

Extraction of *Morinda Citrifolia* Leaves Essential Oils as EGFR Inhibitor in Non-Small Cells Lung Cancer: In Silico Approach

Muhammad Arvito Ramadhan, Hanif Sabawi Ma'ruf, Riko Syafriadi, Okta Suryani, Fajriah Azra✉

Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang,
Jln. Prof. Dr.Hamka, Air Tawar Padang, Indonesia 25132

Info Artikel

Diterima : 12-02-2025

Disetujui : 23-04-2025

Dipublikasikan : 29-08-2025

Keywords:

Non-Small Lung Cancer
Morinda Citrifolia
Essential oils
EGFR
Molecular Docking

Abstrak

Kanker paru-paru merupakan salah satu penyakit kanker dengan penderita terbanyak di dunia maupun di Indonesia. 85% dari penyebab kanker paru-paru merupakan *non-small-cell lung cancer* (NSCLC) dengan mutasi gen paling banyak ditemukan pada EGFR. Ekstrak *essential oils* dari *Morinda citrifolia* telah berhasil menghambat pertumbuhan sel kanker paru-paru A549 dengan IC_{50} 40 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan kandidat obat dari *essential oils* *Morinda citrifolia* sebagai inhibitor EGFR menggunakan pendekatan *in silico* melalui perangkat lunak MOE. Skrining fisikokimia dan farmakokinetika juga telah dilakukan dengan menggunakan Lipinski *rule of five* dan ADMET. Hasil *molecular docking* menunjukan 9-H-Pyridol [3, 4-b]indole dan cubenol sebagai ligan terbaik dengan masing-masing RMSD 0.790 Å dan 0.778 Å dengan masing masing nilai energi ikatan -5.992 dan -5.325 kcal.mol^{-1} . Interaksi ligan dengan residu asam amino menunjukan 9-H-Pyridol [3, 4-b]indole terdapat ikatan hidrogen pada tiga residu asam amino, yaitu Arg812, Tyr867, dan Arg865. Sementara pada cubenol memiliki interaksi ikatan hidrofobik. Data ADMET dan Lipinski telah dicantumkan pada artikel ini untuk memberi gambaran bagaimana reaksi senyawa ligan pada tubuh.

Abstract

Lung cancer is one of the most common cancers in the world and in Indonesia. 85% of lung cancer cases are non-small-cell lung cancer (NSCLC) with the most common gene mutations found in EGFR. *Morinda citrifolia* essential oils extract has successfully inhibited the growth of A549 lung cancer cells with an IC_{50} of 40 $\mu\text{g/mL}$. This study aims to find drug candidates from *Morinda citrifolia* essential oils as EGFR inhibitors using an *in silico* approach through MOE software. Physicochemical and pharmacokinetic screening has also been carried out using the Lipinski rule of five and ADMET. The results of molecular docking showed 9-H-Pyridol [3, 4-b]indole and cubenol as the best ligands with RMSD of 0.790 Å and 0.778 Å respectively with binding energy values of -5.992 and -5.325 kcal.mol^{-1} respectively. Ligand interactions with amino acid residues indicate that 9-H-Pyridol [3, 4-b]indole has hydrogen bonds at three amino acid residues, namely Arg812, Tyr867, and Arg865. Meanwhile, cubenol has hydrophobic bond interactions. ADMET and Lipinski data have been included in this article to provide an overview of how ligand compounds react in the body.

Pendahuluan

Kanker paru-paru merupakan penyakit kanker dengan penderita terbanyak kedua di dunia (11.4%). Sedangkan di Indonesia penderita kanker paru paru berada pada peringkat ketiga (8.8%) dengan angka kematian tertinggi, yakni 13.2% dari 30.834 kasus (GLOBOCAN, 2020). Kanker paru-paru terbagi menjadi dua jenis yaitu *non-small-cell lung cancer* (NSCLC) dan *small-cell lung cancer* (SCLC). NSCLC menjadi kasus terbanyak dengan 85% dari kasus kanker paru-paru (Alves *et al.*, 2014; Jorge *et al.*, 2014).

Epidermal growth factor receptor (EGFR) merupakan protein transmembran dalam reseptor tirosin kinase yang paling banyak mengekspresikan NSCLC sekitar 40-80% (Idowu, 2013). Ketika domain ekstraseluler EGFR berikatan dengan ligan (EGF atau TGF- α), hal itu menyebabkan dimerisasi dan aktivasi reseptor, sehingga memicu aktivitas tirosin kinase intraseluler EGFR (Shao & Zhu, 2019). Hal ini mengaktifkan serangkaian jalur pensinyalan hilir, seperti jalur MAPK, PI3K/Akt, dan JAK/STAT, yang mengatur pertumbuhan, proliferasi, migrasi, dan kelangsungan hidup sel (Yaseen *et al.*, 2022). Oleh karena itu, dengan mendesain inhibitor reseptor tirosin kinase EGFR diharapkan menjadi pengobatan awal bagi pasien dengan NSCLC stadium lanjut atau metastasis positif mutasi EGFR yang sebelumnya tidak diobati (Lu *et al.*, 2024).

Erlotinib dan gefitinib merupakan salah satu Tirosin Kinase Inhibitor (TKI) tipe 1 yang dapat mengikat sisi aktif EGFR tirosin kinase domain (EGFR-TKD) dibandingkan inhibitor lainnya yang telah dilaporkan, seperti lapatinib dan neratinib (Park *et al.*, 2012). Erlotinib memiliki bobot molekul rendah oral yang secara selektif dan reversibel menghambat aktivitas TK EGFR yang bersaing dengan adenosin trifosfat untuk mengikat dalam domain TK reseptor (Bareschino *et al.*, 2007). Erlotinib telah disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) pada November 2004 dan oleh *European Medicinal Evaluation Agency* pada Oktober 2005 untuk pengobatan pasien NSCLC lanjut yang resisten terhadap kemoterapi (Cataldo *et al.*, n.d.). Akan tetapi, pada tahun, Becker dkk (2010) melaporkan bahwa penggunaan obat erlotinib oleh 22 pasien dalam jangka waktu 4,5 tahun menunjukkan adanya efek samping toksisitas kulit, seperti folikulitis dan xerosis kutis pada beberapa kasus. Selain pada kulit, efek samping lain seperti paronikia, diare, dan disfungsi keratokonjungtivitis sicca juga didapatkan oleh pasien setelah mengonsumsi erlotinib dalam jangka waktu 4,5 tahun (Backer *et al.*, 2010).

Berbagai upaya telah dilakukan dalam menemukan obat baru sebagai alternatif dari obat-obatan sintetik, salah satunya dengan pemanfaatan bahan alam. Beragam kandungan kimia dan aktivitas biologinya, bahan alam dinilai menjadi sumber obat alternatif dan telah menjadi fokus banyak penelitian karena dinilai jauh lebih aman ditinjau dari tingkat toksisitasnya. Berbagai yang ada di Indonesia telah dilaporkan dapat digunakan sebagai inhibitor NSCLC. Ekstrak Tanaman meniran (*Phyllanthus urinaria* L) telah dilakukan oleh Tseng *et al* (2012) sebagai anti-metastasis sel A549 pada ekspresi matriks metaloproteinase-2 (MMP-2). Selain itu, ekstrak kurkumin dari tanaman kunyit telah dilakukan oleh Liao *et al* (2015) sebagai anti invasi dan metastasis ekspresi transporter glukosa (GLUT) 1 yang diekspresikan pada sel A549 (Liao *et al.*, 2015; Tseng *et al.*, 2012).

Tanaman mengkudu mengkudu (*Morinda Citrifolia*) memiliki kandungan senyawa bioaktif yang dapat berperan sebagai aktivitas antioksidan, antimikroba, antijamur, antidiislipidemia dan sifat imunomodulatori. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa secara klinis maupun praklinis menunjukkan bahwa mengkudu merupakan tanaman obat yang berpotensi dalam pengobatan kanker. Aktivitas antikanker dari tanaman mengkudu terbukti dalam model kanker payudara dan paru-paru di mana volume tumor menurun secara signifikan melalui apoptosis serta gangguan dalam jalur migrasi dan proliferasi sel (Chanthira Kumar *et al.*, 2022).

Penelitian terbaru telah dilakukan oleh Rajivgandhi *et al* (2020) dengan mengekstrak *essential oils* dari tanaman mengkudu (*Morinda Citrifolia*) yang dikombinasi dengan kitosan untuk menghambat sel A549. Penggunaan kombinasi tersebut menunjukkan aktivitas antikanker meningkat dan memiliki biokompatibilitas yang baik pada sel darah merah. Konsentrasi IC₅₀ 40 μ g/mL menunjukkan efek sitotoksitas yang rendah dibandingkan Konsentrasi IC₅₀ lainnya (Rajivgandhi *et al.*, 2020). Oleh karena itu, menarik untuk dilakukan studi lebih lanjut mengenai potensi *essential oils* dari tanaman mengkudu untuk menghambat pertumbuhan mutasi EGFR pada NSCLC.

Molecular docking merupakan salah satu metode yang digunakan untuk mensimulasikan interaksi molekul ligan dengan reseptor melalui proses komputasi. Berdasarkan proses tersebut diperoleh geometri ligan yang cocok secara geometri dan energi ke situs pengikatan reseptor tersebut. Pendekatan *Molecular docking* telah umum digunakan untuk memperoleh prediksi interaksi dan afinitas kandidat obat sebagai ligan dengan reseptornya. Berdasarkan hasil tersebut, kandidat *lead compound* dapat ditentukan, sehingga metode ini berperan penting sebagai tahap awal dalam penemuan dan desain obat baru (Agarwal & Mehrotra, 2016). Melalui *Molecular docking* memungkinkan untuk mengurangi biaya dan meningkatkan peluang untuk menemukan kandidat obat baru yang diinginkan, sehingga penemuan obat baru dapat dilakukan lebih efisien (Pinzi & Rastelli, 2019).

Konsep kemiripan obat diusulkan untuk memberikan panduan yang berguna selama tahap awal penemuan obat untuk meningkatkan peluang suatu senyawa tersebut memasuki dan lolos uji klinis Melalui analisis ADMET (*absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity*). Hal ini dapat didefinisikan sebagai sifat fisikokimia molekuler yang menjadi ciri khas suatu molekul yang dikenal sebagai kandidat obat. Kemiripan obat sering digunakan untuk menggambarkan farmakokinetik dan toksisitas, dan juga dapat dipahami sebagai senyawa dengan sifat ADMET yang diinginkan (Jia *et al.*, 2020). Selain itu, Molekul obat yang ideal akan memenuhi sifat fisikokimia Lipinski *Rules of Five* (RO5). Pedoman ini memprediksi kemiripan obat dari senyawa kimia dengan aktivitas biologis tertentu yang dirancang untuk rute pemberian oral (Lipinski *et al.*, 2001)

Penelitian ini bertujuan untuk untuk mengetahui bagaimana aktivitas ekstrak *essential oils* dari tanaman mengkudu menggunakan pendekatan *in silico* terhadap penghambatan mutasi EGFR pada tirosin kinase. Simulasi *Molecular docking* dilakukan untuk mengetahui aktivitas tersebut. Selain itu, skrining farmakokinteka dan fisikokimia akan dilakukan untuk mengetahui senyawa yang memenuhi tahap awal uji klinis.

Metode

Sebanyak 15 senyawa major dari hasil GC-MS ekstrak Mengkudu yang dilaporkan oleh Rajivgandhi *et al* (2020) digunakan sebagai ligan yang diperoleh dari kode smiles melalui *website* Pubchem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Adapun reseptor yang digunakan adalah EGFR dengan id PDB 4HJO pada <https://www.rcsb.org/structure/4HJO>. *Native Ligand* pada reseptor tersebut adalah erlotinib yang akan digunakan sebagai pembanding dari 15 senyawa tersebut. Simulasi *molecular docking* dikerjakan menggunakan perangkat lunak MOE 2015.1 dan perangkat keras menggunakan spesifikasi Core i-3 gen 12 dan RAM 5 GB.

Profil sifat Farmakokinetika dari kandidat obat diskriminasi menggunakan pendekatan ADMET melalui *website* <http://www.swissadme.ch/index.php> dan <https://preadmet.webservice.bmdrc.org>. Informasi yang diperoleh dari ADMET yaitu adsorpsi, metabolisme, distribusi, dan ekskresi suatu senyawa dalam tubuh serta toksisitasnya dalam mencit dan tikus. Selain itu, skrining sifat fisikokimia kandidat obat juga dilakukan dengan menggunakan Lipinski *Rules of Five* (RO5) dengan menggunakan *website* <http://www.scfbio-iiitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>. Adapun aturan dari RO5 adalah berat molekul ≤ 500 ; donor ikatan hidrogen ≤ 5 ; akseptor ikatan hidrogen ≤ 10 ; sifat lipofilisitas (LogP) ≤ 5

Preparasi ligan dilakukan dengan meminimalisasi energi dan mengatur gradien (0,001 kcal/mol/Å). Setelah itu, preparasi ligan menyimpan dalam format *.mdb. Preparasi Reseptor dilakukan dengan meminimalisasi energi, mengatur gradien (0,001 kcal/mol/Å) dengan algoritma AMBER. Minimisasi energi bertujuan untuk membawa molekul ke konformasi dengan energi potensial lokal minimum. Dengan energi minimum, diperoleh konformasi molekul yang lebih mendekati ketersediaan molekul senyawa tersebut dalam kondisi biologis (Fadlan & Nusantara, 2021). Minimisasi dengan gradien 0,001 kcal/mol/Å bertujuan untuk memastikan molekul berada pada kondisi yang paling stabil. Sehingga diharapkan dengan pengaturan tersebut dikombinasikan dengan algoritma AMBER dalam meminimasi energi sehingga interaksi antara ligan dengan reseptor dalam proses *docking* lebih akurat ((Trosset & Scheraga, 1998).

Reseptor yang telah dipreparasi disimpan dalam format *.pdb. Pengerjaan *docking* dilakukan dengan menentukan sisi aktif reseptor terlebih dahulu dengan mengatur *set finder*. Adapun sisi aktif dari reseptor 4HJO adalah Met769, Gly772A, Leu768A, Cys773, Asp776A, Phe771A, Pro770A, Leu820A, Thr830A, Ala791A, Thr766A, Gln767A, Lys21A, Leu764A, Val702, Asp831A, dan Leu694A (Park *et al.*, 2012). Visualisasi dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Biovia Discovery Studio 2017 untuk melihat interaksi ligan dengan reseptor.

Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan hasil GC-MS ekstrak *essential oils* dari mengkudu oleh Rajivgandhi *et al.*, (2020) diperoleh 29 senyawa telah berhasil diekstrak. Dari 29 senyawa tersebut, diambil 15 senyawa major yang memiliki %area tertinggi pada hasil GC-MS. Selain itu, aktivitas senyawa antikanker juga dipertimbangkan. Berdasarkan kriteria tersebut, limabelas senyawa yang akan disimulasikan pada *molecular docking* adalah Morindone, 9-H-Pyridol [3, 4-b] indole, erucic acid, terpinolene, β -sistosterol, cubenol, myrtenal, nordamnacanthol, β -alizarin, 1-scopoletin, terpinen-4-ol, α -pinene, β -phellandrene, sabinene, dan α -copaene. Selain itu, erlotinib sebagai *native ligand* dari reseptor EGFR dengan IDPDB:4HJO digunakan sebagai kontrol positif. (Park *et al.*, 2012; Rajivgandhi *et al.*, 2020)

Validasi hasil *docking* dilakukan untuk mengetahui kesesuaian hasil simulasi ligan dengan hasil ligan asli pada kristalografi protein yang dinyatakan dalam satuan angstrom (Å) yang bertujuan untuk mengetahui konformasi struktur ligan yang akurat dalam sistem *docking* dalam parameter *root mean square deviation* (RMSD). Kesesuaian konformasi struktur yang optimal memiliki nilai RMSD ≤ 2 Å. Semakin

mendekati nol suatu RMSD, maka tingkat akurasi konformasi ligan dengan protein semakin akurat (Syafriyanti *et al.*, 2023). Berdasarkan hasil *docking*, molekul 9-H-Pyridol [3, 4-b] indole dan cubenol memiliki nilai RMSD terendah dibandingkan ligan-ligan lainnya dengan masing-masing RMSD 0.790 dan 0.778. Nilai RMSD pada kedua ligan ini memiliki nilai yang lebih baik daripada ligan Erlotinib sebagai kontrol memiliki RMSD 1.334.

Senyawa 9-H-Pyridol [3, 4-b] indole atau yang dikenal dengan β -carboline berdasarkan strukturnya memiliki 3 cincin heterosiklik yang mana cincin indolin dan piridin terdapat atom N, sehingga memungkinkan terjadinya ikatan hidrogen, ikatan elektrostatis, dan ikatan hidrofobik dalam interaksinya dengan sisi aktif reseptor (Soni *et al.*, 2021). Penelitian sebelumnya melaporkan 9-H-Pyridol [3, 4-b] indole memiliki interaksi yang sangat kuat terhadap sisi aktif reseptor, yaitu Monoamine oksidases (MAOs) (Prah *et al.*, 2022). Sementara cubenol memiliki cincin naftalena yang terhidrogenasi, sehingga terdapat gugus hidroksil (-OH) pada cincin naftalena tersebut. Cubenol dikatakan memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri yang baik (Susanti & Sukardi, 2023). Namun belum ada penelitian yang melaporkan bahwa cubenol memiliki aktivitas antikanker maupun interaksinya dengan reseptor.

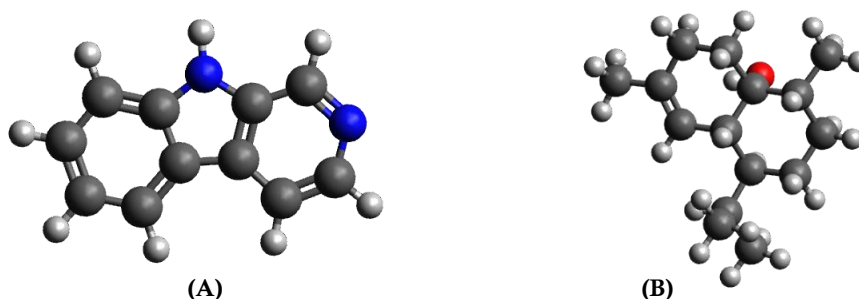
Analisis hasil *docking* ligan 9-H-Pyridol [3, 4-b] indole dan cubenol dilanjutkan dengan mengetahui hasil *docking score* (DS). DS merupakan representasi dari energi ikatan antara ligan dengan reseptor yang dinyatakan pada satuan kcal.mol^{-1} . Semakin rendah nilai DS, maka, semakin besar afinitas ikatan antara ligan dengan reseptor yang memungkinkan terjadinya inhibisi reseptor semakin besar (Aziz *et al.*, 2016). Berdasarkan hasil *docking*, ligan 9-H-Pyridol [3, 4-b] indole dan cubenol memiliki energi ikatan -5.992 dan -5.325 kcal.mol^{-1} secara berurutan. Nilai yang dihasilkan lebih rendah daripada ligan erlotinib sebagai kontrol dengan nilai -8.545 kcal.mol^{-1} . Nilai negatif pada hasil energi ikatan menandakan adanya kemungkinan interaksi antara ligan dengan reseptor yang kemudian akan dianalisis lebih lanjut dengan analisis interaksi ligan dengan reseptor 4HJO.

Tabel 1. DS, RMSD, residu asam amino, jarak, dan jenis ikatan yang terbentuk antara ligan dengan EGFR

No	Molekul	DS (kcal.mol^{-1})	RMSD (Å)	Residu Asam Amino	Jarak (Å)	Jenis Interaksi
1	Morindone	-6.175	1.095	Thr830	2.02	Ikatan Hidrogen
				Asp831	1.83	Ikatan Hidrogen
					2.91	Ikatan Hidrofobik
					4.58	Ikatan Elektrostatis
				Ala719	2.67	Ikatan Hidrogen
				Leu764	2.31	Ikatan Hidrogen
				Met742	4.68	Ikatan Hidrofobik
				Lys721	5.02	Ikatan Hidrofobik
				Leu753	5.13	Ikatan Hidrofobik
				Val702	5.20	Ikatan Hidrofobik
				Arg812	1.94	Ikatan Hidrogen
				Tyr867	2.67	Ikatan Hidrogen
				Arg865	3.06	Ikatan Hidrogen
				Phe699	4.57	Ikatan Hidrofobik
2	9-H-Pyridol [3, 4-b] indole	-5.992	0.790	Ala840	4.06	Ikatan Hidrofobik
				Val852	4.98	Ikatan Hidrofobik
				Pro853	5.41	Ikatan Hidrofobik
				Leu838	5.5	Ikatan Hidrofobik
				Ala847	4.27	Ikatan Hidrofobik
				Leu768	4.59	Ikatan Hidrofobik
				Val702	4.12	Ikatan Hidrofobik
				Ala719	3.35	Ikatan Hidrofobik
				Leu820	4.64	Ikatan Hidrofobik
				Leu768	4.66	Ikatan Hidrofobik
				Met769	4.80	Ikatan Hidrofobik
				Phe699	4.24	Ikatan Hidrofobik
				Val702	5.22	Ikatan Hidrofobik
				Arg817	4.31	Ikatan Hidrofobik
3	Erucic Acid	-6.596	1.358	Cys773	3.81	Ikatan Hidrofobik
				Lys851	4.09	Ikatan Hidrofobik
				Pro853	4.33	Ikatan Hidrofobik
4	Terpinolene	-4.670	0.822			
5	β -Sistosterol	-7.006	1.010			

No	Molekul	DS (kcal.mol ⁻¹)	RMSD (Å)	Residu Asam Amino	Jarak (Å)	Jenis Interaksi
6	Cubenol	-5.325	0.778	Val702	4.54	Ikatan Hidrofobik
				Ala719	3.71	Ikatan Hidrofobik
				Leu820	4.23	Ikatan Hidrofobik
				Lys701	3.88	Ikatan Hidrofobik
				Cys773	4.92	Ikatan Hidrofobik
				Leu768	4.95	Ikatan Hidrofobik
				Met769	4.32	Ikatan Hidrofobik
7	Myrtenal	-5.348	0.834	Leu 764	2.68	Ikatan Hidrogen-C
					4.86	Ikatan Hidrofobik
				Lys721	4.57	Ikatan Hidrofobik
				Leu834	5.33	Ikatan Hidrofobik
				Lys751	4.81	Ikatan Hidrofobik
				Leu753	4.94	Ikatan Hidrofobik
8	Nordamnacanthal	-6.467	1.472	Tyr867	3.06	Ikatan Hidrogen
				Pro853	2.99	Ikatan Hidrogen-C
				Asp813	2.76	Ikatan Hidrogen-C
				Arg865	3.83	Ikatan Elektrostatik
				Ala835	5.18	Ikatan Hidrofobik
				Ala840	3.72	Ikatan Hidrofobik
				Val852	4.63	Ikatan Hidrofobik
				Ala847	5.22	Ikatan Hidrofobik
				Arg812	2.72	Ikatan Hidrogen
				Tyr867	2.79	Ikatan Hidrogen
9	β-Alizarin	-6.111	1.460	Ala835	4.07	Ikatan Hidrofobik
				Ala840	3.62	Ikatan Hidrofobik
				Ala847	3.62	Ikatan Hidrofobik
				Val852	5.06	Ikatan Hidrofobik
				Pro853	4.46	Ikatan Hidrofobik
				Lys721	2.99	Ikatan Hidrogen
				Thr766	2.97	Ikatan Hidrogen
				Asp817	2.59	Ikatan Hidrogen-C
10	L-Scopoletin	-5.248	1.091	Asp831	2.69	Ikatan Hidrogen-C
				Val702	4.93	Ikatan Hidrofobik
				Ala719	4.74	Ikatan Hidrofobik
				Lys721	4.23	Ikatan Hidrofobik
				Leu820	5.12	Ikatan Hidrofobik
				Ala847	2.02	Ikatan Hidrogen
						Ikatan Hidrofobik
				Tyr845	2.32	Ikatan Hidrogen
				Ala840	4.36	Ikatan Hidrofobik
				Val852	4.46	Ikatan Hidrofobik
11	Terpinen-4-ol	-4.853	0.896	Pro853	5.04	Ikatan Hidrofobik
				His846	4.93	Ikatan Hidrofobik
				Pro910	3.99	Ikatan Hidrofobik
				Leu909	5.12	Ikatan Hidrofobik
				Trp881	4.84	Ikatan Hidrofobik
				Ala791	3.64	Ikatan Hidrofobik
				Leu721	4.38	Ikatan Hidrofobik
12	α-Pinene	-4.411	0.796	Leu764	5.41	Ikatan Hidrofobik
				Met742	4.11	Ikatan Hidrofobik
				Leu843	5.09	Ikatan Hidrofobik
				Lys721	4.41	Ikatan Hidrofobik
				Val702	4.65	Ikatan Hidrofobik
				Ala835	3.98	Ikatan Hidrofobik
				Ala840	4.14	Ikatan Hidrofobik
				Pro853	4.88	Ikatan Hidrofobik
13	β-Phellandrene	-5.667	0.887	Leu838	5.25	Ikatan Hidrofobik
				Val852	4.60	Ikatan Hidrofobik
14	Sabinene	-5.164	1.072			

No	Molekul	DS (kcal.mol ⁻¹)	RMSD (Å)	Residu Asam Amino	Jarak (Å)	Jenis Interaksi
15	α -Copaene	-5.045	0.946	Leu834	4.54	Ikatan Hidrofobik
				Phe699	4.38	Ikatan Hidrofobik
				Val702	4.93	Ikatan Hidrofobik
				Arg817	4.67	Ikatan Hidrofobik
				Lys721	5.48	Ikatan Hidrofobik
16	Erlotinib (Kontrol)	-8.545	1.334	Leu820	5.02	Ikatan Hidrofobik
				Arg817	2.87	Ikatan Hidrogen-C
					3.92	Ikatan Elektrostatik
				Pro853	2.47	Ikatan Hidrogen-C
				Asp813	2.58	Ikatan Hidrogen-C
				Trp856		Ikatan Hidrofobik
				Ile854		Ikatan Hidrofobik
				Lys855		Ikatan Hidrofobik
				Pro853		Ikatan Hidrofobik
				Pro851		Ikatan Hidrofobik



Gambar 1. Struktur 3D ligan terbaik hasil *docking* (A) 9-H-Pyridol [3, 4-b]indole (B) cubenol

Interaksi ligan dengan reseptor dapat diketahui melalui visualisasi hasil *docking* menggunakan perangkat lunak Biovia Discovery Studio 2017. Berdasarkan hasil tersebut, diketahui interaksi yang terjadi dengan berbagai jenis, diantaranya ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, dan ikatan elektrostatik. Interaksi tersebut terjadi akibat adanya interaksi *non-bond* antara gugus fungsi dari senyawa ligan dengan residu asam amino pada reseptor.

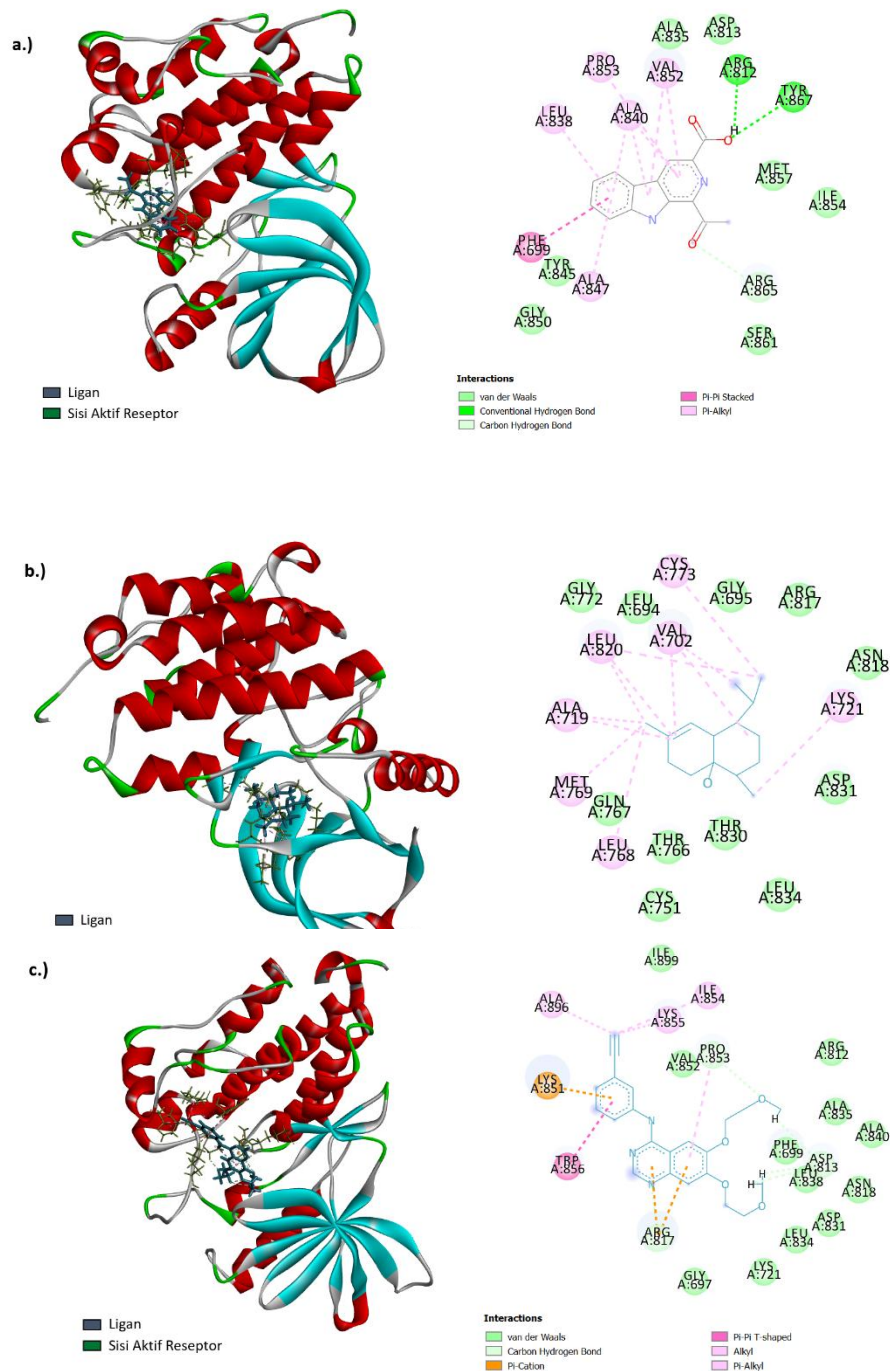
Ikatan hidrogen merupakan interaksi antar atom H dengan atom lain yang bersifat elektronegatif yang memiliki kekuatan rata-rata 5 kcal.mol⁻¹. Beberapa kasus ditemukan bahwa ikatan hidrogen tumpang tindih dengan interaksi ionik antara ion gugus bermuatan dari ligan dengan gugus yang berlawanan muatan pada residu asam amino. Interaksi ini memiliki jarak sekitar 2.7-3.0 Å yang memiliki ikatan yang sangat kuat dibandingkan interaksi lainnya (Itoh *et al.*, 2019; Klebe, 2013). Berdasarkan hasil *docking* dan visualisasi, menunjukan bahwa ikatan hidrogen ditunjukan hanya pada 9-H-Pyridol [3, 4-b] indole dengan residu asam amino Arg812, Tyr867, dan Arg865. Sedangkan pada cubenol tidak redapat ikatan hidrogen. Erlotinib sebagai kontrol positif juga memiliki ikatan hidrogen pada asam amino Arg817, Pro853, dan Asp813.

Ikatan hidrofobik memiliki stabilitas protein yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikatan hdirogen. Ikatan hidrofobik juga mampu menggabungkan daerah non-polar pada ligan dengan non-polar reseptor. Dengan stabilitas dan kemampuannya tersebut menjadikan ikatan hidrofobik berperan dalam mengatur keseimbangan dan kekuatan ikatan ligan-reseptor (Pace *et al.*, 2011). Berdasarkan hasil *docking* dan visualisasi, 2 ligan terbaik memiliki ikatan hdirofobik dengan banyak residu asam amino, begitu juga dengan erlotinib sebagai kontrol positif. Hasil tersebut menunjukan bahwa kedua ligan memiliki potensi yang cukup besar sbagai alternatif erlotinib karena memiliki kestabilan antara ligan dengan reseptor.

Interaski elektrostatik dikaitkan dengan kemampuan afinitias pengikatan, struktur, karakteristik kimia, anantara ligan dengan reseptor. Interaksi elektrostatik merupakan interaksi antara kation dan anion yang hampir mendekati ikatan kovalen (Klebe, 2013). Berdasarkan hasil *docking* dan visualisasi, 2 ligan terbaik tidak menunjukan adanya interaksi elektrostatik, berbeda dengan elektronib yang menunjukan adanya interaksi elektrostatik dengan asam amino Arg817.

Berdasarkan visualisasi interaksi ikatan inilah menjadi pertimbangan mengapa ligan 9-H-Pyridol [3, 4-b]indole memiliki energi ikatan yang lebih tinggi daripada cubenol, namun lebih rendah jika dibandingkan dengan erlotinib. Hal ini disebabkan karena pada elrotinib memiliki ketiga jenis interaksi biologis antara ligan dengan reseptor dibandingkan dengan 9-H-Pyridol [3, 4-b]indole dengan dua jenis

interaksi dan cubenol dengan satu jenis interaksi. Energi ikatan yang rendah dapat mempengaruhi kestabilan kompleks ligan-reseptor dengan berbagai jenis interaksi di dalamnya (Prasiska Wulandari *et al.*, 2023).



Gambar 2. Visualisasi 3D dan interaksi ligan dengan reseptor 4HJO (A) 9-H-Pyridol [3, 4-b]indole (B) cubenol (C) erlotinib

Skrining sifat fisikokimia pada senyawa obat dilakukan dengan tujuan untuk mempercepat proses penemuan dan pengembangan obat berdasarkan sifat kelarutan dan permeabilitas obat melalui oral. Aturan Lipinski menetapkan lima aturan yang harus dipenuhi senyawa obat, diantaranya massa molekul kurang dari 500 dalton, jumlah donor ikatan hidrogen (HBD) kurang dari lima, jumlah akseptor ikatan hidrogen kurang dari sepuluh. Nilai kelarutan dari senyawa obat direpresentasikan dengan log P dalam pelarut oktanol dan air. Nilai molar refractivity harus berada pada rentang 40-150 (Lipinski *et al.*, 2001).

Massa molekul yang lebih dari 500 dalton dapat menyebabkan penghambatan permeabilitas pada sistem pencernaan dan saraf pusat. Nilai log P yang kurang dari lima menunjukkan kemampuan senyawa dapat menembus membran sel yang terdiri dari lipid. Jumlah donor akseptor dan donor juga dibatasi

dikarenakan kecenderungan untuk sulit menembus membran sel yang dapat larut dalam pelarut air yang memiliki ikatan hidrogen yang kuat (Pollastri, 2010).

Berdasarkan hasil skrining pada tabel 2, 9-H-Pyridol [3, 4-b]indole dan cubenol memenuhi aturan Lipinski, namun pada 9-H-Pyridol [3, 4-b]indole memiliki kelarutan yang berada sedikit diatas ambang batas, yakni 5.958. Hasil sifat fisikokimia dari senyawa ligan terbaik masih berada dibawah erlotinib yang memiliki kelaurtan yang lebih rendah dari $\log P < 5$ dan ikatan hidrogen donor dan akseptor masing masing 1 dan 5.

Tabel 2. Hasil Prediksi Lipinski RO5

No	Molekul	Massa (dalton)	Hydrogen Bond Donor	Hydrogen Bond Acceptor	Log P	Molar Refractivity
1	Morindone	270.05	3	5	1.921	63.33
2	9-H-Pyridol [3, 4-b]indole	338.32	1	2	5.958	118.72
3	Erucic Acid	254.00	2	4	0.625	58.68
4	Terpinolene	136.00	0	0	2.654	50.00
5	β -Sistosterol	414.00	1	1	7.745	150.20
6	Cubenol	222.2	0	1	4.067	78.02
7	Myrtenal	150.1	0	1	1.893	44.33
8	Nordamnacanthal	268.04	2	5	1.361	59.93
9	β -Alizarin	240.04	2	4	1.360	55.66
10	L-Scopoletin	192.04	1	4	0.979	42.61
11	Terpinen-4-ol	154.14	1	1	2.950	53.04
12	α -Pinene	136.13	0	0	2.694	45.98
13	β -Phellandrene	136.13	0	0	2.543	49.14
14	Sabinene	136.13	0	0	2.522	49.25
15	α -Copaene	204.19	0	0	3.842	73.67
16	Erlotinib (Kontrol)	393.00	1	5	2.672	98.46

Tabel 3. Hasil Prediksi ADMET

No	Molekul	PPB	Ames Test	Carcino Mouse	Carcino Rat	BBB	CaCO ₂	HIA
1	Morindone	99.58	M	-	+	0.67	20.89	90.42
2	9-H-Pyridol [3, 4-b]indole	100.00	M	+	-	4.75	30.99	90.05
3	Erucic Acid	100.00	M	+	+	14.03	32.88	98.15
4	Terpinolene	98.16	M	+	+	8.90	23.64	100.00
5	β -Sistosterol	100.00	NM	+	-	19.89	52.37	100.00
6	Cubenol	100.00	M	+	-	9.58	55.41	100.00
7	Myrtenal	49.76	M	-	-	0.90	22.04	100.00
8	Nordamnacanthal	92.98	M	-	+	0.63	6.02	91.85
9	β -Alizarin	98.05	M	-	-	0.64	0.34	92.34
10	L-Scopoletin	29.42	M	-	+	0.64	0.28	93.92
11	Terpinen-4-ol	100.00	M	+	-	0.54	50.09	100.00
12	α -Pinene	100.00	M	-	+	0.53	23.63	100.00
13	β -Phellandrene	91.20	M	-	+	7.41	23.42	100.00
14	Sabinene	60.97	M	-	+	5.76	23.49	100.00
15	α -Copaene	100.00	NM	-	+	11.15	23.63	100.00
16	Erlotinib (Kontrol)	93.15	M	-	-	0.04	54.87	96.28

Skrining farmakokinetik dan sifat fisikokimia dilakukan pada 15 senyawa ekstrak *essential oils* pada mengkudu menggunakan pendekatan ADMET dan Lipinski rules of five. Paremetr admet meliputi PPB, BBB, CaCO₂, HIA, tes mutagen dan karsino pada tikus dan mencit. Sedangkan parameter Lipinski meliputi massa molekul, HBD, HBA, Log P, dan molar rafractivity.

Prediksi adsorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi, dan toksisitas senyawa uji dan kontrol sangat diperlukan dalam penemuan obat. Hal ini bertujuan untuk mencegah kemungkinan adanya cacat farmakokinetik pada obat. *Human Intestinal Adsorption* (HIA) dan permeabilitas CaCO₂ digunakan sebagai parameter adsorpsi. HIA merupakan representasi usus dalam menyerap suatu obat dalam skala persentase

dari total penyerapan (Prasetiawati *et al.*, 2021). Nilai serapan yang baik pada usus manusia berada pada persentasi di atas 70%. Permeabilitas CaCO_2 merupakan representasi dari adenokarsinoma usus besar dan memiliki beberapa jalur melalui jaringan epitel. Nilai CaCO_2 yang kurang dari 4 menandakan permeabilitas rendah, 4-70 menandakan permeabilitas sedang, dan 70 keatas memiliki permeabilitas tinggi. Berdasarkan hasil skrining pada tabel 3, 9-H-Pyridol [3, 4-b]indole memiliki HIA 90.05% dan CaCO_2 30.99 sedangkan cubenol memiliki nilai HIA 100% dan CaCO_2 55.41. Pada erlotinib sebagai kontrol HIA yang diperoleh 96% dan CaCO_2 54.87. Parameter adsorpsi tersebut menunjukkan bahwa dua senyawa ligan terbaik menunjukkan kemampuan adsorpsi yang hampir bagusya dengan adsorpsi erlotinib

Blood brain barrier (BBB) dan plasma protein binding (PPB) merupakan parameter distribusi. PPB menunjukkan distribusi pengikatan protein dalam darah. Nilai PPB yang besar dari 90% menunjukkan kuatnya ikatan protein dalam darah dan kurang dari 90% menunjukkan lemahnya ikatan protein dengan darah (Smith & Waters, 2019). BBB menunjukkan sejauh bana obat didistribusikan pada otak. Nilai $\text{BBB} < 1$ menunjukkan bahwa distribusi senyawa pada darah ke otak yang rendah, nilai 1-2 menunjukkan distribusi yang sedang, dan nilai > 2 menunjukkan distribusi yang tinggi. Nilai BBB yang rendah diperlukan agar senyawa ligan tidak terdistribusikan ke otak sehingga meminimalisasikan efek samping (Prasetiawati *et al.*, 2021). Berdasarkan hasil skrining pada tabel 3, 9-H-Pyridol [3, 4-b]indole memiliki PPB 100% dan BBB 4.75 sedangkan cubenol memiliki nilai PPB 100% dan BBB 9.58%. Erlotinib menunjukkan PPB 93.15 dan BBB 0.04. Hasil BBB dari kedua senyawa ligan terbaik tergolong tinggi dibandingkan dengan erlotinib yang mendekati nol. Sehingga, potensi efek samping 9-H-Pyridol [3, 4-b]indole dan cubenol memiliki efek samping yang tinggi terhadap otak dibandingkan dengan erlotinib.

Mutagenesis diimplementasikan dalam *ames test* dan karsinogenitasis untuk mengetahui efek mutasi DNA pada sel secara *in vitro* maupun *in vivo*. Kedua parameter ini merupakan gambaran dari toksisitas dari obat yang ditandai dengan tanda positif dan non-toksik ditandai dengan tanda negatif (19). Berdasarkan skrining pada tabel 3, 9-H-Pyridol [3, 4-b]indole dan cubenol memiliki sifat mutagen dan karsinogenik pada tikus, namun negatif pada mencit. Sementara pada erlotinib juga bersifat mutagen namun non-karsinogenik pada tikus maupun mencit. Parameter yang menunjukkan adanya efek samping dapat diminimalisasikan dengan optimasi lebih lanjut melalui modifikasi struktur obat. Hal ini dikarenakan struktur senyawa ligan respon mutagenik dari obat tersebut (Karim *et al.*, n.d.).

Simpulan

Metode *in silico* melalui *molecular docking* menunjukkan ekstrak *essential oils* dari mengkudu (*Morinda Citrifolia*) untuk menghambat mutasi EGFR pada NSCLC dapat mengikat sisi aktif reseptor. Dua senyawa yang memiliki RMSD yaitu 9-H-Pyridol [3, 4-b]indole dan cubenol masing-masing 0.790 dan 0.778 dengan masing masing nilai energi ikatan -5.992 dan -5.325 kcal.mol^{-1} . Interaksi dengan reseptor pada ligan 9-H-Pyridol [3, 4-b]indole terdapat ikatan hidrogen pada tiga residu asam amino, yaitu Arg812, Tyr867, dan Arg865. Sementara pada cubenol hanya ikatan hidrofobik yang terbentuk dengan residu asam amino. Berdasarkan hasil Lipinski rule of five dan ADMET, dua ligan tersebut memiliki sifat fisikokimia dan farmakokinetik yang baik, terkecuali pada efek toksisitas.

Daftar Referensi

- Agarwal, S., & Mehrotra, R. (2016). An overview of Molecular Docking. *JSM Chem*, 4(2), 1024. <https://www.researchgate.net/publication/303897563>
- Alves, I. A. B. S., Miranda, H. M., Soares, L. A. L., & Randau, K. P. (2014). Simaroubaceae family: Botany, chemical composition and biological activities. In *Revista Brasileira de Farmacognosia* (Vol. 24, Issue 4, pp. 481–501). Sociedade Brasileira de Farmacognosia. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.07.021>
- Aziz, F. K., Nukitasari, C., Oktavianingrum, F. A., Aryati, L. W., & Santoso, B. (2016). Hasil *In Silico* Senyawa Z12501572, Z00321025, SCB5631028 dan SCB13970547 dibandingkan Turunan Zerumbon terhadap Human Liver Glycogen Phosphorylase (115Q) sebagai Antidiabetes. *Jurnal Kimia VALENSI*, 0(0). <https://doi.org/10.15408/jkv.v0i0.4170>
- Bareschino, M. A., Schettino, C., Troiani, T., Martinelli, E., Morgillo, F., & Ciardiello, F. (2007). Erlotinib in cancer treatment. *Annals of Oncology*, 18(SUPPL. 6). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm222>
- Cataldo, V. D., Gibbons, D. L., Pérez-Soler, R., & Quintás-Cardama, A. (n.d.). *Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer with Erlotinib or Gefitinib*.
- Chanthira Kumar, H., Lim, X. Y., Mohkiar, F. H., Suhaimi, S. N., Mohammad Shafie, N., & Chin Tan, T. Y. (2022). Efficacy and Safety of *Morinda citrifolia* L. (Noni) as a Potential Anticancer Agent. In

Integrative Cancer Therapies (Vol. 21). SAGE Publications Inc.
<https://doi.org/10.1177/15347354221132848>

- Fadlan, A., & Nusantara, Y. R. (2021). The Effect of Energy Minimization on The Molecular Docking of Acetone-Based Oxindole Derivatives. *JKPK (Jurnal Kimia Dan Pendidikan Kimia)*, 6(1), 69. <https://doi.org/10.20961/jkpk.v6i1.45467>
- Idowu, M. O. (2013). Epidermal growth factor receptor in lung cancer: The amazing interplay of molecular testing and cytology. In *Cancer Cytopathology* (Vol. 121, Issue 10, pp. 540–543). <https://doi.org/10.1002/cncy.21321>
- Itoh, Y., Nakashima, Y., Tsukamoto, S., Kurohara, T., Suzuki, M., Sakae, Y., Oda, M., Okamoto, Y., & Suzuki, T. (2019). N+–C–H...O Hydrogen bonds in protein–ligand complexes. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36987-9>
- Jia, C. Y., Li, J. Y., Hao, G. F., & Yang, G. F. (2020). A drug-likeness toolbox facilitates ADMET study in drug discovery. In *Drug Discovery Today* (Vol. 25, Issue 1, pp. 248–258). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.10.014>
- Jorge, S. E. D. C., Kobayashi, S. S., & Costa, D. B. (2014). Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in lung cancer: Preclinical and clinical data. In *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (Vol. 47, Issue 11, pp. 929–939). Associacao Brasileira de Divulgacao Cientifica. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20144099>
- Karim, B. K., Tsamarah, D. F., Zahira, A., Rosandi, N. F., Swarga, K. F., Aulifa, D. L., Elaine, A. A., & Sitinjak, B. D. P. (n.d.). *Indonesian Journal of Biological Pharmacy In-Silico Study of Active Compounds in Guava Leaves (Psidium guajava L.) as Candidates for Breast Anticancer Drugs*. <https://www.ijbcm.com/>
- Klebe, G. (2013). Protein–Ligand Interactions as the Basis for Drug Action. In *Drug Design* (pp. 61–88). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17907-5_4
- Liao, H., Wang, Z., Deng, Z., Ren, H., & Li, X. (2015). Curcumin inhibits lung cancer invasion and metastasis by attenuating GLUT1/MT1-MMP/MMP2 pathway. In *Int J Clin Exp Med* (Vol. 8, Issue 6). www.ijcem.com/
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development q settings. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 46). www.elsevier.com/locate/drugdeliv
- Lu, J., Ji, X., Liu, X., Jiang, Y., Li, G., Fang, P., Li, W., Zuo, A., Guo, Z., Yang, S., Ji, Y., & Lu, D. (2024). Machine learning-based radiomics strategy for prediction of acquired EGFR T790M mutation following treatment with EGFR-TKI in NSCLC. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50984-7>
- Pace, C. N., Fu, H., Fryar, K. L., Landua, J., Trevino, S. R., Shirley, B. A., Hendricks, M. M. N., Iimura, S., Gajiwala, K., Scholtz, J. M., & Grimsley, G. R. (2011). Contribution of hydrophobic interactions to protein stability. *Journal of Molecular Biology*, 408(3), 514–528. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.053>
- Park, J. H., Liu, Y., Lemmon, M. A., & Radhakrishnan, R. (2012). Erlotinib binds both inactive and active conformations of the EGFR tyrosine kinase domain. *Biochemical Journal*, 448(3), 417–423. <https://doi.org/10.1042/BJ20121513>
- Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>
- Pollastri, M. P. (2010). Overview on the rule of five. In *Current Protocols in Pharmacology* (Issue SUPPL. 49). <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0912s49>
- Prah, A., Gavranic, T., Perdih, A., Sollner Dolenc, M., & Mavri, J. (2022). Computational Insights into β -Carboline Inhibition of Monoamine Oxidase A. *Molecules*, 27(19). <https://doi.org/10.3390/molecules27196711>
- Prasetiawati, R., Suherman, M., & Permana, B. (2021). Molecular Docking Study of Anthocyanidin Compounds Against Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) as Anti-Lung Cancer. In *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology Journal Homepage* (Issue 1). <http://jurnal.unpad.ac.id/ijpst/UNPAD8>

- Prasiska Wulandari, R., Gabriel, K., Aulia Nurdin, H., Hauna Pakhrul, D. F., Salmandhiya Harits, S., Prameswari, N., Puteri Agustina Pribadi, A., Diah Lia Aulifa Jurusan Farmasi, dan, Farmasi, F., & Padjadjaran Jalan Raya Bandung Sumedang, U. K. (2023). Indonesian Journal of Chemical Science In Silico Study of Secondary Metabolite Compounds in Parsley (*Petroselinum crispum*) as a Drug Therapy for Blood Cancer (Myeloproliferative Neoplasm (MPN)) targeting JAK-2. In *J. Chem. Sci* (Vol. 12, Issue 2). <http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/ijcs>
- Rajivgandhi, G., Saravanan, K., Ramachandran, G., Li, J. L., Yin, L., Quero, F., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., Manoharan, N., & Li, W. J. (2020). Enhanced anti-cancer activity of chitosan loaded *Morinda citrifolia* essential oil against A549 human lung cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 4010–4021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.169>
- Shao, Q., & Zhu, W. (2019). Ligand binding effects on the activation of the EGFR extracellular domain. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(15), 8141–8151. <https://doi.org/10.1039/c8cp07496h>
- Smith, S. A., & Waters, N. J. (2019). Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations for Drugs Binding to Alpha-1-Acid Glycoprotein. In *Pharmaceutical Research* (Vol. 36, Issue 2). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2551-x>
- Soni, J. P., Yeole, Y., & Shankaraiah, N. (2021). β -Carboline-based molecular hybrids as anticancer agents: A brief sketch. In *RSC Medicinal Chemistry* (Vol. 12, Issue 5, pp. 730–750). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0md00422g>
- Susanti, R., & Sukardi, S. (2023). The Composition of the Chemicals, Antioxidants, and Anti-Microbial Agents on the Essential Oil of the Piper Species and Its Potential as A Natural Preservative: A Review. *Jurnal Teknik Pertanian Lampung (Journal of Agricultural Engineering)*, 12(2), 312. <https://doi.org/10.23960/jtep-l.v12i2.312-325>
- Syafrizayanti, S., Putri, A., Salim, M., & Kusnanda, A. J. (2023). Simulasi Inhibisi Aktivitas Enzim α -Amilase dan α -Glukosidase oleh Senyawa Bioaktif Mikroalga *Spirulina platensis*. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 19(2), 223. <https://doi.org/10.20961/alchemy.19.2.73120.223-233>
- Trosset, J., & Scheraga, H. A. (1998). Reaching the global minimum in docking simulations: A Monte Carlo energy minimization approach using Bezier splines. In *Biophysics* (Vol. 95). www.pnas.org.
- Tseng, H. H., Chen, P. N., Kuo, W. H., Wang, J. W., Chu, S. C., & Hsieh, Y. S. (2012). Antimetastatic potentials of *phyllanthus urinaria* L on A549 and Lewis lung carcinoma cells via repression of matrix-degrading proteases. *Integrative Cancer Therapies*, 11(3), 267–278. <https://doi.org/10.1177/1534735411417128>
- Yaseen, Y. S., Mahmood, A. A. R., Abbas, A. H., Shihab, W. A., & Tahtamouni, L. H. (2022). New Niflumic Acid Derivatives as EGFR Inhibitors: Design, Synthesis, In silico Studies, and Anti-proliferative Assessment. *Medicinal Chemistry*, 19(5), 445–459. <https://doi.org/10.2174/1573406419666221219144804>