

In Silico Study of Mangosteen Fruit (*Garcinia mangostana* L.) as Pancreatic Anticancer Against AKT Kinase

Angela A. Elaine*, Akhyatun Nisa, Nabila Tahara,
Dzulfah Q. Aini, Zulvan Syahriar

Departement of Pharmaceutical Analysis and Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Padjadjaran University

Submitted 28 October 2022; Revised 30 January 2023; Accepted 07 February 2023 ; Published 28 April 2023

*Corresponding author: angela19001@mail.unpad.ac.id

Abstract

Pancreatic malignancy results from uncontrolled cell proliferation which leads to reduced cell apoptosis. Therefore, one of the efforts to treat cases of pancreatic cancer is to inhibit anti-apoptotic proteins such as AKT kinase. Inhibition of AKT protein kinase is based on inhibiting AKT kinase protein phosphorylation mechanisms in pancreatic cells. Xanthenes from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) have been shown to have anticancer activity. In this study, xanthenes were investigated for their potential as anti-pancreatic cancer drugs through the molecular docking method. Molecular docking of xanthenes derived compounds was carried out against the AKT kinase protein receptor with AutoDockTools (versions 4,2.6 and 1.5.6), visualized with BIOVIA Discovery Studio 2020, then analysis of pharmacokinetic profiles as well as toxicity and drug-likeness referring to Lipinski's Rule of Five through the pre-ADMET website. The results of molecular docking obtained 5 xanthone derivatives that met the criteria. Of the 5 compounds, the 1-isomangostin compound has a better activity potential when compared to the comparison ligands and other test ligands, with bond energy (G) of -9.90 kcal/mol and an inhibition constant of 54.9 nM. The ADMET prediction results of 1-isomangostin showed good absorption properties (HIA = 94%, Caco2 = 39.97), good distribution (PPB = 79.1%), unable to penetrate the brain barrier (BBB = 0.179), and not toxic.

Keywords: AKT kinase protein, mangosteen, molecular docking, pancreatic cancer, xanthone compounds.

Studi In Silico Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.) sebagai Antikanker Pankreas terhadap AKT Kinase

Abstrak

Keganasan pada pankreas diakibatkan karena tidak terkendalinya proliferasi sel yang akan mengarah pada berkurangnya proses apoptosis sel. Oleh karena itu, salah satu usaha untuk menangani kasus kanker pankreas ini adalah dengan menghambat protein antiapoptosis seperti AKT kinase. Inhibisi protein AKT kinase didasarkan pada mekanisme penghambatan fosforilasi protein AKT kinase pada sel pankreas. Senyawa golongan xanton dari buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) telah terbukti memiliki aktivitas antikanker. Pada penelitian ini senyawa golongan santon diteliti potensinya sebagai obat anti kanker pankreas melalui metode penambatan molekuler yang dilakukan terhadap reseptor protein AKT kinase dengan bantuan AutoDockTools (versi 4,2.6 dan 1.5.6), divisualisasikan dengan BIOVIA Discovery Studio 2020, lalu analisis profil farmakokinetika serta toksisitas dan drug-likeness yang mengacu pada *Lipinski's Rule of Five* melalui situs web pre-ADMET. Penambatan molekuler menghasilkan 5 senyawa turunan santon yang memenuhi kriteria. Senyawa 1-isomangostin memiliki potensi aktivitas yang lebih baik jika dibandingkan dengan ligan pembanding dan ligan uji lainnya dengan energi ikatan (ΔG) -9,90 kkal/mol dan konstanta inhibisi 54,9 nM. Hasil prediksi ADMET dari 1-isomangostin menunjukkan sifat absorpsi yang baik (HIA = 94%, Caco2 = 39,97), distribusi yang baik (PPB = 79,1%), tidak mampu menembus sawar otak (BBB = 0,179), dan tidak bersifat toksik.

Kata Kunci: Buah manggis, kanker pankreas, protein AKT kinase, penambatan molekuler, xanton

1. Pendahuluan

Kanker pankreas merupakan penyakit yang disebabkan oleh proliferasi sel yang bermutasi sehingga penyakit ini merupakan salah satu jenis kanker yang berbahaya di dunia dan terjadinya mutasi ini tidak dapat dikendalikan.¹ Kanker pankreas memiliki tingkat mortalitas yang tinggi. Para penderita kanker pankreas yang dapat bertahan hidup sangat kurang dari 5% dalam waktu 5 tahun. Hal itu dikarenakan pertumbuhan sel kanker yang tidak terkendali sehingga menyebabkan penurunan pada proses terjadinya apoptosis sel.² Proses apoptosis merupakan proses yang penting dalam menghilangkan sel kanker dengan mencegah terjadinya pertumbuhan sel yang tidak terkendali.³ Beberapa protein dapat menghambat proses apoptosis dan meningkatkan proses proliferasi sel. Protein tersebut harus dihambat untuk mencegah berkembangnya kanker. Salah satu jenis dari protein yang berperan menghambat proses apoptosis (antiapoptosis) ialah AKT kinase.⁴

Protein AKT kinase yang juga dikenal sebagai protein kinase B ini berperan penting pada pengaturan berbagai fungsi seluler seperti faktor pertumbuhan sel, proliferasi, metabolisme glukosa, stabilitas genom, transkripsi dan sintesis protein, serta pengatur dari aktivasi hormon fosfatidil inositol-3-kinase (PI3K). Salah satu fungsi utama protein AKT kinase ini adalah untuk meningkatkan kelangsungan hidup yang dimediasi oleh faktor pertumbuhan, peningkatan proliferasi sel dan untuk menghambat apoptosis (antiapoptosis).⁵ Pengaktifan protein AKT kinase dapat mempengaruhi kinerja dari protein-protein yang berperan dalam apoptosis. Pada sel kanker, protein AKT kinase diekspresikan secara berlebih sehingga dapat menghambat kinerja apoptosis. Oleh karena itu, protein AKT kinase dapat dijadikan target dalam pengobatan kanker pankreas. Mekanisme inhibisi protein AKT kinase adalah dengan penghambatan fosforilasi protein AKT kinase pada sel pankreas, sehingga diharapkan dapat menurunkan proliferasi sel kanker melalui peningkatan apoptosis.¹

Saat ini, telah dilakukan banyak penelitian yang menghubungkan aktivitas

senyawa dari suatu tumbuhan dengan potensi senyawa tersebut untuk digunakan sebagai pengobatan dari berbagai macam gangguan dan penyakit tertentu. Salah satunya tanaman buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) yang memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi, antiseptik, analgesik, antikanker, dan antibakteri. Di dalam buah manggis, terkandung senyawa xanton sekitar 123,97 mg/100 mL. Senyawa ini berada di kulit buah dengan ciri cairan berwarna kuning yang sewaktu-waktu keluar dari kulit buah manggis.¹ Xanton merupakan senyawa dari metabolit sekunder fenolik yang masuk ke dalam kelas polifenol dari senyawa keton siklik polifenol. Menurut beberapa studi, xanton telah terbukti memberikan efek farmakologis berupa anti inflamasi, antikanker, dan antibakteri. Oleh karena beberapa efek tersebut senyawa golongan xanton digunakan pada penelitian ini dengan metode simulasi penambatan molekuler untuk memperoleh aktivitas anti kanker pankreas terbaik.

Studi ini dilakukan secara *in silico* dengan menggunakan *molecular docking*. *Molecular docking* atau simulasi penambatan molekuler merupakan metode utama dalam pencarian dan pengembangan obat berbasis struktur secara komputasi. Secara prinsip penambatan molekuler adalah pendekatan berbasis struktur dan dengan metode komputasi menggunakan algoritma matematika untuk mengevaluasi penambatan antara substrat dengan ligan atau senyawa target sehingga membentuk konformasi molekul kompleks.⁶

2. Metode

2.1. Preparasi Reseptor

Struktur kristal protein yang digunakan dalam pengujian, yaitu protein AKT Kinase (AKT1) diunduh dari *Protein Data Bank* (PDB) melalui website <https://www.rcsb.org/> dengan PDB ID: 4EKL5. Struktur kristal protein kemudian dipreparasi menggunakan software BIOVIA Discovery Studio 2020. Protein AKT1 dipreparasi dengan cara dihilangkan molekul airnya dan dipisahkan dari ligan alaminya. Ligan alami dan reseptor AKT1 yang telah dipreparasi kemudian disimpan dengan format protein data bank (.pdb).

2.2. Validasi Metode Simulasi Penambatan Molekuler

Validasi metode simulasi penambatan molekuler dilakukan dengan menggunakan software Autodock Tools 1.5.6. Validasi metode dilakukan dengan menambatkan ulang (*redocking*) protein AKT1 dengan ligan alami protein AKT1. Parameter penambatan ulang molekuler yang baik dikonfirmasi dari nilai *Root Square Mean Deviation* (RSMD) $\leq 2,0$ Å. Reseptor AKT1 dan ligan alaminya dalam format protein data bank (.pdb) dipreparasi terlebih dahulu dengan menggunakan Autodock Tools 1.5.6. Molekul reseptor AKT1 dipreparasi dengan cara diberi hidrogen polar dan muatan Kollman, sedangkan ligan alami dipreparasi dengan cara diberi hidrogen dan senyawa dibuat non-polar serta diberikan muatan Gasteiger. Molekul reseptor dan ligan alami yang telah dipreparasi disimpan dalam format .pdbqt dan dilakukan penambatan ulang antara protein AKT1 dengan ligan alaminya dengan menggunakan Autodock Tools 1.5.6.

2.3. Preparasi Ligan

Ligan yang berupa senyawa turunan santan dari kulit buah manggis dan senyawa pembanding yang berupa senyawa obat untuk kanker pankreas, yaitu 5-fluorourasil dan gemitabin, diunduh strukturnya dari situs Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Struktur seluruh ligan uji dan ligan pembanding yang telah diunduh kemudian struktur 2D digambarkan ulang dengan menggunakan software ChemDraw Ultra 12.0. Hasil penggambaran struktur disimpan dalam format file .cdx. Senyawa yang telah digambarkan kemudian dioptimasi dengan menggunakan Chem3D Pro 12.0. Senyawa hasil optimasi disimpan dalam bentuk file protein data bank (.pdb).

2.4. Simulasi Penambatan Molekuler

Struktur kristal protein dan struktur molekuler ligan yang telah disimpan dalam format protein data bank (.pdb) dipreparasi lebih lanjut dengan menggunakan Autodock Tools 1.5.6 sebelum dilakukan simulasi penambatan molekuler dengan software yang

sama. Molekul reseptor AKT1 dipreparasi dengan menambahkan molekul hidrogen yang polar dan ditambahkan muatan Kollman. Molekul reseptor yang sudah dipreparasi kemudian disimpan dalam format file .pdbqt. Ligan dipreparasi dengan ditambahkan molekul hidrogen kemudian ligan ditambahkan muatan Gasteiger. Molekul ligan yang telah dipreparasi kemudian disimpan dalam format file .pdbqt. Pada simulasi penambatan molekuler, digunakan koordinat grid box x, y, z secara berurutan pada 27,721; 5,411; 10,714 dengan *grid box point* 40 x 40 x 40 serta spasi 0,375 Å. Data parameter yang digunakan berdasarkan pada Algoritma Genetik Lamarckian dan dengan 100 kali pengerjaan.

2.5. Prediksi Farmakokinetik dan Toksisitas

Sifat farmakokinetik dan toksisitas dari senyawa turunan xanton pada buah manggis dan senyawa pembanding, yaitu 5-fluorourasil dan gemitabin dapat diprediksi pada situs web <https://preadmet.bmdrc.kr/>. Parameter yang digunakan antara lain adalah *human intestinal absorption* (HIA) dan Caco2 sebagai parameter untuk absorpsi, *brain blood barrier* (BBB) dan *plasma protein binding* (PPB) sebagai parameter distribusi, mutagenesitas serta karsinogenesitas sebagai parameter toksisitas.

2.6. Analisis Lipinski's Rules of Five

Analisis *Lipinski's Rule of Five* dilakukan untuk menentukan *drug-likeness* dari senyawa uji dan senyawa pembanding. Persyaratan dari *Lipinski's Rule of Five* antara lain bobot molekuler ≤ 500 dalton, nilai $\log P \leq 5$, ikatan hidrogen donor ≤ 5 , dan ikatan hidrogen akseptor ≤ 10 . Nilai dari parameter yang digunakan dalam analisis *Lipinski's Rule of Five* dari senyawa uji dan senyawa pembanding dapat dilihat dari informasi ligan dengan menggunakan software LiganScout 4.4.5. Hasil *drug-likeness* dapat ditentukan dengan melihat jumlah parameter *Lipinski's Rule of Five* yang tidak terpenuhi oleh masing-masing senyawa. Jika satu parameter tidak terpenuhi masih dapat ditoleransi dan masih memenuhi *drug-likeness*.

3. Hasil

3.1. Validasi Metode Penambatan Molekuler

Pada validasi penambatan molekuler menggunakan parameter nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) untuk mengetahui hasil validasi metode yang baik. Dari proses validasi didapatkan nilai RMSD sebesar 1,33 (Tabel 1), *grid point* (x, y, z) sebesar 40, 40, 40 poin, dan *grid address* (x, y, z) pada 27,721; 5,411; 10,714.

3.2. Simulasi Penambatan Molekuler

Seluruh ligan uji dan ligan pembanding yang telah dipreparasi (Tabel 2) dilakukan penambatan molekuler terhadap reseptor target, yaitu protein AKT1. Pada simulasi penambatan molekuler digunakan parameter energi ikatan, konstanta inhibisi, dan interaksi antara ligan dengan asam amino reseptor target. Dari parameter energi ikatan (Tabel 3), senyawa uji 1-isomangostin ($\Delta G = -10,22$ kkal/mol), 7-O-metilgarsinon ($\Delta G = -10,24$ kkal/mol), dan garsinon E ($\Delta G = -9,8$ kkal/mol) memiliki energi ikatan yang lebih rendah dibandingkan dengan senyawa uji lainnya maupun dengan ligan pembanding. Senyawa 1-isomangostin ($K_i = 32,31$ nM), 7-O-metilgarsinon ($K_i = 31,21$ nM), dan garsinon E ($K_i = 66,07$) merupakan senyawa yang memiliki nilai konstanta inhibisi paling rendah jika dibandingkan dengan senyawa uji lain dan senyawa pembanding gemsitabin ($K_i = 279,0$ μ M) dan 5-fluorourasil ($K_i = 1,12$ mM). Interaksi antara ligan dengan asam amino target menunjukkan senyawa uji 1-isomangostin dan 7-O-metilgarsinon memiliki interaksi asam amino yang sama seperti interaksi ligan alami AKT 1 dengan reseptor AKT1 (Tabel 3).

3.3. Prediksi Farmakokinetik dan Toksisitas

Farmakokinetik serta toksisitas seluruh senyawa uji dan senyawa pembanding diprediksi dengan menggunakan beberapa parameter. Proses farmakokinetik yang diprediksi antara lain proses absorpsi dan distribusi. Pada prediksi proses absorpsi menggunakan parameter *human intestinal absorption* (HIA) dan Caco-2. Dari hasil pada Tabel 4, senyawa 7-O-metilgarsinon (HIA 93,5%), 1-isomangostin (HIA 94,059%), dan beta-mangostin (HIA 94,57%) merupakan senyawa uji yang memiliki nilai HIA paling besar dibandingkan dengan senyawa uji lain ataupun senyawa pembanding. Dari parameter Caco-2, senyawa 7-O-metilgarsinon (Caco-2 27,7), Beta-mangostin (Caco-2 36,6), dan 1-isomangostin (39,97) memiliki nilai parameter Caco-2 yang lebih besar jika dibandingkan dengan senyawa uji maupun senyawa pembanding.

Proses distribusi diprediksi dengan menggunakan parameter *plasma binding protein* (PPB) dan *blood brain barrier* (BBB). Dari parameter PPB (Tabel 4), seluruh senyawa memiliki nilai PPB kurang dari 99%, kecuali senyawa 8-deoksiganon, euksanton, gamma-mangostin, garsinon E, dan gartanin. Berdasarkan parameter BBB, senyawa 7-O-metilgarsinon, alfa-mangostin, beta-mangostin, gamma-mangostin, garsinon C, dan rubrasanton dieksklusi karena memiliki nilai BBB yang tidak memenuhi syarat. Dari hasil prediksi toksisitas, didapatkan senyawa 1-3-5-6-tetrahidroksixanton, euxanton, dan gartanin bersifat mutagen, sedangkan senyawa gartanin dan rubrasanton memiliki sifat karsinogen.

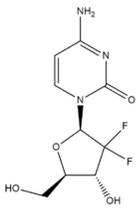
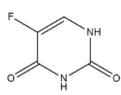
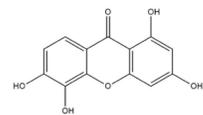
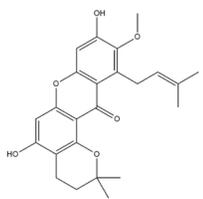
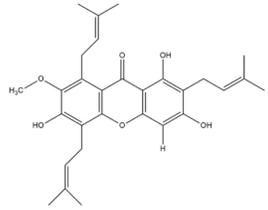
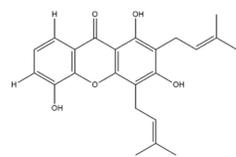
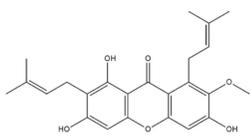
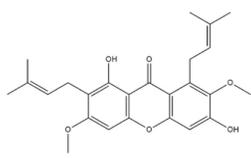
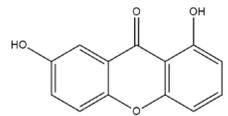
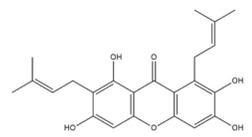
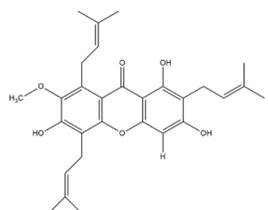
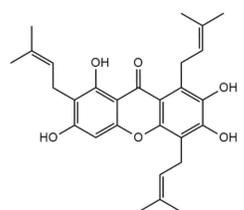
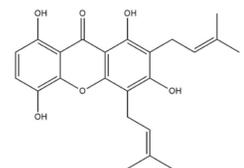
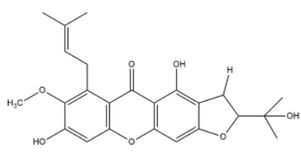
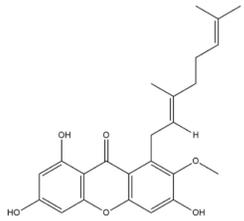
3.4. Analisis Lipinski's Rules of Five

Parameter yang digunakan dalam analisis *Lipinski's Rules of Five* antara lain berat

Tabel 1. Hasil Validasi Penambatan Molekuler

Ligan Alami	Grid Address (x, y, z)	ΔG (Kcal/mol)	RMSD	Interaksi Asam Amino
(2S)-2-(4-chlorophenyl)-1-{4-[[5R,7R]-7-hydroxy-5-methyl-6,7-dihydro-5H-cyclopenta[d]pyrimidin-4-yl]piperazin-1-yl}-3-(propan-2-ylamino)propan-1-one	27,721; 5,411; 10,714	-9,97	1,33	Met227; Lys179; Val164; Glu278; Glu234; Lys158; Gly157; Met281; Leu156; Ala177; Ala230; Glu228.

Tabel 2. Struktur Ligan

Struktur Ligan		
		
Gemsitabin	5-fluorourasil	1-3-5-6-tetrahidroksixanton
		
1-isomangostin	7-O-metilgarsinon	8-deoksiganon
		
Alfa-mangostin	Beta-mangostin	Euxanton
		
Gamma-mangostin	Garsinon C	Garsinon E
		
Gartanin	Mangostanin	Rubrasanton

molekul, logP, jumlah ikatan hidrogen donor, dan jumlah ikatan hidrogen akseptor. Seluruh senyawa uji dan pembanding memiliki jumlah pelanggaran *Lipinski's Rules of Five* yang masih dapat ditoleransi sehingga seluruh senyawa uji dan pembanding memenuhi kriteria *drug likeness* (Tabel 5).

4. Pembahasan

4.1. Preparasi Reseptor

Struktur kristal reseptor AKT1 (Gambar 1) yang diunduh pada situs Protein Data Bank (PDB ID: 4EKL) dipilih sebagai makromolekul dalam pengujian karena memiliki parameter eksperimental yang baik. Parameter eksperimental tersebut terdiri dari resolusi eksperimental (2,00 Å), nilai R-kerja (0,172), nilai R-bebas (0,235), dan nilai R-observasi (0,175).⁵ Nilai-nilai parameter yang dimiliki oleh struktur kristal AKT1 telah memenuhi

Tabel 3. Parameter penambatan molekuler

No	Senyawa	Cluster	ΔG (kkal/mol)	Ki (μM)	Interaksi dengan asam amino		
					Ikatan hidrogen	Ikatan van der waals	Lain-lain
1.	Gemcitabin	12	-4,85	279,0	Leu156; Glu234; Lys179; Asp292	-	Val164
2.	5-fluorourasil	2	-4,03	1,12x10 ³	Glu234; Asp438; Leu156	-	Phe438
3.	1-3-5-6-tetrahidroksi xanton	27	-6,60	14,58	Leu156; Ala230; Glu228; Thr291	-	Glu234;Val164;Met281; Ala177
4.	1-isomangostin	100	-10,22	32,31x10 ⁻³	Ala230; Glu278; Glu234	-	Lys179;Met227;Ala177; Val164;Leu156;Met281; Gly157
5.	7-O-metilgarsinon	68	-10,24	31,21x10 ⁻³	Glu234; Glu278	-	Met227; Ala230;Ala177; Met281;Leu156; Gly157; Val164
6.	8-deoksigartanin	12	-8,45	644,68x10 ⁻³	Thr291; Glu234	-	Lys179; Phe442;Phe438; Met281;Val164; Ala177; Ala230
7.	Alfa-mangostin	70	-9,40	129,55x10 ⁻³	Lys179; Thr291; Glu234	-	Ala177; Ala230;Leu156; Met281;Met22; Val164; Phe438
8.	Beta-mangostin	14	-9,13	202,23x10 ⁻³	Glu278; Glu234	-	Phe237;Phe438; Ala177; Met227;Ala230;Met281; Lys179; Val164;Phe442
9.	Euxanton	46	-6,98	7,70	Glu234; Tyr437; Asp439	-	Val164
10.	Gamma-mangostin	68	-8,91	295,20x10 ⁻³	Glu234; Lys179; Thr291	-	Phe438; Val164;Met22; Met28;Ala230
11.	Garsinon C	17	-8,95	272,90x10 ⁻³	Lys179; Lys158	-	Leu181; Glu234; Val164; Ala177;Leu156; Met281; Met227;Ala230;Lys289
12.	Garsinon E	68	-9,80	66,07x10 ⁻³	Glu234; Glu278	-	Phe438;Phe442; Met281; Ala177;Ala230;Met227; Val164; Lys179
13.	Gartanin	37	-8,48	606,52x10 ⁻³	Glu228	-	Ala177;Met22; Met281; Val164; Phe438; Phe442
14.	Mangostanin	1	-8,74	394,90x10 ⁻³	Met281; Asp439; Glu234	-	Phe442; Val164;Ala177; Met227
15.	Rubraxanton	52	-9,07	223,37x10 ⁻³	Glu198; Glu278	-	Thr291; Met227;Lys179; Phe237;Phe438; Leu156; Val164

persyaratan sebagai reseptor yang baik.⁷ Preparasi struktur kristal reseptor dengan menggunakan BIOVIA Discovery Studio 2020 terdiri dari penghilangan molekul air dan pemisahan dengan ligan alaminya. Tujuan dari penghilangan molekul air pada preparasi, yaitu untuk menyederhanakan proses kalkulasi dan simulasi penambatan molekul. Dalam simulasi penambatan molekuler, makromolekul yang berupa protein harus dipreparasi agar proses penambatan molekul dapat berlangsung semirip mungkin dengan proses fisiologis yang ada dalam tubuh manusia.

4.2. Validasi Metode Penambatan Molekuler

Tujuan dari validasi penambatan molekuler yaitu untuk memastikan bahwa metode dan perangkat lunak yang digunakan untuk penambatan molekul telah memenuhi standar validitas dan dapat diimplementasikan sebagai prosedur pengujian dan simulasi molekuler. Pada proses validasi penambatan molekuler, protein AKT1 dilakukan penambatan ulang dengan ligan alaminya. Nilai RMSD yang menunjukkan hasil validasi metode yang baik yaitu $\leq 2,0 \text{ \AA}$.⁸ Pada proses validasi metode penambatan molekuler, didapatkan nilai RMSD sebesar 1,33 (Tabel 1). *Grid point* (x, y, z) yang ditetapkan pada validasi sebesar 40, 40, dan 40 poin. Hal ini menunjukkan bahwa metode serta parameter penambatan molekuler yang diatur pada pengujian dinyatakan valid dan dapat diaplikasikan pada proses simulasi penambatan molekuler senyawa uji dan senyawa pembanding dengan protein AKT1.

4.3. Preparasi Ligan

Ligan uji yang digunakan merupakan senyawa turunan golongan santon dari tanaman manggis (*G. mangostana*). Digunakan 13 senyawa uji, yaitu 1-3-5-6-tetrahidrosixanton, 1-isomangostin, 7-O-metilgarsinon, 8-deoksigtartanin, alfa-mangostin, beta-mangostin, euxanton, gamma-mangostin, garsinon C, garsinon E, gartanin, mangostanin, dan rubraxanton (Tabel 2). Selain melakukan simulasi penambatan molekuler antara senyawa uji dengan protein AKT1, digunakan juga senyawa pembanding,

yaitu gemitabin dan 5-fluorourasil (Tabel 2). Gemitabin dan 5-fluorourasil dipilih sebagai senyawa pembanding karena saat ini kedua senyawa tersebut digunakan sebagai terapi *adjuvant* dari kanker pankreas.⁹ Struktur senyawa uji digambar dengan menggunakan software ChemDraw Ultra 12.0, kemudian struktur diminimisasi energinya dengan menggunakan Chem3D Pro 12.0. Tujuan dari minimisasi energi untuk optimasi struktur sehingga didapatkan senyawa dengan bentuk yang paling stabil.

4.4. Simulasi Penambatan Molekuler

Penambatan molekuler merupakan metode analisis konformasi dan orientasi dari suatu molekul ke situs ikatan (*binding site*) dari protein target.¹⁰ Penambatan molekuler memberikan hasil yang cukup menjanjikan dalam proses identifikasi dan perkembangan senyawa obat.¹¹ Kemampuan protein untuk berinteraksi dengan ligan dan membentuk suatu kompleks reseptor-ligan menjadi peran utama dalam menentukan dinamika protein untuk meningkatkan ataupun menghambat aktivitas fisiologisnya. Hasil penambatan molekuler ditunjukkan pada Tabel 3. Berdasarkan hasil dari penambatan molekuler, digunakan beberapa parameter, yaitu energi ikatan (ΔG), konstanta inhibisi, dan interaksi antara ligan dengan residu asam amino pada reseptor. Senyawa pembanding gemitabin dan 5-fluorourasil memiliki energi ikatan sebesar -4,85 kkal/mol dan -4,03 kkal/mol. Seluruh senyawa uji memiliki energi ikatan yang lebih rendah dibandingkan dengan energi ikatan senyawa pembanding. Hal ini menunjukkan interaksi antara reseptor AKT1 dengan senyawa uji lebih baik dibandingkan dengan senyawa pembanding. Nilai energi ikatan yang rendah menunjukkan proses pembentukan kompleks ligan-reseptor dapat berlangsung secara spontan.¹² Berdasarkan parameter energi ikatan, senyawa uji 1-isomangostin ($\Delta G = -10,22$ kkal/mol), 7-O-metilgarsinon ($\Delta G = -10,24$ kkal/mol), dan Garsinon E ($\Delta G = -9,8$ kkal/mol) memiliki energi ikatan yang lebih rendah dibandingkan dengan senyawa uji lainnya maupun dengan ligan pembanding.

Tabel 4. Hasil prediksi ADME dan toksisitas

No	Nama Senyawa	Absorpsi		Distribusi		Toksistas	
		HIA (%)	Caco2	PPB (%)	BBB	Mutagen	Karsinogen
1	Gemcitabin	58,132	7,825	8,141	0,194	mutagen	Mouse:+ Rat:+
2	5-fluorourasil	75,925	17,253	8,313	0,199	mutagen	Mouse:+ Rat:+
3	1-3-5-6-tetrahidroksixanton	74,427	20,836	92,528	0,428	mutagen	Mouse:- Rat:+
4	1-isomangostin	94,059	39,968	79,091	0,179	non mutagen	Mouse:- Rat:+
5	7-O-metilgarsinon	93,500	27,704	97,271	6,949	non mutagen	Mouse:- Rat:+
6	8-deoksigartanin	91,786	10,757	100	4,943	non mutagen	Mouse:- Rat:+
7	Alfa-mangostin	91,811	20,694	96,620	3,938	non mutagen	Mouse:- Rat:+
8	Beta-mangostin	94,575	36,592	93,75	3,812	non mutagen	Mouse:- Rat:+
9	Euxanton	91,867	0,216	100	0,823	mutagen	Mouse:- Rat:+
10	Gamma-mangostin	87,254	18,727	100	4,101	non mutagen	Mouse:- Rat:+
11	Garsinon C	77,822	15,555	98,587	0,828	non mutagen	Mouse:- Rat:+
12	Garsinon E	90,421	19,809	100	6,317	non mutagen	Mouse:- Rat:+
13	Gartanin	87,254	14,261	100	2,642	mutagen	Mouse:+ Rat:+
14	Mangostanin	91,491	20,675	90,480	0,576	non mutagen	Mouse:- Rat:+
15	Rubraxanton	91,814	21,354	97,876	3,260	non mutagen	Mouse:+ Rat:+

Rendahnya nilai energi ikatan tidak menjamin suatu proses inhibisi atau proses interaksi antara ligan dengan reseptor dapat berlangsung dengan baik. Kemampuan suatu ligan untuk berinteraksi dengan asam amino katalitik sangat dibutuhkan untuk mengaktifasi protein fungsional tersebut. Interaksi asam amino antara protein AKT1 dengan ligan alaminya terjadi pada asam amino Met227; Lys179; Val164; Glu278; Glu234; Lys158; Gly157; Met281; Leu156; Ala177; Ala230; Glu228 (Gambar 2). Seluruh senyawa uji maupun senyawa pembanding memiliki interaksi terhadap protein AKT1 pada beberapa asam amino yang sama seperti interaksi ligan alami. Hal tersebut menunjukkan bahwa ligan uji maupun ligan pembanding terikat pada situs katalitik dari

protein AKT1. Senyawa uji 1-isomangostin dan 7-O-metilgarsinon memiliki interaksi asam amino yang sama seperti interaksi ligan alami AKT1 dengan reseptor AKT1.

Selain parameter energi ikatan dan interaksi antara ligan-reseptor, parameter lain yang digunakan dalam simulasi penambatan molekuler adalah konstanta inhibisi (K_i). Konstanta inhibisi mengindikasikan afinitas antara protein atau reseptor dengan ligannya. Senyawa dengan nilai konstanta inhibisi rendah menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki afinitas yang baik dengan reseptor.¹³ Berdasarkan hasil pada Tabel 3, senyawa 1-isomangostin ($K_i = 32,31$ nM), 7-O-metilgarsinon ($K_i = 31,21$ nM), dan garsinon E ($K_i = 66,07$) merupakan senyawa yang memiliki nilai konstanta inhibisi paling

Tabel 5. Hasil analisis *Lipinski's Rule of Five*

No	Nama Senyawa	Berat molekul (g/mol)	CLogP	Ikatan hidrogen donor	Ikatan hidrogen akseptor	Pelanggaran RO5	Drug likeness
1	Gemcitabin	265,216	-1,601	4	6	-	yes
2	5-fluorourasil	130,078	-0,798	2	3	-	yes
3	1-3-5-6-tetrahidroksixanton	262,217	2,595	5	5	-	yes
4	1-isomangostin	414,498	5,885	3	5	1	yes
5	7-O-metilgarsinon	486,649	7,664	4	5	1	yes
6	8-deoksigtartanin	386,488	6,607	4	4	1	yes
7	Alfa-mangostin	416,514	6,075	4	5	1	yes
8	Beta-mangostin	430,541	6,378	3	5	1	yes
9	Euxanton	230,219	3,030	3	3	-	yes
10	Gamma-mangostin	402,487	5,772	5	5	1	yes
11	Garsinon C	418,486	4,887	6	6	1	yes
12	Garsinon E	472,622	7,361	5	5	1	yes
13	Gartanin	402,487	5,772	5	5	1	yes
14	Mangostanin	430,497	4,855	4	6	-	yes
15	Rubraxanton	416,514	6,293	4	5	1	yes

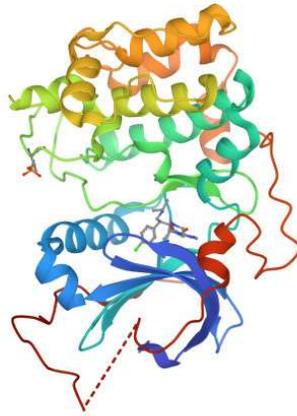
rendah jika dibandingkan dengan senyawa uji lain dan senyawa pembanding gemcitabin ($K_i = 279,0 \mu\text{M}$) dan 5-fluorourasil ($K_i = 1,12 \text{ mM}$).

4.5. Prediksi Farmakokinetik dan Toksisitas

Istilah farmakokinetika secara sederhana dapat diartikan sebagai kerja tubuh terhadap obat ketika obat masuk ke dalam tubuh pasien. Secara umum farmakokinetika dapat dideskripsikan melalui empat proses penting, yaitu absorpsi, distribusi, metabolisme, dan eliminasi, atau lebih dikenal dengan istilah ADME. Interaksi antara molekul obat dengan tubuh dapat mengontrol kecepatan dan efisiensi relatif dari masing-masing proses farmakokinetika.¹⁴ Dalam proses penemuan dan pengembangan obat, perlu dilakukan

adanya pengujian untuk memprediksi proses farmakokinetika yang terdiri dari proses absorpsi, distribusi, metabolisme, dan eliminasi (ADME) dan prediksi toksisitas dari masing-masing senyawa uji. Tujuan perlu dilakukannya prediksi ADME dan toksisitas yaitu agar masalah farmakokinetik obat dapat dihindari. Pada parameter pengujian prediksi ADME, digunakan beberapa parameter. Parameter absorpsi terdiri dari *Human Intestinal Absorption* (HIA) dan sel Caco-2. Parameter distribusi terdiri dari *Plasma Protein Binding* (PPB) dan *Blood Brain Barrier* (BBB). Parameter untuk prediksi toksisitas senyawa uji menggunakan mutagenesis dan karsinogenesis. Hasil prediksi ADME dan toksisitas tersedia pada Tabel 4.

Human Intestinal Absorption (HIA)

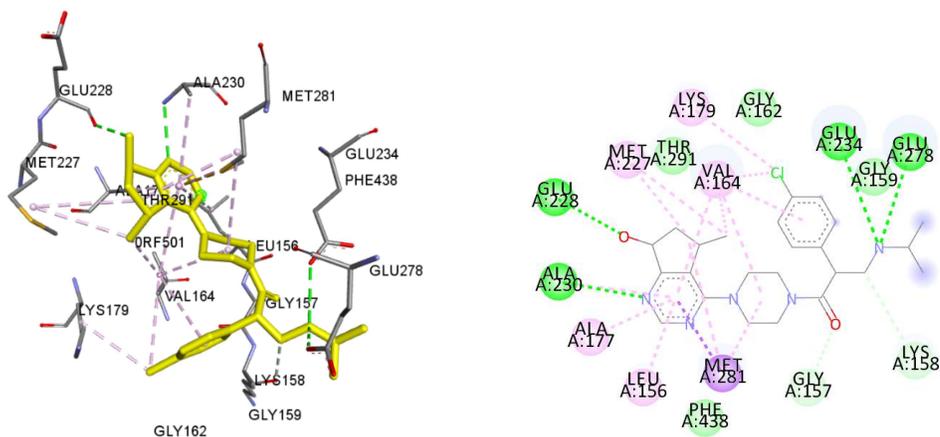


Gambar 1. Struktur kristal protein AKT1 (PDB ID: 4EKL)

merupakan parameter yang menunjukkan jumlah suatu senyawa yang dapat diabsorpsi atau diserap oleh usus. Absorpsi obat pada usus kecil sangat penting untuk menentukan bioavailabilitas obat yang diberikan secara oral. Nilai HIA dinyatakan dalam persen dan menunjukkan kemampuan senyawa untuk diabsorpsi. Nilai HIA kurang dari 30% menunjukkan senyawa diserap secara buruk pada usus, nilai HIA 30-70% menunjukkan senyawa diserap secara cukup baik pada usus, dan nilai HIA lebih dari 70% menunjukkan senyawa diserap secara baik pada usus.¹⁵ Pada hasil prediksi ADME dan toksisitas yang tertera pada Tabel 4, dari parameter HIA didapatkan bahwa seluruh senyawa uji maupun senyawa pembanding memiliki kemampuan untuk diserap pada usus dengan cukup baik ataupun dengan baik (nilai HIA lebih dari

30%). Senyawa 7-O-metilgarsinon (HIA = 93,5%), 1-isomangostin (HIA = 94,059%), dan Beta-mangostin (HIA = 94,575%) merupakan senyawa uji yang memiliki nilai HIA paling besar dibandingkan dengan senyawa uji lain ataupun senyawa pembanding, yaitu gemitabin (HIA = 53,132%) dan 5-fluorourasil (HIA = 75,925%). Hal ini menunjukkan, senyawa 7-O-metilgarsinon, 1-isomangostin, dan beta-mangostin merupakan senyawa uji dengan kemampuan untuk diserap oleh usus paling baik sehingga mudah diabsorpsi ketika diberikan secara oral.

Selain dari parameter HIA, prediksi proses absorpsi senyawa di dalam tubuh manusia juga dapat dilihat melalui parameter Caco-2. Sel Caco-2 (*human colon adenocarcinoma*) merupakan pengganti sel epitel usus manusia yang biasa digunakan



Gambar 1. Visualisasi interaksi asam amino antara AKT kinase dengan ligan alami

untuk memperkirakan permeabilitas obat secara *in vitro*. Sel Caco-2 digunakan karena memiliki kesamaan secara morfologi maupun fungsional dengan enterosit manusia.¹⁶ Sel Caco-2 berasal dari sel colorectal adenocarcinoma manusia.¹⁷ Nilai parameter Caco-2 kurang dari 4 menunjukkan senyawa memiliki permeabilitas yang rendah, nilai Caco-2 antara 4-70 menunjukkan senyawa memiliki permeabilitas yang sedang atau cukup, dan untuk nilai Caco-2 lebih dari 70 menunjukkan senyawa memiliki permeabilitas yang tinggi. Dari hasil prediksi absorpsi yang tertera pada Tabel 4, senyawa 7-O-metilgarsinon (Caco-2 = 27,704), Beta-mangostin (Caco-2 = 36,592), dan 1-isomangostin (Caco-2 = 39,968) memiliki nilai parameter Caco-2 yang lebih besar jika dibandingkan dengan senyawa uji maupun senyawa pembanding. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga senyawa memiliki permeabilitas yang sedang. Diantara senyawa uji dan senyawa pembanding hanya ada satu senyawa yang memiliki nilai permeabilitas buruk, yaitu senyawa Euxanton dengan nilai parameter Caco-2 sebesar 0,216.

Proses distribusi obat suatu senyawa dapat diprediksi melalui dua parameter, yaitu *plasma binding protein* (PPB) dan *blood-brain barrier* (BBB). Terikatnya molekul obat dengan protein plasma dapat membantu sekaligus menghalangi proses distribusi senyawa obat dalam tubuh. Terikatnya senyawa obat dengan protein plasma seperti albumin dapat membantu proses distribusi obat melalui aliran darah untuk mencapai area target kerja obat. Namun obat yang terikat secara kuat pada protein plasma menjadi sulit untuk berdifusi ke dalam jaringan.¹⁸ Nilai parameter PPB kurang dari 90% menunjukkan senyawa terikat secara lemah dengan protein plasma, sedangkan nilai parameter BBB lebih dari 90% menunjukkan senyawa terikat secara kuat pada protein plasma. Namun nilai PPB masih dapat ditoleransi karena berdasarkan penelitian, suatu obat masih dapat memberikan konsentrasi obat bebas jika nilai PPB di bawah 99%.¹⁹ Berdasarkan hasil yang tertera pada Tabel 4, senyawa 8-deoksigartanin, euxanton, gamma-mangostin, garsinon E, dan gartanin

memiliki nilai PPB lebih dari 99%, yaitu 100%. Oleh karena itu berdasarkan parameter PPB kelima senyawa tersebut dieksklusi karena terikat secara kuat pada protein plasma.

Parameter lain yang digunakan untuk memprediksi distribusi senyawa adalah *blood brain barrier* (BBB). *Blood brain barrier* atau sawar otak terbentuk dari sel endotelial yang tersusun secara rapat di sekitar kapiler otak untuk membentuk penghalang yang sangat selektif antara otak dengan tubuh. Obat neuroaktif harus memiliki kemampuan untuk menembus sawar otak, tetapi obat yang target kerjanya di area tubuh lain umumnya tidak menembus sawar otak untuk menghindari efek samping yang bersifat psikotropik.²⁰ Nilai parameter BBB lebih dari 2,0 menunjukkan senyawa mampu melewati sawar otak dengan baik, nilai parameter BBB antara 2,0 - 0,1 menunjukkan senyawa cukup mampu untuk melewati sawar otak, dan nilai parameter BBB kurang dari 0,1 menunjukkan senyawa tidak memiliki kemampuan untuk melewati sawar otak.²¹ Senyawa obat untuk kanker pankreas tidak didesain untuk menembus sawar otak, maka senyawa yang memiliki kemampuan untuk menembus sawar otak (nilai BBB > 2) tidak akan digunakan sebagai kandidat senyawa potensial. Berdasarkan hasil nilai parameter BBB pada Tabel 4, senyawa 7-O-metilgarsinon, alfa-mangostin, beta-mangostin, gamma-mangostin, garsinon C, dan rubraxanton dieksklusi karena memiliki kemampuan untuk menembus sawar otak dengan baik.

Selain prediksi proses farmakokinetika senyawa obat dalam tubuh, dilakukan juga prediksi toksisitas senyawa terhadap tubuh. Parameter untuk prediksi toksisitas yang digunakan adalah mutagenesitas dan karsinogenesitas. Mutagenesitas senyawa diprediksikan melalui uji Ames (*Ames Test*). Uji Ames merupakan pengujian dengan menggunakan bakteri dalam jangka waktu pendek untuk mengidentifikasi senyawa karsinogen dengan mutagenesitas bakteri sebagai titik akhir pengujian. Bakteri yang digunakan dalam Uji Ames adalah bakteri strain *Salmonella typhimurium* yang membutuhkan senyawa histidin untuk

tumbuh.²² Uji Ames dilakukan dengan menguji pertumbuhan bakteri mutagen pada medium agar. Mutasi yang terjadi akan menghambat biosintesis histidin sehingga bakteri tidak dapat tumbuh.²³ Hasil Uji Ames berupa pernyataan positif atau negatif yang menunjukkan mutagenesis dari senyawa. Berdasarkan hasil pada Tabel 4, senyawa pembanding yaitu gempitabin dan 5-fluorourasil, serta senyawa uji 1-3-5-6-tetrahydroksixanton, euxanton, dan gartanin bersifat mutagen. Uji karsinogenitas dilakukan secara *in vivo* pada tikus, dan didapatkan hasil senyawa gempitabin, 5-fluorourasil, gartanin, dan rubrasanton memiliki sifat karsinogen.

4.6. Analisis *Lipinski's Rule of Five*

Lipinski's Rule of Five dapat digunakan sebagai parameter penentu drug-likeness dari suatu senyawa. Syarat dari *Lipinski's Rule of Five* antara lain berat molekul senyawa kurang dari 500 dalton, ikatan hidrogen donor kurang dari 5, ikatan hidrogen akseptor kurang dari 10, dan nilai LogP kurang dari 5. *Lipinski's Rule of Five* dapat menentukan apakah senyawa yang ingin dikembangkan menjadi obat memiliki syarat yang baik untuk dibuat dalam bentuk sediaan oral atau non-oral.²⁶ Berdasarkan data hasil penentuan analisis *Lipinski's Rule of Five* dari seluruh senyawa uji dan senyawa pembanding yang dapat dilihat pada Tabel 5, seluruh senyawa uji dan senyawa pembanding memenuhi syarat *Lipinski's Rules of Five* dan dapat dikembangkan untuk dijadikan sediaan oral. Senyawa 1-isomangostin yang merupakan senyawa dengan hasil simulasi penambatan molekuler dan prediksi ADMET paling baik juga menunjukkan memenuhi persyaratan *Lipinski's Rule of Five* dengan bobot molekul 414,498 dalton, memiliki 3 ikatan hidrogen donor dan 5 ikatan hidrogen akseptor, dan nilai Log P sebesar 5,885. Hasil nilai Log P senyawa 1-isomangostin melebihi persyaratan, tetapi masih termasuk dalam rentang toleransi dari analisis *Lipinski's Rule of Five* (toleransi hasil yang melebihi syarat tidak boleh lebih dari satu).

Obat kanker dalam bentuk sediaan oral sendiri sudah banyak berkembang dalam kurun

waktu 20 tahun terakhir, namun penggunaan sediaan oral sebagai obat anti kanker masih memiliki banyak keterbatasan. Keterbatasan sediaan oral obat anti kanker yang biasa ditemui adalah masalah bioavailabilitas senyawa yang tidak dapat diprediksi. Oleh karena itu, obat anti kanker masih banyak diadministrasikan secara intravena dan perlu dipertimbangkan kembali apakah senyawa yang berpotensi dikembangkan menjadi obat anti kanker akan dibuat dalam bentuk sediaan oral atau sediaan intravena meski senyawa tersebut memenuhi persyaratan pada *Lipinski's Rule of Five*.²⁷

5. Simpulan

Dari 13 senyawa uji yang diuji, terdapat 5 senyawa yang memenuhi kriteria berdasarkan parameter prediksi ADME dan toksisitas, parameter penambatan molekuler, serta parameter *Lipinski's Rule of Five*. Kelima senyawa tersebut yaitu 1-isomangostin, alfa-mangostin, beta-mangostin, gamma-mangostin, dan garsinon C. Dari kelima senyawa tersebut, 1-isomangostin adalah senyawa dengan binding energi paling negatif (-9,90 kkal/mol) dan konstanta inhibisi paling kecil (54,9 nM). Oleh karena itu, dari hasil simulasi penambatan molekuler senyawa xanton dan turunannya dari tanaman manggis, 1-isomangostin menjadi senyawa dengan interaksi paling baik dengan AKT Kinase dibandingkan dengan senyawa uji lain dan senyawa obat pembanding.

Daftar Pustaka

1. Noviardj, H., Wulanawati, A., Sholehuddin M. I., M. Perbandingan inhibisi -Mangostin, -Mangostin, dan Mangostin Terhadap Protein AKT-Kinase Pada Sel Kanker Pankreas Secara Molecular Docking. *Jurnal Farmamedika*. 2016; 1(1):1-2.
2. Zhao, G., Deng, S., Zhu, S., Wang, B., Li, X., Liu, Y., et al. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer demonstrate active epithelial-mesenchymal transition profile, regulated by miR-217-SIRT1 pathway. *Cancer Lett*. 2014; 355:184-191.
3. Kuno, T., Tsukamoto, T., Hara, A., Tanaka, T.. Cancer chemoprevention trough the

- introduction of apoptosis by natural compound. *Journal of Biophysical Chemistry*. 2012; 2:156-173
4. Yan, C., Siegel, D., Newsome, J., Chiloux, A., Moody, C. J., Ross, D. Antitumor indolequinones induced apoptosis in human pancreatic cancer cells via inhibition of thioredoxin reductase and activation of redox signaling. *Molecular Pharmacology*. 2012; 81(3):401-410.
 5. Lin, K., Lin, J., Wu, W. I., Ballard, J., Lee, B. B., Gloor, S. L., Vigers, G. P., Morales, T. H., Friedman, L. S., Skelton, N., & Brandhuber, B. J. An ATP-site on-off switch that restricts phosphatase accessibility of Akt. *Science signaling*. 2012; 5(223), ra37.
 6. Miladiyah, Isnatin., Jumina, Jumina., Haryana, Sofia Mubarika., Mustofa, Mustofa. Biological Activity, Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis, and Molecular Docking of Xanthone Derivatives as Anticancer Drugs. *Drug Design, Development and Therapy*. 2018; 12 : 149-158.
 7. Karplus, P. A., & Diederichs, K. 2012. Linking crystallographic model and data quality. *Science (New York, N.Y.)*. 336(6084) : 1030–1033.
 8. Ramirez D, Caballero J. Is It Reliable to Take The Molecular Docking Top Scoring Position As The Best Solution Without Considering Available Structural Data. *Molecules*. 2018; 23(1038):1-17.
 9. McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World journal of gastroenterology*. 2018; 24(43), 4846–4861. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i43.4846>
 10. Torres, P, H., Sodero, A, C., Jofilym P., Silva-Jr, F. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(18) : 4574.
 11. Ferreira, L, G., Santos, R, N., Olivia, G., Andricopiuo, A. 2015. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*. 2019; 20(7) : 13384 – 13421.
 12. Du, X., Li, Y., Xia, Y. L., Ai, S. M., Liang, J., Sang, P., Ji, X. L., & Liu, S. Q. Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *International journal of molecular sciences*. 2016; 17(2), 144. <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>.
 13. Vargas, J, A., Lopez, A, G., Pinol, M, C., Froeyen, M. Molecular Docking Study on the Interaction Between 2-substituted-4,5-difuryl Imidazoles with Different Protein Target for Antileishmanial Activity. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences*. 2018; 8(03) : 014-022.
 14. Patrick M. Glassman and Vladimir R. Muzykantov. Pharmacokinetics, Biodistribution, and Pharmacodynamics of Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2019; DOI: <https://doi.org/10.1124/jpet.119.257113>.
 15. Radchenko, E., Dyabina, A., Palyulin, V., & Zefirov, N. Prediction of Human Intestinal Absorption of Drugs Compounds. *Russian Chemical Bulletin*. 2016; 65 : 576 - 580.
 16. Wang, N.-N., Dong, J., Deng, Y.-H., Zhu, M.-F., Wen, M., Yao, J.-Z., Cao, D.- S. 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*. 2016; 763 - 773
 17. Lea, T. Caco-2 Cell Line. New York: Springer International Publishing; 2015.
 18. Lindup, W., & Orme, M. Plasma Protein Binding of Drugs. *British Medical Journal*. 1981; 282 : 212 - 214.
 19. Vieth, M. et al. Characteristic physical properties and structural fragments of marketed oral drugs. *J. Med. Chem*. 2004; 47, 224–232.
 20. Carpenter, T., Kirshner, D., Lau, E., Wong, S., Milmeier, J., & Lightstone, F. A Method to Predict Blood-Brain Barrier Permeability of Drug-Like Compounds Using Molecular Dynamics Simulations. *Biophys Journal*. 2014; 630 - 641.
 21. Ma, X., Chen, C., & Yang, J. Predictive Model of Blood-Brain Barrier Penetration of Organic Compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2005; 26 (4) :

- 500 - 512.
22. Hengstler, J., & Oesch, F. *Encyclopedia of Genetics : Ames Test*. Cambridge: Academic Press; 2001.
 23. Follmann, W., Degen, G., Oesch, F., & Hengstler, J. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Edisi ke-2. Cambridge: Academic Press; 2013.
 24. Qing, X., Lee, X, Y., Raeymaeker, J., Tame, J., Zhang, K., Maeyer, M., dan Voet, A. *Pharmacophore Modeling : Advances, Limitations, and Current Utility in Drug Discovery*. *Journal of Receptor, Ligand, and Channel Research*. 2014; 7 : 81 - 92.
 25. Sharma, S., Basu, A., Agrawal, R. *Pharmacophore Modeling and Docking Studies on Some Nonpeptide-Based Caspase-3 Inhibitors*. *Biomed Research International*. 2013; 1- 15.
 26. Lipinski, C. *Lead Profiling Lead- and Drug-like Compounds : The Rule-of Five Revolution*. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2004; 1 (4): 337–341.
 27. Priyani, T., Purwoko, T., Pangastuti, A. Uji mutagenisitas fraksi ekstrak kloroform daun ambre (*Geranium radula*) terhadap bakteri *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, dan TA1535 serta profil kandungan kimia fraksi teraktif. *Biofarmasi*. Vol 13 (1) : 34-39; 2015.