

## QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP ANALYSIS OF CURCUMIN AND ITS DERIVATIVES AS GST INHIBITORS BASED ON COMPUTATIONAL CHEMISTRY CALCULATION

*Analisis Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas Kurkumin dan Turunannya Sebagai Inhibitor GST Berdasarkan Perhitungan Kimia Komputasi*

Enade Perdana Istyastono

Lab. Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta

Sudibyo Martono

Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Harno Dwi Pranowo, Iqmal Tahir

Chemistry Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences

Gadjah Mada University, Yogyakarta

### ABSTRACT

The Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) study was established on curcumin and its derivatives as glutathione S-transferase(s) (GSTs) inhibitors using atomic net charges as the descriptors. The charges were resulted by semiempirical AM1 and PM3 quantum-chemical calculations using computational chemistry approach. The inhibition activity was expressed as the concentration that gave 50% inhibition of GSTs activity ( $IC_{50}$ ). The selection of the best QSAR equation models was determined by multiple linear regression analysis. This research was related to the nature of GSTs as multifunctional enzymes, which play an important role in the detoxification of electrophilic compounds, the process of inflammation and the effectivity of anticancer compounds.

The result showed that AM1 semiempirical method gave better descriptor for the construction of QSAR equation model than PM3 did. The best QSAR equation model was described by :

$$\log 1/IC_{50} = -2,238 - 17,326 qC_2 + 1,876 qC_4 + 9,200 qC_6$$

The equation was significant at 95% level with statistical parameters :  $n = 10$ ,  $m = 3$ ,  $r = 0,839$ ,  $SE = 0,254$ ,  $F = 4,764$ ,  $F/F_{table} = 1,001$ .

**Keywords:** QSAR analysis, curcumin, glutathione S-transferase(s) (GSTs), atomic net charge.

### PENDAHULUAN

Perkembangan kimia komputasi mengalami fase percepatan pada dekade terakhir ini. Salah satu disiplin ilmu yang sangat terbantu dengan perkembangan tersebut adalah Kimia Medisinal, terutama untuk studi Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas (HKSA) atau *Quantitative Structure-Activity Relationship* (QSAR). Hal ini sinergis dengan perkembangan penemuan obat baru yang semakin lama diharapkan semakin efektif dan efisien.

Hubungan antara struktur-aktivitas biologis tersebut dinyatakan secara matematis, sehingga sering disebut sebagai Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas (HKSA) atau *Quantitative Structure-Activity Relationship* (QSAR). Asumsi mendasar dari HKSA adalah bahwa terdapat hubungan kuantitatif antara sifat mikroskopis (struktur molekul) dan sifat makroskopis/empiris

(aktivitas biologis) dari suatu molekul [1]. Istilah struktur tidak hanya terbatas pada pengertian pengaturan ruang dan hubungan antar atom dan molekul, tetapi juga sifat fisika dan sifat kimia yang melekat pada susunan tersebut.

Senyawa-senyawa yang menjadi tren dalam perkembangan ilmu farmasi akhir-akhir ini, antara lain adalah senyawa-senyawa inhibitor glutathione S-transferase (GST). Hal ini terkait dengan sifat GST sebagai enzim multifungsional yang memainkan peranan penting dalam detoksifikasi senyawa-senyawa elektrofilik, efektivitas senyawa antikanker [2] dan proses inflamasi [3].

Kurkumin dan turunannya dilaporkan memiliki aktivitas sebagai inhibitor GST [4], namun hingga saat ini belum pernah diteliti HKSA senyawa-senyawa tersebut sebagai inhibitor GST. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian HKSA kurkumin dan turunannya sebagai inhibitor GST

guna mendesain senyawa turunan kurkumin yang optimal sebagai inhibitor GST.

Tujuan penelitian ini adalah merumuskan HKSA senyawa-senyawa turunan kurkumin sebagai inhibitor GST dan merumuskan strategi desain senyawa turunan dan analog kurkumin baru sebagai inhibitor GST.

**METODOLOGI**

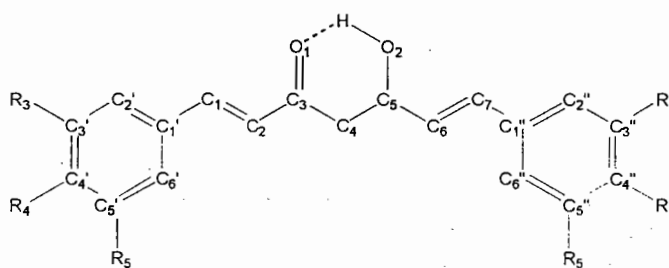
**Materi Penelitian**

Berupa data set struktur dan aktivitas kurkumin dan turunannya sebagai inhibitor GST diperoleh

dari literatur [4]. Sejumlah 10 senyawa, seperti tercantum pada gambar 1 dan tabel I.

**Peralatan**

Perangkat keras berupa satu set komputer Pentium IV 1,5 GHz dengan kapasitas memori 256 MB. Perangkat lunak paket program *Hyperchem Pro ver. 6.0* untuk melakukan perhitungan kimia kuantum dan mengeksplorasi sifat fisikokimia. Perangkat lunak *SPSS 10.0 for Windows* untuk melakukan analisis statistik.



No. Senyawa	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
1	H	H	H
2	H	OH	H
3	OCH <sub>3</sub>	OH	H
(kurkumin)			
4	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
5	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>
6	i-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	OH	i-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
7	H	OCH <sub>3</sub>	H
8	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
9	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
10	H	CH <sub>3</sub>	H

Gambar 1 Struktur kimia kurkumin dan turunannya

Tabel 1 Nama kimia dan Kode untuk kurkumin dan turunannya pada penelitian ini, serta nilai IC<sub>50</sub><sup>\*)</sup> kurkumin dan turunannya sebagai inhibitor GST<sup>\*\*)</sup>

Nomer Senyawa	Kode	Nama Kimia	IC <sub>50</sub> (µM)
1	Cur. 1	1,7-bis-(fenil)-1,6-heptadien-3,5-dion	26,5
2	Cur. 2	1,7-bis-(4'-hidroksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion	14,6
3	Cur. 3	1,7-bis-(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion	2,8
4	Cur. 4	1,7-bis-(4'-hidroksi-3',5'-dimetoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion	10,5
5	Cur. 5	1,7-bis-(4'-hidroksi-3',5'-dimetilfenil)-1,6-heptadien-3,5-dion	22,4
6	Cur. 6	1,7-bis-(4'-hidroksi-3',5'-diisopropilfenil)-1,6-heptadien-3,5-dion	27,1
7	Cur. 7	1,7-bis-(4'-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion	53,5*)
8	Cur. 8	1,7-bis-(3',5'-dimetoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion	40,4
9	Cur. 9	1,7-bis-(3',4',5'-trimetoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion	27,5
10	Cur. 10	1,7-bis-(4'-metilfenil)-1,6-heptadien-3,5-dion	51,0*)

Keterangan : \*) Merupakan hasil ekstrapolasi  
 \*\*) Konsentrasi inhibitor yang menghasilkan 50% penghambatan aktivitas GST.

**Prosedur penelitian**

**Optimasi geometri**

Masing-masing senyawa yang digunakan sebagai bahan penelitian (Tabel I) dibuat struktur dua dimensi (2D) menggunakan paket program *Hyperchem*. Selanjutnya dilakukan penambahan atom H untuk melengkapi strukturnya dan dibentuk menjadi struktur tiga dimensi (3D). Struktur yang terbentuk dioptimasi geometri menggunakan metode AM1 dan PM3 menggunakan algoritma Polak-Ribiere. Batas konvergensi ditentukan setelah tercapai gradien 0,01 kkal/Å. Struktur yang telah teroptimasi disimpan sebagai *file.hin* [5].

**Perhitungan deskriptor**

Dilakukan perhitungan *single point* pada struktur yang teroptimasi untuk memperoleh parameter-parameter elektronik ( $\sigma$ ) berupa muatan bersih atom yang terdapat pada molekul menggunakan paket program *Hyperchem* [5].

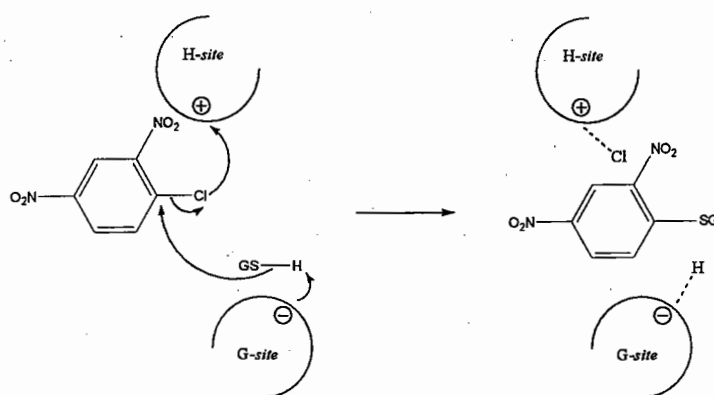
**Analisis statistik**

Masing-masing kelompok deskriptor dilakukan analisis regresi multilinear terhadap aktivitas inhibisi GST yang dinyatakan sebagai  $\log(1/IC_{50})$ . Pemilihan model persamaan terbaik dilakukan dengan mempertimbangkan parameter statistik  $r$ ,  $SE$ , dan  $F$ . Model persamaan terbaik yang diperoleh digunakan untuk memprediksi harga aktivitas inhibisi teoritis setiap senyawa.

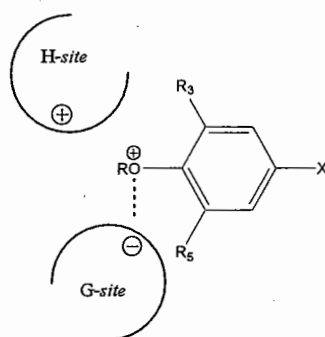
Semua senyawa dalam seri turunan kurkumin diperoleh dari literatur [4,6]. Senyawa yang diambil sebagai senyawa induk adalah 1,7-*bis*-(fenil)-1,6-heptadien-3,5-dion (Cur. 1), turunan kurkumin (Cur. 3) yang tidak memiliki substituen (Gambar 1). Nurfina [6] maupun Sudibyo [4], dalam penelitiannya menggunakan kurkumin sebagai senyawa penuntun untuk kemudian dikembangkan satu seri turunan yang diharapkan dapat mengungkap hubungan struktur-aktivitas kurkumin dan turunannya secara eksperimental kualitatif. Penelitian ini tidak menggunakan kurkumin sebagai senyawa induk tetapi menggunakan Cur. 1 sebagai senyawa induk karena senyawa tersebut merupakan struktur induk dari turunan kurkumin bahkan juga struktur induk dari kurkumin. Pemilihan ini dilakukan juga untuk menghindari *missing value* yang mungkin timbul jika digunakan kurkumin sebagai senyawa induk.

Perhitungan deskriptor harus dilakukan pada struktur yang teroptimasi. Oleh karena itu, setiap senyawa yang terlibat dalam penelitian ini dioptimasi geometri terlebih dahulu. Pemodelan molekul dilakukan dalam bentuk tautomer enol sesuai dengan hasil analisis eksperimental [6]. Dari studi mengenai tautomer keto-enol kurkumin [7], didapati bahwa entalpi pembentukan ( $\Delta H_f$ ) bentuk tautomer enol lebih rendah daripada  $\Delta H_f$  bentuk tautomer keto. Hal ini menunjukkan bahwa kurkumin sebagai tautomer enol lebih stabil daripada sebagai tautomer keto.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**



Gambar 2 Mekanisme aksi GST (Clark dkk., 1991).



Gambar 3 Usulan mekanisme aksi inhibisi GST oleh senyawa-senyawa fenolik (Istyastono dkk., 2003<sup>a</sup>).

Penelitian ini menitikberatkan muatan bersih atom sebagai deskriptor karena GST merupakan enzim yang memiliki aktivitas mendetoksifikasi senyawa-senyawa elektrofilik dalam tubuh dengan mengkatalisis reaksi konjugasi antara gugus tiol (-SH) dari glutathion (GSH) dengan pusat elektrofilik dari senyawa-senyawa elektrofilik tersebut pada sistem detoksifikasi fase II [2]. Mekanismenya melibatkan sisi H (H-site) yang bersifat asam dan sisi G (G-site) yang bersifat basa. H-site dan G-site merupakan dua sisi aktif (*active site*) pada GST. Sisi G yang bersifat basa untuk berikatan dengan proton dari glutathion dan sisi H yang bersifat asam untuk mengikat substrat. Sifat basa pada sisi G membantu deprotonasi GSH menjadi  $GS^-$  dan meningkatkan serangan nukleofil  $GS^-$  terhadap substrat. Sifat asam pada sisi H meningkatkan negativitas gugus pergi (*leaving group*) sehingga lebih mudah meninggalkan substrat (dalam hal ini 1-kloro-2,4-dinitrobenzen/CDNB) (Gambar 2) [8].

Istyastono dkk. [9] berdasar pada mekanisme aksi GST yang dipostulasikan oleh Clark dkk. (1991) dan berdasar pada analisis kualitatif struktur-aktivitas berbagai senyawa fenolik sebagai inhibitor GST, mempostulasikan mekanisme aksi inhibisi senyawa-senyawa fenolik terhadap aktivitas GST (gambar 3). Adanya atom O pada gugus -OH atau -OCH<sub>3</sub> fenolik dengan kerapatan elektron relatif rendah (elektrofil) akibat dari adanya karbonil sebagai gugus penarik elektron (*electron withdrawing group*) pada senyawa-senyawa fenolik, sehingga meningkatkan kecenderungan untuk berikatan secara dipol-dipol dengan sisi G pada GST. Hal ini diduga

menghambat aksi GST secara kompetitif dalam mengkatalisis reaksi sisi deprotonasi GSH.

Berdasarkan aktivitas GST [2] dan mekanisme aksi GST [8] serta mekanisme aksi inhibisi senyawa-senyawa fenolik terhadap aktivitas GST [7] tersirat bahwa sifat elektronik memegang peran penting dalam aktivitas turunan kurkumin sebagai inhibitor GST. Hal tersebut yang merupakan dasar pemilihan muatan bersih atom sebagai deskriptor dalam penelitian ini.

Muatan bersih atom tersebut dihitung dari struktur yang teoptimasi geometri dengan metode AM1 dan metode PM3. Muatan bersih atom hasil perhitungan dengan dengan metode AM1 disajikan pada Tabel II, sedangkan muatan bersih atom hasil perhitungan dengan dengan metode PM3 disajikan pada Tabel III. Muatan atom tersebut memiliki satuan C (*coulomb*).

Seri senyawa tersebut hanya berbeda pada substituen fenil secara simetri pada R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, dan R<sub>5</sub> cincin I dan II (Gambar 1). Berdasarkan perbedaan variabilitas (sebaran) antara muatan bersih atom pada kedua cincin dengan muatan bersih atom pada rantai tengah, maka muatan bersih atom pada rantai tengah dapat diabaikan dan tidak digunakan sebagai deskriptor pada studi HKSA ini. Hal tersebut juga sesuai dengan pernyataan Clark dkk. [8] dan Istyastono dkk. [7] mengenai peran penting cincin fenil dalam aktivitas turunan kurkumin sebagai inhibitor GST. Berdasar pada Clark dkk. [8] dan Istyastono dkk. [9] juga diketahui bahwa hanya satu cincin fenil dari senyawa-senyawa inhibitor GST yang memegang peran penting dalam dalam aktivitas turunan kurkumin sebagai inhibitor GST.

Tabel IV Model persamaan hasil analisis regresi multilinear menggunakan deskriptor atomik metode AM1

Model	Deskriptor	n	m	r	SE	F	F/F <sub>tabel</sub>
1.	qC <sub>1</sub> ; qC <sub>2</sub> ; qC <sub>3</sub> ; qC <sub>4</sub> ; qC <sub>5</sub> ; qC <sub>6</sub>	10	6	0,884	0,309	1,790	0,200
2.	qC <sub>1</sub> ; qC <sub>2</sub> ; qC <sub>3</sub> ; qC <sub>4</sub> ; qC <sub>6</sub>	10	5	0,884	0,268	2,864	0,458
3.	qC <sub>2</sub> ; qC <sub>3</sub> ; qC <sub>4</sub> ; qC <sub>6</sub>	10	4	0,883	0,240	4,446	0,856
4.	qC <sub>2</sub> ; qC <sub>4</sub> ; qC <sub>6</sub>	10	3	0,839	0,254	4,764	1,001
5.	qC <sub>2</sub> ; qC <sub>6</sub>	10	2	0,773	0,274	5,205	1,099

Keterangan : n = jumlah data; m = jumlah variabel yang masuk dalam persamaan; r = koefisien korelasi; SE = standar error, F = kriteria Fisher hasil analisis ANAVA.

Tabel V Model persamaan hasil analisis regresi multilinear menggunakan deskriptor atomik metode PM3

Model	Deskriptor	n	m	r	SE	F	F/F <sub>tabel</sub>
1.	qC <sub>1</sub> ; qC <sub>2</sub> ; qC <sub>3</sub> ; qC <sub>4</sub> ; qC <sub>5</sub> ; qC <sub>6</sub>	10	6	0,799	0,397	0,885	0,099
2.	qC <sub>1</sub> ; qC <sub>2</sub> ; qC <sub>3</sub> ; qC <sub>4</sub> ; qC <sub>6</sub>	10	5	0,782	0,357	1,262	0,202
3.	qC <sub>1</sub> ; qC <sub>3</sub> ; qC <sub>4</sub> ; qC <sub>6</sub>	10	4	0,756	0,336	1,663	0,320
4.	qC <sub>1</sub> ; qC <sub>3</sub> ; qC <sub>6</sub>	10	3	0,605	0,372	1,157	0,243
5.	qC <sub>1</sub> ; qC <sub>3</sub>	10	2	0,575	0,354	1,726	0,364
6.	qC <sub>1</sub>	10	1	0,221	0,395	0,412	0,077

Hal tersebut juga terbukti oleh korelasi (hasil uji statistik korelasi Pearson) yang sangat signifikan antara muatan bersih atom atom karbon yang merupakan bayangan cermin pada cincin fenil I dan cincin fenil II senyawa-senyawa turunan kurkumin pada penelitian ini. Hal tersebut kemudian yang menjadi dasar bahwa hanya muatan bersih atom pada satu cincin saja yang digunakan sebagai deskriptor. Hal ini juga untuk memenuhi salah satu kriteria pemilihan model "terbaik" yang dianjurkan pada studi HKSA, yaitu jumlah senyawa (data/n) yang dikorelasikan harus lebih banyak daripada jumlah variabel bebas (deskriptor) yang diperoleh [10].

Hasil analisis regresi multilinear terhadap data muatan bersih atom yang dihitung menggunakan metode AM1 dan PM3 pada aktivitas inhibitor GST yang dinyatakan sebagai log 1/IC<sub>50</sub> masing-masing tersaji pada tabel IV dan tabel V. Hasil yang tersaji merupakan hasil analisis regresi multilinear menggunakan metode *backward* dengan perangkat lunak SPSS 10.0 for Windows.

Parameter-parameter statistik hasil regresi multilinear (r, SE dan F) yang disajikan pada tabel IV dan tabel V menunjukkan bahwa model persamaan HKSA kurkumin dan turunannya sebagai inhibitor GST dengan deskriptor muatan bersih atom hasil perhitungan dengan metode AM1 lebih baik daripada dengan metode PM3. Analisis beberapa parameter statistik tersebut mengarah

pada kesimpulan bahwa model persamaan 4 menggunakan deskriptor atomik metode AM1 merupakan model "terbaik". Model tersebut merupakan satu-satunya model pada penelitian ini yang memenuhi syarat model "terbaik" menurut Kubinyi (1993).

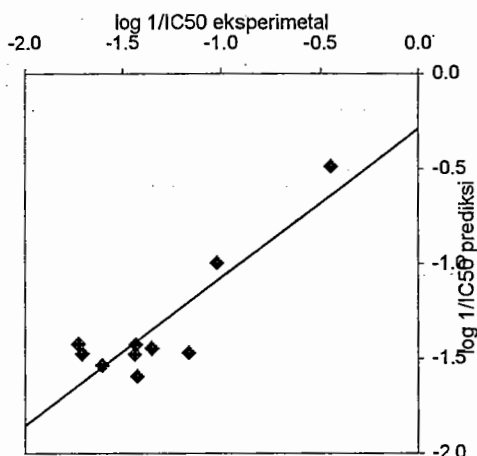
Model persamaan sedianya diuji dengan menggunakan metode validasi silang *leave-one-out* untuk mendapat adalah model persamaan yang memiliki nilai *predicted residual sum of squares* (PRESS) dan standar error prediksi (SEP) minimal. Namun karena model persamaan yang memenuhi syarat sebagai model "terbaik" menurut Kubinyi (1993) hanya satu yaitu model persamaan 4 metode AM1, maka dapat dipastikan bahwa model tersebut memiliki nilai PRESS dan SEP yang paling minimal diantara model yang memenuhi syarat. Secara lengkap, model persamaan HKSA model tersebut adalah sebagai berikut:

$$\log 1/IC_{50} = -2,238 - 17,326 qC_2 + 1,876 qC_4 + 9,200 qC_6 \quad (i)$$

Persamaan tersebut digunakan untuk menghitung harga aktivitas sebagai inhibitor GST (log 1/IC<sub>50</sub>)<sub>prediksi</sub> dari masing-masing senyawa. Hasil perhitungan disajikan pada tabel VI, sedangkan *plot* antara aktivitas sebagai inhibitor GST eksperimental dan prediksi disajikan pada gambar 11. Dari gambar 11, persamaan regresi yang terbentuk dari *plot* tersebut adalah sebagai berikut :

Tabel VI Harga aktivitas sebagai inhibitor GST  $(\log 1/IC_{50})_{\text{eksperimental}}$  dan harga aktivitas sebagai inhibitor GST  $(\log 1/IC_{50})_{\text{prediksi}}$  menggunakan model 4 (AM1).

Senyawa	$(\log 1/IC_{50})_{\text{eksperimental}}$	$(\log 1/IC_{50})_{\text{prediksi}}$	selisih
Cur. 1	-1,423	-1,599	0,175
Cur. 2	-1,164	-1,585	0,421
Cur. 3	-0,447	-0,582	0,134
Cur. 4	-1,021	-0,987	-0,034
Cur. 5	-1,350	-1,349	-0,002
Cur. 6	-1,433	-1,330	-0,103
Cur. 7	-1,728	-1,548	-0,180
Cur. 8	-1,606	-1,330	-0,276
Cur. 9	-1,439	-1,499	0,059
Cur. 10	-1,708	-1,514	-0,194



Gambar 4 Plot antara  $(\log 1/IC_{50})_{\text{eksperimental}}$  dan  $(\log 1/IC_{50})_{\text{prediksi}}$  dari model 4 (AM1).

$$(\log 1/IC_{50})_{\text{prediksi}} = -0,393 + 0,705 (\log 1/IC_{50})_{\text{eksperimental}} \quad (ii)$$

Berdasarkan persamaan (i), senyawa dikatakan semakin aktif sebagai inhibitor GST apabila harga variabel tidak bebas berupa  $\log 1/IC_{50}$  semakin tinggi atau harga  $IC_{50}$  semakin rendah. Hal tersebut dapat dipenuhi oleh suatu senyawa turunan atau analog kurkumin yang memiliki muatan bersih atom pada  $C_2$  semakin negatif (harga muatan bersih atom  $C_2$  semakin kecil) dan/atau muatan bersih atom pada  $C_4$  dan  $C_6$  semakin positif (harga muatan bersih atom  $C_4$  dan  $C_6$  semakin besar).

**KESIMPULAN**

1. Metode AM1 menghasilkan deskriptor yang lebih baik dalam pembangunan model persamaan HKSA kurkumin dan turunannya sebagai inhibitor GST daripada metode PM3.
2. Hubungan kuantitatif antara muatan bersih atom pada atom-atom cincin senyawa 1,7-bis-(fenil)-1,6-heptadien-3,5-dion (Cur. 1/senyawa induk) sebagai gambaran struktur elektronik menunjukkan signifikansi hubungan dengan aktivitas senyawa sebagai inhibitor GST, mengikuti persamaan :  

$$\log 1/IC_{50} = -2,238 - 17,326 qC_2 + 1,876 qC_4 + 9,200 qC_6$$

Persamaan signifikan pada tingkat kepercayaan 95% dengan parameter statistik :  $n = 10$ ,  $m = 3$ ,  $r = 0,839$ ,  $SE = 0,254$ ,  $F = 4,764$ ,  $F/F_{tabel} = 1,001$ .

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Diucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian Universitas Sanata Dharma yang telah membiayai penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Lee, K.W., Kwon, S.Y., Hwang, S., Lee, J.U., and Kim, H., 1996, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 17, 147-152.
2. Van der Aar, E. M., Tan, K. T., Commandeur, J. N. M., and Vermeulen N. P. E., 1998, *Drug Metab. Rev.*, 30 (3), 569-643.
3. Ujihara, M., Tsuchida, S., Satoh, K., Sato, H., and Urade, Y., 1988, *Archs. Biochem. Biophys.*, 264, 428-437.
4. Sudibyo, M., 2000, *Inhibition of glutathione S-transferase by curcumin and its derivatives, Molecular mechanisms and qualitative structure-activity relationships*, Ph.D Thesis, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia.
5. Sudarmanto, B.S.A., 2002, *Analisis hubungan kuantitatif struktur-aktivitas seri senyawa analog urkumin sebagai antioksidan menggunakan descriptor berdasarkan perhitungan kimia kuantum*, Tesis, Fakultas MIPA, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
6. Nurfina, A., 1994, *The synthesis of some symmetrical curcumin derivatives and the study of their anti-inflammatory activities as well as structure-activity relationships*, Ph.D. Thesis, Gadjah Mada University, Yogyakarta.
7. Istyastono, E.P., Sudibyo, M., dan Supardjan, A.M., 2003, 2003, *Prosiding Seminar Ilmiah Nasional: "Penelitian Farmasi Masa Mendatang Berdasarkan Diversitas Hayati Indonesia"*, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.
8. Clark, A.G., Hamilton, J.F., and Marshall, S.N., 1991, *Biochem. J.*, 278, 193-198.
9. Istyastono, E.P., Supardjan, A.M., dan Pranowo, H.D., 2003, *Majalah Farmasi Indonesia*, 14 (3), In Press.
10. Kubinyi, H., 1993, *QSAR : Hansch analysis and related approaches*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.