

Sintesis Konjugat Kurkumin-Isoleusin sebagai Kandidat Antibakteri *Escherichia coli*

Reasa Pebriani Komarudin *, Nety Kurniaty, Rani Maharani

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

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

Abstract. Curcumin is an active yellow-orange chemical compound derived from *Curcuma longa* which has potential as an antibacterial. The use of curcumin is still limited due to its low solubility in water and poor bioavailability. The formation of curcumin conjugate compounds with isoleucine-Boc amino acids using the Steglich esterification method involving the activating agent *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and the catalyst 4-dimethylaminopyridine (DMAP). Isoleucine is protected with a Boc group to avoid side reactions. From the synthesis results, a crude product of 4.8407 g was obtained. The synthesis product (curcumin-Ile-Boc) was purified using gradient and isocratic column chromatography techniques. The fraction obtained was 4 mg and the yield percentage was 2.54%. The target fraction was characterized using a mass spectrometer showing a molecular ion peak with a value of $m/z = 582.2647$ with the $[M+H]^+$ ion corresponding to the theoretical mass of 581.1564. Antibacterial activity was tested against *Escherichia coli* using the microdilution method and the results showed that the curcumin isoleucine-Boc conjugate had activity against *Escherichia coli* bacteria at a minimum concentration of 2000 ppm. The release of the Boc group will be a further study to produce curcumin-isoleucine-NH₂ which is expected to have better antibacterial activity.

Keywords: *Antibacterial, Curcumin, Isoleucine.*

Abstrak. Kurkumin merupakan senyawa kimia aktif berwarna kuning-oranye yang berasal dari *Curcuma longa* yang memiliki potensi sebagai antibakteri. Penggunaan kurkumin masih terbatas akibat kelarutan yang rendah dalam air dan bioavailabilitas yang kurang baik. Pembentukan senyawa konjugat kurkumin dengan asam amino isoleusin-Boc menggunakan metode esterifikasi steglich yang melibatkan agen pengaktif *N,N'*-disikloheksilkarbodiimida (DCC) dan katalis 4-dimetilaminopiridin (DMAP). Isoleusin dilindungi dengan gugus Boc untuk menghindari reaksi samping. Dari hasil sintesis diperoleh produk kerdus sebanyak 4,8407 g. Produk sintesis (kurkumin-Ile-Boc) dimurnikan menggunakan teknik kromatografi kolom metode gradien dan isokratik. Fraksi yang diperoleh sebanyak 4 mg dan persentase rendemen diperoleh sebanyak 2,54%. Fraksi target dikarakterisasi menggunakan spektrometer massa menunjukkan puncak ion molekul dengan nilai $m/z = 582,2647$ dengan ion $[M+H]^+$ yang sesuai dengan massa teoritis sebesar 581,1564. Aktivitas antibakteri diuji terhadap *Escherichia coli* menggunakan metode mikrodilusi dan hasilnya menunjukkan bahwa konjugat kurkumin isoleusin-Boc memiliki aktivitas terhadap bakteri *Escherichia coli* pada konsentrasi minimal 2000 ppm. Pelepasan gugus Boc akan menjadi penelitian lanjutan untuk menghasilkan kurkumin-isoleusin-NH₂ yang diharapkan memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik.

Kata Kunci: *Antibakteri, Kurkumin, Isoleusin.*

A. Pendahuluan

Kurkumin merupakan komponen kurkuminoid yang berasal dari rimpang kunyit (*Curcuma longa*). Senyawa ini diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis, salah satunya sebagai antibakteri. Kurkumin memiliki molekul lipofilik yang terdiri dari dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh dua gugus karbonil tak jenuh menunjukkan kelarutan yang buruk didalam air sekitar 11 ng/mL. Rendahnya kelarutan menjadi kendala utama dalam pemanfaatan kurkumin. Untuk mengatasi masalah tersebut, dengan mengkonjugasikan kurkumin dan asam amino. Seperti yang telah diteliti oleh Ni *et al.* (2024). Pada penelitian tersebut menunjukkan bahwa konjugasi kurkumin dengan asam amino lisin dapat meningkatkan kelarutan kurkumin hingga 33,2mg/mL dibandingkan dengan kurkumin yang tidak dimodifikasi. Salah satunya melalui pembentukan konjugat dengan senyawa lain, seperti asam amino. Konjugasi merupakan proses penggabungan dua molekul atau lebih untuk membentuk senyawa baru. Penelitian Ni *et al.* (2024) menunjukkan bahwa konjugasi kurkumin dengan asam amino dapat meningkatkan kelarutan serta aktivitas biologis terhadap mikroorganisme.

Asam amino merupakan komponen utama penyusun protein di dalam tubuh. Salah satu jenis asam amino isoleusin dipilih untuk dikonjugasikan dengan kurkumin karena isoleusin memiliki rantai samping yang bercabang dan bersifat nonpolar, sehingga mampu membentuk interaksi yang stabil dengan senyawa lain. Konjugasi antara senyawa bioaktif dan asam amino dapat meningkatkan stabilitas, kelarutan, dan aktivitas biologis senyawa (Zou *et al.*, 2016). Asam amino isoleusin termasuk dalam asam amino essensial yang tidak dapat disintesis oleh tubuh dan diperoleh melalui konsumsi makanan.

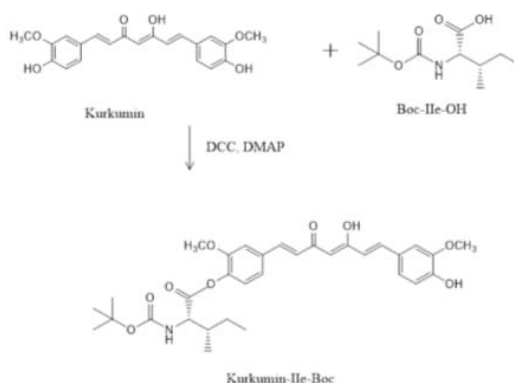
Secara umum, bakteri mempunyai bentuk yang bulat (coccus), berbentuk batang (bacillus) atau melengkung. Bakteri mempunyai morfologi yang berbeda-beda tergantung dari jenisnya dan dipengaruhi oleh kondisi lingkungan. Bakteri berkembang biak melalui pembelahan diri secara langsung (aseksual) jika kondisi lingkungannya memungkinkan. *Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif yang secara alami hidup di dalam saluran pencernaan manusia. Sebagian besar jenis *Escherichia coli* tidak berbahaya dan membantu proses pencernaan, namun terdapat beberapa jenis bakteri tertentu yang dapat menyebabkan penyakit, seperti diare dan infeksi saluran kemih (Najmah *et al.*, 2024).

Berdasarkan latar belakang diatas maka rumusan masalah pada penelitian ini apakah sintesis konjugat kurkumin dengan asam amino isoleusin-Boc dapat disintesis dengan metode esterifikasi Steglich dan apakah senyawa yang diperoleh sudah murni serta apakah hasil sintesis konjugat senyawa kurkumin dengan asam amino isoleusin-Boc memiliki aktivitas antibakteri lebih baik dibandingkan kurkumin murni saja. Tujuan penelitian ini untuk mengembangkan dan memberikan kontribusi dalam bidang farmasi mengenai sintesis konjugat kurkumin dengan asam amino isoleusin-Boc sebagai antibakteri. Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam bidang farmasi, khususnya mengenai sintesis konjugat kurkumin dengan asam amino, menambah wawasan mengenai ilmu pengetahuan baru.

B. Metodologi Penelitian

Proses penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran Bandung mengenai sintesis konjugat senyawa kurkumin dengan asam amino isoleusin sebagai kandidat antibakteri *Escherichia coli* menggunakan metode esterifikasi steglich. Pada proses sintesis, kurkumin direaksikan dengan isoleusin-Boc dan reagen *N,N'*-disikloheksilkarbodiimida (DCC), 4-dimetilaminopiridina (DMAP). Setelah tahap reaksi selesai, campuran reaksi di evaporasi untuk memperoleh senyawa pekat dan dilakukan pemisahan menggunakan kromatografi kolom metode isokratik dan gradien. Pada tahap kromatografi kolom dilakukan beberapa kali sampai diperoleh hasil fraksi yang sudah murni.

Senyawa hasil sintesis, kemudian dikarakterisasi menggunakan spektrometri massa yang dilaksanakan di Institut Teknologi Bandung untuk mengidentifikasi dan memastikan senyawa hasil konjugat kurkumin dengan asam amino isoleusin-Boc yang terbentuk tidak mengandung pengotor atau produk samping dan memperoleh hasil dengan tingkat kemurnian yang akurat. Uji aktivitas antibakteri *Escherichia coli* menggunakan metode mikrodilusi. Pada tahap pengujian ini untuk melihat daya hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi terendah dari senyawa yang masih mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

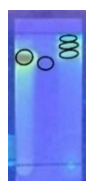


Gambar 1. Sintesis Konjugat kurkumin-Isoleusin

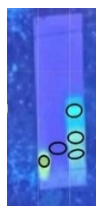
C. Hasil dan Pembahasan

Sintesis Konjugat Kurkumin-Isoleusin

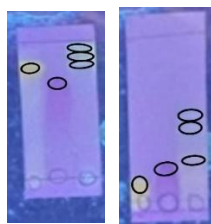
Pada penelitian ini melakukan proses sintesis kurkumin dengan asam amino isoleusin. Sebelum tahap reaksi dimulai, labu RBF dilakukan pengondisian menggunakan gas nitrogen bertujuan untuk menjaga kesetabilan reaksi (inert) dan mencegah terjadinya reaksi samping yang tidak diharapkan. Dilakukan pengondisian labu sebanyak tiga kali agar reaksi berlangsung secara optimal. Isoleusin dipilih sebagai asam amino yang dikonjugasikan karena sifat hidroflik yang berpotensi meningkatkan kelarutan. Selain itu, isoleusin memiliki rantai samping yang bercabang dan stabil, sehingga dapat meningkatkan efektivitas. Pelarut yang digunakan trietilamina (TEA) dan dioksan. Pelarut (TEA) bersifat basa lemah dan tidak menyebabkan degradasi pada reagen sedangkan dioksan sebagai pelarut yang mampu untuk melarutkan kurkumin yang bersifat hidrofobik. DMAP digunakan sebagai pengkatalis yang akan mempercepat proses reaksi namun tidak habis bereaksi sedangkan DCC sebagai agen pengaktif. Dilakukan sonikasi pada reaksi untuk mempercepat proses pelarutan reaksi. (Pereira *et al.*, 2016). labu reaksi diletakkan diatas hot plate yang telah disetting dengan suhu 30°C untuk menjaga kestabilan senyawa tanpa menyebabkan degradasi (Arifian *et al.*, 2022). Selama reaksi berlangsung, campuran diaduk menggunakan stirrer diatas hot plate untuk mencegah terjadinya pengendapan. Larutan reaksi dilakukan pemantauan dengan analisis KLT dan menentukan eluen yang akan digunakan serta memantau keberhasilan reaksi (Parvathy *et al.*, 2010).



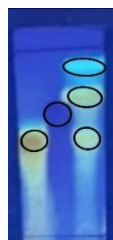
Gambar 2. Hasil KLT setelah 2 jam kurkumin, Ile-Boc, Produk dengan eluen *n*-heksana : etil asetat (1:1)



Gambar 3. Hasil KLT setelah 4 jam kurkumin, Ile-Boc, Produk dengan eluen *n*-heksana : etil asetat (8:2)



Gambar 4. Hasil KLT pada setelah 12 jam Kurkumin, Isoleusin, Konjugat Produk dengan eluen *n*-heksana : etil asetat (8:2) (a), *n*-heksana : etil asetat (1:1) (b) dengan sinar uv 365 nm.



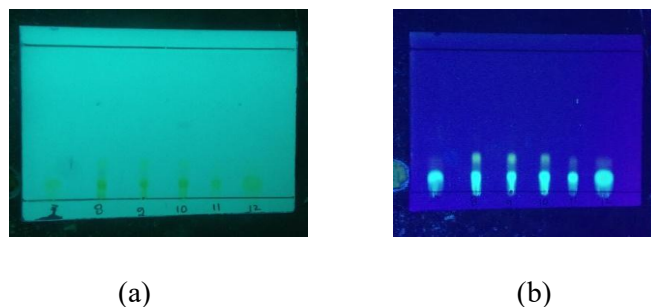
Gambar 5 Hasil KLT pada setelah 48 jam Kurkumin, Isoleusin, Konjugat Produk dengan eluen *n*-heksana : etil asetat (6:4) dengan sinar uv 365 nm

Setelah reaksi berlangsung selama 48 jam, dilakukan analisis menggunakan Kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengamati keberadaan serta pemisahan senyawa kurkumin, isoleusin, dan produk konjugat. Munculnya tiga bercak pada satu titik penotolan menandakan bahwa sampel masih mengandung lebih dari satu jenis senyawa. Pola pada plat manandakan bahwa reaksi sintesis belum menghasilkan senyawa tunggal secara sempurna. Oleh karena itu, dilakukan tahap pemurnian lanjutan menggunakan kromatografi kolom untuk memperoleh senyawa dalam bentuk murni. Proses penotolan sampel menggunakan pipa kapiler secara hati-hati agar tidak merusak lapisan silika pada plat. Setelah plat dikeringkan, lalu dimasukkan ke dalam chamber yang telah dijenuhkan dengan eluen. Elusi dihentikan setelah mencapai batas atas, lalu plat diangkat dengan pinset dan dikeringkan sebelum dianalisis di bawah sinar UV. Kelebihan dari kromatografi lapis tipis yaitu menggunakan alat dan bahan yang sederhana (Astuti *et al.*, 2023).

Kromatografi kolm

Dilakukan pemisahan menggunakan kromatografi kolom untuk diperoleh senyawa yang murni. Dalam penelitian ini, pemisahan senyawa menggunakan kromatografi kolom. Cara ini digunakan untuk mengisolasi senyawa berdasarkan perbedaan polaritasnya. Salah satu kelebihan dari kromatografi kolom adalah kemampuannya dalam memisahkan senyawa dari campuran yang kompleks (Riyanto *et al.*, 2024). Hasil analisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan bahwa senyawa yang diperoleh masih belum murni dan masih ada beberapa pola yang belum terpisah sempurna. Berdasarkan hasil yang diperoleh, fraksi dengan pola bercak yang sama digabungkan, kemudian dianalisis kembali menggunakan kromatografi lapis tipis. Berdasarkan hasil pengamatan pada plat KLT, terlihat bahwa masing-masing fraksi masih menunjukkan lebih dari satu bercak. Pola bercak yang muncul memiliki intensitas dan posisi yang berbeda, yang menandakan bahwa senyawa pada fraksi tersebut belum sepenuhnya terpisah.

Fase diam yang digunakan berupa silika gel ODS, sedangkan fase geraknya berupa campuran metanol dan air dengan rasio 9:1. Silika gel sebagai fase diam dimasukkan ke dalam kolom, kemudian sampel dipisahkan berdasarkan tingkat kemampuan masing-masing senyawa untuk berinteraksi dengan fase diam. Fase gerak dalam bentuk cairan berfungsi mengalirkan senyawa melewati kolom. Pemisahan ini bergantung pada seberapa kuat interaksi kimia antara senyawa dengan fase diam, karena senyawa yang memiliki afinitas lebih tinggi akan tertahan lebih lama dalam kolom (Susanti *et al.*, 2024). Berdasarkan hasil pengamatan, senyawa pada fraksi tersebut belum menunjukkan kemurnian. Oleh karena itu, proses pemisahan dilanjutkan dengan menampung fraksi-fraksi berikutnya. Hasil pengujian menunjukkan bahwa fraksi ke 12 memiliki pola bercak tunggal pada plat KLT, yang mengindikasikan bahwa senyawa telah mencapai tingkat kemurnian.



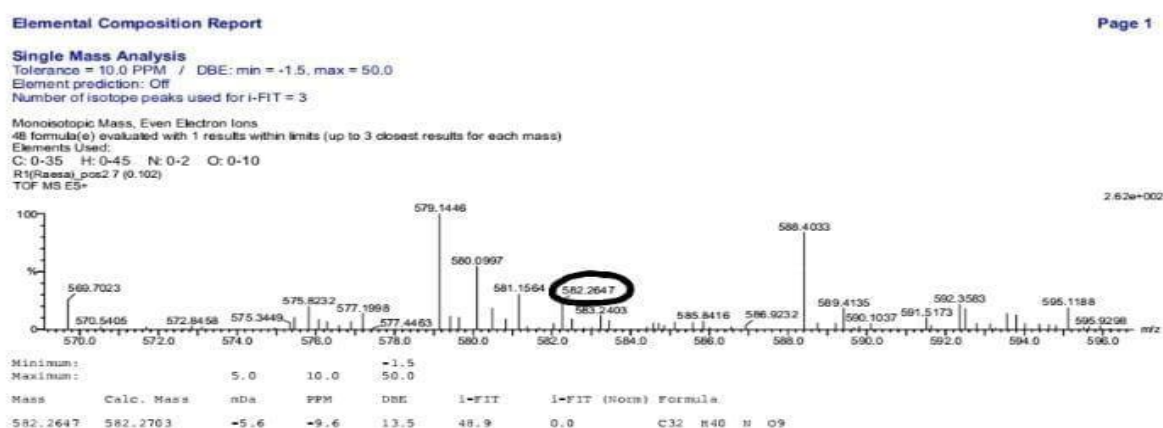
Gambar 6. Hasil KLT Fraksi 7,8,9,10,11 12 sinar uv 254 nm (a)365 nm (b)

Dalam analisis KLT, Kemurnian suatu senyawa dilihat melalui kemunculan satu bercak tunggal yang tajam, jelas, dan tidak menyebar pada plat. Bercak tunggal tersebut menunjukkan bahwa hanya satu komponen yang terdapat dalam sampel tanpa adanya kontaminasi dari senyawa lain. Pada bercak tunggal yang konsisten pada dua panjang gelombang ultraviolet merupakan indikator keberhasilan pemisahan dan menunjukkan bahwa senyawa berada dalam kondisi murni (Hashim *et al.*, 2016).

Spektrometri massa

Merupakan metode analisis yang digunakan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi molekul seayawa berdasarkan rasio massa terhadap muatan (m/z). Prinsip dasar dari metode ini dengan mengubah sampel menjadi bentuk ion gas, kemudian memisahkan ion-ion tersebut sesuai m/z -nya, dan mendeteksi intensitasnya secara kuantitatif menggunakan detektor sensitif. Secara umum, cara kerja alat spektrometri massa terdiri dari tiga bagian utama. Pertama, ada bagian yang disebut sumber ion, yang berfungsi mengubah sampel menjadi partikel bermuatan (ion). Setelah itu, ion-ion tersebut dipisahkan berdasarkan besar kecilnya massa oleh bagian yang disebut penganalisis massa. Kemudian, ion yang sudah dipisahkan akan ditangkap oleh detektor dan diubah menjadi data berupa grafik atau spektrum untuk dianalisis (Kaklamanos *et al.*, 2020). Spektrometri massa dapat menganalisis secara kualitatif dan kuantitatif. Pada spektrometri massa dapat digunakan untuk menganalisis senyawa tunggal atau campuran. (Saputra, 2022).

Berdasarkan hasil yang diperoleh, terdapat puncak massa pada spektrum, 582,2647. Puncak tersebut menunjukkan keberadaan ion dominan dari senyawa uji yang digunakan sebagai dasar dalam penentuan rumus molekul serta struktur senyawa hasil sintesis. Nilai m/z sesuai dengan massa molekul senyawa.



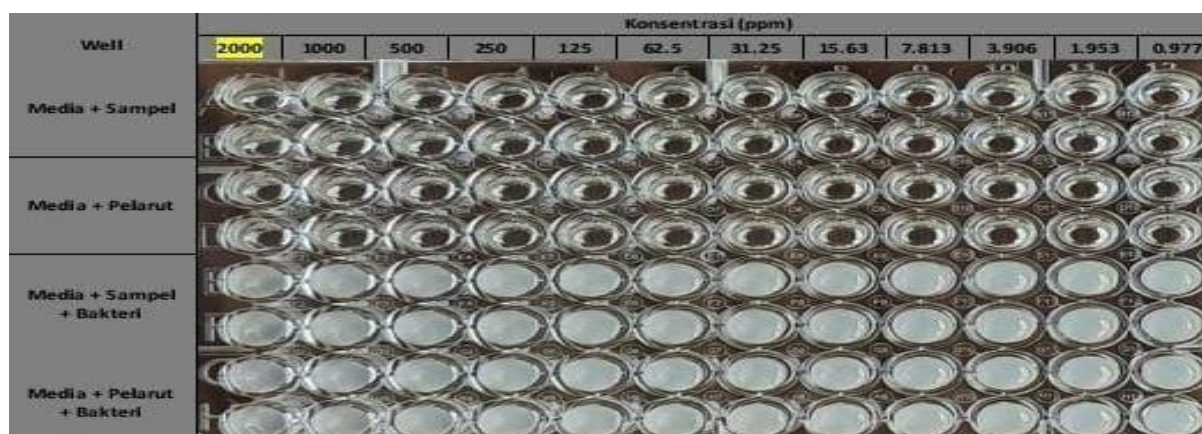
Gambar 7. Hasil Spektrometri massa

Uji antibakteri metode dilusi

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode mikrodilusi yang merupakan metode standar dan akurat untuk menentukan aktivitas senyawa antimikroba terhadap pertumbuhan bakteri. Metode ini digunakan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), yaitu kadar terendah dari senyawa uji yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pengukuran kuantitatif dilakukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm yang merupakan panjang gelombang standar untuk mengukur densitas optik suspensi bakteri. Apabila hasil yang diperoleh keruh maka bahan uji tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan apabila hasil yang diperoleh bening maka bahan uji dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yaitu hasil media yang jernih dan tidak ditumbuhi oleh bakteri (Wiegand *et al.*, 2008).

Berdasarkan hasil analisis pengamatan terhadap konjugat kurkumin dengan asam amino isoleusin, sampel tidak terkontaminasi dan mampu menghambat terhadap bakteri *Escherichia coli* pada konsentrasi minimum 2000 ppm. Penelitian yang dilakukan oleh Singh *et al.* (2010) mendukung temuan ini, dengan menunjukkan bahwa kurkumin yang dikonjugasikan serta dimodifikasi secara struktural dengan asam amino dapat meningkatkan kelarutan dan efektivitas antibakterinya.

Well	Konsentrasi (ppm)											
	2000	1000	500	250	125	62.5	31.250	15.625	7.813	3.906	1.953	0.977
Media + Sampel	0.069	0.058	0.054	0.051	0.049	0.048	0.048	0.048	0.048	0.049	0.048	0.048
Media + Pelarut	0.047	0.048	0.050	0.049	0.049	0.048	0.048	0.048	0.048	0.047	0.049	0.046
Media + Sampel + Bakteri	0.364	0.476	0.494	0.516	0.500	0.471	0.488	0.457	0.474	0.460	0.456	0.519
Media + Pelarut + Bakteri	0.423	0.492	0.513	0.525	0.536	0.499	0.501	0.500	0.472	0.488	0.471	0.497
%Kematian Sel	21.773	5.741	5.099	2.237	7.464	6.213	2.873	9.425	-0.389	6.879	3.563	-4.378



Gambar 8. Pengujian Antibakteri *Escherichia coli*

D. Kesimpulan

Senyawa konjugat kurkumin dengan asam amino isoleusin-Boc berhasil disintesis melalui metode esterifikasi Steglich, menggunakan agen pengaktif *N,N'*-disikloheksilkarbodiimida (DCC) dan katalis 4-dimetilaminopiridina (DMAP). Pemurnian senyawa dilakukan melalui kromatografi kolom dan menghasilkan senyawa murni yang ditandai dengan munculnya satu bercak tunggal yang tajam, jelas, dan tidak menyebar pada plat. Senyawa yang sudah murni dikarakterisasi untuk

memastikan senyawa target menggunakan spektrometri massa yang menunjukkan puncak ion dengan nilai $m/z = 582,2647$ yang mendekati nilai teoritis 581,1564. Uji aktivitas antibakteri pada konsentrasi minimum 2000 ppm menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan *Escherichia coli*.

Acknowledge

Penulis mengucapkan puji dan syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, karunia dan hidayah. Sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini. Ucapan terima kasih kepada kedua orang tua, dosen pembimbing dan seluruh pihak yang telah membantu selama proses penulisan artikel.

Daftar Pustaka

- Arifian, H., Maharani, R., Megantara, S., Gazzali, A. M., & Muchtaridi, M. (2022). Amino-Acid-Conjugated Natural Compounds: Aims, Designs and Results. *Molecules* (Vol. 27, Issue 21). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27217631>
- Astuti, P., Rohama, & Budi, S. (2023). Profil kromatografi dan penentuan kadar flavonoid total fraksi n-Heksan daun Kalangkala (*Litsea angulata* Bl) menggunakan spektrofotometri UV-Vis. *Journal of Pharmaceutical Care and Sciences*, 3(2), 30–41.
- Hashim, S., Beh, H. K., Hamil, M. S. R., Ismail, Z., & Abdul Majid, A. M. S. (2016). High-performance thin-layer chromatography method development, validation, and simultaneous quantification of four compounds identified in standardized extracts of *Orthosiphon stamineus*. *Pharmacognosy Research*, 8(4), 238–243. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.188872>
- Kaklamanos, G., Aprea, E., & Theodoridis, G. (2020). Mass spectrometry: Principles and instrumentation. In D. B. Rodriguez-Amaya & J. M. Amaya-Farfan (Eds.), *Chemical analysis of food* (2nd ed., pp. 525–547). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813266-1.00011-5>
- Najmah, N., Ridwan, A., Idayanti, T., Emelda, E., Dwijastuti, N. M. S., Setianingtyas, D., Putra, S. P., Krihariyani, D., Aini, A., & Parisihni, K. (2024). *Pengantar mikrobiologi*. CV. Eureka Media Aksara
- Ni, J., Zhang, Y., Zhai, S., Xiong, H., Ming, Y., & Ma, Y. (2024). Preparation of valine-curcumin conjugate and its in vitro antibacterial and antitumor activity and in vivo biological effects on American eels (*Anguilla rostrata*). *Fish and Shellfish Immunology*, 149. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109615>
- Parvathy, K. S., Negi, P. S., & Srinivas, P. (2010). Curcumin-amino acid conjugates: Synthesis, antioxidant and antimutagenic attributes. *Food Chemistry*, 120(2), 523–530. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.047>
- Pereira, S. V., Colombo, F. B., & de Freitas, L. A. P. (2016). Ultrasound influence on the solubility of solid dispersions prepared for a poorly soluble drug. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.10.022>
- Riyanto, A., Aulia, M., Asni, N., Devi Eka Putri, S., Dewi Rukmana, M., Studi Analis Kimia, P., & Kimia Analis Caraka Nusantara, A. (2024). Eksplorasi Potensi Pigmen dalam

Daun Pandan (*Pandanus odoratissimus*) melalui Kromatografi Kolom. *Journal of Polymer Chemical Engineering and Technology*, 2(1), 37–42. <https://doi.org/10.52330/jpcet.v2i1.316>

Saputra, R. R. (2022). *Aplikasi Instrumen Spektroskopi FTIR dan Spektrometri Massa di Dunia Kesehatan*.

Singh, R. K., Rai, D., Yadav, D., Bhargava, A., Balzarini, J., & De Clercq, E. (2010). Synthesis, antibacterial and antiviral properties of curcumin bioconjugates bearing dipeptide, fatty acids and folic acid. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(4), 1078–1086. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.12.002>

Susanti, I., Pratiwi, R., Rosandi, Y., & Hasanah, A. N. (2024). Separation Methods of Phenolic Compounds from Plant Extract as Antioxidant Agents Candidate. *Plants*, 13(7), 965. <https://doi.org/10.3390/plants13070965>