

Interaksi Senyawa Aktif dari *Muntingia calabura* terhadap Enzim Human ROS-1: *In Silico*

Interaction of Active Compound of Muntingia calabura on Human ROS-1 Enzymes: In Silico

Feri Kanti Rahayu¹, Mega Kartikasari², Lukman Hakim^{3*}

¹Program Studi D3 Analisis Farmasi dan Makanan, STIKES Ibnu Sina Ajibarang, Indonesia

^{2,3}Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Harapan Bangsa, Jalan Raden Patah No. 100, Ledug, Purwokerto, Kabupaten Banyumas, Jawa Tengah 53182, Indonesia

Abstract

Reactive Oxygen Species (ROS) is a by-product of metabolic processes and is a type of free radical. An imbalance in the number of free radicals with the number of endogenous antioxidants produced by the body causes oxidative stress, this situation can cause problems with body cells which can cause various diseases such as cancer, heart disease, cataracts, premature aging, diabetes mellitus, and degenerative diseases. Human ROS-1 is often found in lung cancer cells. Cherry plants (*Muntingia calabura*) are reported to contain secondary metabolites that have antioxidant activity *in vitro*. This research focuses on the interaction of compounds in cherry leaves with the Human ROS 1 receptor (PDB ID 3ZBF) using an *in silico* molecular docking approach. Nine test compounds (active compounds from *Muntingia calabura*) can bind to the Human ROS-1 enzyme. The two compounds with the lowest energy are compound 50 (-81.6 kcal/mol) and compound 66 (81.5 kcal/mol). Interactions occur through the formation of hydrogen, hydrophobic, and electrostatic bonds.

Keywords: docking, Human ROS-1, *Muntingia calabura*, molecular docking

Article Info

Article history

Submission: Januari 2024

Accepted: January 2024

Publish: January 2024

Abstrak

Reactive Oxygen Species (ROS) merupakan hasil samping dari proses metabolisme dan menjadi salah satu radikal bebas. Ketidakseimbangan jumlah radikal bebas dengan jumlah antioksidan endogen yang diproduksi tubuh menyebabkan stres oksidatif, keadaan ini dapat menyebabkan terjadinya permasalahan terhadap sel tubuh yang dapat menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, diabetes melitus, dan penyakit degeneratif. Human ROS-1 banyak ditemukan pada sel kanker paru. Tanaman kersen (*Muntingia calabura*) dilaporkan mengandung metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas antioksidan secara *in vitro*. Penelitian ini berfokus pada interaksi senyawa-senyawa pada daun kersen terhadap reseptor Human ROS 1 (PDB ID 3ZBF) melalui pendekatan penambatan molekul secara *in silico*. Sembilan senyawa uji (senyawa aktif dari *Muntingia calabura*) dapat berikatan dengan enzim Human ROS-1. Dua senyawa dengan energi terendah yakni senyawa 50 (-81,6 kkal/mol) dan senyawa 66 (81,5 kkal/mol). Interaksi yang terjadi melalui pembentukan ikatan hydrogen, hidrofobik, dan elektrostatik.

Keywords: docking, Human ROS-1, *Muntingia calabura*, penambatan molekul

Ucapan terimakasih

Correspondence:

Lukman Hakim,

Program Studi Farmasi

Fakultas Kesehatan

Universitas Harapan Bangsa,

Jalan Raden Patah No. 100,

Ledug, Purwokerto,

Kabupaten Banyumas, Jawa

Tengah 53182, Indonesia

Email: lukmanhakim@uhb.ac.id

PENDAHULUAN

Reactive Oxygen Species (ROS) merupakan hasil samping dari proses metabolisme (1) dan menjadi salah satu radikal yang banyak terdapat pada tubuh. ROS adalah turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif dan menyebabkan mutasi DNA berujung memicu terjadinya kanker, sehingga dalam hal ini antioksidan sangat diperlukan untuk mencegah atau menghambat terjadinya reaksi oksidasi berantai dari ROS (2).

Ketidakseimbangan jumlah radikal bebas dengan jumlah antioksidan endogen yang diproduksi tubuh seperti Superoksida Dismutase (SOD), Glutation Peroksidase (GPx) dan Catalase (CAT) inilah yang menyebabkan stres oksidatif (3). Keadaan ini dapat menyebabkan terjadinya permasalahan terhadap sel tubuh yang dapat menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, diabetes melitus, dan penyakit degeneratif lainnya (4,5);(6). Maka dari itu perlu asupan antioksidan eksogen untuk menghambat proses oksidasi yang berlebih dan pencegahan kerusakan sel-sel tubuh. Antioksidan dapat berupa senyawa kimia hasil sintesis ataupun bahan berasal dari alam yang pada kadar tertentu dapat menghambat proses oksidasi (5).

Kandungan senyawa fenol seperti flavonoid dan tanin berperan sebagai antioksidan yang berfungsi untuk menetralkan senyawa radikal bebas (7). Tanaman kersen (*Muntingia calabura*) dilaporkan mengandung berbagai golongan saponin, flavonoid, tanin, flavonol, alkaloid, steroid, kuinon dan terpenoid (8,9).

Berdasarkan laporan penelitian yang ekstrak air daun kersen mempunyai aktivitas antioksidan *in vitro* meredam radikal bebas 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (IC₅₀ = 196,80 µg/ml) dan kadar fenolat total yang terdapat pada daun kersen setara dengan asam galat 2,86 mg/50 g daun segar(10). Hasil penelitian lain ekstrak etanol daun dan batang kersen pada uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) terdapat berbagai metabolit sekunder serta memiliki aktivitas antioksidan yang sangat tinggi yaitu menunjukkan penghambatan DPPH lebih dari 90% (11).

Berdasarkan temuan-temuan tersebut menunjukkan adanya aktivitas antioksidan yang

tinggi pada daun kersen, namun aktivitas antioksidan baru diuji sebatas ekstrak kasar. Diketahui ekstrak kasar masih mengandung banyak metabolit sekunder atau dapat dikatakan bukan senyawa murni, sehingga tidak diketahui pasti senyawa metabolit mana yang paling berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan pada tanaman-tanaman tersebut. Salah satu metode yang relevan dan dapat diterapkan dengan pertimbangan waktu dan biaya adalah menerapkan metode *in silico* melalui pendekatan penambatan molekul (*docking*). Penambatan molekul mampu menunjukkan pengikatan dan mempertegas bukti interaksi kimiawi yang akan terjadi antara hasil laboratorium dan kimia komputasi. Penambatan molekul menggunakan struktur tiga dimensi reseptor untuk menyaring dan memperoleh konformasi molekul sebagai ligan yang memiliki afinitas pengikatan tertinggi terhadap protein. Metode tersebut dapat memperoleh informasi tentang hubungan antara konformasi ligan dengan situs aktif protein (12).

Human ROS-1 banyak ditemukan pada sel kanker paru(13). Reseptor *Human* ROS-1 yang merupakan jenis reseptor tirosin kinase telah menunjukkan potensialnya sebagai target terapi kanker ditandai dengan Crizotinib sebagai obat kanker(14). Protein reseptor tersebut dapat menjadi target digunakan dalam memprediksi aktivitas antioksidan senyawa-senyawa pada daun kersen. Berdasarkan uraian tersebut penelitian ini berfokus pada interaksi senyawa-senyawa pada daun kersen terhadap reseptor *Human* ROS 1 melalui pendekatan penambatan molekul secara *in silico* (15). Senyawa yang didapatkan dari studi literatur (9), akan dipelajari bagaimana interaksinya terhadap protein reseptor *Human* ROS 1.

METODE PENELITIAN

Konstituen senyawa pada ekstrak daun kersen dibuat struktur 2D dan 3D menggunakan *software ChemDraw Professional 15.0*. dan disimpan dalam dalam format *.mol. Struktur kristal makromolekul (protein target) reseptor *Human* ROS-1 diunduh dari <https://rcsb.org/> dengan kode *Protein Data Bank* (PDB) 3ZBF(14). Preparasi makromolekul (protein target) dengan menghilangkan molekul air dan memisahkan

ligan bawaan menggunakan *Discovery Studio Visualizer* (DSV) dan disimpan dalam format *.pdb.

Validasi metode penambatan molekul dilakukan dengan menambatkan ulang (*re-docking*) ligan bawaan dari protein target menggunakan *software i-GemDock*. Metode penambatan dikatakan baik (*valid*) jika nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) antara konformasi pose hasil penambatan dengan kristalografi $\leq 3\text{ \AA}$ (16–18), profil ikatan *re-docking* asam amino dan intermolekul protein yang mirip dengan kristalografi.

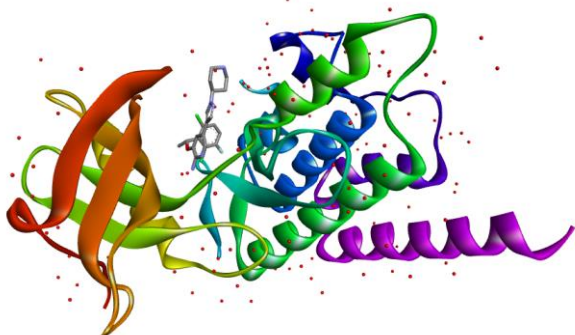
Struktur protein dan ligan uji yang telah diperoleh dalam bentuk *.pdb ditentukan parameter yang digunakan dalam proses penambatan menggunakan *software i-GemDock*. Hasil penambatan dievaluasi menggunakan *Discovery Studio Visualizer* (DSV)(19,20).

Visualisasi hasil penambatan berupa struktur 3D dan visualisasi interaksi ikatan intermolekul 3D dan 2D dilakukan menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio Visualizer* (DSV) (21,22).

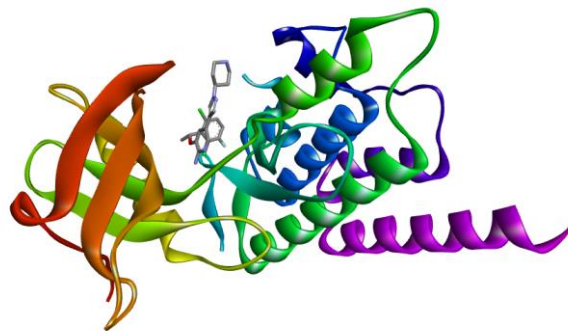
Penilaian hasil penambatan berupa nilai energi ikatan senyawa terhadap protein target, interaksi residu asam amino, dan interaksi intermolekul. Nilai energi ikatan yang paling kecil merupakan parameter konformasi ligan-protein yang stabil (23).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Diperoleh konstituen senyawa yang terdapat pada daun kersen sebanyak 9 konstituen (struktur senyawa disajikan pada Tabel 1). Struktur kristal protein target yakni reseptor *Human ROS-1* ditunjukkan pada gambar 1.



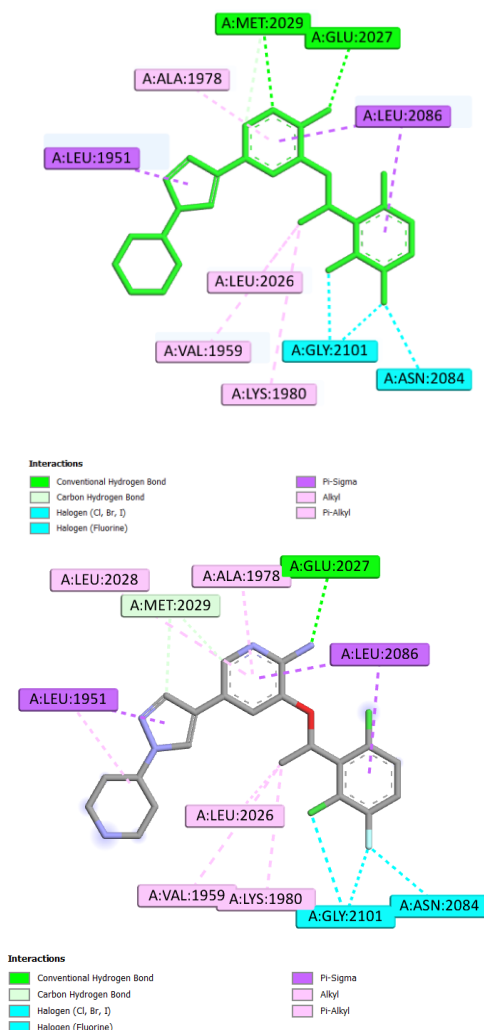
A



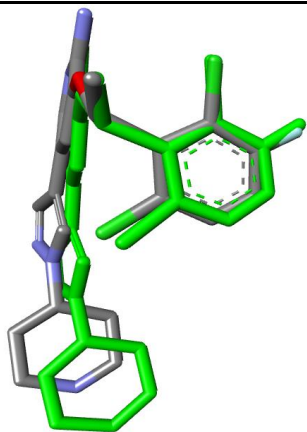
B

Gambar 1. Struktur kristal protein target. (A) Sebelum preparasi. (B) Sesudah preparasi.

Validasi protocol penambatan dilakukan menggunakan ligan bawaan dari struktur kristal protein target, hal ini dilakukan untuk memastikan penambatan pada senyawa uji memberikan hasil yang valid(18). Hasil validasi protocol penambatan diperoleh nilai RMSD 1,17 \AA , *superimpose* ko-kristal dengan hasil validasi disajikan Gambar 2.



A



B

Gambar 2. Interaksi residu asam amino dengan reference ligan (ko-kristal → hijau; hasil validasi → metalik) (A). Superimpose ko-kristal dengan validasi (B).

Tabel 1. Konstituen senyawa pada ekstrak daun kersen

| N o | Senyaw a | Struktur |
|--------|-------------|----------|
| 1 | 13 | |
| 2 | 50 | |
| 3 | 51 | |
| 4 | 52 | |

| N o | Senyaw a | Struktur |
|--------|-------------|----------|
| 5 | 53 | |
| 6 | 65 | |
| 7 | 66 | |
| 8 | 67 | |
| 9 | 87 | |

Protokol *docking* yang diterapkan adalah *Binding site radius 8 Å*; *Docking Accuracy Setting (GA Parameters)* dengan *Population size: 200*; *Generations: 70*; *number of solutions: 2*; dan menggunakan pengaturan *Standard Docking*. Berdasarkan hasil validasi dapat dikatakan valid nilai $RMSD\ 1,17\ \text{Å} < 3,0\ \text{Å}$ dan profil interaksi residu asam amino 90% kemiripan dengan ko-kristal serta pose interaksi yang mirip (Gambar 2).

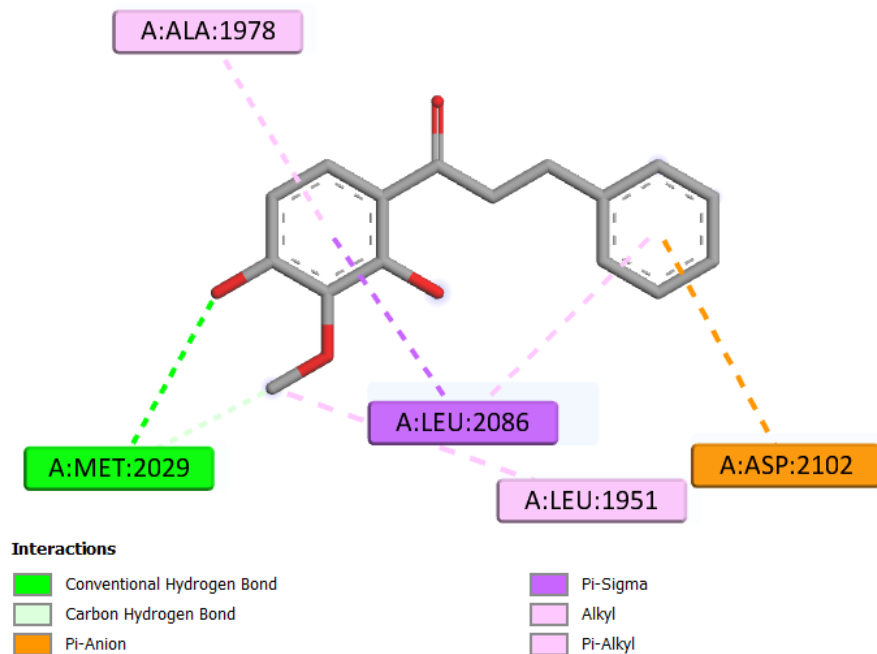
Pengikatan protein-ligan hanya terjadi secara spontan ketika perubahan energi bebas bernilai negative dan energi bebas ikatan sebanding dengan stabilitas interaksi protein-ligan. Oleh karena itu, protein-ligan terjadi energi ikatan rendah dalam sistem(24–26). Energi bebas ikatan mengindikasikan kesetabilan kompleks

ligan-protein dan ini merupakan karakteristik penting dalam kemanjuran suatu obat(27). Senyawa 50 dan 66 memberikan energi ikatan paling rendah (-81,6 kkal/mol dan 81,5 kkal/mol) dibandingkan dengan 7 senyawa lainnya, namun

masih lebih besar jika dibandingkan dengan Crizotinib (-94,8 kkal/mol) sebagai ligan reference. Senyawa 50 membentuk 3 kategori ikatan yakni ikatan hydrogen, ikatan hidrofobik, dan ikatan elektrostatik (Gambar 3).

Tabel 2. Profil interaksi ligan dan senyawa uji dengan protein target

| Senyawa | Skor docking (kkal/mol) |
|------------------------|-------------------------|
| Reference (Crizotinib) | -94,8 |
| 65 | -79,3 |
| 13 | -79,1 |
| 53 | -71,9 |
| 67 | -71,6 |
| 51 | -68,9 |
| 52 | -68,5 |
| 87 | -66,8 |
| 50 | -81,6 |
| 66 | -81,5 |



Gambar 3. Interaksi residu asam amino dengan senyawa uji 50

Ikatan hidrofobik berupa Pi-Sigma, Alkyl, Pi-Alkyl dengan residu asam amino yang terlibat LEU 2086; LEU 1951; ALA 1978. Ikatan hidrofobik memiliki kontribusi utama stabilitas protein dibandingkan dengan ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen juga mendukung stabilitas protein, tetapi pada tingkat yang lebih rendah dibandingkan ikatan hidrofobik (28). Ikatan hidrofobik juga penting dalam menggabungkan daerah non-polar molekul obat dengan daerah

non-polar reseptor biologis. Daerah non-polar molekul obat yang tidak larut dalam air dan molekul air di sekitarnya akan bergabung melalui ikatan hidrogen membentuk struktur kuasi-kristalin (18,29,30). Oleh karena itu, ikatan hidrofobik merupakan penentu utama keseimbangan dan kekuatan ikatan ligan-protein (28)

Ikatan hydrogen dengan residu MET 2029. Ikatan hydrogen atau ikatan antara atom H

dengan atom lain yang bersifat elektronegatif dan mempunyai sepasang elektron bebas dengan oktet yang lengkap, seperti O, N, dan F. Kekuatan ikatan hidrogen bervariasi antara 1-10 kkal/mol, rata-rata 5 kkal/mol. Ikatan hidrogen pada umumnya terjadi pada senyawa yang mempunyai gugus-gugus seperti OH...O, NH...O, NH...N, OH...N, NH...F dan OH...F dan memiliki kekuatan yang berbeda(29,31-33). Ikatan antara O...H tergolong kategori tidak terlalu kuat(33-35). Sering ditemukan bahwa gugus bermuatan dari ligan berikatan dengan gugus yang bermuatan berlawanan pada protein. Interaksi ionik (juga dikenal sebagai *salt bridge*) sangat kuat ketika dua kelompok dipisahkan oleh 2,7-3,0 Å dari satu sama lain. Seringkali interaksi ionik tumpang tindih dengan ikatan hidrogen. Ini disebut ikatan hidrogen berbantuan muatan. Kita akan melihat bahwa di banyak kompleks protein-ligan, asosiasi sebagian besar ditentukan oleh interaksi ionik tersebut(36).

Ikatan elektrostatik berupa Pi-Anion dengan residu asam amino ASP 2102. Ikatan elektrostatik umumnya dikaitkan dengan afinitas pengikatan, struktur, karakteristik kimia, dan stabilitas, dan dengan reaktivitas biologis protein dan asam nukleat(36,37). Interaksi elektrostatik merupakan faktor energi yang mendominasi. Interaksi antara kation dan anion dalam ruang hampa lebih dari 400 kJ/mol, yang hampir mendekati kekuatan ikatan kovalen. Oleh karena itu, pengikatan pasangan ion dalam fase gas jauh lebih besar daripada kekuatan khas interaksi protein-ligan dalam air (36).

Residu asam amino MET 2029 diduga merupakan kunci dalam pengikatan protein dengan ligan (disajikan pada gambar 2; gambar 3; dan lampiran) hal ini tergambar dari semua senyawa uji dan ligan reference memberikan ikatan terhadap residu asam amino tersebut.

KESIMPULAN

Sembilan senyawa uji (senyawa aktif dari *Muntingia calabura*) dapat berikatan dengan enzim *Human ROS-1* dengan energi yang cukup rendah. Dua senyawa dengan energi terendah yakni senyawa 50 dan senyawa 66. Interaksi yang terjadi melalui pembentukan ikatan hidrogen, hidrofobik, dan elektrostatik.

KONFLIK KEPENTINGAN DAN SUMBER PENDANAAN

DAFTAR PUSTAKA

1. Simanjuntak E, Setia Budi Pasar Tanjung Sari. SUPEROKSIDA DISMUTASE (SOD) DAN RADIKAL BEBAS. JURNAL KEPERAWATAN DAN FISIOTERAPI (JKF) [Internet]. 2020 Apr 30 [cited 2022 Dec 3];2(2):124-9. Available from: <https://ejournal.medistra.ac.id/index.php/JKF/article/view/342>
2. Rosiarto BD, Puspaningtyas AR, Holidah D. Studi Aktivitas Antioksidan Senyawa 1-(p-klorobenzoiloksimetil)-5-fluorourasil dengan Metode Molecular Docking dan Metode DPPH (Antioxidant Activity of 1-(p-chlorobenzoyloxymethyl)-5-Fluorouracyl Using Molecular Docking and DPPH Method). Pustaka Kesehatan [Internet]. 2014 Jan 8 [cited 2023 Dec 15];2(1):95-9. Available from: <https://jurnal.unej.ac.id/index.php/JPK/article/view/602>
3. Risfianty DK, Sanuriza I II. UJI ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL BUAH ASAM JAWA (*TAMARINDUS INDICA L.*) TUA DAN MUDA DENGAN METODE DPPH. Jurnal Inovasi Pendidikan dan Sains. 2021;2(2):55-7.
4. Bengal W. Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions : An Overview. 2010;1(3):185-92.
5. Sayuti K dan, Rina Y. ALAMI dan SINTETIK. Angrgraini T, editor. Padang: Andalas University Press; 2015.
6. Martemucci G, Costagliola C, Mariano M, D'andrea L, Napolitano P, D'Alessandro AG. Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. Oxygen. 2022;2(2):48-78.

7. Hidayati MD, Ersam T, Shimizu K, Fatmawati S. Antioxidant activity of *Syzygium polynthum* extracts. Indonesian Journal of Chemistry. 2017;17(1):49–53.
8. Illiyyin Akib N, Saraswati Hendra N, Eka Purnama Putri A, Indradewi Armadhani F, Nafisah Tendri Adjeng A, Mahmudah atul. PREPARASI FITOSOM EKSTRAK ETANOL DAUN KERSEN (*Muntingia calabura* L.) SEBAGAI ANTIOKSIDAN PREPARATION OF PHYTOSOME OF KERSEN LEAVES (*Muntingia calabura* L.) ETHANOL EXTRACT AS ANTI-OXIDANT. Jurnal Farmasi Sains dan Praktis [Internet]. 2021;7(3):2579–4558. Available from: <http://journal.ummg.ac.id/index.php/pharmacy>
9. Mahmood ND, Nasir NLM, Rofiee MS, Tohid SFM, Ching SM, Teh LK, et al. *Muntingia calabura*: A review of its traditional uses, chemical properties, and pharmacological observations. Pharm Biol [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2023 Oct 31];52(12):1598–623. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/13880209.2014.908397>
10. Marjoni MR, Afrinaldi A, Novita AD. Kandungan Total Fenol Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air Daun Kersen (*Muntingia Calabura* L.). YARSI medical Journal. 2015;23(3):187–96.
11. Buhian WPC, Rubio RO, Martin-Puzon JJ. Chromatographic fingerprinting and free-radical scavenging activity of ethanol extracts of *Muntingia calabura* L. leaves and stems. Asian Pac J Trop Biomed. 2017 Feb 1;7(2):139–43.
12. McGovern SL, Shoichet BK. Information decay in molecular docking screens against holo, apo, and modeled conformations of enzymes. J Med Chem [Internet]. 2003 Jul 3 [cited 2022 Dec 3];46(14):2895–907. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm0300330>
13. Hikmah F, Hardiany NS, Kunci K. Peran Reactive Oxygen Species (ROS) Dalam Sel Punca Kanker The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cancer Stem Cells. JURNAL KEDOKTERAN YARSI. 2021;29(3):120–34.
14. Utami D, Solikah WY, Mahfudh N. Antioxidant Potency of Cassumunin A-C Compounds from Bangle Rhizome (*Zingiber cassumunar*) by Molecular Docking on Human ROS-1 kinase Receptors. JPKP (Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia). 2021 Dec 25;6(3):292.
15. Maulana LH, Prasyono RN, Prayogi S, Murniningsih E, Alfarikhi MZ. Uji Aktivitas Antioksidan *Syzygium polyanthum* DAN *Terminalia catappa* L. SECARA IN VITRO DAN IN SILICO. Parapemikir: Jurnal Ilmiah Farmasi [Internet]. 2023 Sep 9 [cited 2023 Dec 15];12(3):393–405. Available from: <https://ejournal.poltekharber.ac.id/index.php/parapemikir/article/view/5163>
16. Istyastono EP. Rancangan Obat dan Penapisan Virtual Berbasis Struktur. Yogyakarta: Sanata Dharma University Press; 2018.
17. Ramírez D, Caballero J. molecules Is It Reliable to Take the Molecular Docking Top Scoring Position as the Best Solution without Considering Available Structural Data? [cited 2023 Dec 15]; Available from: www.mdpi.com/journal/molecules
18. Prayogi S, Dhiani BA, Djalil AD. Molecular Docking of Bicycloproline Derivative Synthetic Compounds on Envelope Protein: Anti-SARS-CoV-2 Drug Discovery. JURNAL FARMASI DAN ILMU KEFARMASIAN INDONESIA [Internet]. 2023 Apr 30 [cited 2024 Jan 13];10(1):11–21. Available from: <https://ejournal.unair.ac.id/JFIKI/article/view/38635>
19. Khalil M, Amin M, Lukiati B. Analisis Potensi Senyawa Repensol Sebagai Kandidat Inhibitor Replikasi Virus Hepatitis B Secara In Silico. 2020;1–6.
20. Hakim L, Prayogi S, Kartikasari M, Kanti Rahayu F, Studi Farmasi Fakultas Kesehatan P. STUDY OF MOLECULAR DOCKING LIGANDS IN Glucagon Like-Peptide-1 Receptor (GLP-1R). Pharmacy Peradaban Journal [Internet]. 2023 Feb 6 [cited 2024 Jan 13];3(1). Available from:

- <https://journal.peradaban.ac.id/index.php/pj/article/view/1337>
21. Sari IW, Junaidin J, Pratiwi D. STUDI MOLECULAR DOCKING SENYAWA FLAVONOID HERBA KUMIS KUCING (*Orthosiphon stamineus* B.) PADA RESEPTOR α -GLUKOSIDASE SEBAGAI ANTIDIABETES TIPE 2. *Jurnal Farmagazine*. 2020;7(2):54.
 22. Kartikasari M, Prayogi S, Hakim L, Kanti Rahayu F, Studi Farmasi Fakultas Kesehatan P. SIMULATION OF MOLECULAR DOCKING FATTY ACID CONSTITUENTS OF SNAKEHEAD FISH (*Channa striata*) ON FFAR4/GPR120. *Pharmacy Peradaban Journal* [Internet]. 2023 Feb 6 [cited 2024 Jan 13];3(1). Available from: <https://journal.peradaban.ac.id/index.php/pj/article/view/1338>
 23. Manna A, Laksitorini MD, Hudiyanti D, Siahaan P. Molecular Docking of Interaction between ECadherin Protein and Conformational Structure of Cyclic Peptide ADTC3 (Ac-CADTPC-NH₂) Simulated on 20 ns. *Journal of scientific and applied chemistry*. 2017;20(1):30–6.
 24. Afriza D, Suriyah WH, Ichwan SJA. In silico analysis of molecular interactions between the anti-apoptotic protein survivin and dentatin, nordentatin, and quercetin. In: *Journal of Physics: Conference Series*. Institute of Physics Publishing; 2018.
 25. Du X, Li Y, Xia YL, Ai SM, Liang J, Sang P, et al. Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016 Jan 26 [cited 2022 Jul 24];17(2). Available from: </pmc/articles/PMC4783878/>
 26. Sergeev Y V., Dolinska MB, Wingfield PT. The thermodynamic analysis of weak protein interactions using sedimentation equilibrium. *Current protocols in protein science / editorial board, John E Coligan*. [et al] [Internet]. 2014 [cited 2022 Jul 24];77:20.13.1. Available from: </pmc/articles/PMC4182932/>
 27. Mohamad Rosdi MN, Mohd Arif S, Abu Bakar MH, Razali SA, Mohamed Zulkifli R, Ya'akob H. Molecular docking studies of bioactive compounds from *Annona muricata* Linn as potential inhibitors for Bcl-2, Bcl-w and Mcl-1 antiapoptotic proteins. *Apoptosis* 2017 23:1 [Internet]. 2017 Dec 4 [cited 2022 Jul 24];23(1):27–40. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10495-017-1434-7>
 28. Pace CN, Fu H, Fryar KL, Landua J, Trevino SR, Shirley BA, et al. Contribution of Hydrophobic Interactions to Protein Stability. *J Mol Biol* [Internet]. 2011 May 5 [cited 2022 Jul 24];408(3):514. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3086625/>
 29. Patrick GL. *An Introduction to Medicinal Chemistry Fifth Edition*. 5th Ed. Oxford University Press. New York: OXFORD; 2013.
 30. Siswandono & Soekardjo B. *Kimia Medisinal*. Edisi 2. Surabaya: Airlangga University Press; 2017.
 31. Siswandono. *Medicinal Chemistry*. 2nd ed. Siswandono, editor. Surabaya: Airlangga University Press; 2016. 1–554 p.
 32. Böhm HJoachim, Schneider G. *Protein-ligand interactions from molecular recognition to drug design*. Wiley-VCH; 2003. 242 p.
 33. N Baker BE. 22.2. Hydrogen bonding in biological macromolecules. 2006.
 34. Panigrahi SK, Desiraju GR. Strong and weak hydrogen bonds in the protein–ligand interface. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* [Internet]. 2007 Apr 1 [cited 2022 Aug 4];67(1):128–41. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/prot.21253>
 35. Itoh Y, Nakashima Y, Tsukamoto S, Kurohara T, Suzuki M, Sakae Y, et al. N+–C–H...O Hydrogen bonds in protein-ligand complexes. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2022 Aug 4];9(1). Available from: </pmc/articles/PMC6347603/>
 36. Klebe G. Protein–Ligand Interactions as the Basis for Drug Action. *Drug Design*. 2013;61–88.
 37. Sharp KA. 22.3. Electrostatic interactions in proteins. 2006.