aspartic acid	5,25
L-Serine	3,21
L-Glutamic acid	8,22
Triptophan	0,00

*foci: titik pusat suatu kerusakan melokalisasi atau berkembang

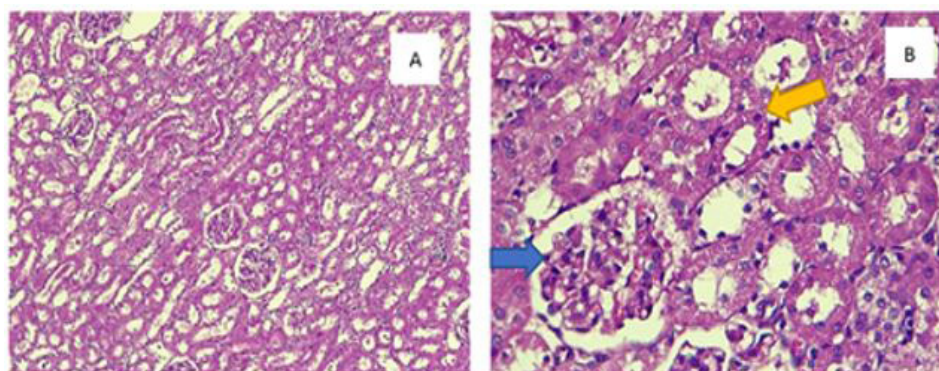


Gambar 2. Hasil pengamatan histopatologi hepar pada hari ke-14 setelah pemejanaan SNEDDS propolis, Keterangan : A. Tikus normal diamati dengan perbesaran 200x (panah biru: vena sentralis, panah kuning: trias porta); B. Tikus normal diamati dengan perbesaran 400x; C. Tikus dosis 2000 mg/kgBB perbesaran 200x (panah biru: sebulan limfosit); D. Tikus dosis 2000 mg/kgBB perbesaran 400x (panah biru: sebulan limfosit)

sifat fisikokimia, ukuran, dan sifat permukaan (muatan, luas, dan reaktivitas [18]. Disisi lain, beberapa penelitian menunjukkan bahwa sediaan nanopartikel dengan ukuran partikel 15-50 nm tidak menimbulkan gejala dan tanda ketoksikan [19,20]. Studi lebih lanjut terkait jumlah zat yang mampu terabsorpsi dan terdistribusi dari suatu sediaan nano partikel sangat dibutuhkan untuk memahami potensi ketoksikan yang mungkin terjadi.

Untuk memastikan bahwa ketiadaan efek toksik tidak hanya pada level makroskopis, maka pemeriksaan

mikroskopis melalui pengamatan histopatologis hepar dan ginjal dilakukan (pengecatan HE, 400x). Hepar dan ginjal adalah organ yang penting dalam proses metabolisme maupun ekskresi suatu senyawa yang masuk ke dalam tubuh. Sehingga, jika suatu senyawa bersifat toksik, maka kedua organ tersebut akan mengalami perubahan kondisi selulernya. Gambaran histopatologis hepar pada tikus yang dikorbkan di akhir penelitian terlihat pada Gambar 2. Pada tikus normal, tampak vena sentralis dan kondisi sel tidak ada perubahan (Gambar 2A dan B), begitu pula



Gambar 3. Hasil pengamatan histopatologi ginjal pada hari ke-14 setelah pemejanaan SNEDDS propolis Keterangan: A. Tikus normal diamati dengan perbesaran 200x; B. Tikus normal diamati dengan perbesaran 400x (panah biru: glomerulus, panah kuning: tubulus).

pada tikus yang mendapat pemejanan dosis 175 dan 550 mg/kgBB yang berada dalam batas normal. Namun, pada tikus yang mendapatkan dosis tertinggi yaitu 2000 mg/kgBB, terlihat adanya sebaran limfosit (Gambar 2C dan D). Hal tersebut menunjukkan adanya infiltrasi sel radang yang umumnya dikarenakan efek zat toksik, bakteri, virus, dll sehingga menginduksi limfosit masuk ke dalam sel hepatosit (Yulida, 2013; Kismiyati, 2018). Meskipun demikian, infiltrasi sel radang perilobular masuk kategori batas normal dan bersifat *reversible* serta mendapat skor 1 (Tabel 2) berdasarkan skoring NASH CRN [21]. Sehingga dapat disimpulkan bahwa SNEDDS propolis tidak menimbulkan kerusakan pada hepar hewan uji.

Organ lain yang diamati histopatologisnya adalah ginjal sebagai jalur ekskresi utama dalam tubuh. Pemejanan suatu senyawa dalam konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan akumulasi metabolit toksik di ginjal yang selanjutnya menyebabkan kerusakan. Hasil pengamatan histopatologis ginjal (Gambar 3) menunjukkan kondisi ginjal yang normal, tidak ada degenerasi pada glomerulus dan tubulus maupun kongesti. Hasil tersebut konsisten teramati pada seluruh dosis perlakuan. Sehingga pemejanan SNEDDS propolis tidak menimbulkan kerusakan pada ginjal tikus.

Berdasar seluruh hasil yang didapat dalam penelitian ini, membuktikan bahwa formulasi sediaan propolis dalam bentuk SNEDDS tidak menimbulkan efek ketoksikan secara akut. Metode uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode standar pengujian ketoksikan akut OECD 425. Berbagai kelebihan dapat dicatat pada metode ini dibandingkan metode yang sebelumnya. Namun, adanya batasan dosis maksimal 2000 mg/kgBB akan memberikan nilai LD₅₀ semu untuk senyawa yang tidak menimbulkan ketoksikan pada dosis tersebut sehingga tidak diketahui nilai LD₅₀ nya secara pasti. Studi terkait perbaikan kekentalan hasil formulasi dan peningkatan *loading dose* zat aktif kedalam pembawa SNEDDS akan mempermudah dalam pengujian ketoksikan selanjutnya.

Kesimpulan

Propolis yang diformulasikan dalam bentuk nanopartikel SNEDDS tidak menyebabkan ketoksikan akut secara per oral berdasarkan pengamatan gejala klinis, berat badan, dan histopatologis hepar maupun ginjal. Nilai LD₅₀ yang didapatkan adalah > 2000 mg/kgBB (po) dan masuk kategori senyawa yang sedikit toksik.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada KEMDIKBUDRISTEK

yang telah mendanai penelitian ini melalui hibah skema Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi tahun 2021 dengan nomor kontrak 009/DirDPPM/70/DPPM/PTUPT-KEMDIKBUDRISTEK/VII/2021.

Referensi

- Khanna K, Kohli SK, Kaur R, Bhardwaj A, Bhardwaj V, Ohri P, et al. Herbal immune-boosters: Substantial warriors of pandemic Covid-19 battle. *Phytomedicine* 2021;85:153361-.
- Al-Hariri M. Immune's-boosting agent: Immunomodulation potentials of propolis. *J Family Community Med* 2019;26(1):57-60.
- Katarzyna W, Gorska A, Antosik K, Lugowska K. Immunomodulatory Effects of Propolis and its Components on Basic Immune Cell Functions. *Indian J Pharm Sci* 2019;81.
- Omene C, Kalac M, Wu J, Marchi E, Frenkel K, O'Connor OA. Propolis and its Active Component, Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), Modulate Breast Cancer Therapeutic Targets via an Epigenetically Mediated Mechanism of Action. *J Cancer Sci Ther* 2013;5(10):334-42.
- Park JH, Lee JK, Kim HS, Chung ST, Eom JH, Kim KA, et al. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. *Int Immunopharmacol* 2004;4(3):429-36.
- Gao W, Wu J, Wei J, Pu L, Guo C, Yang J, et al. Brazilian green propolis improves immune function in aged mice. *J Clin Biochem Nutr* 2014;55(1):7-10.
- Di Pierro F, Zanvit A, Colombo M. Role of a proprietary propolis-based product on the wait-and-see approach in acute otitis media and in preventing evolution to tracheitis, bronchitis, or rhinosinusitis from nonstreptococcal pharyngitis. *Int J Gen Med* 2016;9:409-14.
- Fitria A, Hanifah S, Chabib L, Uno AM, Munawwarah H, Atsil N, et al. Design and characterization of propolis extract loaded self-nano emulsifying drug delivery system as immunostimulant. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2021;29(6):625-34.
- Ai J, Biazar E, Jafarpour M, Montazeri M, Majidi A, Aminifard S, et al. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *Int J Nanomedicine* 2011;6:1117-27.
- Vega-Villa KR, Takemoto JK, Yáñez JA, Remsburg CM, Forrest ML, Davies NM. Clinical toxicities of nanocarrier systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60(8):929-38.
- Juluri R, Vuppalanchi R, Olson J, Unalp A, Van Natta ML, Cummings OW, et al. Generalizability of the nonalcoholic steatohepatitis Clinical Research Network histologic scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2011;45(1):55-8.
- Nurqolbiah E, Kusharyanti I, Nurbaeti SN. Uji Toksisitas Fraksi Air Impatiens balsamina Pada Tikus Betina Galur Sprague Dawley. *Pharmaceutical Sciences and Research* 2014;1:16-29.
- Abozaid O, Shawi O, Aziza S, Abu-Elazm A. Safety and /or Toxicity of Acute Dual Propolis and Ginger co-treatment in female albino Rats A B S T R A C T. 2019.
- Chapman K, Sewell F, Allais L, Delongea JL, Donald E, Festag M, et al. A global pharmaceutical company initiative: an evidence-based approach to define the upper limit of body weight loss in short term toxicity studies. *Regul Toxicol Pharmacol* 2013;67(1):27-38.
- Hoffman WP, Ness DK, van Lier RBL. Analysis of Rodent Growth Data in Toxicology Studies. *Toxicological Sciences* 2002;66(2):313-9.
- da Silva RO, Andrade VM, Bullé Rêgo ES, Azevedo Dória GA, Santos Lima BD, da Silva FA, et al. Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. *J Ethnopharmacol* 2015;170:66-71.
- OECD. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure 2008.
- Wolfram J, Zhu M, Yang Y, Shen J, Gentile E, Paolino D, et al. Safety of Nanoparticles in Medicine. *Curr Drug Targets* 2015;16(14):1671-81.
- Pokharkar V, Dhar S, Bhumkar D, Mali V, Bodhankar S, Blv P. Acute and Subacute Toxicity Studies of Chitosan Reduced Gold Nanoparticles: A Novel Carrier for Therapeutic Agents. *Journal of biomedical nanotechnology* 2009;5:233-9.

[20]. Pan Y, Neuss-Stein S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, et al. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small* (Weinheim an der Bergstrasse, Germany) 2007;3:1941-9.

[21]. Puri P, Sanyal AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: Definitions, risk factors, and workup. *Clin Liver Dis* (Hoboken) 2012;1(4):99-103..



Copyright © 2022 The author(s). You are free to share (copy and redistribute the material in any medium or format) and adapt (remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially) under the following terms: Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)