

ARTIKEL PENELITIAN

Pola sensitivitas kotrimoksazol terhadap bakteri penyebab infeksi saluran kemih pada pasien diabetes melitus tipe 2

Shafira Kurnia Warianti¹, Mardhia Mardhia^{2*}, Mahyarudin Mahyarudin²

1. Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak; 2. Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak

Korespondensi: Mardhia Mardhia; mardhia@medical.untan.ac.id; 08195452038

Abstrak

Tujuan: Penelitian ini untuk mengetahui sensitivitas kotrimoksazol terhadap bakteri penyebab Infeksi Saluran Kemih (ISK) pada pasien diabetes melitus tipe 2. **Metode:** Penelitian dilakukan pada isolat bakteri penyebab ISK tersimpan dengan total 22 isolat bakteri. Uji sensitivitas antibiotik menggunakan metode difusi cakram dengan panduan dari *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Hasil uji sensitivitas dikategorikan sebagai sensitif (diameter ≥ 16 mm), intermediet (diameter 11-15 mm), dan resisten (diameter ≤ 10 mm). **Hasil:** Penelitian ini mendapatkan data bahwa bakteri penyebab ISK mengalami resistensi terhadap kotrimoksazol sebesar 59,09% dengan jumlah isolat sebanyak 15 dari 22 isolat uji. Resistensi kotrimoksazol ditemukan pada bakteri *Escherichia coli* (46,15%;6/13), *Pseudomonas aeruginosa* (80%;4/5), *Enterobacter aerogenes* (100%;2/2), *Klebsiella* (100%;1/1), dan sensitif terhadap *Shigella* (100%;1/1). **Kesimpulan:** Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bakteri penyebab ISK pada pasien DM tipe 2 mengalami resistensi terhadap kotrimoksazol dengan persentase sebesar 46,15%-100%.

Kata kunci: Diabetes Melitus (DM); Infeksi Saluran Kemih (ISK); Kotrimoksazol

Abstract

*Purpose of the study was to revealed the sensitivity of cotrimoxazole towards Urinary Tract Infection (UTI) bacteria in Type 2 Diabetes Mellitus patients. **Method:** The study was performed on 22 UTI bacteria isolate. Antibiotic sensitivity test were done by disc diffusion method from Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline. Sensitivity result categorized as sensitive (diameter ≥ 16 mm), intermediet (diameter 11-15 mm), and resistance (diameter ≤ 10 mm). **Result:** The study demonstrated that the bacteria causing UTI have resistance to cotrimoxazole by 59.09%. The cotrimoxazole resistance pattern were showed in *Escherichia coli* (46.15%; 6/13), *Pseudomonas aeruginosa* (80%; 4/5), *Enterobacter aerogenes* (100%; 2/2), *Klebsiella* (100%; 1/1 / 1), and sensitive to *Shigella* (100%; 1/1). Bacteria that caused UTI in DM patients have resistance to cotrimoxazole with range of 46.15% -100%. **Keywords:** Diabetes Mellitus (DM); Urinary Tract Infection (UTI); Cotrimoxazole*

PENDAHULUAN

Diabetes melitus (DM) tergolong dalam penyakit tidak menular (PTM) yang merupakan penyakit metabolik kronik tertinggi di dunia.^{1,2} Diabetes mellitus memiliki karakteristik yaitu terjadinya hiperglikemia yang merupakan akibat dari kelainan sekresi insulin, kelainan kerja insulin, ataupun kedua faktor tersebut.³ Penderita DM dengan usia 20-79 tahun diperkirakan meningkat pada tahun 2017 sekitar 48% di dunia, yaitu dari 425 juta jiwa di tahun 2017 menjadi 629 juta jiwa ditahun 2045.⁴ Diabetes melitus tipe 2 (DMT2) di Indonesia tercatat mengalami peningkatan pada tahun 2013 yang menjadi 6,9%, sedangkan sebelumnya pada tahun 2007 hanya dengan persentase sebesar 5,7%.⁵ Tingkat kejadian DMT2 di Kalimantan Barat sendiri tercatat memiliki persentase sebesar 0,8% dengan perkiraan jumlah 24.581 jiwa.⁶ Keadaan hiperglikemia pada DM menyebabkan disfungsi neutrofil dengan meningkatkan kadar kalsium intraseluler sehingga aktin terhambat dan adanya kondisi diapedesis pada neutrofil berakibat terjadinya keadaan toleransi terhadap infeksi. Komponen imunitas yang terpengaruh pada keadaan tersebut yaitu fungsi *Polymorphonuclear neutrophilic leukocyte* (PMN), adhesi, kemotaksis serta fagositosis. Kecenderungan adanya penurunan kadar interleukin-6 (IL-6) dan Interleukin-8 (IL-8).⁷

Infeksi penyulit tersering pada DMT2 yaitu infeksi saluran kemih (ISK) dengan persentase sebesar 43% pada perempuan

dan pada laki-laki sebesar 30%.^{7,8} Kondisi ini didasarkan bahwa pada pasien dengan DMT2 terjadi berbagai gangguan dalam sistem kekebalan tubuh serta pengosongan kandung kemih yang sering tidak tuntas akibat neuropati otonom. ISK merupakan infeksi bakteri yang umum dan menyerang saluran kemih. Bakteri umum penyebab ISK diantaranya yaitu *Uropathogenic Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, dan *Enterococci*.⁹ Golongan tersering dalam etiologi dari ISK yaitu golongan *Uropathogenic Escherichia coli* dengan prevalensi sebesar 50%-90%.¹⁰

Terapi utama pada ISK yaitu dengan antibiotik golongan fluoroquinolon, nitrofurantoin, dan trimetoprim-sulfametoksazol. Kotrimoksazol merupakan antibiotik golongan trimetoprim dan gabungan sulfametoksazol yang memiliki aktifitas bakterisida dan efektif terhadap gram positif dan negatif.¹⁰ Mekanisme kerja kotrimoksazol menghambat enzim dihidrofolat reduktase sehingga terjadi gangguan dalam pembentukan tetrahidrofolat yang menyebabkan pertumbuhan dan pembelahan bakteri menurun. Penggunaan antibiotik pada terapi ISK diketahui telah mengalami resistensi. Penelitian di RSUD dr. Moewardi tahun 2014, menunjukkan lebih dari 50% *Uropathogenic Escherichia coli* resisten terhadap antibiotik cefepime, ceftazidime, ceftioxone, ciprofloxacin, gentamisin dan trimetoprim/sulfametoksazol.¹¹ Penelitian lain menunjukkan bahwa *Klebsiella*

pneumonia resisten terhadap trimetoprim/sulfametoksazol sebesar 100%. *Proteus mirabilis* resisten terhadap trimetoprim/sulfametoksazol sebesar 100%. Sedangkan pada penelitian Seta, mendapatkan hasil berupa beberapa *Uropathogenic Escherichia coli* yang ditemukan pada penelitian ini resisten terhadap kotrimoksazol dengan persentase sebesar 83,1%. Hampir seluruh *Klebsiella pneumoniae* yang ditemukan pada penelitian ini telah resisten terhadap kotrimoksazol dengan persentase sebesar 83,9%.¹²

Tingkat kejadian ISK yang tinggi pada pasien dengan DMT2 yang disertai pola resistensi yang tinggi, menyebabkan pentingnya mengetahui sensitivitas antibiotik penatalaksanaan ISK sehingga dapat menentukan terapi yang sesuai dan menekan terjadinya resistensi pada pasien. Data mengenai pola sensitivitas kotrimoksazol terhadap bakteri penyebab ISK pada pasien DMT2 di kota Pontianak belum ada, oleh karena itu penelitian ini dilakukan.

METODE

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif. Penelitian dilakukan pada bulan April hingga Oktober 2019 di Laboratorium Mikroskopik Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak. Sampel yang digunakan merupakan isolat bakteri penyebab ISK tersimpan, dengan total 22 isolat.¹³ Prosedur penelitian yang dilakukan pada penelitian ini diawali dengan peremajaan isolat bakteri ISK pada pasien DM dan pembuatan suspensi *Mc*

Farland 0,5. Pertumbuhan koloni bakteri hasil peremajaan pada media Eosin Methilen Blue (EMB) diidentifikasi baik secara makroskopis maupun mikroskopis. Identifikasi makroskopis dengan melihat bentuk koloni, perubahan warna serta adanya kilau hijau metalik pada koloni. Sedangkan identifikasi mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan gram dan pengamatan dibawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 100x. Koloni bakteri yang telah diidentifikasi selanjutnya dibuat dalam bentuk suspensi dan disetarakan dengan kekeruhan *Mc Farland* 0,5 baik secara langsung maupun menggunakan spektrofotometer. Suspensi bakteri digoreskan menggunakan *swab* steril pada media Muller Hinton Agar (MHA) secara merata dari tiga arah (perputaran setiap 120°), selanjutnya dilakukan peletakan cakram antibiotik kotrimoksazol menggunakan pinset. Media MHA selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C untuk mendapatkan hasil pengujian sensitivitas antibiotik berupa adanya zona hambat. Pengukuran zona hambat yang terbentuk dilakukan dengan jangka sorong. Klasifikasi hasil uji sensitivitas antibiotik berdasarkan tabel kriteria *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) 2019 dikategorikan sebagai sensitif jika diameter zona hambat ≥ 16 mm, intermediet dengan diameter zona hambat 11-15 mm, dan resisten jika diameter zona hambat ≤ 10 mm.

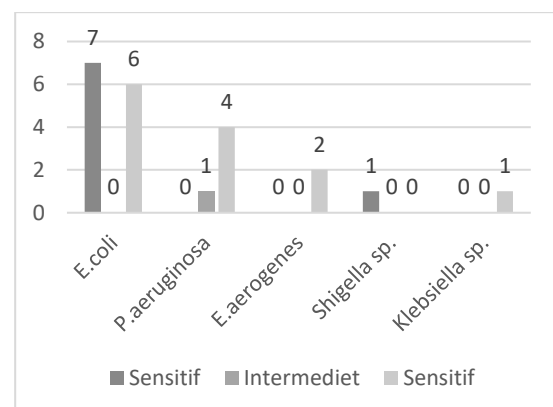
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolat yang tumbuh adalah bakteri Gram negatif seperti *Escherichia coli* (59,09%;13/22), *Pseudomonas aeruginosa* (22,72%;5/22), *Enterobacter aerogenes* (9,09%;2/22), *Shigella sp.* (4,76%;1/22), dan *Klebsiella sp.* (4,76%;1/22).¹⁴⁻¹⁶ Bakteri tersering dalam etiologi dari ISK adalah *Uropathogenic Escherichia coli* dengan prevalensi sebesar 50%-90%, hal ini sesuai dengan hasil yang didapatkan pada penelitian (59,09%). Pola patogenesis ISK pada umumnya dengan cara ascenden dari perianal yang masuk ke dalam uretra.⁸ Bakteri bermigrasi dari saluran pencernaan ke daerah periurethral, akhirnya naik dari uretra menuju kandung kemih. Hal ini diketahui juga sebagai faktor risiko definitif untuk *Rectal Urinary Track Infection* (RUTI). Wanita yang menderita RUTI ditemukan memiliki frekuensi infeksi yang lebih tinggi dengan flora rektal endogen, khususnya *Uropathogenic Escherichia coli* dan *Enterococcus faecalis*.¹⁷⁻¹⁹

Berdasarkan hasil pengujian sensitivitas antibiotik terhadap bakteri dengan metode difusi cakram, didapatkan data resistensi bakteri terhadap kotrimoksazol sebesar 59,09% mencakup golongan bakteri *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella sp.* dan sensitif terhadap *Shigella sp.*(100%;1/1). Data resistensi *Escherichia coli* (46,15%;6/13) terhadap kotrimoksazol pada penelitian ini didukung dengan penelitian yang dilakukan oleh Seta pada tahun 2015 yaitu

mengalami resistensi sebesar 83,1%, sedangkan pada penelitian Sari tahun 2015 data resistensi *Escherichia coli* terhadap kotrimoksazol sebesar 56%.^{11,20} Penelitian Manar dkk pada tahun 2018 didapatkan hasil resisten *Escherichia coli* terhadap kotrimoksazol sebesar 46%.²¹ Resistensi yang terjadi pada *Pseudomonas aeruginosa* (80%;4/5) terhadap kotrimoksazol didukung dengan penelitian yang dilakukan oleh Seta tahun 2015 dengan hasil resistensi sebesar 82,9% dan berdasarkan panduan CLSI kotrimoksazol tidak dianjurkan pada tatalaksana infeksi oleh *Pseudomonas aeruginosa*.²² Bakteri lain seperti *Enterobacter aerogenes* (100%;2/2) dan *Klebsiella sp.* (100%;1/1) mengalami resistensi penuh pada penelitian ini, penelitian lain menunjukkan hasil resistensi *Enterobacter aerogenes* sebesar 100% serta pada *Klebsiella* sebesar 83,9%.¹¹

Gambar 1. Hasil uji sensitivitas kotrimoksazol pada isolat penyebab ISK



Escherichia coli pada penelitian ini memiliki sensitivitas sebesar 53,84% terhadap kotrimoksazol. Kotrimoksazol merupakan antibiotik golongan trimethoprim dan gabungan

sulfametoksazol.⁹ Trimethoprim bekerja dengan menghambat enzim *dihydrofolatreduktase* dalam mereduksi dihidrofolat menjadi tetrahydrofolat. Sedangkan sulfametoksazol akan berkompetisi dengan PABA untuk menghambat sintesis asam dihidrofolat.²³ Gabungan kerja dari duakombinasi antibiotic ini menyebabkan terjadinya hambatan bertingkat dalam proses pembentukan asam tetrahydrofolat (biosintesis asam folat). Kotrimoksazol ini memiliki aktifitas bakterisid dan efektif terhadap Gram positif dan negatif.¹⁰

Resistensi antibiotik dipengaruhi oleh dua faktor yaitu faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik merupakan keadaan terbentuknya mekanisme alamiah bakteri untuk bertahan hidup. Paparan antibiotik sebelumnya pada bakteri menyebabkan kemampuan untuk menciptakan system pertahanan diri dari antibiotik yang telah dikenali oleh bakteri.²⁴ Proses adaptasi yang dilakukan oleh bakteri diperantarai oleh perpindahan plasmid atau transposon antarbakteri yang menimbulkan beberapa keadaan seperti diproduksinya enzim baru yang dapat menimbulkan ketidakaktifan dari antibiotik, selain itu juga terjadinya modifikasi enzim yang menjadi target dari mekanisme kerja antibiotik.²⁵

Bakteri dapat mengalami resistensi terhadap kotrimoksazol melalui tiga jalur secara umum yaitu; (1) Penurunan daya serap bakteri terhadap antibiotik; (2) Perubahan atau mutasi pada reduktase dihidrofolat; dan (3) Reduktase dihidrofolat yang berlebihan.²⁶

Mekanisme yang berperan terhadap resistensi yang terjadi pada UPEC yaitu perubahan permeabilitas melalui pompa efluks sehingga dapat terjadi pengeluaran molekul dari antibiotik, inaktivasi situs target dan resistensi yang diperoleh dengan transfer horizontal elemen genetik, seperti urutan penyisipan, kaset gen, integron, dan transposon.²⁷ Mekanisme resistensi *Pseudomonas aeruginosa* berhubungan dengan permeabilitas membran luar yang lebih rendah, peningkatan ekspresi pompa efluks dengan spesifitas yang berbeda sehingga memiliki kemampuan untuk memompa biosintesis asam folat inhibitor pada trimetropim (kotrimoksazol).²⁸

Faktor dari pasien juga dapat mempengaruhi kejadian resistensi dari antibiotik. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat seperti konsumsi yang tidak sesuai waktu anjuran, pemberian dosis yang terlalu rendah, pemilihan antibiotik yang tidak tepat, maupun penegakan diagnosis yang salah dapat menjadi faktor pendukung terjadinya resistensi.²⁹ Penelitian menyatakan bahwa analisis bivariat kepatuhan yang rendah cenderung mengarah pada hubungan yang signifikan dengan respon klinis yang buruk (57%, $P = 0,06$).²⁹ Penggunaan secara luas dapat menyebabkan penurunan efektivitas kerja dari suatu antibiotik.³⁰

Langkah dalam meminimalisir angka resistensi adalah penerapan rasionalitas penggunaan antibiotik, yaitu menekankan ketepatan indikasi, tepat obat, tepat dosis, tepat frekuensi, dan tepat jangka waktu pemberian antibiotik. Antibiotik yang

rasional dipilih melalui pengujian kepekaan bakteri agar terhindar dari terapi antibiotik memiliki pola resistensi terhadap pasien. Data gambaran sensitifitas antibiotik terhadap suatu bakteri di rumah sakit sangat diperlukan sebagai panduan penggunaan antibiotik.³¹

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pada bakteri penyebab ISK pada pasien DMT2 di RSUD Sultan Syarif Mohamad Alkadrie kota Pontianak dapat disimpulkan bahwa bakteri penyebab ISK telah mengalami resistensi terhadap

antibiotik kotrimoksazol sebesar 59,09% (*Escheriachia coli* (46,15%), *Pseudomonas auriginosa* (80%), *Enterobacter aerogenes* (100%), *Klebsiella* sp. (100%), dan sensitif terhadap *Shigella* sp. (100%).

DUKUNGAN FINANSIAL (jika ada)

Tidak ada

UCAPAN TERIMA KASIH (jika ada)

Tidak ada

KONFLIK KEPENTINGAN (jika ada)

Tidak ada

DAFTAR PUSTAKA

1. Haida N, Atoilah M. Hubungan Empat Pilar Pengendalian DM Tipe 2 dengan Rerata Kadar Gula Darah. *JBE*. 2013; 1(2):234-243.
2. International Diabetes Federation. IDF Diabetes atlas.Ed.7. 2015.
3. American Diabetes Association. Position Statement: Standards of Medical Care in Diabetes 2010. *Diab Care*. 2010;33(1)
4. International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. Edisi ke-8. International Diabetes Federation, 2017. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan KEMENKES RI. Riset kesehatan dasar 2013. Jakarta, Balitbangkes. 2013.
5. Kementerian Kesehatan RI. INFODATIN Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI: Situasi dan Analisis Diabetes. 2014.
6. Nitzan O, Elias M, Chazan B, Saliba W. Urinary tract infections in patients with type 2 diabetes mellitus: review of prevalence, diagnosis, and management.*Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*. Devepress. 2015;8:129–136.
7. Black JM, Hawks JH. Medical–surgical nursing. Clinical management for positive outcomes. 8 ed. St. Louis : Saunders, an imprint of Elsevier, Inc. 2009.
8. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infection: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat REV Microbio*. 2015;13(5):269-84
9. Rahayu UE. Antibiotika, Resistensi, dan Rasionalitas Terapi. *Sainstis*. 2012; 1(1): 0699-2089.
10. Imaniah BA. Peta kuman dan resistensinya terhadap antibiotika pada penderita infeksi saluran kemih (ISK) di RSUD Dr. Moewardi Tahun 2014[SKRIPSI]. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. 2015.
11. Seta S. I, Indah L. H, dan Rizka R. pola kepekaan bakteri penyebab infeksi saluran kemih pada anak terhadap antimikroba. *MKS*. 2015; 47(2): 85-90.
12. Asadul J. MS. Karakteristik Antibiotik untuk Terapi pada Pasien Infeksi Saluran Kemih di Rumah Sakit Pendidikan

- Universitas Hasanuddin Periode Januari 2016 – Juli 2017[SKRIPSI]. Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin : Makassar. 2017.
13. Nur Z, Mardhia, dan Mahyarudin. Gambaran bakteri penyebab infeksi saluran kemih pada urin penderita diabetes melitus tipe 2. *MKA*. 2022; 45(2): 173-84.
 14. Tille PM. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. Missouri: Elsevier Mosby; 2014.
 15. Weitz M dan Kearns B. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*, 27th ed. New York: McGraw-Hill;2016.
 16. Sari M. Uji bakteriologis dan resistensi antibiotik terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella sp.* pada makanan gado-gado di kantin UIN Syarif hidayatullah Jakarta [skripsi] Tangerang Selatan: Universitas Islam Negeri Jakarta; 2015.
 17. SafitriVA ,Rosdiana D, Astari RV. Gambaran hasil pemeriksaan monofilamen pada pasien diabetes melitus (DM) yang berkunjung ke poli klinik penyakit dalam RSUD Arifin achmad provinsi riau. *JIK*. 2017; 11(2):92-7.
 18. Amri, F., S. Arman, dan Darniati. Isolasi dan identifikasi bakteri enterik pada feses gajah sumatera (*elephas maximus sumatranus*) di pusat konservasi gajah (PKG) saree aceh besar. *JIMVET*. 2017;1(3):305-315.
 19. Grieshaber-Bouyer R, Nigrovic PA. Neutrophil heterogeneity as therapeutic opportunity in immune-mediated disease. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:1-13. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00346.
 20. Sari P.A, Erly, DessyArisanty. Perbandingan efektivitas daya hambat kotrimoksazol generik dan paten terhadap pertumbuhan bakteri *escherichia coli* sebagai penyebab infeksi saluran kemih secara in vitro. *Jurnal FK Unand*. 2015;3(1):227-32.
 21. Manar O, Lashkar, Pharm D, BCPS, Milap C, Nahata MS, et al. Antimicrobial pharmacotherapy management of urinary tract infection in pediatric patients. *Journal of Pharmacy Technology*. 2018;3(42):62-81.
 22. Clinical and Laboratory Standars Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standards-29 Ed. CLSI document M02-A11.Wayne, PA: CLSI; 2019. p. 24.
 23. Utami ER. Antibiotika, resistensi, dan rasionalitas terapi. *El-Hayah*. 2011;1(4):191–198.
 24. Ramanath KV, Shafiya SB. Prescription pattern of antibiotic usage for urinary tract infection treated in a rural tertiary care hospital. *Indian Journal of Pharmacy Practice* 2011; 4(2):57-63.
 25. Mahon C, Lehman D, Manuselis G. *Texbook of diagnostic microbiologi* 4th ed. USA: Saunders Elsevier, 2015. 420-853P
 26. Darna, Masnur Turnip, Rahmawati. Identifikasi bakteri anggota Enterobacteriaceae pada makanan tradisional sotong pangkong. *JLabMed*. 2018;2(2):6-12.
 27. Tantri BUN. Identifikasi bakteri *escherichia coli*, *shigella sp*, dan *salmonella sp* pada air sumur di wilayah pembuangan limbah tahu dan limbah ikan kota bandar lampung[skripsi]. Bandar Lampung: Universitas Lampung; 2016.
 28. Weitz M dan Kearns B. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*, 27th ed. New York: McGraw-Hill;2016.
 29. Ochoa SA, Cruz-Cordova A, Luna-Pineda VM, Reyes-Grajeda JP, Cazer-DomIniguez V, Escalona G, et al. Multidrug- and extensively drug-resistant Uropathogenic *Escherichia coli* clinical strains: phylogenetic groups widely associated with integrons maintain high genetic diversity. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7(2042):1-12.
 30. Samantha J. Eells, Megan Nguyen, Jina Jung, Raul Macias-Gil, Larissa May, Loren G. Miller. Relationship between adherence to oral antibiotics and postdischarge clinical outcomes among

- patients hospitalized with staphylococcus aureus skin infections. American Society for Microbiology: Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2016;60(5):2941-8.
31. Febrianto AW, Mukaddas A, Faustine I. Rasionalitas penggunaan antibiotik pada pasien Infeksi Saluran Kemih (ISK) di instalasi rawat inap RSUD Undata Palu tahun 2012. Online Jurnal of Natural Science. 2013; 2(3): 20-29.