

In Silico Study of Flavonoid Derivative Compounds against ER- α as Anticancer

Deden I. Dinata^{1,2*}, Fauzan Z. Muttaqin¹, Jajang J. Sodik¹, Abdul M. Irfani¹, Yunan N. Binawan¹

¹Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana, Bandung, Indonesia

²Yayasan Intiqomah Sejahtera, Lembaga Pendidikan, Riset dan Sosial Keagamaan, Kabupaten Bandung Barat, Indonesia

Abstract

In Indonesia, there are 65,858 cases of breast cancer, with a mortality rate of 22,430. The first-line treatment for breast cancer involves the use of Selective Estrogen Receptor Modulators (SERM), one of which is Tamoxifen. Flavonoid derivatives have been pharmacologically proven effective in cancer treatment and can induce cell apoptosis. The study was conducted on 103 flavonoid derivatives using molecular docking and molecular dynamics simulation methods with autodock version 4.2.3, with K_i and ΔG observation parameters, while molecular dynamics simulations used AMBER 18 software with RMSD, RMSF, and MMGBSA and hydrogen bond parameters. From the molecular docking results, the compounds scutellarein, maritimetin, baicalein, maesopsin, formononetin, calycosin, pratensein, biochanin A, sulfuretin, and eriodictiol showed potential as ER α antagonists with better K_i values than the natural ligand. Based on molecular dynamics simulation parameters, the binding stability and antagonistic activity of these flavonoid derivatives against ER α were comparable but slightly lower than tamoxifen molecular dynamics simulation analysis revealed that although these flavonoid compounds showed promising K_i values, their overall interaction stability with ER α was less favorable compared to tamoxifen as evidenced by their combined molecular dynamics parameters.

Keywords: ER α , flavonoids, molecular docking, molecular dynamics, tamoxifen.

Kajian *In Silico* Senyawa Turunan Flavonoid Terhadap ER- α Sebagai Antikanker Payudara

Abstrak

Di Indonesia, terdapat 65.858 kasus kanker payudara dengan angka kematian 22.430 jiwa. Pengobatan lini pertama kanker payudara melibatkan penggunaan *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERM), salah satunya adalah Tamoxifen. Turunan flavonoid telah terbukti secara farmakologi efektif dalam pengobatan kanker dan dapat menginduksi apoptosis sel. Penelitian dilakukan terhadap 103 turunan flavonoid menggunakan metode simulasi molecular docking dan dinamika molekul dengan *Autodock* versi 4.2.3, dengan parameter observasi K_i dan ΔG , sedangkan simulasi dinamika molekul menggunakan aplikasi AMBER 18 dengan parameter RMSD, RMSF, dan MMGBSA serta ikatan hidrogen. Berdasarkan hasil penambatan molekuler, senyawa *scutellarein*, *maritimetin*, *baicalein*, *maesopsin*, *formononetin*, *calycosin*, *pratensein*, *biochanin A*, *sulfuretin*, dan *eriodictiol* menunjukkan potensi sebagai antagonis ER α dengan nilai K_i yang lebih baik dibandingkan ligan alami. Berdasarkan parameter simulasi dinamika molekul, stabilitas pengikatan dan aktivitas antagonis dari turunan flavonoid ini terhadap ER α sebanding namun sedikit lebih rendah dibandingkan tamoxifen. Analisis simulasi dinamika molekul mengungkapkan bahwa meskipun senyawa flavonoid ini menunjukkan nilai K_i yang menjanjikan, stabilitas interaksi keseluruhan senyawa-senyawa ini dengan ER α kurang menguntungkan dibandingkan tamoxifen, seperti yang ditunjukkan oleh parameter dinamika molekul gabungan.

Kata Kunci: Dinamika molekul, ER- α , flavonoid, penambatan molekul, tamoxifen.

Article History:

Submitted 17 December 2024

Revised 31 January 2025

Accepted 06 February 2025

Published 23 May 2025

*Corresponding author:

deden.indradinata@bku.ac.id

Citation:

Dinata, D.I.; Muttaqin, F.Z.; Sodik, J.J.; Irfani, A.M.; Binawan, Y.M. *In Silico* Study of Flavonoid Derivative Compounds against ER- α as Anticancer. Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2025: Vol. 12 suppl. 2 :166-175.

1. Pendahuluan

Kanker adalah salah satu penyebab utama kematian di seluruh dunia, dan kanker payudara menjadi salah satu jenis kanker yang paling umum. Kanker payudara disebabkan oleh kerusakan genetik pada sel, yang mengarah pada pembelahan sel yang tidak terkendali dan proliferasi sel yang abnormal. Data dari GLOBOCAN pada tahun 2020 menunjukkan bahwa terdapat 2,2 juta kasus kanker payudara di seluruh dunia, dengan angka kematian mencapai 684.996.¹ Di Indonesia, kanker payudara adalah kanker yang paling sering terjadi, dengan 65.858 kasus dan 22.430 kematian.¹ Hal ini menunjukkan betapa pentingnya upaya pencegahan dan pengobatan kanker payudara.

Pengobatan yang umum digunakan untuk kanker payudara adalah tamoxifen, yang berfungsi sebagai modulator reseptor estrogen selektif. Tamoxifen menghentikan estrogen untuk berikatan dengan reseptor sensitif di jaringan payudara, sehingga efektif dalam pengobatan karsinoma reseptor positif. Namun, penggunaan tamoxifen juga memiliki risiko, seperti meningkatkan kemungkinan hiperplasia dan neoplasia endometrium. Oleh karena itu, diperlukan alternatif pengobatan yang lebih aman dan efektif untuk menangani kanker payudara.²

Fitokimia, khususnya flavonoid, berperan penting dalam mencegah kanker dengan mengatur proliferasi sel dan jalur sinyal apoptosis. Flavonoid adalah senyawa polifenol yang terdapat dalam berbagai bahan alam, seperti tanaman, buah-buahan, dan sayuran. Senyawa ini memiliki aktivitas antikanker melalui beberapa mekanisme, termasuk penghambatan karsinogenesis, inhibisi siklus sel, dan penghambatan angiogenesis.^{2,3} Dengan demikian, flavonoid memiliki potensi untuk digunakan dalam terapi kanker.

Reseptor estrogen alfa (ER- α) berperan signifikan dalam perkembangan kanker payudara, di mana peningkatan ekspresi reseptor ini dapat berkontribusi hingga 70% kasus kanker payudara. Reseptor ini berfungsi sebagai antagonis yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker, dan produksi estrogen yang tinggi akan berikatan dengan reseptor ini di jaringan payudara. Karena ER- α lebih umum ditemukan di jaringan payudara dan memiliki afinitas tinggi terhadap estrogen, reseptor ini menjadi target yang menarik untuk pengembangan obat baru dalam pengobatan kanker payudara.⁴

Dalam konteks penelitian ini, pemodelan molekul untuk desain obat komputasi menjadi pendekatan yang sangat bermanfaat. Metode *in silico*, termasuk penambatan molekul dan dinamika molekul, memungkinkan peneliti untuk mengidentifikasi dan

mengoptimalkan senyawa calon obat dengan lebih efisien. Pendekatan ini dapat mempercepat proses identifikasi senyawa dengan afinitas tinggi terhadap target, yang penting dalam pengembangan obat baru.⁵ Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi afinitas dan interaksi senyawa turunan flavonoid dengan ER- α serta menganalisis stabilitas interaksi tersebut melalui simulasi dinamika.

Senyawa dari tumbuhan, terutama flavonoid, memainkan peran penting dalam pencegahan kanker dengan mengatur proliferasi sel dan jalur pensinyalan apoptosis. Flavonoid adalah senyawa polifenolik yang ditemukan dalam berbagai bahan alami, seperti tanaman, buah-buahan, dan sayuran. Koneksi ini memiliki aktivitas antikanker melalui berbagai mekanisme, termasuk menghambat karsinogenesis, menghambat sirkulasi sel, dan menghambat angiogenesis. Dalam penelitian ini, senyawa turunan flavonoid yang diperoleh dari database PubChem dipilih berdasarkan kemiripan struktur dengan senyawa flavonoid alami yang telah diketahui memiliki aktivitas antikanker.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mencari senyawa turunan flavonoid yang memiliki afinitas dan interaksi yang baik dengan ER- α sebagai kandidat antiestrogen dalam pengobatan kanker payudara. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi signifikan dalam menemukan senyawa baru yang berpotensi dikembangkan sebagai obat kanker, terutama bagi pasien kanker payudara. Dengan fokus pada pengembangan senyawa yang lebih aman dan efektif, penelitian ini dapat berkontribusi pada upaya global untuk mengurangi angka kematian akibat kanker payudara dan meningkatkan kualitas hidup pasien.

2. Metode

Penelitian ini menggunakan metode penambatan molekul dan simulasi dinamika molekul untuk mengeksplorasi interaksi senyawa uji dengan protein target. Tahapan dimulai dengan skrining senyawa uji yang diambil dari database PubChem, diikuti dengan optimasi geometri menggunakan aplikasi Gaussian dengan metode DFT, fungsi B3LYP, dan basis set 6-31G. Protein target diperoleh dari Protein Data Bank (PDB ID 3ERT) dan validasi penambatan molekul dilakukan dengan menghitung nilai RMSD, yang dianggap baik jika <2 , menggunakan aplikasi Autodock. Setiap senyawa uji kemudian dianalisis untuk menentukan energi bebas ikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi (K_i). Senyawa terbaik selanjutnya diuji dalam simulasi dinamika molekul menggunakan aplikasi Amber 18, meliputi preparasi, topologi, minimisasi, dan simulasi selama 100 ns

untuk menganalisis kestabilan interaksi dengan memperhatikan nilai RMSD, RMSF, MMGBSA, dan ikatan hidrogen.

2.1. Alat

Penelitian ini menggunakan perangkat keras berupa komputer dengan spesifikasi sistem Linux Ubuntu 16.04 LTS, processor Intel Core i7-6700K CPU @4.00GHz x 8, Graphics GeForce 1070 Ti/PCie/SSE2, OS type 64-bit, disc 475,3 GB, dan memori 61,4 GB. Selain itu, perangkat lunak yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Autodock* versi 4.2.3, *AMBER 18*, *ChemBio Office 2014*, *Discovery Studio Visualizer 2016*, *Gaussian09*, dan *Gauss View 5.0.8*.

2.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini seperti struktur reseptor target yaitu reseptor estrogen alfa (ER- α) yang terdapat pada website Protein Data Bank www.rcsb.org dalam bentuk file protein data bank (*.pdb) dengan kode PDB 3ERT, struktur ligan uji yaitu senyawa turunan flavonoid sebanyak 103 senyawa yang diperoleh dari *Pubchem database* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam bentuk file senyawa (*.sdf), serta ligan alami yaitu tamoxifen.

2.3. Prosedur

Penelitian ini melibatkan prosedur yang sistematis untuk mempersiapkan protein target, ligan, dan melakukan simulasi dinamika molekul. Preparasi protein target dilakukan pada reseptor estrogen alfa (ER- α) dengan kode PDB 3ERT. Proses ini mencakup pemisahan ligan alami dari protein dan penghapusan molekul air menggunakan aplikasi *Discovery Studio*, diakhiri dengan penyimpanan hasil dalam format yang sesuai untuk proses lebih lanjut.

Setelah preparasi protein, penelitian berlanjut dengan persiapan 103 ligan senyawa uji, yang melibatkan pembuatan struktur 2D dan 3D menggunakan program *Chemdraw* pada aplikasi *ChemOffice*. Sifat fisikokimia dari setiap ligan ditentukan untuk mendapatkan informasi seperti koefisien partisi (LogP) dan jumlah donor serta akseptor ikatan hidrogen, menggunakan aplikasi *Chemoffice*. Tahapan ini penting untuk menilai potensi aktivitas biologis senyawa yang diuji.

Tahapan optimasi geometri dilakukan dengan perangkat lunak *Gaussian09* untuk mendapatkan konformasi ligan terbaik dengan energi ikatan terendah. Nilai HOMO-LUMO, gap energi, dan total energi dicatat untuk analisis lebih lanjut. Validasi metode *molecular docking* kemudian dilakukan

dengan menggunakan *Autodock*, di mana ligan alami di-*docking* kembali ke protein target untuk memastikan akurasi metode, diukur melalui nilai RMSD yang harus di bawah 2Å.

Setelah validasi, tahap simulasi docking dilakukan untuk mengevaluasi interaksi antara ligan uji dan protein target, dengan hasil yang mencakup energi bebas ikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi (Ki). Energi ikatan yang rendah menunjukkan interaksi yang lebih kuat dan stabil, yang kemudian dianalisis lebih lanjut dengan aplikasi *Discovery Studio Visualizer* untuk memahami interaksi antara ligan dan reseptor.

Simulasi dinamika molekul dilakukan pada senyawa terbaik yang dihasilkan dari simulasi docking, menggunakan *AMBER* versi 18 untuk memeriksa stabilitas interaksi dalam kondisi fisiologis. Parameter yang dianalisis termasuk RMSD, RMSF, MMGBSA, dan ikatan hidrogen, untuk mendapatkan gambaran yang jelas tentang dinamika interaksi antara ligan dan reseptor.

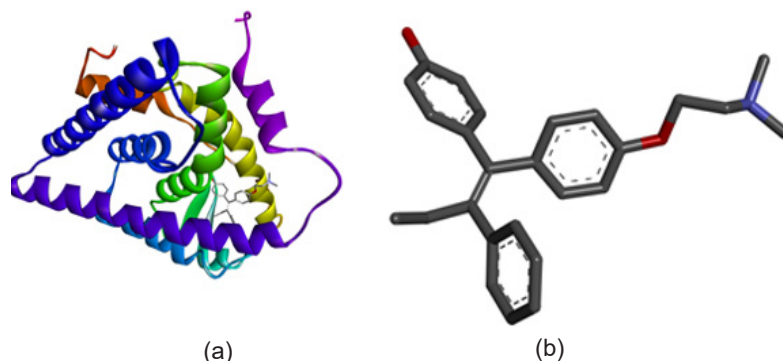
Tahapan dalam simulasi dinamika molekul meliputi persiapan berkas, topologi, solvasi, netralisasi, minimisasi energi, ekuilibrasi, dan produksi. Setiap tahap memiliki tujuan tertentu, seperti memastikan sistem stabil, menghindari bentrokan atom, dan menyiapkan kondisi yang sesuai untuk simulasi. Proses ini memastikan bahwa simulasi dapat dilakukan dalam keadaan yang mendekati kondisi fisiologis tubuh manusia.

Proses minimisasi energi penting untuk menghindari bentrokan antara atom dalam protein, sementara ekuilibrasi menstabilkan suhu dan tekanan sistem sebelum simulasi berlangsung. Setelah semua parameter diperiksa dan dinyatakan siap, proses produksi dilakukan untuk mendapatkan hasil akhir dari simulasi dinamika molekul, yang mencerminkan interaksi antara ligan dan protein target.

3. Hasil

3.1. Preparasi Protein Target

Penelitian ini menggunakan reseptor estrogen alfa (ER- α) sebagai protein target, yang diunduh dari *Protein Data Bank* (PDB) dengan kode 3ERT, mewakili struktur kristal dari *human estrogen receptor alpha ligand-binding domain* dalam kompleks dengan 4-hydroxytamoxifen dengan resolusi 1,9 Å. Protein ini dipilih karena berperan sebagai antagonis dan sesuai untuk metode *X-ray diffraction* (XRD) yang hanya menunjukkan satu pose dalam keadaan diam. Ligan alami yang digunakan adalah *4-Hydroxytamoxifen*, selektif sebagai modulator reseptor estrogen dan



Gambar 1. (a) Kompleks Reseptor Estrogen Alfa (3ERT) dan (b) ligan alami (*Protein Data Bank*, 2024)

digunakan secara klinis sebagai antagonis untuk mengobati kanker payudara yang bergantung pada estrogen.⁶

Protein target ini dipreparasi menggunakan *Discovery Studio Visualizer* (DSV) untuk memisahkan native ligand, menyediakan pocket bagi senyawa uji yang akan berikatan dengan ER- α .⁷

3.2. Preparasi Ligan Uji

Preparasi ligan uji dalam penelitian ini menggunakan senyawa turunan flavonoid yang dipilih karena memiliki aktivitas antikanker, seperti menangkap radikal bebas, mengatur metabolisme sel, dan mencegah penyakit terkait stres oksidatif.⁸ Senyawa flavonoid bekerja melalui berbagai mekanisme, seperti menghentikan siklus sel kanker, memicu apoptosis, serta menginduksi kematian sel.⁹ Misalnya, isoflavon menghentikan sel kanker payudara pada fase G2/M dan memicu apoptosis yang bergantung pada ROS, sementara flavanone memiliki efek antikanker pada lini sel koriokarsinoma.¹⁰ Ligan uji dimodelkan menggunakan Chem Office dan dianalisis berdasarkan aturan Lipinski "Rule of Five", yang mencakup bobot molekul, koefisien partisi (LogP), dan donor-akseptor hidrogen. Sebagian besar ligan memenuhi syarat, namun 8 dari 103 senyawa tidak memenuhi syarat bobot molekul, 2 ligan melebihi batas LogP > 5, serta beberapa ligan tidak memenuhi syarat untuk donor dan akseptor hidrogen, yang memengaruhi penetrasi membran biologis. Hasil penentuan pada masing-masing ligan alami dan ligan uji pada Tabel 1 menunjukkan bahwa 6 ligan uji memiliki massa molekul relatif melebihi batas yang ditetapkan dalam aturan Lipinski (>500).

Berdasarkan parameter aturan Lipinski, telah terseleksi senyawa turunan flavonoid sebagai ligan uji termasuk ligan alami. Terdapat 23 ligan uji yang tidak memenuhi keseluruhan aturan Lipinski. Terdapat 80 ligan uji yang memiliki kemampuan menembus membran biologis yang lebih baik dibandingkan ligan uji lainnya.

3.3. Optimasi Geometri

Penelitian ini menggunakan optimasi geometri dengan perangkat lunak *Gaussian 09* melalui antarmuka *Gauss View 5.0.8* untuk mencapai konformasi yang paling stabil dan menghitung energi setiap komponen.¹¹ Proses ini menggunakan metode DFT, B3LYP, dan basis set 6-31G, yang memberikan data akurat dalam menentukan struktur molekul secara kuantum mekanis. DFT (*Density Functional Theory*) memiliki keakuratan tinggi karena didasarkan pada persamaan *Schrodinger* dan distribusi elektron. B3LYP digunakan selama optimasi karena menggabungkan metode *Hartree-Fock*, sering disebut sebagai metode hybrid. Basis set 6-31G, yang umum digunakan, memberikan geometri yang baik dan energi relatif yang masuk akal dengan menggunakan enam fungsi Gaussian dan tiga fungsi yang mewakili orbital elektron valensi.

Optimasi geometri menunjukkan bahwa parameter *HOMO* dan *LUMO* sangat penting dalam kimia kuantum, dalam hal ini, *HOMO* berperan sebagai donor elektron dan *LUMO* sebagai akseptor.¹² Berdasarkan hasil penentuan optimasi geometri, ligan uji LU64 memiliki nilai *HOMO* terbesar (-0,0755 kkal/mol), menunjukkan kemampuan yang lebih besar dalam mendonorkan elektron dibandingkan ligan alami. Sementara itu, ligan uji LU91 memiliki nilai *LUMO* terendah (-0,682 kkal/mol), yang menunjukkan kemampuan lebih besar dalam menerima elektron. Ligan LU64 juga memiliki gap energi terbesar (-0,05615 kkal/mol), menunjukkan stabilitas yang lebih tinggi, sedangkan LU30 memiliki gap energi terkecil (-0,21301 kkal/mol), menunjukkan reaktivitas yang lebih tinggi. Semakin besar gap energi, semakin tinggi stabilitas dan semakin rendah reaktivitasnya. Nilai total energi paling negatif tercatat pada LU75 (-1.489,955), menunjukkan stabilitas lebih tinggi dibanding tamoxifen (-1.213,0843).

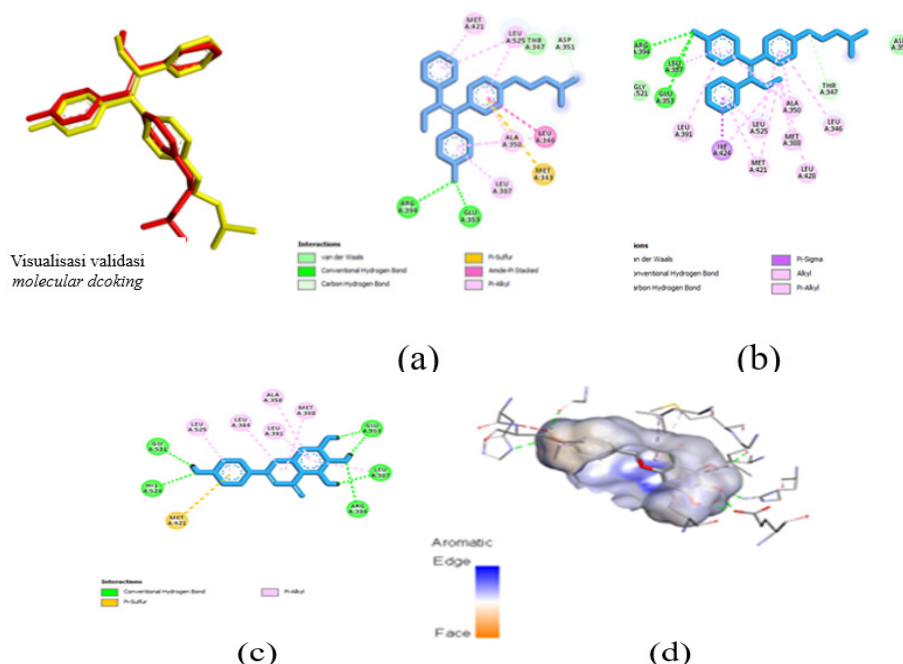
3.4. Validasi Penambatan Molekul

Validasi penambatan molekul dilakukan menggunakan aplikasi *Autodock tools* untuk redocking antara

Grid Box			Grid Center			
X	Y	Z	Grid Spacing	X center	Y center	Z center
42	54	48	0,375A	30,282	-1,913	24,207
Number of Runs : 100						
Number of Evals : Medium						
Metode Algoritma : Lamarckian Genetic Algorith						
RMSD : 1,119 A						
Energi Ikatan : -11,65 kkal/mol						
Konstanta Inhibisi : 2,89 uM						

Validasi penambatan molekul dilakukan dengan pengaturan *grid box* untuk menentukan besar sisi ikatan, resolusi *grid*, dan parameter penambatan, dengan tujuan membatasi daerah interaksi dan mendapatkan nilai *binding affinity* terbaik. Hasil validasi menunjukkan nilai RMSD ≤ 2 Å, yang valid, dengan ukuran *grid box* X = 42, Y = 54, Z = 48 dan *grid spacing* 0,375 Å. Metode yang digunakan adalah *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA), menghasilkan 100 pose interaksi ligan-protein, dengan konformasi terbaik pada run ke-69, nilai RMSD sebesar 1,119 Å, energi bebas ikatan (ΔG) sebesar -11,65 kkal/mol, dan

Gambar 2 menunjukkan visualisasi hasil *superimpose* antara struktur ligan hasil validasi *molecular docking* (merah) dengan ligan alami sebelum validasi (kuning). Hasil validasi menunjukkan nilai RMSD sebesar 1,119 Å, energi bebas ikatan (ΔG) -11,65 kkal/mol, dan konstanta inhibisi (K_i) 2,89 μM yang diperoleh pada running ke-69. Visualisasi tumpang tindih antara ligan alami kristalografi sinar-X dan ligan alami hasil *redocking* untuk mengamati perubahan posisi kedua *pose* tersebut. Penelitian ini juga memvalidasi hasil penambatan molekul dengan menentukan interaksi antara protein target dan ligan alami dari kristalografi PDB dan ligan alami dengan *pose* terbaik dari penambatan molekul. Hasilnya menunjukkan interaksi berupa ikatan hidrogen dan hidrofobik. Ikatan hidrogen terbentuk antara atom hidrogen gugus amino dengan residu asam amino, terdiri dari ikatan hidrogen konvensional dan ikatan karbon-hidrogen.



<http://jurnal.unpad.ac.id/ijpst/>

Tabel 2. Hasil Penambatan Ligan pada Reseptor Estrogen Alfa (ER- α)

Kode Ligan	Energi Bebas Ikatan (ΔG) (kkal/mol)	Konstanta Inhibisi (Ki) μM	Ikatan Hidrogen	Ikatan Hidrofobik
LA1	-11,65	2,89	ARG394, GLU353	MET421, LEU525, ALA350 LEU387
LU90	-8,95	0,27	ARG394, GLU353	LEU525, ALA350
LU18	-8,46	0,63	GLU353, GLU419, LEU346, HIS524	ALA350, LEU387, MET421.
LU65	-8,43	0,66	ARG394, GLU353, LEU387	LEU525, ALA350.
LU52	-8,38	0,71	GLU353, LEU387, GLY521, HIS524	ALA350, LEU525.
LU17	-8,37	0,73	GLU353, GLY521, HIS524	ALA350, LEU525
LU4	-8,29	0,84	ARG394, GLU353, GLU419 HIS524	MET421, LEU525, ALA350, LEU387.
LU10	-8,29	0,84	ARG394, GLU353, LEU346 GLY521	MET421, LEU525, ALA350, LEU387.
LU2	-8,28	0,85	ARG394, GLU353, LEU346 HIS524	ALA350, LEU387, LEU525, MET421.
LU20	-8,24	0,92	GLU353, GLU419 HIS524	MET421, LEU387, ALA350.
LU3	-8,23	0,93	ARG394, GLU353 GLY420	LEU387, ALA350

Interaksi antara protein target dengan ligan alami hasil kristalografi dan ligan alami dengan hasil validasi memiliki kemiripan. Sebanyak 10 residu asam amino interaksi antara ligan alami dengan protein target yaitu ARG394, GLU353, LEU387, MET343, ALA350, LEU346, ASP351, THR347, LEU525, dan MET421 (Gambar 2B dan 2C). Terbentuknya ikatan hidrogen dengan residu asam amino yang bertanggung jawab terhadap aktivitas yaitu AGR394 dan GLU353. Adapun residu asam amino yang tidak terkonfirmasi interaksinya adalah LEU387, GLY521, LEU391, ILE424, LEU428 dan MET388. Berdasarkan hasil interaksi tersebut membuktikan validasi penambatan molekul dapat dinyatakan valid.

3.5. Penambatan Molekul

Penambatan molekul merupakan metode penting dalam *structured based drug design* (SBDD) karena mampu memprediksi konformasi ligan molekul kecil di situs pengikatan target dengan akurasi tinggi. Penambatan ini mengevaluasi interaksi konformasi, hidrogen, hidrofobik, dan elektrostatik.¹⁴ Dalam penelitian ini, penambatan dilakukan pada ligan uji, turunan flavonoid, sebagai antagonis reseptor estrogen alfa menggunakan parameter yang telah tervalidasi. Hasil penambatan menghasilkan nilai energi bebas (ΔG) dan konstanta inhibisi (Ki), yang mengindikasikan kestabilan konformasi antara ligan dan reseptor. Nilai ΔG rendah menunjukkan afinitas tinggi ligan terhadap reseptor, sementara Ki rendah

menandakan kekuatan hambatan senyawa terhadap reseptor.¹⁵

Berdasarkan tabel 2, ligan uji yang digunakan pada tahap ini sebanyak 81 dengan 80 senyawa turunan flavonoid dan 1 senyawa ligan alami sebagai pembanding yang sudah dilakukan validasi penambatan molekul. Hasil penambatan molekul didapatkan ada 10 ligan uji terbaik yang memiliki nilai ΔG dan Ki yang lebih baik daripada ligan alami, oleh karena itu senyawa ligan uji tersebut diprediksi memiliki afinitas dengan stabilitas yang lebih baik dalam berinteraksi dengan protein target dibandingkan ligan alami dan senyawa uji lainnya. Hasil penambatan molekul ligan uji yang terbaik akan dilanjutkan ke tahap simulasi dinamika molekul. Penelitian ini mengamati nilai ΔG dan Ki sebagai parameter penambatan molekul untuk sepuluh ligan uji flavonoid (LU90, LU18, LU65, LU52, LU17, LU4, LU10, LU2, LU20, LU3) terhadap reseptor estrogen alfa (ER- α). Nilai ΔG berkisar antara -8,95 kkal/mol hingga -8,23 kkal/mol, sementara nilai Ki berkisar antara 0,27 μM hingga 0,93 μM . Berdasarkan hasil ini, ligan tersebut dipilih sebagai kandidat obat antikanker payudara. Visualisasi interaksi menunjukkan kemiripan dengan ligan alami, terutama pada ikatan hidrogen dengan residu GLU353 dan ARG394. Ligan uji ini akan dilanjutkan ke tahap dinamika molekul untuk menguji stabilitas interaksinya dengan reseptor dalam kondisi mendekati fisiologis tubuh.

Tabel 3. Pergerakan Rata-rata Deviasi dan Rentang RMSD Hasil Dinamika Molekul

Kode Ligan	Pergerakan Rata-Rata Deviasi	Rentang RMSD (Å)
LA	0,995	0,211-1,708
LU20	0,409	0,116-1,528
LU18	0,567	0,120-1,114
LU65	0,718	0,094-1,224
LU90	0,729	0,108-1,135
LU2	0,870	0,127-1,256
LU3	0,928	0,105-1,362
LU4	1,014	0,127-1,857
LU10	1,287	0,164-1,623
LU52	1,410	0,114-2,198
LU17	1,486	0,097-2,308

3.6. Simulasi Dinamika Molekul

Pada penelitian kali ini, simulasi dinamika molekul dilakukan selama 100 ns dimana untuk mendapatkan data simulasi dan kestabilan yang lebih baik. Hasil grafik fluktuatif antara ligan alami dan ligan uji terhadap protein target terdapat pada Gambar 3.

Berdasarkan Tabel 3, nilai pergerakan rata-rata deviasi senyawa dengan kode ligan LU20 lebih kecil dibandingkan ligan alami dan senyawa yang lainnya. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Chagas dkk.¹⁶ menyatakan bahwa interaksi yang stabil ini menunjukan target kerja cenderung mempertahankan strukturnya.

Berdasarkan Gambar 3, ligan uji seperti LU90, LU18, LU65, LU52, LU17, LU4, LU10, LU2, LU20, dan LU3 menunjukkan variasi fluktuasi RMSD karena ligan-ligan ini berusaha menemukan sisi ikatan yang sesuai pada protein target ER- α . Ligan alami mengalami ketidakstabilan hingga 45 ns sebelum menunjukkan penurunan fluktuasi. Ligan LU90, LU18, dan LU65 juga mengalami lonjakan dan penurunan *RMSD* yang bervariasi, menandakan konformasi yang kurang stabil. Ligan LU20, LU2, LU3, dan LU17 mengalami fluktuasi yang konstan sepanjang 100 ns. Secara umum, nilai *RMSD* yang meningkat menunjukkan bahwa ligan mencari posisi ikatan, sedangkan nilai yang stabil menunjukkan tercapainya konformasi optimum. LU20 teridentifikasi sebagai ligan uji yang paling stabil dibandingkan ligan lainnya.¹⁷ Penambahan waktu simulasi diperlukan untuk menganalisis stabilitas ikatan makromolekul lebih lanjut.

Analisis *RMSF* adalah perubahan yang disebabkan oleh tiap atom atau residu asam amino penyusun reseptor yang menghasilkan fleksibilitas reseptor. Nilai *RMSF* akan menunjukkan pergeseran masing-masing residu asam amino selama simulasi yang dilakukan pada sisi aktif reseptor. Interaksi kompleks antara

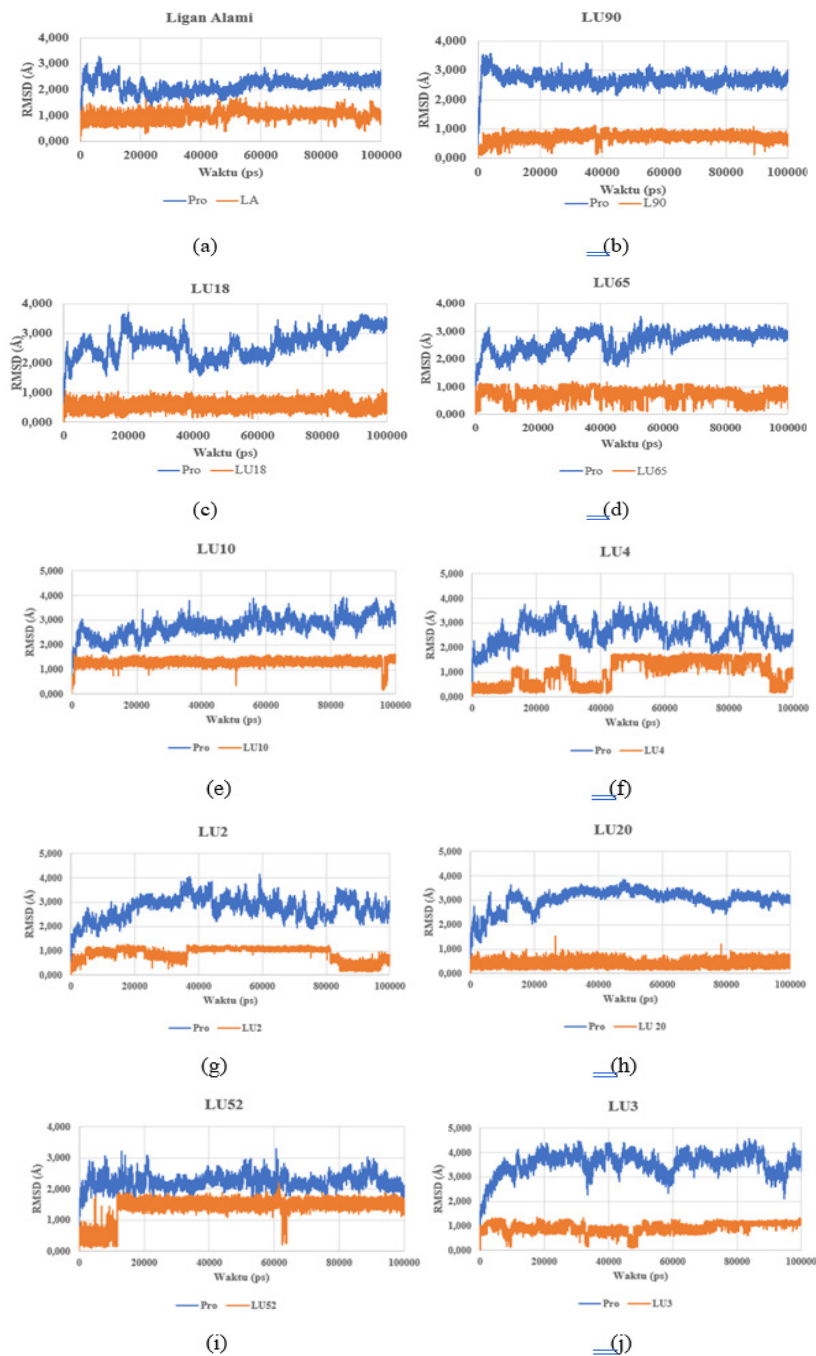
protein dan ligan ditunjukkan oleh fleksibilitas.¹

Berdasarkan penentuan residu asam amino, menunjukkan hasil yang bervariasi. Pergerakan rata-rata fluktuasi residu asam amino ligan alami, LU90, LU18, LU65, LU52, LU17, LU4, LU10, LU2, LU20 dan LU3 berturut-turut adalah 1,093 Å; 0,990 Å; 1,425 Å; 1,255 Å; 1,142 Å; 1,275 Å; 1,240 Å; 1,263 Å; 1,318 Å; 1,161 Å dan 1,123 Å. Nilai *RMSF* yang tinggi yang menandakan bahwa pada daerah tersebut merupakan daerah residu yang fleksibel. Residu yang bersifat fleksibel merupakan bagian struktur heliks sehingga mudah mengalami pergerakan karena struktur heliks tidak memiliki ikatan hidrogen untuk mempertahankan struktur.²

Residu asam amino pada sisi aktif berada pada nilai ≤ 2 Å. Berdasarkan hasil penentuan, daerah yang stabil ditandai dengan bulatan berwarna hitam antara lain GLU353 dan ARG394. Residu asam amino pada sisi aktif berada pada nilai kurang dari 2Å, karena atom penyusun residu asam amino cenderung tidak banyak berubah posisi selama simulasi dinamika molekul.

Analisis ini menggunakan mekanika molekuler dan model solvasi kontinum untuk menghitung energi bebas yang mengikat makromolekul. Interaksi energi bebas fase gas (ΔG Gas) yang digunakan untuk menentukan perhitungan MMGBSA menunjukkan bahwa kontribusi energi van der Waals adalah kontribusi utama terhadap energi (ΔE VDW) antara reseptor ER dan ligan; kontribusi interaksi van der Waals lebih besar dari kontribusi energi elektrostatik (ΔEEL). ΔG gas fase terlarut yang dimodelkan menggunakan model GB menunjukkan kontribusi energi ikat yang baik pada energi bebas pelarut polar (ΔG Gas).

Berdasarkan perhitungan ikatan MMGBSA, hasil ligan alami memiliki nilai energi total sebesar -56,9136 kkal/mol. Sedangkan ligan uji yang memiliki nilai energi total yang mendekati ligan alami adalah Pada LU3, LU90,



Gambar 3. (a-j). Fluktuatif Hasil *RMSD* Ligan Alami dan Ligan Uji

LU65, LU10, LU4, LU2, LU20, LU52, LU18 dan LU17 dengan nilai berturut-turut adalah -38,4867 kkal/mol; -38,2561 kkal/mol; -37,5491 kkal/mol; -36,5463 kkal/mol; -36,3619 kkal/mol; 34,7198 kkal/mol; -31,5084 kkal/mol; -30,6727 kkal/mol; -30,5801 kkal/mol; -26,9043 kkal/mol.¹⁸

Analisis ikatan okupansi yang dilakukan antara ligan dan reseptor ER- α menunjukkan sisi yang terikat.¹⁹ Okupansi Ikatan hidrogen dihitung sebagai persentase konformasi residu yang terdiri dari setidaknya satu ikatan hidrogen yang terlibat dengan residu tertentu. Hasil okupansi ikatan hidrogen menunjukkan interaksi

antara ligan dan residu asam amino pada protein target. Ligan alami memiliki okupansi tertinggi pada asam amino GLU353 (79,61%). Ligan uji LU90 dan LU17 menunjukkan okupansi sangat tinggi pada GLU353 masing-masing sebesar 99,79% dan 99,26%.²⁰ Ligan lain juga menunjukkan okupansi yang baik, seperti LU65 (87,71%), LU52 (74,22%), LU4 (66,99%), LU18 (66,76% pada GLU346), LU10 (65,58%), LU20 (65,13%), LU3 (53,54%), dan LU2 (51,31%) pada GLU353. Ikatan hidrogen dianggap kuat jika okupansinya $\geq 80\%$ dan stabil jika $\geq 50\%$. Hasil menunjukkan LU90 dan LU17 memiliki ikatan hidrogen yang kuat, sementara ligan lainnya seperti

ligan alami, LU18, LU65, LU52, LU10, LU20, LU2, LU3, dan LU4 memiliki ikatan hidrogen yang stabil dengan ER- α , menandakan stabilitas interaksi sepanjang simulasi.²¹

4. Pembahasan

Pemilihan reseptor estrogen alfa (ER- α) dengan kode PDB 3ERT sebagai protein target didasarkan pada perannya sebagai antagonis dalam pengobatan kanker payudara. Metode *X-ray diffraction* yang digunakan menghasilkan resolusi 1,9 Å, memenuhi standar validitas struktur kristal protein ($<2\text{\AA}$).⁶ Penggunaan *4-hydroxytamoxifen* sebagai ligan alami didasarkan pada efektivitasnya sebagai modulator reseptor estrogen selektif dalam terapi kanker payudara yang bergantung pada estrogen.⁷

Senyawa turunan flavonoid dipilih sebagai ligan uji karena aktivitas antikankernya yang telah terbukti melalui berbagai mekanisme, termasuk penangkapan radikal bebas, regulasi metabolisme sel, dan induksi apoptosis.⁸ Analisis farmakokinetik menggunakan aturan Lipinski menunjukkan bahwa 95 dari 103 senyawa uji memenuhi kriteria *drug-likeness*, mengindikasikan potensi bioavailabilitas oral yang baik.⁹ Hasil optimasi geometri menggunakan metode DFT menunjukkan bahwa beberapa ligan uji memiliki karakteristik elektronik yang menguntungkan, seperti yang ditunjukkan oleh nilai HOMO-LUMO dan *gap* energi.¹⁰

Validasi metode penambatan molekul menghasilkan nilai RMSD 1,119 Å, menunjukkan akurasi yang baik dalam memprediksi pose pengikatan.¹² Analisis penambatan molekul mengidentifikasi 10 senyawa dengan afinitas pengikatan yang lebih baik dibandingkan tamoxifen, dengan LU90 menunjukkan nilai ΔG dan K_i terbaik (-8,95 kkal/mol dan 0,27 μM). Interaksi ini distabilkan oleh ikatan hidrogen dengan residu kunci GLU353 dan ARG394, yang konsisten dengan mekanisme pengikatan tamoxifen.^{13,14}

Simulasi dinamika molekul selama 100 ns memberikan pemahaman lebih mendalam tentang stabilitas kompleks ligan-reseptor. Analisis RMSD menunjukkan bahwa mayoritas kompleks mencapai stabilitas konformasi, dengan LU20 menunjukkan fluktuasi terendah.¹⁵ Analisis RMSF mengungkapkan bahwa residu pada sisi aktif mempertahankan stabilitasnya (nilai $<2\text{\AA}$), terutama pada GLU353 dan ARG394, yang penting untuk aktivitas antagonis.¹⁶ LU3 dan LU90 menunjukkan fluktuasi residu yang lebih baik dibandingkan ligan alami.

Perhitungan MMGBSA mengungkapkan bahwa kontribusi van der Waals merupakan faktor dominan

dalam stabilitas kompleks.¹⁷ Meskipun energi total ligan uji (-38,4867 hingga -26,9043 kkal/mol) lebih rendah dibandingkan tamoxifen (-56,9136 kkal/mol), nilai ini tetap menunjukkan afinitas pengikatan yang signifikan.¹⁸ Analisis okupansi ikatan hidrogen menunjukkan bahwa LU90 dan LU17 membentuk ikatan hidrogen yang kuat (okupansi $\geq 80\%$) dengan GLU353, sementara ligan lainnya menunjukkan stabilitas moderat (okupansi $\geq 50\%$).¹⁹

Hasil-hasil ini mengindikasikan bahwa beberapa senyawa turunan flavonoid, terutama LU90, memiliki potensi sebagai alternatif tamoxifen dalam pengobatan kanker payudara. Meskipun stabilitas interaksi mereka tidak melebihi tamoxifen, profil pengikatan yang ditunjukkan memberi dasar yang kuat untuk pengembangan dan optimasi lebih lanjut. Studi lebih lanjut diperlukan untuk mengevaluasi toksisitas dan efektivitas senyawa-senyawa ini melalui uji *in vitro* dan *in vivo*.

5. Simpulan

Penelitian ini berhasil mengidentifikasi 10 senyawa uji dari total 80 senyawa yang diuji, yang menunjukkan kinerja lebih baik dibandingkan ligan alami terhadap reseptor estrogen alfa. Senyawa-senyawa ini, yaitu LU90, LU18, LU65, LU52, LU17, LU4, LU10, LU2, LU20, dan LU3, memiliki nilai K_i dan ΔG yang mengindikasikan potensi afinitas tinggi, dengan nilai energi bebas yang berkisar antara -8,23 hingga -8,95 kkal/mol dan konstanta inhibisi (K_i) yang beragam. Temuan ini menegaskan bahwa senyawa turunan flavonoid memiliki potensi sebagai kandidat obat antikanker payudara.

Analisis dinamika molekul menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tersebut mampu mempertahankan stabilitas kompleks dengan nilai RMSD di bawah 2Å dan fluktuasi rendah pada sisi aktif selama simulasi 100 ns. Nilai okupansi tinggi pada ikatan hidrogen menandakan interaksi yang kuat dengan reseptor, serta energi total (MMGBSA) yang konsisten mendukung stabilitas konformasi. Hasil ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tersebut memiliki potensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai obat baru untuk kanker payudara, namun diperlukan penelitian lanjutan untuk mengevaluasi toksisitas dan efektivitasnya melalui pengujian *in vitro* dan *in vivo*.

Diperlukan studi lebih lanjut untuk memprediksi toksisitas secara *in silico* pada senyawa turunan flavonoid lainnya, serta melakukan pengujian *in vitro* dan *in vivo* pada senyawa terbaik, khususnya LU90, untuk mengkonfirmasi potensinya sebagai kandidat obat baru dalam pengobatan kanker payudara. are more cost-effective.

Pernyataan Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan bahwa data yang dipublikasikan pada naskah tersebut tidak ada konflik kepentingan terhadap pihak manapun.

Daftar Pustaka

1. WHO. The Global Cancer Observatory - All cancers. Int Agency Res Cancer - WHO [Internet]. 2020 [cited 2024 Dec 21];419:199–200. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/home>
2. Burhan A, Aisyah AN, Awaluddin A, Zulham Z, Taebe B, Gafur A. Uji aktivitas antioksidan dan antikanker ekstrak batang murbei (*Morus alba* L.) terhadap sel kanker WiDr secara in vitro. Kartika: Jurnal Ilmu Farmasi. 2019;7(1):17.
3. Fatimah F, Martha RD, Kusumawati A. Deteksi dan identifikasi senyawa flavonoid ekstrak etanol kulit batang tanaman majapahit (*Crescentia cujete*) dengan LCMS. CHEESA: Chem Eng Res Artic. 2020;3(2):88–98.
4. Reynaldi MA, Setiawansyah A. Potensi anti-kanker payudara tanaman songga (*Strychnos lucida* R.Br): tinjauan interaksi molekuler terhadap reseptor estrogen- α in silico. Sasambo J Pharm. 2022;3(1):30–5.
5. Dinata DI, Peni MI, Asnawi A. Identification of angiotensin receptor blocker II ligands from Gotu Kola (*Centella asiatica* L.) extract: an in silico study. J Sains Seni ITS. 2023;6(1):51–66.
6. Fauzi FM, Wutsqa YU, Rohmatika NA. Studi bioavailabilitas dan molecular docking senyawa fenolik *Ocimum sanctum* L. sebagai inhibitor reseptor estrogen alfa pada sel kanker payudara. Akfarindo. 2024;9(1):49–56.
7. Rastini, Giantari, Adnyani, Laksmini. Molecular docking aktivitas antikanker dari kuersetin terhadap kanker payudara secara in silico. 2019;243–70.
8. Rodríguez-García C, Sánchez-Quesada C, Gaforio JJ. Dietary flavonoids as cancer chemopreventive agents: an updated review of human studies. Antioxidants. 2019;8(5):1–23.
9. Chirumbolo S, Bjørklund G, Lysiuk R, Vella A, Lenchyk L, Upyr T. Targeting cancer with phytochemicals via their fine-tuning of the cell survival signaling pathways. Int J Mol Sci. 2018;19(11).
10. Park S, Lim W, Bazer FW, Song G. Naringenin suppresses growth of human placental choriocarcinoma via reactive oxygen species-mediated P38 and JNK MAPK pathways. Phytomedicine. 2018;50:238–46.
11. Muttaqin FZ. Molecular docking and molecular dynamic studies of stilbene derivative compounds as sirtuin-3 (Sirt3) histone deacetylase inhibitor on melanoma skin cancer and their toxicities prediction. J Pharmacopolium. 2019;2(2):112–21.
12. Panicker CY, Varghese HT, Manjula PS, Sarojini BK, Narayana B, War JA, et al. FT-IR, HOMO-LUMO, NBO, MEP analysis and molecular docking study of 3-Methyl-4-((E)-[4-(methylsulfanyl)-benzylidene]amino}1H-1,2,4-triazole-5(4H)-thione. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2015;151:198–207.
13. Granchi C, Capecchi A, Del Frate G, Martinelli A, Macchia M, Minutolo F, et al. Development and validation of a docking-based virtual screening platform for the identification of new lactate dehydrogenase inhibitors. Molecules. 2015;20(5):8772–90.
14. Asnawi A, Febrina E, Aligita W, Yuliantini A, Arfan A. Penambatan molekul dan dinamika molekul beberapa fitokimia dari *Acalypha indica* L. sebagai inhibitor matriks metalloproteinase-9. J Sains Farm Klin. 2023;10(1):62–70.
15. Kalontong PK, Safithri M, Tarman K. Molecular docking of active compound of *Spirulina platensis* as TMPRSS2 inhibitor to prevent the SARS-COV-2 infection. J Pengolahan Hasil Perikanan Indones. 2022;25(2):253–67.
16. Chagas CM, Moss S, Alisaraie L. Drug metabolites and their effects on the development of adverse reactions: revisiting Lipinski's Rule of Five. Int J Pharm. 2018;549(1–2):133–49.
17. Zubair MS, Maulana S, Mukaddas A. Penambatan molekul dan simulasi dinamika molekuler senyawa dari genus *Nigella* terhadap penghambatan aktivitas enzim protease HIV-1. J Farmasi Galenika. 2020;6(1):132–40.
18. Rachmania AR, Supandi, Larasati AO. Analisis in-silico senyawa diterpenoid laktone herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) pada reseptor alpha-glucosidase sebagai antidiabetes tipe II. Pharmacy. 2015;12(2):210–22.
19. Cardoso F, Costa A, Senkus E, Aapro M, André F, Barrios CH, et al. 3rd ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 3). Annals of Oncology. 2017;28(1):16–33.
20. Dall GV, Britt KL. Estrogen effects on the mammary gland in early and late life and breast cancer risk. Front Oncol. 2017;7:1–10.
21. Abdjan MI, Aminah NS, Siswanto I, Kristanti AN, Takaya Y, Choudhary MI. Exploration of stilbenoid trimers as potential inhibitors of sirtuin1 enzyme using a molecular docking and molecular dynamics simulation approach. RSC Advances. 2021;11(31):19323–32.
22. Sari IW, Junaidin D, dan Pratiwi. Studi Molecular Docking Senyawa Flavonoid Herba Kumis Kucing (*Orthosiphon stamineus* B.) Pada Reseptor A-Glukosidase Sebagai Antidiabetes Tipe 2. Jurnal Farmagazine. 2020;7(2):54-60.