

## ACTIVITY OF PROPYL *p*-BENZOYLOXYBENZOATE AS A GLUTATHIONE S-TRANSFERASE(S) INHIBITOR: THE COMPARISON BETWEEN COMPUTATIONAL CHEMISTRY APPROACH AND EMPIRICAL OBSERVATION

*Aktivitas Propil P-Benzoiloksibenzoat Sebagai Inhibitor Glutathion S-Transferase: Perbandingan Pendekatan Kimia Komputasi Dengan Pengamatan Empiris*

Enade Perdana Istyastono<sup>a,\*</sup>, Agnes Nora Iska Harnita<sup>a</sup> and Sudibyo Martono<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Pharmacy, University of Sanata Dharma, Paingan, Maguwoharjo Yogyakarta 55281

<sup>b</sup> Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University, Sekip Utara, Yogyakarta 55281

Received 15 December 2005; Accepted 22 February 2006

### ABSTRACT

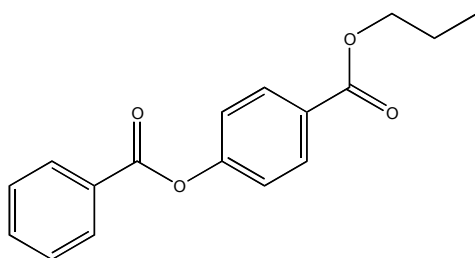
The activity of propyl *p*-benzoyloxybenzoate as a glutathione S-transferase(s) (GSTs) inhibitor has been examined through computational chemistry based theoretical approach and laboratory experiment. This research was related to the nature of GSTs as multifunctional enzymes, which play an important role in the detoxification of electrophilic compounds, the process of inflammation and the effectivities of anticancer compounds. Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) study, which was established on curcumin and its derivatives using computational chemistry approach, was used to examine the theoretical activity of *p*-benzoyloxybenzoate as a GSTs inhibitor. Empirical observation on GSTs inhibition was examined using formation reaction model of GS-CNB conjugate through conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and glutathione (GSH) with GSTs (prepared from rat's liver) as catalysts. The result showed that the difference between the activities of propyl *p*-benzoyloxybenzoate as a GSTs inhibitor obtained from the computational chemistry approach and the empirical observation were not statistically significant at 95% level of confidence.

**Keywords:** Propyl *p*-benzoyloxybenzoate, inhibitor, glutathione S-transferase (GSTs), QSAR.

### PENDAHULUAN

Propil *p*-benzoiloksibenzoat (Gambar 1) merupakan senyawa baru disintesis dari propil *p*-hidroksibenzoat dan benzoilklorida [1]. Propil *p*-benzoiloksibenzoat, secara struktural, diduga memiliki aktivitas antiinflamasi. Aktivitas tersebut terkait dengan dua gugus ester yang dimilikinya. Gugus tersebut diharapkan dapat bertindak seperti pada aspirin dalam mekanisme antiinflamasinya [2].

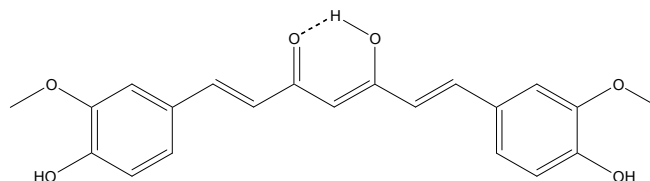
Obat antiinflamasi non-steroid merupakan salah satu golongan obat yang paling sering digunakan. Aktivitas antiinflamasi non steroid dilaporkan melalui penghambatan sintesis prostaglandin, suatu mediator inflamasi. Proses tersebut dapat melalui penghambatan siklooksigenase (COX), penangkapan radikal oksigen maupun penghambatan glutathion S-transferase (GST) [2-6].



Gambar 1 Struktur propil *p*-benzoiloksibenzoat [1]

Hubungan kuantitatif struktur-aktivitas (HKSA) kurkumin (Gambar 2) dan turunannya sebagai inhibitor GST kelas umum telah dilakukan dengan menggunakan prediktor berupa muatan bersih atom yang dihitung secara kimia komputasi metode semi empirik AM1 dan diperoleh model persamaan yang dapat digunakan untuk mendesain senyawa baru, baik turunan maupun analog kurkumin yang memiliki kemampuan optimal sebagai inhibitor GST kelas umum [7]. Propil *p*-benzoiloksibenzoat memiliki residu cincin benzen terkonjugasi gugus karbonil (suatu gugus penarik elektron), residu yang diduga terkait dengan aktivitas suatu senyawa sebagai inhibitor GST [7-8].

Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas propil *p*-benzoiloksibenzoat sebagai inhibitor GST kelas umum (*alpha*, *mu*, dan *pi*) dengan pendekatan teoretis berbasis kimia komputasi [7] dan uji empiris di



Gambar 2 Kurkumin [15]

\* Corresponding author.

Email address : enade@staff.usd.ac.id (E.P. Istyastono)

laboratorium secara spektrofotometri [9] serta membandingkan kedua metode tersebut untuk keperluan verifikasi penggunaan model HKSA yang diusulkan oleh [7] dalam sistem molekul yang bukan merupakan turunan kurkumin.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

#### Pendekatan Teoretis

Data berupa struktur propil *p*-benzoiloksibenzoat dalam dua dimensi (2D) diperoleh dari literatur [1]. Aktivitas inhibisi GST dinyatakan sebagai  $\log(1/IC_{50})$ , yaitu hasil konversi dari  $IC_{50}$  (konsentrasi inhibitor yang menghambat aktivitas enzim sebesar 50%) [7].

#### Pengamatan Empiris

Glutation (GSH), *bovine* serum albumin (BSA) (Sigma Chem. Co., USA), senyawa 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) (Aldrich), metanol, etanol, kalium dihidrogen fosfat, dikalium hidrogen fosfat, pereaksi Biuret ( $CuSO_4 \cdot NaOH$ ) (kualitas p.a. E. Merck, Germany), tip pipet berbagai ukuran (*blue*, *white*, dan *yellow*). Senyawa propil *p*-benzoiloksibenzoat hasil sintesis [1]. Tikus putih (strain *Wistar*) dari Unit Pengadaan Hewan Percobaan (UPHP) UGM. Pelet pakan tikus dari Bagian Farmakologi dan Farmakoterapi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

### Alat

#### Pendekatan Teoretis

Perangkat keras berupa satu set komputer dengan prosesor Intel® Celeron™ dan RAM 96 Mb yang mampu melakukan perhitungan kimia komputasi. Perangkat lunak berupa paket program *HyperChem* Pro ver. 6.0 untuk melakukan perhitungan kimia kuantum dan mengeksplorasi sifat fisikokimia.

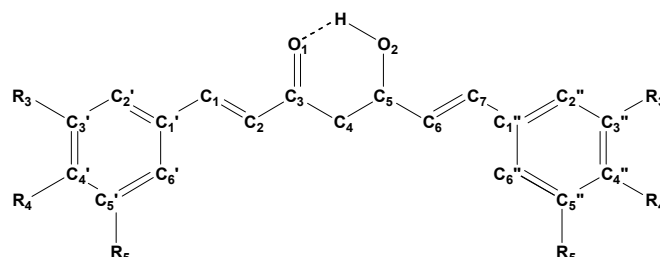
#### Pengamatan Empiris

Spektrofotometer UV-Vis (Genesys-5 Milton Roy), pH Meter (TOA HM-60S), ultrasentrifugator (Hitachi SCP 85H), *deep freeze* ( $-80^\circ C$ ), neraca elektrik (Shimadzu, type LS-6DT) dan *delivery* pipet (Gilson Pipetman) berbagai ukuran, dan alat-alat gelas yang lazim.

### Prosedur Kerja

#### Pendekatan Teoretis

Senyawa propil *p*-benzoiloksibenzoat yang digunakan sebagai bahan penelitian dibuat struktur dua dimensi (2D) menggunakan paket program *HyperChem*. Selanjutnya dilakukan penambahan atom H untuk melengkapi strukturnya dan dibentuk menjadi struktur tiga dimensi (3D). Optimasi sudut torsi dilakukan pada setiap ikatan tunggal asiklik dengan memperhatikan kaidah kimia organik. Struktur yang terbentuk dilakukan optimasi geometri menggunakan metode AM1 dengan algoritma Polak-Ribiere. Batas konvergensi ditentukan setelah tercapai gradien  $0,01 \text{ kkal}/\text{\AA} \cdot \text{mol}$  [7].



**Gambar 3** Penomoran pada analisis HKSA kurkumin dan turunannya sebagai inhibitor GST [7]

Perhitungan *single point* dilakukan dengan menggunakan paket program *HyperChem* pada struktur hasil optimasi untuk memperoleh parameter elektronik ( $\sigma$ ) berupa muatan bersih atom yang terdapat pada molekul. Aktivitas sebagai inhibitor GST dihitung menggunakan model persamaan HKSA kurkumin dan turunannya sebagai inhibitor GST hasil penelitian [7]:

$$\log(1/IC_{50}) = -2,238 - 17,326 qC_{2'} + 1,876 qC_{4'} + 9,200 qC_{6'} \quad (1)$$

Dalam hal ini  $qC_{2'}$ ,  $qC_{4'}$ , dan  $qC_{6'}$  merupakan muatan bersih atom  $C_{2'}$ ,  $C_{4'}$  dan  $C_{6'}$  dari struktur kurkumin (Gambar 3). Prediksi dilakukan dengan menggunakan muatan bersih atom yang memiliki posisi ekuivalen pada molekul yang diprediksi.

#### Pengamatan Empiris

##### Penyiapan fraksi sitosol yang mengandung GST

Tikus jantan berat 200-220 g sebanyak 10 ekor, diadaptasikan dalam kandang dengan pemberian pakan pelet dan minum air ledeng *ad libitum*, selama satu minggu. Setelah waktu perlakuan selesai, tikus dipuaskan 24 jam sebelum dibunuh dan diambil hatinya untuk penyiapan fraksi sitosol yang mengandung enzim GST dengan metode sentrifugasi bertingkat menurut [10] dengan sedikit modifikasi. Kadar protein dalam fraksi sitosol (yang mengandung enzim GST) ditetapkan secara spektrofotometri visibel dengan menggunakan BSA sebagai pembanding menggunakan metode Biuret. Fraksi sitosol yang diperoleh disimpan pada suhu  $-80^\circ C$  sampai saat digunakan untuk konjugasi CDNB dengan GSH.

##### Penetapan aktivitas enzim GST [9]

Ke dalam kuvet 1 mL dimasukkan larutan 50 mM CDNB dalam etanol ( $75,00 \mu L$ ), larutan 50 mM GSH dalam akuades ( $10,05 \mu L$ ), fraksi sitosol (mengandung GST) hati tikus ( $17,50 \mu L$ ) dan bufer fosfat 0,1 M pH 6,5 *ad*  $750 \mu L$ . Produk konjugat GS-CNB yang terbentuk diukur pada  $\lambda$  345 nm dari menit ke-0 hingga ke-3 menggunakan spektrofotometer (program *simple kinetic*). Hasil pengukuran berupa *rate* ( $\Delta$  serapan per menit). Kemudian dihitung aktivitas enzim (V) GST dari *rate* yang didapat menggunakan persamaan sebagai berikut (Keterangan: Konsentrasi protein dalam fraksi

sitosol = 0,078 mg/mL; Tebal kuvet = 1 cm;  $\Delta\varepsilon_{\text{GS-CNB}} = 10,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ):

$$V = \frac{\text{rate}}{\Delta\varepsilon_{\text{GS-CNB}} \cdot \text{tebal kuvet} \cdot \text{kadar protein}} \quad (2)$$

Persen (%) penghambatan dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{V_{\text{tanpa inhibitor}} - V_{\text{dengan inhibitor}}}{V_{\text{tanpa inhibitor}}} \times 100\% \quad (3)$$

Aktivitas yang diperoleh dari penambahan senyawa uji pada berbagai konsentrasi dilakukan uji statistik *general linear model* (GLM) pada taraf kepercayaan 95%. Jika aktivitas dengan penambahan inhibitor dinyatakan berbeda bermakna secara statistik maka senyawa tersebut merupakan inhibitor dan ditentukan nilai  $IC_{50}$  (yaitu konsentrasi inhibitor yang menghasilkan penghambatan aktivitas GST sebesar 50%) dengan menggunakan persamaan garis regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi inhibitor dengan % penghambatan (inhibisi) yang dihasilkan. Nilai  $IC_{50}$  ini kemudian dikonversi menjadi  $\log(1/IC_{50})$  guna dibandingkan dengan aktivitas yang dihitung dengan pendekatan teoretis berbasis kimia komputasi.

#### Analisis Hasil

Aktivitas propil *p*-benzoioksibenzoat sebagai inhibitor GST yang diperoleh dari pendekatan teoretis berbasis kimia komputasi dan pengamatan empiris dibandingkan dengan menggunakan uji *t* [11].

## HASIL DAN PEMBAHASAN

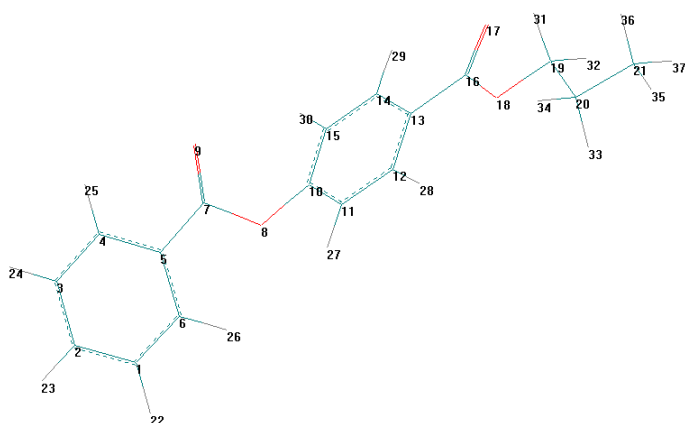
### Pendekatan Teoretis

Optimasi geometri dilakukan menggunakan metode AM1 dengan algoritma Polak-Ribiere dan batas konvergensi 0,01 kkal/Å.mol. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan [7] dan dilaporkan dapat memberikan hasil analisis HKSA yang baik. Metode AM1 juga dilaporkan memberikan hasil analisis yang lebih baik pada HKSA seri senyawa analog kurkumin sebagai antioksidan dibandingkan dengan metode PM3 [12], dan dapat digunakan untuk memprediksi struktur 3D 15-fenilprotoporfirin IX [13]. Penelitian lain yang dikembangkan oleh Nakano *et al.* [14] untuk mendapatkan metode baru perhitungan muatan bersih atom ternyata juga menggunakan metode AM1. Untuk analisis stabilitas tautomer ketonol kurkumin oleh Istyastono *et al.* [15] terbukti bahwa metode AM1 memiliki korelasi positif dengan aktivitas sitotoksik senyawa uji terhadap sel Myeloma [16].

Koordinat atom-atom penyusun propil *p*-benzoioksibenzoat hasil optimasi disajikan pada Tabel 1. Struktur 3D propil *p*-benzoioksibenzoat hasil optimasi dengan model *stick* lengkap dengan penomoran yang digunakan disajikan pada Gambar 4. Berdasarkan Tabel 1 dan Gambar 4 diperoleh bahwa 2 cincin benzen pada propil *p*-benzoioksibenzoat tidak saling koplantar yang ditunjukkan dengan sudut torsi atom C nomor 7 (C<sub>7</sub>) – O<sub>8</sub> – C<sub>10</sub> – C<sub>15</sub> sebesar 45,312°. Hal ini berakibat pada sistem konjugasi elektron  $\pi$  yang tidak sempurna. Hal ini juga dapat diduga dari serbuk propil *p*-benzoioksibenzoat yang tidak berwarna [1].

**Tabel 1.** Koordinat atom-atom pada propil *p*-benzoioksibenzoat teroptimasi

No.	Atom	Koordinat (Å)			No.	Atom	Koordinat (Å)		
		X	Y	Z			X	Y	Z
1.	C	2,87905	5,87110	4,54733	20.	C	11,36680	-2,11035	0,52759
2.	C	1,97332	6,74569	3,94605	21.	C	12,53595	-2,94604	0,07661
3.	C	2,06467	7,01980	2,58062	22.	H	2,80592	5,65611	5,62380
4.	C	3,06101	6,42126	1,81261	23.	H	1,18504	7,22070	4,54975
5.	C	3,97127	5,54230	2,41762	24.	H	1,35003	7,70962	2,10745
6.	C	3,87937	5,26702	3,78719	25.	H	3,14422	6,62996	0,73343
7.	C	5,00981	4,93311	1,57509	26.	H	4,59737	4,57575	4,25680
8.	O	5,80364	4,03598	2,26571	27.	H	6,30045	1,54065	2,60685
9.	O	5,23006	5,12175	0,37980	28.	H	8,28708	0,29687	1,70192
10.	C	6,85919	3,39651	1,62443	29.	H	9,59051	3,86962	-0,36445
11.	C	7,02914	2,04151	1,95410	30.	H	7,60272	5,11938	0,52558
12.	C	8,13235	1,35921	1,45246	31.	H	11,43481	-0,70487	-1,16013
13.	C	9,05053	2,01762	0,62398	32.	H	12,40553	-0,18783	0,29902
14.	C	8,86240	3,36664	0,29366	33.	H	11,33635	-2,05696	1,64728
15.	C	7,76629	4,06499	0,79403	34.	H	10,40360	-2,57585	0,19159
16.	C	10,22567	1,32250	0,08146	35.	H	12,45201	-3,97837	0,49416
17.	O	11,10295	1,78069	-0,65754	36.	H	12,56588	-3,01698	-1,03774
18.	O	10,33115	0,01121	0,46400	37.	H	13,49913	-2,50099	0,42587
19.	C	11,47172	-0,70716	-0,03987					

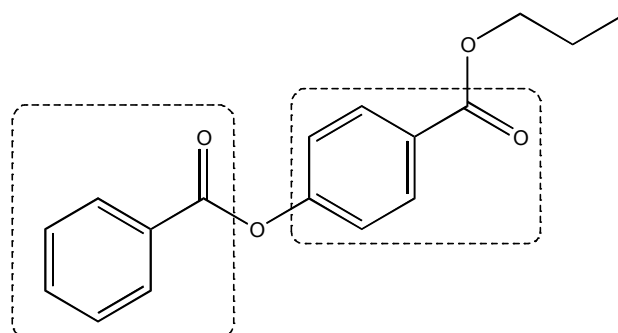


**Gambar 4** Model *sticks* senyawa propil *p*-benzoiloksibenzoat hasil optimasi dengan penomoran yang digunakan dalam penelitian ini

Jika 2 cincin benzen pada propil *p*-benzoiloksibenzoat saling koplanar maka diharapkan diperoleh senyawa yang berwarna kekuningan, seperti halnya pada kurkumin dan turunannya [15].

Propil *p*-benzoiloksibenzoat memiliki 2 sistem cincin benzen yang terkonjugasi gugus karbonil (suatu gugus penarik elektron) (Gambar 5), sistem yang diduga terkait dengan aktivitas suatu senyawa sebagai inhibitor GST [7-8]. Aktivitas propil *p*-benzoiloksibenzoat sebagai inhibitor GST diprediksi secara kualitatif relatif lemah akibat dari keberadaan atom  $O_{sp^3}$  pada gugus penarik elektron yang diduga menghalangi konjugasi. Fenomena ini dapat dilihat pada aktivitas senyawa fenol alami dengan gugus penarik elektron berupa ester maupun asam karboksilat [17] dan pada aktivitas aspirin [18]. Senyawa fenol alami dengan gugus penarik elektron berupa ester maupun asam karboksilat memiliki aktivitas sebagai inhibitor GST relatif lemah [17] sedangkan aspirin dilaporkan tidak memiliki aktivitas sebagai inhibitor GST [18].

Dalam penelitian terdahulu [7] dapat dilihat bahwa muatan bersih anggota cincin yang berada di ujung molekul dan bukan rantai karbon  $sp^2$  di tengah molekul yang merupakan prediktor. Oleh karena itu, dalam



**Gambar 5** Sistem cincin benzen yang terkonjugasi gugus penarik elektron pada propil *p*-benzoiloksibenzoat

penelitian ini cincin benzen yang ekuivalen adalah cincin benzen di ujung molekul propil *p*-benzoiloksibenzoat, sehingga atom yang ekuivalen dengan  $C_2$  pada turunan kurkumin (Gambar 3) adalah  $C_4$  (muatan bersih = -0,070 coulomb),  $C_4$  ekuivalen dengan  $C_2$  (muatan bersih = -0,092 coulomb), sedangkan  $C_6$  ekuivalen dengan  $C_6$  (muatan bersih = -0,067 coulomb). Hasil prediksi dengan model HKSA yang didapat dengan regresi linier multivariat pada taraf kepercayaan 95% (selang kepercayaan = 0,254;  $n = 10$ ) [7] menunjukkan bahwa propil *p*-benzoiloksibenzoat memiliki aktivitas sebagai inhibitor GST dengan  $\log(1/IC_{50}) = -1,814$ .

### Pengamatan Empiris

Hasil uji penghambatan aktivitas GST oleh propil *p*-benzoiloksibenzoat disajikan pada Tabel 2. Kurva hubungan konsentrasi propil *p*-benzoiloksibenzoat dengan aktivitas disajikan pada Gambar 6. Kurva tersebut memperlihatkan adanya penurunan aktivitas setiap penambahan konsentrasi propil *p*-benzoiloksibenzoat.

**Tabel 2** Aktivitas GST (pada reaksi konjugasi GSH-CDNB) dengan dan tanpa penambahan propil *p*-benzoiloksibenzoat berbagai konsentrasi

Replikasi	Aktivitas <sup>(*)</sup> (nanomol menit <sup>-1</sup> (mg protein) <sup>-1</sup> ) pada konsentrasi				
	0 $\mu$ M	25 $\mu$ M	50 $\mu$ M	75 $\mu$ M	100 $\mu$ M
1.	112,821	103,846	96,154	79,487	69,231
2.	115,385	106,410	98,718	84,615	70,513
3.	115,385	107,692	101,282	88,462	70,513
4.	116,667	111,538	101,282	88,462	71,795
Purata	115,065	107,372	99,359	85,257	70,513
SD <sup>(**)</sup>	1,613	3,205	2,455	4,252	1,047
CV <sup>(***)</sup> (%)	1,402	2,985	2,471	4,988	1,484

Keterangan : \*) Dengan konsentrasi protein dalam fraksi sitosol = 0,078 mg/mL; tebal kuvet = 1 cm; dan  $\Delta_{EGS-CDNB} = 10,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

\*\*\*) SD : standard deviation

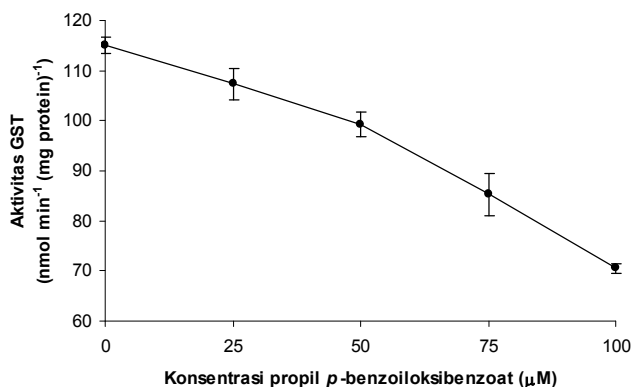
\*\*\* CV : coefficient of variation

**Tabel 3.** Potensi propil *p*-benzoiloksibenzoat sebagai inhibitor GST

Replikasi	% Penghambatan pada konsentrasi				IC <sub>50</sub> <sup>*)</sup>	log (1/IC <sub>50</sub> )
	25 $\mu$ M	50 $\mu$ M	75 $\mu$ M	100 $\mu$ M		
1.	7,955	14,773	29,546	38,636	126,410	-2,102
2.	7,778	14,445	26,667	38,889	129,014	-2,111
3.	6,667	12,223	23,333	38,889	131,476	-2,119
4.	4,396	13,187	24,176	38,462	128,567	-2,109
Purata					128,867	-2,110
SD <sup>**)</sup>					2,078	0,007

Keterangan : \*) Diperoleh dari regresi linier dengan  $y = \% \text{ penghambatan}$  dan  $x = \text{konsentrasi inhibitor}$ . Didapati korelasi antara 0,979 hingga 0,994. IC<sub>50</sub> merupakan nilai  $x$  dengan  $y = 50$ .

\*\*\*) SD : standard deviation



**Gambar 6** Kurva hubungan konsentrasi propil *p*-benzoiloksibenzoat dengan aktivitas GST (pada reaksi konjugasi GSH-CDNB)

Hasil uji statistik dengan metode GLM pada taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa penurunan aktivitas setiap penambahan konsentrasi propil *p*-benzoiloksibenzoat berbeda bermakna. Hal ini mengindikasikan bahwa propil *p*-benzoiloksibenzoat memiliki aktivitas sebagai inhibitor GST.

Potensi penghambatan GST oleh propil *p*-benzoiloksibenzoat disajikan pada Tabel 3 (dalam %) didapat dari selisih antara purata aktivitas pada konsentrasi tertentu propil *p*-benzoiloksibenzoat dengan purata aktivitas tanpa penambahan propil *p*-benzoiloksibenzoat, dibagi purata aktivitas tanpa penambahan propil *p*-benzoiloksibenzoat, dikalikan 100 %. Berdasar data pada Tabel 3 diperoleh bahwa propil *p*-benzoiloksibenzoat memiliki aktivitas sebagai inhibitor GST dengan IC<sub>50</sub> sebesar 128,87  $\mu$ M (SD = 2,078) dan jika dikonversikan ke log (1/IC<sub>50</sub>) maka diperoleh aktivitas propil *p*-benzoiloksibenzoat sebagai inhibitor GST adalah sebesar -2,110 (SD = -0,007).

#### Perbandingan antara Pendekatan Teoretis dan Pengamatan Empiris

Uji *t* dilakukan untuk membandingkan nilai log (1/IC<sub>50</sub>) yang diperoleh dari pendekatan teoretis dengan nilai log (1/IC<sub>50</sub>) yang diperoleh dari pengamatan empiris, dan diperoleh nilai 1,80. Nilai ini masih di bawah

nilai *t* tabel (taraf kepercayaan 95%; derajat bebas = 12) yaitu 2,18 [11]. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas propil *p*-benzoiloksibenzoat sebagai inhibitor GST yang diperoleh dengan pendekatan teoretis dan pengamatan empiris berbeda tidak bermakna secara statistik dengan taraf kepercayaan 95%.

Pada penelitian ini ditunjukkan bahwa model HKSA yang diusulkan oleh [7] dapat digunakan untuk memprediksi secara kuantitatif aktivitas senyawa lain yang memiliki cincin benzen yang terkonjugasi dengan suatu gugus penarik elektron, tidak terbatas pada senyawa-senyawa turunan kurkumin. Verifikasi ini masih perlu ditegaskan dengan penelitian-penelitian lanjutan.

#### KESIMPULAN

Aktivitas propil *p*-benzoiloksibenzoat sebagai inhibitor GST yang diperoleh dengan pendekatan teoretis dan pengamatan empiris berbeda tidak bermakna secara statistik pada taraf kepercayaan 95%.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Florensa, N.A., 2003, *Sintesis Propil p-Benzoilbenzoat melalui Modifikasi Metode Schoten-Baumann*, Skripsi, Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.
2. Vane, J.R., and Botting, R.M., 1996, *Overview-Mechanism of Action of Anti-inflammatory Drugs in Improved Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs COX-2 Enzyme Inhibitors*, Eds. Vane, S.J., Botting, J., and Botting, R., Kluwer Academic Publishers and William Harvey Press, Great Britain, 1-28.
3. Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L.T., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., and Simmons, D.L., 2002, *PNAS*, 99 (21), 13926-31.
4. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.J., and Arouma, O.S., 1987, *Anal. Biochem.*, 165, 215-9.
5. Ujihara, M., Tsuchida, S., Satoh, K., Sato, H., and Urade, Y., 1988, *Archs. Biochem. Biophys.*, 264, 428-37.
6. Samuelsson, B., 1980, *TiPS*, (May), 227-30.

7. Istyastono, E.P., Sudiby, M., Pranowo, H.D., dan Tahir, I., 2003, *Indon. J. Chem.*, 3 (3), 179-85.
8. Istyastono, E.P., Sudiby, M., dan Supardjan, A.M., 2003, Pengaruh Gugus Karbonil dalam Senyawa-senyawa fenolik pada Penghambatan Aktivitas GST, *Risalah Seminar Ilmiah Nasional*, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta, 172-82.
9. Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B., 1974, *J. Biol. Chem.*, 249 (22), 7130-9.
10. Lundgren, B., Meijer, J., and DePierre, J.W., 1987, *Drug Metab. Dispos.*, 15, 114-21.
11. Armstrong, M.A. and James, K.C., 1996, *Pharmaceutical Experimental Design and Interpretation*, Taylor & Francis Ltd., London, pp. 12-3, 226.
12. Sudarmanto, B.S.A., 2002, *Analisis Hubungan Kuantitatif Struktur-Aktivitas Seri Senyawa Analog Kurkumin sebagai Antioksidan Menggunakan Deskriptor Berdasarkan Perhitungan Kimia Kuantum*, Tesis S2, Fakultas MIPA, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
13. Wang, J., Niemevs, F., Lad, L., Huang, L., Alvares, D.E., Buldain, G., Poulos, T.L., and de Montellano, P.R.O., 2004, *JBC*, 279 (41), 42593-604.
14. Nakano, T., Kaminuma, T., Uebayasi, M., and Nakata, Y., 2001, *Chem-Bio Inform. J.*, 1 (1), 35-40.
15. Istyastono, E.P., Supardjan, A.M., dan Pranowo, H.D., 2003, *Majalah Farmasi Indonesia*, 14 (3), 107-113.
16. Supardjan, A.M. dan Da'i, M., 2005, *Majalah Farmasi Indonesia*, 16 (2), 100-4.
17. Das, M., Bickers, D. R., and Mukhtar, H., 1984, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120 (2), 427-33.
18. Istyastono, E.P., Sudiby, M., dan Supardjan, A.M., 2002, *Majalah Farmasi Indonesia*, 13 (2), 71-76.