

Artikel Penelitian

Stabilitas Kompleks Asam Amino Esensial Pengangkut Serotonin dengan Senyawa *Curcumin* dan *Demethoxycurcumin* sebagai Kandidat Antidepresan Berdasarkan Uji *In Silico*

Farach Khanifah^{1*}, Evi Puspitas Sari¹, Gerry Nugraha²

¹Teknologi Laboratorium Medis, Institut Teknologi Sains dan Kesehatan Insan Cendekia Medika Jombang

²Farmasi, Stikes Aisyiyah Pelembang

^{*}E-mail: farach.khanifah@gmail.com

Diterima : Desember 2023

Disetujui : Januari 2024

ABSTRAK

Depresi merupakan keadaan masalah mental yang lazim di alami oleh semua masyarakat salah satunya remaja, diperkirakan 10-20% remaja di dunia mengalami masalah kesehatan mental. Kunyit dengan dosis 560mg/KgBB menunjukkan efektif sebagai antidepresan pada tikus wistar rat (*rattus norvegicus*). Komputer menawarkan metode uji in silico sebagai komplemen metode *in vitro* dan *in vivo* yang lazim digunakan dalam proses penemuan pengembangan aktivitas biologis senyawa kimia atau bahan alam sebagai kandidat obat. Hasil penelitian diketahui simulasi MD pada kompleks protein pengangkut serotonin dengan ligan Demetoxycurcumin lebih stabil dibanding curcumin dan fluvoxamin. Hasil identifikasi determinan dinamika molekul penambatan dengan ligan *native* adalah asam amino SER336 dan ligan referensi adalah asam amino SER438.

Kata kunci: Curcumin, Demetoxycurcumin, SER438, Antidepresan.

Stability of Serotonin Transporter Essential Amino Acid Complex with *Curcumin* and *Demethoxycurcumin* Compounds as Antidepressant Candidates Based on In Silico Test

ABSTRACT

A Depression is a mental problem that is common in all communities, including teenagers. It is estimated that 10-20% of teenagers in the world experience mental health problems. Turmeric at a dose of 560mg/KgBW was shown to be effective as an antidepressant in Wistar rats (*rattus norvegicus*). Computers offer in silico test methods as a complement to in vitro and in vivo methods which are commonly used in the process of discovering and developing the biological activity of chemical compounds or natural materials as drug candidates. The research results show that MD simulations on the serotonin transporter complex protein with the ligand Demethoxycurcumin are more stable than curcumin and fluvoxamine. The results of identifying the molecular dynamics determinant of binding with the native ligand are amino acid SER336 and the reference ligand is amino acid SER438.

Keywords: Curcumin, Demetoxycurcumin, SER438, Antidepressant.

1. PENDAHULUAN

Depresi merupakan keadaan masalah mental yang lazim di alami oleh semua masyarakat salah satunya remaja, diperkirakan 10-20% remaja di dunia mengalami masalah kesehatan mental (1). Depresi pada individu lanjut usia di atas 55 tahun mencakup gejala emosional, kognitif, somatik, perseptual, dan perilaku yang tidak kondusif menunjukkan sindrom depresi sebanyak 14% (2). Indonesia merupakan Negara berkembang dengan data prevalensi gangguan mental emosional pada usia remaja dan lanjut usia sebanyak 6%. Mayoritas masyarakat Indonesia menggunakan tanaman dan bahan alam

sebagai bahan pengobatan sehingga perlu dilakukan pemilihan bahan alam yang memiliki senyawa aktif sebagai antidepresan dan perlu diketahui mekanisme farmakologinya. Hal tersebut dikarenakan adanya ketersediaan bahan alam yang sering digunakan sebagai obat. Salah satu bahan alam yang dapat digunakan adalah kunyit karena kunyit (*Curcuma Longa*) memiliki senyawa metabolit skunder yang memiliki bioaktivitas (3). Kunyit dengan dosis 560mg/KgBB menunjukkan efektif sebagai antidepresan pada tikus wistar rat (*rattus norvegicus*) (4). Penggunaan obat antidepresan seperti *selective serotonin reuptake*

inhibitors (SSRIs), antidepresan trisiklik (TCAs), dan *Monoamine oxidase inhibitors* (MAOIs) memiliki efek samping dan dapat menimbulkan ketergantungan. Hampir 30% pasien depresi tidak memberikan respon terhadap terapi obat dan 70% pasien gagal mencapai kesembuhan total (5). Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa terdapat tujuh belas senyawa fenolik yang berasal dari isolat kunyit (6), namun hanya tiga isolat kunyit memiliki aktivitas biologis sebagai antioksidan adalah toluene, 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, curcumin, dan demethoxycurcumin dengan nilai IC_{50} masing-masing 0.5, 0.8, 0.7 GAE/100mg (7). Aktivitas biologis senyawa sebagai antioksidan dapat dijadikan marker antidepresan karena mekanisme antioksidan dapat mendasari efek neuroprotektif antidepresan (8).

Komputer menawarkan metode uji *in silico* sebagai komplemen metode *in vitro* dan *in vivo* yang lazim digunakan dalam proses penemuan pengembangan aktivitas biologis senyawa kimia atau bahan alam sebagai kandidat obat (9). Fluvoxamin merupakan salah satu obat antidepresan karena dapat meningkatkan kadar serotonin (5-HT). Mekanisme peningkatan 5-HT pada presinaptik diperlukan asam amino pengangkut. 6AWP merupakan kode asam amino pengangkut 5-HT pada senyawa fluvoxamine dengan sumber dari protein data bank. Penelitian kunyit sebagai antidepresan dengan menggunakan uji *in silico* dilaporkan menghambat kerja enzim MAOA (10) namun kestabilan asam esensial pengangkut serotonin dengan senyawa curcumin dan demethoxycurcumin sebagai kandidat antidepresan yang terlibat belum diungkapkan, sehingga tujuan dalam penelitian ini adalah “apakah stabil asam amino esensial pengangkut serotonin dengan senyawa curcumin dan demethoxycurcumin sebagai kandidat antidepresan berdasarkan uji *in silico*?”.

2. METODE PENELITIAN

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksploratif deskriptif, dengan menggunakan rancangan penelitian menggunakan pendekatan teoritis berbasis komputer (*in silico*), yang bersifat prediktif. Pendekatan ini melalui simulasi molekular, berupa penapisan data sel molekular dari senyawa model, dapat dijadikan proses yang efektif dalam mendesain obat. Uji *in silico* menjadi sangat penting dalam bidang ilmu Kimia Medisinal, digunakan untuk merancang, menemukan dan

optimasi senyawa bioaktif dalam proses pengembangan obat. Penelitian ini menggunakan curcumin dan demethoxycurcumin sebagai ligan referensi. Rumus Kimia dari curcumin $C_{21}H_{20}O_6$ dengan PubChem ID 969516 dan rumus kimia demethoxycurcumin $C_{20}H_{18}O_5$. Reseptor yang digunakan dengan pdb.id 6AWP. Docking dilakukan dengan menggunakan metode LGA Autodock.

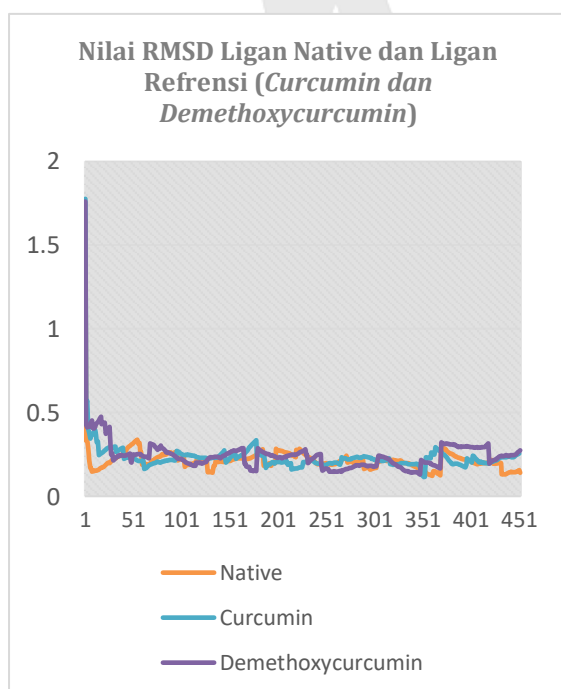
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui stabilitas kompleks protein transpor serotonin dengan ligan referensi curcumin dan demethoxycurcumin dan dibandingkan dengan ligan nativ. Fluvoxamin merupakan ligan nativ yang berasal dari reseptor 6AWP. Curcumin dan demethoxycurcumin merupakan senyawa isolat dari kunyit (*Curcuma Longa Inn*) yang digunakan sebagai ligan referensi. Ligan referensi sangat berguna untuk mendefinisikan kantung ikatan (*binding pocket*). Simulasi MD digunakan dengan menggunakan metode LGA Autodock karena memiliki kelebihan salah satunya memperhatikan medan gaya saat simulasi MD dilakukan. Berdasarkan Tabel 1 menunjukkan bahwa nilai RMSD ligan native (fluvoxamine) dengan menggunakan metode Autodock LGA lebih kecil dibanding dengan metode Autodock VINA. Hal tersebut sejalan oleh penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa metode Autodock LGA lebih direkomendasikan (16).

Stabilitas kompleks protein didasarkan: (i) nilai RMSD dan (ii) determinan molekuler yang berperan penting dalam stabilitas kompleks protein. Reseptor 6AWP diunduh dari bank data protein, sebagai reseptor target karena memiliki ligan referensi dan syarat ini sangat penting dalam konstruksi PVBS (17). Sehingga setelah mengetahui reseptor target maka dilakukan penambatan reseptor tanpa ligan, penambatan reseptor Nativ dan penambatan reseptor referensi. Penelitian menggunakan pengaturan medan gaya AMBER14 pH 7,4 suhu 298K tekanan 1bar dan dijalankan dengan perintah `md_runmembrane.mcr`. Setelah target reseptor ditemukan, maka dilakukan proses penambatan molekul. penambatan molekul dilakukan pada 3 kondisi, (i) docking reseptor tanpa ligan, (ii), native reseptor docking, dan (iii) dengan ligan referensi berupa senyawa curcumin dan demethoxycurcumin.

Tabel 1. Nilai RMSD dengan perbandingan metode LGA Autock dan Autodock VINA

Docking Ke-	VINA	AutoDockLGA
1	1.9899	1.5164
2	5.4861	1.5821
3	1.9198	1.675
4	1.5865	1.7282
5	5.5276	1.8319
6	5.6463	1.8352
7	5.5147	1.8527
8	1.6795	1.8775
9	1.5751	1.8946
10	1.8663	1.8974
11	5.5405	1.8994
12	5.525	1.9019
13	1.6138	1.9249
14	1.9034	1.9347
15	5.5777	1.9361
16	5.6962	1.9414
17	1.76	1.9743
18	1.8552	1.9803
19	1.7692	1.9808
20	5.7522	1.9897
Rata-rata	3.48925	1.857725



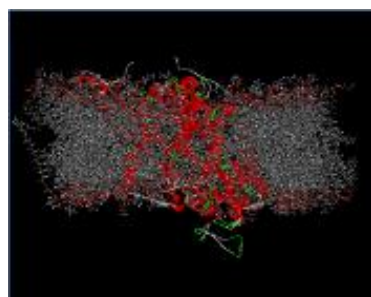
Gambar 1. Nilai RMSD Ligan Native dan Ligan Refrensi (Curcumin dan Demethoxycurcumin)

MD dilakukan pada ligan curcumin dan ligan demethoxycurcumin dengan nilai RMSD < 2Å

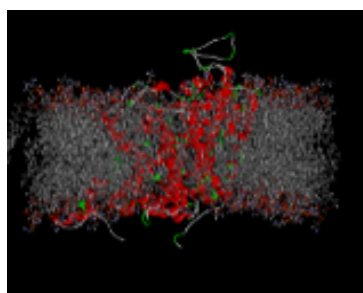
selama 50ns dan berdasarkan gambar 1 diketahui bahwa tidak ada lonjakan yang signifikan sebelum 2Å, artinya hasil dinamik telah mencapai kesetimbangan. Stabilitas MD juga dapat dilihat berdasarkan nilai RMSD, dan nilai RMSD $\leq 2\text{\AA}$ selama 2 ns, menunjukkan ikatan protein yang stabil (18). Pemilihan durasi lama MD didasarkan pada penelitian Istyastono dan Riswanto (19) bahwa analisis kompleks stabilitas protein dilakukan setiap 50 ns untuk menghasilkan 500 snapshot atau jepretan. Berdasarkan gambar 1 dapat dilihat nilai RMSD tertinggi pada ligan nativ, senyawa curcumin dan demethoxycurcumin masing-masing 1.65006Å, 1.77558Å, 1.75974Å.

Energi ikatan Gibbs (ΔG) yang merupakan parameter kestabilan konformasi antara ligan dengan reseptor. ligan-reseptor yang saling berinteraksi akan cenderung berada pada kondisi energi yang paling rendah, kondisi tersebut menyebabkan molekul akan berada pada keadaan yang stabil sehingga semakin kecil harga ΔG interaksi ligan dengan reseptor akan semakin stabil. Interaksi molekul pada Ligan-reseptor mencakup interaksi elektrostatik, interaksi hidrofobik, dan ikatan hidrogen yang berkontribusi pada harga ΔG dari ligan-reseptor (20) sehingga dapat menunjukkan bahwa konformasi ligan dengan reseptor sudah stabil. Berdasarkan hasil MD didapatkan ΔG ligan nativ, ligan curcumin dan ligan demethoxycurcumin masing-masing sebesar -11.6850 kJ/mol -14.1250 kJ/mol dan -14.1680 kJ/mol. Energi ikatan dari perhitungan *binding energy* menggunakan YASARA dan ubuntu dengan perintah `BE_native grep 001 *.log > grep_log`. Energi terendah dan *snapshot* terbaik dapat diketahui dengan menggunakan perintah `BE_nativ$ grep 11.6850 *.log`. Jepretan terbaik dengan energi terendah kemudian digunakan sebagai target pengikatan molekul ligan sebanyak 1000 kali menggunakan macro `dock_run_1000.mcr`. Protokol ini bertujuan untuk mengetahui kestabilan ligan pada reseptor. Peneliti sebelumnya melaporkan bahwa penambatan molekul bersifat stokastik sehingga disarankan penambatan ulang lebih dari satu kali, untuk mengurangi ketidakstabilan ligan dalam reseptor maka dapat dilakukan 1000 kali penambatan (21). Hasil menunjukkan pada *snapshot* 218.pdb. Energi ikat ligan referensi *curcumin* -14.1250 KJ/mol pada jepretan 223.pdb. Energi ikat ligan referensi *demethoxycurcumin* 220.pdb, *Snapshot* terbaik dipilih dengan nilai energi paling rendah diantara pose lainnya. Secara

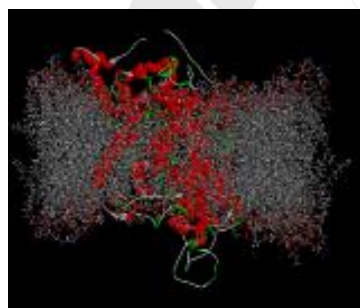
termodinamika, interaksi reseptor-ligan terbaik terjadi jika kompleks yang dihasilkan memiliki energi potensial yang lebih rendah (22).



(a) Ligan Native (SER336)



(b) Ligan Curcumin (SER438)



(c) Ligan demethoxycurcumin (SER 438)

Gambar 2. Snapshot Terbaik dari Berbagai Ligan

Docking ligan uji dilakukan untuk menghasilkan nilai binding energi dalam satuan kkal/mol. Nilai *binding energy* yang digunakan adalah yang memperoleh nilai semakin minus. Residu asam amino yang terlibat pada ligan nativ dengan BE 8.34 kkal/mol adalah Tyr95, Ala96, Asn177, Ser336, Ser 438. Residu asam amino yang terlibat pada ligan refrensi curcumin dengan BE 9.56 kkal/mol adalah Ala96, Tyr175, Ser336, Ser438. Residu asam amino yang terlibat pada ligan refrensi demethoxycurcumin dengan BE 10.59 kkal/mol. adalah Ala96, Tyr175, Ser336, Ser438. Pemilihan residu asam amino yang terlibat dapat dibandingkan dengan menggunakan data yang berasal dari uniprot. Uniprot dapat digunakan untuk mengetahui fungsi biologis protein yang diperoleh dari beberapa penelitian berdasarkan pada interaksi

protein terhadap aktivitas biologis. Hal tersebut digunakan untuk mengidentifikasi lebih lanjut terkait komponen aktif dan protein target (23).

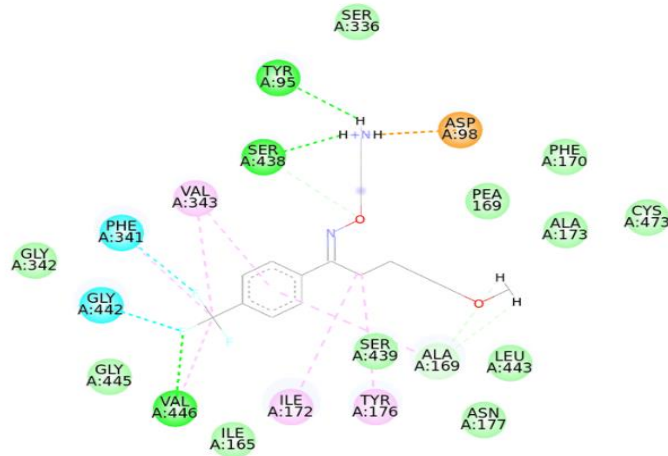
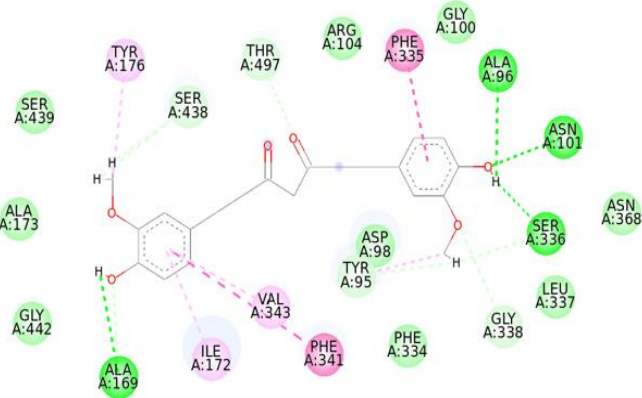
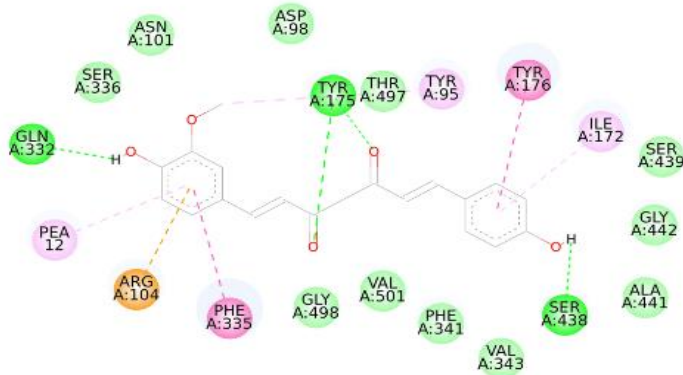
Identifikasi determinan molekul berperan penting pada stabilitas kompleks yang terjadi dilakukan dengan bantuan perangkat lunak Biovia Discovery Studio Visualizer terhadap hasil simulasi dinamika molekul (24). Perbandingan asam amino vital dapat dilihat tabel 1. Hubungan struktur dengan aktivitas dapat dilihat dari jenis ikatan yang terbentuk. Ikatan hidrogen merupakan ikatan yang kuat dibandingkan dengan ikatan Van der Waals. Hal ini disebabkan karena ikatan hidrogen dapat terbentuk meskipun jarak antara ligan dan reseptor cukup jauh (25). Interaksi hidrofobik juga berperan dalam menentukan stabilitas ligan terhadap reseptor. Pembentukan ikatan hidrofobik meminimalkan interaksi residu nonpolar dengan air (26). Apabila kapasitas hidrogen semakin tinggi, maka energi yang dibutuhkan untuk proses absorpsi semakin tinggi pula. Aturan lipinski digunakan untuk mempertimbangkan senyawa aktif yang dapat disarankan sebagai penemuan obat (27). Berdasarkan tabel 1 diketahui bahwa hasil identifikasi determinan MD penambatan dengan ligan native adalah asam amino SER336 jenis ikatan hidrogen dan penambatan molekul dengan ligan referensi adalah asam amino SER438, jenis ikatan hidrogen. Hal tersebut relevan dengan penelitian sebelum yang melaporkan bahwa asam amino esensial pada protein pengangkut serotonin (6AWP) adalah SER336 (28).

Penelitian lain menyebutkan asam amino esensial transporter serotonin adalah Ser438/Thr439/Ala169/Ile172/Ala173 (29). Hasil penelitian ini melaporkan bahwa coklat (*Theobroma cacao*) disinyalir memiliki aktivitas terhadap reseptor, dilihat dari terbentuknya beberapa ikatan dengan asam amino vital atau esensial.

Berdasarkan hasil penelitian diketahui simulasi MD pada kompleks protein pengangkut serotonin dengan ligan Demetoxycurcumin lebih stabil dibanding curcumin dan fluvoxamin. Hasil identifikasi determinan dinamika molekul penambatan dengan ligan native adalah asam amino SER336 dan ligan referensi adalah asam amino SER438, jenis ikatan masing-masing adalah ikatan hidrogen (*H-bond acceptor*).

Pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan simulasi MD dilakukan dengan pengaturan Medan Gaya AMBER14 pH 7,4 suhu 300 K tekanan 1barr.

Tabel 1 Identifikasi determinan menggunakan Biovia Discovery Studio Visualizer v21.1.0.20298

Jenis Ligan	Interaksi Reseptor Ligan
Ligan Nativ (fluvoxamine)	
Curcumin	
Demethoxycurcumin	

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian diketahui simulasi MD pada kompleks protein pengangkut serotonin dengan ligan 6AWP. Hasil identifikasi determinan dinamika molekul penambatan dengan ligan native adalah asam amino SER336 dan ligan

referensi adalah asam amino SER438, jenis ikatan yang paling berpengaruh adalah ikatan hidrogen (H-bond acceptor). Pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan simulasi MD dilakukan dengan pengaturan Medan Gaya AMBER14 pH 7,4 suhu 310 K tekanan 1barr.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih diucapkan kepada Laboratorium Komputasi Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta sebagai mitra. Hibah PDP Tahun Anggaran 2023 Kementerian Ristek Dikti. Program Studi DIII Teknologi Laboratorium Medis Fakultas Vokasi Institut Teknologi Sains dan Kesehatan Insan Cendekia Medika Jombang.

6. PENDANAAN

Penelitian ini didanai oleh Hibah PDP Tahun Anggaran 2023 Kementerian Ristek Dikti.

6. KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan tidak terdapat potensi konflik kepentingan dengan penelitian, kepenulisan (*authorship*), dan atau publikasi artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sulistyorini, W., & Sabarisman, M. (2017). Depresi: Suatu tinjauan psikologis. *Jurnal Sosio Informa* 3(2).
2. World Health Organization. (2005). *Nutrition in Adolescence-Issues and Challenges for Health Sector: Issues in Adolescent Health and Development*. Geneva: World Health Organization.
3. Faryadian S, Sydmohammadi A, Khosravi A, Kashiri M, Faryadayn P, Abasi N. (2014). Aqueous Extract of Echium Amoneum Elevate CSF Serotonin and Dopamin Level in Depression Rate. *Biomedical & Pharmacology Journal* 7 (1), 137-142.
4. Yu, C., Garcia-Olivares, J., Candler, S., Schwabe, S., & Maletic, V. (2020). New insights into the mechanism of action of viloxazine: serotonin and norepinephrine modulating properties. *Journal of Experimental Pharmacology*, 12, 285.
5. Kulkarni, R. R., & Kulkarni, P. R. (2013). Linezolid-induced near-fatal serotonin syndrome during escitalopram therapy: case report and review of literature. *Indian Journal of Psychological Medicine*, 35(4), 413-416.
6. Khanifah, F., Sari, E. P., & Susanto, A. (2021). Efektivitas kombinasi ekstrak etanol kunyit (*Curcuma longa* linn.) dan coklat (*Theobroma cacao*) sebagai kandidat antidepresan pada tikus putih (*rattus norvegicus*) galur wistar. *Jurnal Wiyata: Penelitian Sains dan Kesehatan*. 8(2), 103-110.
7. Scholey, A., & Owen, L. (2013). Effects of chocolate on cognitive function and mood: A systematic review. *Nutrition Reviews* 71(10), 665-681.
8. Herraiz, T. (2000). Tetrahydro- β -carbolines, potential neuroactive alkaloids, in chocolate and cocoa. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(10), 4900- 4904.
9. Istyastono, E. P. (2020). *Rancangan Obat dan Penapisan Virtual Berbasis Struktur*. Sanata Dharma University Press.
10. Jenwitheesuk, E. H. (2008). Novel Paradigms for Drug Discovery Computational multitarget screening. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29, 62-71.
11. Mahar, I., Bambico, F. R., Mechawar, N., & Nobrega, J. N. (2014). Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 38, 173-192.
12. Grahame-Smith, D. G. (1967). The biosynthesis of 5-hydroxytryptamine in brain. *Biochemical Journal*, 105(1), 351-360.
13. Pradnyawati, Ni Putu W., Sucandra, I made K. (2017). *Neurofisiologi. Bagian Anestesi Dan Terapi Intensif* Rsup Sanglah Denpasar/ Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.
14. Basak, S., Gicheru, Y., Kapoor, A., Mayer, M. L., Filizola, M., & Chakrapani, S. (2019). Molecular mechanism of setron-mediated inhibition of full-length 5-HT_{3A} receptor. *nature communications*, 10(1), 1-11.
15. Susilawati, A., Ratep, N., & Putera, K. (2014). Depresi pasca-stroke: diagnosis dan tatalaksana. *cermin dunia kedokteran*, 41(12), 901-905.
16. Chan, H. N., Fam, J., & Ng, B. Y. (2009). Use of antidepressants in the treatment of chronic pain. *Annals Academy of Medicine Singapore*, 38(11), 974.
17. Adelina, R. (2013). Kajian tanaman obat Indonesia yang berpotensi sebagai antidepresan. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 9-18.
18. Coleman, J. A., & Gouaux, E. (2018). Structural basis for recognition of diverse antidepressants by the human serotonin transporter. *Nature structural & molecular biology*, 25(2), 170-175.
19. Istyastono, E. P., Yuniarti, N., Prasasty, V. D., & Mungkasi, S. (2021). PyPLIF HIPPOS-Assisted Prediction of Molecular Determinants of Ligand Binding to Receptors. *Molecules*, 26(9), 2452.
20. Riandono, F. D., & Istyastono, E. P. (2022). Identifikasi Determinan Molekul Interaksi STK630921 pada Interleukin-17A. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 9(1), 57-63.
21. Istyastono, E. P., (2012). Construction and optimization of structure-based virtual screening protocols to identify cyclooxygenase-1 inhibitors using open babel, spores and plants. *Indones. J. Chem.* Vol 12, No 2, doi:10.22146/ijc.21354.
22. Istyastono, Enade perdana. Riswanto florentinus dika octa. (2022). *Molecular dynamics simulations*

- of the caffeic acid interactions to dipeptidyl peptidase iv. *International journal of applied pharmaceutics* vol 14, issue 4, 2022, 274-278
23. Nugraha, G. Istyastono, E. 2021. Virtual Target Construction For Structure-Based Screening In The Discovery Of Histamine H₂ Receptor Ligands. *International Journal Applied Pharmaceutics*, Vol 13, Issue 3, 2021, 239-241.
24. Nugraha, h. D. Pranowo, m. Mudasir, and e. P. Istyastono, "Virtual Target Construction For Discovery Of Human Histamine H₄ Receptor Ligands Employing A Structure-Based Virtual Screening Approach", *int j app pharm*, vol. 14, no. 4, pp. 213–218, jul. 2022.
25. Istyastono, E. P., (2021). *Secangkir Kopi dan Penemuan Obat Diabetes*. Sanata Dharma University Press. Yogyakarta.
26. Bulusu, G., & Desiraju, G. R. (2020). Strong and weak hydrogen bonds in protein– ligand recognition. *Journal of the Indian Institute of Science*, 100, 31-41.
27. Escobar, L., & Ballester, P. (2021). Molecular recognition in water using macrocyclic synthetic receptors. *Chemical Reviews*, 121(4), 2445-2514.
28. Lipinski, C. A., F. Lombardo, B. W. Dominy, dan P. J. Feeney. (2012).
29. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 64(1-3): 4-17.
30. Chan, M. C., Selvam, B., Young, H. J., Procko, E., & Shukla, D. (2022). The Substrate Import Mechanism Of The Human Serotonin Transporter. *Biophysical journal*, 121(5), 715-730.