

**PENGARUH PEMBERIAN FRAKSI HEKSAN KULIT MANGGIS
TERHADAP KADAR ICAM-1 SERUM MENCIT YANG DIINOKULASI**

Plasmodium berghei

**THE EFFECT OF HEXANE FRACTION OF MANGOSTEEN'S
PERICARPS TOWARDS ICAM-1 SERUM LEVELS IN**

Plasmodium berghei-INOCULATED MICE

Zaneth Sugiri¹, Susy Tjahjani², Khie Khiong³

¹ Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha,

² Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha,

³ Bagian Biologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha

Jalan Prof. Drg. Suria Sumantri MPH No. 65 Bandung 40164 Indonesia

ABSTRAK

Malaria merupakan salah satu penyakit infeksi yang masih menjadi masalah kesehatan masyarakat dunia termasuk di Indonesia. ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*) memiliki peranan yang penting dalam patogenesis malaria serebral yang berkorelasi dengan radikal bebas. Saat ini sudah banyak terjadi resistensi terhadap berbagai obat antimalaria sehingga digunakan ACT (*Artemisinin based Combination Therapy*) yang menghasilkan radikal bebas. Oleh sebab itu diperlukan zat yang menangkal radikal bebas yaitu kulit buah manggis yang mengandung *xanthone* sebagai antioksidan kuat. Penelitian ini bertujuan untuk menilai fraksi heksan kulit manggis dalam menurunkan kadar ICAM-1 serum pada mencit yang diinokulasi *Plasmodium berghei*.

Penelitian bersifat eksperimental laboratorium sungguhan dengan rancangan acak lengkap (RAL), menggunakan 24 mencit jantan galur DDY yang dibagi dalam 6 kelompok (n=4) secara acak, masing-masing kelompok mendapat perlakuan: kontrol akuades tidak diinokulasi *Plasmodium berghei* dan diberi 0,1 mL akuades, sedangkan 5 kelompok lain diinokulasi *Plasmodium berghei* intraperitoneal kemudian masing-masing diberi perlakuan per oral 0,1 mL akuades (kontrol negatif), 0,1 mg artemisinin (kontrol positif), 2,5 mg fraksi heksan kulit manggis (H1), 0,5 mg fraksi heksan kulit manggis (H2) dan 0,1 mg fraksi heksan kulit manggis (H3). Setelah diberi perlakuan selama 3 hari, pada hari ke-4 seluruh mencit diterminasi, kemudian diukur kadar ICAM-1 serum menggunakan metode ELISA. Data yang diperoleh dihitung dengan menggunakan uji ANAVA satu arah dan *Tukey HSD* dengan derajat kemaknaan $\alpha = 0,05$.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata kadar ICAM-1 serum pada kelompok perlakuan fraksi heksan kulit manggis lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ($p < 0,01$). Simpulan penelitian ini adalah fraksi heksan kulit manggis dapat menurunkan kadar ICAM-1 serum pada mencit yang diinokulasi *Plasmodium berghei*.

Kata kunci: malaria, artemisinin, fraksi heksan kulit manggis, ICAM-1

ABSTRACT

Malaria is one of infectious disease that remains as one of public health problems in the world including in Indonesia. ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) has important role in the pathogenesis of cerebral malaria that has correlation with free radicals. Nowadays we have had a lot going on resistance to various antimalarial drugs, therefore current therapy for malaria is the ACT (Artemisinin-based Combination Therapy) that generates free radicals. Therefore it is required substances that counteract free radicals which is mangosteen's pericarps that containing xanthone as a powerful antioxidant. The aim of this research was to evaluate the hexane fraction of mangosteen's pericarps in lowering ICAM-1 serum levels in Plasmodium berghei-inoculated mice.

The research's method was true experimental laboratory research, using 24 male DDY mice were randomly divided into 6 groups (n=4), each group received treatment: the aquadest control group is not inoculated by Plasmodium berghei and given 0,1 mL aquadest, while the other 5 groups are inoculated by Plasmodium berghei intra-peritoneal and given treatment orally 0,1 mL aquadest (negative control), 0,1 mg artemisinin (positive control), 2,5 mg hexane fraction of mangosteen pericarps (H1), 0,5 mg hexane fraction of mangosteen pericarps (H2), and 0,1 mg hexane fraction of mangosteen pericarps (H3). After treatment for 3 days, on the 4th day the entire mice is terminated, then measured ICAM-1 serum levels using ELISA method. All data were analyzed using One Way Analysis Test Of Variance (ANOVA) and Tukey HSD with significance levels based on the value of $\alpha \leq 0.05$.

The results showed that the mean of ICAM-1 serum levels in the treatment group of hexane fraction from mangosteen group was lower than the negative control group ($p < 0.01$). Conclusion of this research was that the hexane fraction of mangosteen's pericarps could decrease ICAM-1 serum levels in Plasmodium berghei-inoculated mice.

Keywords: malaria, artemisinin, hexane fraction of mangosteen's pericarps, ICAM-1

PENDAHULUAN

Malaria adalah penyakit yang mengancam jiwa yang disebabkan oleh parasit yang ditularkan ke manusia melalui nyamuk yang terinfeksi protozoa obligat intraseluler dari genus *Plasmodium*. Malaria menjadi penyebab utama kematian di banyak negara berkembang dan kelompok yang paling rentan adalah anak-anak dan wanita hamil. Menurut *World Malaria Report 2013* dan *Global Malaria Action Plan WHO*, sejumlah 3,4 miliar orang (setengah populasi dunia) tinggal di daerah berisiko penularan malaria di 106 negara. Pada tahun 2012, malaria menyebabkan sekitar 207 juta episode klinis serta 627.000 kematian. Diperkirakan 91 % kematian pada tahun 2010 berada di wilayah Afrika¹.

Satu orang anak meninggal setiap menit akibat malaria namun angka kematian malaria di kalangan anak-anak di Afrika telah berkurang diperkirakan 54 % sejak tahun 2000. Wisatawan dari daerah bebas malaria sangat rentan terhadap penyakit ketika mereka terinfeksi malaria. Malaria

dapat dicegah dan disembuhkan. Peningkatan langkah-langkah pencegahan dan pengendalian malaria dapat mengurangi beban malaria di banyak daerah endemis malaria².

Rencana Strategis Kementerian Kesehatan Tahun 2010 – 2014 menyatakan bahwa malaria merupakan salah satu penyakit yang ditargetkan untuk penurunan angka kesakitan dari 2 menjadi 1 per 1.000 penduduk. Program eliminasi malaria di Indonesia tertuang dalam keputusan Menteri Kesehatan RI No. 293/ MENKES/ SK/ IV/ 2009. Pelaksanaan pengendalian malaria menuju eliminasi dilakukan secara bertahap dari satu pulau sampai seluruh pulau di Indonesia sehingga terwujudnya masyarakat Indonesia yang sehat dan terbebas dari penularan malaria sampai tahun 2030³.

Masalah yang berkembang saat ini pada malaria adalah adanya resistensi malaria terhadap beberapa obat antimalaria. Resistensi terhadap obat antimalaria telah banyak ditularkan pada *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, dan *Plasmodium vivax*. Pada *P. falciparum*,

resistensi obat terdapat pada kuinin dan sulfadoksin-pirimetamin. Bahkan baru-baru ini juga ditemukan adanya resistensi malaria terhadap derivat artemisinin di beberapa daerah. Kegagalan pengobatan karena parasit resisten terhadap obat antimalaria ditandai dengan menetapnya atau timbulnya kembali parasit aseksual di darah perifer (rekrudesensi) yang dapat disertai gejala klinis malaria^{4,5}.

Patogenesis malaria termasuk malaria berat (malaria serebral) berhubungan dengan radikal bebas yang diproduksi. Pada malaria serebral terjadi peningkatan molekul-molekul seperti TNF- α , iNOS, ICAM-1, serta sitoadheren eritrosit yang terinfeksi dengan endotel kapiler dan venula organ internal. Radikal bebas dapat memicu makrofag untuk menghasilkan TNF- α . Peningkatan kadar TNF- α ini akan meningkatkan kadar ICAM-1⁶.

Derivat artemisinin adalah agen antimalaria yang penting yang memiliki mekanisme kerja yang lebih baik daripada obat antimalaria lainnya. Sebuah penelitian telah menunjukkan bahwa pada pengobatan malaria akibat *P. falciparum* dengan artesunat dapat mengurangi kematian dibandingkan dengan kina. Artemisinin dan kina berasal dari tanaman, tetapi secara struktural senyawanya berbeda. Artemisinin termasuk kelompok senyawa seskuiterpen lakton yang mengandung jembatan peroksida. Jembatan peroksida pada molekul artemisinin diputus oleh ion Fe²⁺ menjadi radikal bebas yang sangat reaktif. Radikal-radikal artemisinin ini kemudian menghambat dan memodifikasi berbagai macam molekul dalam parasit sehingga parasit itu mati. Oleh karena itu perlu diteliti obat-obat antimalaria lain yang dapat mengobati malaria terutama malaria serebral serta dapat mengurangi radikal bebas yang terbentuk akibat malaria^{7,8}.

Kulit buah manggis sebagai limbah mengandung senyawa *xanthone* yang sangat tinggi dibanding dengan buah lain. Senyawa *xanthone* sangat bermanfaat karena memiliki aktivitas antioksidan dan antimalaria. Ekstrak kulit buah manggis memiliki aktivitas antioksidan yang besar. Penelitian terhadap buah manggis telah banyak dilakukan. Buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) memiliki banyak khasiat yaitu sebagai antioksidan, antimalaria,

antialergi, antitumor, antiviral, antibakteri, antiinflamasi, dan antimikroba. Menurut Kumar tahun 2012, ekstrak kulit buah manggis mengandung 95 % *xanthone*, isoflavon, tannin, dan flavonoid^{9,10,11,12}.

Xanthone merupakan senyawa yang paling banyak terdapat dalam kulit buah manggis yang memiliki efek antioksidan. Turunan *xanthone* α dan β -*mangosteen* yang diisolasi dari kulit buah manggis memiliki aktivitas antimalaria secara in vitro terhadap *Plasmodium falciparum*. Hasil isolasi *xanthone* dari kulit buah manggis memiliki efek antioksidan dan antimalaria. Dalam kulit buah manggis terkandung antioksidan yang dapat menekan radikal bebas sehingga akan menurunkan kadar ICAM-1^{13,14}.

BAHAN DAN CARA

Bahan uji yang digunakan adalah artemisinin dan fraksi heksan kulit manggis. Mencit yang digunakan berjumlah 24 ekor mencit galur DDY dibagi menjadi 6 kelompok yang masing-masing terdiri dari 4 ekor mencit. Kelompok I yaitu sebagai kontrol akuades (KA) tidak diinokulasi *Plasmodium berghei*, diberi 0,1 mL akuades. Kelompok II yaitu sebagai kontrol negatif (KN) diinokulasi *Plasmodium berghei* 0,1 mL intraperitoneal, diberi 0,1 mL akuades. Kelompok III yaitu sebagai kontrol positif (KP) diinokulasi *Plasmodium berghei* 0,1 mL intraperitoneal dan diberi artemisinin 0,1 mg per hari per ekor secara per oral. Kelompok IV, V, VI yaitu sebagai "H1", "H2", "H3" diinokulasi *Plasmodium berghei* intraperitoneal dan masing-masing diberi fraksi heksan kulit manggis dengan dosis yang berbeda (2,5 mg; 0,5 mg; 0,1 mg) per hari per ekor secara per oral selama 3 hari.

Kemudian dilakukan pewarnaan Giemsa untuk mengetahui kadar parasitemia pada mencit. Darah perifer mencit diambil yaitu dengan cara menyuntikkan jarum 1 cc di sinus orbitalis mata mencit. Darah yang diperoleh dibuat sediaan apus darah tipis pada kaca objek. Selanjutnya dibiarkan mengering di udara lalu difiksasi dengan direndam pada larutan methanol selama 30 detik. Selanjutnya dibiarkan mengering kembali. Apusan kemudian diwarnai dengan larutan Giemsa 20 % selama 20 menit, selanjutnya dibilas dengan air mengalir lalu dibiarkan mengering. Preparat kemudian

diamati menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 1000x. Parasitemia diamati setiap hari sampai didapatkan minimal parasitemia 5 %. Setelah memenuhi syarat parasitemia yang diinginkan, maka diberikan perlakuan yang sudah ditentukan kepada masing-masing kelompok mencit. Setelah diterapi selama 3 hari, dilakukan pengambilan darah pada semua mencit, kemudian disimpan serumnya, dibekukan dan dilakukan pemeriksaan kadar ICAM-1 dengan ELISA.

ANALISIS DATA

Kadar ICAM-1 serum diukur dengan menggunakan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dan dibaca menggunakan alat ELISA *plate reader*. Data yang diperoleh dalam μg , dianalisis dengan menggunakan uji *One Way Analysis Of Variance* (ANOVA) dilanjutkan dengan uji beda rata-rata *Tukey HSD* dengan $\alpha = 0,05$ di mana suatu perbedaan dikatakan bermakna jika $p \leq 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan yang dilakukan secara serologis menggunakan metode ELISA pada tiap serum kelompok mencit yang telah diberi perlakuan Artemisinin dan fraksi heksan kulit manggis setelah 3 hari didapatkan rerata kadar ICAM-1 serum seperti pada tabel 1.

Tabel 2 ANOVA Efek Fraksi Heksan Kulit Manggis terhadap Kadar ICAM-1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1150529660,111	5	230105932,022	348,822	0,000
Within Groups	11873990,219	18	659666,123		
Total	1162403650,330	23			

Pengujian data statistik dengan pengujian hipotesis statistik sebagai berikut:

$F_{hitung} \leq F_{tabel}$ dan $p > 0,05$ maka H_0 gagal ditolak.

$F_{hitung} > F_{tabel}$ dan $p \leq 0,05$ maka H_0 ditolak, terima hal lainnya.

Karena $F_{hitung} = 348,82 > F_{tabel 0,05 (4,25)} = 2,76$ dengan $p = 0,00 < \alpha = 0,05$ maka H_0 ditolak, terima H_1 dan hal lainnya, yang artinya terdapat perbedaan kadar ICAM-1 serum di

Tabel 1 Rerata Kadar ICAM-1 Serum Setelah 3 hari

Kelompok	Kadar ICAM-1 (pg/mL) \pm STDEV
Kontrol Akuades	3514,793 \pm 176,84
Kontrol Negatif	21551,728 \pm 854,32
Kontrol Positif	6930,852 \pm 421,76
H1	7035,522 \pm 270,39
H2	13841,908 \pm 914,67
H3	20422,819 \pm 1452,31

Data rerata kadar ICAM-1 serum tiap kelompok perlakuan menunjukkan bahwa kadar ICAM-1 serum yang rendah terdapat pada kelompok kontrol akuades, sedangkan kadar ICAM-1 serum yang tinggi terdapat pada kelompok kontrol positif. Dari kelompok kontrol positif, H1, H2, dan H3 didapatkan rerata kadar ICAM-1 yang rendah terdapat pada kelompok kontrol positif dan H1.

Untuk mengetahui adanya perbedaan kadar ICAM-1 serum yang bermakna antar masing-masing kelompok perlakuan, maka dilakukan analisis menggunakan uji ANOVA dengan derajat kemaknaan (*level of significancy*) $\alpha = 0,05$.

antara minimal 1 pasang kelompok perlakuan.

Selanjutnya, untuk menentukan di antara kelompok-kelompok mana yang berbeda, dilakukan uji *Post Hoc* dengan metode *Tukey-HSD*. Hasil analisis *Tukey-HSD* dapat dilihat pada tabel 3 dan grafik 1.

Hasil analisis uji *Tukey-HSD* (tabel 3) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan pada kadar ICAM-1 serum

($p < 0,05$) antara kelompok KP dibandingkan dengan H1 serta antara kelompok KN dibandingkan dengan H3. Sedangkan kadar ICAM-1 serum memiliki perbedaan yang sangat signifikan pada kelompok KN dibandingkan dengan kelompok KP, H1, H2

dengan masing-masing nilai $p < 0,01$. Perbandingan pada masing-masing kelompok perlakuan juga dapat dilihat pada Grafik1.

Tabel 3 Kadar ICAM-1 Berdasarkan Hasil Uji Beda Rata-Rata Metode Tukey-HSD

Kelompok Perlakuan	KA	KN	KP	H1	H2	H3
KA		**	**	**	**	**
KN			**	**	**	NS
KP				NS	**	**
H1					**	**
H2						**
H3						

Keterangan:

NS : tidak signifikan

** : sangat signifikan

KA : Kontrol Akuades, tidak diinokulasi *Plasmodium berghei*.

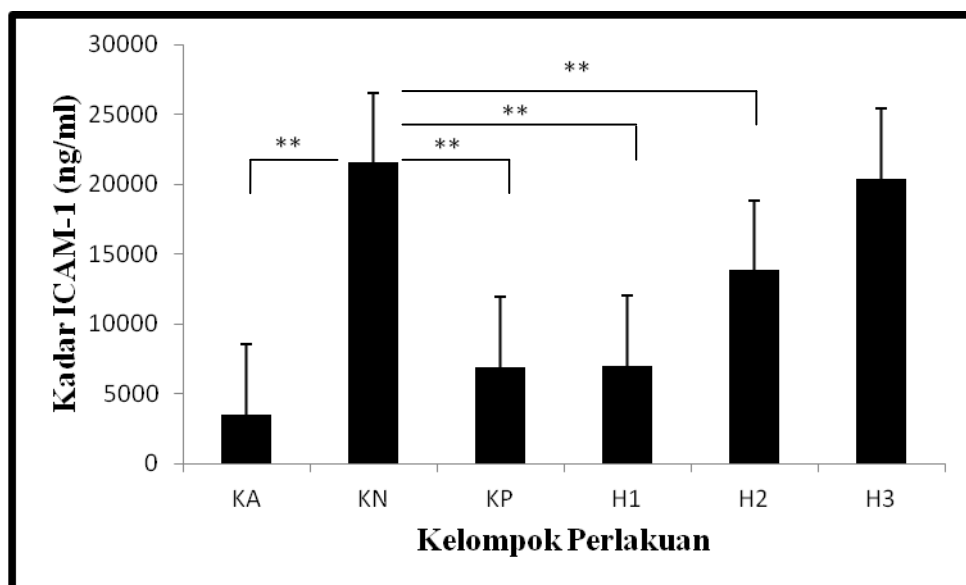
KN : Kontrol Negatif, diinokulasi *Plasmodium berghei*.

KP : Kontrol Positif diinokulasi *Plasmodium berghei* dan diberi artemisinin 0,1 mL per oral per hari per ekor.

H1 : Heksan 1; Fraksi heksan kulit manggis dosis 2,5 mg per oral per hari per ekor dan diinokulasi *Plasmodium berghei*.

H2 : Heksan 2; Fraksi heksan kulit manggis dosis 0,5 mg per oral per hari per ekor dan diinokulasi *Plasmodium berghei*.

H3 : Heksan 3; Fraksi heksan kulit manggis dosis 0,1 mg per oral per hari per ekor dan diinokulasi *Plasmodium berghei*.



Gambar 1 Grafik Perbandingan Rerata Kadar ICAM-1 Setelah Diberi Perlakuan 3 hari

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian fraksi heksan kulit manggis dapat menurunkan kadar ICAM-1 serum pada mencit yang diinokulasi *Plasmodium berghei*. Fraksi heksan kulit manggis menurunkan kadar ICAM-1 serum pada dosis paling tinggi yaitu 2,5 mg. Kelompok H1 fraksi heksan kulit manggis yang memiliki dosis paling tinggi, memiliki efek menurunkan kadar ICAM-1 serum setara dengan kelompok kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok perlakuan fraksi heksan kulit manggis memiliki efek menurunkan kadar ICAM-1 serum dalam hal *dose dependent manner*. Hal ini terjadi karena kandungan *xanthone* yang terdapat di dalam kulit buah manggis sebagai antioksidan sehingga kadar ICAM-1 menurun.

Pada penyakit malaria sesuai dengan patogenezisnya, memerlukan antioksidan yang dapat memerangkap radikal bebas terutama jika diberi obat golongan artemisinin. *Xanthone* yang terkandung dalam kulit buah manggis merupakan senyawa yang bersifat antioksidan dan dapat menghambat polimerisasi heme secara *in vitro* sehingga mempunyai potensi sebagai antimalaria. Penelitian lain membuktikan bahwa senyawa α -mangostin, γ -mangostin, garcinone C, garcinone D memiliki aktivitas antioksidan, antimalaria, dan bersinergi dengan artemisinin sebagai antimalaria *in vitro* (Susy Tjahjani dan Wahyu Widowati, 2013). Ekstrak kulit buah manggis memiliki aktivitas antioksidan yang besar (Dungir *et al.*, 2012). Menurut penelitian Muhammad Iqbal, dkk. (2013) membuktikan bahwa fraksi heksan kulit buah manggis yang diberikan secara oral memiliki aktivitas antimalaria pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*^{9,10,15}.

Dalam penelitian ini juga didapatkan hasil tidak ada perbedaan yang signifikan pada kadar ICAM-1 serum ($p > 0,05$) antara kelompok KP dibandingkan dengan H1 serta antara kelompok KN dibandingkan dengan H3. Hasil yang tidak berbeda antara kelompok KP dan H1 diduga karena dosis fraksi heksan kulit manggis (2,5 mg) yang kurang tinggi, sedangkan antara kelompok KN dan H3 diduga karena dosis fraksi heksan kulit manggis yang kecil (0,1 mg). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian selanjutnya dengan menggunakan dosis

fraksi heksan kulit manggis yang lebih tinggi sehingga diharapkan pemberian kulit manggis dapat mengatasi malaria serebral.

SIMPULAN

Fraksi heksan kulit manggis dapat menurunkan kadar ICAM-1 serum pada mencit yang diinokulasi *Plasmodium berghei*.

DAFTAR PUSTAKA

1. CDC, 2014. (cited 2014 June 17). Available from: http://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/impact.html
2. WHO. Malaria; 2013. (cited 2014 January 14). Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>.
3. Laihah JF. Buletin jendela data dan informasi kesehatan: epidemiologi malaria di Indonesia. Kementerian Kesehatan RI. April 2011; Vol.1: Hal 1 - 3.
4. WHO. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000 – 2010, World Health Organization Press, Geneva, Switzerland; 2010.
5. Tjitra E. Pengobatan malaria dengan kombinasi artemisinin. Dalam Harijanto PN (editor): Malaria, epidemiologi, patogenezis, manifestasi klinis dan penanganan. Jakarta: EGC. 2005; Hal 53 - 59.
6. Pino P, Vouldoukis I, Dugas N, Hassani-Loppion G, Dugas B, Mazier D. Redox-dependent apoptosis in human endothelial cells after adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. Ann N Y Acad Sci. 2003; 1010 : 582 – 6
7. Krishna S, Woodrow CJ, Staines HM, Haynes RK, Odile Mercereau-Puijalon. Re-evaluation of how artemisinin work in light of emerging evidence of *in vitro* resistance. TrendsMol.Med. 2006; 12 : 200 – 205. (cited 201 January 2014). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2682190/>.
8. Putrianti, ED. Artemisinin, pembunuh parasit malaria. 2014; (cited 2014 September 25). Available from:

- http://www.unisosdem.org/article_detail.php?aid=2652&coid=1&caid=56&gid=5
9. Tjahjani S. dan Widowati W. Potensi beberapa senyawa *xanthone* sebagai antioksidan dan antimalaria serta sinergisme dengan artemisinin in vitro. *J. Indon Med Assoc*, 2013; 63 (3): 95 – 99.
 10. Dungir SG, Katja DG, Kamu VS. Aktivitas antioksidan ekstrak fenolik dari kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Jurnal MIPA Unsrat Online*. 2012; 1(1) : 11 – 15
 11. Chen LG, Yang LL, Wang CC. Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. 2008; (cited 2014 February 17) Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18029076>.
 12. Pothitirat W, Chomnawang MT, Supabphol R, Gritsanapan W. Free radical scavenging and anti-acne activities of mangosteen fruit rind extracts prepared by different extraction methods. 2010; (cited 2014 February 17). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20645837>.
 13. Jinsart W, Ternai B, Buddhasukh D, Polya GM. Inhibition of wheat embryo calcium-dependent protein kinase and other kinases by mangostin and gamma-mangostin, *Phytochemistry*. 1992; 31(11):3711-13
 14. Pedraza-Chaverri J, Cardenas-Rodriguez N, Orozco-Ibarra M, Perez-Rojas JM. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and Chemical Toxicology* 46. 2008; 3227-3239
 15. Muhammad I, Effendi Z, Aamruna Y, dan Suryawati. Uji aktivitas antimalaria in vivo dari beberapa fraksi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* Linn) pada mencit (*Mus musculus*) yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*. 2013; (cited 2014 September 25). Available from: <http://artikel.dikti.go.id/index.php/PKM-P/article/download/55/55>