

Interaksi Asam Galat dan Metil Galat dari Tumbuhan Kasturi (*Mangifera casturi*) sebagai Inhibitor Protein Human Epidermal Growth Factor 2 (HER-2): Evaluasi Molekular Docking

NOER KOMARI^{1*}, ROBIATUL ADAWIYAH¹, EKO SUHARTONO², SAMSUL HADI³

¹Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, Kalimantan Selatan, Indonesia

²Bagian Biokimia/Kimia Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, Kalimantan Selatan, Indonesia

³Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, Kalimantan Selatan, Indonesia

* alamat e-mail korespondensi: nkomari@ulm.ac.id

Informasi Artikel	Abstrak/Abstract
<p>Kata Kunci: Anti kanker payudara; energi bebas Gibbs; in silico; polifenol; SwissADME;</p> <p>Keywords: anti-breast cancer; Gibbs free energy; in silico; polyphenols; SwissADME;</p>	<p>Kasturi (<i>Mangifera casturi</i>) adalah tanaman khas Kalimantan. Kandungan polifenol daun kasturi bersifat antioksidan antara lain asam galat dan metil galat. Potensi antioksidan asam galat dan metil galat daun kasturi diduga dapat menghambat pertumbuhan sel kanker payudara. Protein Human Epidermal Growth Factor 2 (HER-2) merupakan faktor penting dalam pertumbuhan epidermal sel payudara dan juga menjadi target pengobatan kanker payudara. Penelitian ini bertujuan untuk melihat potensi senyawa asam galat dan metil galat dari buah kasturi sebagai inhibitor protein HER-2. Parameter molecular docking berupa energi bebas Gibbs, interaksi ligan asam galat dan metil galat dengan residu protein HER-2 (PDB ID: 3PP0) dan hasil farmakotoksik menggunakan web server pkCSM dan SwissADME digunakan untuk memprediksi potensi senyawa asam galat dan metil galat sebagai inhibitor HER-2. Hasil simulasi docking molekular menunjukkan bahwa asam galat dan metil galat berpotensi sebagai inhibitor protein HER-2 dengan nilai $G = -7,00$ Kkal/mol dan $-6,98$ Kkal/mol. Interaksi asam galat dengan residu asam amino: GLU-766, GLU-770, ARG-756, ARG-868, THR-759, PHE-731, PHE-864, LEU-755, ILE-767, LYS-753, GLY-865, dan ALA-763. Interaksi metil galat dengan residu asam amino: ARG-970, ASP-838, GLU-837, GLU-971, SER-834, PHE-969, ARG-968, dan ARG-970. Asam galat dan metil galat memiliki nilai LD-50 sebesar 2,218 mol/Kg dan 1,898 mol/Kg yang termasuk dalam kategori IV (cukup toksik); tidak bersifat hepatotoxicity, tidak bersifat skin sensitization dan bioavailabilitas baik. Residu protein HER-2 berinteraksi cukup stabil dengan asam galat dan metil galat dan memiliki banyak kemiripan interaksi residu asam amino dengan ligan alami sebagai pembanding.</p> <p><i>Kasturi (Mangifera casturi) is a endemic plant of Borneo. The polyphenol content of M. casturi leaves has antioxidant properties, including gallic acid and methyl gallic. The antioxidant potential of gallic acid and methyl gallate of M. casturi leaves is thought to inhibit the growth of breast cancer cells. Human Epidermal Growth Factor 2 (HER-2) protein is an important factor in the epidermal growth of breast cells and is also a target for breast cancer treatment. This study aims to investigate the potential of gallic acid and methyl gallic compounds from M. casturi as inhibitors of HER-2 protein. Molecular docking parameters in Gibbs free energy, interaction of gallic acid and methyl gallic ligands with HER-2 protein residues (PDB ID: 3PP0) and pharmacotoxic results were used to predict the potential of gallic acid and methyl gallic compounds as HER-2 inhibitors. Molecular docking simulation results show that gallic acid and methyl gallic are potential inhibitors of HER-2 protein with G values = -7.00 Kcal/mol and -6.98 Kcal/mol. Gallic acid interaction with amino acid residues: GLU-766, GLU-770, ARG-756, ARG-868, THR-759, PHE-731, PHE-864, LEU-755, ILE-767, LYS-753, GLY-865, and ALA-763. Methyl gallate interaction with amino acid residues: ARG-970, ASP-838, GLU-837, GLU-971, SER-834, PHE-969, ARG-968, and ARG-970. Gallic acid and methyl gallic have LD-50 values of 2.218 mol/Kg and 1.898 mol/Kg which are included in category IV (quite toxic); no hepatotoxicity, no skin sensitization and good bioavailability. HER-2 protein residues interacted quite stable with gallic acid and methyl gallic and had many similar amino acid residue interactions with natural ligands for comparison.</i></p>

PENDAHULUAN

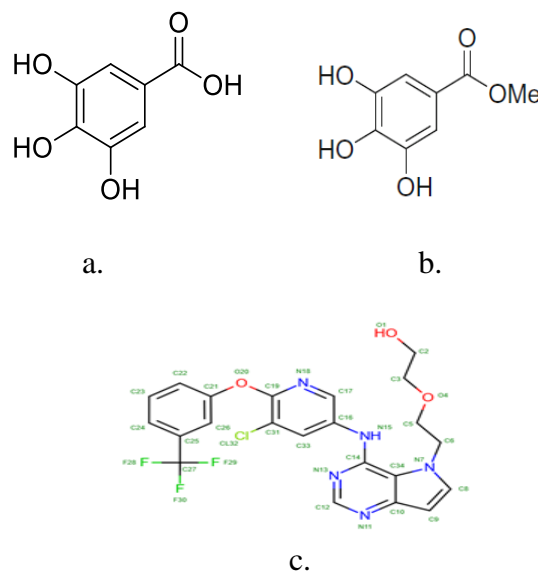
Kanker payudara menempati urutan pertama di Indonesia pada tahun 2014 dengan 48.998 kasus. World Health Organization (2019) melaporkan pada tahun 2019 jumlah penderita kanker payudara sebanyak 58.256 kasus dengan jumlah kematian sebanyak 22.692 kasus. Kematian akibat kanker sangat tinggi, dimana 92.200 perempuan Indonesia meninggal karena kanker dan 21,4% disebabkan oleh kanker payudara [1].

Pembentukan kanker payudara diawali oleh interaksi sel kanker dengan berbagai macam zat karsinogen dan terjadinya mutasi DNA menjadi abnormal karena perubahan protein [2]. Mutasi ini disebabkan oleh banyak faktor seperti paparan estrogen, gaya hidup tidak sehat, nuliparitas, menarche di bawah 12 tahun, monopause terlambat, terdapat riwayat penyakit kanker payudara, endometrium, atau kanker ovarium dan pernah terpapar sinar radiasi [2]. Jika faktor resiko tersebut tidak dikendalikan maka akan menyebabkan perkembangan sel kanker lebih cepat dan berdampak buruk pada penderita.

Human Epidermal Growth Factor-2 (HER-2) adalah protein target terapeutik kanker yang penting karena HER-2 merupakan pasangan utama aktivasi jalur sinyal HER dan di antara semua kompleks HER, HER-2 memiliki potensi mitogenik tertinggi. Selain itu, HER-2 dapat mencegah aktivasi beberapa kaskade sinyal intraselular yang dapat menyebabkan karsinogenesis[3]. Pengujian aktivitas antikanker payudara secara *in silico* dapat dilakukan terhadap protein target HER-2 (Human Epidermal Growth Factor) [4].

Beberapa penelitian mengkaji pemanfaatan metabolit sekunder tumbuhan sebagai antikanker payudara. *Mangifera casturi* mengandung metabolit sekunder yang diduga sebagai antikanker payudara. Senyawa mangiferin sebagai senyawa utama pada *Mangifera casturi* terbukti memiliki aktivitas antioksidan, immunomodulator dan anti-inflamasi [5] serta antikanker [6]. Taxifolin pada Tumbuhan kasturi juga diduga mempunyai aktivitas antikanker payudara [7]. Asam galat (asam 3,4,5-trihidroksibenzoat) merupakan salah satu senyawa fenolik yang ditemukan dalam tanaman kasturi (*Mangifera casturi*) [8]. Menurut Ekprasada et al. [9], senyawa asam galat (**Gambar 1a**) dan turunannya seperti metil galat (**Gambar 1b**) dapat berperan sebagai antioksidan karena memiliki kelebihan untuk mendonasikan proton dan sebagai inhibitor

radikal bebas. Selain sebagai antioksidan, metil galat juga memiliki kelebihan sebagai antikanker [10].



Gambar 1. Struktur kimia asam galat (a), metil galat (b), ligan alami 03Q (c)

Penelitian aktivitas metabolit tanaman memerlukan waktu panjang dan biaya mahal, maka pengembangan atau penemuan obat baru dapat dilakukan dengan cara komputasi atau *in silico* melalui kajian molecular docking [11]. Kajian docking molekular adalah penapisan senyawa berdasarkan struktur dengan bantuan computer yang dapat digunakan untuk mengkalkulasi potensi obat yang berkhasiat, contohnya sebagai antikanker payudara. Penelitian ini ingin mengkaji interaksi asam galat dan metil galat dari tumbuhan Kasturi (*Mangifera casturi*) sebagai sebagai inhibitor Protein Human Epidermal Growth Factor 2 (HER-2) secara docking molekular untuk kandidat obat antikanker payudara.

EKSPERIMEN

Alat dan bahan

Penelitian ini menggunakan perangkat keras laptop yang terkoneksi dengan internet untuk mengakses web server RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>), web server PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), web server pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/>), dan Swiss ADME (<http://www.swissadme.ch/>) dan web server SwissDock (<http://www.swissdock.ch/>) untuk proses docking. Perangkat lunak USCF Chimera 1.15 untuk preparasi protein, senyawa uji dan ligan alami

yang dapat diunduh dari (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>). Perangkat lunak Discovery Studio Visualizer untuk visualisasi interaksi residu asam amino hasil docking diunduh dari <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>.

Bahan yang digunakan adalah struktur 2D asam galat dan metil galat yang diunduh dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dengan kode PubChem CID 370 dan 7428. Struktur 3D protein Human Epidermal Growth Factor-2 (HER-2) dengan kode PDB: 3PP0 diunduh dari RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) dengan format *.pdb.

Analisis farmakokinetik

Analisis farmakokinetik senyawa asam galat dan metil galat menggunakan web server pkCSM dan SwissADME. Parameter farmokinetik yang didapatkan berupa Oral Rat Acute Toxicity (LD50), Hepatototoxicity dan Skin Sensitisation dan Bioavailability.

Preparasi ligan dan protein

Preparasi senyawa asam galat, metil galat, ligan alami dan protein HER-2 menggunakan program USCF Chimera1.15.

Docking molekular

Docking molekular menggunakan web server SwissDock. Hasil docking molekular divisualisasikan dan dianalisis menggunakan program Discovery Studio Visualizer.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Molecular docking

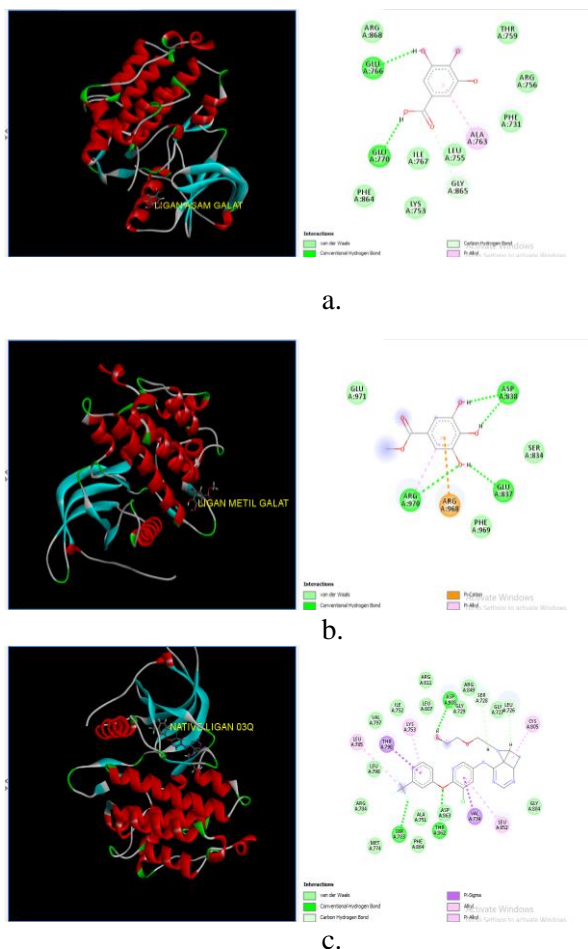
Prediksi interaksi molekular antara protein HER-2 dan senyawa ligan asam galat dan metil galat dilakukan dengan docking molekular secara online menggunakan web server SwissDock (<http://www.swissdock.ch/>). Parameter docking yang diperoleh antara lain energi bebas Gibbs (ΔG) dan interaksi ligan dan residu asam amino dari proses docking [12]. Interaksi molekular antara ligan dan reseptor meliputi interaksi elektrostatik, interaksi hidrofobik, dan ikatan hidrogen, yang juga berkontribusi terhadap nilai energi bebas Gibb (ΔG) sebagai energi ikatan [13]. **Tabel 1** adalah hasil docking molekular senyawa asam galat,

metil galat dan ligan alami dengan dengan protein target pada HER-2.

Tabel 1. Hasil docking molekular

Ligan	ΔG (kkal/mol)	Ikatan hidrogen	Ikatan hidrofobik
Asam galat	-7,00	GLU766, GLU770	ARG756, RG868, THR759, HE731, PHE864, EU755, ILE767, LYS753, GLY865, ALA763
Metil galat	-6,98	ARG970, ASP838, GLU837	GLU971, SER834, PHE969, ARG968, ARG970, VAL797, ILE752, LEU796, LEU807, ARG784, ARG811, ARG849, GLY727, GLY729, GLY804, ASP863, ALA751, PHE864, MET774, SER728, LEU726, THR798, VAL734
Ligan alami	-10,76	SER783, THR862, ASP808	VAL797, ILE752, LEU796, LEU807, ARG784, ARG811, ARG849, GLY727, GLY729, GLY804, ASP863, ALA751, PHE864, MET774, SER728, LEU726, THR798, VAL734, LEU852, LYS753, CYS805

Tabel 1 menunjukkan bahwa senyawa asam galat dan metil galat berinteraksi dengan protein HER-2 dengan nilai energi bebas Gibbs (ΔG) masing masing -7,00 kkal/mol dan -6.98 kkal/mol. Nilai ini jauh berbeda dengan ligan alami berinteraksi dengan protein HER-2 memiliki nilai energi bebas Gibbs (ΔG) = -10,76 kkal/mol. Nilai ΔG senyawa asam galat dan metil galat lebih besar dibandingkan dengan ligan alami, sehingga ligan alami relatif lebih stabil berinteraksi dengan protein HER-2 dibandingkan dengan senyawa asam galat dan metil galat. Nilai energi bebas Gibbs (ΔG) < -5,00 kkal/mol, dapat dikatakan menunjukkan berinteraksi cukup stabil [14]. Interaksi senyawa asam galat dan metil galat dengan protein HER-2 yang membentuk kompleks ligan-reseptor disebut cukup stabil. Asam galat berinteraksi dengan 12 residu asam amino pada protein HER-2, sedangkan metil galat berinteraksi dengan 26 residu asam amino. Hal ini menunjukkan bahwa metil galat lebih kuat dan lebih stabil berinteraksi dengan protein HER-2 dibandingkan asam galat.



Gambar 2. Interaksi ligan dengan HER-2: a. asam galat, b. metil galat, c. ligan alami

Asam galat berinteraksi membentuk ikatan hidrogen dengan residu asam amino GLU766 dan GLU770 pada gugus OH (**Gambar 2a**). Asam Glutamat merupakan residu asam amino ionik yang dapat memberikan kontribusi terbesar dalam penentuan nilai ΔG . Interaksi ionik merupakan interaksi intermolekul sehingga memiliki ikatan yang lebih kuat daripada ikatan polar [15]. Hal tersebut menyebabkan senyawa asam galat berinteraksi dengan protein HER-2 dengan nilai ΔG yang rendah yaitu $-7,00$ kkal/mol.

Interaksi senyawa metil galat dengan residu asam amino protein HER-2 memiliki tiga ikatan hidrogen yaitu ARG970, ASP838 dan GLU837 yang berikatan dengan sisi aktif reseptor pada gugus OH dan memiliki residu asam amino ARG968 pada Pi-Cation dan ARG970 pada Pi-Alkyl (**Gambar 2b**). Interaksi hidrofobik biasanya terdiri dari ikatan C-H, phi-sigma, phi-phi bentuk T, phi-alkil, phi-sulfur, phi-anion dan phi-kation [16]. Arginin merupakan salah satu residu dengan sifat hidrofilik yang tinggi jika dibandingkan dengan residu Asparagin. Sifat

hidrofilik pada arginin menyebabkan tingkat kestabilan interaksi antara ligan dan reseptor sehingga memiliki nilai ΔG yang rendah yaitu $-6,98$ kkal/mol. Protein HER-2 dapat menjadi target pengobatan kanker payudara dan sebagai prediktor respon kemoterapi [17]. Interaksi senyawa metil galat dengan protein HER-2 menunjukkan adanya potensi sebagai inhibitor dalam aktivitas antikanker payudara.

Ligan alami dengan kode PDB 03Q membentuk 3 ikatan hidrogen dengan residu SER783, THR862, ASP808 dan 21 interaksi hidrofobik dengan VAL797, ILE752, LEU796, LEU807, ARG784, ARG811, ARG849, GLY727, GLY729, GLY804, ASP863, ALA751, PHE864, MET774, SER728, LEU726, THR798, VAL734, LEU852, LYS753, CYS805 (**Gambar 2c**). Ligan alami adalah senyawa 2-{2-[4-({5-chloro-6-[3-(trifluoromethyl)phenoxy]pyridin-3-yl)amino]-5H-pyrrolo[3,2-d]pyrimidin-5-yl]ethoxy}ethanol (**Gambar 1c**).

Analisis Farmakokinetik

Sifat farmakokinetik senyawa asam galat dan metil galat ditentukan secara *in silico*. Web server pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>) dan SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) digunakan untuk menentukan parameter (LD-50) dengan merujuk Oral Rat Acute Toxicity, Hepatotoksik, alergi kulit dan bioavailabilitas.

Tabel 2. Analisis farmakokinetik senyawa asam galat dan metil galat

Senyawa	LD-50 (mol/Kg)	Hepatotoksisitas	Alergi kulit	Bioavailabilitas
Asam galat	2,218	No	No	0,56
Metil galat	1,898	No	No	0,55

No = tidak mempunyai sifat, Yes = mempunyai sifat

Tabel 2 menunjukkan bahwa senyawa asam galat dan metil galat tidak menimbulkan sifat alergi kulit (Skin Sensitisation). Skin sensitisation adalah efek samping oleh produk yang diaplikasikan secara dermal dan dapat menyebabkan alergi [18]. Nilai bioavailabilitas senyawa asam galat dan metil galat masing-masing sebesar 0.56 dan 0.55. Bioavailabilitas adalah kecepatan dan jumlah relatif obat untuk mencapai sirkulasi tubuh secara sistemik. Nilai bioavailability lebih dari 0,55 dikatakan baik

karena kecepatan dan jumlah relatif obat yang mencapai sirkulasi ke seluruh peredaran darah berjalan dengan baik [19]. Hepatotoksitas adalah reaksi yang disebabkan oleh akumulasi sifat obat yang berbahaya di dalam hepar [20]. **Tabel 2** menunjukkan senyawa asam galat dan metil galat tidak bersifat hepatotoksik.

Dosis Letal 50% atau LD50 adalah nilai standar tolak ukur kuantitatif yang digunakan untuk mengukur kisaran dosis letal pada uji toksitas akut obat (Jumain et al., 2018). Uji toksitas akut perlu dilakukan untuk memperoleh informasi awal sebelum menentukan kandidat senyawa obat, karena obat merupakan senyawa kimia yang belum tentu sepenuhnya aman dan bisa diterima oleh tubuh. LD50 diartikan sebagai dosis yang diperlukan untuk dapat membunuh 50% dari kelompok hewan uji [21]. Semakin besar dosis LD50 senyawa uji maka semakin rendah sifat toksitasnya, sebaliknya semakin kecil dosis LD50 senyawa uji maka semakin toksik dan berbahaya senyawa tersebut. Asam galat dan metil galat mempunyai nilai LD50 masing-masing sebesar 2,218 mol/Kg dan 1,898 mol/Kg, dengan kategori sifat cukup toksik.

SIMPULAN

Komplek metil galat-HER-2 relatif stabil dengan nilai ΔG -6,98 kkal/mol dengan 3 ikatan hidrogen dan 23 interaksi hidrofobik pada residu asam amino dibandingkan asam galat. Metil galat memiliki nilai LD50 1,898 mol/Kg termasuk cukup toksik, tidak memiliki sifat hepatotoxicity dan skin sensitisation. Metil galat dari tumbuhan kasturi (*Mangifera casturi*) berpotensi dalam aktivitas antikanker payudara melalui penghambatan protein HER-2.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada bapak Sunardi yang telah membantu menyediakan laboratorium bioinformatika untuk penelitian ini.

REFERENSI

- [1] D. Dermawan, R. Sumirtanuridin, and D. Dewantisari, "Simulasi Dinamika Molekular Reseptor Estrogen Alfa dengan Andrografolid sebagai Anti Kanker Payudara," *Indones. J. Pharm. Sci. Technol.*, vol. 6, no. 2, 2019.
- [2] Y. S. Sun et al., "Risk factors and preventions of breast cancer," *International Journal of*

Biological Sciences. 2017, doi: 10.7150/ijbs.21635.

- [3] H. Rahma Amtiria, D. Khairun, and N. Berawi, "Peran Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 pada Kanker Payudara," 2018.
- [4] M. K. Rohmah, "STUDI IN SILICO KOMPLEKS LIGAND-RESEPTOR EUGENOL DAUN BASIL (*Ocimum basilicum* L.) DENGAN RESEPTOR HER2 PADA NON-SMALL CELL LUNG CANCER (NSCLC) DENGAN KONTROL GEFITINIB," *J. Ilm. Medicam.*, vol. 3, no. 2, 2017, doi: 10.36733/medicamento.v3i2.894.
- [5] N. M. Ramírez et al., "Extraction of mangiferin and chemical characterization and sensorial analysis of teas from mangifera indica l. Leaves of the ubá variety," *Beverages*, vol. 2, no. 4, 2016, doi: 10.3390/beverages2040033.
- [6] M. Imran, M. S. Arshad, M. S. Butt, J. H. Kwon, M. U. Arshad, and M. T. Sultan, "Mangiferin: a natural miracle bioactive compound against lifestyle related disorders," *Lipids Health Dis.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–17, 2017, doi: 10.1186/s12944-017-0449-y.
- [7] R. Adawiyah and N. Komari, "Interaksi Senyawa Taxifolin dari Buah Kasturi (*Mangifera casturi*) sebagai Antikanker Payudara: Evaluasi Docking Molekular," *J. Nat. Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–6, 2021.
- [8] H. Ramadhan, D. P. Rezky, and E. F. Susiani, "Penetapan Kandungan Total Fenolik-Flavonoid pada Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Kasturi (*Mangifera casturi* Kosterman)," *J. Farm. Dan Ilmu Kefarmasian Indones.*, vol. 8, no. 1, p. 58, 2021, doi: 10.20473/jfiki.v8i12021.58-67.
- [9] M. T. Ekaprasada, H. Nurdin, S. Ibrahim, and D. Dachriyanus, "ANTIOXIDANT ACTIVITY OF METHYL GALLATE ISOLATED FROM THE LEAVES OF *Toona sureni*," *Indones. J. Chem.*, vol. 9, no. 3, pp. 457–460, 2010, doi: 10.22146/ijc.21515.
- [10] S. Khurana et al., "A macrohistone variant links dynamic chromatin compaction to

- BRCA1-dependent genome maintenance,” *Cell Rep.*, vol. 8, no. 4, pp. 1049–1062, 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.024.
- [11] Siswandono, T. Widiandani, and S. Hardjono., “Docking and Cytotoxicity Test on Human Breast Cancer Cell Line (T47d) of N-(Allylcarbamothioyl)-3-chlorobenzamide and N-(Allylcarbamothioyl)-3, 4-dichlorobenzamide,” *Res. J. Pharm. , Biol. Chem. Sci.*, vol. 8, no. 1909, pp. 1909–1914, 2017.
- [12] G. Bitencourt-Ferreira and W. F. de Azevedo, *Docking Screens for Drug Discovery*. 2019.
- [13] A. Arwansyah, L. Ambarsari, and T. I. Sumaryada, “Simulasi Docking Senyawa Kurkumin dan Analognya Sebagai Inhibitor Reseptor Androgen pada Kanker Prostat,” *Curr. Biochem.*, vol. 1, no. 1, 2014, doi: 10.29244/cb.1.1.11-19.
- [14] M. R. Sinurat, Y. Rahmayanti, and R. Rizarullah*, “Uji Aktivitas Antidiabetes Senyawa Baru Daun Yakon (*Smallanthus sonchifolius*) sebagai Inhibitor Enzim DPP-4: Studi in Silico,” *J. IPA Pembelajaran IPA*, vol. 5, no. 2, 2021, doi: 10.24815/jipi.v5i2.20068.
- [15] M. K. Rohmah, “STUDI IN SILICO KOMPLEKS LIGAND-RESEPTOR EUGENOL DAUN BASIL (*Ocimum basilicum* L.) PADA NON-SMALL CELL LUNG CANCER,” In, *Stud. Kompleks. Silico Daun, Ligand-reseptor Eugenol Ocimum, Basil Dengan, L Her, Reseptor Cell, Pada Non-small Cancer, Lung Her, L With On, Recept. Lung, Non-small Cell*, vol. 3, no. 2, pp. 71–78, 2017.
- [16] K. Faqih, “Skrining Turunan Flavonoid Sebagai Kandidat Inhibitor Protease nsP2 dari Virus Chikungunya Menggunakan Molecular Docking,” vol. 3, no. 1, pp. 34–44, 2019, doi: 10.17977/um0260v3i12019p034.
- [17] E. Wijaya, D. I. Widiputri, and D. Rahmawati, “Optimizing the antioxidant activity of Kelakai (*Stenochlaena palustris*) through multiplestage extraction process,” 2017, doi: 10.1063/1.5011891.
- [18] C. Goebel et al., “Quantitative risk assessment for skin sensitisation: Consideration of a simplified approach for hair dye ingredients,” *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 64, no. 3, 1970, doi: 10.1016/j.yrtph.2012.10.004.
- [19] J. Le, *Drug Bioavailability*, MSD manual, Professional version. 1989.
- [20] R. J. Andrade, M. Robles, A. Fernández-Castañer, S. López-Ortega, M. C. López-Vega, and M. I. Lucena, “Assessment of drug-induced hepatotoxicity in clinical practice: A challenge for gastroenterologists,” *World Journal of Gastroenterology*, vol. 13, no. 3. 2007, doi: 10.3748/wjg.v13.i3.329.
- [21] A. R. M. Syahmi et al., “Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of *elaeis guineensis* jacq., (oil palm leaf) methanol extract,” *Molecules*, 2010, doi: 10.3390/molecules15118111.