

PENGARUH JENIS DAN LAMA PERENDAMAN *NON DENTAL GLASS FIBER REINFORCED COMPOSITE* TERHADAP SITOTOKSISITAS SEL FIBROBLAS

Dendy Murdiyanto^{*}, Widjijono^{**}, Nuryono^{***}

^{*}Program Studi S2 Ilmu Kedokteran, Gigi, FKG Universitas Gadjah Mada

^{**}Bagian Biomaterial, FKG Universitas Gadjah Mada

^{***}Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Gadjah Mada

KATA KUNCI

non dental glass fiber reinforced composite, lama perendaman, sitotoksitas

ABSTRAK

Perawatan di kedokteran gigi mulai menggunakan material *fiber reinforced composite* (FRC) sebagai bahan penyusun alat-alat tertentu seperti gigi tiruan cekat, restorasi *onlay*, *splinting* gigi goyah, pasak gigi dan *space maintainer*. Penyusun FRC terdiri dari *fiber* dengan jenis terbanyak *glass fiber* dan matriks berupa *dental composite*. *Non dental glass fiber* merupakan jenis *glass fiber* yang digunakan pada pembuatan gypsum, patung dan alat-alat otomotif yang mudah dijumpai di pasaran dengan harga terjangkau. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi sitotoksitas jenis dan lama perendaman *non dental glass fiber reinforced composite* terhadap sel fibroblas yang mati.

Penelitian ini menggunakan FRC yang diperkuat oleh 3 jenis *non dental glass fiber* I, II, III dan *dental E-glass fiber* sebagai pembanding. Uji sitotoksitas dilakukan dengan *methyl tetrazolium test* (MTT) menggunakan sel vero terhadap air hasil rendaman FRC selama 1, 4, 7 dan 10 hari masing-masing 6 pengulangan sampel tiap kelompok. Jumlah sel yang mati menunjukkan tingkat sitotoksitas dan kemudian dianalisa dengan Anava dua jalur ($\alpha = 0,05$).

Hasil penelitian menunjukkan rata-rata kematian sel tertinggi yaitu $8,55 \pm 0,27$ % pada FRC III dengan lama perendaman 10 hari, sedangkan rata-rata kematian sel terendah yaitu $8,48 \pm 0,35$ % pada *dental glass fiber* dengan lama perendaman 1 hari. Berdasarkan pedoman dari Sjögren bahan tidak bersifat sitotoksik jika kematian sel masih dibawah 10%. Uji Anava dua jalur menunjukkan bahwa jenis *non dental glass fiber reinforced composite* dan lama perendaman mempunyai pengaruh tidak bermakna ($p > 0,05$) terhadap sitotoksitas sel fibroblas. Kesimpulan hasil penelitian yaitu *non dental glass fiber reinforced composite* tidak bersifat sitotoksik terhadap sel fibroblas, jenis *non dental glass fiber reinforced composite* dan lama perendaman tidak berpengaruh terhadap sitotoksitas sel fibroblas.

PENDAHULUAN

Fiber reinforced composite adalah suatu komposit yang didalamnya sudah diperkuat oleh *fiber*¹. Perawatan di kedokteran gigi mulai menggunakan material FRC sebagai bahan penyusun alat-alat tertentu. Penggunaan FRC di kedokteran gigi antara

lain pada gigi tiruan cekat², restorasi *onlay*³, *splinting* gigi goyah, pasak gigi dan *space maintainer*⁴. Tujuan digunakannya FRC pada perawatan di kedokteran gigi yaitu untuk mendapatkan kekuatan yang lebih baik⁵. Komposisi kimia dari *E-glass fiber* yang sering dipakai di kedokteran gigi yaitu SiO_2

54 %, Al₂O₃ 14 %, CaO + MgO 22 %, B₂O₃ 10 % dan Na₂O + K₂O kurang dari 2 %⁶. *E-glass fiber* untuk perawatan kedokteran gigi di Indonesia masih jarang dijumpai dan harganya relative mahal. Namun demikian di Indonesia tersedia *glass fiber* di banyak tempat dengan harga terjangkau yang digunakan di dunia teknik sebagai penguat pada pembuatan gypsum, patung dan alat-alat otomotif. Uji *scanning electron microscope – energy dispersive x-ray* (SEM-EDX) pra penelitian yang telah dilakukan untuk melihat komposisi dari bahan tersebut, ternyata didapat hasil bahwa sebagian besar komposisinya sama dengan *E-glass fiber* yang biasa digunakan di kedokteran gigi, meskipun ada beberapa komponen penyusun yang berbeda.

Alat dan bahan medis yang digunakan pada perawatan pasien harus memenuhi persyaratan *international organization for standardization* (ISO) 10933 termasuk di bidang kedokteran gigi. Prinsip uji biokompatibilitas merupakan bagian ISO 10933⁷. Uji sitotoksisitas bagian dari ISO 10933-5 merupakan langkah awal untuk mengetahui biokompatibilitas suatu material, seharusnya material tidak mempengaruhi pertumbuhan, integritas dinding, aktivitas, integritas genetik dan ekspresi genetik dari sel⁸.

Uji sitotoksisitas yang sering dilakukan diantaranya *dye exclusion*, *colony-forming assay*, *intracellular energy charge*, dan *methyl tetrazolium test* (MTT)⁹. Kelebihan

dari prosedur MTT adalah hasil yang akurat, lebih menghemat waktu, dan dapat digunakan pada semua jenis sel termasuk sel fibroblas¹⁰.

Lingkungan rongga mulut tempat aplikasi FRC memiliki kandungan air yang berasal dari saliva dan cairan lain¹¹. Saat resin komposit terpapar air, terjadi efek yang merugikan. Air dapat menghancurkan ikatan matriks polimer-*fiber* dan dapat mempengaruhi sifat sitotoksisitas karena akan menyebabkan komponen penyusun FRC terlepas serta larut^{12,13}. Örtengren menyebutkan bahwa konsentrasi lepasan penyusun komposit dalam air akan meningkat sebanding dengan lama perendaman¹⁴.

METODE PENELITIAN

Bahan

Uji *scanning electron microscope – energy dispersive x-ray* (SEM-EDX) pra penelitian yang telah dilakukan untuk melihat komposisi *fiber* (Tabel 1).

Tabel 1. Komposisi *E-glass fiber* (%)

Komponen	Dental <i>E-glass fiber</i>	Non dental glass fiber		
		I	II	III
C	3,12	3,64	7,78	3,35
O	52,54	59,90	50,96	57,04
Mg	0,25	1,25	-	1,25
Al	5,54	2,03	-	1,68
Si	18,81	20,15	20,39	20,14
K	0,36	0,20	1,21	-
Ca	18,89	6,87	3,29	7,08
Na	-	5,93	6,16	6,24
Ti	-	-	2,56	-
Zr	-	-	7,61	-
Cu	-	-	-	1,12

Tabel 2. Bahan yang digunakan

Bahan	Asal/pabrik
Sel Vero	LPPT UGM
Flowable composite	Master flow Biodinamica, Brazil
Silane coupling agent	3M ESPE™Sil, Jerman

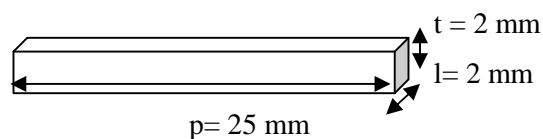
Metode

Fiber disimpan di dalam *dessicator* selama 24 jam selanjutnya dipotong sepanjang 25 mm dan ditimbang beratnya. Berat *non dental glass fiber* disamakan dengan berat 1 bundel *dental E-glass fiber* yaitu 56 mg dengan panjang 25 mm.

Setiap *fiber* yang sudah dipotong dan ditimbang selanjutnya ditetesi *silane* 1 ml kemudian diratakan dengan *microbrush* dan didiamkan selama 1 menit. Cetakan logam dengan ukuran 2 x 2 x 25 mm diletakkan di atas *glass plate*¹⁵. Komposit resin diinjeksikan sampai terisi setengah dari tinggi mould, kemudian dimasukkan ke dalam cetakan dengan arah sejajar sumbu aksis dan ditambahkan lagi di atas *fiber* hingga seluruh permukaan *fiber* tertutup dan *mould* terisi penuh lalu ditutup dengan *glass plate*.

Penyinaran dilakukan dengan menggunakan *visible light curing* selama 4 x 20 detik untuk tiap permukaan, permukaan yang tidak disinari ditutup dengan *aluminium foil*. Setelah penyinaran selesai, sampel dikeluarkan dari cetakan (gambar 1). Sampel direndam dalam *saline* sebanyak 10 ml selama 1, 4, 7, dan 10 hari kemudian disimpan pada inkubator suhu 37°C dengan kondisi steril. Air hasil rendaman sampel

selanjutnya disentralkan dengan *filtrasi* dan ditambahkan ke dalam media kultur.



Gambar 1. Bentuk dan ukuran sampel

Sel Vero adalah sel fibroblas yang berasal dari ginjal kera hijau Afrika (*Cercopithecus aethiops*). Sel ini adalah salah satu sel kontinyu yang sering digunakan pada penelitian. Penghitungan sel dilakukan apabila sel telah konfluen dalam *flask*, menempel, dan tumbuh memenuhi dasar *flask*. Jumlah sel hidup dihitung melalui mikroskop binokuler dengan pembesaran 10 kali. Setelah mengetahui jumlah sel hidup dilakukan pengenceran untuk membuat suspensi dengan kepadatan 2×10^4 sel/100 μ L⁷.

Setiap sumuran pada 96 sumuran *microtiter tissue plate* diisi suspensi sel fibroblas dengan kepadatan sel 2×10^4 sel/100 μ L. Kultur sel diinkubasi selama 24 jam. Paparan sampel penelitian sebanyak 1 ml diberikan pada kultur sel. Suspensi diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Tiap sumuran diberi 10 μ L MTT (5 mg/ml), dibiarkan 4 jam, lalu diberi 100 μ L DMSO. Pada uji MTT, nilai *optical density* (OD) diperoleh dari penghitungan terhadap jumlah formazan yang terbentuk menggunakan ELISA *plate reader* pada panjang gelombang 550 nm. Nilai OD digunakan untuk menghitung

persentase sel yang mati menggunakan rumus ⁷ :

$$\text{Sel mati \%} = \frac{\text{ODkontrol} - \text{ODperlakuan}}{\text{ODkontrol}} \times 100\%$$

Keterangan :

ODperlakuan : nilai rata-rata *optical density* sel perlakuan

ODkontrol : nilai rata-rata *optical density* sel kontrol

Pedoman sitotoksitas suatu bahan yaitu : ¹⁶

tidak sitotoksik : sel hidup lebih dari 90% atau sel mati kurang dari 10%

sitotoksik ringan : sel hidup antara 60-90% atau sel mati antara 10-40%

sitotoksik sedang : sel hidup antara 30-59% atau sel mati antara 41-70%

sitotoksik berat : sel hidup kurang dari 30% atau sel mati lebih dari 70%

Data pengaruh jenis dan lama perendaman *non dental glass fiber reinforced*

composite terhadap sitotoksitas sel fibroblas diuji dengan statistik Anova dua jalur dengan $\alpha = 0,05$.

HASIL

Penelitian tentang pengaruh jenis dan lama perendaman *non dental glass fiber reinforced composite* terhadap sitotoksitas sel fibroblas telah selesai dilaksanakan. Nilai rerata dan simpangan baku dari sel yang mati setelah pemaparan air hasil perendaman *non dental glass fiber reinforced composite* selama 1, 4, 7 dan 10 hari dapat dilihat pada tabel 3. Rata-rata kematian sel tertinggi yaitu $8,55 \pm 0,27\%$ pada komposisi III dengan lama perendaman 10 hari, sedangkan rata-rata kematian sel terendah yaitu $8,48 \pm 0,35\%$ pada *dental E-glass fiber* dengan lama perendaman 1 hari.

Tabel 3. Tabel hasil rerata dan simpangan baku dari sel yang mati

Lama perendaman (hari)	I			II			III			IV		
	rata-rata sel mati (%)	±	SD	rata-rata sel mati (%)	±	SD	rata-rata sel mati (%)	±	SD	rata-rata sel mati (%)	±	SD
1	8.49	±	0.35	8.50	±	0.35	8.52	±	0.38	8.48	±	0.35
4	8.50	±	0.34	8.51	±	0.37	8.52	±	0.40	8.49	±	0.35
7	8.50	±	0.34	8.51	±	0.39	8.53	±	0.35	8.50	±	0.35
10	8.51	±	0.35	8.51	±	0.33	8.55	±	0.27	8.50	±	0.36

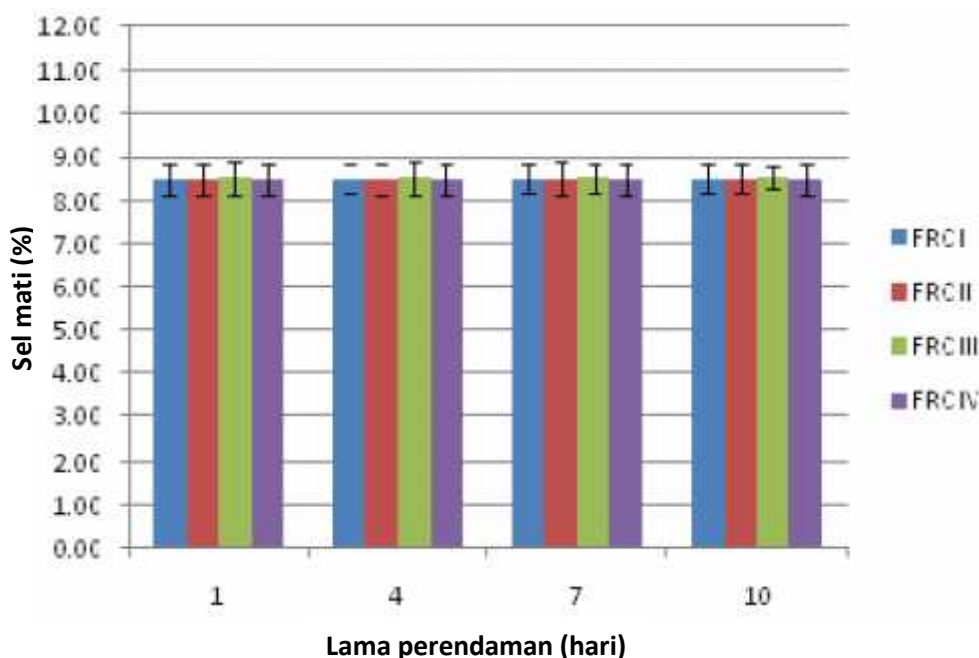
Keterangan : I = *non dental glass fiber I reinforced composite*, II = *non dental glass fiber II reinforced composite*, III = *non dental glass fiber III reinforced composite*, IV = *dental E-glass fiber reinforced composite*.

Jumlah sel yang mati setelah dipaparkan air hasil rendaman *non dental glass fiber*

reinforced composite mengalami kenaikan jumlah seiring dengan lama perendaman.

Lama perendaman terhadap sel mati untuk FRC bisa dilihat pada grafik gambar 2. Data rata-rata jumlah sel yang mati masih termasuk dalam sebaran normal berdasarkan

uji normalitas *Kolmogorov Smirnov* ($p > 0,05$) dan memiliki tingkat homogen $p > 0,05$ pada uji *Levene*.



Hasil olah data Anova dua jalur dengan variabel *independent* jenis *fiber* FRC dan lama perendaman sedangkan variabel *dependent* persentase sel fibroblas yang mati diperoleh kesimpulan (Tabel 4) bahwa jenis *fiber* FRC dan lama perendaman memiliki pengaruh tidak bermakna terhadap persentase sel fibroblas yang mati dengan nilai $p > 0,05$. Variabel jenis *fiber* FRC dan lama perendaman diperoleh nilai $p > 0,05$ yang artinya tidak ada interaksi antara jenis *fiber* FRC dengan lama perendaman.

Lama Perendaman	3	0,001	11	0,998
Jenis FRC*Lama Perendaman	9	0,000	02	1,000

Tabel 4. Hasil uji Anova dua jalur dengan variabel *dependent* sitotoksitas

Sumber	derajat bebas	rerata kuadrat	F	probabilitas (p)
Jenis FRC	3	0,007	53	0,984

PEMBAHASAN

Sifat biologis dan toksisitas suatu material merupakan hal yang penting dalam perawatan kedokteran gigi. Penilaian sitotoksitas secara *in vitro* merupakan tahap yang harus dilalui sebelum tahap *in vivo*¹³. Beberapa peneliti telah melaporkan nilai sitotoksitas FRC yang bervariasi terhadap beberapa sel termasuk jenis sel fibroblas¹⁷. Sel fibroblas yang digunakan pada penelitian pengaruh jenis dan lama perendaman *non dental glass fiber reinforced composite* terhadap sitotoksitas sel fibroblas yang

telah dilakukan adalah sel vero dari LPPT UGM.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase rata-rata jumlah sel yang mati bervariasi dari 8,48% - 8,55% masih dibawah 10%. Pedoman sitotoksitas suatu bahan bahwa suatu material dikatakan tidak sitotoksik jika sel hidup lebih dari 90% atau sel mati kurang dari 10% dan termasuk sitotoksik ringan jika sel hidup 60-90% atau sel mati 10-40%¹⁶. Nilai ini juga sesuai dengan ISO 10993 yang menyatakan bahan termasuk sitotoksik jika viabilitas sel kurang dari 70% atau sel mati lebih dari 30%. Hasil penelitian ini sesuai dengan hipotesis bahwa jenis *Non dental glass fiber reinforced composites* tidak bersifat sitotoksik terhadap sel fibroblas.

Jumlah sel vero yang menurun kemungkinan disebabkan karena berkontak dengan komponen FRC yang larut di dalam air. Silika merupakan komponen anorganik dengan jumlah terbanyak dari *E-glass fiber* penyusun FRC komposisi I, II, III dan IV yang diuji dengan *scanning electron microscope – energy dispersive x-ray* (SEM-EDX), selain itu matriks FRC berupa *composite flowable* juga mengandung *filler* silika. FRC yang berkontak dengan air akan menyebabkan difusi air ke dalam FRC diantara *polymer network* dan berada diantara celah *microvoid* sehingga terjadi plastisasi dan pembengkakan matriks polimer¹⁸. Molekul air juga akan memutus ikatan *siloxane* (Si-O-Si) yang terbentuk antara

silanol (-Si-OH) dengan *silane coupling agent* melalui mekanisme hidrolitik yang akan mengakibatkan lepasnya *filler composite* diantaranya silika¹⁹. Proses hidrolitik ini akan memutus ikatan antara polimer matriks *composite* dan *fiber* yang akan menyebabkan lepasnya komponen *fiber* berupa silika oksida dan alkali oksida²⁰.

Menurut Mallick bahwa *silica glass fiber* yang sering digunakan di dalam kedokteran gigi memiliki komposisi silika dalam bentuk SiO₂⁶. Wegner pada penelitiannya menyebutkan bahwa terdapat penurunan jumlah sel fibroblas namun tidak signifikan dan silika dalam bentuk SiO₂ tidak bersifat sitotoksik²¹. Kematian sel fibroblas kemungkinan disebabkan karena sebagian silika yang berukuran kecil dapat menembus dinding sel dan berada di sitoplasma sebagai residu yang mengganggu metabolisme²². *Fiber* komposisi III memiliki tingkat kematian sel yang lebih tinggi kemungkinan karena adanya komponen Cu yang termasuk logam berat. Hal ini sesuai dengan pernyataan Shi bahwa jenis logam berat Cu sudah diketahui memiliki sifat toksik terhadap manusia²³.

Jumlah kematian sel fibroblas penelitian pada sampel komposisi I, II, III dan IV dengan lama perendaman 1, 4, 7 dan 10 hari menunjukkan peningkatan, tertinggi pada hari ke-7 sampai 10. Hal ini sesuai dengan pendapat Ferracane bahwa *hydrolytic* bisa dilihat selama 7-60 hari¹⁹. Kematian sel tertinggi terjadi pada hari ke-10 karena

terjadi akumulasi komponen penyusun FRC yang terlarut. Banyaknya penyusun FRC yang terlarut tidak bisa disamakan dengan jumlah air yang masuk ke FRC karena kecepatan difusi air dan larutnya komponen tidak berbanding lurus. Air diserap lebih cepat daripada komponen terlarut yang lepas sampai mendekati kejenuhan²⁴. Ikatan oleh silane yang baik antara matriks dengan fiber juga menyebabkan penyerapan air menjadi lebih sedikit sehingga komponen penyusun FRC yang terlarut juga akan kecil²⁵.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan disimpulkan bahwa :

1. Jenis *non dental glass fiber reinforced composite* tidak bersifat sitotoksik terhadap sel fibroblas.
2. Lama perendaman *non dental glass fiber reinforced composite* tidak berpengaruh terhadap sitotoksisitas sel fibroblas.

SARAN

1. Penelitian ini menggunakan lama perendaman 1-10 hari, masih perlu dilakukan penelitian lanjut dengan penambahan lama perendaman sehingga bisa diketahui apakah penambahan lama perendaman akan mempengaruhi sitotoksisitas *non dental glass fiber*.
2. Penelitian ini masih merupakan penelitian sitotoksisitas awal terhadap material *non dental glass fiber* menggunakan sel fibroblas sehingga masih perlu dilakukan

penelitian lebih lanjut pada tingkat *in vivo* dengan hewan coba.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bunsell A.R. dan Renard J., *Fundamentals of Fibre Reinforced Composite Materials*, Institute of Physics Publishing, Bristol, 2005, hal. 23-25.
2. Mohan S., Gurtu A., Singhal A., dan Guha C., Fibre Reinforced Composite – A Riview and Case Report, *J. Dent. Sci. Oral Rehab.*, 2012, 5 : 45-48.
3. Garoushi S., Mangoush E., Vallittu P., dan Lassila L., Short Fiber Reinforced Composite: a New Alternative for Direct Onlay Restorations, *Open Dent. J.*, 2013 , 7 : 181-185.
4. Tuloglu N., Bayrak S., dan Tunc E.S., Different Clinical Applications of Bondable Reinforcement Ribbond in Pediatric Dentistry, *Eur. J. Dent.*, 2009, 3 : 329-334.
5. Duymus Z.Y., Karaalioglu F.O., dan Suleyman F., Flexural Strength of Provisional Crown and Fixed Partial Denture Resins both with and without Reinforced Fiber, *J. Mater. Sci. Nanotechnol.*, 2014, 1 (3): 302.
6. Mallick P.K., *Fiber-Reinforced Composites: Materials, Manufacturing, and Design*, 3rd ed., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2008, hal 19-63.
7. ISO 10993-5, *Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5, Test For In Vitro Cytotoxicity*, 2009, hal. 30-34.
8. O'Brien W.J., *Dental Materials and Their Selection*, 3rd ed, Quintessence Publishing Co, Inc, Canada, 2002, hal. 12.
9. Portner, R., *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols*, 2nd ed., Humana Press Inc., New Jersey, 2007, hal. 212-214.
10. Freimoser, F.M., Jakob, C.A., Aebi, M., dan Tuor, U., The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities, *App Environmen Microbiol*, 1999, 65(8): 3727-3729.
11. Kuroda, S., Yokoyama, D., Shinya, A., Gomi, H., dan Shinya, A., Measuring The Effects of Water Immertion Conditions on The Durability of Fiber-Reinforced Hybrid Composite Resin Using Static and Dynamic Tests. *Dent. Mat. J.*, 2012, 31(3) : 449-457.
12. Raszewski, Z., dan Nowakowska, D., Mechanical Properties of Hot Curing Acrylic Resin after Reinforced with Different Kinds

- Of Fibers, *Int. J. Biomedic. Mat. Res.*, 2013, 1(1) : 9-13.
13. Powers J.M. dan Sakaguchi R.L., *Craig's Restorative Dental Material*, 12th ed., Mosby Elsevier, St. Louis, 2006, hal. 104.
 14. Örtengren U., Wellendorf H., Karlsson S., dan Ruyter IE, Water Sorption and Solubility of Dental Composites and Identification of Monomer Released in Aquauous Environment, *J. Oral Rehab.*, 2001, 28:1106-1115.
 15. ISO 4049, *Dentistry – Polymer-Based Filling, Restorative and Luting Materials*, 2000, hal 17-20.
 16. Sjögren G., Sletten G., dan Dahl J.E., Cytotoxicity of Dental Alloys, Metals, and Ceramics Assessed by Millipore Filter, Agar Overlay, and MTT Test, *J. Prosthet. Dent.*, 2000, 84(2): 229-36.
 17. Andrade A.L.,Marco R.M., Maia T., Lopes M.T.P., Salas C.E. dan Domingues,Z.R., In Vitro Bioactivity And Cytotoxicity Of Chemically Treated Glass Fibers, 2004, *Mat. Res.* , 2004,7(4) : 635-638.
 18. Curtis A.R., Shortall A.C., Marquis P.M., dan Palin W.M., Water Uptake and Strength Characteristics of A Nanofilled Resin-Based Composite, *J. Dent.*, 2008, 36(3): 186–93.
 19. Ferracane J.L., Hygroscopic and Hydrolytic Effects in Dental Polymer Networks, *Dent. Mater.*, 2006, 22(3):211-22.
 20. Lasilla L.V.J., Hohrstrom T., dan Valittu P.K., The Influence of Short Term Water Storage on The Flexural Properties of Unidirectional Glass Fiber-Reinforced Composites, *Biomaterial*, 2002, 23 (10) : 2221-2222.
 21. Wagner S., Münzer S., Behrens P., Scheper T., Bahnemann D., dan Kasper C., Cytotoxicity of Titanium and Silicon Dioxide Nanoparticles, *Journal of Physics*, 2009, 12: 1-8.
 22. Kostroyz E.L., Utter C.J., Wang Y., Dusevic V. and Spencer P., Cytotoxicity of Dental Nanocomposite Particles, *NSTI-Nanotech*, 2007, 2:647-650.
 23. Shi D.L., *Introduction to Biomaterials*, Tsinghua University Press, Beijing, 2006, hal. 59.
 24. Noort R.V., *Introduction to Dental Materials*, 3rd ed., Mosby Elsevier, St. Louis, 2007, hal. 63.
 25. Zhang M. dan Matinlinna J.P., The Effect of Resin Matrix Composition on Mechanical Properties of E-glass Fibre-Reinforced Composite for Dental Use, *J. Adhesion Sci. and Tech.*, 2011, 19(25): 2687-2701.