

## **Studi Potensi Antikanker dari Senyawa Bioaktif Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Pendekatan Penambatan Molekuler**

Yohanis Irenius Mandik\*, Agnes Eri Maryuni, Frans Augusthinus Asmuruf

Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Cenderawasih,  
Jayapura 99358

\*Corresponding author: [yimandik@gmail.com](mailto:yimandik@gmail.com)

### **Abstrak**

Mikroalga diketahui memiliki banyak manfaat bagi kesehatan karena kandungan senyawa bioaktifnya sudah terbukti mampu berperan dalam pemeliharaan kesehatan. Pencarian molekul obat baru merupakan tantangan terkini dalam upaya pencegahan penyakit termasuk kanker. Penggunaan metode penambatan molekuler (*molecular docking*) merupakan sarana tepat untuk perancangan dan penemuan obat baru. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan studi penambatan molekuler antara senyawa bioaktif yang berasal dari mikroalga dengan protein reseptor yang bertanggung jawab dalam penyakit kanker. Metode penelitian yang digunakan adalah dengan menggunakan metode penambatan molekuler. Ligan yang digunakan, adalah  $\beta$ -glucan, corymbolone, dan neophytadiene. Protein reseptor yang digunakan adalah KRas (7TLK). Hasil penambatan molekuler menunjukkan bahwa energi ikatan corymbolone dengan 7TLK adalah yang paling rendah (7,0 kkal/mol) bila dibandingkan penambatan ligan  $\beta$ -glucan dan neophytadiene. Nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) untuk ketiga ligan adalah 0 Å. Selain itu, ligan corymbolone memenuhi aturan Lipinski (Ro5), sedangkan ligan  $\beta$ -glucan dan neophytadiene tidak memenuhi aturan Lipinski. Berdasarkan hasil-hasil ini, ligan corymbolone adalah ligan terbaik untuk penambatan molekuler dengan reseptor protein onkogen KRas.

Kata kunci: mikroalga, penambatan molekuler, ligan, reseptor, kanker, KRas

## ***Anticancer Potential Study of Bioactive Compounds of Microalgae *Chlorella* sp. with Molecular Docking Approach***

### **Abstract**

*Microalgae are known to have many health benefits because the content of their bioactive compounds has been proven to play a role in maintaining health. The search for new drug molecules is the latest challenge in efforts to prevent diseases including cancer. The use of molecular docking methods is an appropriate tool for the design and discovery of new drugs. This study aims to conduct molecular binding studies between bioactive compounds derived from microalgae and receptor proteins responsible for cancer. The research method used is to use the molecular docking method. The ligands used were  $\beta$ -glucan, corymbolone, and neophytadiene. The receptor protein used is KRas (7TLK). The results of molecular docking showed that the binding energy of corymbolone with 7TLK was the lowest (7.0 kcal/mol) when compared to the bonding of  $\beta$ -glucan and neophytadiene ligands. The Root Mean Square Deviation (RMSD) value for the three ligands is 0 Å. In addition, the corymbolone ligands comply with the Lipinski rule (Ro5), while the  $\beta$ -glucan and neophytadiene ligands do not comply with the Lipinski rule. Based on these results, corymbolone ligand is the best ligand for molecular docking to the KRas oncogene protein receptor.*

*Keywords: microalgae, molecular docking, ligand, receptor, cancer, KRas*

## PENDAHULUAN

Kanker adalah masalah kesehatan global yang bertanggung jawab atas satu dari enam kematian di seluruh dunia. Pada tahun 2020, diperkirakan terdapat 19,3 juta kasus kanker baru dan sekitar 10 juta kematian akibat kanker secara global. Kanker adalah rangkaian kondisi penyakit yang sangat rumit yang berkembang secara bertahap dengan hilangnya kendali pertumbuhan secara umum. Hanya ada beberapa pilihan pengobatan kanker untuk pasien selama beberapa dekade yang meliputi pembedahan, terapi radiasi, dan kemoterapi sebagai pengobatan tunggal atau dalam kombinasi. Namun baru-baru ini, banyak jalur yang terlibat dalam perkembangan terapi kanker dan bagaimana mereka dapat ditargetkan telah meningkat secara dramatis, dengan strategi kombinatorial, yang melibatkan beberapa terapi bertarget atau kemoterapi "tradisional". Pendekatan baru, seperti obat-obatan, molekul biologis, dan terapi yang dimediasi kekebalan, digunakan untuk pengobatan bahkan jika tingkat terapi yang dikecualikan belum tercapai yang menahan angka kematian dan mengurangi waktu kelangsungan hidup yang lama untuk kanker metastatik.

Ras, dari "virus sarkoma tikus", adalah keluarga protein terkait yang diekspresikan dalam semua garis keturunan dan organ sel hewan. Semua anggota keluarga protein Ras milik kelas protein yang disebut GTPase kecil, dan terlibat dalam mentransmisikan sinyal di dalam sel (transduksi sinyal seluler). Ras adalah anggota prototipe protein superfamili Ras, yang semuanya terkait dalam struktur tiga dimensi dan mengatur perilaku sel yang beragam (Malumbres and Barbacid, 2003).

Ketika Ras 'diaktifkan' oleh sinyal yang masuk, ia kemudian mengaktifkan protein lain, yang pada akhirnya mengaktifkan gen yang terlibat dalam pertumbuhan, diferensiasi, dan kelangsungan hidup sel. Mutasi pada gen Ras dapat menyebabkan produksi protein Ras yang diaktifkan secara permanen, yang dapat menyebabkan pensinyalan yang tidak diinginkan dan terlalu aktif di dalam sel, bahkan saat tidak ada sinyal yang masuk. Karena sinyal-sinyal ini menghasilkan pertumbuhan dan pembelahan sel, pensinyalan Ras yang terlalu aktif pada akhirnya dapat menyebabkan kanker (Downward, 2003). Ketiga gen Ras pada manusia (HRAS, KRAS, dan NRAS) adalah onkogen yang paling umum pada kanker manusia; mutasi yang mengaktifkan Ras secara permanen ditemukan pada 20 hingga 25% dari semua tumor manusia dan hingga 90% pada jenis kanker tertentu (misalnya, kanker pankreas) (Goodsell, 1999). Untuk alasan ini, penghambat Ras sedang dipelajari sebagai pengobatan untuk kanker dan penyakit lain dengan ekspresi berlebih Ras.

Meskipun banyak obat antikanker yang dirancang baru dapat memperpanjang waktu kelangsungan hidup pasien, efek samping yang substansial dari obat ini biasanya sangat membahayakan kualitas hidup pasien. Kemoterapi biasanya merupakan pengobatan lini pertama untuk menyembuhkan kanker; obat tersebut mampu menghancurkan atau setidaknya menghambat pertumbuhan sel kanker. Obat-obatan ini digabungkan melalui rasa sakit yang berkisar dari reaksi ringan hingga penyakit parah yang mengancam jiwa. Banyak efek samping dari obat kemoterapi antara lain kebotakan, dan hilangnya nafsu makan. Oleh karena itu agen antikanker baru harus diselidiki dari berbagai sumber (Basak *et al.* 2022).

Tumbuhan telah menjadi sumber penting obat konvensional dan berharga secara klinis untuk pengobatan berbagai bentuk tumor. Investigasi tanaman untuk agen antikanker yang efektif dengan efek samping yang cukup rendah tampaknya memberikan strategi pengembangan obat antikanker yang menarik. Banyak amalgam antitumor alami atau produk sampingannya umumnya diproduksi oleh alga dan mikroalga (Cui *et al.* 2020).

Beberapa investigasi telah berkonsentrasi pada tindakan biologis fitokimia yang berasal dari tanaman tetapi sangat sedikit tentang fitokimia yang berasal dari mikroalga. Fitokimia yang berasal dari mikroalga memiliki aktivitas biologis yang lebih potensial daripada asal terestrial (fitokimia tumbuhan). Mikroalga memiliki bermacam-macam kelas fenolik yang cukup berbeda dengan banyak spesies tumbuhan lain (tanaman obat, buah-buahan, dan sayur-sayuran). Kandungan klorofil dan karotenoid lebih tinggi pada mikroalga daripada beberapa tanaman. Mengenai plastisitas metabolik, mikroalga menunjukkan keunggulan kompetitif tambahan; metabolisme sekunder dapat ditingkatkan dengan banyak jenis stres eksternal yang diterapkan. Selain itu, manfaat farmasi yang sangat baik dapat diperoleh dari senyawa mikroalga, yang ditandai dengan reaksi selektif dengan berbagai target molekuler seperti agen antiinflamasi, antivirus, dan antikanker. Selain itu, mikroalga mendapat

perhatian besar karena sifat antioksidan dan antimikrobanya; yang mungkin disebabkan oleh konsentrasinya yang lebih tinggi dari berbagai isoform fitokimia (polisakarida, karotenoid, dan asam lemak) (El-fayoumy *et al.* 2021; de Morais *et al.* 2015).

Penemuan obat baru telah diakui sebagai proyek yang rumit, mahal, memakan waktu, dan menantang. Diperkirakan sekitar 12 tahun dan sekitar 2,7 miliar USD, telah dihabiskan untuk penemuan obat baru melalui jalur pengembangan obat tradisional. Bagaimana cara mengurangi biaya penelitian dan mempercepat proses pengembangan penemuan obat baru telah menjadi pertanyaan yang menantang dan mendesak bagi industri farmasi. Penemuan obat berbantuan komputer telah muncul sebagai teknologi yang kuat dan menjanjikan untuk desain obat yang lebih cepat, lebih murah, dan lebih efektif. Pertumbuhan pesat alat komputasi untuk penemuan obat, termasuk terapi antikanker, telah menunjukkan dampak yang signifikan dan luar biasa pada desain obat antikanker, dan juga memberikan wawasan yang bermanfaat ke dalam bidang terapi kanker. Penggunaan metode penambatan molekuler (*molecular docking*) menjadi sarana tepat untuk tujuan penemuan obat baru (Cui *et al.* 2020, Li *et al.* 2022).

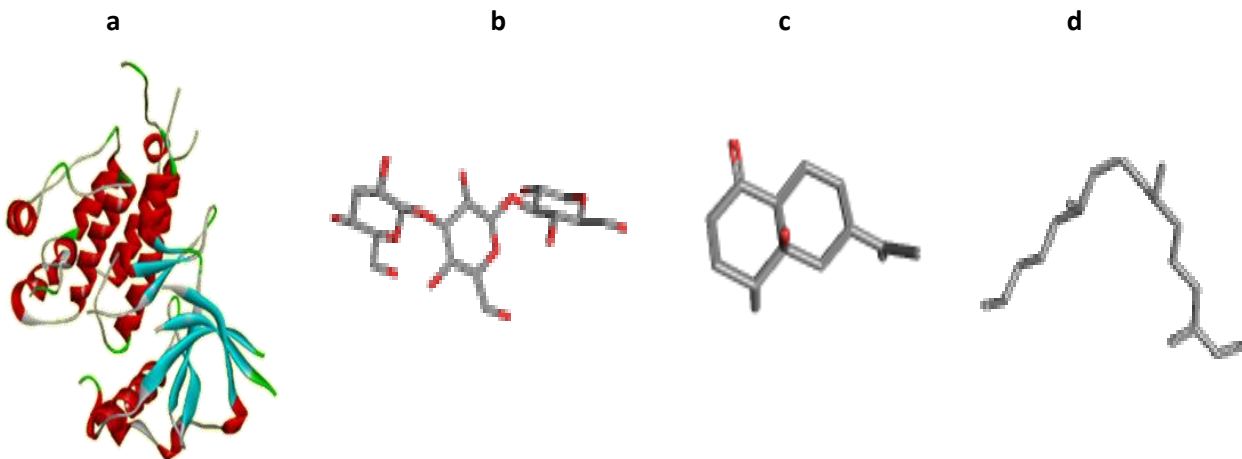
Oleh karena itu, dalam penelitian ini hendak diselidiki potensi antikanker dari beberapa senyawa bioaktif yang terdapat dalam mikroalga khususnya dari *Chlorella* sp. melalui pendekatan penambatan molekuler (*molecular docking*).

## BAHAN DAN METODE

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah seperangkat laptop dengan spesifikasi Intel® Pentium® Silver N6000 @1,1GHz, RAM 4GB, 64-bit operating system, x64-based processor, Windows 11 Home Single Language. Database yang digunakan bersumber dari PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) serta Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>).

Bahan penelitian ini adalah struktur 3 dimensi protein onkogen dengan PDB ID 7TLK (Gambar 1a), serta sebagai ligan digunakan adalah struktur 3 dimensi dari  $\beta$ -glukan (Gambar 1b), Corymbolone (Gambar 1c), dan Neophytadiene (Gambar 1d), yang diperoleh dari PubChem.



**Gambar 1.** Reseptor dan ligan yang digunakan; (a) Reseptor 7TLK, (b)  $\beta$ -glukan; (c) corymbolone; (d) neophytadiene

### Metode

#### Preparasi Ligan dan Reseptor

Metode penambatan molekuler diawali dengan preparasi dari ligan yang akan digunakan. Preparasi ligan dilakukan dengan menggunakan piranti lunak PyRX. Ligan diunduh dari PucChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), dan disimpan dalam format SDF (\*.sdf). Ligan dipreparasi dengan meminimalkan energi ligan dan mengubah formatnya menjadi PDBQT (\*.pdbqt).

Selanjutnya dilakukan preparasi reseptor atau protein target. Protein yang menjadi target dalam penelitian ini adalah protein K-Ras, suatu onkogen yang paling umum dalam tubuh manusia, dengan PDB ID adalah 7TLK, yang diunduh dalam format pdb pada Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Reseptor dibersihkan dari molekul air dan ligan lain yang tidak diperlukan menggunakan *Biovia Discovery Studio Visualizer* (BDS) dan dilanjutkan dengan PyRX. Reseptor yang sudah dibersihkan disimpan dalam format PDB (\*.pdb).

### **Penambatan Molekuler dan Visualisasi Hasil**

Penambatan molekuler dilakukan dengan menggunakan PyRX-Vina. Reseptor 7TLK yang sudah dibersihkan dalam proses sebelumnya digunakan sebagai makromolekul dibuka dengan PyRX. Kemudian pada 7TLK diklik kanan untuk menambahkan ligan yang dipilih. Penambatan dimulai dengan memilih menu *Vina Wizard*. Hasil akan ditampilkan dalam menu *table analyze result*.

Visualisasi hasil penambatan molekuler dilakukan dengan menggunakan program *BDS*. Interaksi dan ikatan yang terjadi pada sisi aktif serta asam-asam amino yang terlibat ditampilkan dalam diagram 2D.

### **Aturan Lipinski (Lipinski Rule of Five, Ro5)**

Aturan Lipinski (Ro5) dilakukan untuk menganalisis kemiripan obat dari ligan yang dipilih. Analisis Ro5 dilakukan melalui website SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) dengan mengisikan data SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*) setiap ligan yang digunakan yang diperoleh dari data ligan yang ada di PUBCHEM.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Energi pengikatan dan validasi penambatan molekuler**

Hasil penambatan molekuler antara ligan-ligan senyawa bioaktif yang diisolasi dari mikroalga *Chlorella* sp. Terhadap reseptor onkogen manusia 7TLK dapat dilihat dalam Tabel 1. Skor penambatan ini menunjukkan nilai energi per unit molekul yang dapat mewakili energi pengikatan ligan terhadap protein target. Semakin rendah nilai energi pengikatan, maka semakin tinggi afinitas ligan terhadap target. Hal ini menunjukkan bahwa kompleks pengikatan ligan semakin baik terhadap protein target.

**Tabel 1.** Nilai skor penambatan (*binding energy*) dan RMSD untuk ligan dengan reseptor 7TLK

Metabolit/Ligan	PubChem ID	<i>Binding energy</i> (kkal/mol)	RMSD (Å)
$\beta$ -glucan	64689	-6,1	0
Corymbolone	178931	-7,0	0
Neophytadiene	10446	-4,8	0

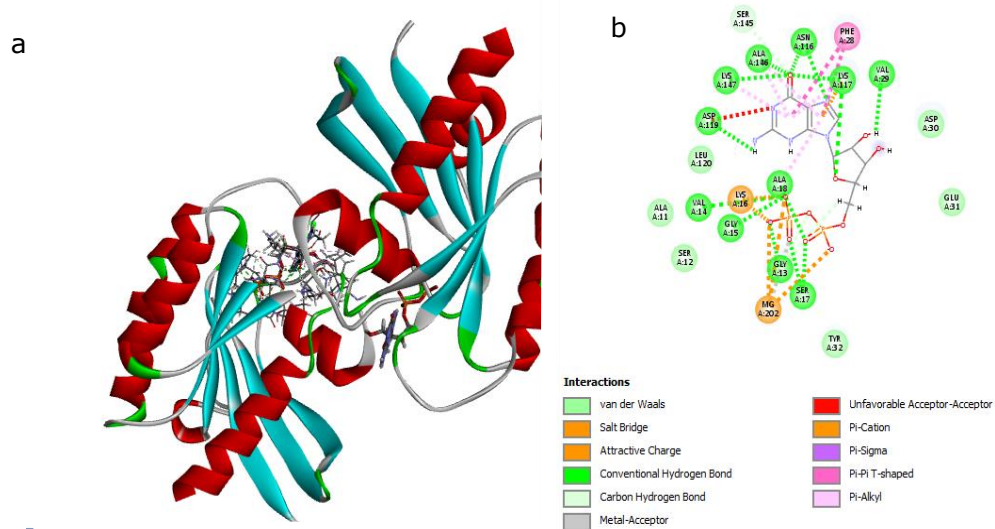
Berdasarkan Tabel 1, terlihat bahwa ligan Corymbolone memiliki nilai *binding energy* yang lebih kecil dibandingkan nilai *binding energy* dari  $\beta$ -glucan dan neophytadiene. Hal ini menunjukkan bahwa corymbolone memiliki afinitas yang paling tinggi terhadap reseptor target 7TLK. Perbedaan nilai *binding energy* dapat terjadi karena adanya perbedaan jenis ikatan yang dimiliki suatu konformasi penambatan. Ikatan hidrogen paling mempengaruhi nilai *binding energy* karena memiliki energi yang lebih kuat dibandingkan interaksi hidrofobik. Untuk mencapai kestabilan, maka ligan dan reseptor akan cenderung berinteraksi pada tingkat energi paling rendah (Badawy *et al.*, 2019).

Validasi metode dilakukan dengan mengukur nilai *root mean square deviation* (RMSD). Nilai ini menunjukkan perbandingan sudut ligan asli dengan ligan hasil dari penambatan molekuler. Data dalam Tabel 1 menunjukkan bahwa nilai RMSD semua ligan adalah 0Å. Nilai RMSD dari penelitian ini menunjukkan bahwa metode tersebut valid dan dapat digunakan lebih lanjut, karena memiliki nilai RMSD  $\leq 2\text{Å}$  (Kufareva dan Abagyan, 2012).

Ligan yang digunakan dalam penelitian ini adalah  $\beta$ -glucan, corymbolone, dan neophytadiene. Ketiganya adalah senyawa aktif yang diisolasi dari mikroalga laut *Chlorella* sp. Senyawa bioaktif  $\beta$ -glucan adalah suatu imunostimulator aktif yang mengurangi radikal bebas dan menurunkan kadar kolesterol darah. Kemanjuran senyawa ini terhadap tukak lambung, luka, dan sembelit telah dilaporkan. Selain itu,  $\beta$ -glucan telah terbukti mampu mencegah aterosklerosis, hiperkolesterolemia, dan memiliki aktivitas antitumor (Spolaore *et al.* 2006). Sementara itu, corymbolone dan neophytadiene memiliki aktivitas antioksidan dan antimikroba (Azzaz *et al.*, 2014; Sosa *et al.*, 2016).

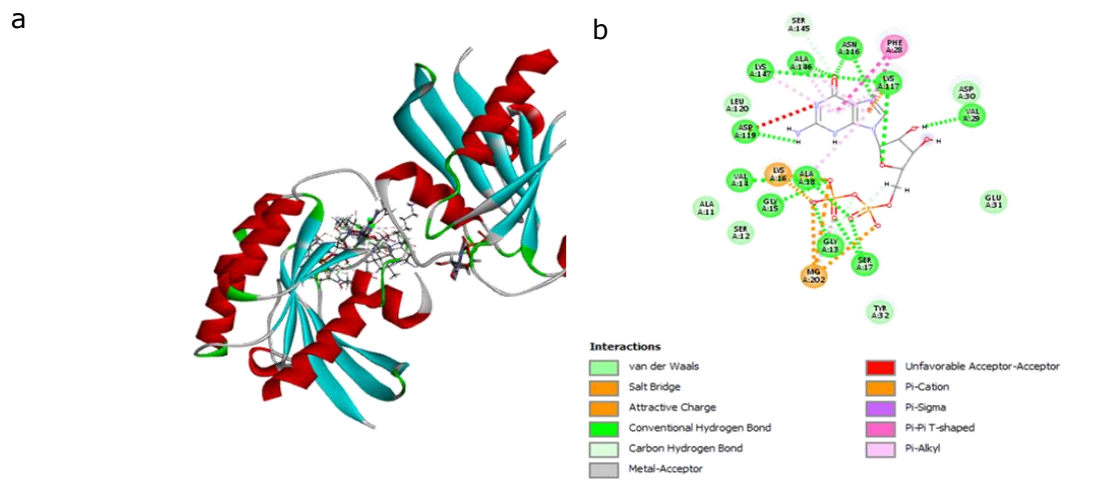
### Visualisasi hasil penambatan molekuler

Visualisasi hasil penambatan molekuler yang menunjukkan interaksi antara ligan dengan reseptor dilakukan dengan menggunakan BDS. Visualisasi interaksi antara ligan  $\beta$ -glucan, corymbolone, dan neophytadiene dengan 7TLK berturut-turut ditampilkan dalam Gambar 2, 3, dan 4. Visualisasi interaksi ligan dan reseptor ditampilkan dalam bentuk 2D dan 3D.



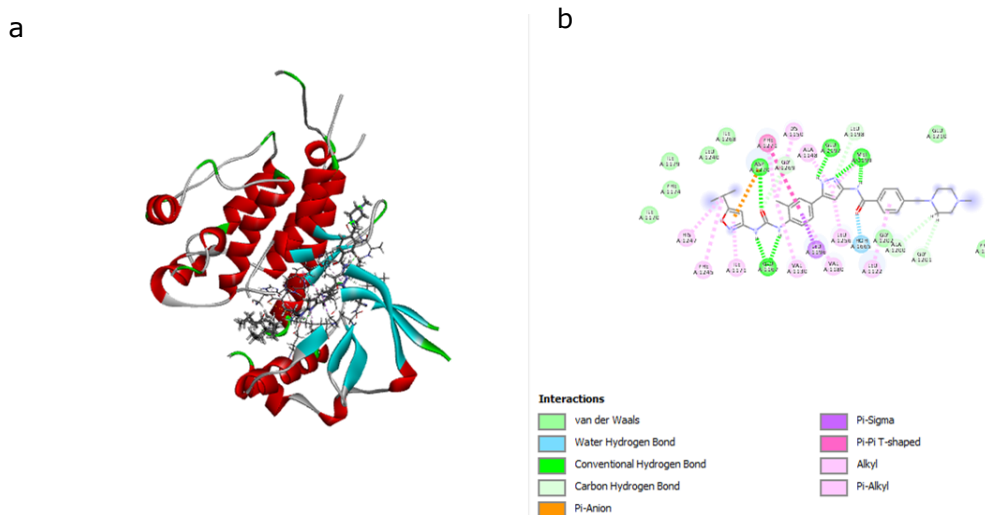
**Gambar 2.** Visualisasi interaksi ligan  $\beta$ -glucan dengan reseptor 7TLK (a) 3D dan (b) 2D

Gambar 2 menunjukkan interaksi ligan  $\beta$ -glucan dengan reseptor 7TLK. Berdasarkan visualisasi 2D, terlihat adanya ikatan hidrogen antara ligan dengan GLY13, VAL14, GLY15, SER17, ALA18, VAL29, ASN116, LYS117, ASP119, ALA146, dan LYS147. Interaksi lainnya yang terlihat dimiliki ligan  $\beta$ -glucan dengan reseptor 7TLK adalah interaksi Van der Waals, pi-kation, pi-sigma, pi-alkil, pi-pi T-shaped, dan terlihat adanya jembatan garam. Adanya ikatan hidrogen dan interaksi lainnya mempengaruhi nilai *binding energy*. Dalam hal ini, untuk interaksi glucan dengan 7TLK menghasilkan nilai *binding energy* sebesar 6,1 kkal/mol.



**Gambar 3.** Visualisasi interaksi ligan corymbolone dengan reseptor 7TLK (a) 3D dan (b) 2D

Gambar 3 menunjukkan interaksi ligan corymbolone dengan reseptor 7TLK. Interaksi ini terlihat memiliki kemiripan dengan interaksi antara ligan  $\beta$ -glucan dengan reseptor 7TLK pada Gambar 2 sebelumnya. Kemiripan terlihat pada residu asam-asam amino pada reseptor 7TLK yang memiliki ikatan hidrogen dengan ligan corymbolone adalah sama dengan yang berinteraksi pada ligan  $\beta$ -glucan. Namun, nilai *binding energy* yang dimiliki oleh ligan corymbolone (7,0 kkal/mol) lebih rendah dibandingkan ligan  $\beta$ -glucan (6,1 kkal/mol), Hal ini dapat disebabkan karena ligan  $\beta$ -glucan memiliki bobot molekul yang lebih besar (472,44 g/mol) dibandingkan dengan corymbolone (236,35 g/mol). Selain itu, jumlah atom oksigen pada ligan  $\beta$ -glucan lebih banyak bila dibandingkan dengan ligan corymbolone. Jumlah atom oksigen yang lebih banyak akan meningkatkan jumlah ikatan hidrogen sehingga dapat meningkatkan nilai *binding energy*.



**Gambar 4.** Visualisasi interaksi ligan neophytadiene dengan reseptor 7TLK (a) 3D dan (b) 2D

Gambar 4 menunjukkan interaksi ligan neophytadiene dengan reseptor 7TLK. Berdasarkan visualisasi 2D, terlihat adanya ikatan hidrogen antara ligan dengan GLU1194, VAL1199, ASP1270, GLU1164. Interaksi lainnya yang terlihat dimiliki ligan neophytadiene dengan reseptor 7TLK adalah interaksi Van der Waals, pi-anion, pi-sigma, alkil, pi-alkil, dan pi-pi T-shaped. Adanya ikatan hidrogen dan interaksi lainnya mempengaruhi nilai *binding energy*.

Dalam hal ini, untuk interaksi neophytadiene dengan 7TLK menghasilkan nilai *binding energy* sebesar 4,8 kkal/mol. Nilai *binding energy* ini paling tinggi bila dibandingkan dengan ligan  $\beta$ -glucan dan corymbolone. Hal ini dapat disebabkan karena kurangnya ikatan hidrogen yang terbentuk dalam interaksi ligan neophytadiene dengan 7TLK.

### Aturan Lipinski (Ro5)

Lipinski's rule of five (Ro5) adalah suatu pedoman yang mengatur kemiripan suatu molekul target untuk dijadikan obat (*drug-likeness*). Lima aturan yang harus dipenuhi suatu molekul supaya bisa dijadikan kandidat obat, adalah bobot molekul  $\leq 500$  g/mol, jumlah donor ikatan hidrogen  $\leq 5$ , akseptor ikatan hidrogen  $\leq 5$ ,  $\log P \leq 5$ . Log P menyatakan koefisien kelarutan lemak/air dengan rentang -0,4 hingga 5 (Lipinski *et al.* 2001). Hasil analisis aturan Lipinski Ro5 ini ditampilkan dalam Tabel 2 berikut.

No	Ligan	Bobot molekul (g/mol)	Donor ikatan hidrogen	Akseptor ikatan hidrogen	Log P	Violation
1	$\beta$ -glucan	472,44	9	14	1,67	2
2	Corymbolone	236,35	1	2	2,60	0
3	Neophytadiene	278,52	0	0	5,05	1

Berdasarkan Tabel 2, terlihat bahwa ligan Corymbolone memenuhi aturan Lipinski (Ro5), yaitu bobot molekul  $\leq 500$  g/mol, jumlah donor ikatan hidrogen  $\leq 5$ , akseptor ikatan hidrogen  $\leq 5$ ,  $\log P \leq 5$ . sehingga ligan corymbolone memiliki sifat kemiripan (*drug-likeness*) paling sesuai dengan Ro5. Ligan  $\beta$ -glucan tidak memenuhi aturan Lipinski karena memiliki 2 *violation*, yaitu donor ikatan hidrogennya 9 dan akseptor hidrogennya 14. Ligan neophytadiene tidak memenuhi aturan Ro5, karena nilai Log P-nya sebesar 5,05 berada di atas ketentuan, yaitu  $\leq 5$ .

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ligan corymbolone adalah yang paling mungkin untuk dilanjutkan penelitiannya sebagai anti kanker, karena penambatan molekulernya memiliki *binding energy* yang paling rendah, nilai RMSD memenuhi syarat ( $\leq 2\text{\AA}$ ), serta memenuhi aturan Lipinski Ro5.

## KESIMPULAN

Hasil studi penambatan molekuler antara ligan yang berasal dari senyawa bioaktif mikroalga *Chlorella* sp. terhadap protein reseptor onkogen 7TLK menunjukkan bahwa ligan corymbolone memiliki energi pengikatan paling rendah, yaitu sebesar 7,0 kkal/mol. Selain itu nilai RMSD dari corymbolone adalah 0  $\text{\AA}$  serta memenuhi syarat aturan Lipinski. Hal ini menunjukkan potensi corymbolone untuk dijadikan kandidat obat antikanker.

## DAFTAR PUSTAKA

- Azzaz, N.A.E., El-Khateeb, A.Y., Farag, A.A. 2014. Chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cyperus articulates*. International Journal of Academic Research, 6: 265–269.
- de Morais, M.G., Vaz, Bd.S., de Morais, E.G., and Costa, J.A.V. 2015. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. Biomedical Research International. 435265.
- Downward, 2003. Targeting RAS signaling pathways in cancer therapy. Nature Review Cancer. 3(1): 11-22.
- Goodsell, D.S. 1999. The molecular perspective: the ras oncogene. Oncologist. 4(3): 263-264.



Kalalo, M. J., Fatimawali., Kalalo, T., and Rambli, C. I. J. 2020. Tea Bioactive Compounds as Inhibitor of MRSA Penicillin Binding Protein 2a (PBP2a): A Molecular Docking Study. *Pharmacy Medical Journal*, 3(2): 70-75.

Li, K., Du, Y., Li, L., and Wei, D.Q. 2019/Bioinformatics Approaches for Anti-cancer Drug Discovery. *Current Drug Targets*, 21: 3-17.

Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 3-26.

Malumbres, M. and Barbacid, M. 2003. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature Review Cancer*. 3(6): 459-465.

Sosa, A.A., Bagi, S.H., and Hameed, I.H. 2016. Analysis of bioactive chemical compounds of *Euphorbia lathyrus* using gas chromatography-mass spectrometry and Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal Pharmacognosy and Phytotherapy*, 8: 109-26.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., and Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2): 87-96.