

Sintesis Konjugat Kurkumin-Leusin sebagai Kandidat Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*

Najwa Fitri Rayyani *, Nety Kurniaty, Rani Maharani

Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Indonesia.

najwafitri202@gmail.com, nety.kurniaty@gmail.com, r.maharani@unpad.ac.id

Abstract. The goal of this study is to synthesize curcumin-leucine conjugates as potential antibacterial agents against *Staphylococcus aureus*. Curcumin has antibacterial properties, but its use is limited by factors such as low solubility and poor bioavailability. We made structural modifications by conjugating curcumin with the lipophilic amino acid leucine, which has the potential to enhance its penetration into bacterial cell membranes. The synthesis was performed using the Steglich esterification method. Curcumin and leucine (Boc) were reacted with DCC and DMAP in a dioxane solvent for 48 hours at room temperature. The reaction product was then purified via column chromatography using an n-hexane and ethyl acetate gradient eluent system, and the process was monitored via TLC. Purification yielded 2,25%. Mass spectrometry (MS) was used to characterize the pure fraction, showing a molecular ion peak at m/z 580.2551 $[M-H]^-$ in negative mode, which is consistent with the theoretical mass of 581.2625. The antibacterial activity of the synthetic product was tested in vitro using the microdilution method against *S. aureus*. The results showed that curcumin-leucine(Boc) did not exhibit antibacterial activity at concentrations of 1500 ppm or less.

Keywords: *Curcumin, Leucine, Antibacterial.*

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis konjugat kurkumin-leusin sebagai kandidat antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Kurkumin diketahui memiliki aktivitas antibakteri, namun keterbatasan seperti kelarutan rendah dan bioavailabilitas buruk membatasi penggunaannya. Modifikasi struktur dilakukan dengan mengkonjugasikan kurkumin dengan asam amino leusin yang memiliki sifat lipofilik dan berpotensi meningkatkan penetrasi ke membran sel bakteri. Sintesis dilakukan menggunakan metode esterifikasi steglich, dengan mereaksikan kurkumin dan leusin(Boc) menggunakan DCC dan DMAP dalam pelarut dioksan selama 48 jam pada suhu ruang. Produk hasil reaksi dimurnikan dengan kromatografi kolom menggunakan sistem eluen gradien *n-heksan*:etil asetat dan dipantau melalui KLT. Hasil pemurnian memiliki nilai *yield* 2,25% Fraksi murni dikarakterisasi menggunakan spektrometri massa (MS), yang menunjukkan puncak ion molekul pada m/z 580,2551 $[M-H]^-$ pada mode negatif, sesuai dengan massa teoritis sebesar 581, 2625. Pengujian aktivitas antibakteri pada produk sintesis dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode mikrodilusi terhadap *S. aureus*. Hasil menunjukkan kurkumin-leusin(Boc) tidak memiliki aktivitas antibakteri pada konsentrasi $\leq$ 1500 ppm.

Kata Kunci: *Kurkumin, Leusin, Antibakteri.*

A. Pendahuluan

Infeksi merupakan salah satu masalah kesehatan besar yang terjadi di negara maju maupun berkembang. Infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen yang masuk ke dalam tubuh kemudian berkembang dan menyebar ke aliran darah melalui jaringan atau sistem limfatik. Mikroba patogen yang dapat menyebabkan infeksi dapat berupa jamur, protozoa, virus, ataupun bakteri. Bakteri yang banyak menyebabkan infeksi yaitu *Salmonella typhi*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Shigella shigae*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* bakteri flora normal yang ada pada tubuh manusia, namun pada kondisi tertentu dapat menyebabkan infeksi.

Staphylococcus aureus dapat ditemukan di kulit bagian luar epidermis, tenggorokan, dan hidung. *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti infeksi kulit, infeksi saluran kemih, keracunan makanan, pneumonia, meningitis, dan sepsis. Pada umumnya infeksi bakteri diatasi dengan menggunakan antibiotik. Namun penggunaan antibiotik yang tidak tepat dapat menyebabkan bakteri menjadi resisten sehingga penggunaan antibiotik menjadi tidak efektif. Salah satu contoh resistensi antibiotik adalah MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). MRSA menjadi salah satu masalah kesehatan yang cukup serius karena kemampuannya untuk beradaptasi dan resisten terhadap beberapa jenis antibiotik, khususnya antibiotik golongan beta-laktam, termasuk amoxicillin dan penicillin.

Pencarian antibiotik baru terus dilakukan untuk mengatasi bakteri yang resisten terhadap antibiotik, termasuk penelitian terhadap senyawa dari tumbuhan yang memiliki aktivitas antibakteri. Salah satu senyawa yang memiliki potensi besar sebagai antibakteri adalah kurkumin yang merupakan komponen utama dari kunyit (*Curcuma longa* L). Banyak penelitian yang sudah dilakukan dengan menggunakan kurkumin dan menunjukkan adanya aktivitas farmakologis termasuk antibakteri, antiinflamasi, antikarsinogenik, dan tksidan. Namun meskipun kurkumin ini memiliki berbagai aktivitas farmakologis, kurkumin sangat mudah larut dalam lemak, sehingga akan sulit larut dalam air. Selain itu, beberapa penelitian telah menunjukkan ketidakstabilannya dalam kondisi fisiologis, dan memiliki bioavailabilitas yang rendah. Kekurangan tersebut membuat kurkumin lebih terbatas dalam pengaplikasiannya (Vareed et al., 2008).

Hingga saat ini berbagai strategi telah dilakukan untuk mengatasi keterbatasan dari kurkumin, terutama kelarutannya di dalam air. Modifikasi kimia pada molekul kurkumin dapat menjadi salah satu pendekatan untuk mengatasi keterbatasan tersebut. Metode yang telah dilakukan dalam konjugasi kurkumin salah satunya adalah penggunaan asam amino yang dilindungi, yaitu, Butiloksikarbonil (Boc), karboksibenzil (Cbz), atau Fluorenilmetiloksikarbonil (Fmoc). Konjugasi kurkumin dengan asam amino merupakan salah satu metode yang umum digunakan. Asam amino memiliki gugus fungsional yang dapat berinteraksi dengan kurkumin, sehingga dapat meningkatkan kelarutan, stabilitas, dan bioavailabilitasnya. Selain itu, konjugasi dengan asam amino dapat memberikan sifat tambahan pada molekul kurkumin, seperti peningkatan selektivitas terhadap target tertentu (Salehi et al., 2018).

Leusin (L-leucin) adalah asam amino hidrofobik esensial yang diketahui memiliki peran penting dalam berbagai proses biologis, salah satunya antibakteri. Leusin yang bersifat hidrofobik dapat meningkatkan kemampuan untuk berinteraksi dengan membran sel bakteri hidrofobik untuk meningkatkan penetrasi dan efektivitas antibakteri (Han et al., 2019). Selain itu, konjugasi asam amino juga dapat mempengaruhi jalur metabolisme dan distribusi in-vivo, yang dapat meningkatkan waktu paruh dan ketersediaan kurkumin dalam tubuh. Pendekatan sintesis konjugat kurkumin-leusin diharapkan untuk menghasilkan senyawa turunan baru dengan aktivitas antibakteri yang lebih efektif dan kelarutan dalam air yang lebih tinggi daripada kurkumin tunggal.

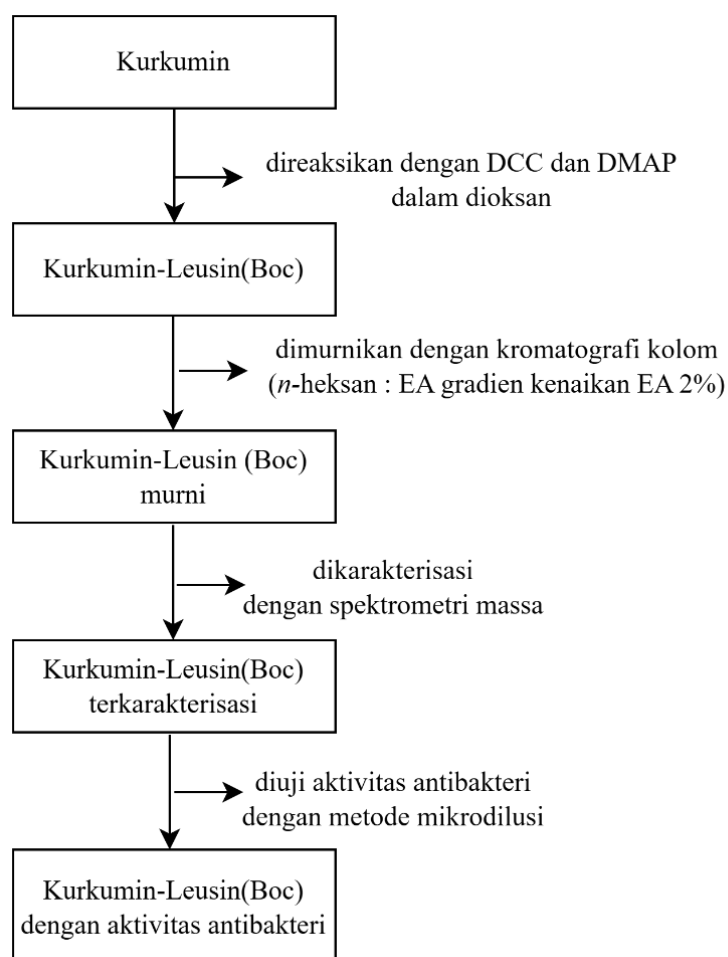
Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah apakah sintesis konjugat kurkumin-leusin mampu meningkatkan bioavailabilitas dan kelarutannya dalam air, serta apakah hasil sintesis konjugat kurkumin-leusin ini memiliki aktivitas antibakteri. Penelitian ini pula bertujuan untuk mensintesis konjugat kurkumin-leusin sebagai kandidat antibakteri serta untuk menguji aktivitas antibakteri dari hasil sintesis konjugat kurkumin-leusin. Manfaat dari penelitian ini yaitu ilmu pengetahuan yang baru dari sintesis konjugat kurkumin-asam amino sebagai antibakteri.

B. Metode

Penelitian sintesis konjugat kurkumin-leusin sebagai kandidat antibakteri *Staphylococcus aureus* ini dilaksanakan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran. Metode yang digunakan sintesis adalah reaksi esterifikasi steglich. Pada tahap sintesis, kurkumin direaksikan langsung dengan asam amino leusin yang telah terproteksi oleh Boc (butiloksikarbonil) pada gugus aminanya. Reaksi ini menggunakan DCC (disikloheksilkarbodiimida) sebagai reagen dan DMAP (4-dimetilamino-piridina) sebagai katalisator nukleofilik yang mempercepat pembentukan ester. Campuran senyawa tersebut direaksikan secara kontinu menggunakan magnetic stirrer selama 48 jam pada suhu ruang di atas hotplate.

Setelah selesai direaksikan, senyawa konjugat kurkumin-leusin yang terbentuk dipisahkan dan dimurnikan menggunakan kromatografi kolom dengan metode elusi gradien. Proses kromatografi kolom ini menggunakan 21 eluen dengan rasio yang berbeda untuk mendapatkan fraksi terbaik. Fraksi-fraksi yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan KLT. Fraksi yang diperkirakan menunjukkan kemurnian tinggi dikumpulkan dan dilakukan penguapan menggunakan rotary evaporator untuk mendapatkan fraksi yang kental atau kering.

Selanjutnya, fraksi yang diperoleh dilakukan karakterisasi menggunakan spektrometri massa untuk menentukan nilai massa molekul senyawa yang telah disintesis dengan akurat. Analisis spektrometri massa dilakukan di Laboratorium Kimia Terpadu Institut Teknologi Bandung.



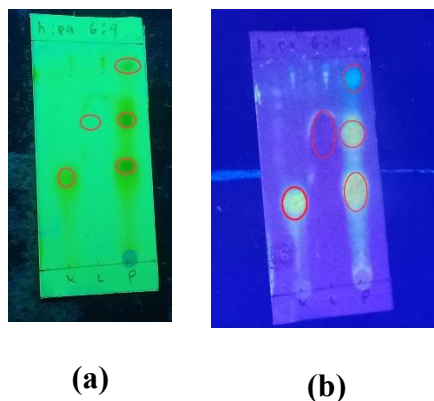
Gambar 1. Tahapan Sintesis Konjugat Kurkumin-Leusin dan Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus*

C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Konjugasi kurkumin dengan asam amino menjadi salah satu strategi yang dapat mengatasi

kekurangan dari kurkumin dan meningkatkan efisiensi kurkumin. Leusin merupakan asam amino esensial yang bersifat hidrofobik, sifat ini memungkinkan konjugasi leusin dengan kurkumin berpotensi meningkatkan kemampuan dalam berinteraksi dan menembus membran sel bakteri yang sebagian besar bersifat hidrofobik. Sintesis Konjugat kurkumin-leusin dilakukan dengan esterifikasi steglich.

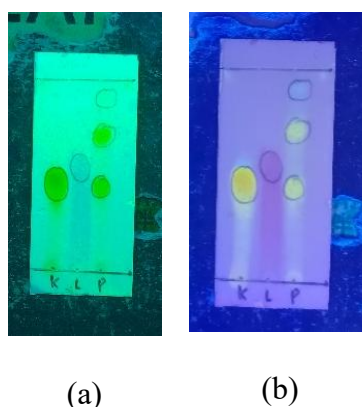
Hasil Temuan Pertama



Gambar 2. Hasil KLT reaksi 24 jam

(a) pada sinar uv 254 nm (b) pada sinar uv 365 nm

Pada reaksi 24 jam, spot leusin-Boc tidak terlihat sehingga dilakukan penyemprotan dengan ninhidrin yang bagus untuk mendeteksi keberadaan asam amino. Kemudian diamati kembali di bawah sinar UV. Pada plat terlihat satu spot pada kurkumin yang memiliki nilai R_f 0,375, pada leusin terbentuk satu spot dengan 0,775, pada produk reaksi terbentuk 3 spot dengan nilai R_f masing-masing 0,45; 0,675; dan 0,925.



Gambar 3. Hasil KLT reaksi 48 jam.

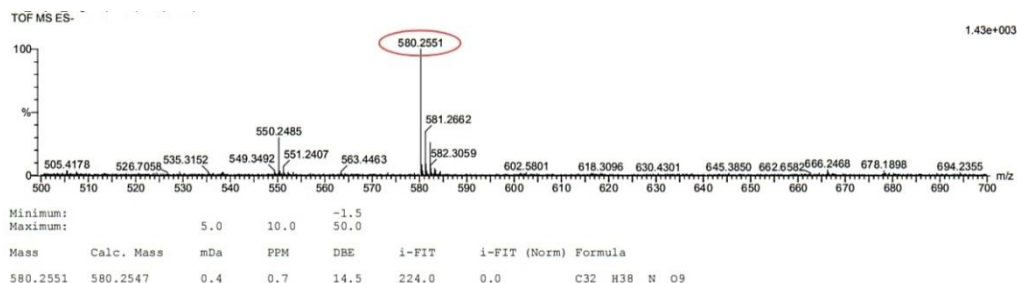
(a) pada sinar UV 254 nm (b) pada sinar UV 365 nm

Dalam reaksi 48 jam, pada plat terlihat satu spot pada kurkumin yang memiliki nilai R_f 0,5, pada leusin terbentuk satu spot dengan 0,625, pada produk reaksi terbentuk 3 spot dengan nilai R_f masing-masing 0,5; 0,7; dan 0,9. Terjadi perubahan nilai R_f pada produk yang disebabkan oleh perubahan polaritas pada produk.

Setelah direaksikan selama 48 jam, dilakukan pemurnian dengan kromatografi kolom

Kromatografi kolom dilakukan dengan metode elusi gradien. Berdasarkan pengamatan hasil KLT, senyawa target yang diperkirakan murni adalah senyawa yang terdapat pada fraksi ke-16 dengan rasio *n*-heksan etil asetat (72:28).

Fraksi yang telah murni selanjutnya dikarakterisasi dengan menggunakan spektrometri massa. Hasil spektrometri massa menunjukkan puncak molekul yang dominan pada *m/z* sebesar 580,2521 Da. Nilai ini dibandingkan dengan massa molekul teoritis yaitu 581,2625 Da.



Gambar 4. Hasil spektrometri massa.

Kemudian sebanyak 1500 ppm senyawa konjugat kurkumin-leusin dilakukan uji antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Hasil menunjukkan bahwa senyawa konjugat kurkumin-leusin tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi ≤ 1500 ppm.



Gambar 5. microplate pengujian aktivitas antibakteri *S. aureus*

Analisis dan Pembahasan

Sintesis konjugat kurkumin-leusin dilakukan dengan melewati reaksi esterifikasi steglich. Bahan utama yang diperlukan dalam esterifikasi Steglich adalah DCC sebagai aktivator gugus karboksilat dan DMAP sebagai katalisator nukleofil untuk mempercepat reaksi. Dalam proses ini esterifikasi steglich terjadi antara gugus karboksil pada leusin sebagai elektrofil dan gugus fenol pada kurkumin sebagai nukleofil (Balouiri et al., 2016). Pemilihan eluen *n*-heksan : etil asetat (6:4) digunakan untuk pemisahan berdasarkan kepolarannya. *n*-heksan digunakan untuk bahan yang bersifat non-polar seperti kurkumin dan konjugatnya, etil asetat bersifat lebih polar yang dapat membantu menembus lapisan silika dan bahan lain yang bersifat lebih polar. Semua bahan direaksikan dalam suasana nitrogen, diaduk dengan magnetic stirrer selama 48 jam dan dilakukan pemantauan setiap 24 jam. Perbedaan nilai *R_f* kurkumin dari 0,375 menjadi 0,5 dan leusin dari 0,775 menjadi 0,625 bisa disebabkan karena terjadi perubahan struktur yang menjadikan perubahan polaritas. Adanya tiga spot pada produk reaksi menandakan bahwa produk yang terbentuk belum murni sehingga diperlukan teknik pemurnian lebih lanjut untuk mengisolasi produk yang diinginkan secara lebih spesifik (Poole & Poole, 2012).

Pemurnian dengan kromatografi kolom dilakukan untuk mengisolasi senyawa konjugat

kurkumin-leusin(Boc) yang lebih murni. Hal ini dilakukan karena produk reaksi yang dihasilkan masih mengandung campuran lain (Emilda & Delfira, 2023). Campuran eluen *n*-heksan etil asetat digunakan sebagai fase gerak dengan sistem elusi gradien dengan total rasio 21 komposisi pelarut yang berbeda. Penggunaan sistem elusi gradien dengan rasio yang berbeda-beda memungkinkan pemurnian yang lebih selektif karena setiap fraksi memiliki tingkat polaritas yang berbeda sehingga diperoleh fraksi yang sesuai dengan polaritasnya.

Berdasarkan pengamatan hasil KLT, senyawa target yang diperkirakan murni adalah senyawa yang terdapat pada fraksi ke-16. Hal ini dikarenakan spot pada fraksi ke-16 hanya menghasilkan satu spot tunggal yang terlihat jelas dan tidak menunjukkan adanya *tailing*, berbeda dengan fraksi lainnya yang menunjukkan lebih dari satu spot. Spot tunggal menjadi indikator utama terbentuknya senyawa murni dalam pemurnian (Sherma & Fried, 2003). Selain itu spot pada fraksi ke-16 memiliki intensitas yang tinggi dan berbentuk bulat simetris yang menandakan konsentrasi senyawa tinggi dan tidak tersebar oleh campuran (Poole & Poole, 2012).

Kemudian filtrat dari fraksi ke-16 dilakukan pemekatan untuk menghilangkan pelarut pada produk sehingga diperoleh produk yang kental. Pemekatan dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada kecepatan 65 rpm dan 165 mbar bertujuan agar produk tidak rusak karena suhu dan tekanan yang tidak sesuai dapat menyebabkan degradasi atau kehilangan komponen aktif. Krud yang telah di evaporasi selanjutnya Dari hasil pemurnian dengan kromatografi kolom, diperoleh fraksi sebanyak 9,1 mg dan diperoleh nilai *yield* 2,25%.

Karakterisasi dengan spektrometri massa bertujuan untuk mengetahui nilai *m/z* dari fraksi yang diperoleh dan mengetahui tingkat kemurnian dari senyawa yang diinginkan, yaitu konjugat kurkumin-leusin(Boc). Hasil spektrometri massa menunjukkan puncak molekul yang dominan pada *m/z* sebesar 580,2521 Da. Nilai ini dibandingkan dengan massa molekul teoritis yaitu 581,2625 Da. Perbedaan antara nilai teoritis dan hasil reaksi sangat kecil. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa senyawa yang terbentuk telah sesuai dengan yang diharapkan. Nilai *m/z* sebesar 580,2521 diperoleh karena HR-MS dilakukan dengan mode ionisasi negatif sehingga yang dalam prosesnya cenderung mengalami pelepasan satu proton (H^+). Dalam metode ionisasi negatif, massa ion yang terdeteksi adalah hasil pengurangan satu proton.

Uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan metode mikrodilusi. Suspensi bakteri diencerkan dalam media Mueller Hinton Broth (MHB) untuk mendapatkan inokulum akhir sekitar 1×10^6 CFU/mL, sesuai dengan standar pengujian MIC. Senyawa uji konjugat kurkumin-leusin(Boc) dilarutkan dalam pelarut DMSO (dimetilsulfoksida) karena senyawa ini tidak larut dalam air. DMSO dipilih karena pelarut ini mampu melarutkan senyawa organik dan telah banyak digunakan dalam pengujian antibakteri, selama konsentrasinya tidak melebihi ambang toksik terhadap bakteri uji (Balaoui *et al.*, 2016).

Serial dilusi dua kali lipat senyawa dilakukan dalam MHB untuk memperoleh rentang konsentrasi dari 1500 $\mu\text{g/mL}$ hingga 0,732 $\mu\text{g/mL}$. Serial dilusi seperti ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi terkecil senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri secara penuh. Kemudian *micro plate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. *Micro plate* kemudian diamati dan menunjukkan pelarut DMSO memiliki aktivitas antibakteri pada konsentrasi 5000 ppm yang ditandai dengan adanya sumur yang berwarna bening pada baris G dan H. Seharusnya seluruh sumur pada garis G dan H ini terlihat keruh dan tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. DMSO dapat menembus dan merusak membran sel bakteri dengan meningkatkan permeabilitasnya sehingga merusak tekanan osmotik pada sel dan menghambat pertumbuhan sel bakteri terutama pada bakteri gram positif seperti *S. aureus* (Santos *et al.*, 2003).

Pada sumur di baris E dan F terlihat keruh pada kolom 1 hingga 12, menunjukkan bahwa sampel konjugat kurkumin-leusin tidak memiliki aktivitas antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 1500 ppm hingga 0,732 ppm. Salah satu penyebab utama tidak adanya aktivitas antibakteri dalam senyawa ini adalah masih terdapat gugus pelindung Boc pada gugus amina leusin yang belum dideproteksi. Gugus pelindung Boc berfungsi untuk melindungi gugus amina pada saat proses sintesis agar tidak bereaksi dengan reagen lain. Namun setelah sintesis selesai, Boc sebaiknya dideproteksi agar gugus amina pada leusin mampu bekerja dan memberikan aktivitas biologis.

Gugus amina penting untuk membantu senyawa berinteraksi dengan dinding sel bakteri dan mampu menghasilkan aktivitas antibakteri. Selain itu, gugus pelindung Boc memiliki ukuran yang

besar dan bersifat hidrofobik sehingga membuat senyawa lebih sulit larut dalam media MHB dan sulit menembus dinding sel bakteri (Vlieghe et al., 2010). Hal ini dapat terjadi karena sampel yang digunakan telah terkontaminasi oleh bakteri, selain itu konsentrasi sampel yang digunakan terlalu rendah. Konsentrasi senyawa yang terlalu rendah dapat menyebabkan terhambatnya kemampuan senyawa untuk mencapai molekul target sehingga tidak terjadi aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri dan campuran larutan terlihat keruh. Adanya gugus pelindung dalam pada asam amino (Wiegand et al., 2008).

D. Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengujian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa sintesis senyawa konjugat kurkumin-leusin(Boc) telah berhasil dilakukan dengan metode esterifikasi steglich dengan menggunakan agen katalis DMAP dan *activator* DCC yang direaksikan selama 48 jam. Keberhasilan sintesis ini dikonfirmasi melalui hasil uji karakterisasi menggunakan spektrometri massa yang menunjukkan adanya puncak ion molekul [M-H]⁻ dengan nilai *m/z* 580,2551, dengan jumlah 9,1 mg dan rendemen 2,25%. Senyawa konjugat kurkumin-leusin-Boc tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi ≤ 1500 ppm. Hal ini dikonfirmasi melalui uji aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi yang tidak menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan *Staphylococcus aureus* oleh senyawa konjugat kurkumin-leusin-Boc.

Berdasarkan hasil penelitian ini, disarankan untuk melakukan deproteksi gugus pelindung sebelum dilakukan uji aktivitas antibakteri. Deproteksi gugus pelindung Boc akan membuka gugus amina leusin sehingga dapat lebih aktif dalam memberikan aktivitas biologis. Selain itu, konsentrasi sampel pada uji aktivitas antibakteri perlu ditingkatkan.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Dr. Nety Kurniaty, S.Si., M.Sc., dan Ibu Prof. Rani Maharani, Ph.D., selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, saran, serta ilmu pengetahuan kepada penulis dari awal hingga akhir penelitian.

Daftar Pustaka

- Andi Wilda Angraini, Muhammad Asri SR, & Widya Ariati. (2024). FORMULASI SEDIAAN SERUM DARI EKSTRAK ETANOL DAUN NANGKA (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) SEBAGAI ANTIJERAWAT TERHADAP *Propionibacterium acnes*. *Jurnal Ilmiah Farmasi Farmasyifa*, 7(2), 132–146. <https://doi.org/10.29313/jiff.v7i2.3033>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Emilda, E., & Delfira, N. (2023). Pemanfaatan Silika Gel 70-230 Mesh Bekas Sebagai Pengganti Fase Diam Kromatografi Kolom pada Praktikum Kimia Organik. *Indonesian Journal of Laboratory*, 1(1), 45. <https://doi.org/10.22146/ijl.v1i1.82006>
- Fauziah Supyan, A., Lina Rahmawati Rizkulloh, & Salsabila Adlina. (2025). Aktivitas Antioksidan dan Evaluasi Mutu Fisik Sediaan Serum Wajah Ekstrak Etanol Daun Kelengkeng (*Dimocarpus logan* L.). *Jurnal Ilmiah Farmasi Farmasyifa*, 8(2), 72–82. <https://doi.org/10.29313/jiff.v8i2.6988>
- Han, G., Yang, H., Wang, Y., Haraguchi, S., Miyazaki, T., Bungo, T., Tashiro, K., Furuse, M., & Chowdhury, V. S. (2019). L-Leucine increases the daily body temperature and affords thermotolerance in broiler chicks. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32(6), 842–848. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0677>

- Nur, S., Putra, P., Garna, H., & Rizki Akbar, M. (n.d.). *Hubungan Indeks Massa Tubuh, Kualitas Tidur, dan Tekanan Darah dengan Tingkat Stres Karyawan Pabrik PT Primastra Sandang Lestari Bandung Tahun 2022*. <https://journals.sangkuriangpublisher.com/pharmacomedic>
- Poole, C. F., & Poole, S. K. (2012). *Chromatography Today. 5th Edition. Academic Press*.
- Salehi, B., Martorell, M., Arbiser, J. L., Sureda, A., Martins, N., Maurya, P. K., Sharifi-Rad, M., Kumar, P., & Sharifi-Rad, J. (2018). *Antioxidants: Positive or negative actors? Biomolecules*. 8(4), 1–11.
- Santos, N. C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., & Saldanha, C. (2003). Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*, 65(7), 1035–1041. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00002-9)
- Sherma, J., & Fried, B. (2003). *Handbook of Thin-Layer Chromatography (3rd ed.)*. CRC Press.
- Vareed, S. K., Kakarala, M., Ruffin, M. T., Crowell, J. A., Normolle, D. P., Djuric, Z., & Brenner, D. E. (2008). Pharmacokinetics of Curcumin Conjugate Metabolites in Healthy Human Subjects. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 17(6), 1411–1417. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-2693>
- Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., & Khrestchatisky, M. (2010). Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today*, 15(1–2), 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.10.009>
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>