

## Prediksi Aktivitas Fitoestrogenik Senyawa Golongan Flavonoid terhadap Receptor Estrogen $\alpha$ (ER- $\alpha$ ) dengan pendekatan *In Silico*

### Prediction of Phytoestrogenic Activity of Flavonoid Compounds against Estrogen Receptor $\alpha$ (ER- $\alpha$ ) with *In silico* approach

Denis Mery Mirza<sup>1</sup>, Burhan Ma'arif<sup>2</sup>, Ira Purbosari<sup>3</sup>, Suko Hardjono<sup>4</sup>, Mangestuti Agil<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Magister Ilmu Farmasi, Departemen Ilmu Kefarmasian, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

<sup>2</sup>Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang

<sup>3</sup>Program Studi Farmasi, Fakultas Sains dan Kesehatan, Universitas PGRI Adi Buana, Surabaya

<sup>4</sup>Departemen Ilmu Kefarmasian, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya

\*Email korespondensi: [mmangestuti@yahoo.com](mailto:mmangestuti@yahoo.com)

#### Abstrak

Tubuh manusia akan mengalami penuaan dan menyebabkan kenaikan resiko penyakit dan pada akhirnya menyebabkan kematian. Fenomena tersebut dapat muncul salah satunya akibat penurunan homeostasis tubuh karena menurunnya hormon estrogen. Salah satu senyawa yang berpotensi mengatasi keadaan tersebut adalah fitoestrogen dari golongan flavonoid. Potensi senyawa flavonoid dengan aktivitas fitoestrogenik, dapat diketahui dengan melakukan pengamatan *In silico* terhadap Estrogen Receptor  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) dengan *molecular docking*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui mekanisme senyawa fitoestrogen melalui jalur ER-dependent lain seperti ER- $\alpha$ . Tahapan *molecular docking* dilakukan menggunakan plug-in Autodock Vina dalam PyRX 0.8. Hasilnya diketahui senyawa apigenin, quercetin, kaempferol, katekin, genistein dan daidzein memiliki interaksi agonis terhadap ER- $\alpha$ . Interaksi yang diperoleh dapat menggambarkan bahwa senyawa apigenin, daidzein, genistein, kaempferol, katekin serta quercetin mampu memberikan aktivitas fitoestrogenik ketika membentuk ikatan ligan reseptor terhadap ER- $\alpha$ .

**Kata Kunci:** Flavonoid, Molecular Docking, Phytoestrogen

## Abstract

The human body will experience aging and cause an increased risk of disease and death. This phenomenon can arise, one of which is due to a decrease in body homeostasis due to a decrease in the hormone estrogen. One of the compounds that has the potential to treat this situation is phytoestrogens from the flavonoid compounds. The potential of flavonoid compounds with phytoestrogenic activity can be determined by *In silico* on Estrogen Receptor  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) with molecular docking. The aim of this study was to determine the mechanism of phytoestrogen compounds through other ER-dependent pathways such as ER- $\alpha$ . The molecular docking step was carried out using the plug-in Autodock Vina in PyRX 0.8. The results show that apigenin, quercetin, kaempferol, catechins, genistein and daidzein have agonist interactions with ER- $\alpha$ . The interactions obtained can illustrate that apigenin, daidzein, genistein, kaempferol, catechins and quercetin are able to provide phytoestrogenic activity when forming receptor ligand bonds against ER- $\alpha$ .

**Keywords:** Flavonoid, Molecular Docking, Phytoestrogen

---

**Submitted:** 18 Mei 2021

**Accepted:** 10 Juni 2021

**DOI:** <https://doi.org/10.25026/jsk.v3i4.640>

---

## 1 Pendahuluan

Tubuh manusia akan mengalami penuaan yang ditandai dengan terjadinya penurunan keadaan fisiologi, kenaikan resiko penyakit dan pada akhirnya menyebabkan kematian [1-3]. Fenomena tersebut muncul akibat perubahan metabolisme dan fungsi hormonal tubuh secara progresif karena kegagalan transkripsi *deoxyribonucleic acid* (DNA), inflamasi kronis, dan ketidakstabilan homeostasis tubuh. Keadaan tersebut, pada tubuh perempuan akan terjadi saat perempuan memasuki masa menopause dan puncaknya ditandai dengan penurunan estrogen yang dikenal dengan defisiensi estrogen [2, 4, 5]. Selain terjadi penurunan jumlah produksinya, estrogen juga mengalami penurunan aktivitasnya akibat deaktivasi dan sulfasi estrogen yang membentuk senyawa lain dengan daya ikat lebih rendah terhadap reseptor estrogen [6, 7]. Selanjutnya akan terjadi berbagai gangguan kesehatan seperti neurodegeneratif, osteoporosis maupun gangguan kesehatan yang lainnya [8, 9].

Terapi yang umum untuk mengatasi gangguan kesehatan akibat defisiensi estrogen adalah penggunaan terapi sulih hormon yang cukup efektif serta dikenal secara luas oleh masyarakat [10]. Namun penggunaan terapi sulih hormon memiliki efek samping yang memunculkan masalah kesehatan lain seperti

*hot flushes*, kanker, stroke iskemik hingga terjadinya kematian [11, 12]. Salah satu terapi yang dikembangkan untuk mendapatkan tingkat efektifitas setara terapi sulih hormon, namun keamanan lebih tinggi adalah fitoestrogen [12].

Fitoestrogen merupakan senyawa yang berasal dari alam dengan struktur, aktivitas maupun afinitas yang sama dengan estrogen yang ditemukan dalam tubuh mamalia [13]. Salah satu golongan senyawa terbesar dan memiliki aktivitas fitoestrogen adalah flavonoid seperti genistein, kaempferol, daidzein dan lainnya [8, 14, 15]. Senyawa fitoestrogen mampu memberikan aktivitasnya setelah berikatan dengan reseptornya (ER-dependent) maupun jalur lain (ER-Independent). Namun jalur ER-dependent mampu memberikan aktivitasnya secara langsung, salah satunya berikatan dengan Estrogen Receptor  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ). Penelitian sebelumnya juga menunjukkan kaempferol mampu memberikan aktivitas terhadap ER- $\beta$  secara *in silico* [15].

Berdasarkan penjelasan tersebut, perlu dilakukan pengamatan secara *in silico* terhadap senyawa genistein, daizein, kaempferol, katekin, quercetin dan apigenin. Pengamatan aktivitas terhadap ER- $\alpha$  perlu dilakukan untuk mengetahui mekanisme senyawa fitoestrogen melalui jalur ER-dependent selain ER- $\beta$  [15].

Pengamatan *in silico* memberikan keuntungan seperti cepat serta murah untuk mengetahui aktivitas estrogenik suatu senyawa [16]. Selain itu, senyawa terpilih cukup banyak ditemukan dalam tanaman serta memiliki potensi yang cukup tinggi sebagai sumber fitoestrogen untuk mengatasi defisiensi estrogen.

## 2 Metode Penelitian

### 2.1 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam simulasi adalah ER- $\alpha$  yang diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) (<https://rcsb.org>) ID: 1A52. Sampel kemudian dilakukan preparasi dengan memisahkan protein serta ligan internal menggunakan aplikasi Biovia Discovery Studio Visualizer 2016 [8] dengan tujuan untuk dilakukan validasi internal. Sampel lain adalah senyawa golongan flavonoid seperti Apigenin, Daidzein, Genistein, Kaempferol, Katekin dan Quercetin yang dilakukan preparasi menggunakan ChemDraw 15. Senyawa terpilih, dirubah menjadi SMILES serta dibentuk menjadi bentuk 3D. Senyawa yang telah dirubah menjadi SMILES, dilakukan pengamatan sifat fisikokimia menggunakan *web tool* SwissADME untuk mengetahui potensi sebagai senyawa berkhasiat obat maupun potensinya untuk menembus gastrointestinal tract (GIT) serta blood-brain barrier (BBB) [17-20]. Tahap selanjutnya senyawa yang telah terbentuk menjadi bentuk 3D, dilakukan preparasi menggunakan Avogadro 1.90.0 untuk mendapatkan senyawa dengan bentuk geometri paling stabil dengan parameter MMFF94 [21].

### 2.2 Simulasi *Molecular Docking* dan Analisis Potensi Senyawa

Simulasi *molecular docking* dilakukan menggunakan *plug-in* Autodock Vina dalam PyRX 0.8 yang sebelumnya telah dilakukan validasi internal terhadap protein 1A52 [22, 23]. Proses *docking* dilakukan dengan menggunakan *gridbox* yang dimaksimalkan secara manual terhadap ligan internal serta digunakan *exhaustiveness* sebesar 8. Hasil simulasi docking berbentuk kompleks ligan-reseptor kemudian dilakukan visualisasi menggunakan Biovia Discovery Studio Visualizer 2016 dengan mengamati interaksi

asam amino dan jarak farmakofor yang terbentuk. Asam amino dan jarak farmakofor yang terbentuk kemudian dibandingkan dengan hasil simulasi ligan internal untuk mengetahui potensi senyawa flavonoid terpilih

## 3 Hasil dan Pembahasan

### 3.1 Preparasi Sampel

Sampel PDB 1A52 setelah dipreparasi untuk memisahkan ligan dan protein dilakukan validasi internal untuk mengetahui validitas serta kelayakan *plug-in* Autodock Vina dalam PyRX 0.8 dalam melakukan simulasi *molecular docking* [23]. Sampel berupa senyawa flavonoid terpilih dilakukan 2 macam preparasi yaitu merubah bentuknya menjadi 3D, agar senyawa dapat dilakukan simulasi dengan protein 1A52 serta merubah bentuknya menjadi SMILES. Perubahan bentuk menjadi SMILES ini memiliki tujuan untuk memperoleh bentuk senyawa sesuai dengan nama IUPAC serta dapat digunakan sebagai analisis sifat fisikokimia senyawa sebagai bahan berkhasiat obat [24]. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa apigenin, daidzein, genistein, kaempferol, katekin serta quercetin mampu menembus GIT sehingga dalam perkembangannya dapat diformulasi sebagai sediaan per oral. Hasil fisikokimia ini tidak terlepas dari nilai berat molekul dan *Topological Polar Surface Area* (TPSA) yang menjadi parameter kritis sifat yang dimiliki oleh senyawa flavonoid terpilih yang diamati menggunakan SwissADME dan dapat diamati pada tabel 1

Tabel 1. Sifat fisikokimia kritis senyawa flavonoid terpilih

Senyawa	Berat Molekul	Nilai TPSA
Apigenin	270,24	90,90
Quercetin	302,24	131,36
Kaempferol	286,24	111,13
Katekin	302,24	131,36
Genistein	270,24	90,90
Daidzein	254,24	70,67

Berdasarkan tabel tersebut, senyawa flavonoid terpilih memiliki berat molekul  $\leq 500$  kDa yang mengindikasikan senyawa tersebut mampu menembus GIT. Nilai tersebut juga

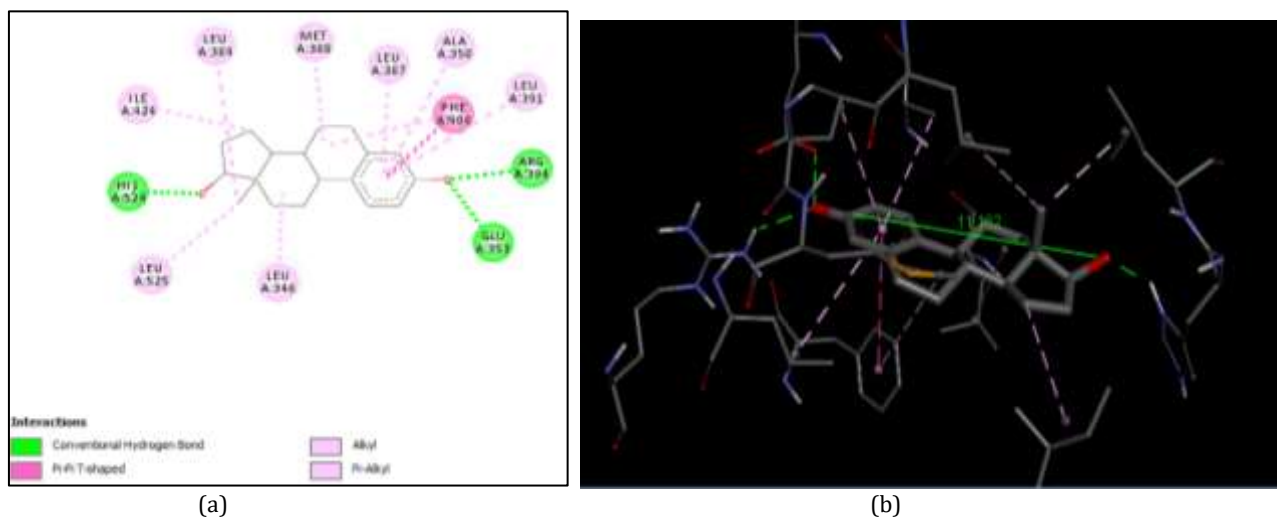
mengindikasikan bahwa senyawa senyawa tersebut memiliki potensi sebagai bahan berkhasiat obat sesuai dengan *Lipinski Rule of Five* [17]. Selain itu, senyawa terpilih, memiliki nilai TPSA  $\leq 140\text{\AA}^2$  yang memperkuat *Lipinski Rule of Five* yang mengindikasikan bahwa senyawa tersebut memiliki kemampuan cukup baik untuk menembus GIT, bahkan hasil yang cukup menarik adalah daidzein memiliki nilai TPSA 70,67  $\text{\AA}^2$ . Hasil tersebut mengindikasikan bahwa Daidzein memiliki kemampuan untuk menembus BBB dan dapat digunakan sebagai senyawa berkhasiat obat di sistem saraf pusat [8, 18].

### 3.2 Simulasi *Molecular Docking* dan Analisis Potensi Senyawa

Hasil validasi internal yang dilakukan sebelum *molecular docking* menunjukkan nilai rata-rata RMSD 1.8 $\text{\AA}$  sehingga *plug-in* Autodock Vina dapat digunakan untuk simulasi *docking* [8, 22]. Senyawa yang telah dilakukan simulasi kemudian dilakukan analisis potensi senyawa sebagai pengganti senyawa estrogen. Analisis yang dilakukan terhadap interaksi antara asam amino serta jarak farmakofor senyawa flavonoid terpilih dapat teramati pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil Simulasi *Molecular Docking* senyawa flavonoid terpilih

Senyawa	Binding Affinity	Interaksi	Asam Amino Terikat (Jenis Ikatan)	Jarak Farmakofor
Apigenin	-7,9	Agonis	Glu353; His524 (Hidrogen)	11,184
Quercetin	-7,5	Agonis	Glu353; His524 (Hidrogen)	11,700
Kaempferol	-7,4	Agonis	Glu353; His524 (Hidrogen)	11,512
Katekin	-7,3	Agonis	Glu353; His524 (Hidrogen)	11,844
Genistein	-8,3	Agonis	Glu353; His524 (Hidrogen); Arg394 (Unfavourable)	12,561
Daidzein	-8,2	Agonis	Glu353; His524 (Hidrogen)	12,604
17beta estradiol (Kontrol Positif)	-10,6		Glu353; Arg394; His524 (Hidrogen)	11,182



Gambar 1. Hasil *molecular docking* ligan internal (17- $\beta$  Estradiol) (a) Pengamatan 2 dimensi (b) Pengamatan 3 dimensi

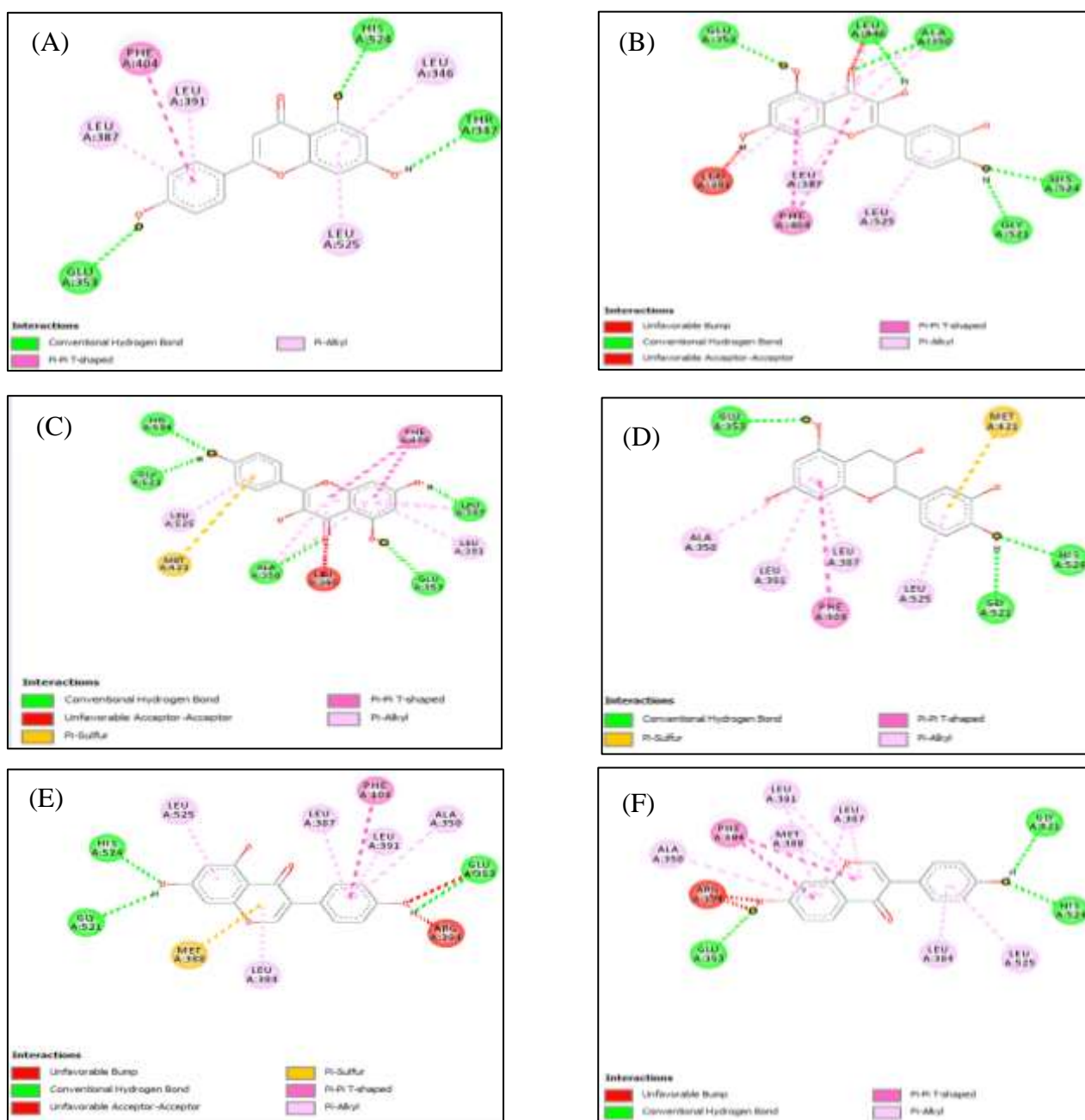
Berdasarkan hasil tersebut, senyawa flavonoid terpilih bersifat agonis terhadap protein 1A52, Kategorisasi tersebut berdasarkan asam amino yang diikat oleh masing-masing senyawa. Suatu senyawa dapat memiliki interaksi agonis apabila mengikat His524 serta Glu353 atau Arg394 dan apabila

senyawa tersebut tidak mengikat His524 akan memiliki interaksi antagonis [8] (Gambar 1).

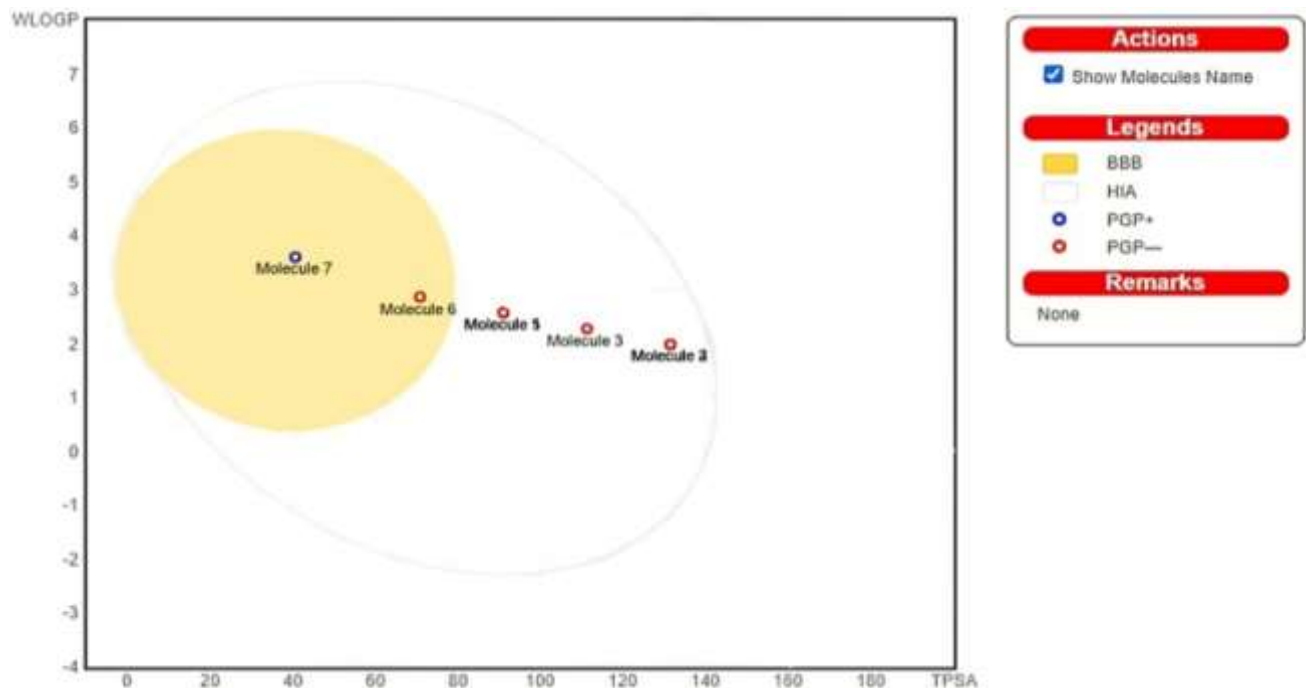
Hasil simulasi tersebut, mengindikasikan bahwa senyawa flavonoid terpilih mampu berinteraksi agonis terhadap ER- $\alpha$  serta memberikan efek estrogenik (Gambar 2). Senyawa flavonoid kemudian dibandingkan

potensinya dengan ligan internal 1A52 atau 17beta estradiol (K(+)) dan hasilnya kaempferol memiliki daya ikat (*binding affinity*) paling rendah dengan nilai -8,3. Semakin rendah nilai daya ikat, maka efek yang diberikan oleh suatu senyawa akan semakin stabil. Hal ini berkaitan dengan energi bebas yang dibutuhkan oleh senyawa tersebut untuk memberikan efek terhadap protein target

seperti reseptor. Hasil pengamatan lain, menunjukkan apigenin sebagai senyawa yang memiliki jarak farmakofor mendekati senyawa K(+) dengan nilai 11,184 Å. Hal tersebut, secara sederhana menggambarkan bahwa senyawa apigenin memiliki potensi penyembuh mendekati senyawa K(+) meskipun nilai daya ikatnya lebih tinggi dibandingkan dengan genistein maupun senyawa K(+) [25]



Gambar 2. Hasil molecular docking senyawa (A) Apigenin; (B) Quercetin; (C) Kaempferol; (D) Katekin; (E) Genistein; (F) Daidzein



Gambar 3 Diagram Boiled-Egg SwissADME Mol1: Apigenin; Mol2:Quercetin; Mol3: Kaempferol; Mol4: Katekin; Mol5: Genistein; Mol6: Daidzein; Mol7: 17beta Estradiol

Hasil dari simulasi *molecular docking* terhadap semua senyawa, masih menunjukkan bahwa masih belum terdapat senyawa yang memiliki potensi yang baik dan mengimbangi dari 17 beta estradiol untuk memberikan aktivitas estrogenik. Hal tersebut juga teramati pada hasil perbandingan sifat fisikokimia menggunakan diagram boiled-egg [17] (Gambar 3)

Hasil tersebut secara sederhana menunjukkan bahwa belum ada senyawa yang memiliki sifat fisikokimia mendekati 17beta estradiol. Sehingga dapat ditarik kesimpulan sederhana, belum terdapat senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas estrogenik mendekati 17beta estradiol untuk memberikan aktivitasnya pada ER- $\alpha$ . Berdasarkan diagram tersebut, terdapat hasil yang cukup menarik dimana senyawa apigenin dan genistein serta senyawa katekin dan quercetin saling berhimpit. Hasil tersebut menunjukkan bahwa apigenin dan genistein serta katekin dan quercetin, memiliki sifat fisikokimia yang serupa. Kesamaan tersebut juga dapat mengindikasikan kesamaan aktivitas diantara senyawa tersebut.

Senyawa flavonoid terpilih dapat diprediksi mampu memberikan aktivitas estrogenik. Asumsi yang muncul adalah, senyawa tersebut pada aktivitasnya akan mengikat reseptor ER- $\alpha$ , kemudian mampu membentuk kompleks teraktivasi sehingga aktivitas estrogenik seperti menjaga homeostasis dapat muncul [7]. Namun hasil dari simulasi *molecular docking* terhadap semua senyawa, masih menunjukkan bahwa masih belum terdapat senyawa yang memiliki potensi yang baik dan mengimbangi dari 17 beta estradiol untuk memberikan aktivitas estrogenik.

#### 4 Kesimpulan

Hasil simulasi *molecular docking* menunjukkan bahwa semua senyawa uji memiliki interaksi agonis terhadap ER- $\alpha$  sehingga senyawa apigenin, daidzein, genistein, kaempferol, katekin serta quercetin mampu memberikan aktivitas fitoestrogenik ketika membentuk ikatan ligan reseptor dengan ER- $\alpha$ .

## 5 Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kepada Departemen Ilmu Kefarmasian, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga dan Phytoestrogen Project

## 6 Konflik Kepentingan

Tidak terdapat konflik kepentingan

## 7 Daftar Pustaka

- [1] Vasto, S., Scapagnini G., Bulati, M., Candore, G., Castiglia, L., Colonna-Romano, G., 2010 Biomarkers of Aging. *Front Biosci (Scholed)*. Vol. 2. (1). 392-402.
- [2] Steve, C. J., Spector, T. D., Jackson, S. H., 2012. Ageing, Genes, Environment and Epigenetics: What Twin Studies Tell US Now, and in the Future. *Age Aging*. Vol. 41. (5). 581-586.
- [3] Poulouse, N dan Raju, R., 2014. Aging and Injury: Alteration in Cellular Energetics and Organ Function. *Aging and Disease*. Vol. 5. (2). 101-108.
- [4] Villa, A., Vegeto, E., Poletti, A., Maggi, A., 2016. Estrogens, Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Endocrine Society*. Vol. 37. (4). 372-402.
- [5] Wagner, K-H., Cameron-Smith, D., Wessner, B., Franzke, B., 2016. Biomarkers of Aging: From Function to Molecular Biology. *Nutrient*. Vol. 8. (338).1-12.
- [6] Horstman, A. M., Dillon, E. L., Urban, R. J., Sheffield-Moore, M., 2012. The Role of Androgens and Estrogens on Healthy Aging and Longevity. *Journal of Gerontology: Biological Sciences*. Vol. 67. (11). 1140-1152.
- [7] Cui, J., Shen, Y, Li, R., 2013. Estrogen Synthesis and Signaling Pathways durin Ageing: From Periphery to Brain. *Trends Mol Med*. Vol. 19. (3). 197-209.
- [8] Ma'arif, B., Mirza, D. M., Hasanah, M., Laswati, H., Agil, M., 2019, Antineuroinflammation Activity of n-Butanol Fraction of *Marsilea crenata* Presl. in Microglia HMC3 Cell Line. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 20190255. 1-6.
- [9] Aditama, A. P. R., Ma'arif, B., Mirza, D. M., Laswati, H., Agil, M., 2020. In Vitro and In Silico Analysis on the Bone Formation Activity of n-Hexane Fraction of *Semanggi* (*Marsilea crenata* Presl.). *Sys. Rev. Pharm*. Vol. 11. (11). 837-849.
- [10] Yang, T-S., Wang, S-Y., Yang, Y-C., Su, C-H., Lee, F-K., Chen, S-C., Tseng, C-Y., Jou, H-J., Huang, J-P., Huang, K-E., 2012. Effects of standardized phytoestrogen on Taiwanese menopausal women. *Elsevier : Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. Vol. 51. (2). 229-235.
- [11] Lee, W-L., Tsui, K-H., Seow, K-M., Cheng, M-H., Su, W-H., Chen, C-P., Wang, P-H., 2013. Hormone therapy for postmenopausal women And unanswered issue. *Elsevier : Gynecology and Minimally Invasive Therapy*. Vol. 2. (1). 13-17.
- [12] Jantarantotai A,N., Utaisincharoen B,P., Sanvarinda A,P., Thampithak C,A., Sanvarinda, Y., 2013. Phytoestrogens Mediated Anti-Inflammatory Effect Through Suppression Of IRF-1 and PSTAT 1 Expressions in Lipopolysaccharide-Activated Microglia. *International Immunopharmacology*. Vol. 17. (2). 483-488.
- [13] Sirotkin, A.V., Harrath, A.H., 2014. Phytoestrogen And Their Effects. *European Journal Of Pharmacology*. Vol. 741. 230-236.
- [14] Ganai, A. A. dan Farooqi, H., 2015. Bioactivity of Genistein: A Review of In vitro and In vivo Studies. *Biomed Pharmacother*. Vol. 76. 30-38.
- [15] Ma'arif, B., 2020. Aktivitas Antineuroinflamasi Ekstrak dan Fraksi Daun Semanggi (*M. crenata* Presl.) terhadap sel Mikroglia HMC3. Disertasi. Surabaya: Universitas Airlangga.
- [16] Wadood, A., Ahmed, N., Shah, L., Ahmad, A., Hassan, H., Shams, S., 2013. In Silico Drug Design: An Approach Whish Revolutionarised the Drug Discovery Process. *OA Drug Design and Delivery*. Vol. 1 (1). 1-4
- [17] Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Freeny, P. J., 1997. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 23. (1-3). 3-25.
- [18] Kelder, J., Grootenhuis, D. J. P., Bayada, D. M., Delbressine, P. C. L., Ploemen, J. P., 1999. Polar Molecular Surface as a Dominating Determinant for Oral Absorption and Brain Penetration of Drugs. *Pharmaceutical Research*. Vol. 16. (10). 1514-1519.
- [19] Daina, A., Michielin, O., Zoete, V., 2017. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Scientific Reports*. Vol. 7. (42717). 1-13
- [20] Daina, A., Zoete, V., 2016. A Boiled-Egg to Predict Gastrointestinal Absorption and

- Brain Penetration of Small Molecules. *Chem Med Chem*. Vol. 11. (11). 1117-1121.
- [21] Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G. R., 2012. Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization and Analysis Platform. *Journal of Cheminformatics*. Vol. 4. (17). 1-17.
- [22] Troot, O dan Olson, A. J., 2010. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading. *J. Comput Chem*. Vol. 31. (2). 455-461.
- [23] Muchtaridi, M., Darmawan, D., Yusuf, M., 2018. Molecular Docking, 3D Structure Based Pharmacophore Modeling and ADME Prediction of Alpha Mangostin and Its Derivative Against Estrogen Receptor Alpha. *J. Young Pharm*. Vol. 10. (3). 252-259.
- [24] Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., Lowe, E. W. Jr., 2014. Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacol Rev*. Vol. 66. (1). 334-395.
- [25] Siswandono dan Soekardjo, B. 1995. *Kimia Medisinal*. Surabaya: University of Airlangga Press