

# AKTIVITAS ANTINOCICEPTIV DAN UJI *IN SILICO* TERHADAP *CYCLOOXYGENASE* DARI ASAM *P*-METOKSISINAMAT DAN ASAM *M*-METOKSISINAMAT

JUNI EKOWATI, NUZUL W. DIYAH

Departement of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy,

Airlangga University, Jl. Dharmawangsa Dalam, Surabaya

e-mail : j\_ekowati@yahoo.com

## ABSTRACT

The object of this study was to prove antinociceptive activity of *p*-methoxycinnamic acid and *m*-methoxycinnamic acid by writhing test method and their *in silico* test againts cyclooxygenase (COX-1 PDB ID = 1PTH; COX-2 PDB ID = 1CX2) using Molegro computer programme ver 5.5. The results showed that both of test compounds have antinociceptive activity which are dose dependent. The antinociceptive potential of the both compounds are higher than acetyl salicylic acid. The results of *in silico* test showed affinity of APMS and AMMS against COX-1 and COX-2 are better than acetyl salicylic acid.

**Keywords** : *p*-methoxycinnamic acid, *m*-methoxycinnamic acid, writhing test, antinociceptive, cyclooxygenase

## PENDAHULUAN

Struktur senyawa obat dapat mempengaruhi aktivitas biologis karena sifat fisiko kimia yang berbeda-beda. Contohnya asam *o*-hidroksibenzoat dan asam *p*-hidroksibenzoat memiliki aktivitas yang berbeda karena letak gugus -OH yang berbeda pada inti aromatis. Bentuk tiga dimensi struktur obat tersebut juga akan mem-pengaruhi interaksi obat-reseptor. Hal ini disebabkan perbedaan reaktivitas kimia, ukuran, bentuk, stereokimia dan distribusi gugus fungsi akan mempengaruhi resonansi maupun efek induksinya dalam hubungan ikatan dengan reseptor (Patrick G., 2009).

Ekowati *et al.* (2005) telah melakukan sintesis dua derivat asam metok-sisinamat (posisi *meta*- dan *para*-) melalui reaksi Knoevenagel. Asam *o*-metoksisi-namat (AOMS) telah dilaporkan memiliki aktivitas analgesik lebih baik daripada asam asetil salisilat (Ekowati *et al.*, 2010). Derivat asam sinamat yang lain, yaitu etil *p*-metoksisinamat (EPMS) dilaporkan memiliki aktivitas analgesik anti infla-masi dengan mekanisme kerja secara non selektif menghambat COX-1/2 (Ridtidid *et al.*, 2008; Umar *et al.*, 2012). Oleh karena itu pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas analgesik dari asam *p*-metoksisinamat (APMS)

dan asam *m*-metoksisinamat (AMMS).

Salah satu *Non Steroidal Anti Inflammatory Drug* (NSAID) yang masih ba-nyak penggunaannya hingga saat ini adalah asam asetil salisilat. Mekanisme kerja NSAID pada umumnya, termasuk asam asetil salisilat ini adalah melalui hambatan aktivitas cyclooxygenase (COX1/2) sehingga menghambat produksi prostaglandin (Adinarayana *et al.*, 2012; Little *et al.*, 2007). Oleh karena itu pada penelitian ini sebagai pembanding digunakan asam asetil salisilat.

Aktivitas antinociceptiv senyawa APMS dan AMMS pada penelitian ini diuji dengan menggunakan metode *writhing test*. Senyawa penginduksi pada *writhing test* adalah larutan asam asetat 0,6%. Potensi senyawa uji sebagai antinociceptiv dapat diamati dari jumlah respon geliat mencit yang diberi senyawa uji pada dosis tertentu dibandingkan dengan mencit kelompok kontrol. Penurunan jumlah respon geliat akibat perlakuan senyawa uji dibandingkan dengan kelompok kontrol dinyatakan sebagai % proteksi (Ali *et al.*, 2013).

Mekanisme aktivitas antinociceptiv APMS dan AMMS diuji secara *in silico* terhadap COX-1 (PDB 1PTH) dan COX-2 (PDB 1CX2) dari APMS dan AMMS.

## METODOLOGI PENELITIAN

**Bahan dan Alat :** Senyawa uji diperoleh dari Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Asam asetat p.a. (E. Merck), CMC-Na ph.g (Brataco), Asam asetil salisilat p.a (Bayer). Mortir dan stamper, jarum injeksi 26G (Terumo), Software ChemBioDraw Ultra ver 11 (Cambridge Soft) digunakan untuk menggambar struktur 3D, Program komputer Molegro Virtual Docker (MVD) ver 5.5. (CLC Bio) digunakan untuk uji *in silico*.

### Uji writhing test

Uji writhing test dilakukan dengan menggunakan larutan asam asetat 0,6% sebagai penginduksi. Perbandingan yang digunakan adalah asam asetilsalisilat (ASA). Sediaan uji APMS dan AMMS maupun ASA dibuat bentuk suspensi dalam larutan CMC-Na 0,5%. Dosis senyawa uji adalah 50, 100 dan 200 mg/kg BB. Hewan coba mencit *Mus musculus* dengan berat badan 20-30g diadaptasikan selama satu minggu dalam kandang di ruangan dengan suhu  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  dan sebelum perlakuan dipuaskan semalam, tetapi tetap diberi minum *ad libitum*. Berat badan masing-masing mencit ditimbang, kemudian dibagi dalam tiga kelompok dosis (50, 100 dan 200 mg/kgBB), kelompok kontrol negatif (plasebo) dan kelompok kontrol positif (asam asetilsalisilat) yang masing-masing terdiri dari 10 ekor. Mencit tiap kelompok dosis diberi senyawa uji sesuai bobot badannya, sedangkan kelompok kontrol hanya diberi larutan CMC Na 0,5% (plasebo). Uji *writhing test* dilakukan dengan pemberian senyawa uji pada mencit secara *intraperitoneal*, selanjutnya 20 menit kemudian diikuti penyuntikan dengan larutan asam asetat 0,6% sebanyak 0,01ml/g BB secara *intraperitoneal*.

Lima menit setelah induksi, pengamatan respon nyeri dilakukan selama 30 menit. Respon yang diamati adalah frekuensi geliat kelompok dosis dan kelompok kontrol, yang selanjutnya data frekuensi geliat mencit pada kelompok dosis dan kontrol tersebut digunakan untuk menghitung % proteksi nyeri. Persen proteksi dapat dihitung berdasarkan rumus : selisih frekuensi geliat

kelompok kontrol dengan kelompok dosis di bagi frekuensi kelompok kontrol, dikalikan 100%. Analisis data pada uji writhing test ini menggunakan analisis one way ANOVA ( $p < 0,05$ ).

### Uji *in silico*

Uji *in silico* dilakukan dengan melakukan align method pada struktur ligan PDB 1PTH dan PDB 1CX2. Struktur SAL701 (PDB ID = 1PTH) dan SC58 (PDB ID = 1CX2) diperoleh dari Protein Data Bank ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)). Struktur senyawa uji yaitu APMS dan AMMS dibuat dengan program ChemBioDraw Ultra ver. 11 dan dilakukan optimasi geometrinya menggunakan metode MM2 program tersebut dan disimpan dalam format Sybyl Mol2. Uji *in silico* (docking) dilakukan dengan menempatkan senyawa uji pada binding site 1PTH (cavity 3) dengan align method pada ligan referensi (SAL). Evaluasi interaksi antara senyawa uji APMS dan AMMS dilakukan berdasarkan Rank Score (RS)nya, yaitu jumlah energi interaksi ligan-protein dan energi internal ligan (termasuk ikatan hidrogen antara ligan dan protein). Hasil skor tertinggi menunjukkan energi terendah ikatan dan dianggap sebagai model ikatan yang terbaik. Validasi docking dilakukan dengan cara redocking SAL pada cavity-3 1PTH maupun S58 pada cavity-3 1CX2. Hasil docking terbaik bila memenuhi kriteria berikut : i) senyawa uji memiliki energi ikatan paling rendah, ii) secara geometris menempati cavity yang sama dengan SAL701 (PDB 1PTH) atau SC58 (PDB 1CX2).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi larutan asam asetat 0,6% secara intraperitoneal dapat menyebabkan iritasi jaringan peritoneal, sehingga menginduksi terjadinya nyeri yang dapat diamati sebagai respon geliat (Ali et al., 2013). Beberapa derivat asam sinamat telah dilaporkan memiliki aktivitas antinociceptiv pada mencit yang diinduksi larutan asam asetat 0,6%, contohnya AOMS dan EPMS (Ekowati et al., 2010; Umar et al., 2012).

Aktivitas analgesik isomer AOMS yaitu APMS dan AMMS, ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Respon Geliat dan % Hambatan Nyeri Perlakuan Senyawa Uji

Perlakuan	Dosis (mg/kgBB)	Jumlah geliat	% Hambatan nyeri
Pembawa	0	91±4,3	0
ASA	50	61±13.3	32,9
	100	38±5.5	58,3
	200	25±3.4	72,5
APMS	50	46±3.7	49,0
	100	31±7.3	65,9
	200	19±5.5	79,1
AMMS	50	43±4.7	52,7
	100	32±4.6	64,8
	200	17±2.7	81,3

Ket. ASA= asam asetil salisilat, APMS = asam *p*-metoksisinamat, AMMS = asam *m*-metoksisinamat

Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah geliat pada mencit yang diinduksi larutan asam asetat 0,6% pada kelompok mencit yang diberi senyawa uji APMS maupun AMMS. Hasil analisis statistik *one way Anova* menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada tiap dosis senyawa uji ( $p < 0,05$ ). Semakin besar dosis semakin besar % hambatan nyeri yang ditimbulkan. Korelasi antara dosis vs geliat senyawa ASA = 89,5%, APMS = 84%, AMMS = 95,2%. Adanya korelasi yang cukup tinggi antara dosis dan respon geliat yang tampak menunjukkan aktivitas antinociceptiv senyawa uji bersifat *dose dependent*.

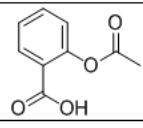
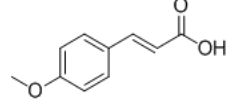
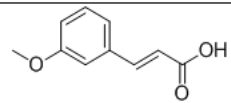
Hasil perhitungan ED<sub>50</sub> dari ASA = 84,28 mg/kgBB; APMS = 50,86mg/kgBB; dan AMMS = 45,47mg/kgBB. Hal ini membuktikan aktivitas antinociceptiv APMS maupun AMMS lebih kuat dibandingkan dengan ASA.

Aktivitas ASA sebagai antinociceptive adalah melalui hambatan pelepasan prostaglandin dan

phlogistic mediator seperti PGE<sub>2</sub>. Level PGE<sub>2</sub> ini akan meningkat dengan adanya induksi asam asetat (Venkatesh, S. & Fatima, S., 2013). Produksi prostaglandin dapat dihambat dengan menghambat enzim *cyclooxygenase* (COX) (Ali *et al.*, 2013). Michelson (2011) melaporkan penggunaan ASA sebagai COX-1 inhibitor dan antiplatelet. Sifat polar dari asam asetil salisilat ( $\log P = 1,21$ ) mendukung aksi kerjanya sebagai analgetika perifer, karena lebih sulit menembus sawar otak. Senyawa uji, yaitu APMS dan AMMS memiliki log P yang sama yaitu 1,81; jika dibanding dengan ASA ada dugaan APMS dan AMMS juga merupakan analgetika yang bersifat perifer walaupun lipofilitasnya sedikit lebih tinggi.

Pengujian mekanisme kerja APMS dan AMMS sebagai antinociceptive dilakukan secara *in silico* menggunakan program komputer Molegro Virtual Docker ver 5.5. Hasil uji ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji *in silico* APMS dan AMMS terhadap COX-1 (PDB 1PTH) dan COX-2 (PDB 1CX2)

Nama Senyawa	Struktur Senyawa	Rank Score (kcal/mol)	
		COX-1	COX-2
ASA		-60,0844	-64,2502
APMS		-71,4474	-69,0685
AMMS		-70,8835	-72,3947

Ket. ASA = asam asetil salisilat, APMS = asam *p*-metoksisinamat, AMMS = asam *m*-metoksisinamat

Data pada Tabel 2 menunjukkan kemungkinan mekanisme kerja APMS maupun AMMS sebagai antinociceptive menyerupai ASA. Hasil uji *in silico* terhadap COX-1 (PDB 1PTH) maupun COX-2 (PDB 1CX2) dari APMS dan AMMS menunjukkan hasil *Rank Score* yang lebih rendah daripada ASA. Hal ini menunjukkan interaksi yang lebih stabil antara APMS dan AMMS dengan COX-1 maupun COX-2 dibandingkan dengan ASA. Data tersebut juga mendukung hasil uji *in vivo* ED50 APMS dan AMMS lebih kecil daripada ASA. Interaksi APMS dan AMMS dengan COX-2 PDB 1CX2 memperkuat prediksi bahwa kedua senyawa tersebut juga memiliki aktivitas antiinflamasi.

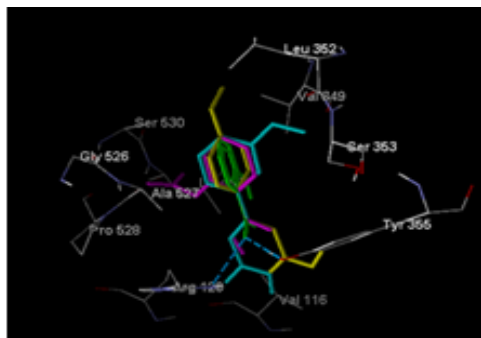
Korelasi hasil uji *in silico* (RS) dan uji *in vivo* (ED50) dari masing-masing senyawa uji pada COX-1 = 97,1%, sedangkan pada COX-2 = 91,8%. Hal ini memperkuat dugaan mekanisme hambatan nyeri APMS maupun AMMS melalui hambatan COX 1/2 sejalan dengan mekanisme senyawa NSAID pada umumnya (Yurtsever *et al.*, 2011).

Pose doking senyawa uji pada enzim COX-1 cavity-3 ligan SAL (PDB 1PTH) ditampilkan pada Gambar 1, menunjukkan beberapa asam amino yang terletak pada *active site* (cavity 3) COX-1, diantaranya adalah Arg120, Val349,

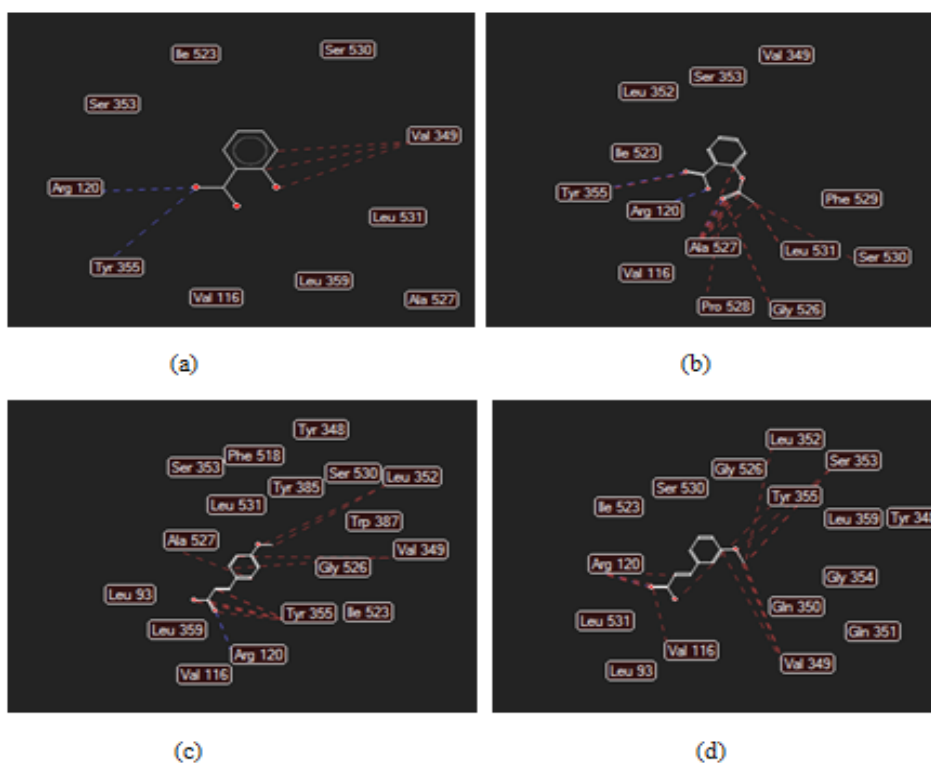
Ser353, Tyr355, Ile 523, Ser530, Leu531. Interaksi senyawa uji pada enzim COX-1 ditampilkan pada Gambar 2. Gambar 2a menunjukkan interaksi ligan SAL berupa ikatan hidrogen pada gugus –COOH dengan Arg120 dan Tyr355, sedangkan interaksi sterik tampak pada inti aromatis maupun gugus –OH dari SAL dengan Val349. Gambar 2b menunjukkan interaksi ikatan hidrogen gugus –COOH dari senyawa pembanding ASA dengan Arg120 dan Tyr355; sedangkan interaksi sterik terjadi pada gugus asetil dengan Ser530, Leu531, Pro528 dan Gly526. Interaksi sterik ASA juga terjadi pada inti aromatisnya dengan asam amino Ala527 enzim COX-1.

Interaksi APMS dengan enzim COX-1 (Gambar 2c) berupa ikatan hidrogen tampak pada gugus –COOH dengan Arg120 dan Tyr355. Interaksi sterik APMS tampak pada ikatan rangkap vinilik dengan Tyr355, inti aromatis dengan Ala527, Gly526 dan Val349, gugus –CH<sub>3</sub> dari –OCH<sub>3</sub> dengan Leu352.

Interaksi AMMS dengan COX-1 (Gambar 2d) menunjukkan adanya ikatan hidrogen dari gugus –COOH dengan Arg120 dan Tyr355. Interaksi sterik AMMS terjadi antara ikatan rangkap vinilik dengan Arg120, inti aromatis dengan Val349 dan gugus –CH<sub>3</sub> dari –OCH<sub>3</sub> dengan Val349, Ser353, Leu352.



Gambar 1. Doking Senyawa Uji – SAL (ligan PDB 1PTH) pada enzim COX-1  
Kuning = APMS; Biru = AMMS  
Ungu = ASA; Hijau = SAL



Gambar 2. Interaksi senyawa uji – COX-1 PDB 1PTH  
a = SAL; b = ASA; c = APMS; d = AMMS

Berdasarkan Gambar 2 (a-d), ASA, SAL, APMS dan AMMS memiliki kesamaan yaitu interaksi berupa ikatan hidrogen antara masing-masing gugus  $-COOH$  dengan Arg120 dan Tyr355. Inti aromatis, ikatan rangkap vinilik maupun gugus  $-CH_3$  dari  $-OCH_3$  merupakan gugus fungsi penting yang berinteraksi dengan enzim COX-1. Transformasi ikatan rangkap vinilik APMS menjadi ikatan tunggal pada senyawa asam 3-fenil propanoat dapat menurunkan aktivitas analgesiknya (Ekowati *et al.*, 2007).

Pose doking senyawa uji pada enzim COX-2 cavity-3 ligan S58 (PDB 1CX2) ditampilkan pada Gambar 3. Tampak beberapa asam amino

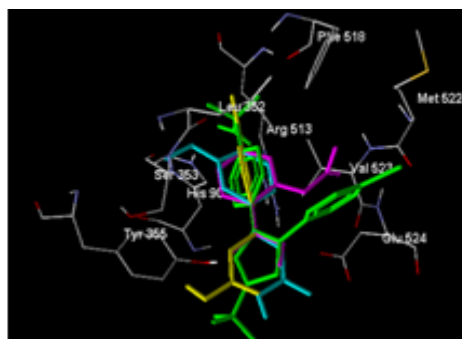
yang terletak pada *active site* (cavity 3) COX-2, diantaranya adalah His90, Tyr355, Ser353, Leu352, Arg513, Phe518, Met522, Val523 dan Glu524.

Interaksi senyawa uji pada enzim COX-2 ditampilkan pada Gambar 4. Gambar 4a menunjukkan interaksi ligan celecoxib (CELE) berupa ikatan hidrogen pada cincin pirazol dengan Tyr355, sedangkan interaksi sterik terjadi pada gugus  $-CF_3$  Arg120 dan Val349, inti aromatis yang mengikat gugus  $-SO_2NH_2$  dengan Val523 dan Leu352, gugus  $-NH_2$  dari  $-SO_2NH_2$  dengan Arg513 dan His90, gugus  $-SO_2$  dari  $-SO_2NH_2$  dengan Phe518. Gambar 4b menunjukkan interaksi ASA dengan enzim

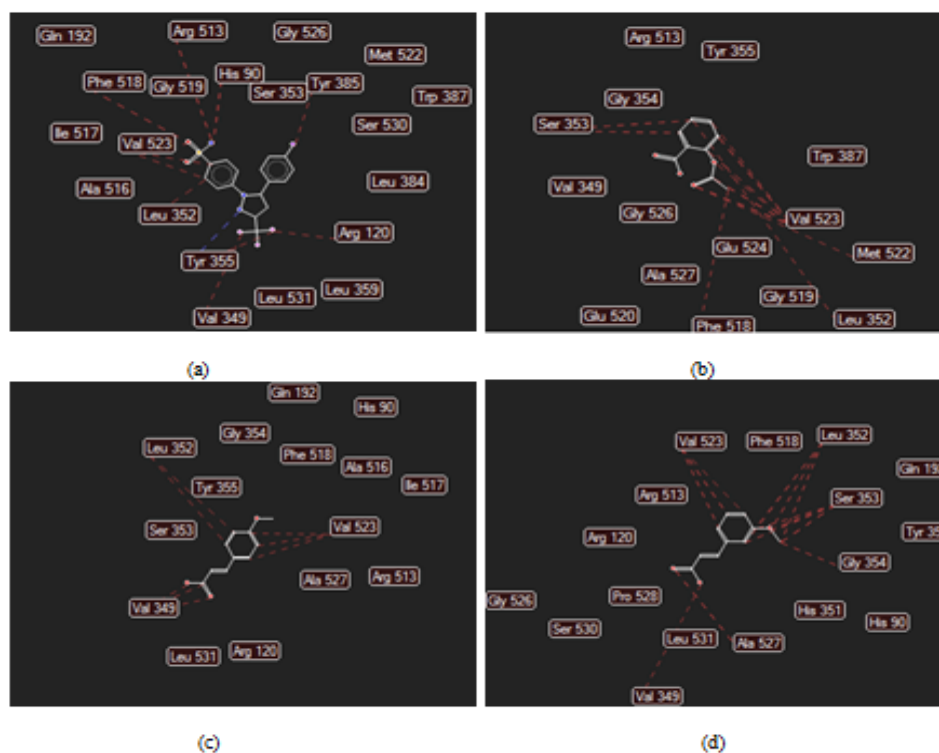
COX-2 berupa interaksi sterik inti aromatis dengan Leu352, Ser353 dan Val523, gugus  $-C=O$  dari asetil dengan Met522 serta gugus  $-CH_3$  dari asetil dengan Phe518.

Interaksi APMS dengan enzim COX-2 (Gambar 4c) menunjukkan interaksi sterik antara gugus  $-COOH$  dengan Val349, inti aromatis dengan Val523 dan Leu352. Gambar 4d menunjukkan adanya interaksi sterik AMMS

antara gugus  $-COOH$  dengan Val349 dan Ala527, inti aromatis dengan Val523 dan Leu352, gugus  $-OCH_3$  dengan Ser353 dan gugus  $-CH_3$  dari  $-OCH_3$  dengan Gly354. Berdasarkan Gambar 3-4 (a-d) tampak adanya kesamaan interaksi antara inti aromatis dengan Val523.



Gambar 3. Doking Senyawa Uji – S58 (ligan PDB 1CX2) pada enzim COX-2  
Kuning = APMS; Biru = AMMS  
Ungu = ASA; Hijau = CELE



Gambar 4. Interaksi senyawa uji – COX-2 PDB 1CX2  
a = CELE; b = ASA; c = APMS; d = AMMS

Residu Val523 ini merupakan residu yang spesifik terdapat pada *active site* COX-2, pada COX-1 posisi tersebut ditempati oleh residu Ile. Interaksi APMS dan AMMS dengan asam amino Val523 ini menunjukkan bahwa kedua senyawa tersebut dapat masuk pada *active site* dari COX-2 (Little *et al.*, 2007).

Residu Ile523 pada enzim COX-1 merupakan asam amino yang memiliki gugus alkil yang lebih meruah, sedangkan residu Val523 pada enzim COX-2 memiliki gugus alkil yang lebih kecil sehingga ada perbedaan konformasi kedua enzim tersebut yang akan mempengaruhi spesifitas senyawa obat terhadap COX-1 maupun COX-2. Perbedaan lainnya antara residu COX-1 dengan COX-2 adalah adanya residu Arg513 pada COX2 yang berinteraksi dengan gugus  $-SO_2NH_2$  dari ligan CELE (celecoxib) (Little *et al.*, 2007; Simons *et al.*, 2004).

Adanya residu Val523 dan Arg513 meningkatkan volume *active site* sekitar 20% pada COX-2 dibandingkan COX-1, sehingga fakta ini dapat digunakan untuk mendesain senyawa-senyawa COX-2 inhibitor (Little *et al.*, 2007). Saberi *et al.* (2010) melaporkan dua residu penting COX-2 yang berinteraksi dengan COX-2 inhibitor, yaitu Tyr385 dan Ser530, sedangkan Yuniarti *et al.* (2011) melaporkan interaksi ikatan hidrogen dengan Arg513 merupakan petunjuk penting dalam penemuan COX-2 inhibitor.

Berdasarkan uji *in silico* pada Gambar 2 dan 4 tersebut di atas, diprediksi kedua senyawa uji memiliki selektivitas yang relatif lebih rendah dibandingkan dengan celecoxib terhadap COX-2. Pengembangan struktur APMS maupun AMMS masih dibutuhkan untuk memperoleh senyawa yang selektif sebagai COX-2 inhibitor.

## KESIMPULAN

1. Asam *p*-metoksisinamat dan asam *m*-metoksisinamat memiliki aktivitas antinociceptive yang lebih tinggi dibandingkan dengan asam asetat salisilat.

2. Mekanisme hambatan nyeri asam *p*-metoksisinamat dan asam *m*-metoksisinamat melalui hambatan enzim COX.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan Rektor Universitas Airlangga atas dukungan dana penelitian melalui Project Grand 2010. Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada Prof. Dr. Siswandono, MS., Apt. atas ijin menggunakan program komputer Molegro ver 5,5.

## DAFTAR PUSTAKA :

- Adinarayana, K.P.S., Reddy, P.A., Babu, P.A. 2012. Structural Studies on Docking Selective COX-2 Inhibitors. **J. of Bioinformatics & Research** 1(1), pp.21-26.
- Ali G., Subhan F., Wadood A., Khan A., Ullah N., Ul Islam N., Khan I. 2013. Pharmacological evaluation, molecular docking and dynamics simulation studies of salicyl alcohol nitrogen containing derivatives. **African J. of Pharmacy and Pharmacology** 7(11), pp. 585-596.
- Ekowati, J., Suzana, Budiati, T. 2005. Pengaruh Posisi Gugus Metoksi *para* dan *meta* terhadap hasil Sintesis asam *p*-metoksisinamat dan asam *m*-metoksisinamat, **Airlangga J. of Pharmacy**, Vol. 5 (3), pp. 79-83.
- Ekowati, J., Suzana, Dyah NW, Susilowaty MI, Poerwono H, Rudyanto M, Astika GN, Syahrani A, Siswono H, Budiati T, 2007. Novel Analgesic Compounds from *p*-hydroxycinnamic acid **First Collab. Joint Seminar USM-Unair**, Penang, Malaysia.
- Ekowati, J., Dyah, N.W., Astika, G.N., Budiati, T., 2010. Sintesis Asam *orto*-metoksi-sinamat dari Material Awal *o*-metoksibenzaldehid dan Uji Aktivitas Analge-siknya. **Airlangga J. of Pharmacy**, Vol. 8(2), pp.12-17.
- Little D, Jones SL, Blikslager AT. 2007. Cyclooxygenase (COX) Inhibitors and the Intestine. **J. Vet. Intern. Med. Rev.** 21 : 367-377.
- Michelson, A.D., 2011. Advances in Antiplatelet Therapy. **Hematology** 2011, pp.62-69.

- Patrick, G.L. 2009. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 4<sup>th</sup>.ed. New York: Oxford University Press, pp. 42-70.
- Riditid W., Sae-Wong C., Reanmongkol W., Wongnawa M., 2008. Antinociceptive activity of the methanolic extract of *Kaempferia galanga* Linn. in experimental animals. **J Ethnopharmacol.** 118(2), pp. 225-230.
- Saberi MR, Hadizadeh F, Imenshahidi M, Shakeri H, Ziaee ST, Ghafuri MA, Sakhtianchi R, Badiyan Z, Hajian S. 2010. Synthesis and Effects of 4,5-Diaryl-2-(2-alkylthio-5-imidazolyl) Imidazoles as Selective Cyclooxygenase Inhibitors. **Iranian J. of Basic Med. Sci.** 13 (4) : 225-231.
- Simmons, D.L., Botting, R. M., and Hla, Timothy. 2004. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandins and Synthesis Inhibition, **Pharmacological Reviews**, Vol 56, No 3, pp. 387-437.
- Umar MI., Asmawi MZ., Sadikun A., Atangwho IJ., Yam MF., Altaf R., Ahmed A. 2012. Bioactivity-Guide Isolation of Ethyl p-methoxycinnamate, an Anti-inflammatory Constituent, from *Kaempferia galanga* Linn. Extracts. **Molecule** 17, pp. 8720-8734.
- Venkatesh S & Fatima S. 2013. Evaluation of Antinociceptive effects of *Tragia plukenetii* : A possible mechanism. **Pharmacology Study** 34 (3), pp. 316-321.
- Yuniarti N, Ikawati Z, Istyastono EP. 2011. The Importance of ARG513 as hydrogen bond anchor to discover COX-2 inhibitor in a virtual screening campaign. **Bioinformation** 6(4) : 164-166.
- Yurtsever., Z., Erman, B., Yurtsever, E., 2011. Competitive Hydrogen Bonding in Aspirin-aspirin and Aspirin-leucin interactions. **Turk. J. Chem** 36, pp. 383-395.