

Inhibition Activity of Indonesian Zingiber zerumbet Leaves Extract on α -Glucosidase Enzyme

Andi Suhendi¹, Dedi Hanwar¹✉, Broto Santoso¹, Subhan R Abidi¹

¹ Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Indonesia

✉ dedi.hanwar@ums.ac.id

Abstract

Previous research stated that Zerumbon and kaempferol compounds of Zingiber zerumbet and the extract had inhibition activity of enzyme α -glucosidase. Therefore, leaves of zingiber zerumbet thought to have activity as the inhibition of α -glucosidase enzymes. The purposes of this study were to determine the inhibition activity of α -glucosidase enzymes and inhibition mechanism. P-nitrophenol which was formed from the reaction between enzymes with p-nitrofenil- α -D-glucopyranose (PNPG) was measured by microplate reader. Enzyme inhibition performed using various concentrations of the extract and acarbose as a positive control. Test of enzyme kinetics using 4 series substrate concentration p-nitrofenil- α -D-glucopyranose (PNPG). The result showed that ethanol extract of Zingiber zerumbet have inhibition activity of enzyme α -glucosidase with IC₅₀ value was 22.21±0.20 μ g/mL. Meanwhile, the IC₅₀ value of acarbose was 47.41±2.37 μ g/mL. The inhibition activity of extract better compared than acarbose. Due to value of $K_{ap} > K$ and $V_{ap} < V$, the type inhibition of enzymes by extracts was a mixed type.

Keywords: leaves extract; Zingiber zerumbet; α -glucosidase; inhibition

Aktivitas Penghambatan Enzim α -Glucosidase Ekstrak Daun Zingiber zerumbet

Abstrak

Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa senyawa zerumbon dan kaempferol dari Zingiber zerumbet dan ekstraknya memiliki aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase. Oleh karena itu, daun zingiber zerumbet diduga memiliki aktivitas sebagai penghambat enzim α -glukosidase. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase dan mekanisme penghambatannya. P-nitrofenol yang terbentuk dari reaksi antara enzim dengan p-nitrofenil- α -D-glukopiranososa (PNPG) diukur dengan microplate reader pada panjang gelombang 405 nm. Penghambatan enzim dilakukan dengan menggunakan berbagai konsentrasi ekstrak dan acarbose sebagai kontrol positif. Uji kinetika enzim menggunakan 4 seri konsentrasi substrat p-nitrofenil- α -D-glucopyranose (PNPG). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun Zingiber zerumbet memiliki aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase dengan nilai IC₅₀ sebesar 22,21±0,20 μ g/mL. Sedangkan nilai IC₅₀ acarbose adalah 47,41±2,37 μ g/mL. Aktivitas penghambatan ekstrak lebih baik dibandingkan acarbose. Mekanisme penghambatan merupakan tipe campuran karena nilai $K_{ap} > K$ dan $V_{ap} < V$.

Kata kunci: Ekstrak daun; Zingiber zerumbet; α -glucosidase; inhibisi

1. Pendahuluan

Diabetes mellitus (DM) merupakan suatu penyakit atau gangguan metabolisme kronis dengan multi etiologi yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah disertai dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lipid dan protein sebagai akibat insufisiensi fungsi insulin. Insufisiensi fungsi insulin dapat disebabkan oleh gangguan atau defisiensi produksi insulin oleh sel-sel beta Langerhans kelenjar pankreas, atau disebabkan oleh kurang responsifnya sel-sel tubuh terhadap insulin [1]. Pada tahun 2012 sebanyak $\pm 1,5$ juta manusia meninggal karena diabetes mellitus, sedangkan pada tahun 2014 jumlah penderita diabetes mellitus global diperkirakan sebanyak 9% dengan usia lebih dari 18 tahun. Sebanyak 80% lebih kematian pada penderita diabetes mellitus yang terjadi terdapat pada berpenghasilan rendah [2].

Penyakit diabetes mellitus perlu terapi non obat dan obat [1]. Terapi pengobatan diabetes mellitus telah banyak dikembangkan. Salah satu mekanisme pengobatan diabetes mellitus dengan cara menginhibisi aktivitas enzim α -glukosidase. Enzim α -glukosidase bekerja menghidrolisis oligosakarida dan disakarida yang terdapat pada dinding usus halus. Jika enzim α -glukosidase dihambat, maka dapat menurunkan pencernaan karbohidrat kompleks dan absorbsinya, sehingga menurunkan kadar glukosa postprandial [3]. Tidak sedikit terapi pengobatan diabetes militus yang beredar di pasaran menimbulkan efek samping. Salah satu obat antidiabetes yaitu akarbose, obat ini mempunyai efek samping flatulensi, diare, mual, perut kembung dan nyeri [1]. Pemilihan obat tradisional sebagai pengobatan diabetes mellitus menjadi cara untuk meminimalkan efek samping dari pengobatan dengan bahan kimia [4].

Tanaman obat tradisional yang sering digunakan sebagai obat adalah lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet*). Menurut penelitian Ajish et al., senyawa zerumbon dan kaempferol yang terkandung dalam rimpang lempuyang gajah mempunyai aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase [5]. Daun lempuyang gajah mengandung senyawa zerumbon dan kaempferol [6].

Pada penelitian ini, pemilihan daun lempuyang gajah sebagai sampel uji karena persamaan kandungan senyawa zerumbon dan kaempferol yang ada dalam rimpang. Pada pengujian inhibisi aktivitas enzim α -glukosidase dilakukan secara invitro. Uji invitro merupakan metode pendekatan awal sebelum uji invivo, selain itu efisien waktu, material dan kesadaran penggunaan makhluk hidup sebagai bahan uji coba [7]. Oleh karena itu tujuan dari penelitian ini dilakukan untuk mengetahui seberapa besar ekstrak etanol daun lempuyang gajah dalam menginhibisi aktivitas enzim α -glukosidase dan menghitung nilai IC_{50} serta menentukan tipe inhibisinya.

2. Metode

2.1. Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas (Pyrex), mikropipet (Socorex), microplatereader (BIOTEK Elx 800), sentrifugator (Mini Spin), mikroplate (iwaki), neraca analitik (AND GR-202), pH meter (Eutech instrument), dan inkubator (Memmert). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun lempuyang gajah yang didapat dari Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, enzim α -glukosidase dari *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich), buffer pH 6,8 dan 4, p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (Sigma-Aldrich), 4-nitrofenol (Sigma-Aldrich), akarbose (glucobay), bovin serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich), Kalium Dihidrogenfosfat (Merck), akuades p.i., natrium bikarbonat (merck), dan Dimetilsulfoksida (DMSO)(merck).

2.2. Metode

a. Larutan ekstrak etanol daun lempuyang gajah

Ekstrak etanol daun lempuyang gajah didapat dari Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Larutan ekstrak etanol daun lempuyang gajah dibuat dengan melarutkan 400 mg ekstrak dengan DMSO hingga 5,0 mL, sehingga didapatkan konsentrasi 80000 $\mu\text{g/mL}$ yang digunakan sebagai stok. Dibuat seri konsentrasi yang diujikan 3,125; 6,250; 12,500; 25,000; dan 50,000 $\mu\text{g/mL}$.

b. Larutan p-Nitrofenol

Larutan p-Nitrofenol dibuat dengan melarutkan sebanyak 13,91 mg p-Nitrofenol dalam 10 mL larutan dapar posfat pH 6,8, didapatkan konsentrasi 10 mM. Larutan p-Nitrofenol dibuat menjadi 6 konsentrasi yaitu, 15, 30, 45, 60, 75, dan 90 μM [8].

c. Larutan akarbosa

Tablet akarbosa (glukobay) 100 mg yang digunakan sebagai kontrol positif. Dibuat seri konsentrasi yang diujikan 3,125; 6,250; 12,500; 25,000; dan 50,000 $\mu\text{g/mL}$.

Tabel 1. Pengujian inhibisi enzim α -glukosidase oleh ekstrak etanol daun lempuyang gajah dan akarbosa [9]

Larutan	Blangko	K	S ₀	S ₁
Sampel (μL)	-	-	1	1
DMSO (μL)	1	1	-	-
Dapar pH 6,8 (μL)	49	49	49	49
Substrat (5 mM)	25	25	25	25
Inkubasi 37°C selama 5 menit				
Dapar fosfat pH 6,8 (μL)	25	-	25	-
Enzim (0,05 U/mL)	-	25	-	25
Inkubasi 37°C selama 15 menit				
Na ₂ CO ₃ (μL)	100	100	100	100
Volume total 1 well (μL)	200	200	200	200

Keterangan: Blanko = Sistem reaksi tanpa adanya ekstrak dan enzim; K = Campuran tanpa ekstrak; S₀ = Campuran tanpa enzim namun dengan ekstrak/akarbosa; S₁ = Campuran dengan enzim dan ekstrak/akarbosa

b. Kinetika inhibisi enzim

Kinetika inhibisi α -glukosidase oleh ekstrak daun lempuyang gajah dipelajari dengan menggunakan dua sistem reaksi, yaitu sistem reaksi tanpa inhibitor dan sistem reaksi dengan inhibitor. Pengujian dilakukan dengan menggunakan konsentrasi substrat (p-NPG) yang berbeda, yaitu 0,625 μM , 1,25 μM , 2,5 μM , dan 5 μM dalam dapar fosfat pH 6,8. Inhibitor yang digunakan hanya satu konsentrasi yang mendekati nilai IC₅₀. Campuran sistem reaksi sama dengan campuran pada inhibisi enzim α -glukosidase. Larutan pengujian kinetika dibaca pada absorbansi 405 nm. Sistem reaksi kinetika enzim α -glukosidase oleh ekstrak etanol daun lempuyang gajah bisa dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengujian kinetika inhibisi enzim α -glukosidase oleh ekstrak etanol daun lempuyang gajah [10]

Larutan	Tanpa inhibitor	Dengan inhibitor
Ekstrak (μL)	-	1
DMSO	1	-
Dapar pospat pH 6,8 (μL)	49	49
Substrat (μL)	25	25
Inkubasi 37 oC selama 5 menit		
Enzim (0,05 U/mL)	25	25
Inkubasi 37 oC selama 15 menit		
Na ₂ CO ₃ (μL)	100	100
Volume total 1 well (μL)	200	200

Analisis data

Perhitungan persen inhibisi enzim menggunakan rumus $= \frac{K-S}{K} \times 100$

Keterangan :

K = p-Nitrofenol kontrol tanpa sampel (kontrol-blanko)

S = p-Nitrofenol sampel uji yaitu S_1-S_0

S_1 = p-Nitrofenol sampel dengan penambahan enzim

S_0 = p-Nitrofenol sampel tanpa penambahan enzim [9]

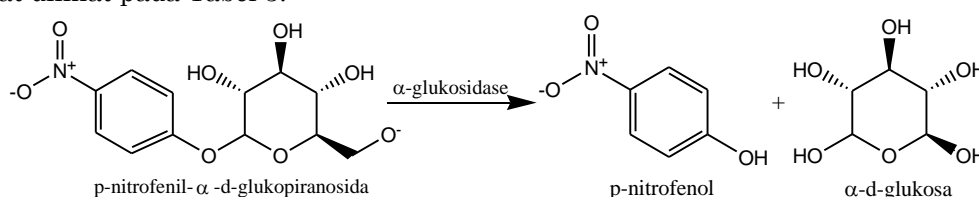
IC_{50} dihitung dari persamaan $y = a + bx$ dengan menggunakan persamaan regresi linier, konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan persen inhibisi sebagai sumbu y sehingga dapat digunakan rumus $IC_{50} = \frac{50-a}{b}$.

Penentuan jenis kinetika mekanisme inhibisi enzim α -glukosidase dengan menganalisa hasil pengujian dari hasil kurva tanpa inhibitor dan dengan inhibitor pada kurva Lineweaver-Burk, perhitungan nilai K dan V [11], [12].

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Penentuan inhibisi α -glukosidasae

Enzim α -glukosidase bereaksi dengan substrat p-NPG (p-nitrofenil- α -Dglukopiranoside) menghasilkan produk yaitu d-glukopiranosida dan p-nitrofenol (seperti disajikan pada Gambar 1). Larutan p-nitrofenol berwarna kuning dibaca absorbansinya menggunakan microplate reader dengan panjang gelombang sebesar 405 nm [13]. Warna kuning yang timbul akibat perubahan gugus kromofor, saat mengikat gula tidak memungkinkan untuk mengalami ionisasi menghasilkan ikatan rangkap terkonjugasi yang lebih Panjang. Regresi linier dari p-Nitrofenol digunakan untuk menentukan jumlah p-nitrofenol yang terbentuk oleh reaksi enzimatik. Regresi linier yang didapat adalah $y = 0,0033x + 0,0138$ dengan nilai r sebesar 0,9973. Nilai r mendekati 1 menunjukkan hubungan linieritas yang tinggi antara konsentrasi p-nitrofenol dengan hasil absorbansinya [14]. Hasil inhibisi dari ekstrak etanol daun lempuyang gajah dan akar bosa dapat dilihat pada Tabel 3.



Gambar 1. Reaksi enzimatik p-NPG (p-nitrofenil- α -Dglukopiranoside) menghasilkan produk yaitu d-glukopiranosida dan p-nitrofenol [9]

Tabel 3. Hasil pengujian inhibisi aktivitas enzim α -glukosidase oleh ekstrak etanol daun lempuyang gajah dan akar bosa (n=3)

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% Daya Inhibisi	
	Ekstrak lempuyang gajah	Akar bosa
3,125	9,56 \pm 1,3	25,46 \pm 2
6,25	15,36 \pm 2	29,08 \pm 0,4
12,5	36,35 \pm 0,6	31,83 \pm 0,65
25	53,37 \pm 0,68	40,62 \pm 2,19
50	-	50,32 \pm 0,70
IC_{50}	22,21 \pm 0,20	47,41 \pm 2,37

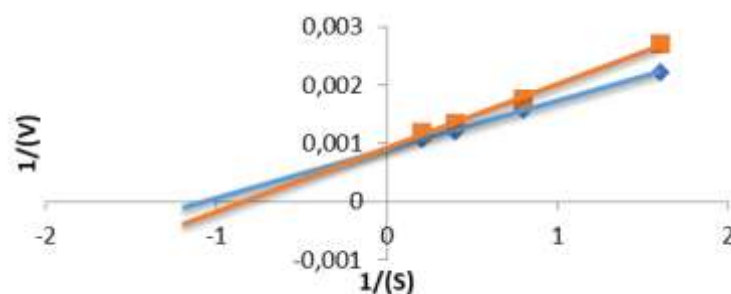
Hasil penelitian menunjukkan semakin meningkatnya konsentrasi, aktivitas inhibisi juga mengalami peningkatan karena kuantitas senyawa aktif dalam ekstrak mengalami peningkatan. Pada penelitian ini ekstrak etanol daun lempuyang gajah mempunyai aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase dengan rata-rata nilai IC_{50} sebesar $22,21 \pm 0,20$ $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak etanol daun lempuyang gajah mempunyai aktivitas inhibisi karena dalam ekstrak terdapat banyak senyawa-senyawa yang berkontribusi, antara lain yaitu senyawa zerumbon dan kaempferol.

Menurut penelitian dari Ajish et al. senyawa zerumbon dan kaempferol yang diisolasi dari rimpang lempuyang gajah terbukti mampu menghambat enzim α -glukosidase dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar $20,89 \pm 1,04$ $\mu\text{g/mL}$ dan $2,57 \pm 0,08$ $\mu\text{g/mL}$ [5]. Aktivitas ekstrak etanol daun lempuyang gajah dalam menghambat enzim α -glukosidase lebih kecil dari senyawa zerumbon dan kaempferol hasil isolasi dari rimpang lempuyang gajah. Perbedaan nilai IC_{50} ini diduga oleh keberadaan matriks nabati yang mengganggu aktivitas senyawa aktif [7]. Selain alasan tersebut, mungkin oleh kecilnya kuantitas zerumbon dan kaempferol pada ekstrak yang diuji (daun lempuyang gajah). Daun lempuyang gajah mengandung senyawa zerumbon sebesar 0,1740 %b/b dan kaempferol sebesar 0,05 %b/b [6].

Nilai IC_{50} kontrol positif diperoleh rata-rata perhitungan sebesar $47,41 \pm 2,37$ $\mu\text{g/mL}$ (seperti disajikan pada Tabel 3). Pada penelitian Ajish et al., nilai IC_{50} akarbosa sebesar $30,47 \pm 0,95$ $\mu\text{g/mL}$ [5]. Perbedaan nilai IC_{50} ini diduga oleh perbedaan enzim α -glukosidase yang digunakan. Pada penelitian ini digunakan enzim α -glukosidase yang berasal dari mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* sedangkan pada penelitian Ajish et al., tidak disebutkan asal dari enzim α -glukosidase. Selain alasan tersebut, akarbosa sebagai kontrol positif. Pada penelitian ini menggunakan tablet akarbosa (glucobay). Nilai IC_{50} ekstrak etanol daun lempuyang gajah mempunyai aktivitas lebih besar daripada kontrol positif ditandai dengan nilai IC_{50} lebih kecil. Hal ini disebabkan kandungan berbagai senyawa yang berkontribusi dalam ekstrak etanol daun lempuyang gajah sedangkan pada kontrol positif hanya senyawa tunggal.

3.2. Kinetika inhibisi enzim α -glukosidase oleh ekstrak etanol daun lempuyang gajah

Dari data di atas menunjukkan ekstrak etanol daun lempuyang gajah mempunyai aktivitas inhibisi terhadap enzim α -glukosidase, sehingga perlu diketahui tipe inhibisi ekstrak etanol daun lempuyang gajah terhadap enzim α -glukosidase. Inhibitor yang digunakan adalah ekstrak etanol daun lempuyang gajah dengan konsentrasi yang mendekati nilai IC_{50} yaitu konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$. Hasil kinetika inhibisi dari ekstrak etanol daun lempuyang gajah dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kinetika inhibisi daun lempuyang gajah yang diplotkan pada kurva Lineweaver-Burk, garis berwarna merah dengan inhibitor dan garis berwarna biru tanpa inhibitor

Pertemuan antara garis (seperti disajikan pada Gambar 2) tanpa inhibitor dan dengan inhibitor terjadi pada sumbu $x = -0,115$ dan pada sumbu $y = 0,0008$. Pola kurva Lineweaver-Burk Gambar 2 sama seperti pola kurva Lineweaver-Burk pada Illanes, yaitu tipe inhibisi campuran 1 [11]. Inhibisi campuran terjadi ketika enzim berikatan dengan substrat kemudian berikatan dengan inhibitor, maupun enzim berikatan dengan inhibitor kemudian berikatan dengan substrat [15].

Hasil pengujian mekanisme inhibisi daun lempuyang gajah didapatkan nilai K 0,924 dan nilai K_{ap} 1,219 sedangkan nilai V 1115,49 dan nilai V_{ap} 1087,40 (Tabel 4). Nilai K menunjukkan konsentrasi substrat yang dapat memberikan setengah kecepatan maksimal dari enzim dan nilai V adalah kecepatan maksimal enzim [15]. K_{AP} adalah konsentrasi substrat dengan adanya inhibitor dan K adalah konsentrasi substrat tanpa adanya inhibitor, sedangkan V_{AP} adalah kecepatan reaksi dengan adanya inhibitor dan V adalah kecepatan reaksi tanpa adanya inhibitor [11].

Tabel 4. Nilai K_m dan V enzim tanpa inhibitor dan dengan inhibitor

sistem reaksi	Nilai K	Nilai V
tanpa inhibitor	0,924	1115,499
inhibitor ekstrak 25 $\mu\text{g/mL}$	1,219	1087,403

Pola kurva Lineweaver-Burk (Gambar 1) menunjukkan tipe inhibisi campuran 1, hal ini didukung data hasil analisa nilai $K_{ap} > K$ dan nilai $V_{ap} < V$ (Tabel 4). Senyawa-senyawa dalam ekstrak diantaranya zerumbon dan kaempferol menempati sisi enzim yang berbeda dengan ikatan enzim-substrat, sehingga terjadi penurunan laju reaksi enzim-substrat dan aktivitas enzim.

4. Kesimpulan

Ekstrak daun lempuyang gajah lebih poten daripada kontrol positif, ditandai oleh nilai IC_{50} Ekstrak sebesar $22,21 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$ lebih kecil daripada IC_{50} kontrol positif sebesar $47,41 \pm 2,37$ $\mu\text{g/mL}$. Tipe inhibisi ekstrak etanol daun lempuyang gajah terhadap enzim α -glukosidase adalah inhibisi campuran 1.

Referensi

- [1] D. P. dan P. Kefarmasian, *Pedoman Pelayanan Kefarmasian pada Diabetes Melitus / Direktorat Jenderal Kefarmasian dan Alat Kesehatan*. 2019. Accessed: Sep. 13, 2022. [Online]. Available: <https://farmalkes.kemkes.go.id/2014/12/pedoman-pelayanan-kefarmasian-pada-diabetes-melitus/>
- [2] 'Diabetes'. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (accessed Sep. 13, 2022).
- [3] J. Shinde *et al.*, 'Alpha-glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto-Kakizaki (GK) rats', *Carbohydr Res*, vol. 343, no. 7, pp. 1278–1281, May 2008, doi: 10.1016/j.carres.2008.03.003.
- [4] T. A.N.S, *Tanaman Obat Tradisional 2*, Cet 11. Kanisius, 2003.
- [5] K. R. Ajish *et al.*, 'Studies on α -glucosidase, aldose reductase and glycation inhibitory properties of sesquiterpenes and flavonoids of *Zingiber zerumbet* Smith', *Nat Prod Res*, vol. 29, no. 10, pp. 947–952, 2015, doi: 10.1080/14786419.2014.956741.

- [6] A. Ghasemzadeh *et al.*, 'Variation in secondary metabolite production as well as antioxidant and antibacterial activities of Zingiber zerumbet (L.) at different stages of growth', *BMC Complement Altern Med*, vol. 16, p. 104, Mar. 2016, doi: 10.1186/s12906-016-1072-6.
- [7] Azis Saifudin, *Senyawa alam metabolit sekunder teori, konsep dan teknik pemurnian*. Deepublish, 2014. Accessed: Sep. 13, 2022.
- [8] N. Sari, 'Potensi Buah Makasar (*Brucea javanica* (L.) Merr) sebagai Inhibitor Enzim α -Glukosidase', 2010, Accessed: Sep. 13, 2022. [Online]. Available: <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/44241>
- [9] S. Sugiwati, S. Setiasih, and E. Afifah, 'Antihyperglycemic Activity Of The Mahkota Dewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff .) Boerl .] Leaf Extracts As An Alpha-Glucosidase Inhibitor', vol. 13, no. 2, pp. 74–78, 2009.
- [10] B. Loranza, 'Uji Penghambatan Aktivitas Enzim Alfa-Glukosidase Dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Dari Fraksi Teraktif Daun Buni (*Antidesma Bunius* L .)', Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, 2012.
- [11] A. Illanes, Ed., *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*, 2008th edition. Dordrecht: Springer, 2008.
- [12] M. Alfarabi, 'Kajian Antidiabetogenik Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) In Vitro', 2010, Accessed: Sep. 13, 2022. [Online]. Available: <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/41142>
- [13] J. Gao, P. Xu, Y. Wang, Y. Wang, and D. Hochstetter, 'Combined effects of green tea extracts, green tea polyphenols or epigallocatechin gallate with acarbose on inhibition against α -amylase and α -glucosidase in vitro', *Molecules*, vol. 18, no. 9, pp. 11614–11623, Sep. 2013, doi: 10.3390/molecules180911614.
- [14] E. Purwatresna, 'Aktivitas antidiabetes ekstrak air dan etanol daun sirsak secara in vitro melalui inhibisi enzim α -glukosidase', 2012, Accessed: Sep. 13, 2022. [Online]. Available: <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/58641>
- [15] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Seventh edition. New York, NY : Houndmills, Basingstoke: W. H. Freeman, 2017.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)