

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hutan tropis Indonesia menyimpan kekayaan hayati yang luar biasa, termasuk beragam spesies tumbuhan yang berpotensi besar sebagai sumber obat alami (Nurul., 2018). Selain kelimpahan flora dan fauna, Indonesia juga dikenal memiliki keragaman etnis dan budaya yang tersebar di seluruh nusantara. Setiap kelompok masyarakat mewarisi pengetahuan tradisional yang khas dalam memanfaatkan sumber daya alam, khususnya tumbuhan berkhasiat untuk pengobatan secara turun-temurun (Husnul & Sri., 2019). Sejak masa lampau, masyarakat Indonesia telah menjadikan alam sebagai sumber utama dalam menjaga kesehatan dan mengobati berbagai penyakit (Shofiah & Nada., 2017).

Masamba merupakan salah satu wilayah subur di Sulawesi Selatan yang dikelilingi oleh hutan tropis dan pegunungan hijau, sehingga menciptakan hubungan yang harmonis antara manusia, alam, dan hewan. Kondisi lingkungan yang lembap dan alami menjadikan wilayah ini habitat ideal bagi lebah *Apis mellifera*. Lebah ini menghasilkan propolis, yaitu resin alami yang dikumpulkan dari tunas dan kulit batang pohon, kemudian dicampur dengan lilin lebah dan enzim. Propolis berfungsi melindungi sarang dari serangan mikroorganisme dan telah lama dikenal memiliki khasiat farmakologis yang tinggi (Andrzej., 2013).

Sifat fisik dan kimia propolis sangat bervariasi, dipengaruhi oleh spesies lebah, jenis flora di sekitarnya, serta kondisi geografis tempat resin dikumpulkan. Secara umum, propolis mentah mengandung sekitar 40–50% resin, 20–30% lilin, 5–10% minyak atsiri, 1–5% serbuk sari, serta berbagai senyawa fenolik dan asam organik (Eroglu & Yuksel., 2020). Kandungan minyak atsiri dan polifenol tersebut berkontribusi terhadap berbagai aktivitas biologis penting, seperti antioksidan, antimikroba, antiinflamasi, antitumor, dan imunomodulator (Kurek-Górecka *et al.*, 2020).

Dalam beberapa tahun terakhir, meningkatnya kesadaran masyarakat terhadap kesehatan serta perubahan gaya hidup telah mendorong minat terhadap terapi berbasis bahan alam. Fenomena ini semakin kuat seiring mudahnya akses informasi melalui media cetak dan digital. Salah satu isu kesehatan yang banyak mendapat perhatian adalah paparan radikal bebas yang berlebihan, yang dapat memicu stres oksidatif. Stres oksidatif terjadi ketika jumlah radikal bebas melebihi kemampuan sistem antioksidan tubuh, sehingga menyebabkan kerusakan biomolekul penting seperti DNA, protein, dan lipid. Kondisi ini berkontribusi terhadap timbulnya berbagai penyakit degeneratif, antara lain kanker, penuaan dini, diabetes melitus, gangguan kardiovaskular, autoimun, hingga gangguan neurodegeneratif (Mardiah., 2019; Maigona, 2022; Nurcholis., 2021). Menariknya, penyakit degeneratif yang sebelumnya banyak ditemukan pada usia lanjut kini semakin sering dijumpai pada kelompok usia muda (Hafsah *et al.*, 2022). Oleh karena itu, konsumsi antioksidan alami menjadi sangat penting sebagai langkah preventif dalam menjaga integritas sel.

Propolis dikenal sebagai salah satu sumber antioksidan alami yang kuat. Berbagai penelitian melaporkan bahwa propolis mengandung senyawa bioaktif seperti fenolik, flavonoid, terpenoid, dan asam aromatik. Senyawa utama, antara lain caffeic acid phenethyl ester (CAPE), artepillin C, dan chrysin, diketahui memiliki aktivitas antikanker yang kuat, khususnya dalam menghambat pertumbuhan sel kanker payudara (Rzepecka-Stojko *et al.*, 2015). Penelitian Miyata *et al.*, (2019) berhasil mengisolasi tiga senyawa baru dari propolis lebah tanpa sengat (*Tetragonula aff. biroii*) asal Sulawesi Selatan, yaitu 4-(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-3,5,7-trihidroksikumarin, sulawesin A, dan sulawesin B, serta beberapa senyawa lain seperti gliserin A, brousoflavonol F, flavanon turunan prenilasi, dan isomer asam absisat. Selain aktivitas antioksidan, propolis juga menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan.

Beberapa penelitian melaporkan bahwa propolis mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen, termasuk *Staphylococcus aureus*, bakteri Gram-positif yang berperan sebagai flora normal namun dapat menyebabkan berbagai infeksi serius, seperti infeksi kulit, saluran pernapasan, infeksi nosokomial, hingga bakteremia (Jawetz *et al.*, 2005; Syahrurahman dkk., 2010). Aktivitas antibakteri propolis diduga berasal dari kandungan flavonoid, tanin, steroid, dan minyak atsiri yang bekerja dengan mengganggu aktivitas enzim dan merusak membran sel bakteri (Zaki Mubarak., 2016). Penelitian terbaru bahkan menunjukkan bahwa propolis dapat digunakan sebagai terapi tambahan pada pasien tuberkulosis (TB) yang menjalani pengobatan standar, dengan hasil berupa perbaikan gejala klinis dan peningkatan berat badan (Rif'atunnisa, 2024). Komposisi kimia propolis sangat dipengaruhi oleh jenis lebah, kondisi geografis, serta sumber flora di sekitarnya (Pahvalani *et al.*, 2020).

Oleh karena itu, diperlukan metode analisis yang tepat untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya. Teknik Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan sebagai metode skrining awal untuk memisahkan senyawa berdasarkan polaritas dengan prinsip *like dissolves like* (Ahsan., 2022). Sementara itu, teknologi Liquid Chromatography–Mass Spectrometry/Quadrupole Time-of-Flight (LC-MS/MS-QTOF) termasuk dalam instrumen High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) yang mampu menghasilkan ribuan spektrum fragmentasi secara otomatis dalam satu kali analisis, sehingga memungkinkan identifikasi metabolit sekunder secara komprehensif dan akurat (Harmita *et al.*, 2019; Hadacek *et al.*, 2022).

Meskipun berbagai penelitian telah melaporkan potensi biologis propolis, kajian mengenai karakterisasi senyawa terpenoid dan fenolik propolis *Apis mellifera* asal Sulawesi Selatan yang dikombinasikan dengan uji aktivitas antibakteri masih terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa terpenoid dan fenolik dalam propolis *Apis mellifera* asal Sulawesi Selatan menggunakan kombinasi metode KLT dan LC-MS/MS-QTOF, serta mengevaluasi aktivitas antibakterinya terhadap *Staphylococcus aureus* melalui metode difusi cakram. Pendekatan ini diharapkan dapat memberikan gambaran menyeluruh mengenai profil senyawa bioaktif propolis lokal sekaligus memvalidasi potensinya sebagai kandidat bahan baku alami dalam pengembangan produk farmasi dan biomedis.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana cara mengidentifikasi terpenoid dan fenolik pada propolis (*Apis mellifera*) dari Sulawesi Selatan menggunakan metode KLT dan LC-MS/MS-QTOF serta uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*?

1.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengidentifikasi senyawa terpenoid dan fenolik pada propolis (*Apis mellifera*) dari Sulawesi Selatan menggunakan metode KLT dan LC-MS/MS-QTOF, serta menilai aktivitas antibakterinya terhadap *Staphylococcus aureus*

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan memperkaya pengetahuan di bidang kimia bahan alam, khususnya mengenai komposisi senyawa terpenoid dan fenolik pada propolis (*Apis mellifera*) dari Sulawesi Selatan. Selain itu, penelitian ini juga memberikan wawasan teoritis dan praktis mengenai penggunaan metode KLT dan LC-MS/MS-QTOF dalam analisis senyawa bioaktif pada propolis maupun bahan alam lainnya, serta memberikan informasi awal mengenai potensi antibakteri propolis terhadap *Staphylococcus aureus*.

1.4.2 Manfaat Praktis

a) Bagi Ilmu Pengetahuan

Memberikan informasi mengenai kandungan terpenoid dan fenolik pada propolis Sulawesi Selatan serta potensi aktivitas antibakterinya, yang dapat menjadi dasar bagi pengembangan produk berbasis bahan alami di bidang kesehatan dan farmasi.

b) Bagi Institusi

Menunjukkan peran Universitas Hasanuddin Makassar dalam penelitian bahan alam lokal Sulawesi Selatan dan pengembangan metode analisis kimia, sekaligus meningkatkan kredibilitas institusi melalui riset yang relevan dan aplikatif.

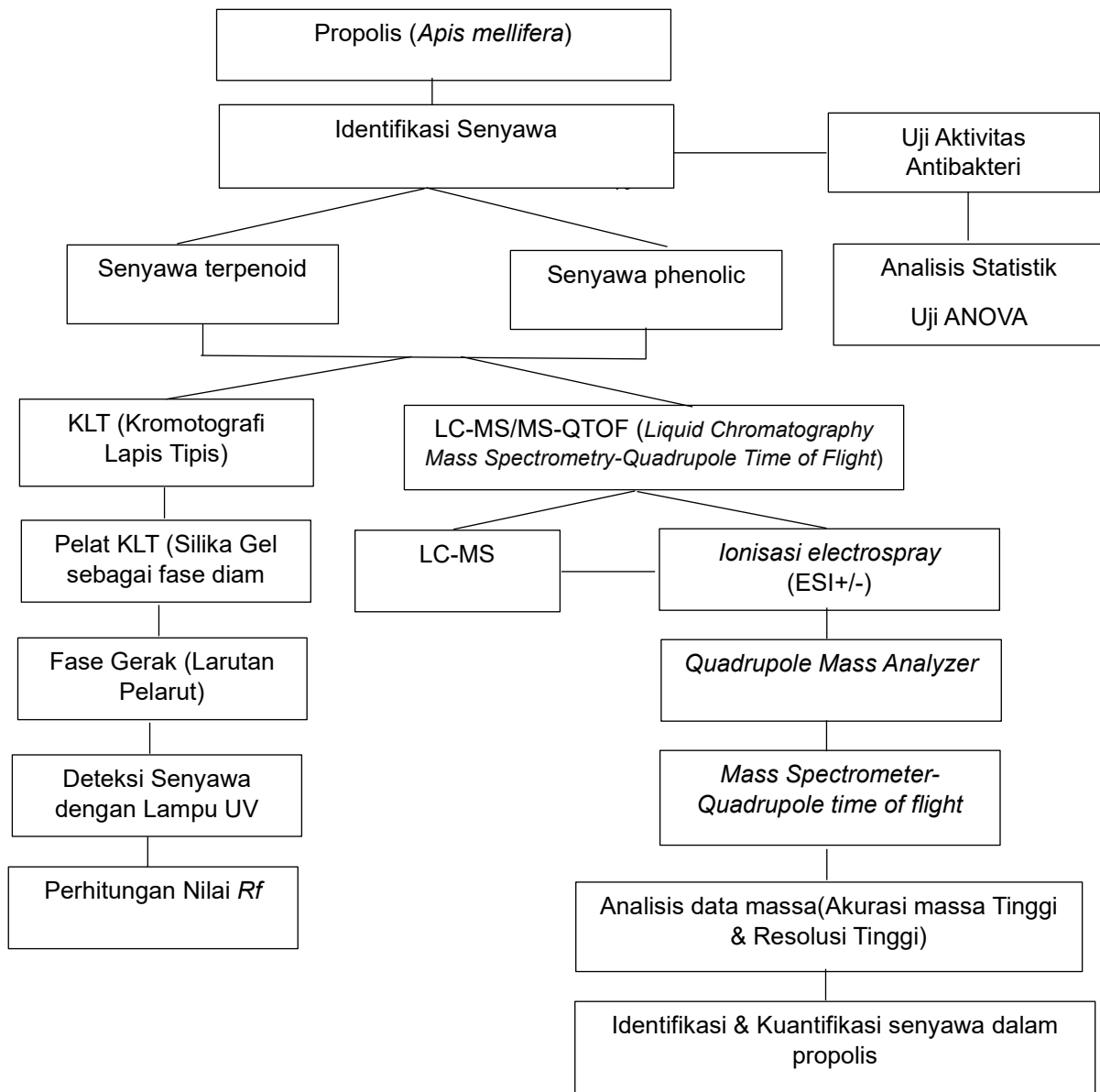
c) Bagi Masyarakat

Menyediakan data ilmiah mengenai komposisi dan manfaat propolis Sulawesi Selatan, termasuk potensinya sebagai antibakteri, sehingga masyarakat dapat memanfaatkan propolis sebagai produk kesehatan berbasis bahan alami dan meningkatkan apresiasi terhadap produk lokal.

d) Bagi Peneliti

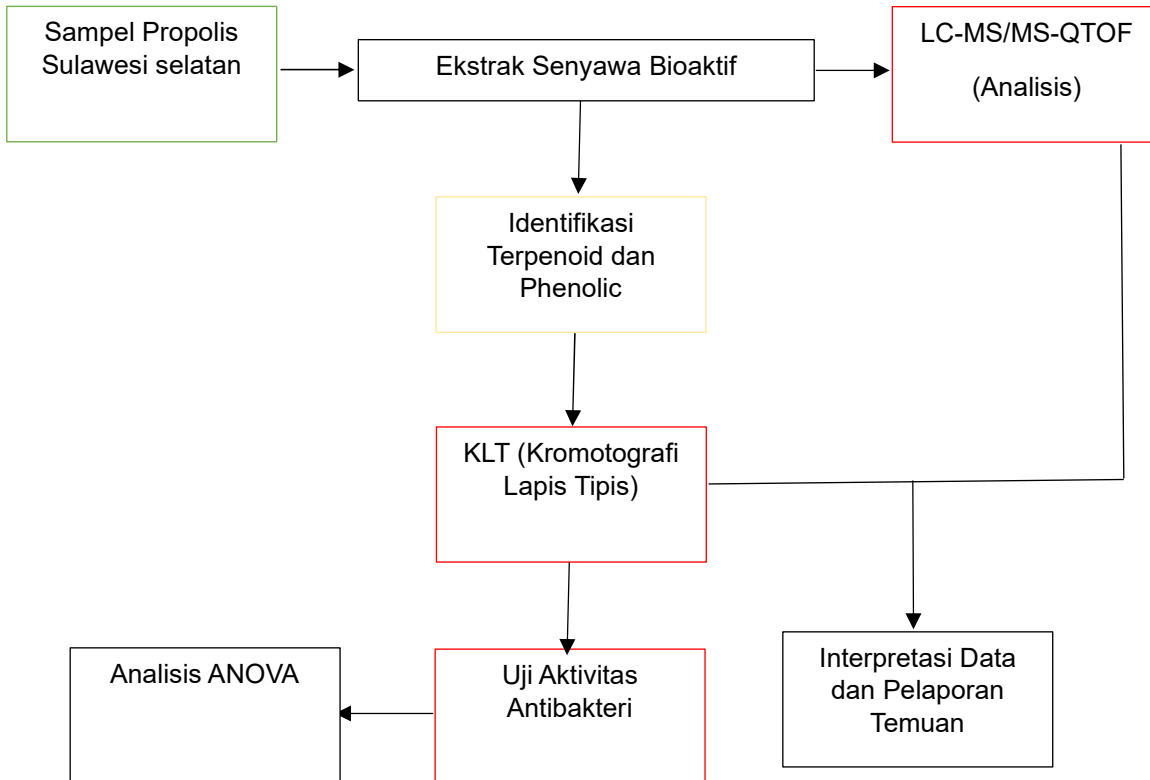
Menambah pengetahuan dan keterampilan dalam identifikasi senyawa terpenoid dan fenolik pada propolis (*Apis mellifera*) menggunakan KLT dan LC-MS/MS-QTOF, serta membuka peluang penelitian lanjutan terkait aplikasi antibakteri propolis, pengembangan produk, atau eksplorasi senyawa bioaktif lainnya.

1.5 Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka Teori

1.6 Kerangka Konsep



Gambar 2. Kerangka Konsep

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental berskala laboratorium yang bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi senyawa terpenoid dan fenolik pada propolis (*Apis mellifera*) asal Sulawesi Selatan, serta mengevaluasi aktivitas antibakterinya terhadap *Staphylococcus aureus*. Rancangan penelitian ini dipilih karena memungkinkan analisis yang komprehensif terhadap komponen bioaktif propolis melalui penggunaan kromatografi lapis tipis (KLT) sebagai metode pemisahan awal dan teknik LC-MS/MS-QTOF untuk identifikasi senyawa secara lebih spesifik. Selain itu, penelitian ini juga mencakup uji aktivitas antibakteri guna mengetahui potensi biologis propolis terhadap bakteri patogen.

2.2 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di tiga lokasi berbeda. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan. Sementara itu, pengujian LC-MS-QTOF dilakukan dengan mengirimkan sampel propolis ke PT Saraswanti Indo Genetech (SIG), Bogor, Indonesia, yang memiliki nomor registrasi LP-184-IDN. SIG merupakan perusahaan yang bergerak di bidang laboratorium pengujian dan sertifikasi, dengan fasilitas lengkap, termasuk instrumen LC-MS-QTOF, serta memiliki pengalaman dan reputasi baik dalam analisis kimia sampel alami. Selain itu, penelitian ini juga mencakup uji aktivitas antibakteri, yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar. Kegiatan penelitian direncanakan berlangsung selama 7 bulan, mulai Februari 2025 hingga Agustus 2025. Rentang waktu ini dipilih untuk memastikan adanya persiapan yang matang, pelaksanaan analisis yang cermat, serta penyelesaian seluruh rangkaian identifikasi senyawa terpenoid dan fenolik pada propolis (*Apis mellifera*) asal Sulawesi Selatan menggunakan KLT dan LC-MS-QTOF, disertai uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

2.3 Populasi dan Sampel

Propolis merupakan bagian dari madu *Apis mellifera* yang diperoleh dari perternakan lebah di kecamatan Masamba, Sulawesi Selatan, Indonesia.

2.4 Alat dan Bahan

2.4.1 Alat yang digunakan

Peralatan yang digunakan pada pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT) meliputi *chamber*, lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, serta kertas saring nomor 42.

Untuk analisis LC-MS QTOF (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Quadrupole Time of Flight) digunakan instrumen khusus yang berfungsi mengidentifikasi senyawa bioaktif yang terkandung dalam propolis.

Selain itu, pada uji aktivitas antibakteri digunakan seperangkat alat laboratorium mikrobiologi, termasuk cawan petri, micropipette, tabung reaksi, Bunsen burner, incubator, autoclave, dan penggaris jangka sorong untuk pengukuran zona hambat.

2.4.2 Bahan yang digunakan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi pelat Silika Gel GF254, etil asetat, n-heksana, aquades, dan Vanilin-asam sulfat (H_2SO_4) untuk pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Sampel propolis diperoleh dari Kabupaten Masamba, Sulawesi Selatan. Untuk analisis LC-MS QTOF digunakan ekstrak propolis hasil preparasi, dengan pelarut LC-MS grade seperti metanol, asetonitril, atau air ultrapure sesuai prosedur laboratorium, serta standar kalibrasi internal atau eksternal jika diperlukan. Pada uji aktivitas antibakteri digunakan isolat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29747, media

Nutrient Agar (NA), antibiotik tetrasiklin sebagai kontrol positif, aquades steril sebagai kontrol negatif, ekstrak propolis pada berbagai konsentrasi, dan larutan NaCl fisiologis (0,9%) untuk pengenceran suspensi bakteri.

2.5 Prosedur Kerja

2.5.1 Penyiapan Sampel

Sampel propolis dari *Apis mellifera* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari peternak lebah di Kecamatan Masamba, Sulawesi Selatan. Propolis dikumpulkan dengan cara mengikis kerangka sarang lebah, kemudian disimpan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sebelum diolah menjadi serbuk. Sebanyak 300 gram serbuk propolis dicampur dengan etanol 70% dengan rasio 1:10 (w/v), kemudian diekstraksi menggunakan metode Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) dengan bantuan sonikator pada suhu $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 20 menit. Hasil ekstraksi disaring menggunakan kertas saring, lalu ampasnya diekstraksi kembali sebanyak dua kali. Seluruh filtrat yang diperoleh, disaring menggunakan kertas saring Whatman™ No. 41, kemudian diuapkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak propolis pekat (Zahra *et al.*, 2021).

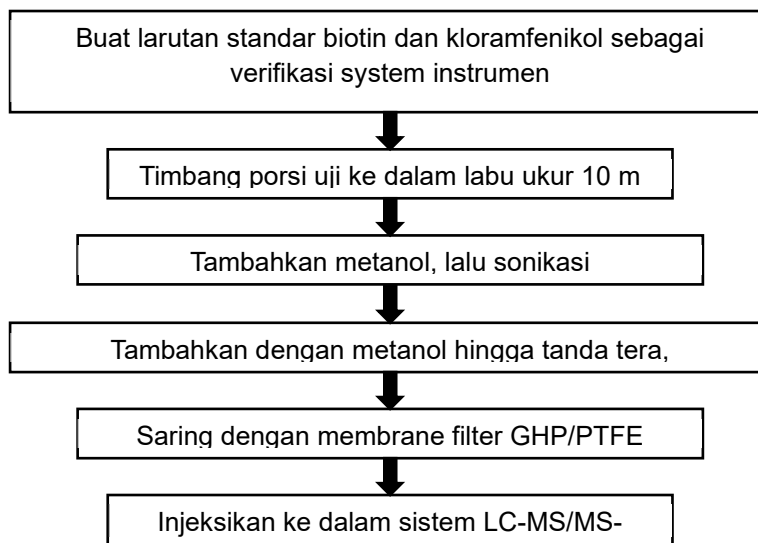
2.6. Pengujian KLT (Kromatograf Lapis Tipis)

Pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan menggunakan pelat Silika Gel GF254 berukuran 6 cm x 1 cm. Sebelum digunakan, pelat diaktivasi dengan cara dipanaskan di oven pada suhu $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama satu jam untuk menghilangkan kandungan air. Setelah itu, pelat diberi garis batas atas dan bawah masing-masing berjarak 1 cm sebagai panduan penotolan sampel. Untuk analisis terpenoid, fase gerak yang digunakan adalah campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 3:1, sedangkan untuk analisis fenolik digunakan campuran n-heksana dan etil asetat dengan rasio 2:1. Eluen dimasukkan ke dalam *chamber* hingga mencapai kondisi jenuh, kemudian pelat KLT yang telah ditotolkan sampel dimasukkan ke dalamnya. Selama proses elusi, eluen bergerak naik melalui lapisan silika gel sambil membawa senyawa-senyawa dalam sampel. Proses dihentikan ketika eluen mencapai garis batas atas, lalu pelat diangkat dan dikeringkan. Noda hasil pemisahan diamati di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, Selanjutnya, plat KLT disemprot dengan pereaksi vanillin-asam sulfat (H_2SO_4) kemudian dipanaskan di oven pada suhu $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit untuk menampakkan warna atau fluoresensi khas senyawa terpenoid. Sementara itu, untuk mendeteksi senyawa fenolik digunakan pereaksi FeCl_3 . Nilai R_f dari setiap bercak yang muncul kemudian dihitung dan dibandingkan dengan nilai standar.

2.7. Pengujian LC-MS/MS-QTOF

Untuk persiapan larutan standar, dibuat larutan biotin dan kloramfenikol yang digunakan sebagai kalibrasi serta verifikasi kinerja instrumen. Pada persiapan sampel, sejumlah propolis ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian dilarutkan dengan metanol. Larutan ini disaring menggunakan membran filter GHP/PTFE guna menghilangkan partikel berukuran besar sebelum diinjeksi ke instrumen LC-MS QTOF. Analisis dilakukan menggunakan kolom LC HSS T3 dengan suhu kolom dikondisikan pada $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ untuk memastikan pemisahan senyawa berlangsung optimal. Sistem gradien yang digunakan terdiri dari fase A berupa asam format 0,1% dalam asetonitril, dan fase B berupa asam format 0,1% dalam akuabides, dengan laju alir 0,6 mL/menit. Untuk metode MS instrumen dioperasikan pada mode Tof MS^e dengan ionisasi ESI (+) dan (-) untuk menangkap spektrum penuh senyawa polar maupun non-polar, pada rentang m/z sesuai target analit. Hasil analisis diolah untuk identifikasi senyawa berdasarkan nilai m/z dan pola fragmentasi, lalu dibandingkan dengan pustaka senyawa (Natural product library). Konsentrasi ditentukan dari luas area puncak terhadap kurva kalibrasi (Qiao *et al.*, 2013).

2.8. Diagram Alur Penelitian



Gambar 3. Diagram Alur Penelitian

2.9. Analisis Data LC-MS-QTOF

Screening zat aktif bahan alam menggunakan instrument LC-MS-QTOF dilakukan dengan perangkat lunak UNIFI yang didalamnya telah memiliki *natural product library* spektrum massa dan hasil dinyatakan sebagai positif atau negatif dengan kriteria sebagai berikut:

Tabel 1. *Screening* zat aktif bahan alam menggunakan instrument LC-MS-QTOF

Kriteria	Positif	Positif <i>Low Abundance</i>	Negatif
<i>Mass error</i>	≤ 5 ppm	≤ 5 ppm	> 5 ppm
<i>Isotope match M/Z</i>	≤ 6 ppm	≤ 6 ppm	> ppm
<i>RMS PPM</i>	≤ 10 %	≤ 10 %	> 10 %
<i>RMS %</i>			
<i>Intensity/response</i>	≥ 300	< 300	< 300
<i>Fragment match</i>	≥ 1 <i>mass fragment</i>	≥ 1 <i>mass fragment</i>	< 1 <i>mass fragment</i>

2.10. Uji Aktivitas Antibakteri

2.10.1 Sterilisasi Alat

Prosedur sterilisasi alat pada penelitian ini diawali dengan menyiapkan seluruh peralatan yang akan digunakan, kemudian membersihkannya menggunakan sabun dan air, lalu mengeringkannya. Mulut tabung reaksi dan erlenmeyer ditutup dengan kapas yang telah dilapisi kain kasa, kemudian dibungkus menggunakan kertas. Peralatan yang tidak memiliki skala dimasukkan ke dalam oven dan dipanaskan pada suhu 180 °C selama dua jam. Sementara itu, peralatan berskala disterilkan menggunakan autoklaf dengan menutup rapat penutup autoklaf, menguncinya, dan menghubungkannya ke sumber listrik hingga suhu mencapai 121 °C selama 15 menit. Setelah proses selesai, penutup atau klem autoklaf dibuka perlahan untuk melepaskan uap, kemudian peralatan yang telah disterilkan dikeluarkan.

2.10.2 Pembuatan Media Muller Hinton Agar (MHA)

Media MHA (Muller Hinton Agar) disiapkan dengan menimbang sebanyak 4,75 gram, kemudian dilarutkan dalam 125 mL aquadest, dengan bantuan pemanasan jika diperlukan. Setelah larut sempurna, media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit. Selanjutnya, media yang telah steril dituangkan ke dalam 45 cawan petri steril dan dibiarkan pada suhu ruang hingga mengeras (Utomo *et al.*, 2018).

2.10.3 Sterilisasi Media

Proses sterilisasi media dalam penelitian ini dilakukan dengan membungkus media yang telah disiapkan menggunakan kertas. Selanjutnya, penutup autoklaf beserta aluminiumnya dibuka, media dimasukkan ke dalam autoklaf, lalu penutup dikunci rapat dan dihubungkan ke sumber listrik. Sterilisasi dilakukan hingga suhu mencapai 121 °C selama 15 menit. Setelah itu, penutup atau klem autoklaf dibuka perlahan untuk melepaskan uap, media yang telah steril dikeluarkan, kemudian didinginkan dan dicairkan kembali hingga larut sempurna, sehingga siap digunakan.

2.10.4 Penyiapan Bakteri

Prosedur penyiapan bakteri dalam penelitian ini diawali dengan proses peremajaan *Staphylococcus aureus*. Satu ose biakan murni diambil menggunakan jarum ose yang telah disterilkan, kemudian digoreskan pada media Nutrient Agar (NA) miring dan diinkubasi pada suhu 35-37 °C selama 24 jam. Setelah itu, dibuat suspensi bakteri dengan mengambil satu ose biakan yang telah diremajakan, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 mL larutan NaCl 0,9%, kemudian dikocok hingga homogen sehingga diperoleh suspensi bakteri. Pengujian zona hambat antibakteri dilakukan dengan metode sumuran. Media steril yang telah disiapkan dikeluarkan dari autoklaf, kemudian suspensi bakteri dibuat dengan melarutkan dua ose biakan ke dalam 10 mL larutan NaCl. Sebanyak 15 mL media NA dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 mL suspensi bakteri, lalu campuran tersebut dituangkan ke dalam cawan petri. Setelah media mengeras, sumuran dibuat menggunakan ujung pipet tetes yang telah disterilkan, dengan empat sumuran pada setiap cawan. Sampel uji dimasukkan ke masing-masing sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam

2.11 Pengolahan Data

Pada penelitian ini, analisis data dilakukan menggunakan uji One-Way Analysis of Variance (ANOVA) satu arah untuk mengetahui adanya perbedaan rata-rata yang signifikan antar kelompok perlakuan. Pemenuhan asumsi homogenitas varians diuji menggunakan metode Brown-Forsythe. Seluruh analisis statistik dilakukan dengan bantuan perangkat lunak GraphPad Prism versi 10.50, yang menyediakan keluaran analisis secara sistematis dan mudah diinterpretasikan. Tingkat signifikansi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0,05. Pendekatan analisis ini diharapkan mampu menghasilkan data yang valid dan akurat sehingga dapat mendukung penarikan kesimpulan penelitian secara ilmiah..

2.12 Izin Penelitian dan Kelayakan Etik

Penelitian ini telah memperoleh persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Rumah Sakit Perguruan Tinggi Negeri Universitas Hasanuddin (RSPTN UH)-RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo, Makassar, dengan Nomor Surat: 1012A/UN4.6.4.5.31/PP36/2025.