

## Interactions of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Chemical Constituents Against 5-HT<sub>1B</sub> Receptor as Antidepressant by *In Silico*

Nadia A. Sufi\*, Judith Nauroh, Neng V. Nurani, Annida A. Nurhaniefah, Jacko A. Harmonis

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

Submitted 17 November 2022; Revised 15 December 2022; Accepted 16 December 2022; Published 27 December 2022

\*Corresponding author: [nadiaadhani03@gmail.com](mailto:nadiaadhani03@gmail.com)

### Abstract

Depression is an illness that affects how to feel, think, and act. Depression causes feelings of sadness and/or loss of interest in an activity. Depression can be treated by using antidepressants. *Piper nigrum* L. or Black Pepper is a plant that can be used as an antidepressant. Black pepper contains secondary metabolite which can be used as an antidepressant with a mechanism against 5-HT<sub>1B</sub>. The purpose of the research is to study the interaction between compounds contained in black pepper which have a potential as an antidepressant to 5-HT<sub>1B</sub> receptor using the *in silico* molecular docking method. The test was carried out using the software Autodock 4.2 for molecular docking simulation, visualized using the Biovia Discovery Studio 2020 Client, and analysis of the pharmacokinetic results and toxicity of the compounds through the pre-ADMET site. As the results, piperettin had the greatest potential as a candidate for antidepressant drugs via the 5-HT<sub>1B</sub> agonist mechanism with binding energy values -8,84 kcal/mol with hydrogen bonds occurring at the amino acid residue of THR134. Based on the analysis of the predicted results, Piperettin has pharmacokinetic properties with a CaCo-2 value of 54.6793; HIA 98.050270%; PPB 92.408768%. The results of pre-ADMET compounds showed a suspected potential carcinogen.

**Keywords:** 5-HT<sub>1B</sub>, Antidepressant, Molecular Docking, Piperettin, *Piper nigrum*

## Interaksi Konstituen Kimia Lada Hitam (*Piper nigrum* L.) Terhadap Reseptor 5-HT<sub>1B</sub> Sebagai Antidepresan dengan Pendekatan *In Silico*

### Abstrak

Depresi merupakan penyakit yang mempengaruhi perasaan, cara berpikir, dan tindakan. Depresi menyebabkan perasaan sedih dan / hilangnya minat pada suatu aktivitas. Depresi dapat diobati menggunakan antidepresan. *Piper nigrum* L. atau Lada Hitam merupakan tanaman yang dapat digunakan sebagai antidepresan. Pada lada hitam terkandung senyawa metabolit sekunder yang dapat digunakan sebagai antidepresan dengan mekanisme terhadap 5-HT<sub>1B</sub>. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari interaksi antara senyawa yang terkandung pada lada hitam yang berpotensi sebagai antidepresan terhadap protein 5-HT<sub>1B</sub> menggunakan metode *molecular docking* secara *in silico*. Pengujian dilakukan menggunakan aplikasi *Autodock 4.2* untuk simulasi penambatan molekuler, divisualisasi dengan *Biovia Discovery Studio 2020 Client*, dan analisis hasil farmakokinetika serta toksisitas dari senyawa melalui situs pre-ADMET. Hasil penambatan diperoleh senyawa piperettin memiliki potensi paling besar menjadi kandidat obat antidepresan melalui mekanisme agonis 5-HT<sub>1B</sub> dibandingkan senyawa uji lainnya karena memiliki energi ikatan sebesar -8,84 kKal/mol dengan ikatan hidrogen pada residu asam amino THR134. Berdasarkan analisis hasil prediksi, Piperettin memiliki sifat farmakokinetika dengan nilai CaCo-2 54,6793; HIA 98,050270% ; PPB 92,408768%. Hasil pre-ADMET senyawa menunjukkan adanya dugaan potensi karsinogen.

**Kata Kunci:** 5-HT<sub>1B</sub>, Antidepresan, Molecular Docking, Piperettin, *Piper nigrum*

## 1. Pendahuluan

Gangguan mental menduduki peringkat ketujuh kontributor terbesar beban penyakit dunia berdasarkan indikator *Years Lived with Disability* (YLDs).<sup>1</sup> Gangguan depresi merupakan salah satu gangguan mental yang menjadi kontributor utama penyebab bunuh diri. Depresi dan ansietas merupakan penyebab gangguan mental heterogen yang paling banyak dan umum di dunia.<sup>2</sup> Berdasarkan data WHO pada tahun 2017, 27% jumlah penduduk di wilayah Asia Tenggara mengalami gangguan depresi. Dengan persentase kejadian depresi sebesar 3,7%, Indonesia berada pada peringkat kelima negara dengan kejadian depresi terbesar.<sup>3</sup>

Permasalahan gangguan mental ini telah menjadi hal yang serius dan memerlukan perhatian. Depresi dapat mengganggu aktivitas hidup manusia, selain itu depresi meningkatkan morbiditas dan juga mortalitas.<sup>4</sup> Pola prevalensi penyakit ini meningkat seiring dengan meningkatnya usia, namun gangguan ini sudah dapat terjadi sejak rentang usia 15-24 tahun dengan prevalensi 6,2 % sementara prevalensi tertinggi terjadi pada usia diatas 75 tahun sebesar 8,9%.<sup>5, 6</sup>

Ada beberapa golongan obat yang digunakan dalam pengobatan depresi, kelas pertama yang digunakan sebagai antidepresan adalah *Monoamine oxidase inhibitors* (MAOIs), sementara kelas yang akhir-akhir ini berkembang adalah *serotonin reuptake inhibitor* (SSRIs) dan *serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors* (SNRIs). Golongan lain yang digunakan meliputi trisiklik (TCA), *norepinephrine-dopamine reuptake inhibitors* (NDRIs) dan *serotonin-2 antagonist reuptake inhibitors* (SARIs).<sup>7</sup>

Salah satu pendekatan lain yang dapat dikembangkan adalah efek antidepresan agonis reseptor 5-HT<sub>1B</sub>. *Antidepressant-like effect agonis reseptor 5-HT<sub>1B</sub>* terjadi melalui internalisasi dan aktivasi reseptor 5-HT<sub>1B</sub>, yang menyebabkan down regulasi 5-HT<sub>1B</sub> terutama pada *neuron raphe nuclei* yang memiliki hubungan dengan beberapa sinapsis dan lebih sensitif terhadap fluktuasi pada

konsentrasi serotonin sinaptik.<sup>8</sup> Reseptor ini dapat meregulasi fungsi transporter serotonin, dan *auto-receptor 5-HT<sub>1B</sub>* dapat memodulasi tingkat transmitter ekstraseluler pada daerah proyeksi serotonergik.<sup>9, 10</sup>

Aktivasi reseptor presinaptik 5-HT<sub>1B</sub> oleh CGS12066 dalam saraf terminal hipokampus tikus menyebabkan terhambatnya pengeluaran glutamat yang berasosiasi dengan pengurangan produksi cAMP dan aktivitas PKA serta penekan influks ion Ca<sup>2+</sup> melalui kanal Ca<sup>2+</sup> N dan P/Q-type. Dengan demikian diprediksikan heteroreseptor presinaptik 5-HT<sub>1B</sub> berperan dalam pencegahan akumulasi glutamat ekstraseluler yang berlebihan yang dapat menyebabkan aktivitas berulang sehingga berpotensi memberikan efek neuroprotektif.<sup>11</sup>

Melalui mekanisme ini agonis reseptor 5-HT<sub>1B</sub> dapat menjadi pendekatan terapi rasional down regulasi reseptor 5-HT<sub>1B</sub>, yang lebih cepat dan lebih selektif. Selain itu, pengobatan depresi dengan menstimulasi reseptor 5-HT<sub>1B</sub> pada *forebrain* akan sejalan dengan rendahnya pengikatan reseptor 5-HT<sub>1B</sub> yang ditemukan pada pasien dengan *Major Depressive Disease* (MDD), terutama dalam sistem limbik, area yang dilaporkan penting dalam patofisiologi depresi.<sup>8</sup> Meskipun demikian, mekanisme partial agonist menunjukkan alternatif yang lebih baik karena beberapa hal termasuk efek samping, namun masih diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efek partial agonist ini.<sup>12</sup>

Tanaman lada hitam (*Piper nigrum* L.) termasuk famili Piperaceae dengan sifat menyembuhkan dan banyak digunakan sebagai bumbu, tanaman ini merupakan tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat maupun bumbu masakan, tanaman ini menjadi salah satu komoditas ekspor Indonesia. Komoditas ini mengalami peningkatan ekspor pada tahun 2019, sebelumnya pada tahun 2017 ekspor lada hitam hanya sebesar 14.129,3 ton kemudian meningkat pada tahun 2019 menjadi 17.415,1 ton.<sup>13, 14</sup>

Ekstrak bagian aerial dari *Piper Nigrum* L. berpotensi menjadi agen antidepressant,

agen kolitik<sup>15</sup>, antipiretik<sup>16</sup>, anti inflamasi, analgesik<sup>17</sup>, ansiolitik<sup>18</sup>, antikonvulsan<sup>19</sup> dan juga agen pengobatan migrain<sup>20</sup>.

Kandungan utama lada hitam adalah alkaloid piperin<sup>21</sup>, senyawa ini larut dalam air (40 mg/L) pada suhu 30°C<sup>22</sup>, dan memiliki banyak manfaat dan telah melalui pengujian peran terhadap reseptor 5-HT<sub>1B</sub> adalah piperin. Melalui *swim test* pada tikus dan mencit, penggunaan piperin 1 mg/Kg dapat meningkatkan pre-treatment antidepresan dengan 8-OH-DPAT secara signifikan.<sup>23</sup> Penelitian selanjutnya menunjukkan bahwa piperin memiliki aktivitas antidepresan, hal ini didasarkan pada hasil *gross motor activity test*, *tail suspension test* dan *forced swimming test*. Terdapat dua dosis ekstrak cair piperin yang digunakan, yakni dosis tinggi 500 mg/kg dan 250 mg/kg dengan hasil dosis tinggi lebih efektif dibanding dosis rendah.<sup>24</sup> Selain piperin terdapat 3 alkaloid lain yang terkandung dalam *Piper nigrum*, yaitu piperettine, piperidine dan piperanine. Namun, hanya piperin, piperettin, dan piperanine yang memiliki skor bioaktivitas yang baik.<sup>25</sup>

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi potensi aktivitas agonis 5-HT<sub>1B</sub> senyawa metabolit sekunder tanaman lada hitam (*Piper nigrum* L.) yang dapat digunakan sebagai antidepresan.

## 2. Metode

### 2.1. Alat

Perangkat keras yang digunakan adalah *personal computer* Asus dengan sistem operasi Windows 10 Enterprise 64-bit, processor AMD A6-9220 RADEON R4, 5 COMPUTE CORES 2C+3G @ 2.50GHz, memory (RAM) 4 GB dan personal computer Lenovo dengan sistem operasi Windows 10 Enterprise 64-bit, processor Intel® Pentium® CPU 987 @1.50GHz, memory (RAM) 2 GB.

Perangkat lunak yang digunakan adalah Program *ChemDraw* untuk menggambar struktur 2D ligan, Program *Chem3D* untuk menggambar struktur 3D ligan dan minimisasi energi, Program *Biovia Discovery Studio 2020 Client* untuk memisahkan ligan dengan reseptornya, menentukan koordinat kantung

aktif, dan memvisualisasikan interaksi antara ligan dengan reseptornya, Program *Autodock 4.2* (<https://autodock.scripps.edu/>) untuk mempersiapkan parameter docking dan mensimulasikan proses docking, Program *Ligandscout* untuk pemodelan farmakofor ligan uji dan senyawa obat pembanding, dan *Website Pre-ADMET* (<https://preadmet.bmdrc.kr/>) untuk memprediksi absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas ligan uji.

### 2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah struktur kristal 5-HT<sub>1B</sub> yang dikomplekskan dengan Dihidroergotamin diunduh dari *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank website* ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) dengan ID PDB: 4IAQ, Struktur 2D ligan uji yang telah digambarkan menggunakan *Chemdraw* kemudian dioptimasi menjadi struktur 3D menggunakan *Chem3D*.

### 2.3. Prosedur Rinci

#### 2.3.1. Preparasi Ligan

Struktur makromolekul protein 5-HT<sub>1B</sub> yang sebelumnya telah diunduh dengan kode PDB 4IAQ dihilangkan molekul airnya terlebih dahulu, kemudian dipisahkan antara ligan dengan proteinnya menggunakan aplikasi *Biovia Discovery Studio 2020 Client*. Setelah itu, ligan yang telah dipisahkan disimpan dalam format PDB dan dipreparasi menggunakan aplikasi *Autodock 4.2* (<https://autodock.scripps.edu/>) dengan menambahkan atom hidrogen, *merging non-polar*, menambahkan muatan *compute gasteiger*, menambahkan torsi, dan disimpan dalam format .pdbqt.

#### 2.3.2. Preparasi Protein

Struktur makromolekul protein 5-HT<sub>1B</sub> yang sebelumnya telah diunduh dengan kode PDB 4IAQ dihilangkan molekul airnya terlebih dahulu, kemudian dipisahkan antara protein dengan ligannya menggunakan aplikasi *Biovia Discovery Studio 2020 Client*. Setelah itu, protein yang telah dipisahkan disimpan dalam format PDB dan dipreparasi

menggunakan aplikasi *Autodock 4.2* (<https://autodock.scripps.edu/>) dengan menambahkan atom hidrogen dan muatan kollman kemudian disimpan dalam format *.pdbqt*.

### 2.3.3. Validasi Metode Penambatan Molekuler

Parameter grid dan parameter docking dibuat terlebih dahulu menggunakan aplikasi *Autodock 4.2* (<https://autodock.scripps.edu/>). Selanjutnya, dibuka file ligan dan protein yang sebelumnya telah dipreparasi dengan ekstensi *.pdbqt*. Parameter grid dibuat dengan memilih protein sebagai makromolekulnya dan ligan sebagai ligan nya. Setelah itu, grid box diatur dengan dimensi  $40 \times 40 \times 40 \text{ \AA}$  ( $x = 40$ ;  $y = 40$ ;  $z = 40$ ) dan grid coordinate  $x = -20.423$ ,  $y = 9.414$ , dan  $z = 22.072$  kemudian disimpan dengan format *.gpf*. Parameter docking dibuat dengan parameter *Genetic Algorithm* dan GA runs 100. Output yang digunakan adalah Lamarckian GA. Setelah itu, file disimpan dalam format *.dpf* dan dilanjutkan dengan proses re-docking menggunakan *command prompt*.

### 2.3.4. Simulasi Penambatan Molekuler

Struktur senyawa uji digambar bentuk 2D nya terlebih dahulu dengan menggunakan aplikasi *ChemDraw* kemudian disimpan dalam format *.cdx*. Setelah itu, bentuk 2D dari ligan uji diubah menjadi bentuk 3D nya dan dilakukan minimisasi energi dengan aplikasi *Chem3D* kemudian file disimpan dalam format *.pdb*. Setelah itu, dilakukan preparasi-preparasi pada seluruh ligan uji dengan cara yang sama dengan preparasi ligan alami dihidroergotamin. Setelah selesai proses preparasi, dilakukan docking senyawa uji dengan proteinnya menggunakan *command prompt*. Visualisasi interaksi senyawa uji dengan protein dapat dilihat segera setelah proses docking selesai dengan menggunakan aplikasi *Biovia Discovery Studio 2020 Client*.

### 2.3.5. Pembuatan Farmakofor

Pembuatan farmakofor senyawa uji dapat dilakukan dengan aplikasi *Ligandscout* dengan hasil yang didapatkan berupa bentuk 2D dan 3D struktur disertai ikatan-ikatan

yang terdapat pada senyawa tersebut.

### 2.3.6. Prediksi proses Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekstraksi, dan Toksisitas

Cara memprediksi ADMET dapat dilakukan dengan mengunggah atau menggambar struktur senyawa pada website <https://preadmet.bmdrc.kr/>. Situs ini akan secara otomatis memprediksi parameter ADMET.

## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1. Validasi Metode

Pada studi *in-silico* ini, dilakukan simulasi penambatan molekuler senyawa-senyawa metabolit sekunder yang berasal dari lada hitam (*Piper Nigrum* L.) dengan protein atau reseptor target serotonin ( $5\text{-HT}_{1B}$ ) dengan PDB ID 4IAQ. Pemilihan reseptor dengan kode PDB tersebut dikarenakan reseptor ini tidak bersifat mutagen dan di dalam kristal reseptor tersebut terdapat ligan alami berupa senyawa dihidroergotamin yang diketahui sebagai senyawa yang banyak digunakan untuk migrain namun potensial untuk antidepresan karena senyawa antidepresan memiliki efek terhadap reseptor tersebut dengan demikian letak kantung aktif juga asam amino yang menjadi tempat interaksi antara ligan dan reseptor dapat lebih mudah diketahui. Selain itu, metode penapisan dari struktur 3 dimensi ini menggunakan *X-Ray Diffraction* yang merupakan metode terbaik untuk menggambarkan struktur 3 dimensi dari senyawa makromolekul, resolusi dari enzim dengan PDB ID tersebut memiliki resolusi yang cukup kecil  $< 3 \text{ \AA}$ , yaitu sebesar  $2.80 \text{ \AA}$  dan PDB ID ini terdapat pada organisme Homo sapiens atau manusia. Nilai angka resolusi yang semakin kecil menunjukkan semakin baiknya resolusi yang dimiliki oleh kristal reseptor tersebut sehingga dengan demikian penggambaran strukturnya akan semakin mirip dengan struktur aslinya. Validasi metode molecular docking menggunakan aplikasi *Autodock 4.2* untuk menilai kemampuan metode penambatan molekuler yang akan dilakukan sehingga menghasilkan konformasi ligan yang mirip dengan hasil percobaan sebenarnya.<sup>26</sup> Validasi metode dilakukan dengan *redocking*

native ligand dihidroergotamin dengan reseptor 5-HT<sub>1B</sub> yang sudah dipreparasi. Parameter validasi metode adalah nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) / jarak ikatan. Metode docking dapat dikatakan valid jika nilai RMSD yang diperoleh < 2Å. Besarnya nilai RMSD menunjukkan besarnya akurasi perhitungan, jika RMSD < 2Å menunjukkan kesalahan yang lebih kecil dari perhitungan sehingga lebih akurat, sedangkan jika RMSD > 2Å menunjukkan penyimpangan yang lebih besar dari hasil perhitungan.<sup>27</sup> Semua nilai RMSD yang diperoleh Kurang dari 2 Å dan nilai RMSD terbaik adalah 0,52 Å dan nilai *binding energy* yang diperoleh -14,49 dapat pada Tabel 1. Hasil ini menunjukkan bahwa posisi konformasi ligan redock hampir sama dengan posisi konformasi ligan asal percobaan.

Interaksi antara residu dan ligan asal yang ditambatkan menunjukkan bahwa ligan asli dihidroergotamin berinteraksi dengan residu protein, yaitu THR134, VAL201, ALA216, PHE330, VAL200, LEU126, TRP125, LEU348, PHE331, ILE:130, PHE351, dan CYS133.

Visualisasi interaksi validasi metode molecular docking dapat dilihat pada Gambar 1.

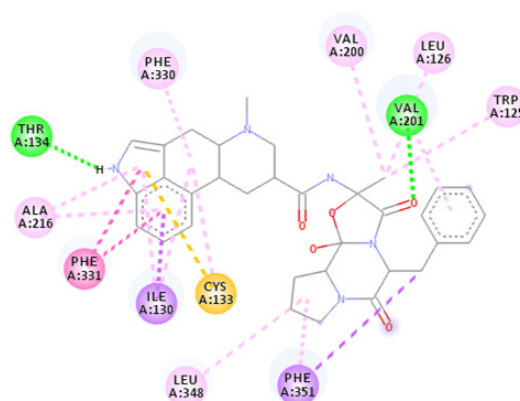
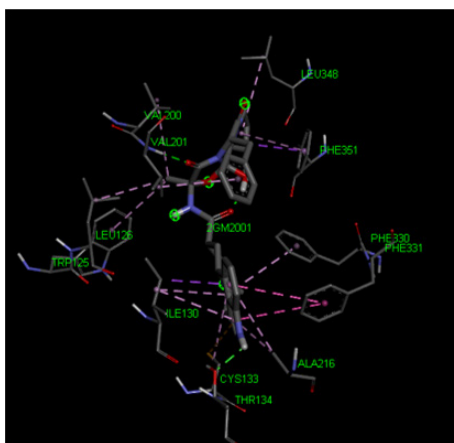
### 3.2. Penambatan Molekuler

Hasil penambatan molekul dapat dilihat pada Tabel 2 yang dinilai berdasarkan nilai *binding energy* ( $\Delta G$ ) dan interaksi ligan dengan residu protein.

Interaksi antara reseptor dengan ligan dapat dilihat dari nilai *binding energy* yang rendah. Nilai *binding energy* adalah sebuah parameter kestabilan proses docking. Bila nilai *binding energy* semakin negatif maka menunjukkan tingkat kestabilan yang baik antara ligan dengan protein target sehingga ikatan yang terbentuk akan semakin kuat dan semakin kecil pula energi yang diperlukan untuk berikatan dengan protein target, sehingga hal ini membuat lebih efektif sebagai senyawa obat. Setelah dilakukan simulasi penambatan molekul, maka didapatkan nilai energi ikatan dan konstanta inhibisi (K<sub>i</sub>) yang menunjukan afinitas antara ligan uji dengan reseptor.<sup>28</sup> Nilai *binding energy* yang paling baik yang diperoleh dari kesepuluh ligan uji adalah Piperretin dengan nilai -8,87. Kemudian dari nilai Konstanta Inhibisi yang menunjukkan nilai paling baik adalah Eugenol dengan nilai 157,77  $\mu M$ , dimana semakin besar nilai yang diperoleh dari konstanta inhibisi maka semakin baik sifat senyawa tersebut. Ligan uji dengan residu asam amino dan ikatan hidrogen yang mendekati ligan

**Tabel 1.** Hasil Validasi Metode *Molecular Docking*

Ligan	Energi Ikatan	RMSD	Ikatan Hidrogen
Native Ligand	-14,49	0,52 Å	THR134, VAL201



**Gambar 1.** Visualisasi Interaksi Senyawa Dihidroergotamin dengan Protein Reseptor 5-HT<sub>1B</sub>. Interaksi berupa ikatan hidrogen ditandai dengan lingkaran berwarna hijau.



Tabel 2. Simulasi Penambatan Molekuler

No	Senyawa	Cluster	Binding Energy (kkal/ mol)	kl (uM)	Interaksi Asam Amino	
					Ikatan Hidrogen	Van der Waals
1.	Sumatripan (Obat Pembeding)	67	-8,92	0,28899	ILE 130, SER 334 ASP 129 THR 355	ILE 180, SER 212, THR 131, ASP 129, TRP 327, THR 213, THR 209
2.	Dihidroergotamin	100	-14,49	0,00002407	THR A:134, VAL A:201	ILE 137, TRP 327, ASP 129, TYR 359, CYS 199, TYR 109, MET 337, SER 334, THR 355, ASP 352, SER 212, ILE 180
3.	Piperin	88	-8,19	0,99039	THR A:134, VAL A:201	TRP 327, CYS 199, TYR 109, THR 355, LEU 126, VAL 200
4.	Piperettin	73	-8,87	0,31755	THR 355, SER 106, THR 134	THR 110, TRP 356, ASP 352, TYR 359, TRP 327, ILE 180, SER 212, TYR 109, ASP 129, CYS 133,
5.	Limonene	100	-5,57	82,56	-	GLY 358, THR 134, THE 355, ASP 129
6.	Kuersetin	32	-8,00	1,37	THR A:355, ASP A:129, THR A:134, SER A:212	TYR 359, TRP 327, ILE 180, THR 213, THR 209
7.	Kaempferol	29	-7,34	4,16	THR A:355, ASP A:129, SER A:212, TYR 308	ILE180, VAL201, ILE137, TRP327, TYR359, THR 355, PHE330
8.	Myrcene	96	-5,21	151,97	-	THR134, ASP 129, GLY 358, THR 355
9.	Chavicine	9	-8,38	0,71611	SER A:212	ASP 129, THR 134, TYR 208, THR 209, SER 334, THR 213, ILE 180
10.	Eugenol	28	-5,19	157,77	ASP 129	TRP 327, THR 134, THR 355, TYR 359
11.	$\beta$ -Caryophyllene	100	-7,24	4,96	-	ASP 129, SER 212, THR 213, THR 134,
12.	$\alpha$ -Humulene	99	-7,03	7.05	-	ASP 129, THR 134, ILE 180, THR 213, SER 212, VAL 201, TYR 208

alami menunjukkan kemiripan jenis interaksi dan menggambarkan kemiripan aktivitas. Pada *native ligand* dihidroergotamine dihasilkan RMSD sebesar 0,52 Å, nilai kl 24,07 pM, nilai *binding energy* -14.49 kkal/mol menunjukkan interaksi dengan residu protein yang dihasilkan adalah THR134, PHE330, ALA216, PHE331, ILE130, CYS133, LEU:348, PHE351, VAL200, VAL201, LEU126, TRP125.

### 3.3. Pemodelan Farmakofor

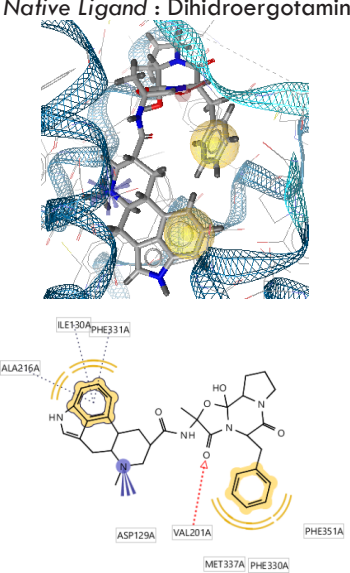
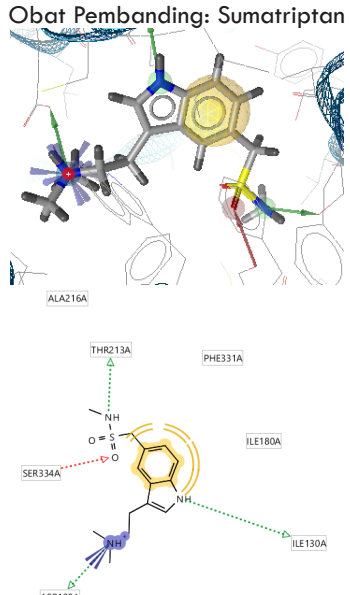
Pemodelan farmakofor *native ligand* dan ligan uji menggunakan *Ligandscout* seperti pada Tabel 3 menunjukkan fitur-fitur farmakofor senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas reseptor 5-HT<sub>1B</sub>, diantara 10 ligan uji, piperin dan piperettin memiliki fitur farmakofor yang paling mirip

dengan fitur farmakofor pada *native ligand*.

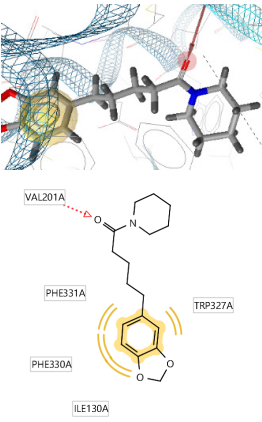
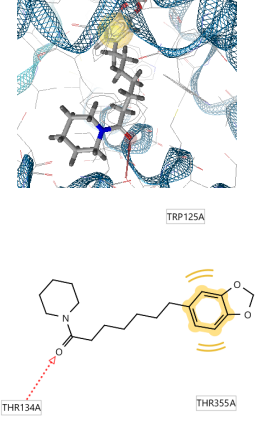
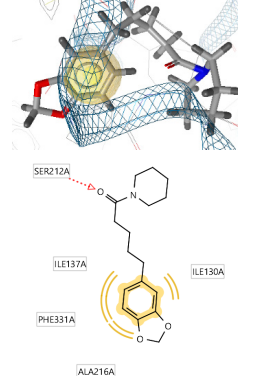
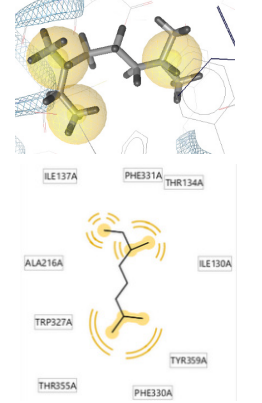
Pemodelan farmakofor *native ligand* dihidroergotamin menunjukkan adanya interaksi antara ligan dengan sisi aktif reseptor 5-HT<sub>1B</sub> melalui interaksi hidrogen dan interaksi hidrofobik. Interaksi hidrofobik ini terjadi antara gugus karbon aromatik dengan residu asam amino ALA216, ILE130, PHE331, VAL201, PHE330, MET337, dan PHE351. Sementara gugus karbonil bertindak sebagai akseptor hidrogen terhadap VAL 201 dan atom nitrogen pada karbon aromatik *positive ionizable* terhadap ASP 129. Dengan demikian, asam amino ALA216, ILE230,

PHE331, VAL201, PHE330, MET337 dan PHE351 memiliki peran penting dari aktivitas biologis reseptor 5-HT<sub>1B</sub>. Berdasarkan hasil penambatan molekuler, Senyawa piperin dan piperettine menunjukkan fitur farmakofor yang paling sesuai, keduanya berinteraksi dengan sisi aktif reseptor melalui interaksi hidrofobik dan interaksi hidrogen. Senyawa piperin memiliki gugus karbonil sebagai akseptor hidrogen terhadap VAL201, dengan gugus karbon aromatis yang berinteraksi hidrofobik dengan PHE330, PHE331 dan ILE130 sementara Piperettine memiliki gugus karbonil yang berperan sebagai akseptor

**Tabel 3.** Hasil Validasi Metode *Molecular Docking*

No	Fitur Farmakofor	Senyawa
1	Interaksi hidrofobik : ALA216; ILE130;PHE31;MET337;PHE330;PHE351 Positive ionizable: ASP129 Ikatan Akseptor hidrogen: VAL201	<p><i>Native Ligand</i> : Dihidroergotamin</p> 
2	Interaksi hidrofobik: ALA216, PHE331, ILE180, ILE130,ASP129 Ikatan akseptor hidrogen: SER334 Ikatan donor hidrogen: THR213	<p>Obat Pemandang: Sumatriptan</p> 

**Tabel 3.** Hasil Validasi Metode *Molecular Docking*

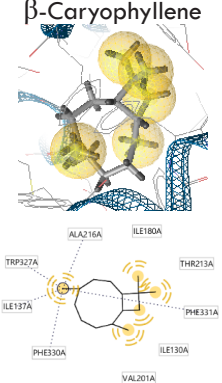
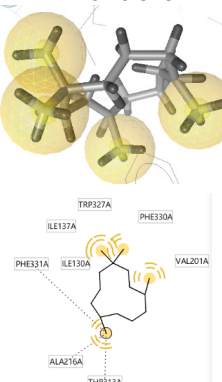
No	Fitur Farmakofor	Senyawa
3	Interaksi hidrofobik: TRP327, ILE130, PHE330, PHE331 Ikatan Akseptor hidrogen: VAL201	<p data-bbox="1053 297 1133 331">Piperin</p> 
4	Interaksi hidrofobik : TRP125, THE335 Ikatan akseptor hidrogen: THR134	<p data-bbox="1053 768 1133 801">Piperettine</p> 
5	Interaksi hidrofobik: ILE130, ILE137, PHE331, ALA216 Ikatan Akseptor Hidrogen: SER212	<p data-bbox="1053 1238 1133 1272">Chavicine</p> 
6	Interaksi hidrofobik: ILE137, PHE331, THR134 ILE130, TYR359, PHE330, THR355, TRP327, ALA216	<p data-bbox="1053 1664 1133 1697">Myrcene</p> 



**Tabel 3.** Hasil Validasi Metode *Molecular Docking*

No	Fitur Farmakofor	Senyawa
7	Interaksi Hidrofobik: ILE137, ILE130, PHE331, ALA 216, THR134, TRP327, THR355, PHE330, Ikatan donor hidrogen: ASP129 Ikatan akseptor hidrogen: TYR359	<p>Eugenol</p>
8	Interaksi hidrofobik: PHE330, TRP327, THR355, TYR359 Ikatan akseptor hidrogen: TYR359, SER 212, TYR208 Ikatan donor hydrogen: ILE130, THR134, SER212, TYR208	<p>Kaempferol</p>
9	Interaksi hidrofobik: PHE330, THR355, TYR359 Ikatan Donor hidrogen: SER212, THR134, TYR359, ASP 129 Ikatan Akseptor hidrogen: THR213, TYR359, SER212	<p>Kuersetin</p>
10	Interaksi hidrofobik: ILE137, ILE130, PHE331, THR134, TRP327, THR355, PHE330, TYR359	<p>Limonene</p>

**Tabel 3.** Hasil Validasi Metode *Molecular Docking*

No	Fitur Farmakofor	Senyawa
11	Interaksi hidrofobik: ALA216, ILE180, THR213, PHE331, ILE130, VAL201, PHE330, ILE137, TRP327	 <p><math>\beta</math>-Caryophyllene</p>
12	Interaksi hidrofobik: PHE331, ILE130, ALA216, THR210, VAL201, PHE330, TRP327, ILE137	 <p><math>\alpha</math>-Humulene</p>

hidrogen, namun terhadap residu asam amino THR355 dan gugus karbon aromatis yang berinteraksi hidrofobik dengan ILE130, PHE330 dan PHE331.

#### 3.4. Prediksi ADME dan toksisitas

Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi (ADME), dan Toksisitas sangat penting dalam farmasi untuk menilai kandidat obat dan menghindari masalah terkait farmakokinetik obat dalam tubuh. Hasil prediksi ADME dan juga toksisitasnya dapat dilihat pada Tabel 4.

Human Intestinal Absorption (HIA) dan Caco-2 digunakan sebagai parameter absorpsi. HIA merupakan penjumlahan dari bioavailabilitas dan absorpsi, yang dapat dilihat dari rasio ekskresi dalam urin, empedu, dan feses. Nilai HIA yang baik > 70%, HIA 30-70% terserap cukup baik dan nilai HIA <30% senyawa kurang terserap di usus.<sup>29</sup> Piperin (98,18%) dan piperettin (98,05%) memiliki nilai HIA yang lebih tinggi daripada sumatriptan (89,86%) sehingga dapat diserap lebih baik oleh usus. Sel Caco-

2 (human colon adenocarcinoma) merupakan parameter untuk menentukan permeabilitas epitel usus yang berasal dari human colon adenocarcinoma dalam model *in vitro*. Sel Caco-2 yang digunakan memiliki kemiripan dengan enterosit manusia baik secara morfologis maupun fungsional, sehingga digunakan dalam parameter ini.<sup>30</sup> Nilai parameter Caco-2 yang tinggi < 70, Caco-2 4-70 permeabilitas sedang, dan Caco-2 <4 permeabilitas rendah. Caco-2 piperin, piperettin dan sumatriptan menunjukkan permeabilitas sedang dan nilai Caco-2 senyawa ini lebih tinggi dari senyawa pembandingan.

Proses distribusi obat suatu senyawa dapat diprediksi melalui dua parameter yaitu *plasma binding protein* (PPB) dan *blood-brain barrier* (BBB). PPB menunjukkan nilai persentase pengikatan obat pada protein plasma. Hal ini berkaitan erat dengan kemampuan disposisi obat untuk memberikan efek terapeutik. Nilai parameter PPB >90% menunjukkan senyawa terikat kuat dengan

Tabel 4. Tabel Preadmetoks

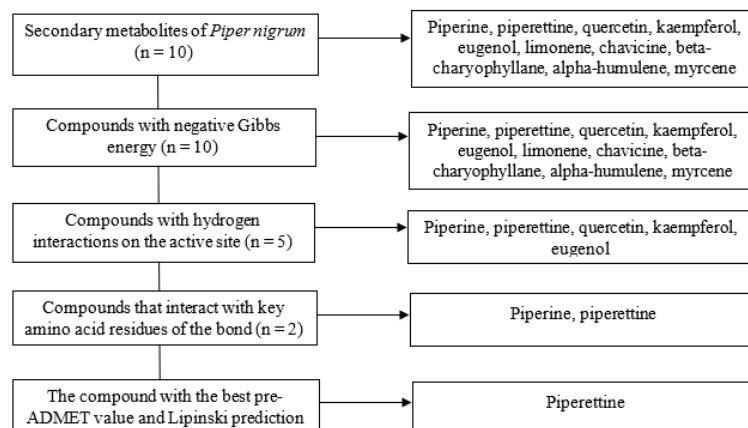
No.	Nama Senyawa	Absorpsi		Distribusi		Toksitas		
		HIA(%)	Caco-2	PPB	BBB	Mutagen	Karsinogen	
							Mouse	Rat
1	Sumatriptan	89.866624 (Well absorbed compound)	4.91783 (Middle permeability)	15.533754 (Chemicals weakly Bound)	0.319056 (Low absorption to CNS)	Mutagen	Negatif	Negatif
2	Dihidroergo tamin	92,357538 (Well absorbed compound)	19,2313 (Middle permeability)	75,754711 (Chemicals weakly Bound)	0,25244 (Low absorption to CNS)	Non Mutagen	Negatif	Negatif
3	Piperin	98,180182 (Well absorbed compound)	52,383 (Middle permeability)	90,448927 (Chemicals strongly Bound)	0,050316 (Low absorption to CNS)	Mutagen	Positif	Negatif
4	Piperettine	98,050270 (Well absorbed compound)	54,6793 (Middle permeability)	92,408768 (Chemicals strongly Bound)	0,0899541 (Low absorption to CNS)	Mutagen	Positif	Negatif
5	Limonene	100.00 (Well absorbed compound)	23.6317 (Middle permeability)	100.00 (Chemicals strongly Bound)	8.27823 (High absorption to CNS)	Mutagen	Negatif	Positif
6	$\beta$ -Caryophyllene	100.00 (Well absorbed compound)	23.6315 (Middle permeability)	100.00 (Chemicals strongly Bound)	13.3193 (High absorption to CNS)	Mutagen	Negatif	Positif
7	$\alpha$ -Humulene	100.00 (Well absorbed compound)	23,633 (Middle permeability)	100.00 (Chemicals strongly Bound)	14,2219 (High absorption to CNS)	Non Mutagen	Positif	Positif
8	Chavicine	98,180182 (Well absorbed compound)	52,383 (Middle permeability)	90,448927 (Chemicals strongly Bound)	0,050316 (Low absorption to CNS)	Mutagen	Positif	Negatif
9	Myrcene	100.00 (Well absorbed compound)	23.6306 (Middle permeability)	100.00 (Chemicals strongly Bound)	9.1018 (High absorption to CNS)	Mutagen	Negatif	Positif
10	Eugenol	96.774447 (Well absorbed compound)	46.8865 (Middle permeability)	100.00 (Chemicals strongly Bound)	2.25544 (High absorption to CNS)	Mutagen	Positif	Positif
11	Kuersetin	63,485215 (Moderately absorbed compound)	3,4129 (Low Permeability)	93.236103 (Chemicals strongly Bound)	0,172765 (Low absorption to CNS)	Mutagen	Negatif	Positif
12	Kaempferol	79,439289 (Well absorbed compound)	9,57744 (Middle permeability)	89,608221 (Chemicals strongly Bound)	0,286076 (Low absorption to CNS)	Mutagen	Negatif	Positif

protein plasma, sedangkan  $PPB < 90\%$  menunjukkan senyawa terikat lemah dengan protein plasma.<sup>31</sup> Piperine dan piperettin memiliki nilai  $PPB > 90$  sehingga membutuhkan waktu lama untuk berikatan dengan reseptor. BBB adalah kemampuan obat untuk menembus penghalang otak. Jika senyawa tersebut memiliki aktivitas di sistem saraf pusat (SSP), senyawa tersebut harus dapat melewati penghalang otak. Namun, senyawa yang tidak ditargetkan pada SSP tidak boleh melewati sawar otak karena dapat menimbulkan efek samping pada SSP. Nilai BBB lebih besar

dari 2,0 menunjukkan kemampuan yang baik untuk melewati sawar otak, nilai BBB antara 2,0 dan 0,1 menunjukkan kemampuan yang memadai untuk melewati sawar otak, dan nilai BBB kurang dari 0,1 menunjukkan kemampuan yang buruk untuk melewati sawar otak. Obat antidepresan dirancang untuk melewati sawar otak, sehingga harus memiliki kemampuan yang baik untuk melewati sawar otak. Piperin dan piperettin memiliki kemampuan yang rendah untuk menembus sawar otak, dengan nilai 0,050 untuk piperine dan 0,089 untuk piperettin, namun dari hasil ADME,

**Tabel 5.** Prediksi Lipinski

No	Senyawa	Berat Molekul (g/mol)	LogP	Ikatan Hidrogen Donor	Ikatan Hidrogen akseptor	Pelanggaran RO5	Drug-likeness
1	Sumatriptan (Obat Perbandingan)	296,413	0,700	3	1	-	Suitable
2	Dihidroergotamina (Ligan Native)	583,689	1,222	-	1	1 (Molecular weight)	Suitable
3	Piperin	289,375	4,078	-	1	-	Suitable
4	Piperettin	317,429	4,859	-	1	-	Suitable
5	Limonene	140,270	3,469	-	-	-	Suitable
6	$\beta$ -Caryophyllene	208,389	4,885	-	-	1 (AlopP98)	Suitable
7	$\alpha$ -Humulene	210,405	5,419	-	-	1 (AlopP98)	Suitable
8	Chavicine	289,375	4,078	-	-	-	Suitable
9	Myrcene	142,286	3,859	-	-	1 (AlogP98)	Suitable
10	Eugenol	166,220	2,353	1	1	-	Suitable
11	Kuersetin	304,254	2,863	6	6	1 (donor)	Suitable
12	Kaempferol	288,255	3,157	5	5	-	Suitable



**Gambar 2.** Proses menyimpulkan in silico senyawa agonis 5-HT<sub>1B</sub>

sumatriptan juga memiliki kemampuan yang rendah untuk menembus sawar otak. Namun hal ini dapat diatasi dengan penggunaan koloid pembawa obat seperti liposom sehingga dapat meningkatkan penyerapan obat melalui sawar darah otak.

Toksistas suatu obat diuji dengan menggunakan uji Ames untuk mengetahui sifat mutagenisitas. Uji ini merupakan uji biologi yang menggunakan bakteri untuk menilai potensi mutagenik senyawa kimia.<sup>33</sup> Sifat karsinogenik suatu senyawa dinilai menggunakan metode *in vivo* pada tikus. Pembandingan untuk sumatriptan bersifat mutagen tetapi tidak bersifat karsinogenik. Piperin dan piperettin seperti sumatriptan, bersifat mutagen tetapi bersifat karsinogenik pada tikus, artinya berpotensi menyebabkan kanker pada tikus.<sup>34</sup> Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk memodifikasi lebih lanjut struktur kimia senyawa uji yang bersifat karsinogenik atau mutagenik.

### 3.5. Analisis Lipinski's Rule of Five

Untuk menentukan drug ability dari senyawa-senyawa yang dianalisis digunakan pedoman *Lipinski's Rule of Five*. Aturan lipinski dapat mengevaluasi desain rute pemberian yang sesuai (oral atau non-oral) dari senyawa berdasarkan sifat fisikokimia. Dalam aturan Lipinski, obat-obat dengan absorpsi atau permeasi yang baik memiliki jumlah ikatan hidrogen donor kurang dari 5, ikatan hidrogen akseptor kurang dari 10, berat molekul lebih dari 500 dalton dan nilai LogP kurang dari 5. Senyawa dengan ukuran yang besar dan ikatan hidrogen yang tinggi dapat menunjukkan profil permeabilitas yang buruk, sementara senyawa dengan ukuran yang besar dan lipofilisitas yang tinggi dapat mengakibatkan kelarutan dalam air yang buruk.<sup>35</sup> Berdasarkan analisis aturan Lipinski, senyawa piperin dan piperettin dapat dikembangkan menjadi sediaan oral.

Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan, 10 senyawa dievaluasi menggunakan simulasi *molecular docking*, dan dua senyawa ditemukan kandidat yang sesuai dengan energi ikat rendah dan residu asam amino kunci. Akhirnya, dua senyawa,

yaitu piperin dan piperettin, diuji ADME dan toksistas serta ketersediaannya untuk pemberian oral. Walaupun hasil ADME dan toksistasnya hampir sama, namun senyawa piperettin memberikan nilai ADME dan toksistas yang lebih baik dibandingkan piperin, dengan nilai HIA, Caco-2, dan BBB yang lebih tinggi. Dari hasil Lipinski, piperettin dapat diberikan secara oral. Ini menunjukkan bahwa piperettin adalah kandidat yang baik dibandingkan dengan senyawa uji lainnya untuk mengobati depresi dengan mekanisme agonis 5-HT<sub>1B</sub>.

## 4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis data, senyawa piperettin memiliki potensi paling besar menjadi obat antidepresan dengan mekanisme agonis 5-HT<sub>1B</sub> di antara senyawa lainnya karena memiliki energi ikatan sebesar -8,84 kKal/mol dengan residu asam amino THR134, meskipun bila dibandingkan dengan *native ligand dihydroergotamin* nilai ini masih lebih rendah. Selain itu berdasarkan hasil prediksi, senyawa ini memiliki sifat farmakokinetika dengan nilai CaCo-2 54,6793; HIA 98,050270% ; PPB 92,408768%. Nilai absorpsi senyawa piperettin pada sistem saraf pusat (SSP) cenderung rendah, namun hal ini dapat diatasi dengan menggunakan *Colloidal Drug-Carrier* seperti liposom. Pengembangan *surface-modified liposomal drug delivery system* ini dapat meningkatkan absorpsi obat melewati *blood brain barrier*.<sup>36</sup> dan dugaan senyawa adanya karsinogen pada salah satu hewan uji, sehingga membutuhkan pengujian ADMET lebih lanjut.

## Daftar Pustaka

1. Institute for Health Metrics and Evaluation. Global Burden Disease Compare [diakses 24 April 2021]. Tersedia Online di <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>.
2. Fajemiroye, J. O., da Silva, D. M., de Oliveira, D. R., dan Costa, E. A. Treatment of anxiety and depression: Medicinal plants in retrospect. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2016; 30(3): 198–215.
3. World Health Organization. Depression And Other Common Mental Disorders.



- Geneva: World Health Organization; 2017.
4. Möller, H.-J., Bandelow, B., Volz, H.-P., Barnikol, U. B., Seifritz, E., dan Kasper, S. The relevance of 'mixed anxiety and depression' as a diagnostic category in clinical practice. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2016;266(8): 725–736.
  5. Khairunisa, N.S., Safitri, D.R., Angelia, D., Taufan, M., dan Sihalo, E.D. Produktivitas dan Depresi di Indonesia: Analisis Data Indonesian Family Life Survey 2014. *Jurnal Ekonomi dan Pembangunan*. 2109; 27(2): 75-84.
  6. Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI. 2019. InfoDATIN: Situasi Kesehatan Jiwa Indonesia [diakses 24 April 2021]. Tersedia Online di <https://pusdatin.kemkes.go.id/resources/download/pusdatin/infodatin/InfoDatin-Kesehatan-Jiwa.pdf>
  7. Sabella, D. Antidepressant Medications. *American Journal of Nursing*. 2018; 118(9): 52–59.
  8. Tiger, M., Varnas, K., Okubo, Y., dan Lundberg, J. The 5-HT<sub>1B</sub> receptor - a potential target for antidepressant treatment. *Pharmacology*. 2018; 235: 1317-1334.
  9. Montanez S, Munn JL, Owens WA, Horton RE, Daws LC. 5-HT<sub>1B</sub> receptor modulation of the serotonin transporter in vivo: studies using KO mice. *Neurochem Int*. 2014;73:127–131.
  10. Hagan CE, McDevitt RA, Liu Y, Furay AR, Neumaier JF. 5-HT<sub>1B</sub> autoreceptor regulation of serotonin transporter activity in synaptosomes. *Synapse*. 2012; 66:1024–1034.
  11. Lu, C.W., Lin, T.Y., Huang, S.K., dan Wang, S.J. 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonist CGS12066 presynaptically inhibits glutamate release in rat hippocampus. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2018; 86:122-130.
  12. Berhan, A., dan Barker, A. Major depressive disorder: a meta-analysis of randomized double-blind controlled trials. *BMC Psychiatry*. 2014;14:276.
  13. Ahmad N, Fazal H, Abbasi B.H, Farooq S, Ali M, Khan M.A. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*. 2012; 2:S1945–S1953.
  14. BPS. 2019. Ekspor Lada Hitam Menurut Negara Tujuan Utama, 2012-2019 [diakses 10 Mei 2021]. Tersedia Online di <https://www.bps.go.id/statistable/2019/02/18/2021/ekspor-lada-hitam-menurut-negara-tujuan-utama-2012-2019.html>
  15. Emon, N.U., Alam, S., Rudra, S., Riya, S.R., Paul, A., Hossen, S., Kulsum, U., dan Ganguly, A. Antidepressant, anxiolytic, antipyretic, and thrombolytic Profiling of Methanol Extract of The Aerial Part of *Piper nigrum*: In vivo, in vitro, and in silico approaches. *Food, Science and Nutrition*. 2020; 9: 833-846.
  16. Sabina EP, Nasreen A, VEDI M, Rasool M. Analgesic, antipyretic and ulcerogenic effects of piperine: An active ingredient of pepper. *J. pharm. Sci. and Res*. 2013; 5(10):203-206.
  17. Tasleem F, Azhar I, Ali SN, Perveen S, Mahmood ZA. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. *Asian Pac J Trop Med*. 2014; 7S1:S461-S468.
  18. Hritcu L, Noumedem JA, Cioanca O, Hancianu M, Postu P, Mihasan M. Anxiolytic and antidepressant profile of the methanolic extract of *Piper nigrum* fruits in beta-amyloid (1-42) rat model of Alzheimer's disease. *Behavioral and Brain Function*. 2015; 11(13):1-13.
  19. Bukhari IA, Pivac N, Alhumayyd MS, Mahesar AL, Gilani AH: The analgesic and anticonvulsant effects of piperine in mice. *J. Physiol. Pharmacol*. 2013; 64:789-794.
  20. Gorgani L, Mohammadi M, dan Najafpour, G.D., dan Nikzad, M. Piperine- The bioactive compound of black pepper: From isolation to medicinal formulations. *Comprehensive Review in Food and Food Safety*. 2017; 16:124-140.
  21. Goswami, A., dan Malviya, N. Reassessing The Restorative Prospectives of The King of Spices Black Pepper. *Journal of Drug*

- Delivery & Therapeutics. 2020; 10 (3): 312-321.
22. Vasavirama K, Upender M. Piperine: a valuable alkaloid from piper species. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014; 6:34–8.
23. Mao, Q.Q., Huang, Z., lo, S.P. Xian, Y.F., dan Che, C.T. 2011. Role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the antidepressant-like effect of piperine in the forced swim test. *Neuroscience Letters.* 2011; 504:81–184.
24. Rao, G.S., D. Charan, S., Kumar, V.A. Reddy, D.S., dan Raju, R.B. Antidepressant Activity of Piper nigrum Fruit Extract And Comparison With Imipramine in Mice Models. 2012;5(7): 3910-3912.
25. Aledeani, E.A., Arshad, M., dan Izhari, M.A. Drug-likeness and Physicochemical Properties Evaluation of The Alkaloids Found in Black Pepper: Piperine, Piperidine, Piperettine and Piperanine. *EJPMR.*2015; 2(6): 296-301.
26. Arba, M., Arfan, Trisnawati, dan Kurniawati, D. Pemodelan Farmakofor untuk Identifikasi Inhibitor Heat Shock Proteins 90 (HSP-90). *Jurnal Farmasi Galenika.* 2020; 6(2): 229-236.
27. Ferwadi, S., Gunawan, R., dan Astuti, W. Studi Docking Molekular Senyawa Asam Sinamat Dan Derivatnya Sebagai Inhibitor Protein 1j4x Pada Sel Kanker Serviks. *Jurnal Kimia Mulawarman.* 2017;14 (2):84-90.
28. Laksmiani, N.P.L., Paramita, N.L.P.V., Wirasuta, I.M.A.G. In Vitro and In Silico Antioxidant Activity of Purified Fractions from Purple Sweet Potato Ethanolic Extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2016;8:177-181.
29. Radchenko, E., Dyabina, A., Palyulin, V., & Zefirov, N. 2016. Prediction of Human Intestinal Absorption of Drugs Compounds. *Russian Chemical Bulletin.* 65 : 576 - 580.
30. Wang, N.-N., Dong, J., Deng, Y.-H., Zhu, M.-F., Wen, M., Yao, J.-Z., Cao, D.- S. 2016. ADME Properties Evaluation in Drug Discovery : Prediction of Caco-2 Cell Permeability Using a Combination of NSGA-II and Boosting. *Journal of Chemical Information and Modeling.* 763 – 773
31. Vieth, M. 2004. Characteristic physical properties and structural fragments of marketed oral drugs. *J. Med. Chem.* 47, 224–232.
32. Ma, X., Chen, C., & Yang, J. 2005. Predictive Model of Blood-Brain Barrier Penetration of Organic Compounds. *Acta Pharmacologica Sinica.* 26 (4) : 500 - 512.
33. Walmsley RM, & Billinton N. 2011. How Accurate is In Vitro Prediction of Carcinogenicity?. *British Journal of Pharmacology.* Vol.162(6):1250–1258.
34. Nohmi T, Masumura K, Toyoda-Hokaiwado, N. 2017. Transgenic Rat Models for Mutagenesis and Carcinogenesis. *Genes and Environment.* Vol. 39(11).
35. Lipinski, C. 2004. Lead Profiling Lead-and Drug-like Compounds : The Rule-of-Five Revolution. *Drug Discovery Today: Technologies.* 1 (4): 337–341.
36. Patel, M.M., dan Patel, B.M. Crossing to Blood-Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to The Brain. *CNS Drug.* 2017; 31(2):109-133.