Indonesian Journal of Biological Pharmacy
Journal homepage: https://jurnal.unpad.ac.id/ijbp
Volume 3 No. 2
August 2023
Pages 83-95

Molecular Docking of Chemical Constituents of Dayak Onion (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) towards VHR Receptors as Candidates for Cervical Anticancer Drugs

Annisa D. Pitaloka*, Chaca Y. Nurhijriah, Kalina, Hanif A. Musyaffa, Annisa M. Azzahra

Departemen Analisis Farmasi dan Kimia Medisinal, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jawa Barat, Indonesia

Submitted 08 February 2023; Revised 06 March 2023; Accepted 16 March 2023; Published 30 August 2023
*Corresponding author: annisa19004@mail.unpad.ac.id

Abstract

Dayak Onion (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) is one of the typical plants that contain flavonoid compounds that have been utilized by the Dayak ethnic group in Central Kalimantan as an Anticancer drug. Cervical cancer is a malignant tumor originating from cervical epithelial cells. The intention of this study was to analyze the various utilities of secondary metabolites and the mechanism of action of Dayak Onion as an Anticancer in silico through the molecular docking method to the Vaccinia H1-related phosphatase (VHR) receptor using the AutoDock Tools program. Method validation has been performed with Root Mean Square Deviation (RMSD) value obtained at 0.57Å. In silico testing of the compounds from Dayak Onion (*E. palmifolia* (L.) Merr) found that Eleuthraquinone A had the lowest G value compared to other compounds and comparison compound 5-Fluorouracil, with binding energy values -9.41 kcal/mol and hydrogen bonds occurring at the amino acid residue GLU122, LEU124, and LYS61. Eleuthraquinone A fulfilled all requirements of Lipinski's rule of 5, had good absorption and distribution, and mutagenic but non-carcinogenic based on ADMET prediction results.

Keywords: Anticancer, Cervical Cancer, Dayak Onion, Molecular Docking, VHR

Penambatan Molekuler Konstituen Kimia Tumbuhan Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) terhadap Reseptor VHR sebagai Kandidat Obat Antikanker Serviks

Abstrak

Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) merupakan salah satu tumbuhan khas yang mengandung senyawa flavonoid yang telah dimanfaatkan oleh masyarakat Dayak di Kalimantan Tengah sebagai obat antikanker. Kanker serviks adalah tumor ganas yang berasal dari sel epitel serviks. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis berbagai kegunaan kandungan metabolit sekunder dan mekanisme kerja dari bawang dayak sebagai antikanker secara *in silico* melalui metode penambatan molekul pada reseptor *Vaccinia H1-related phosphatase* (VHR) menggunakan program *AutoDock Tools*. Validasi metode telah dilakukan dengan nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) yang diperoleh sebesar 0,57Å. Pengujian *in silico* terhadap senyawa yang terkandung dalam bawang dayak (*E. palmifolia* (L.) Merr) didapatkan hasil bahwa senyawa eleuthraquinone A memiliki nilai ΔG yang paling rendah dibandingkan senyawa lain dan senyawa senyawa pembanding 5-Fluorourasil, dengan nilai energi ikatan sebesar -9,41 kkal/mol dengan ikatan hidrogen pada residu asam amino GLU122, LEU124, dan LYS61. Senyawa eleuthraquinone A memenuhi semua aturan Lipinski, mempunyai absorpsi dan distribusi yang baik, dan bersifat mutagen tetapi tidak karsinogen berdasarkan hasil prediksi ADMET.

Kata Kunci: Antikanker, Bawang Dayak, Kanker Serviks, Penambatan Molekul, VHR

1. Pendahuluan

Kanker serviks merupakan penyakit kanker paling umum keempat pada wanita. Menurut WHO tahun 2018, diperkirakan sebanyak 570.000 wanita didiagnosis menderita kanker serviks di seluruh dunia dan sekitar 311.000 wanita meninggal karena penyakit tersebut.[1] Di Indonesia, kanker serviks menjadi penyakit kanker paling banyak kedua setelah kanker payudara.[2] Hampir semua kasus kanker serviks (99%) berhubungan dengan infeksi HPV (*Human papillomavirus*) yang merupakan virus yang sangat umum ditularkan melalui hubungan seksual.[1]

Vaccinia H1-related phosphatase (VHR) merupakan salah satu protein yang terlibat dalam kanker serviks. VHR termasuk ke dalam protein *tyrosine phosphatase* (PTP), yang berperan dalam koordinasi dengan protein tirosin kinase untuk mengontrol jalur persinyalan yang berhubungan dengan pertumbuhan, proliferasi, dan diferensiasi sel.[3,4] Telah diketahui bahwa PTP terlibat dalam berbagai penyakit, termasuk kanker serviks.[5] VHR mengalami peningkatan pada berbagai lini sel kanker serviks seperti CaSki, HeLa, dan SIHA.[6] Penghambatan pada VHR dapat memberikan efek antiproliferasi pada lini sel kanker HeLa. Hal tersebut menunjukkan bahwa VHR dapat menjadi target potensial untuk terapi kanker.[6,7]

Secara umum, metode pengobatan kanker terdiri atas operasi, terapi hormonal, radioterapi, atau kemoterapi.[8] Namun, penggunaan metode tersebut masih tergantung pada jenis tumor dan stadium perkembangannya. Sehingga dibutuhkan pengobatan alternatif, salah satunya dengan memanfaatkan senyawa potensial yang berasal dari tumbuhan. Salah satu tumbuhan yang dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan sel kanker adalah bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L) Merr.).[9]

Bawang dayak (*E. palmifolia* (L.) Merr.) merupakan tumbuhan yang berasal dari Amerika tropis dan banyak ditemukan di Kalimantan Tengah. Tumbuhan ini secara turun temurun digunakan oleh suku Dayak sebagai obat. Secara empiris, umbi dari bawang dayak berkhasiat untuk mengobati luka, penyakit batuk, sakit perut, kanker payudara dan kanker serviks.[10] Umbi bawang dayak mengandung banyak senyawa metabolit sekunder seperti golongan flavonoid yaitu Isoliquiritigenin. Selain itu, terdapat golongan naftokuinon dan turunannya seperti Elecanacin, Eleutherin, Eleuthoside B, Eleuthoside C, Eletherinoside A, Eleuthonine B, dan Eleuthonine C. Terdapat juga golongan antrakuinon dan turunannya yaitu Eleuthraquinone A, serta golongan polifenol yaitu Oxyresveratrol.[11–13]

Pada penelitian *in vitro* yang dilakukan oleh Muti'ah dkk (2019), membuktikan bahwa ekstrak etanol 96% umbi bawang dayak mampu menghambat pertumbuhan sel kanker serviks Hela melalui penghambatan siklus pertumbuhan sel dan induksi apoptosis sel dengan IC_{50} 40,36 µg/mL. Selain itu, telah dilakukan pengujian in silico terhadap beberapa senyawa yang terkandung dalam ekstrak bawang dayak (*E. palmifolia* (L.) Merr) dan didapatkan hasil bahwa senyawa Eleutherinoside A memiliki nilai ikatan energi sebesar -9,55 kkal/mol terhadap reseptor VHR yang lebih kecil dibandingkan dengan ligan alaminya.[12]

Studi penambatan molekul (*molecular docking*) merupakan suatu proses komputasi untuk mencari ligan yang cocok secara geometris dan energi terendah ke situs pengikatan protein.[14] Metode ini merupakan salah satu metode yang digunakan untuk meniru peristiwa interaksi dari suatu molekul ligan terhadap protein yang menjadi targetnya pada uji *in vitro* melalui simulasi model menggunakan komputer.[15] Oleh karena itu, sebagai rangkaian dalam pencarian obat antikanker serviks dilakukan penambatan molekul senyawa metabolit sekunder dari umbi bawang dayak yang belum pernah ditambatkan sebelumnya pada reseptor VHR disertai prediksi *Lipinski's Rule of Five*, ADMET dan pemodelan farmakofor.

2. Metode

2.1. Alat

Perangkat keras yang digunakan yaitu laptop pribadi Dell dengan spesifikasi processor Intel Core i5-6300U CPU @

2.40GHz 2.50GHZ, *memory* (RAM) 8.00 GB dengan sistem operasi Windows 10 64-bit.

Perangkat lunak yang digunakan antara lain aplikasi *ChemDraw Ultra* 12.0 serta Chem3D Pro 12.0 yang digunakan untuk menggambar struktur senyawa uji dan senyawa pembanding serta minimalisasi energi. Aplikasi *AutoDock Tools*-1.5.6 digunakan untuk melakukan analisis penambatan molekuler, BIOVIA *Discovery Studio* 2020 digunakan untuk dalam proses preparasi ligan dan reseptor serta untuk visualisasi hasil penambatan molekuler, dan LigandScout 4.4 untuk penentuan farmakofor. Situs yang digunakan antara lain situs *Protein Data Bank* (https://www.rscb.org/) digunakan untuk mengunduh struktur senyawa struktur protein reseptor, Pubchem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/) untuk mengunduh struktur senyawa uji dan senyawa pembanding, PreADMET (https://preadmet.bmdrc.kr/) untuk memprediksi absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas serta prediksi *Lipinski's Rule of Five* dari senyawa uji.

2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain struktur 3 dimensi protein VHR yang diunduh dari situs Protein Data Bank (https://www.rscb.org/) dengan ID PDB: 5UU1, serta struktur 3 dimensi sepuluh senyawa tumbuhan bawang dayak yaitu Oxyresveratrol, Isoliquiritigenin, Elacanacin, Eleutherin, Eleuthinone B, Eleuthinone C, Eleutherinoside A, Eleuthoside B, Eleuthoside C, dan Eleuthraquinone A yang digambar menggunakan perangkat lunak *ChemDraw Ultra* 12.0 serta Chem3D Pro 12.0.

2.3. Prosedur Rinci

2.3.1. Persiapan Reseptor dan Ligan

Struktur reseptor VHR yang diunduh pada situs *Protein Data Bank* (https://www.rcsb.org/) dengan format PDB dengan mencari ID PDB: 5UU1 pada kolom *search*. Struktur reseptor tersebut dibuka pada program BIOVIA *Discovery Studio* 2020 untuk menghilangkan molekul air dan memisahkan reseptor dengan ligan alaminya. Reseptor dan ligan yang telah dipisahkan disimpan dalam format PDB. Sementara itu, ligan berupa senyawa uji digambar dan diminimalisasi energinya menggunakan *ChemDraw Ultra* 12.0 serta Chem3D Pro 12, lalu disimpan dalam format PDB.

Persiapan ligan dan reseptor dilanjutkan menggunakan program *AutoDockTools*-1.5.6. Pada persiapan ligan, dilanjutkan dengan penambahan atom hidrogen, penggabungan senyawa menjadi non polar, penambahan muatan Gasteiger dan torsi. Sementara itu, pada persiapan reseptor dilanjutkan dengan penambahan muatan Kollman dan atom hidrogen polar. Setelah itu, ligan dan reseptor disimpan dalam format .pdbqt.

2.3.2. Validasi Metode Penambatan Molekuler

Validasi metode penambatan molekuler dilakukan dengan menambatkan kembali ligan alami pada reseptor dalam aplikasi AutoDock untuk menentukan posisi dan ukuran grid box yang akan digunakan pada simulasi penambatan molekuler. Pada penelitian ini, digunakan ukuran *grid box* (x = 40; y = 40; z = 40) dengan koordinat (x = 0,539; y = -18,004; z = -13,408) dan jarak 0,37 Å yang disimpan dalam format .gpf. Parameter *docking* dibuat menggunakan parameter *genetic algorithm* dengan jumlah GA Run 100 dan output Lamarckian GA, lalu disimpan dalam format .dpf. Setelah itu, dilakukan proses penambatan kembali menggunakan *command prompt*.

2.3.3. Simulasi Penambatan Molekuler

Struktur senyawa uji yang telah digambar secara 2D pada aplikasi *ChemDraw* diubah ke dalam bentuk 3D dan dilakukan minimalisasi energi pada aplikasi Chem3D, lalu disimpan dalam format .pdb. Setelah itu, dilakukan preparasi untuk ligan seperti yang ada pada prosedur sebelumnya. Penambatan molekuler antara senyawa uji sebagai ligan dengan reseptor VHR sebagai makromolekul atau protein dilakukan menggunakan command prompt dengan pengaturan seperti pada validasi metode penambatan molekuler. Analisis hasil simulasi penambatan molekuler dilakukan pada aplikasi BIOVIA *Discovery*

Studio untuk visualisasi interaksi ligan dengan reseptor secara 2D maupun 3D.

2.3.4. Pemodelan Farmakofor

Pemodelan farmakofor senyawa uji dilakukan pada aplikasi *Ligandscout* dengan menggunakan fitur *create pharmacophore*. Hasil yang didapatkan berupa gambar dalam bentuk 2D dan 3D beserta ikatan-ikatan pada senyawa uji.

2.3.5. Prediksi *Lipinski's Rule of Five*

Prediksi *Lipinski's Rule of Five* dilakukan pada situs PreADMET (http://preadmet.bmdrc.kr/) dengan mengunggah struktur 2D senyawa uji. Tahapan ini dilakukan untuk memprediksi profil *druglikeness* dari senyawa uji meliputi parameter bobot molekul, nilai log P, ikatan hidrogen donor dan ikatan hidrogen akseptor.

2.3.6. Prediksi ADMET

Prediksi ADMET (Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi, dan Toksisitas) dilakukan dengan mengunggah struktur 2D senyawa uji pada situs PreADMET (http://preadmet.bmdrc.kr/). Parameter yang dianalisis pada tahap ini antara lain nilai *Human Intestinal Absorpsion* (%HIA), *Cancer coli*-2 (Caco-2), *Blood Brain Barrier Penetration* (BBB), *Plasma Protein Binding* (PPB), serta *Ames Test* dan *Rodent Carcinogenicity* untuk penentuan toksisitas. Hasil analisa dapat diunduh dalam format .pdf.

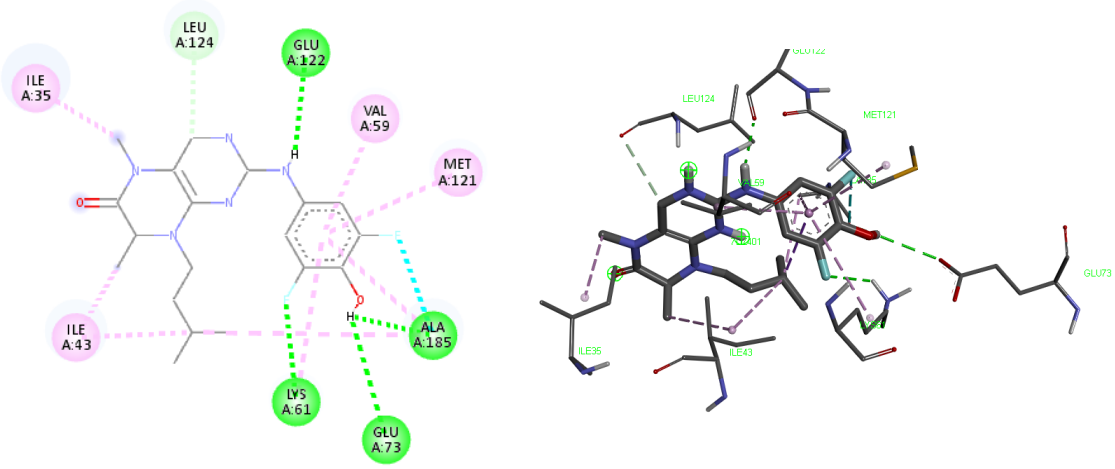
3. Hasil

3.1. Hasil validasi metode penambatan molekuler

Validasi metode merupakan tahapan untuk menguji program yang akan digunakan untuk penambatan molekuler apakah sudah memenuhi syarat atau tidak. Validasi metode ini dilakukan dengan cara menambatkan ulang atau *re-docking* antara ligan alami dari reseptor target dengan reseptor targetnya menggunakan aplikasi *Autodock Tools*. Proses validasi metode ini dilakukan dengan menambatkan kembali ligan alami (BI-D1870) atau senyawa (7S)-2-[(3,5-difluoro-4-hydroxyphenyl)amino]-5,7-dimethyl-8-(3-methylbutyl)-7,8-dihydropteridin-6(5H)-one dengan reseptor VHR (PDB IDE: 5UU1). Parameter yang dilihat dari hasil validasi yaitu nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) dan nilai energi ikatan yang negatif. Pengujian dinyatakan valid ketika hasil RMSD ≤ 2 Å.[16] Hasil validasi metode penambatan molekuler menghasilkan nilai RMSD sebesar 0,57 Å dengan energi ikatan sebesar -8,01 kkal/mol. Visualisasi interaksi senyawa ligan alami dengan protein reseptor VHR pada validasi metode dapat dilihat pada Gambar 1.

3.2. Simulasi penambatan molekuler

Simulasi penambatan molekuler dilakukan pada senyawa uji dan senyawa pembanding dengan reseptor VHR. Hasil dari uji penambatan molekuler pada 10 senyawa



Gambar 1. Interaksi ligan alami dengan reseptor VHR. Interaksi berupa ikatan hidrogen ditandai dengan lingkaran berwarna hijau.

uji yang terdapat pada bawang dayak (*E. palmifolia* (L.) Merr) menunjukkan hasil yang cukup baik dimana semua senyawa uji memiliki energi ikatan bebas yang lebih kecil dari obat pembanding, yaitu 5-Fluorourasil. Semakin kecil energi bebas Gibbs atau *binding energy* maka kemampuan ligan dan reseptor berikatan semakin tinggi.[17] Selain energi bebas Gibbs, terdapat pula parameter konstanta inhibisi dimana nilai konstanta inhibisi ini berbanding lurus dengan nilai energi bebas Gibbs dan hampir semua senyawa uji memiliki nilai konstanta inhibisi yang lebih kecil dari obat pembanding. Senyawa Eleuthraquinone A memiliki energi bebas Gibbs yang paling kecil diantara semua senyawa uji. Namun, energi bebas Gibbs bukanlah satu-satunya parameter yang menunjukkan bahwa senyawa tersebut dapat digunakan sebagai senyawa aktif untuk kanker serviks. Masih terdapat beberapa parameter yang dapat menjadi acuan. Hasil penambatan molekuler senyawa uji dapat dilihat pada Tabel 1.

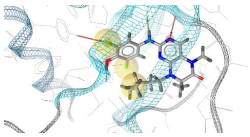
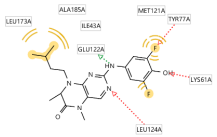
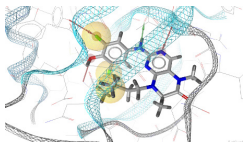
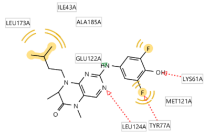
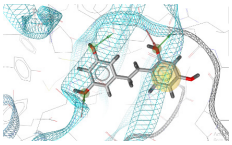
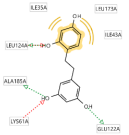
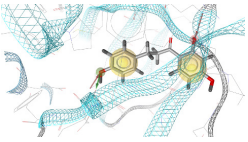
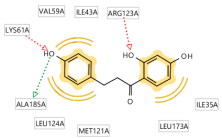
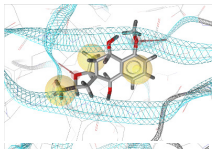
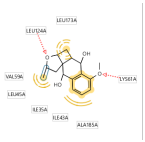
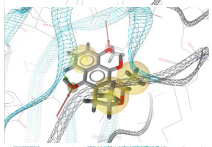
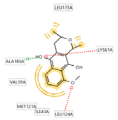
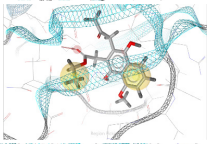
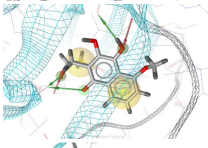
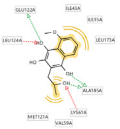
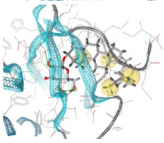
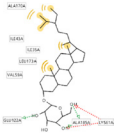
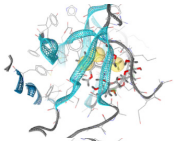
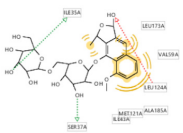
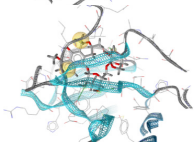
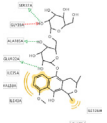
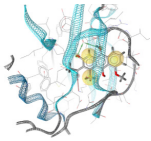
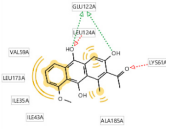
3.3. Pemodelan Farmakofor

Pemodelan farmakofor pada senyawa uji dari bawang dayak (*E. palmifolia* (L.) Merr) dilakukan untuk melihat berapa besar kemiripan ikatan suatu ligan uji dengan ligan alami pada reseptor VHR yang bertanggung jawab atas aktivitas biologis. Tabel 2 menunjukkan visualisasi pemodelan

Tabel 1. Hasil penambatan molekuler

No	Senyawa	Cluster	Energi Ikatan (kkal/mol)	Ki (uM)	Interaksi dengan Asam Amino	
					Ikatan Hidrogen	Ikatan Lainnya
1	Ligan alami (BI-D1870)	82	-8,10	1,16	GLU122, LYS61, GLU73, ALA185, LEU124	ILE35, ILE43, MET121, VAL59
2	5-Fluorourasil (obat pembanding)	100	-3,92	1350	GLU122, LEU124, ALA18	LEU173, VAL59
3	Oxyresveratrol	85	-7,80	1,93	ALA185, ALA170, ASN171, GLU122, GLY39	LEU124, MET121
4	Isoliquiritigenin	75	-8,50	0,59	LEU124, ALA 185	ILE35, ILE43, LEU173, MET121, VAL59
5	Elacanacin	100	-7,97	1,61	LEU124, LYS61, ALA185	MET121, VAL59, LEU173, ARG123, ILE35, ILE43
6	Eleutherin	98	-7,47	3,34	LYS61, GLY38	VAL59, ARG123, ILE43, LEU124, ALA184, LEU173
7	Eleuthinone B	5	-7,95	1,50	LEU124, LYS61, SER37	ILE43, ARG123, VAL59, ILE35, ALA185, GLU122
8	Eleuthinone C	1	-7,08	6,48	LEU124, GLU122, ALA185, LYS61, GLY125	VAL59, MET121, ILE43, LEU173
9	Eleutherinoside A	61	-9,02	0,42	LEU124	ARG123, ALA170
10	Eleuthoside B	43	-8,60	0,50	LYS61, ASP127, ILE35, SER37, GLY38, ASN171	LEU124, LEU173, VAL59, ILE43, ALA185
11	Eleuthoside C	74	-7,28	4,62	LYS61, GLU122, LEU124, ALA170, GLY38	ASP127
12	Eleuthraquinone A	100	-9,41	0,13	GLU122, LEU124, LYS61	MET121, VAL59, LEU173, ALA185, ILE43, ILE35

Tabel 2. Visualisasi pemodelan farmakofor

No	Senyawa	Hasil Visualisasi	
		3D	2D
1.	Ligan alami (BI-D1870)		
2.	5-Fluorourasil		
3.	Oxyresveratrol		
4.	Isoliquiritigenin		
5	Elacanacin		
6	Eleutherin		
7	Eleuthinone B		
8	Eleuthinone C		
9.	Eleutherinoside A		
10	Eleuthoside B		
11	Eleuthoside C		
12.	Eleuthraquinone A		

farmakofor pada ligan alami dan senyawa uji.

3.4. Prediksi *Lipinski's Rule of Five*

Prediksi parameter fisikokimia atau profil *druglikeness* ditentukan berdasarkan Lipinski's Rule of Five melalui parameter bobot molekul, nilai Log P, ikatan hidrogen donor serta ikatan hidrogen akseptor. Hasil prediksi menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa uji dari bawang dayak (*E. palmifolia* (L.) Merr) memenuhi syarat aturan Lipinski tetapi terdapat dua senyawa uji yang tidak memenuhi syarat yaitu senyawa Eleuthoside B dan Eleuthoside C. Hasil prediksi *Lipinski's Rule of Five* dapat dilihat pada Tabel 3.

3.5. Prediksi ADMET

Hasil prediksi ADMET menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa uji diprediksikan memiliki parameter absorpsi dan distribusi yang baik berdasarkan parameter nilai %HIA serta Caco-2 sebagai parameter absorpsi, dan nilai %PPB serta BBB sebagai parameter distribusi. Pengujian toksisitas menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa uji bersifat mutagenik tetapi non karsinogenik berdasarkan *Ames test* dan *Rodent Carcinogenicity*. Hasil prediksi Pre-ADMET senyawa uji terdapat pada Tabel 4.

4. Pembahasan

Penambatan molekuler merupakan salah satu upaya untuk mencari kandidat obat yang berasal dari senyawa metabolit sekunder tumbuhan secara *in silico*. Penambatan molekuler dapat memberikan informasi berupa interaksi senyawa metabolit yang berperan sebagai ligan dengan reseptor yang ada dalam tubuh manusia. Pada studi *in silico* ini, dilakukan simulasi penambatan molekuler senyawa metabolit sekunder yang berasal dari bawang dayak (*E. palmifolia* (L) Merr.) dengan reseptor target VHR dengan PDB ID 5UU1. Reseptor VHR dengan PDB ID 5UU1 dipilih karena reseptor ini tidak mengalami mutasi dan dalam struktur ko-kristalnya terdapat ligan alami BI-D1870, molekul kecil yang menginhibisi reseptor VHR yang merupakan target potensial untuk pencarian obat antikanker serviks.[18] Adanya sisi aktif reseptor yang berikatan pada ligan alaminya

Tabel 3. Hasil prediksi *Lipinski's Rule of Five*

No	Nama Senyawa	Berat Molekul (g/mol)	CLogP	Ikatan Hidrogen donor	Ikatan hidrogen akseptor	Pelanggaran RO5	Drug Likeness
1.	5-Fluorourasil	130,078	-0,798	2	3	0	Memenuhi
2.	Oxyresveratrol	246,262	2,294	4	4	0	Memenuhi
3.	Isoliquiritigenin	258,273	3,387	3	4	0	Memenuhi
4.	Elacanacin	2276,332	1,387	2	4	0	Memenuhi
5.	Eleutherin	274,316	2,995	2	4	0	Memenuhi
6.	Eleuthinone B	332,352	2,497	1	1	0	Memenuhi
7.	Eleuthinone C	264,277	1,889	2	2	0	Memenuhi
8.	Eleutherinoside A	578,875	5,643	4	6	Berat molekul	Memenuhi
9.	Eleuthoside B	568,528	-3,008	7	13	Berat molekul, donor ikatan H, akseptor ikatan H	Tidak memenuhi
10.	Eleuthoside C	598,598	-2,280	8	14	Berat molekul, donor ikatan H, akseptor ikatan H	Tidak memenuhi
11.	Eleuthraquinone A	312,321	3,398	3	5	0	Memenuhi

Tabel 3. Hasil prediksi ADMET

No	Nama Senyawa	Absorbsi		Distribusi		Toksisitas	
		HIA (%)	Caco-2	PPB	BBB	Mutagen	Karsinogen
1.	5-Fluorourasil	75,925	17,253	8.,130	0,199	+	*Mouse:* + *Rats:* +
2.	Oxyresveratrol	80,536	19,848	100,00	0,174	+	*Mouse:* + *Rats:* -
3.	Isoliquiritigenin	88,310	20,160	98,253	1,132	+	*Mouse:* + *Rats:* +
4.	Elacanacin	98,141	16,364	73,613	1,398	+	*Mouse:* + *Rats :* +
5.	Eleutherin	98,102	31,311	87,301	2,019	+	*Mouse:* - *Rats :* +
6.	Eleuthinone B	96,450	18,477	66,045	0,255	+	*Mouse:* - *Rats :* -
7.	Eleuthinone C	89,831	20,745	80,075	0,493	+	*Mouse:* - *Rats :* +
8.	Eleutherinoside A	74,290	11,773	66,288	0,045	+	*Mouse:* - *Rats :* -
9.	Eleuthoside B	21,673	12,171	35,259	0,030	-	*Mouse:* - *Rats :* -
10.	Eleuthoside C	20,193	9,093	35,601	0,031	-	*Mouse:* - *Rats :* -
11.	Eleuthraquinone A	96,696	21,151	90,433	1,175	+	*Mouse:* - *Rats :* +

menyebabkan reseptor ini dapat digunakan untuk mengetahui interaksi antara ligan dan reseptor pada proses simulasi penambatan molekuler. Selain itu, reseptor ini terdapat pada organisme manusia (*Homo sapiens*). Parameter nilai resolusi struktur kristal reseptor pun menjadi pertimbangan. Nilai resolusi menentukan stabilitas dari struktur kristal, yang mana struktur kristal reseptor dinyatakan stabil apabila mempunyai nilai resolusi < 2,5 Å.[19] Nilai resolusi yang kecil pun menunjukkan bahwa kristal memiliki struktur resolusi yang tinggi karena atom-atom penyusunnya mendekati keadaan sebenarnya. Struktur reseptor VHR dengan PDB IDE 5UU1 memiliki resolusi 2,00Å sehingga dapat dinyatakan bahwa struktur kristal reseptor ini stabil dan memiliki struktur resolusi yang tinggi.

Penambatan molekuler dilakukan untuk memprediksikan interaksi atau modus pengikatan antara ligan dan reseptor serta energi ikatannya.[20] Sebelum dilakukan uji penambatan molekuler, dilakukan terlebih dahulu validasi metode dengan cara memisahkan reseptor VHR dari ligan alaminya menggunakan perangkat lunak BIOVIA *Discovery Studio Visualizer*® kemudian dilakukan penambatan ulang menggunakan aplikasi AutoDock. Validasi metode penambatan molekuler dilakukan untuk mengukur kemampuan metode penambatan molekuler untuk menghasilkan konformasi ligan yang mirip dengan hasil eksperimen.[21] Pada validasi metode dengan penambatan ulang reseptor VHR dan ligan alaminya, didapatkan nilai RMSD sebesar 0,57Å dan nilai energi ikatan sebesar -8,01 kkal/mol. Validasi metode dikatakan baik dan sesuai ketika nilai RMSD yang diperoleh <2Å.[16] Nilai RMSD merupakan parameter yang digunakan untuk mengevaluasi kemiripan dua buah struktur, dalam hal ini dinilai dari RMSD atom-atom berat antara konformasi penambatan molekul dengan hasil eksperimen.[22–24] Nilai RMSD menentukan besarnya akurasi perhitungan, dimana semakin kecil nilai RMSD maka semakin kecil kesalahan perhitungan sehingga dapat dikatakan lebih akurat.[25] Pada hasil

penambatan molekuler ligan alami dengan reseptor VHR, terdapat interaksi antara ligan alami dengan residu, melalui 5 ikatan hidrogen yang melibatkan 5 asam amino yaitu GLU122, LYS61, GLU73, ALA185, dan LEU124. Selain ikatan hidrogen, terdapat juga interaksi lain yang melibatkan ILE35, ILE43, MET121, dan VAL59. Visualisasi hasil penambatan ulang dapat dilihat pada Gambar 1.

Ligan yang diuji pada penelitian ini berasal dari senyawa-senyawa yang terdapat dalam umbi bawang dayak (*E. palmifolia* (L) Merr.) antara lain Oxyresveratrol, Isoliquiritigenin, Elacanacin, Eleutherin, Eleuthinone B, Eleuthinone C, Eleutherinoside A, Eleuthoside B, Eleuthoside C, dan Eleuthraquinone A. Senyawa Oxyresveratrol dan Isoliquiritigenin termasuk ke dalam senyawa polifenol dan flavonoid yang berpotensi sebagai antikanker dengan menghambat proliferasi sel kanker.[13] Sementara itu, senyawa Elacanacin, Eleutherin, Eleuthinone B, Eleuthinone C, Eleutherinoside A, Eleuthoside B, Eleuthoside C, dan Eleuthraquinone A termasuk ke dalam senyawa naftalen, antarkuinon, dan naftokuinon yang merupakan tiga konstituen utama dalam umbi bawang dayak.[26,27] Beberapa studi telah menemukan bahwa senyawa naftokuinon dan turunannya berpotensi memiliki aktivitas antikanker. Naftokuinon mampu menghambat proliferasi dan menginduksi apoptosi pada sel kanker.[28–31]

Pada simulasi penambatan molekuler, hasil penambatan molekul dapat dilihat dari parameter nilai energi bebas Gibbs atau energi ikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi (KI). Semakin negatif nilai ikatan energi dan semakin kecil nilai konstanta inhibisi menunjukkan afinitas ligan yang semakin tinggi, karena terjadi kestabilan dan kekuatan interaksi non-kovalen pada senyawa dengan reseptor.[12,32,33]

Setelah ke-10 senyawa uji dilakukan penambatan terhadap reseptor VHR, selanjutnya akan dianalisis untuk menentukan senyawa uji mana yang paling baik. Dalam pemilihan senyawa uji ini, terdapat salah satu pengujian yaitu pengujian afinitas dari masing masing senyawa uji. Terdapat empat parameter yang dipertimbangkan untuk menentukan afinitas senyawa, antara lain ΔG, konstanta inhibisi, ikatan hidrogen, dan interaksi Van der Waals. Berdasarkan hasil penambatan molekuler yang ditunjukkan pada Tabel 1, senyawa Eleuthraquinone A memiliki nilai ΔG yang paling rendah yaitu sebesar -9,41 kkal/mol. Hal ini menunjukkan bahwa interaksi antara Eleuthraquinone A dengan VHR lebih baik dibandingkan senyawa lainnya serta senyawa pembandingnya yaitu 5-Fluorourasil. Pada penelitian ini, 5-Fluorourasil dipilih sebagai senyawa pembanding karena merupakan kemoterapi yang paling banyak digunakan pada penatalaksanaan penyakit kanker serviks, yang pada umumnya dikombinasikan dengan Cisplatin. 5-Fluorourasil merupakan antimetabolit yang bekerja dengan menginhibisi enzim timidilat sintase yang penting untuk sintesis DNA.[34–36] Berdasarkan parameter ikatan energi, semakin negatif nilai ikatan energi dan semakin kecil nilai konstanta inhibisi menunjukkan afinitas ligan yang semakin tinggi karena terjadi kestabilan dan kekuatan interaksi non-kovalen pada senyawa dengan reseptor. Parameter selanjutnya yang dilihat adalah konstanta inhibisi (KI). Dari seluruh senyawa yang diujikan, Eleuthraquinone A memiliki nilai KI yang paling rendah diantara senyawa lainnya, yaitu sebesar 0,126 μM. Nilai konstanta inhibisi ini berbanding lurus dengan ΔG. Oleh karena itu semakin kecil nilai KI, maka akan semakin baik afinitas ligan-reseptor serta akan semakin baik aktivitasnya, dalam hal ini aktivitas penghambatan reseptor VHR oleh senyawa uji.

Analisis kemiripan ikatan asam amino senyawa uji dengan ligan penting dilakukan agar dapat meninjau kemampuan ligan uji untuk berinteraksi dengan *Ligan Binding Domain* (LBD) dari protein target. Dalam pengujian ini, Eleutherinoside A memiliki kemiripan ikatan asam amino dengan ikatan hidrogen pada residu GLU122, LEU124, dan LYS61. Selain itu, terdapat kemiripan ikatan lain pula yang melibatkan residu MET121, VAL59, ILE43, dan ILE35. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa Eleuthraquinone A mungkin memiliki aktivitas biologi yang sama dengan ligan

alami.

Pemodelan farmakofor dilakukan terhadap ligan alami, obat pembanding, dan senyawa uji. Pemodelan farmakofor ini dilakukan untuk mengetahui apa saja fitur-fitur farmakofor yang menunjukkan adanya interaksi antara ligan dan reseptor serta menunjukkan adanya aktivitas biologis dari ligan. Hasil pemodelan farmakofor dari obat pembanding dan reseptor VHR menunjukkan adanya interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen. Terdapat 4 interaksi hidrofobik terhadap asam amino LEU173, ILE43, ALA185, dan MET121, 1 ikatan hidrogen donor terhadap asam amino GLU122, dan 3 ikatan hidrogen akseptor terhadap asam amino LEU124, TYR77, dan LYS61. Setelah semua senyawa uji dilakukan pemodelan farmakofor, senyawa uji Eleuthraquinon A memiliki kesamaan fitur-fitur farmakofor terbanyak dengan obat pembanding dibandingkan senyawa uji lainnya. Interaksi yang terjadi antara Eleuthraquinone A adalah interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen. Terdapat 5 interaksi hidrofobik terhadap asam amino VAL59, LEU174, ILE35, ILE43, ALA185, 2 ikatan hidrogen donor yang keduanya berinteraksi dengan asam amino GLU122, dan 2 ikatan hidrogen akseptor terhadap asam amino LEU124 dan LYS61. Oleh karena itu, berdasarkan pemodelan farmakofor, Eleuthraquinone A kemungkinan memiliki aktivitas biologis terhadap reseptor VHR.

Dalam pengembangan obat baru, kelarutan dan permeabilitas perlu diperhatikan untuk menghindari kegagalan pengembangan obat akibat absorpsi obat yang rendah. Prediksi parameter fisikokimia berupa kelarutan dan permeabilitas ditentukan berdasarkan Lipinski's Rule of Five yang menyatakan bahwa obat yang akan digunakan secara oral harus memenuhi lima syarat, meliputi lipofilisitas (C Log P) tidak lebih dari 5, jumlah donor ikatan hidrogen tidak lebih dari 5, jumlah akseptor ikatan hidrogen tidak lebih dari 10 dan bobot molekul (BM) tidak lebih dari 500 g/mol.[37] Terdapat delapan ligan uji yang memenuhi aturan *Lipinski's rule of five*. Namun, senyawa Eleuthoside B dan Eleuthoside C tidak memenuhi aturan Lipinski. Kedua senyawa tersebut memiliki bobot molekul, donor ikatan H dan akseptor ikatan H yang lebih besar dari aturan. Senyawa uji yang tidak memenuhi aturan Lipinski tidak disarankan untuk digunakan sebagai sediaan oral. Hal ini dikarenakan, bobot molekul yang lebih dari 500 g/mol akan sulit berpenetrasi melalui membran pencernaan.[38] Selain itu, jumlah donor ikatan hidrogen menunjukkan semakin besar kapasitas hidrogen maka semakin tinggi energi yang dibutuhkan agar terjadi proses absorpsi.[39] Oleh karena itu, kedua senyawa tersebut menunjukkan sifat absorpsi yang kurang baik.

Prediksi aspek absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi dan toksisitas penting dilakukan dalam proses pengembangan obat. Profil farmakokinetik dan toksisitas dapat diprediksi secara *in silico*. Profil absorpsi ditinjau berdasarkan kemampuan obat terabsorpsi dalam usus atau *Human Intestinal Absorbtion* (HIA) dan kemampuan permeabilitas pada sel *Human Colon Adenocarcinoma* (Caco-2). HIA merupakan penjumlahan dari bioavailabilitas dan absorbsi yang dievaluasi dari rasio ekskresi dalam urin, empedu dan feses.[40] Sebagian besar senyawa dari umbi bawang dayak (*E. palmifolia* (L.) Merr) mempunyai persentase HIA dalam rentang baik (70-100%) yang menunjukkan absorpsi yang baik dalam usus kecuali senyawa Eleuthoside B dan Eleuthoside C yang mempunyai persentase HIA dalam rentang sedang (20-70%). Sel Caco-2 merupakan model *in vitro* yang menunjukkan absorpsi obat melalui epitel usus yang berasal dari adenocarcinoma kolon manusia yang memiliki jalur transportasi ganda.[40] Seluruh senyawa uji memiliki permeabilitas yang sedang (4-70 nm/sec) melalui sel epitel usus.

Profil distribusi ditinjau berdasarkan keterikatan pada protein plasma (*Plasma Protein Binding*) dan penetrasi dalam sawar darah otak (*Blood Brain Barrier Penetration*). *Plasma Protein Binding* (PPB) menunjukkan fraksi obat yang tersedia dalam bentuk bebas yang dapat didistribusikan ke berbagai jaringan.[40] Pengikatan protein plasma dinyatakan dengan persentase dalam kisaran 0-100% yang mewakili kekuatan ikatan.

Ikatan protein plasma memiliki peran yang penting dalam efek terapeutik obat karena pada umumnya obat yang mampu berdifusi atau melintasi membran sel dan berinteraksi dengan target farmakologi merupakan obat dalam bentuk bebas. Pada umumnya, obat berinteraksi secara *reversible* melalui ikatan kimia yang lemah seperti ikatan hidrogen dan Van der Waals.[41] Sebagian besar senyawa uji memiliki PPB kurang dari 90% yang menunjukkan ikatan lemah. Senyawa Oxyresveratrol, Isoliquiritigenin dan Eleuthraquinone A memiliki nilai PPB lebih besar dari 90% yang menunjukkan ikatan yang kuat. *Blood-Brain Barrier* (BBB) sangat penting dalam pengembangan obat yang memiliki aktivitas di sistem saraf pusat karena harus melewatinya. Nilai penetrasi BBB dinyatakan sebagai rasio konsentrasi dari senyawa uji pada otak dan darah. Sebagian besar senyawa uji memiliki kemampuan menembus sawar darah otak yang menengah karena memiliki nilai BBB yang berada pada rentang 2,0-0,1. Senyawa Eleutherinoside A, Eleuthoside B dan Eleuthoside C memiliki kemampuan menembus sawar darah otak yang rendah sedangkan senyawa Eleutherin memiliki kemampuan menembus sawar darah otak yang tinggi.

Profil toksisitas ditinjau berdasarkan sifat mutagenik dan karsinogenik yang diprediksi melalui *Ames Test* dan *Rodent Carcinogenicity*. *Ames test* merupakan pengujian yang bertujuan untuk mengetahui potensi mutagenik senyawa kimia dengan pendekatan biologi menggunakan bakteri.[42] Hasil prediksi profil toksisitas menunjukkan sebagian besar senyawa uji dari bawang dayak bersifat mutagenik tetapi non karsinogenik. Senyawa Eleutherin, Eleuthinone C, dan Eleuthraquinone A bersifat mutagenik, karsinogenik pada tikus tetapi non karsinogen pada mencit, yang berarti berpotensi menyebabkan kanker pada tikus tetapi tidak pada mencit.[43] Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan mengoptimasi struktur senyawa untuk menghilangkan sifat mutagenik pada senyawa uji jika akan dikembangkan menjadi obat. Hal ini disebabkan struktur kimia mempengaruhi respons mutagenik dari suatu senyawa.

5. Simpulan

Berdasarkan hasil pengujian terhadap 10 senyawa dalam bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr), Eleuthraquinone A terhadap reseptor VHR memiliki nilai ΔG yang paling rendah yaitu sebesar -9,41 kkal/mol. Hal ini menunjukkan bahwa interaksi antara Eleuthraquinone A dengan VHR diatas senyawa lainnya serta diatas senyawa pembandingnya yaitu 5-Fluorourasil. Eleuthraquinone A memiliki nilai KI yang paling rendah diantara senyawa lainnya dimana nilai dari KI nya itu sendiri sebesar 0.126 µM, mempunyai profil absorpsi dan distribusi yang baik sebagai kandidat obat, serta mempunyai kemiripan ikatan asam amino dengan ligan alami yaitu ikatan hidrogen pada residu GLU122, LEU124, dan LYS61. Namun, hasil prediksi toksisitas menunjukkan sebagian besar senyawa uji bersifat mutagenik tetapi non karsinogenik. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan mengoptimasi struktur senyawa untuk menghilangkan sifat mutagenik pada senyawa uji.

Daftar Pustaka

1. WHO. Cervical Cancer. [diunduh 1 April 2021]. Tersedia dari: https://www.who.int/health-topics/cervical-cancer.
2. P2PTM. Buku Pedoman Manajemen Penyakit Tidak Menular. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia Direktorat Pencegahan dan Pengendalian Penyakit Tidak Menular; 2019.
3. Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7(11):833–46.
4. Bollu LR, Mazumdar A, Savage MI, Brown PH. Molecular Pathways: Targeting Protein Tyrosine Phosphatases in Cancer. Clin Cancer Res. 2017;23(9):2136–42.
5. Hendriks WJAJ, Pulido R. Protein tyrosine phosphatase variants in human hereditary disorders and disease susceptibilities. Biochim Biophys Acta. 2013;1832(10):1673–96.
6. Wu S, Vossius S, Rahmouni S, Miletic A

V, Vang T, Vazquez-Rodriguez J, et al. Multidentate small-molecule inhibitors of vaccinia H1-related (VHR) phosphatase decrease proliferation of cervix cancer cells. J Med Chem. 2009;52(21):6716–23.
7. Henkens R, Delvenne P, Arafa M, Moutschen M, Zeddou M, Tautz L, et al. Cervix carcinoma is associated with an up-regulation and nuclear localization of the dual-specificity protein phosphatase VHR. BMC Cancer. 2008;8:147.
8. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. Int J Biol Sci. 2017;13(11):1387–97.
9. Mutiah R. Kajian Efek Ekstrak Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr.). J Islam Pharm. 2020;5(2):14–26.
10. Puspadewi R, Putranti A, M R. Khasiat Umbi Bawang Dayak (Eleutherine palmifolia (L.) Merr.) sebagai Herbal Antimikroba Kulit. Kartika J Ilm Farm. 2013;1(1):31–7.
11. Hidayah A, Kiki M, Leni P. Uji Aktivitas Antioksidan Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine bulbosa* Merr.). In: Prosiding Penelitian SPeSIA Unisba. Bandung: Universitas Islam Bandung; 2015.
12. Narko T, Benny P, Riska P, Dang S, Faridhatul K. Molecular Docking Study of Bulb Of Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) Compound as Anti Servical Cancer. J Ilm Farm Bahari. 2017;8(2):1–14.
13. Muti'ah R, Trian S, Risma A, Erna S. Compound Identification and Anticancer Activity of Ethyl Acetate Fraction from Bawang Sabrang (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr.) on HeLa Cervical Cancer Cell Line. Indones J Cancer Chemoprevention. 2019;10(3):131–9.
14. Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. Curr Comput Aided Drug Des. 2011;7(2):146–57.
15. Pinzi L, Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. Int J Mol Sci [Internet]. 2019 Sep 4;20(18):4331.
16. Kontoyianni M, McClellan LM, Sokol GS. Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms. J Med Chem. 2004;47(3):558–65.
17. Du X, Li Y, Xia YL, Ai SM, Liang J, Sang P, et al. Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. Int J Mol Sci. 2016;17(2).
18. Couñago RM, Allerston CK, Savitsky P, Azevedo H, Godoi PH, Wells CI, et al. Structural characterization of human Vaccinia-Related Kinases (VRK) bound to small-molecule inhibitors identifies different P-loop conformations. Sci Rep. 2017;7(1):7501.
19. Lu HM, Yin DC, Ye YJ, Luo HM, Geng LQ, Li HS, et al. Correlation between protein sequence similarity and x-ray diffraction quality in the protein data bank. Protein Pept Lett. 2009;16(1):50–5.
20. Zhao J, Cao Y, Zhang L. Exploring the computational methods for protein-ligand binding site prediction. Comput Struct Biotechnol J. 2020;18:417–26.
21. Arba M, Arfan, Trisnawati A, Kurniawati D. Pemodelan Farmakofor untuk Identifikasi Inhibitor Heat Shock Proteins-90 (HSP-90). J Farm Galen (Galenika J Pharmacy). 2020;6(2).
22. Prasetiawati R, Suherman M, Permana B, Rahmawati R. Molecular Docking Study of Anthocyanidin Compounds Against Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) as Anti-Lung Cancer. Indones J Pharm Sci Technol. 2021 Feb 12;8(1):8.
23. Ravindranath PA, Forli S, Goodsell DS, Olson AJ, Sanner MF. AutoDockFR: Advances in Protein-Ligand Docking with Explicitly Specified Binding Site Flexibility. Fetrow JS, editor. PLOS Comput Biol. 2015 Dec 2;11(12):e1004586.
24. Musoev A, Numonov S, You Z, Gao H. Discovery of Novel DPP-IV Inhibitors as Potential Candidates for the Treatment of Type 2 Diabetes mellitus Predicted by 3D QSAR Pharmacophore Models, Molecular Docking and de novo Evolution. Molecules. 2019;24(16).
25. Ferwandi S, Gunawan R, Astuti W. Studi Docking Molekular Senyawa Asam Sinamat dan Derivatnya Sebagai Inhibitor

Protein 1j4x pada Sel Kanker Serviks. J Kim Mulawarman. 2017;14(2):84–90.
26. Wang XY, Wang QH, He Y, Wang H. Advances in studies on chemical constituents and pharmacological activities of *Eleutherine palmifolia*. Asia-Pacific Tradit Med. 2015;11(2):39–42.
27. Kamarudin AA, Sayuti NH, Saad N, Razak NAA, Esa NM. *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. Bulb: Review of the Pharmacological Activities and Its Prospects for Application. Int J Mol Sci. 2021;22(13).
28. Pereyra CE, Dantas RF, Ferreira SB, Gomes LP, Silva-Jr FP. The diverse mechanisms and anticancer potential of naphthoquinones. Cancer Cell Int. 2019;19(1):207.
29. Wellington KW. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones – a review. RSC Adv. 2015;5(26):20309–38.
30. Rahman MM, Islam MR, Akash S, Shohag S, Ahmed L, Supti FA, et al. Naphthoquinones and derivatives as potential anticancer agents: An updated review. Chem Biol Interact. 2022;368:110198.
31. Annisa R, Hendradi E, Yuwono M. Analysis of 1,4 naphthoquinone in the Indonesian medical plant from extract *Eleutherine palmifolia* (L.) Merr by UHPLC. IOP Conf Ser Earth Environ Sci. 2020;456(1):012020.
32. Heald R, Bowman K, Bryan M, Burdick D, Chan B, Chan E. Correction to Noncovalent Mutant Selective Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors: A Lead Optimization Case Study. J Med Chem. 2016;59(6):2848–58.
33. Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. Drug Discov Today Technol. 2004;1(4):337–41.
34. Ghaemmaghami F, Behtash N, Yarandi F, Moosavi A, Modares M, Toogeh G, et al. First-line chemotherapy with 5-FU and platinum for advanced and recurrent cancer of the cervix: a Phase II study. J Obstet Gynaecol (Lahore). 2003;23(4):422–5.
35. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nat Rev Cancer. 2003;3(5):330–8.
36. Xie B, Becker E, Stuparevic I, Wery M, Szachnowski U, Morillon A, et al. The anti-cancer drug 5-fluorouracil affects cell cycle regulators and potential regulatory long non-coding RNAs in yeast. RNA Biol. 2019n;16(6):727–41.
37. Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. Exp Dermatol. 2000;9(3):165–9.
38. G S. Prediction of Drug-Like Properties. Madame Curie Bioscience Database. [diunduh 22 Mei 2021]. Tersedia dari: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6404/
39. Nursamsiar, Toding A, Awaluddin A. Studi In Silico Senyawa Turunan Analog Kalkon dan Pirimidin sebagai Antiinflamasi: Prediksi Absorpsi, Distribusi, dan Toksisitas. Pharmacy. 2016;13(1):92–100.
40. Shargel L, Yu A. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. 7th ed. New York: McGraw Hill; 2016.
41. Vieth M. Characteristic physical properties and structural fragments of marketed oral drugs. J Med Chem. 2004;47(1):224–32.
42. Walmsley RM, Billinton N. How accurate is in vitro prediction of carcinogenicity? Br J Pharmacol. 2011;162(6):1250–8.
43. Hsu KH, Su BH, Tu YS, Lin OA, Tseng YJ. Mutagenicity in a Molecule: Identification of Core Structural Features of Mutagenicity Using a Scaffold Analysis. PLoS One. 2016;11(2):e0148900.