

OPTIMASI SINTESIS DAN KARAKTERISASI SABUN CAIR DARI KEMIRI (*Aleurites moluccana*) DENGAN BANTUAN GELOMBANG ULTRASONIC

Aman Santoso*, Syafiuddin, Dedek Sukarianingsih, Sumari, Rini Retnosari
Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Malang

*Email: aman.santoso.fmipa@um.ac.id

Artikel diterima: 04 Agustus 2020; Disetujui: 26 Februari 2021

DOI: <https://doi.org/10.36387/jiis.v6i1.545>

ABSTRAK

Sabun cair sudah menjadi kebutuhan pokok, terutama terutama pada masa pandemic covid ini. Kualitas sabun dipengaruhi oleh jenis bahan baku dan basa yang digunakan. Saponifikasi minyak kemiri dengan kalium hidroksida menghasilkan sabun cair yang berpotensi sebagai anti bakteri. Gelombang ultrasonik (US) menghasilkan kavitasi yang mempercepat reaksi. Penelitian ini bertujuan: (1) Sintesis dan karakterisasi sabun cair dari minyak kemiri, (2) menentukan aktifitas antibakteri sabun cair hasil sintesis. Tahapan dalam penelitian ini adalah : (1) isolasi serta karakterisasi minyak kemiri, (2) pembuatan sabun cair dengan 3 pada berbagai konsentrasi basa dengan US (3) karakterisasi sabun cair (4) uji aktivitas antibakteri. Hasil penelitian menunjukkan sabun cair telah dapat dibuat dengan saponifikasi dengan KOH minyak kemiri, diperoleh sifat fisik bentuk cair kental, warna putih kekuningan, beraroma khas. Sifat kimia sabun cair memiliki massa jenis 1,10 g/mL, kadar asam lemakbebas 0,34%, pH 8,46, kadar alkali bebas 0,05%, tegangan permukaan $4,33 \times 10^{-4}$ N/m, serta viskositas 1.460 cSt. Sabun cair kemiri memiliki aktivitas antibakteri dalam kategori lemah terhadap bakteri *E. coli* dan dalam kategori sedang terhadap bakteri *S. aureus*.

Kata kunci: minyak kemiri, KOH, sabun cair, ultrasonik, antibakteri

ABSTRACT

Liquid soap has become a basic necessity, especially during the Covid pandemic. The quality of soap is influenced by the type of raw material used. Candlenut oil saponification with potassium hydroxide produces liquid soap which has the potential to be anti-bacterial. Ultrasonic waves (US) produce cavitation which speeds up the reaction. This study aims: (1) Synthesis and characterization of liquid hazelnut oil soap, (2) to determine the antibacterial activity of liquid soap. The stages in this study were: (1) isolation and characterization of hazelnut oil, (2) making liquid soap at various alkaline concentrations with US (3) characterizing liquid soap (4) testing for antibacterial activity. The results showed that liquid soap can be made by saponification with KOH hazelnut oil, obtained physical properties of viscous liquid form, yellowish white color, distinctive aroma. The chemical properties of liquid soap have a pH of 8.46, a density of 1.10 g/mL, a free fatty acid content of 0.34%, a free alkaline content of 0.05%, a viscosity of 1,460 cSt and a

surface tension of 4.33×10^{-4} N/m. Candlenut liquid soap has antibacterial activity in the weak category against *E. coli* bacteria and in the moderate category against *S. aureus* bacteria.

Keywords: *candlenut, KOH, liquid soap, ultrasonic, anti-bacterial*

PENDAHULUAN

Nilai ekonomis minyak nabati dapat ditingkatkan dengan mengkonversi menjadi produk baru misalnya seperti kosmetik, biodiesel dan sabun (Arlene, 2010; Jalaluddin et al., 2018). Salah satu hasil minyak nabati yang melimpah misalnya minyak kemiri yang dapat diisolasi dengan ekstraksi soxhletasi, maserasi dan pengepresan kemiri (Darmawan, 2006). Komponen utama minyak kemiri asam palmitat, asam linoleate, dan asam stearat 6,7%, dimana asam nya dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dengan aktivitas sebesar 19,95% (Alodokter, 2020; Subroto et al., 2017), (Khameneh et al., 2019), (Darmawan, 2006; Benitez-Sánchez, León-Camacho and Aparicio, 2003).

Sabun dapat bertindak sebagai agen pembersih untuk melarutkan kotoran dan juga bertindak sebagai antibakteri. Manfaat secara medis sabun dapat mereduksi total mikroorganisme penyebab penyakit

seperti bakteri, virus, serta bentuk parasit lainnya, (Kumalasari *et al.*, 2014; Widyasanti, Winaya and Rosalinda, 2019). Sabun memiliki berbagai macam bentuk misalnya berbentuk gel, bentuk padat (batang), serbuk (detergen), dan cair (George and Raymond, 2016). Sabun cair merupakan produk yang lebih banyak diminati dibandingkan sabun padat oleh masyarakat sekarang ini, karena sabun cair lebih praktis, higienis dan ekonomis (Cella and Stefani, 2018). Penggunaan ultrasonik berpotensi mempercepat reaksi pembuatan sabun cair.

Efek dari gelombang ultrasonik dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan laju reaksi pada beberapa proses kimia (Hielscher, 2020; Mady et al., 2012). Penggunaan gelombang ultrasonik dalam reaksi dapat menurunkan energi aktivasi dan meningkatkan laju reaksi (Chen and Kalback, 1967; Naveena et al., 2015).

Berdasarkan pembahasan yang telah dilakukan dan mengingat

tingginya kebutuhan sabun cair, maka penelitian ini bertujuan mensintesis dan mengkarakterisasi sabun cair dari minyak kemiri, serta uji aktifitas bacterinya.

METODE PENELITIAN

Alat serta bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian antara lain: seperangkat alat destilasi, set ekstraksi *soxhlet*, *Beaker Glass*, Erlenmeyer, buret L, gelas arloji, spatula, kaca pengaduk,, *mortar* dan *pestle*, neraca digital merk Shimadzu, *hotplate stirer*., termometer, pemanas mantel, gelas ukur, *ABBE refractometer*, viskosimeter *Brookfield*, dan ultrasonik merk Branson 1510 E-DTH.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian : Sodium hidroksida, *sodium lauril sulfat*, gliserin, BHT (*butyl hidroksi toluen*), minyak kemiri, aquades, asam citrat, *phenolftalein*, etanol 96%, *bacto pepton*, *nutrient agar*, HCl , sediaan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Isolasi Minyak Kemiri

Sebanyak 1000 g kemiri

direndam dalam *n*-heksana selama 24 jam. Selanjutnya disaring, ekstrak minyak yang dihasilkan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu ± 35 °C. Setelah dilakukan pemisahan pelarut (evaporasi), dikarakterisasi dan dihitung rendemennya

Sintesis Sabun Cair

Sintesis sabun cair dibuat dengan tiga komposisi variasi basa yakni 2,5 ; 3,0 serta 3,5 g.

Tabel 1. Komposisi Bahan untuk Sintesis Sabun Cair

Bahan	SKTU1	SKTU2	SKTU3
KOH (g)	2,5	3	3,5
Minyak kemiri (g)	5	5	5
Gliserin (mL)	1	1	1
<i>Sodium lauril sulfat</i> (g)	5	5	5
BHT (g)	0,2	0,2	0,2
Asam Sitrat (g)	1,5	1,5	1,5

Keterangan :

SKTU1: komposisi sabun dengan KOH 2,5 g

SKTU3: komposisi sabun dengan KOH 3 g

SKTU3: komposisi sabun dengan KOH 3,5 g

Campuran bahan seperti pada Tabel 1 dipanaskan sambil diaduk

pada suhu sekitar 70°C dalam ultrasonic bath, selama satu jam sehingga membentuk cairan kental. Sabun yang dihasilkan dikarakterisasi untuk uji organoleptik, massa jenis, pH, viskositas, uji kadar asam lemak bebas (ALB), tegangan permukaan, dan kadar alkali bebasnya.

Karakterisasi Sabun Cair

Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan meliputi bentuk, warna dan aroma. Hasilnya disesuaikan dengan dengan SNI sabun cair.

Massa Jenis

Sabun cair dimasukkan kedalam piknometer 25 mL yang telah ditimbang beratnya, selanjutnya dihitung dengan rumus perhitungan massa jenis

Kadar asam lemak bebas

Sebanyak 2,0018 gram sabun cair dimasukkan dalam Erlenmeyer, ditambah 20 mL alkohol 96%, kemudian direfluks selama 30 menit. Selanjutnya didinginkan dan dititrasi dengan larutan KOH 0,1 N untuk menentukan kadar asam lemak bebas.

Kadar alkali bebas

Sebanyak 2,5018 gram sabun cair dimasukkan dalam gelas piala,

ditambah 50 mL alkohol 96%, kemudian direfluks selama 30 menit. Dilakukan titrasi menggunakan HCl 0,1 N, yang sampai warna ungu/merah muda hilang..

Tegangan Permukaan

Zat cair yang akan diukur tegangan permukaannya, dituangkan pada cawan dan diletakkan diatas penyangga cuplikan (yang pada posisi bila diturunkan maka cincin dapat mencapai permukaan zat cair). Penahan cuplikan dinaikkan hingga cincin Pt tercelup sedalam 0,5 cm terhadap permukaan. Kemudian lengan torsi diatur, sehingga lengan menunjuk angka nol pada piringan skala (cincin harus tetap tercelup 0,5 cm dari permukaan cairan selama pengerjaan ini). Setelah itu lengan torsi diputar perlahan-lahan hingga cincin terlepas dari permukaan cairan. Lalu, dihitung dengan rumus berikut.

$$\gamma = \frac{\phi}{\phi_0} \times \gamma_0$$

Keterangan :

γ = Tegangan Permukaan Cairan

γ_0 = Tegangan Permukaan Air

ϕ = besar Sudut Putar Cairan

ϕ_0 = Besar Sudut Putar Air

Pengujian Antibakteri pada Bakteri *E. coli* dan *S. aureus*

Uji bioaktifitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran, dengan kontrol positif *sodium lauryl sulfat* dan minyak kemiri serta kontrol negatif akuades. Sampel uji yang digunakan adalah 1 mg sabun cair. *Starter* bakteri diinokulasikan secara merata pada media yang telah disterilkan dalam cawan petri. Selanjutnya media padat steril yang telah diolesi *starter* dilubangi menggunakan bor gabus ditempat yang sesuai. Setelah itu lubang tersebut ditetesi kontrol positif, kontrol negatif, dan sabun cair sebanyak 20 μ L, dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Luasan zona bening yang telah terbentuk di sekitar lubang diukur. Kontrol positif dengan minyak kemiri dan *SLS* serta kontrol negatif dengan

akuades.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Minyak Kemiri

Minyak kemiri berhasil diisolasi dengan metode maserasi sebesar 475 gram. Sisa minyak yang terdapat dalam residu hasil maserasi yang diisolasi dengan metode soxhletasi sebesar 78,2 gram dengan rendemen 55,32%, Ketaren (1986) yaitu 55-66%. Karakteristik minyak kemiri hasil isolasi seperti disajikan dalam Gambar 1 dan Tabel 2.



Gambar 1. Minyak Kemiri Hasil Isolasi

Tabel 2. Karakteristik Minyak Kemiri

Karakteristik	Hasil			SNI
	1	2	Rata-rata	
Wujud	-	-	Cair	Cair
Warna	-	-	Kuning	Khas
Densitas (g/mL)	0,925	0,928	0,927	0,9240-0,9290
Bilangan asam	6,17	7,27	6,72	<5
Bilangan penyabunan mg (KOH/g Minyak)	203,48	192,18	197,83	184-202

Seperti terlihat pada Tabel 2 massa jenis yang diperoleh dalam penelitian ini adalah 0,927 g/mL. Angka ini sesuai dengan standar mutu yang telah ditentukan SNI 01-4462-1998 yaitu sebesar 0,924-0,929 g/mL. Bilangan asam minyak kemiri diperoleh sebesar 6,72. Angka ini kurang sesuai dengan standar mutu minyak seperti dalam SNI 01-4462-1998 dan menunjukkan bahwa minyak tersebut memiliki kualitas yang kurang bagus. Besarnya bilangan asam disebabkan oleh lamanya penyimpanan, sehingga minyak/lemak lebih mudah terhidrolisis. Bilangan penyabunan minyak kemiri diperoleh sebesar 197,83 mg KOH/g minyak kemiri. Data tersebut memenuhi standar mutu minyak kemiri untuk bilangan penyabunan yang telah ditetapkan oleh SNI 01-4462-1998 yaitu sebesar 184-202 mg KOH/g minyak (BSN, 1998).

Sintesis dan Karakterisasi Sabun Cair dari Minyak Kemiri

Sintesis sabun cair minyak kemiri menggunakan tiga variasi basa KOH yaitu dengan penambahan 2,5 gram KOH (SKTU1), 3 gram KOH (SKTU2), dan 3,5 gram KOH

(SKTU3). Sintesis sabun cair dari minyak kemiri dilakukan dalam bak ultrasonik dengan frekuensi 42 kHz, suhu ± 70 °C dan waktu 60 menit. Produk sabun cair hasil sintesis pada berbagai massa kalium hidroksida terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Sabun cair pada berbagai komposisi KOH

Sabun cair dari minyak kemiri hasil sintesis memiliki karakter fisik dan kimia yang berbeda untuk masing-masing variasi penambahan KOH. Hasil karakterisasi sabun cair pada berbagai komposisi disajikan seperti dalam Tabel 3.

Seperti terlihat pada Tabel 3, uji organoleptik pada sabun cair dari minyak kemiri adalah bewujud cair warna putih hingga kekuningan dan memiliki aroma khas, sesuai dalam

rentangan SNI sabun cair.

Hasil pengujian alkali bebas menunjukkan bahwa semakin banyak penambahan KOH terhadap sintesis sabun cair, kadar alkali bebas semakin besar. (Arlene, 2010; BSN, 1998).

Salah satu karakter yang mempengaruhi keterterimaan konsumen lainnya viskositas.

Kekentalan atau viskositas yang tinggi akan mengurangi efisiensi tumbukan antar partikel di dalam sabun sehingga sediaan lebih stabil. Viskositas sabun cair pada semua produk memenuhi standar SNI 06-4085-1996 yang ada pada rentangan 500-20.000 cPs (BSN, 1996; Widyasanti et al., 2019).

Tabel 3. Karakter Sabun Cair dari Minyak Kemiri

Karakteristik	SKTU1	SKTU2	SKTU3	SNI
Wujud	Cair	Cair	Cair	Cair
Warna	Putih	Putih kekuningan	Putih kekuningan	Khas
Aroma	Khas SLS	Khas SLS	Khas SLS	Khas
pH	8,62	8,46	13,51	8—11
Densitas (g/mL)	1,09	1,10	1,11	1,01-1,10
FFA (%)	0,69	0,34	0	<2,5
Alkali bebas (%)	0	0,05	0,73	<0,1
Viskositas cPs)	10.000	1.460	1.160	500- 20.000
Tegangan permukaan (N/m)	4,33 x10 ⁻⁴	4,33 x10 ⁻⁴	4,12 x10 ⁻⁴	-

Pengujian Antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli*

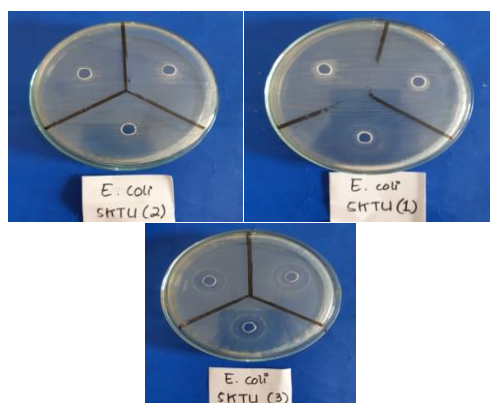
Pelaksanaan uji aktivitas antibakteri sabun cair minyak kemiri dengan memakai metode difusi agar. Aktivitas antibakteri sabun mandi cair dari minyak kemiri dapat dilihat dari terbentuknya zona hambat yang ada (Riaz et al., 2009; Yu et al., 2018). Kriteria kekuatan daya hambat disajikan dalam Tabel 4.

Tabel 4. Kriteria daya hambat anti bakteri

No.	Diameter	Kriteria
1	< 5	lemah
2	5 - 10	sedang
3	10 - 20	kuat
4	> 20	sangat kuat

Aktivitas Sabun Cair dari Minyak Kemiri terhadap Bakteri *E. coli*

Diameter hambat sabun cair terhadap bakteri *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Diameter Hambat Sabun Cair terhadap Bakteri *E. coli*

Perhitungan zona hambat dalam uji antibakteri sabun cair terhadap bakteri *E. coli* disajikan pada Tabel 5.

Hasil menunjukkan bahwa produk sabun cair hasil sintesis

dengan penambahan 2,5 g KOH (SKTU1) dan penambahan 3,0 g KOH (SKTU2) memiliki daya hambat dengan kategori lemah. Produk SKTU 3 dengan penambahan 3,5 g KOH memiliki daya hambat dengan kategori kuat, hal ini karena pH pada sabun tersebut adalah 13,5, sedangkan pertumbuhan bakteri *E. coli* maksimum pada pH 9, oleh karena itu daya hambat terhadap bakteri *E. coli* juga semakin kuat (Kaseng et al., 2016; Kumalasari et al., 2014).

Tabel 5. Data Hasil Uji Antibakteri Sabun Cair terhadap Bakteri *E. coli*

Sampel	Zona Bening (mm)			Rata-rata	Kategori
	1	2	3		
SKTU1	1,20	0,30	1,10	0,87	Lemah
SKTU2	1,10	1,75	1,60	1,48	Lemah
SKTU3	11,85	11,15	13,15	12,05	Kuat
Kontrol + 1	1,25	0,35	1,35	0,98	Lemah
Kontrol + 2	0	0	0	0	-
Kontrol -	0	0	0	0	-

Keterangan :

SKTU1 : penambahan KOH 2,5 g Kontrol +1 : Minyak kemiri
 SKTU2 : penambahan KOH 3,0 g Kontrol +2 : *sodium lauryl sulfat*
 SKTU3 : penambahan KOH 3,5 g Kontrol - : Aquades

KESIMPULAN

Sabun cair keniri dapat dibuat dengan reaksi saponifikasi minyak kemiri dengan basa KOH, diperoleh sifat fisik sabun bentuk cair kental, warna putih kekuningan, beraroma

khas. Sifat kimia sabun cair memiliki massa jenis 1,10 g/mL, pH 8,46, kadar asam lemak bebas 0,34%, dan tegangan permukaan $4,33 \times 10^{-4}$ N/m, viskositas 1.460 cSt Sabun cair dari minyak kemiri menunjukkan aktivitas

terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan kategori lemah untuk produk sabun SKTU1 dan SKTU2, serta kategori sedang kuat untuk produk SKTU3. Sedangkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan termasuk dalam kategori sedang pada semua produk sabun cair hasil sintesis dari minyak kemiri.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan kepada LP2M Universitas Negeri Malang telah mendanai seluruh penelitian ini melalui dana PNBPU UM.

DAFTAR PUSTAKA

Arlene, A., 2010. Pembuatan Sabun dari Minyak Kemiri. Res. Rep.-Eng. Sci. 1.

BSN, 1998. Minyak Kemiri SNI 01-4462-1998. Badan Standardisasi Nasional, Jakarta.

BSN, 1996. Sabun Mandi Cair SNI 06-4085-1996. Badan Standardisasi Nasional, Jakarta.

Cella, R., Stefani, H.A., 2018. Ultrasonic Reactions, in: Green Techniques for Organic Synthesis and Medicinal Chemistry. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 343-371. <https://doi.org/10.1002/9781119288152.ch14>

Chen, J.W., Kalback, W.M., 1967. Effect of Ultrasound on Chemical Reaction Rate. Ind. Eng. Chem. Fundam. 6, 175-178 <https://doi.org/10.1021/i160022a003>.

Darmawan, S., 2006. Pembuatan Minyak Kemiri Dan Pemurniannya Dengan Arang Aktif Dan Bentonit. J. Penelit. Has. Hutan 24, 413-423. <https://doi.org/10.20886/jphh.2006.24.5.413-423>

Davis, W.W., McGuire, J.M., Parke, T.V., 1949. Some new procedures and instruments useful for microbiological antibiotic testing by diffusion methods. I. A new zone reader. J. Am. Pharm. Assoc. 38, 459-462. <https://doi.org/10.1002/jps.3030380813>

Desiyanto, F.A., Djannah, S.N., 2013. Efektivitas Mencuci Tangan Menggunakan Cairan Pembersih Tangan Antiseptik (Hand Sanitizer) Terhadap Jumlah Angka Kuman. Kes Mas J. Fak. Kesehat. Masy. 7, 75-82. <https://doi.org/10.12928/kesmas.v7i2.1041>

George, E.D., Raymond, D.J., 2016. 3 - Formulation of Traditional Soap Cleansing Systems, in: Spitz, L. (Ed.), Soap Manufacturing Technology (Second Edition). AOCS Press, pp. 55-72. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-065-8.50003-7>

Hernani, Bunasor, T.K., Fitriati, 2010. Formula Sabun Transparan Antijamur dengan Bahan Aktif Ekstrak Lengkuas (Alpinia

- galanga L.Swartz.). *Bul. Penelit. Tanam. Rempah Dan Obat* 21, 192–205.
- Hielscher, 2020. Ultrasonic Dissolving of Solids in Liquid [WWW Document]. Hielscher. URL <https://www.hielscher.com/ultrasonic-dissolving-of-solids-in-liquids.htm> (accessed 6.23.20).
- Jalaluddin, Aji, A., Nuriani, S., 2018. Pemanfaatan Minyak Sereh (*Cymbopogon nardus* L.) sebagai Antioksidan pada Sabun Mandi Padat. *J. Teknol. Kim. Unimal* 17, 56–60.
- Kaseng, E.S., Muhlishah, N., Irawan, S., 2016. Uji Daya Hambat terhadap Pertumbuhan Bakteri Uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Ekstrak Etanol Daun Mangrove *Rhizophora mucronata* dan Efek Antidiabetiknya pada Mencit yang Diinduksi Aloksan. *Bionature* 17, 1–6.
- Ketaren, S., 1986. Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan. UI Press, Jakarta.
- Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V., Fazly Bazzaz, B.S., 2019. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 8, 118–118. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0559-6>
- Kumalasari, D., Fasya, A.G., Adi, T.K., Maunatin, A., 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Mikroalga *Chlorella* sp. *Alchemy J. Chem.* 3, 163–172.
- Mady, M.F., El-Kateb, A.A., Zeid, I.F., Jørgensen, K.B., 2012. Comparative Studies on Conventional and Ultrasound-Assisted Synthesis of Novel Homoallylic Alcohol Derivatives Linked to Sulfonyl Dibenzenes Moiety in Aqueous Media. *J. Chem.* 2013, 364036.
- Riaz, S., Ahmad, A., Hasnain, S., 2009. Antibacterial Activity of Soaps Against Daily Encountered Bacteria. *Afr. J. Biotechnol.* 8, 1431–1436.
- Subroto, E., Widjojokusumo, E., Veriansyah, B., Tjandrawinata, R.R., 2017. Supercritical CO₂ extraction of candlenut oil: process optimization using Taguchi orthogonal array and physicochemical properties of the oil. *J. Food Sci. Technol.* 54, 1286–1292. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2542-7>
- Widyasanti, A., Rahayu, A.Y., Zein, S., 2017. Pembuatan Sabun Cair Berbasis Virgin Coconut Oil (VCO) Dengan Penambahan Minyak Melati (*Jasminum sambac*) Sebagai Essential Oil. *Teknotan J. Ind. Teknol. Pertan.* 11, 1–10. <https://doi.org/10.24198/jt.vol11n2.102>
- Yu, J.J., Manus, M.B., Mueller, O., Windsor, S.C., Horvath, J.E., Nunn, C.L., 2018. Antibacterial soap use impacts skin microbial communities in rural Madagascar. *Plos ONE* 13, e0199899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199899>