

Studi Pendahuluan Potensi Antibakteri dari Kapsul Ekstrak Cacing Tanah (*Lumbricus Rubellus*) dan Cacing Kalung (*Pheretima Aspergillum*) yang Beredar di Pasaran terhadap Bakteri *Escherichia Coli* Dan *Staphylococcus Aureus* Secara In Vitro

¹Leonard Azdarisha K., ²Suwendar, ³Sri Peni Fitriyaningsih

^{1,2,3}Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung.

Jl. Tamansari No. 1 Bandung 40116

Email: ¹azdarisha@gmail.com, ²suwendarronnie@yahoo.com, ³sri_peni@yahoo.com

Abstrak. Telah dilakukan studi pendahuluan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari dua sediaan kapsul cacing yang beredar di pasaran yang masing – masing mengandung ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dan ekstrak cacing kalung (*Pheretima aspergillum*) terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus* serta untuk menentukan KHM. Metoda penelitian menggunakan metode KHM dengan perbandingan Antibiotik Amoksisilin. Hasil menunjukan bahwa kedua sediaan uji memberikan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus*. KHM sediaan cacing tanah 5% pada bakteri *E.coli* dan <1% pada bakteri *S.aureus*, KHM sediaan cacing kalung 10% pada bakteri *E.coli* dan <1% pada bakteri *S.aureus*.

Kata Kunci : *L.rubellus*, *P.aspergillum*, *S. aureus*, *E.coli*

A. Pendahuluan

Penyakit infeksi merupakan penyakit utama yang melanda masyarakat negara - negara berkembang. Di Indonesia pun dewasa ini penyakit infeksi masih menduduki tempat teratas diantara penyakit - penyakit yang menyerang penduduk Indonesia. Penyakit penyebab utama kematian terbesar adalah penyakit sirkulasi (jantung/pembuluh darah otak) yaitu 222 per 100.000 penduduk, selanjutnya penyakit infeksi 174 dan pernapasan 85 per 100.000 penduduk. Angka kematian untuk penyakit infeksi dan pernapasan lebih tinggi di pedesaan (204 dan 102) dibandingkan di perkotaan (136 dan 62) (Soemantri, D.S., 2001:37). Antibiotik termasuk kelompok obat yang paling sering dan terbanyak digunakan untuk memerangi penyakit - penyakit infeksi (Wattimena, 1991:1). Penyebab utama resistensi antibiotika adalah penggunaannya yang meluas dan irasional. Lebih dari separuh pasien dalam perawatan rumah sakit menerima antibiotik sebagai pengobatan ataupun profilaksis. Sekitar 80% konsumsi antibiotik dipakai untuk kepentingan manusia dan sedikitnya 40% berdasar indikasi yang kurang tepat, misalnya infeksi virus (Utami, E.R, 2012:124). Karena adanya kejadian resistensi tersebut, maka dicarilah obat alternatif baru untuk mengobati infeksi.

Cacing kalung atau dalam bahasa ilmiahnya *Pheretima aspergillum*, telah dipercaya oleh masyarakat Indonesia berkhasiat menyembuhkan penyakit Tifus. Dari 1800 spesies cacing, hanya dua spesies cacing yang sering dijadikan obat tradisional, yaitu Cacing Eropa atau Introduksi (*Lumbricus rubellus*) dan Cacing Kalung atau Long (*Pheretima aspergillum*). Dalam kasus penyakit tifus, ekstrak cacing tanah bisa bekerja dari dua sisi, yaitu membunuh bakteri penyebabnya sekaligus menurunkan demamnya (Mustakim, 2010).

Penelitian cacing sebelumnya mempelajari tentang pengaruh penghambatan Ekstrak Cacing Tanah (ECT) (*Lumbricus rubellus*) dan Ekstrak Cacing Tanah terenkapsulasinya (ECT-t) sebagai imbuhan pakan terhadap beberapa bakteri patogen. Hasil tersebut menunjukkan bahwa *S. aureus* merupakan bakteri yang paling sensitif

terhadap ekstrak cacing tanah. Tingkat ECT-t 0,78% dan 1,04% yang diukur dengan spektrofotometer masing-masing menunjukkan penghambatan ($P < 0,05$) terhadap *P. aeruginosa* dan *S. pullorum*. Sementara tingkat ECT-t 0,26% yang diukur menggunakan metode *spread plate count* sudah menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap *P. aeruginosa*. Dosis letal 50% (LD50) *E. coli* dan *P. aeruginosa* ditemukan pada tingkat ECT 1,04%, sedangkan LD50 *S. aureus* ditemukan pada tingkat 0,52%. LD50 *P. aeruginosa* terdapat pada tingkat ECT-t 0,52%. Tidak terdapat aktivitas antibakteri ($P > 0,05$) dari ECT dan ECT-t terhadap *S. pullorum* (Istiqomah, dkk., 2011).

Penelitian lain menyebutkan bahwa air rebusan cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dengan baik. Daya hambat yang terbentuk pada masing-masing perlakuan berbeda-beda. Pada konsentrasi 20 % menunjukkan rata-rata daerah hambat terbesar yaitu 14,49 mm dan pada konsentrasi 80 % menunjukkan rata-rata daerah hambat terkecil yaitu 7,92 mm (Indriarti dkk., 2011).

Berdasarkan penelitian – penelitian tersebut terdapat kesamaan pada bakteri yang dijadikan sebagai target kerja penelitian, yaitu bakteri *Escherichia coli* sebagai model pada bakteri Gram negatif, namun untuk mengetahui apakah sediaan kapsul mempunyai aktivitas terhadap bakteri Gram positif, maka digunakan *Staphylococcus aureus* sebagai model, sehingga penelitian ini ditujukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri sediaan kapsul cacing yang beredar di pasaran pada bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Rumusan masalah penelitian ini yaitu, pertama, apakah kedua sediaan kapsul cacing yang beredar di pasaran dapat memberikan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*? Kedua, pada Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) berapa masing - masing sediaan kapsul dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*? Ketiga, apa jenis spektrum kerja dari masing - masing sediaan kapsul cacing yang digunakan dalam penelitian ini? Keempat, sediaan kapsul cacing manakah yang memberikan aktivitas antibakteri yang paling baik terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*?

Sejalan dengan latar belakang dan rumusan masalah, maka secara khusus penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari kedua sediaan kapsul cacing yang beredar di pasaran (cacing tanah dan cacing kalung) terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Serta untuk menentukan konsentrasi hambat minimum, spektrum kerja dan untuk mengetahui aktivitas antibakteri paling baik dari kedua sediaan kapsul cacing yang beredar di pasaran terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Manfaat dari penelitian ini adalah mengetahui khasiat sediaan obat tradisional secara ilmiah yang beredar dipasaran yang bermanfaat untuk pengembangan pengobatan infeksi bakteri terutama untuk penanganan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

B. Landasan Teori

Dalam tubuh cacing tanah dan cacing kalung terdapat berbagai kandungan yang sangat bermanfaat bagi manusia, diantaranya asam arakidonat yang berkhasiat untuk menurunkan suhu tubuh yang demam akibat infeksi. Enzim lumbrokinase berkhasiat membantu mengatasi penyakit tekanan darah, enzim selulase dan lignase

berkhasiat membantu proses pencernaan makanan, sedangkan enzim peroksidase dan katalase berkhasiat membantu mengatasi penyakit degeneratif seperti diabetes mellitus, kolesterol tinggi, dan reumatik. Hal ini diduga karena enzim katalase dapat menghambat produksi 8-epi-PGF(2 α) sehingga dapat digunakan untuk menurunkan rasa nyeri yang timbul pada penyakit-penyakit degeneratif tersebut (Watkins, 1999).

C. Hasil Penelitian

Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Kapsul Cacing Tanah Dan Cacing Kalung

Kapsul cacing tanah dan kapsul cacing kalung masing – masing diuji aktivitasnya terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus* dengan metode difusi agar. Hasil pengujian aktivitas antibakteri kapsul cacing tanah dan kapsul cacing kalung dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji aktivitas antibakteri kapsul cacing tanah dan kapsul cacing kalung terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*

Konsentrasi (%) (b/v)	Diameter hambat (mm) \pm SD			
	Cacing tanah		Cacing kalung	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	20,35 \pm 0,35	-	9,0 \pm 0,1	-
5	23,5 \pm 1,1	24,7 \pm 0,1	10,45 \pm 1,0	-
10	26,3 \pm 0,2	25,1 \pm 0,1	9,1 \pm 0,5	9,8 \pm 0,4
20	25,6 \pm 0,3	26,45 \pm 0,05	12,95 \pm 0,45	10,35 \pm 0,35
30	23,8 \pm 1,0	28,1 \pm 0,1	11,25 \pm 0,05	10,6 \pm 1,6
40	19,3 \pm 0,4	28,6 \pm 0,15	12 \pm 0,2	11,65 \pm 0,3

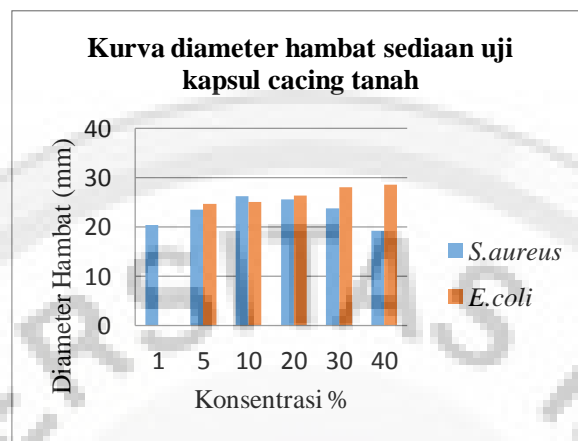
Dari **Tabel 1** diketahui bahwa cacing tanah dan cacing kalung memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus* karena kedua cacing yang digunakan dapat memberikan diameter hambat terhadap kedua bakteri yang digunakan, dilihat dari hasil pengujian bahwa setiap sediaan uji dapat memberikan zona bening pada media Nutrien Agar yang mengandung biakan bakteri uji pada konsentrasi sediaan uji tertentu.

Kapsul cacing tanah memberikan diameter hambat paling besar terhadap bakteri *E.coli* dan bakteri *S.aureus* dibandingkan kapsul cacing kalung. Hal ini dapat dilihat dari diameter hambat kapsul cacing tanah lebih besar dibandingkan diameter hambat pada kapsul cacing kalung (**Tabel 1**). Diantara kedua bakteri *E.coli* dan bakteri *S.aureus* tidak ada perbedaan yang signifikan pada diameter hambat pada kedua kapsul yang digunakan, meskipun pada kedua bakteri ada perbedaan struktur dinding sel bakteri, dinding sel *S.aureus* hanya terdiri dari beberapa lapis peptidoglikan tanpa adanya tiga polimer pembungkus yang terletak di luar lapisan peptidoglikan yaitu lipoprotein, selaput luar dan lipopolisakarida seperti yang dimiliki oleh *E.coli* (Jawetz, dkk., 2005:29).

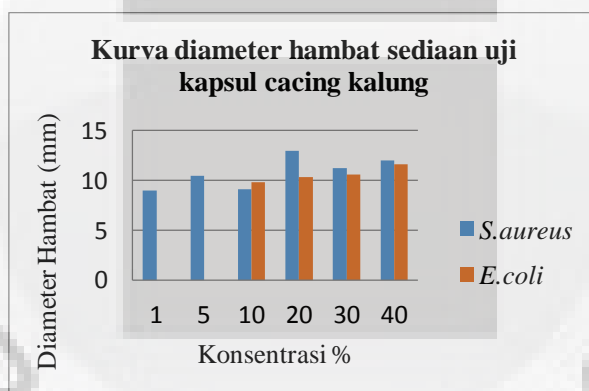
Hasil Uji Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kapsul Cacing Tanah Dan Cacing Kalung

Dari hasil pengujian, didapatkan hasil Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada kedua sediaan kapsul terhadap *E.coli* . Untuk Kapsul cacing tanah mempunyai

KHM 5% pada bakteri *E.coli* dan pada bakteri *S.aureus* KHM belum dapat ditentukan karena sampai dengan konsentrasi 1% masih memberikan efek. Untuk kapsul cacing kalung mempunyai KHM 10% pada bakteri *E. coli* dan pada bakteri pada bakteri *S.aureus* KHM belum dapat ditentukan juga karena sampai dengan konsentrasi 1% masih memberikan efek.



Gambar 1. Kurva uji aktivitas antibakteri kapsul cacing tanah terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*



Gambar 2. Kurva uji aktivitas antibakteri kapsul cacing kalung terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Karena kapsul cacing tanah dan kapsul cacing kalung dapat memberikan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S.aureus* yang mewakili Gram positif dan bakteri *E.coli* yang mewakili Gram negatif, maka kedua sediaan kapsul yang digunakan mempunyai spektrum kerja luas sebagai antibakteri.

Dari hasil yang diperoleh, dapat diamati bahwa kapsul cacing tanah yang memberikan diameter hambat lebih besar pada kedua bakteri yang digunakan, maka sediaan kapsul cacing yang memberikan aktivitas antibakteri paling baik terhadap bakteri *S.aureus* dan bakteri *E.coli* adalah kapsul cacing tanah.

Hasil Uji Penentuan Kesetaraan Aktivitas Uji Terhadap Antibakteri Pembeding

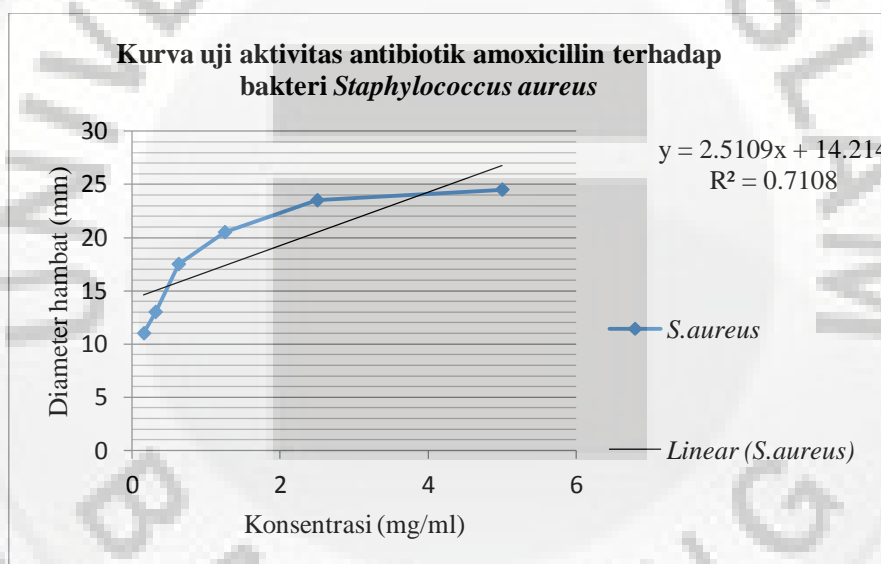
Pada penelitian ini dilakukan pula penentuan kesetaraan aktivitas sediaan uji terhadap antibakteri pembeding yang efektif terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus*.

Antibakteri yang digunakan adalah Amoxicillin sebagai pembanding terhadap aktivitas *E.coli* dan *S.aureus* yang ditunjukkan oleh kapsul cacing tanah dan kapsul cacing kalung. Hasil dapat dilihat pada Tabel 2 berikut ini:

Tabel 2. Hasil Uji aktivitas antibiotik amoxicillin terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

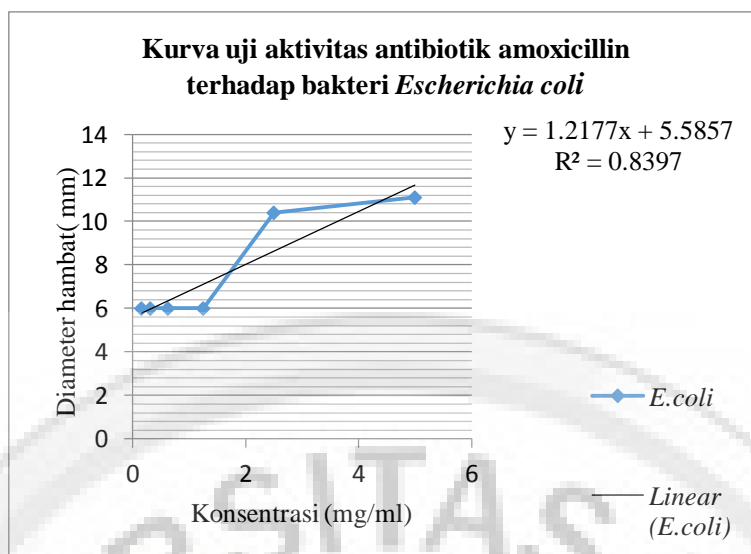
Konsentrasi (mg/ml)	Diameter hambat* (mm)	
	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
0,15	11,0	6,00
0,31	13,0	6,00
0,62	17,50	6,00
1,25	20,50	6,00
2,50	23,50	10,40
5,00	24,50	11,10

*ukuran perforator 6mm



Gambar 3. Kurva uji aktivitas antibiotik amoxicillin terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*

Pada pengujian terhadap *S.aureus*, berdasarkan data yang diperoleh pada kapsul cacing tanah dan cacing kalung dengan konsentrasi 5% (b/v) memberikan diameter hambat sebesar 23,5 mm dan 10,45 mm. Dengan menggunakan persamaan garis kurva baku amoxicillin diperoleh nilai $y = 2,510x + 14,21$, maka diperoleh nilai banding kapsul cacing tanah dengan konsentrasi 50 mg setara dengan 3,7 mg amoxicillin atau kapsul cacing tanah dengan konsentrasi 1 mg setara dengan 0,0074 mg amoxicillin.



Gambar 4. Kurva uji aktivitas antibiotik amoxicillin terhadap bakteri *Escherichia coli*

Pada pengujian terhadap *E.coli*, berdasarkan data yang diperoleh pada cacing tanah dan cacing kalung dengan konsentrasi 5% (b/v) memberikan diameter hambat sebesar 24,7 mm dan 6 mm. Dengan menggunakan persamaan garis kurva baku amoxicillin diperoleh nilai $y = 1,217x + 5,585$, maka diperoleh nilai banding cacing tanah dengan konsentrasi 50 mg setara dengan 15,7 mg amoxicillin atau cacing tanah dengan konsentrasi 1 mg setara dengan 0,31 mg amoxicillin, dan pada cacing kalung dengan konsentrasi 50 mg setara dengan 0,34 mg amoxicillin atau cacing kalung dengan konsentrasi 1 mg setara dengan 0,0068 mg amoxicillin. Pada penentuan kesetaraan aktivitas ini diketahui bahwa kapsul cacing tanah pada bakteri *E.coli* dan *S.aureus* memiliki aktivitas lebih rendah dibandingkan dengan antibakteri pembanding yaitu amoxicillin. Jadi, antibiotik amoksisilin masih lebih kuat aktivitasnya dibanding kedua kapsul ekstrak cacing terhadap kedua bakteri uji.

D. Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa cacing tanah dan cacing kalung masing – masing memberikan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus*. KHM cacing tanah terhadap bakteri *E.coli* 5% dan KHM cacing tanah terhadap bakteri *S.aureus* belum dapat ditentukan. Berdasarkan hasil pengamatan, pada konsentrasi terendah yaitu 1%, cacing tanah masih menimbulkan diameter hambat pada *S.aureus*. KHM cacing kalung terhadap *S.aureus* adalah 10%, KHM cacing kalung terhadap *S.aureus* belum dapat ditentukan. Berdasarkan hasil pengamatan, pada konsentrasi terendah yaitu 1%, cacing kalung masih menimbulkan diameter hambat pada *S.aureus*. Karena kedua sediaan kapsul cacing dapat memberikan aktivitas antibakteri pada bakteri *E.coli* (yang mewakili bakteri Gram negatif) dan *S.aureus* (yang mewakili bakteri Gram positif) maka kedua sediaan kapsul cacing tersebut memiliki spektrum kerja luas. Cacing tanah memiliki aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan cacing kalung.

Cacing tanah menimbulkan aktivitas antibakteri lebih baik daripada cacing kalung, terlihat pada hasil pengujian cacing tanah terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus*. Sedangkan pada cacing kalung diameter hambat *E.coli* dan pada *S.aureus* hanya setengahnya dari cacing tanah.

Aktivitas antibakteri dari 1 mg kapsul cacing tanah terhadap *E.coli* setara

dengan 0,31 mg amoxicillin, 1 mg kapsul cacing tanah setara dengan 0,0074 mg oksitetrasiklin terhadap bakteri *S.aureus*.

Daftar Pustaka

- Ambarsari, C. (2004). Aktivitas Antibakteri Daun Bunga telang (*Clitoria ternatea* Linn) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermis* dengan Metode Difusi Agar [Skripsi], Jurusan Farmasi FMIPA, Universitas Padjajaran, Bandung.
- Brock & Madigan, (1991). *Biology of microorganism*, 9th edition. Practice Hall International, incorporated.
- Bergey's, *Manual of Systematic Bacteriology* 2nd edition, vol 5 (2012). Springer New York Dordrech Heidelberg London.
- Chang, Yung-Ming. (2011)b. Schwann Cell Migration Induced by Earthworm Extract via Activation of PAs and MMP2/9 Mediated through ERK1/2 and p38. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Article ID 395458.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia (1995). *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.
- Dian laila p., (2010). Uji in vitro pengaruh jenis tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus* dan *Pheretima aspergillum*) dengan Variasi suhu pengolahan (50°C, 60°C, dan 70°C) Terhadap penghambatan pertumbuhan Bakteri *Salmonella typhi* [skripsi]. JURUSAN BIOLOGI FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MAULANA MALIK IBRAHIM, Malang.
- Gelu, MF. Deasy, Yoseferta, Riana, Nugroho, Dimas Adi, Kurniasari, Tries, (2005). Pengaruh pemberian ekstrak *pheretima aspergillum* terhadap perubahan histopatologik ileum, hepar, vesika fellea dan lien pada tikus balb/C yang diinfeksi *salmonolla typhimurium*. Universitas Diponegoro. Fakultas Kedokteran. *Media medika Indonesiana* vol 40.
- Elizabeth J. Corwin. (2009). *Buku saku patofisiologi* edisi revisi 3. EGC. Jakarta
- Utami, E.R. (2012). *ANTIBIOTIKA, RESISTENSI, DAN RASIONALITAS TERAPI*. [SKRIPSI] Fakultas Sains dan Tekhnologi UIN Maliki, Malang.
- Jawetz. E , Melnick & Adelberg, (1996), "Mikrobiologi Kedokteran", edisi 20 EGC Jakarta
- Hegner, Robert W.(1968). *Invertebrate zoology* 2nd edition. Macmillan (New York).
- <http://sovianchoeruman.wordpress.com/2009/12/26/cacing-kalung-obat-tifus/> So Chen (2009) diakses pada tanggal 25 Feb 2013
- Indriati, G., M.Sumitri, R.Widiana, (2011). Pengaruh Air Rebusan Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. FMIPA-biologi. Universitas Negeri Medan, Medan.
- Istiqomah.L, H.Herdian, E.Damayanti, S.N.Hayati, H.Julendra, (2011). Inhibitory of Encapsulated Earthworm Extract (*Lumbricus rubellus*) on Pathogenic Bacteria in Vitro. UPT. BPPTK. LIPI. Yogyakarta
- Merdikaningsih, T.D. (2002). Efek Antiinflamasi Ekstrak Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) pada Tikus (*Rattus rattus* Strain Wistar). Tugas Akhir. Tidak Dipublikasikan. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

- Mutschler, Ernst (2010). *Dinamika Obat*, edisi ke-5. Diterjemahkan oleh Mathilda B. Widiyanto dan Anna Setiadi Ranti. ITB. Bandung
- Munaf, Sjamsuir. (1994). *Catatan Kuliah Farmakologi Bagian II*. Palembang : EGC
- Mustakim, (2010) *cacing tanah obat kuno untuk tifus*, [SKRIPSI] Universitas Brawijaya, Malang
- Pertiwi, G.U. (2005). *Uji Aktivitas Antijamur dari Sediaan yang Mengandung Ekstrak Etanol Daun Ketapang (Terminalia catappa L) pada Kulit Punggung Kelinci [Skripsi]*, Jurusan Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Rukmana R. (1999). *Budi daya cacing tanah*. Kanisius. Deresan, Yogyakarta.
- Sears. B. W, Spear & R. Saenz, (2007), “*Intisari Mikrobiologi & Kedokteran*”, EGC Jakarta
- Suryaningrum, S. (2009). *Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Buah Jeruk Purut (Citrus hystrix D.C) Terhadap Staphylococcus aureus Dan Escherichia coli [Skripsi]*, Jurusan Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Siswandono dan Soekardjo. (1995). *Kimia Medisinal*. Surabaya: Penerbit Airlangga University Press.
- Soemantri, D.S. (2001). *Pola penyakit penyebab kematian di perkotaan dan pedesaan di Indonesia, Studi Mortalitas Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT)*. *Jurnal Kedokteran Trisakti*, Mei-Agustus 2003, Vol.22 No.2, Jakarta.
- Tjay, Tan Hoan Dan Kirana Rahardja. (2002). *Obat - Obat Penting*. Jakarta. Elex Media Komputindo Kelompok Gramedia.
- Watkins M.T. (1999). *Synthesis of 8-epi-prostaglandin F2 alpha by Human Endothelial Cells: Role of Prostaglandin F2 Synthase*. *Biochem Jurnal*.1999 Des 15; 344 Pt 3: 747-54. Departement of Surgery, Boston Veterans Affairs Medical Center.
- Wattimena, J.R. (1991). *Farmakodinamik dan Terapi Antibiotik*, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- www.epharmacognosy.com/2012/04/earthworm-dilong-pheretima-aspergillum.html
Nuat Duo Lieu, (2010) diakses pada tanggal 20 Agustus 2013 pukul 22.05
- www.bioimages.org.uk/html/p7/p78429.php malcolm storey, (2010) diakses pada tanggal 25 Agustus 2013 pukul 23.10.