

**SENYAWA KOLESTAN DARI EKSTRAK KLOOROFORM KULIT BATANG
TUMBUHAN *Toona sinensis* (A.Juss) Roem dan UJI BIOINSEKTISIDA**

**CHOLESTAN COMPOUND IN CHLOROFORM EXTRACT of *Toona sinensis*
(A.Juss) Roem and BIOINSECTICIDAL TEST**

Winda Eka Ari Putri* dan Nurul Hidajati

Jurusan Kimia FMIPA-Universitas Negeri Surabaya

**e-mail : ariputri88@yahoo.co.id*

Abstrak. *Toona sinensis* (A.Juss) Roem merupakan salah satu spesies tumbuhan genus *Toona* dan famili *Meliaceae* yang banyak tumbuh di daerah subtropis dan tropis. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan struktur molekul senyawa metabolit sekunder dari ekstrak kloroform kulit batang tumbuhan *Toona sinensis* (A.Juss) Roem. Penentuan struktur molekul dilakukan dengan metode isolasi dan identifikasi. Isolasi dimulai dengan ekstraksi serbuk kering kulit batang tumbuhan tersebut dengan pelarut kloroform. Ekstrak kloroform difraksinasi menggunakan metode Kromatografi Cair Vakum (KCV), Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG), dan selalu dimonitor dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Identifikasi isolat dilakukan melalui analisis menggunakan spektroskopi UV-Vis, IR, dan GC-MS. Dan hasilnya adalah suatu senyawa golongan kolestan yaitu 4-metil-kolest-24-en-3-ol. Uji bioinsektisida pada ekstrak kloroform kulit batang tumbuhan Suren (EKS) terhadap ulat grayak memberikan nilai LC_{50} untuk 24, 48, dan 72 jam setelah pemaparan berturut-turut untuk ekstrak adalah 1373,013; 614,605 dan 235,803 mg/L. Sedangkan untuk isolat (IKS) adalah 151,937; 81,899 dan 47,241 mg/L.

Kata kunci : *Toona sinensis*.(A.Juss) Roem, kolestan, bioinsektisida

Abstract. *Toona sinensis* (A.Juss) Roem is one of plant species in *Toona* genus and *Meliaceae* family which are growth in subtropical and tropical area. The purpose of this research is to determine the structure of secondary metabolite contained in chloroform extract of *Toona sinensis* (A.Juss) Roem's stem bark Determination of molecular structure was done using isolation and identification methods. Isolation process was initiated with extraction on dried powder of stem bark of the plant with chloroform. Chloroform extract then was fractionated by Vacuum Liquid Chromatography (VLC), Gravitational Column Chromatography (GCC) and always monitored by Thin Layer Chromatography (TLC). Identification process was analyzed by spectroscopic data including UV-Vis, IR, and GC-MS. And it have been obtained a cholestan group, namely 4-metil-cholestan-24-en-3-ol. Result of extract insecticide (EKS) showed the LC_{50} value for 24, 48, and 72 hours respectively were 1373,013; 614,605 and 235,803 mg/L And isolate insecticide (IKS) LC_{50} value were 151,937; 81,899 and 47,241 mg/L.

Key words : *Toona sinensis*.(A.Juss) Roem, cholestan, bioinsecticide

PENDAHULUAN

Genus *Toona* merupakan famili *Meliaceae* dengan jumlah lebih dari 100 spesies yang tumbuh di daerah subtropis dan tropis, termasuk di Indonesia, tumbuh dalam bentuk pepohonan atau tanaman berkayu

tumbuhan suren (*Toona sinensis* (A.Juss) Roem) merupakan salah satu spesies dari famili *Meliaceae* genus *Toona*. Pada tumbuhan tersebut kemungkinan terdapat senyawa bioinsektisida. Pada penelitian sebelumnya suren atau *Toona sinensis*

(A.Juss) Roem, pada bagian daun [1], bunga [2], dan kulit batangnya [3] sering digunakan sebagai pestisida nabati dan merupakan bahan alam yang potensial dikembangkan menjadi antikanker ovarium, dalam penelitian sebelumnya ini ditelaah kandungan senyawa kimianya. Hasil penepisan fitokimia simplisia daun suren menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid, tanin dan steroid / triterpenoid [1].

Penelitian fitokimia sebelumnya terhadap spesies *Toona* telah menemukan senyawa triterpen dan fenolik. Sebanyak 15 senyawa, yaitu metal galat, asam galat, kaempferol, kuersitrin, kuersitrin, rutin, kaempferol-glukosida, katekin, epikatekin, asam stearat, asam palmitat, β -sitosterol, stigmasterol, β -sitosteril-glukosida dan stigmasteril-glukosida diisolasi dan diidentifikasi dari tumbuhan *T. sinensis* dan juga ada 7 senyawa polifenol menggunakan absorbansi UV, yaitu katekin, epikatekin, metal galat, rutin, asam galat, kuersitrin, dan kaempferol. Beberapa penelitian juga mengindikasikan bahwa katekin dan polifenol yang terdapat pada buah, sayur, teh, *T. sinensis*, dan anggur merah mempunyai sifat profilaktik yang sangat cocok dengan kesehatan manusia. Menurut beberapa penelitian sebelumnya ada hubungan konsumsi daun *T. sinensis* dan kesehatan [4].

Berdasarkan penjelasan diatas, kelompok steroid yang dilaporkan belum banyak ditemukan pada tumbuhan suren (*Toona sinensis* (A.Juss) Roem), kecuali 2 senyawa yang biasa ditemukan pada tumbuhan *Meliaceae* lainnya, yaitu β -sitosterol dan stigmasterol. Dengan demikian, masih memiliki peluang yang besar untuk dilakukan penelitian lebih lanjut khususnya senyawa steroid lainnya dari ekstrak kloroform tumbuhan tersebut.

METODE PENELITIAN

Alat

Beberapa alat yang digunakan antara lain: seperangkat alat kromatografi kolom (KCV dan KKG). Seperangkat alat untuk kromatografi lapis tipis (KLT). Seperangkat alat untuk analisa UV-Vis merk PharmaSpec UV-1700 Shimadzu, IR merk Jasco FT IR-5300 dan GC-MC merk Shimadzu QP 2010.

Bahan

Pada penelitian ini digunakan metode eksperimen dengan menggunakan pelarut yang digunakan untuk ekstraksi, isolasi menggunakan kromatografi kolom (KCV dan KKG), dan kromatografi lapis tipis adalah pelarut-pelarut teknis yang sudah didestilasi (heksana, etil asetat, dan metanol) maupun pelarut organik p.a seperti kloroform, sedangkan untuk keperluan rekristalisasi digunakan pelarut organik p.a seperti metanol. Penyemprot atau penampak noda KLT-analisis dalam penelitian ini digunakan pelarut Lieberman-Burchard (asam sulfat pekat dalam etanol 5%). Fasa diam untuk kromatografi cair vakum (KCV) menggunakan Si gel Merck 60 GF₂₅₄, kromatografi kolom gravitasi (KKG) menggunakan Si gel Merck 60, dan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan pelat alumunium Si gel Merck Kieselgel 60 F₂₅₄, 0,25 mm, 20 x 20 cm. Dan bahan tumbuhan berupa kulit batang dari suren (*Toona sinensis* (A.juss) Roem) dari UPT TAHURA R. Soeryo Cangar Malang. Tumbuhan ini telah diidentifikasi olah staf Herbarium LIPI, Purwodadi, Pasuruan dan spesimennya disimpan di Herbarium tersebut. Serta ulat grayak (*Spidoptera litura*) ulat grayak yang berasal dari hasil perbanyakan di laboratorium hama BALITTAS Malang. Ulat grayak yang digunakan adalah larva instar ke-3.

Prosedur Penelitian

Ekstraksi dan isolasi

Serbuk halus kulit batang tumbuhan suren (3kg) dimaserasi dengan pelarut kloroform selama 24 jam dan dilakukan sebanyak 5 kali. Kemudian dievaporasi pada tekanan rendah dan diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental dipisahkan melalui Kromatografi Cair Vakum (KCV) dengan menggunakan eluen campuran yaitu berupa campuran *n*-heksana dan etil asetat dengan tingkat kepolaran yang terus meningkat (H : E = 100 : 0 sampai dengan H : E = 0 : 100). Penggabungan fraksi-fraksi tersebut atas dasar analisis KLT menghasilkan 3 fraksi utama, yakni fraksi A (25-45); fraksi B (80-130); dan fraksi C (135-140; 150; 155-170). Pada fraksi A yakni fraksi (25-45) dilakukan proses rekristalisasi dengan menggunakan pelarut kloroform dan

metanol. Sementara itu, fraksi B atau gabungan fraksi 80-130 yang memiliki kesamaan harga Rf pada plat KLT dipisahkan lebih lanjut dengan menggunakan Kromatografi Kolom Gas (KKG) dengan menggunakan campuran eluen *n*-heksan dan etil asetat dengan perbandingan H/E = 9,5 / 0,5. Berdasarkan analisis KLT dan pengamatan terhadap 40 fraksi maka dilakukan penggabungan pada fraksi 2-9 yang menunjukkan harga Rf yang relatif sama. Selanjutnya isolat yang telah dihasilkan diidentifikasi dengan spektroskopi UV-Vis, inframerah (IR) dan GC-MS.

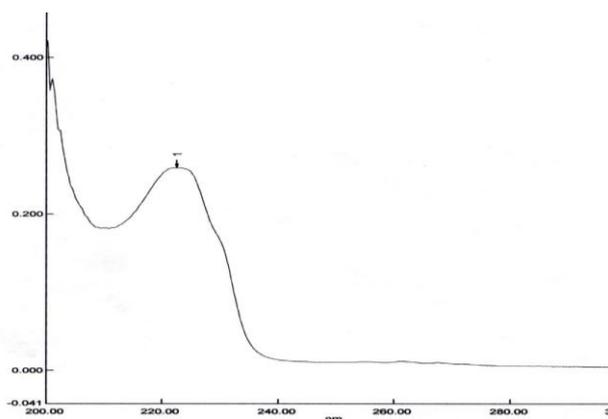
Uji bioinsektisida

Pada uji bioinsektisida ekstrak kloroform dan isolat hasil isolasi dari ekstrak kloroform kulit batang tumbuhan *Toona sinensis* (A. Juss) Roem dibuat larutan ujinya. Untuk ekstrak dibuat variasi konsentrasi 0; 100; 200; 400; 800; dan 1600 mg/L. Sedangkan untuk isolat dibuat variasi konsentrasi 0; 10; 20; 40; 80; dan 160 mg/L. Ulat grayak instar 3 dicelupkan ke dalam larutan uji, dimasukkan ke dalam gelas plastik (masing-masing 15 ekor). Daun jarak kepyar yang telah dipotong dengan ukuran 3 x 3 cm dicelupkan ke dalam larutan uji \pm 5 menit, kemudian diangin-anginkan selama \pm 10 menit, selanjutnya dimasukkan ke dalam gelas plastik yang berisi ulat grayak. Diamati selama 3 hari untuk menghitung jumlah ulat grayak yang mati setelah pemberian perlakuan daun jarak kepyar dengan variasi konsentrasi. Pengulangan dilakukan 3 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

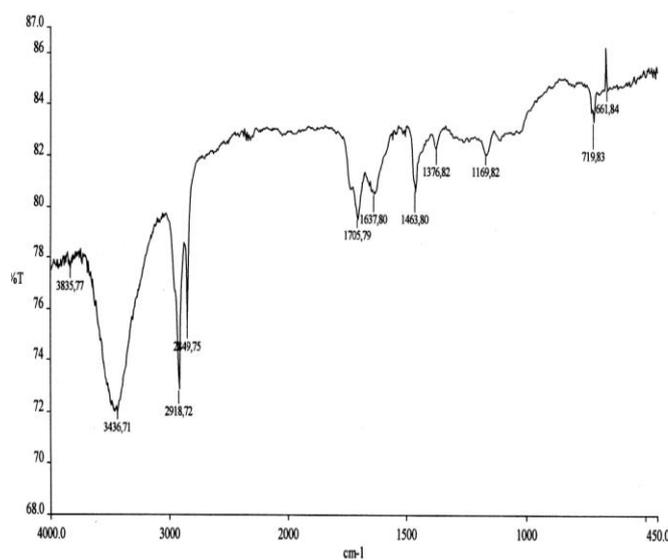
Identifikasi senyawa

Diperoleh serbuk putih seberat 37 mg dari fraksi A. Isolat yang dihasilkan dianalisis dengan spektroskopi UV-Vis, IR, dan GC-MS. Data spektroskopi (UV-Vis, IR, dan GC-MS) untuk senyawa isolat dijelaskan sebagai berikut. Hasil pengukuran spektrum UV-Vis isolat dapat dilihat pada Gambar 1 menunjukkan adanya serapan pada daerah panjang gelombang maksimum 222 nm. menunjukkan terjadinya transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa ini mengandung kromofor ikatan rangkap tak terkonjugasi (*unconjugated double bond*) (C = C).



Gambar 1. Spektrum UV-Vis Isolat

Sementara itu, spektrum IR senyawa isolat seperti terlihat pada gambar 2, menunjukkan sejumlah serapan ν_{maks} pada 3436,7 cm^{-1} menggambarkan adanya gugus (OH) yang membentuk ikatan hidrogen. Adanya vibrasi ulur C-H pada 2918,7 cm^{-1} dan 2849,75 cm^{-1} . Adanya vibrasi ulur C=O pada 1705,7 cm^{-1} . Adanya vibrasi ulur C=C pada 1637,8 cm^{-1} . Pada puncak daerah 1463,8 cm^{-1} dan 1376,8 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi tekuk C-H, serta vibrasi ulur C-O yang puncaknya terletak pada daerah sidik jari 1169,8 cm^{-1} .



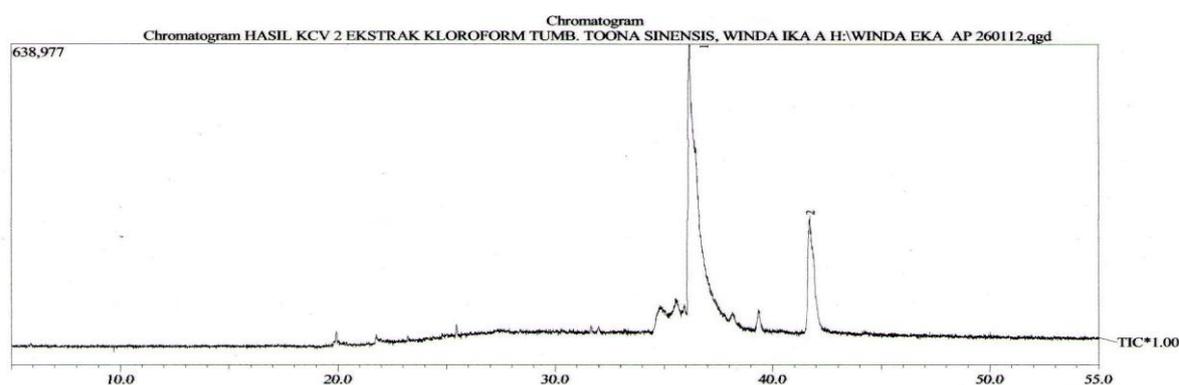
Gambar 2. Spektrum IR Isolat

Tabel 1.:Perbandingan Absorpsi spektrum IR Senyawa Hasil Isolasi

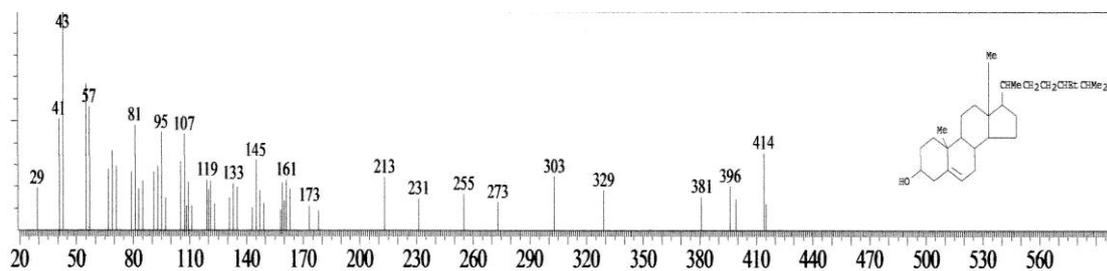
Daerah absorpsi (cm ⁻¹) senyawa hasil isolasi		Gugus fungsi
Isolat	4-metil-kolest-24-en-3-ol	
3436,7	3417,8	OH
2918,7	3001,2	CH ₃
2846	2916,3	CH ₂
1683	1658,7	C=C
1462	1296,1	C-O

Berdasarkan komparasi data spektroskopi serapan IR ternyata senyawa isolat memiliki kemiripan dengan 4-metil-kolest-24-en-3-ol sehingga dapat diduga isolat hasil isolasi sebagai senyawa 4-metil-kolest-24-en-3-ol.

Analisis selanjutnya dengan menggunakan instrumen GC-MS memberikan profil kromatogram seperti terlihat pada gambar 3.



Gambar 3. Kromatogram GC isolat



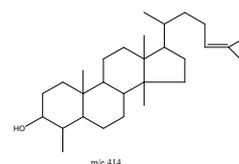
Gambar 4. Spektrum MS Isolat

Dari kromatogram GC-MS dapat diketahui bahwa pada isolat tersebut mengandung senyawa yang dominan pada puncak ke-1, berdasarkan pada puncak yang muncul. Hal ini menunjukkan bahwa isolat hasil isolasi masih belum murni karena masih ada pengotor yang belum terpisahkan. Namun demikian, pengotor ini dapat diabaikan dalam keperluan analisis selanjutnya.

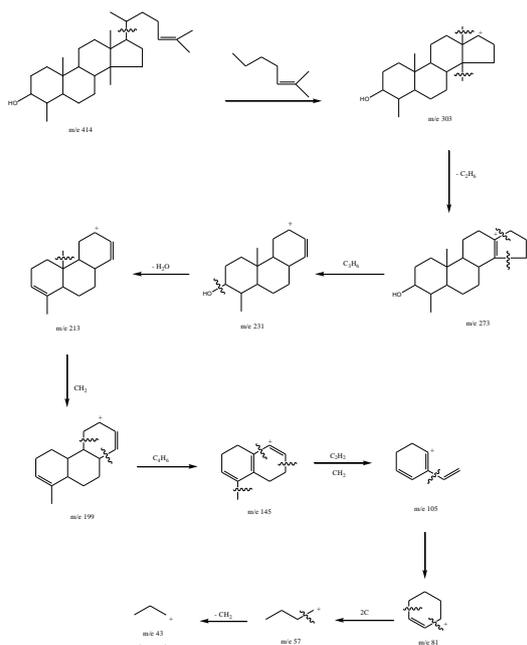
Puncak nomor 1 yang disajikan pada gambar 4 merupakan puncak yang paling dominan dengan waktu retensi 37,025 dan kadar 74,89 % dengan massa molekul relatif $m/e = 414$. Dengan puncak-puncak ion molekul pada m/z yaitu : 414 (M^+), 396, 381, 329, 303, 273, 255, 231,

213, 173, 161, 145, 133, 119, 107, 95, 81, 57, 43, 41, 29.

Berdasarkan gambar 4, spektrum senyawa puncak nomor 1 merupakan senyawa steroid golongan kolestan yaitu 4-metil-kolest-24-en-3-ol, dengan rumus molekul $C_{29}H_{50}O$. Pola fragmentasi senyawa disajikan pada gambar 6.



Gambar 5. Senyawa 4-metil-kolest-24-en-3-ol



Gambar 6. Pola fragmentasi senyawa dari Isolat

Uji Bioinsektisida Ekstrak Kloroform Suren (EKS) dan Isolat Dari Ekstrak Kloroform Suren (IKS) Terhadap LC₅₀ Pada Ulat Grayak

Pendugaan nilai toksisitas insektisida (EKS dan IKS) terhadap serangga uji ulan grayak (*Spodoptera littura*) diukur dengan nilai LC₅₀, yaitu satu konsentrasi atau dosis yang dapat menyebabkan kematian 50% serangga uji yang diuji [5]. Analisis probit digunakan dalam pengujian biologis untuk mengetahui respon subyek yang diteliti oleh adanya stimuli dalam hal ini mengetahui respon berupa mortalitas (Umniyati, 1990 dalam Negara, 2003). Penentuan LC₅₀ dihitung dengan analisis probit menggunakan program *Minitab 14 for Windows*.

Tabel 2. Data pengamatan ulat grayak yang mati karena perlakuan

Konsentrasi (mg/L)	Jumlah Larva	Jumlah larva mati setelah perlakuan		
		24 jam	48 jam	72 jam
0	15	0	0	0
100	15	1	4	7
200	15	2	6	9
400	15	4	7	10
800	15	5	10	13
1600	15	8	12	15

Data pengamatan hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan jumlah ulat grayak yang mati dengan ekstrak kloroform tumbuhan *Toona sinensis* (A.Juss) Roem seperti yang terlihat pada tabel 2.

Dari data pengamatan yang tersaji dalam tabel 2, dapat dihitung persen (%) mortalitasnya, dengan rumus :

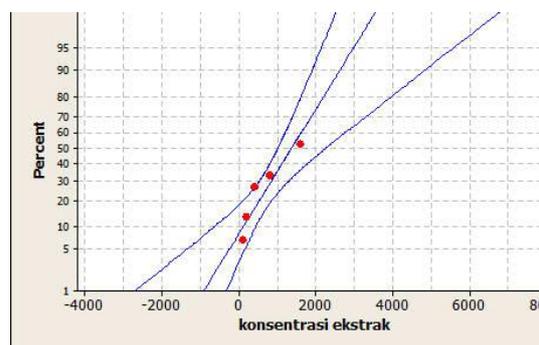
$$P = \frac{X}{Y} \times 100\%$$

dimana x = jumlah larva yang mati, dan y = jumlah larva yang diamati. Diperoleh persen mortalitas ulat grayak karena perlakuan, tersaji dalam tabel 3.

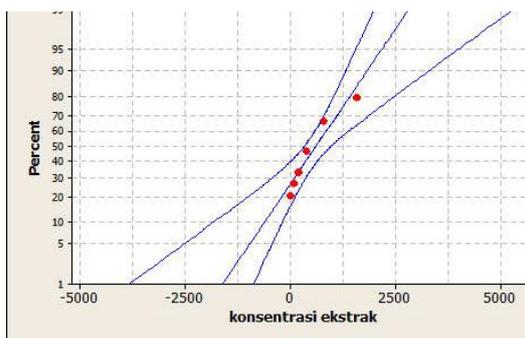
Tabel 3. Data pengamatan ulat grayak yang mati karena perlakuan dalam persen

Konsentrasi (mg/L)	Jumlah Larva	% Mortalitas		
		24 jam	48 jam	72 jam
0	15	0	0	0
100	15	6,67	6,67	46,67
200	15	13,33	40	66,67
400	15	26,67	46,67	66,67
800	15	33,33	66,67	73,33
1600	15	53,33	86,67	86,67

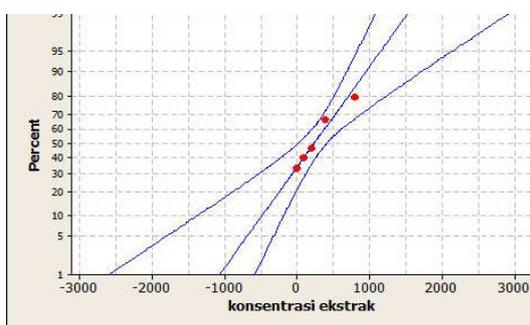
Nilai LC₅₀ tersebut dihitung untuk jumlah total ulat grayak yang mati. Berikut ini akan disajikan grafik hubungan konsentrasi ekstrak kloroform suren (EKS) dan mortalitas ulat grayak dengan analisis probit selama 24, 48, dan 72 jam secara berturut-turut.



Gambar 7. Grafik hubungan konsentrasi EKS dan mortalitas ulat grayak dengan analisis probit selama 24 jam



Gambar 8. Grafik hubungan konsentrasi EKS dan mortalitas ulat grayak dengan analisis probit 48 jam



Gambar 9. Grafik hubungan konsentrasi EKS dan mortalitas ulat grayak dengan analisis probit 72 jam

Dari persamaan-persamaan probit yang dihasilkan didapat nilai LC_{50} , persamaan linear dan koefisien determinasi EKS selama 24, 48, dan 72 jam untuk uji bioaktivitas insektisida ekstrak kloroform kulit batang tumbuhan *Toona sinensis* (A.Juss) Roem yang dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Nilai LC_{50} , Persamaan Linear dan Koefisien Determinasi EKS selama 24, 48, dan 72 jam

Pengamatan	Koefisien determinasi	Persamaan linier	LC_{50} (mg/L)
24 jam	$R^2 = 0,9613$	$y = 3,59939 + 0,0010201x$	1373,012
48 jam	$R^2 = 0,9755$	$y = 4,35325 + 0,0010523x$	614,605
72 jam	$R^2 = 0,8028$	$y = 4,57866 + 0,0017868x$	235,803

Selanjutnya data pengamatan hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan jumlah ulat grayak yang mati dengan isolat dari ekstrak kloroform tumbuhan *Toona sinensis* (A.Juss) Roem seperti yang terlihat pada tabel 5.

Tabel 5. Data pengamatan ulat grayak yang mati karena perlakuan

Konsentrasi (mg/L)	Jumlah Larva	Jumlah larva mati setelah perlakuan		
		24 jam	48 jam	72 jam
0	15	0	0	0
10	15	1	3	4
20	15	2	5	5
40	15	3	6	9
80	15	5	9	12
160	15	7	11	14

Dari data pengamatan yang tersaji dalam tabel 5, dapat dihitung persen (%) mortalitasnya, dengan rumus :

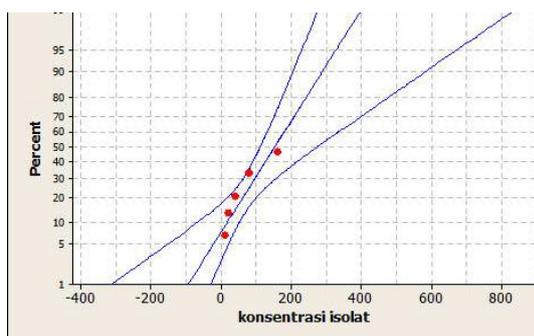
$$P = \frac{X}{Y} \times 100\%$$

dimana x = jumlah larva yang mati, dan y = jumlah larva yang diamati. Diperoleh persen mortalitas ulat grayak karena perlakuan, tersaji dalam tabel 6.

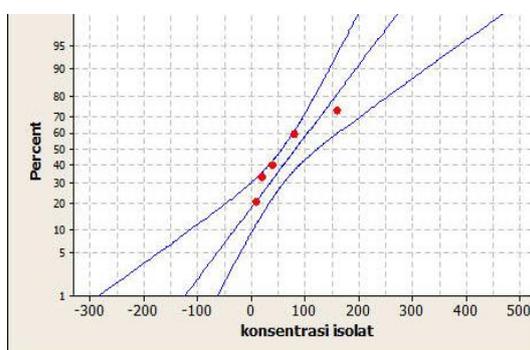
Tabel 6. Data pengamatan ulat grayak yang mati karena perlakuan dalam persen

Konsentrasi (mg/L)	Jumlah Larva	% Mortalitas		
		24 jam	48 jam	72 jam
0	15	0	0	0
10	15	6,67	20	26,67
20	15	13,33	33,33	33,33
40	15	20	40	60
80	15	33,33	60	80
160	15	46,67	73,33	93,33

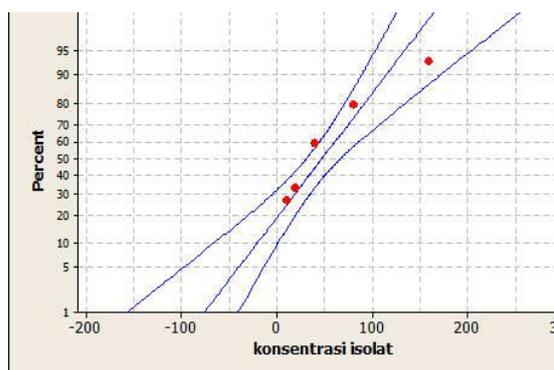
Nilai LC₅₀ tersebut dihitung untuk jumlah total ulat grayak yang mati. Berikut ini akan disajikan grafik hubungan konsentrasi isolat hasil isolasi dari ekstrak kloroform suren (IKS) dan mortalitas ulat grayak dengan analisis probit selama 24, 48, dan 72 jam secara berturut-turut.



Gambar 10. Grafik hubungan konsentrasi IKS dan mortalitas ulat grayak dengan analisis probit selama 24 jam



Gambar 11. Grafik hubungan konsentrasi IKS dan mortalitas ulat grayak dengan analisis probit selama 48 jam



Gambar 12. Grafik hubungan konsentrasi IKS dan mortalitas ulat grayak dengan analisis probit selama 72 jam

Dari persamaan-persamaan probit yang dihasilkan didapat nilai LC₅₀, persamaan linear dan koefisien determinasi EKS selama 24, 48, dan 72 jam untuk uji bioaktivitas insektisida ekstrak kloroform kulit batang tumbuhan *Toona sinensis* (A.Juss) Roem yang dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Nilai LC₅₀, Persamaan Linear dan Koefisien Determinasi IKS selama 24, 48, dan 72 jam

Pengamatan	Koefisien determinasi	Persamaan linier	LC ₅₀ (mg/L)
24 jam	R ² = 0,9680	y = 3,56119 + 0,0094698x	151,937
48 jam	R ² = 0,9861	y = 4,07040 + 0,0113506x	81,899
72 jam	R ² = 0,9847	y = 4,10524 + 0,0189404x	47,241

Pada pengamatan secara visual terhadap perilaku makan dan gerak ulat grayak terhadap masing-masing perlakuan EKS, nampak berbeda dengan kontrol. Pada masing-masing perlakuan EKS terhadap ulat grayak mengalami gejala keracunan yang ditandai dengan kehilangan kegesitan, aktivitas makan menurun, warna tubuh menjadi coklat kehitaman, ukuran tubuh menyusut dari ukuran normal, dan akhirnya ulat grayak mati dengan tubuh mengering, seperti yang terlihat pada gambar 13. Gejala

keracunan diduga karena terganggunya sistem syaraf dan sistem metabolisme



(a) (b)

Gambar 13. Larva ulat grayak (a) hidup (b) mati

Suatu insektisida dikatakan efektif apabila mampu mematikan minimal 80%. Larutan EKS dapat dikatakan efektif dalam mematikan ulat grayak pada konsentrasi 706,822 mg/L. Dan larutan IKS dapat dikatakan efektif dalam mematikan ulat grayak pada konsentrasi 91,676 mg/L.

KESIMPULAN

Beberapa kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian ini adalah suatu senyawa kolestan telah diisolasi dari ekstrak kloroform kulit batang tumbuhan suren (*Toona sinensis* (A.Juss) Roem), yaitu 4-metil-kolest-24-en-3-ol. Uji bioinsektisida pada ekstrak kloroform kulit batang tumbuhan suren (EKS) terhadap ulat grayak memberikan nilai LC_{50} untuk 24, 48, dan 72 jam setelah perlakuan berturut-turut adalah 1373,013; 614,605 dan 235,803 mg/L, untuk isolat (IKS) adalah 151,937; 81,899 dan 47,241 mg/L.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sesilia, E. P., Fidrianny, L., dan Nawawi, A. 2006. *Telaah kandungan kimia daun suren (Toona sinensis (Adr. Juss.) M. J. Roemer)*. Sekolah Farmasi ITB. <http://bahan-alam.fa.itb.ac.id>.
2. Fajar, Bunga. 2006. Isolasi dan Uji Sifat Pestisida Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Diklorometan Bagian Bunga Tumbuhan *Toona sinensis* (Meliaceae). *Skripsi yang dipublikasikan*.
3. Rusnaldi, T. 2006. Isolasi dan Uji aktivitas Pestisida Senyawa Metabolit Sekunder Fraksi Diklorometan kulit Batang Tumbuhan *Toona sinensis*. *Skripsi yang dipublikasikan*. <http://digilib.upi.edu/pasca/available/etd-0328107-132529/>.
4. Hsieh, Ming-Mu, Chung-Yi Chen, Shu-Ling Hsieh, Sung-Fei Hsieh, Pak-Hing Ben Lee, Cheng-Ta Li and Tian-Jye Hsieh. 2006. "Separation of Phenols from the Leaves of *Toona sinensis* (Meliaceae) by Capillary Electrophoresis," *Journal of the Chinese Chemical Society*, 53, pp. 1203-1208.
5. Negara, Abdi. 2003. Penggunaan Analisis Probit untuk Pendugaan Tingkat Kepekaan Populasi *Spodoptera exigua* terhadap Deltrametrin di Daerah Istimewa Yogyakarta. *Informatika Pertanian*. Volume 12. <http://www.litbang.deptan.go.id/warta-ip/pdf-file/abdinegara-12.pdf>.