

ANALISIS *IN SILICO* GENISTEIN DAN ANALOGNYA SEBAGAI INHIBITOR KANKER PAYUDARA RESEPTOR ESTROGEN ALFA POSITIF (ER α)

Fauzan Zein M.¹, Rika Andriani¹, Sophi Damayanti²

¹ Sekolah Tinggi Farmasi Bandung

² Institut Teknologi Bandung

Email : fauzanzein@yahoo.com

ABSTRACT

Breast cancer is the highest mortality disease on women in the world and about 60-80% of the cases are ER α + breast cancer. The discovery of more selective to HER α , safe, and potential new anticancer agent is expected to help the treatment of ER α + breast cancer. *In silico* analysis had been carried out by computational chemistry methods, including determination of physicochemical parameters such as lipophilicity/CLogP, molar refractivity/CMR, bond energy/HOMO-LUMO and E-Gap, partial charge reactivity; determination of structural similarity by overlaying, and the interaction analysis of genistein and its analogues against HER α by docking method. The result showed that group of -7OH on the C ring and group of -4'OH on the A ring of genistein were the major pharmacophore. More number of hydrogen bonds (especially to Arg394), shorter distance, and lower free binding energy resulted higher inhibitory activity, it was shown by MA6 which had 4 of hydrogen bonds (-14,51 kcal/mol) and each of them bound to Arg394 (=N- aromatic, substituent of -4'OR), Arg394 (-4'OR), His524 (-7OR), and Leu391 (=N- aromatic, substituent of -4'OR). Genistein, MA6, and MA8 had similar activity to tamoxifen even predicted more potent (MA6), it was correlated to its binding with Arg394. The complete result of *in silico* analysis confirmed the activity of genistein and its analogues as an inhibitor of ER α + breast cancer.

Key words : Genistein, ER α + breast cancer, Inhibitor, *In silico*.

PENDAHULUAN

Kanker payudara (*breast cancer*) adalah penyakit dengan tingkat mortalitas tertinggi pada wanita di dunia. Ada sekitar 1.000.000 penderita tiap tahunnya kasus wanita yang mengidap kanker payudara. Menurut WHO (2010), sekitar 8-9% wanita akan mengalami kanker payudara, dan resiko terbesar terjadi pada mereka yang berusia 40-50 tahun. WHO juga menyebutkan sekitar 60% kasus kanker payudara terjadi di negara-negara berkembang (termasuk Indonesia) dan separuh dari jumlah pasien di negara berkembang meninggal dunia. Di Indonesia terdapat 17-25 kasus kanker payudara dari 100.000 populasi penduduk dengan karakter keganasan serta progresivitas pertumbuhan dan perkembangan yang cenderung lebih tinggi. Hasil survei SIRS pada 2013 menyebutkan insidensi kanker tertinggi di Indonesia secara umum adalah kanker payudara sebanyak 12.014 kasus (28.7% dari seluruh insidensi kanker).

Sekitar 60-80% pengidap kanker payudara merupakan tipe *Estrogen Hormone-Dependent* atau *Estrogen Receptor Alpha Positive* (ER α +). Aksi biologi hormon estrogen dimediasi oleh dua reseptor yaitu ER α dan ER β yang meregulasi faktor

transkripsi. E2 atau 17- β -estradiol yang terikat pada ER α berperan dalam pertumbuhan, perkembangan, dan proliferasi sel-sel payudara, baik sel payudara normal maupun sel kanker payudara. Oleh karena itu ER α dikatakan sebagai pusat perkembangan kanker payudara sekaligus *marker* kanker payudara ER α + (Payne, et al, 2008; Dhananjaya, et al, 2012; Radharani, et al, 2011).

Suatu pendekatan baru dilakukan untuk membatasi efek samping dan meningkatkan efektivitas kemoterapi kanker payudara yaitu dengan menggunakan jenis obat yang dapat bekerja secara *molecular targeted*. Obat-obat ini mampu membunuh sel-sel kanker payudara dengan menghambat atau memutus jalur/proses tertentu yang penting untuk pertumbuhan dan perkembangan kanker payudara, salah satu jalur yang dimaksud adalah proliferasi kanker payudara yang berkaitan dengan interaksi E2-ER α pada kanker payudara ER α +

Fitoestrogen memiliki struktur molekul menyerupai 17- β -estradiol sehingga dapat secara langsung berikatan dengan reseptor estrogen dan berkompetisi dengan estrogen endogen untuk

memberikan efek estrogenik maupun antiestrogenik (Glover, et al, 2006). Genistein dapat menghambat ikatan E₂ pada ER α secara *reversible competitive inhibitor*, menginduksi apoptosis/kematian sel, inhibitor tirosin kinase (EGFR), menahan siklus sel pada fase G₂-M, dan menghambat angiogenesis (Radharani, et al, 2011). Menurut beberapa penelitian epidemiologik, konsumsi dosis tinggi isoflavonoid kedelai khususnya genistein memiliki berbagai manfaat tidak hanya aktivitas kemopreventif terhadap kanker payudara tetapi juga bermanfaat terhadap kanker prostat, mencegah sindrom postmenopouse, osteoporosis, atherosclerosis, stroke, dan penyakit neurodegenerative (Dhananjaya, et al, 2012; Jane, et al, 2004).

Banyak penelitian *in vitro* dan *in vivo* telah membuktikan aktivitas genistein sebagai antikanker payudara, khususnya tipe ER α . Radharani et al. (2011) berhasil mensintesis 3 analog genistein dan telah terbukti secara *in vitro* paling potensial dalam menurunkan proliferasi sel kanker payudara. Penelitian kali ini terfokus pada analisis *in silico* dari genistein dan analognya guna mengkonfirmasi, mengevaluasi, meneliti lebih terarah pada HER α , dan mempelajari mekanisme kerjanya sebagai inhibitor kanker payudara ER α . Dilakukan kajian *In silico* yaitu menggunakan metode *docking* struktur genistein dan analognya terhadap *Human Estrogen Receptor Alpha* (HER α).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses *docking* genistein dan analognya dilakukan terhadap protein reseptor berupa kompleks *Human Estrogen Receptor Alpha Binding Genistein* (HER α -Genistein), dengan kode 1X7R.pdb (Manas, et al, 2004).

Optimasi geometri dilakukan melalui pendekatan mekanika kuantum semiempiris yang tersedia pada program ArgusLab. Energi terendah yang diperoleh dari hasil optimasi geometri yaitu menggunakan metode MNDO. Semakin rendah energi, konfigurasi dan geometri molekul struktur suatu senyawa semakin stabil, senyawa ada dalam kondisi yang optimum secara geometri seperti yang ada di alam. Pada keadaan ini kesalahan kalkulasi pada proses *docking* dapat diminimalisasi dengan baik, sehingga hasil *docking* menjadi lebih akurat.

Selanjutnya dilakukan proses validasi untuk memperoleh parameter *docking* yang cocok. Diperoleh ukuran *binding site bounding box* X, Y,

dan Z yaitu 16,372603, 20,897000, dan 25,901680, *grid resolution* yang cocok menggunakan *docking engine* GADock dengan *ligand type* Flexible yaitu 1,05, memiliki energi terendah (-9,761 kcal/mol), dan nilai RMSD 1,628731. Nilai RMSD yang dapat diterima adalah < 2 Å, memperlihatkan bahwa metode *docking* yang dipakai menghasilkan simpangan yang tidak terlalu besar. Proses validasi ini dapat menyatakan hasil *docking* sebagai kategori dekat-baik mengingat walaupun seluruh modus ikatan hidrogen dan densitas ikatan pada proses validasi sesuai tetapi terdapat sedikit pergeseran (Kartasasmita, et al, 2009).

Genistein yang merupakan senyawa induk sekaligus ligan acuan yang digunakan dalam analisis *in silico* ini secara *in vitro* memiliki aktivitas farmakologi sebagai inhibitor kanker payudara ER α dengan IC₅₀ pada sel T47D sebesar 15,0 μ M (Radharani, et al, 2011). Energi ikatan HOMO genistein adalah yang paling tinggi yaitu -8,833 EV (Tabel 2) menunjukkan bahwa genistein mudah membentuk orbital yang reaktif dengan reseptor.

Pada proses *docking*, genistein memiliki energi bebas sebesar -10,27 kcal/mol (paling tinggi diantara senyawa uji lain, Tabel 4). Dalam interaksinya dengan HER α , genistein memiliki tiga ikatan hidrogen. Gugus fungsi -7OH pada cincin C genistein (O22, muatan parsial -0,236) berinteraksi dengan residu His524 dan gugus -4'OH pada cincin A genistein (O17, muatan parsial -0,256) masing-masing berinteraksi dengan residu Glu353 dan Arg394. Jarak ikatan berkisar 2,5-2,8 Å. Oksigen pada grup hidroksil -4'OH dan -7OH mempunyai muatan parsial negatif kedua dan ketiga tertinggi setelah gugus karbonil (C=O) pada cincin B genistein. Seperti pada penelitian sebelumnya yang berhasil memprediksi gugus farmakofor menyebutkan bahwa molekul senyawa pada genistein yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antagonis/inhibitor hormon estrogen pada kanker payudara ER α adalah grup hidroksil (-4'OH pada cincin A, -7OH pada cincin C, -5OH pada cincin C) dan grup karbonil (C=O pada cincin B, Tabel 4).

Walaupun grup karbonil (O21, muatan parsial ekstrim negatif -0,699, dan muatan parsial ekstrim positif pada C7 0,359), serta grup -5OH (O19, muatan parsial -0,230) pada cincin C genistein merupakan gugus farmakofor, akan tetapi pada proses *docking* dengan ArgusLab tidak teridentifikasi adanya ikatan hidrogen dengan residu HER α . Diasumsikan bahwa ikatan yang terbentuk

merupakan ikatan elektrostatis mengacu pada penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa cincin B genistein γ -piron berinteraksi dengan residu Leu384 dan grup -5OH berinteraksi dengan residu Met421 pada HERα (Manas, et al, 2004).

Genistein memiliki kemiripan ikatan dan densitas dengan tamoxifen, yaitu berikatan pada Arg394 dan Glu353 dengan hampir semua densitas ikatan yang sama (kecuali tidak ada kedekatan dengan Trp383) (Andrew, et al, 1998). Hasil ini dapat menjelaskan kemiripan mekanisme aksi genistein dengan tamoksifen sebagai inhibitor kanker payudara ERα+. Sifat fisikokimia genistein yang mirip dengan estradiol (lipofilisitas dan keruahan, 3,784 & 7,8622, Tabel 1), cincin fenolik yang sangat diperlukan oleh estradiol untuk berikatan dengan ER juga dimiliki oleh genistein, jarak gugus -OH pada inti genistein yang mirip dengan jarakgugus -OH pada inti estradiol, bobot molekul genistein yang hampir sama dengan bobot molekul estradiol, serta interaksi genistein pada Glu353 dan His524 dan seluruh densitas yang sama seperti ikatan estradiol pada HERα menjelaskan kemampuan genistein yang secara kompetitif dapat berikatan dengan HERα dan menghalangi ikatan estrogen endogen pada HERα (Turner, et al, 2007; Tanebaum, et al, 1998).

Walaupun afinitas genistein pada HERα masih lebih rendah daripada estradiol tetapi penelitian Dhananjaya *et al.* (2012) menyebutkan bahwa *free binding energy* genistein lebih kecil daripada tamoxifen yang berarti afinitas genistein pada HERα lebih baik daripada tamoxifen, sehingga sebagai *lead compound* genistein secara kimia komputasi diprediksi berpotensi memiliki aktivitas sebagai inhibitor kanker payudara ERα+ lebih tinggi daripada tamoxifen (Dhananjaya, 2012).

Dari hasil penelitian terlihat bahwa efek antagonis yang dihasilkan berkaitan erat dengan keterikatan molekul genistein pada Arg394. Hasil *docking* genistein pada HERα menunjukkan bahwa ikatan yang menghasilkan aktivitas agonis (Glu353, His524) masih lebih dominan daripada ikatan yang diprediksi menghasilkan aktivitas antagonis (Arg394).

Tabel 1. Hasil Penetapan Koefisien Partisi (CLogP) dan Refraktivitas Molar (CMR)

Senyawa	CLogP	CMR
Genistein	2,40529	7,1335
MA6	6,57612	17,0481
MA8	4,49326	12,0908
MA19	6,92729	14,9587

Peningkatan lipofilisitas dan keruahan senyawa berpengaruh pada kemampuan senyawa melewati membran sel untuk berikatan dengan reseptor estrogen di sitosol. Keruahan dan kekakuan senyawa mampu menghalangi ikatan agonis karena halangan sterik, sehingga senyawa lebih berperan sebagai inhibitor/antagonis, dan sekaligus membuatnya menjadi lebih selektif terhadap HERα, (Radharani *et al.*, 2011).

Berdasarkan hasil *overlaying*, MA6 memiliki jarak atom paling dekat dengan genistein dibandingkan analog lainnya (≈ 0 , Tabel 3) sehingga dapat diprediksi bahwa reaktivitas, kesetabilan, dan aktivitas biologis MA6 adalah yang paling serupa dengan genistein. MA6 memiliki lipofilisitas sebesar 6,57612 dan refraktivitas molar tertinggi sebesar 17,0481 (Tabel 1). Senyawa MA6 yang lebih lipofil dan lebih meruah berkorelasi terhadap peningkatan aktivitas yang ditunjukkan oleh data IC₅₀ MA6 pada sel T47D 15 kali lebih kecil dari senyawa induk yaitu 0,9 μ M, memiliki aktivitas inhibisi sekitar 15 kali lebih besar daripada genistein (Radharani, et al, 2011).

Tabel 2. Hasil Penetapan Energi Ikatan HOMO LUMO

Senyawa	HOMO (EV)	LUMO (EV)	E-Gap (EV)
Genistein	-8,833	-0,713	8,120
MA6	-8,971	-1,161	7,810
MA8	-8,901	-0,852	8,049
MA19	-8,914	-0,614	8,300

Senyawa yang memiliki energi HOMO lebih besar mempunyai kemampuan memberikan elektron yang lebih baik dan senyawa dengan energi LUMO yang lebih rendah memiliki kemampuan yang lebih tinggi dalam menerima elektron. Interaksi molekul yang memiliki *E-Gap* lebih rendah cenderung lebih stabil karena kemungkinan interaksi ligan-reseptor (serah-terima elektron antara orbital ikatan dan antiikatan) menjadi lebih besar, sehingga dapat menghasilkan aktivitas biologis yang lebih baik.

MA6 memiliki nilai LUMO (-1,161) dan E-Gap (7,810, Tabel 2) terendah dibandingkan analog genistein lainnya yang menandakan molekul senyawa MA6 cenderung lebih mudah berinteraksi dalam menerima elektron dari molekul reseptor (reaktif) dan memiliki stabilitas yang lebih baik. Dari hasil *docking* MA6 memiliki empat ikatan hidrogen, =N- pada cincin A genistein (muatan parsial ekstrim positif, N37, 0,667) berikatan dengan residu Arg394, -4'OR (O21, muatan parsial -0,239) berikatan dengan residu Arg394, -7OR (O17, muatan parsial -0,258) berikatan dengan residu His524, dan terdapat tambahan ikatan hidrogen dari gugus fungsi =N- pada cincin A dengan residu Leu391 (sama dengan salah satu densitas ikatan estradiol dan tamoxifen pada HER α) (Andrew, et al, 1998; Tanebaum, et al, 1998). MA6 memiliki ikatan hidrogen yang paling banyak dan tiga diantaranya berikatan dengan residu utama HER α .

Pasangan elektron bebas dan reaktivitas muatan parsial N tersier aromatik dari substituen pada grup hidroksil cincin A berkontribusi terhadap ikatan hidrogen ligan-reseptor dan diprediksi mampu menghasilkan aktivitas inhibisi lebih tinggi dikorelasikan terhadap keterikatannya pada Arg394. Substituen yang sama pada grup hidroksil cincin C tidak berkontribusi signifikan terhadap interaksi ligan-reseptor (terlihat dari jarak interaksi pada His524 yang hampir sama dengan genistein, $\pm 2,5\text{\AA}$). Dua molekul pada MA6 berinteraksi pada Arg394 dengan jarak ikatan hidrogen (-4'OR) pada residu Arg394 lebih dekat daripada genistein dan MA8.

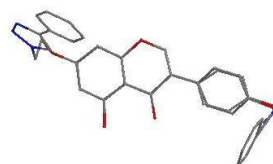
Kedekatan jarak ini sebagai hasil dari substituent yang mempengaruhi muatan parsial O21 pada -4OR. Energi ikatan MA6 adalah yang paling rendah diantara analog genistein lainnya yaitu -14,51 kcal/mol (Tabel 4) yang menandakan MA6 lebih mudah berinteraksi dengan reseptor dengan kekuatan dan stabilitas ikatan yang lebih baik. Ikatan juga distabilkan dengan banyaknya ikatan bump, lebih banyak dari ikatan bump pada genistein. Analisis *in silico* ini dapat membuktikan analisis *in vitro* sebelumnya yang menunjukkan bahwa MA6 memiliki aktivitas inhibisi paling tinggi diantara analog genistein lainnya. Interaksi dua molekul genistein pada Arg394 yang diasumsikan sebagai ikatan yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antagonis menempatkan MA6 diprediksi secara kimia komputasi memiliki potensi aktivitas farmakologi yang lebih tinggi sebagai inhibitor

kanker payudara ER α daripada tamoxifen yang hanya memiliki satu interaksi dengan Arg394.

Hasil *docking* ini membuktikan bahwa kekakuan dan keruahan rantai samping pada substituent menyebabkan halangan sterik pada ikatan agonis (hilangnya interaksi -4'OH dengan Glu353) sehingga aktivitas yang muncul menjadi lebih antagonis.

Tabel 3. Hasil Overlaying MA6-Genistein

No. Atom	Actual
C(1),C(31)	0,076
C(3),C(33)	0,094
C(7),C(37)	0,075
C(14),C(44)	0,060
O(17),O(47)	0,139
O(19),O(48)	0,147
O(21),O(49)	0,034
O(22),O(50)	0,118



Gambar 1. Overlaying MA6-Genistein

Secara keseluruhan atom-atom yang ditumpangtindihkan memiliki jarak $< 1\text{\AA}$. MA6 memiliki kemiripan geometri dan konfigurasi dengan genistein.

Analog genistein lainnya, MA8, dari parameter fisikokimia diperoleh nilai CLogP sebesar 4,49326 (paling mendekati *Lipinski's rule*) dan CMR sebesar 12,0908 (Tabel 1). Hasil *docking* memperlihatkan bahwa MA8 memiliki 4 ikatan hidrogen dengan residu HER α . Grup -4'OH (O21, muatan parsial -0,255) berinteraksi dengan Arg394, Glu353, dan Phe404, sedangkan grup -7OR (O17, muatan parsial -0,207) berinteraksi dengan Leu525. Gugus N tersier aromatik (N25, muatan parsial ekstrim positif 0,655), substituen pada cincin A genistein tidak teridentifikasi memiliki interaksi dengan residu HER α bahkan menggeser afinitas ikatan -7OH pada His524 menjadi pada Leu525. Hasil analisis *in silico* menunjukkan bahwa potensi MA8 sedikit lebih rendah daripada MA6. Hal ini ditunjukkan oleh MA8 yang hanya memiliki satu interaksi dengan Arg394 dan jarak interaksi MA8 pada Arg394 sedikit lebih besar daripada MA6, yaitu $2,700614\text{\AA} > 2,647946\text{\AA}$.

Energi ikatan MA8 dengan HER α sedikit lebih kecil dari MA6 yaitu sebesar -14,02 kcal/mol (Tabel 4).

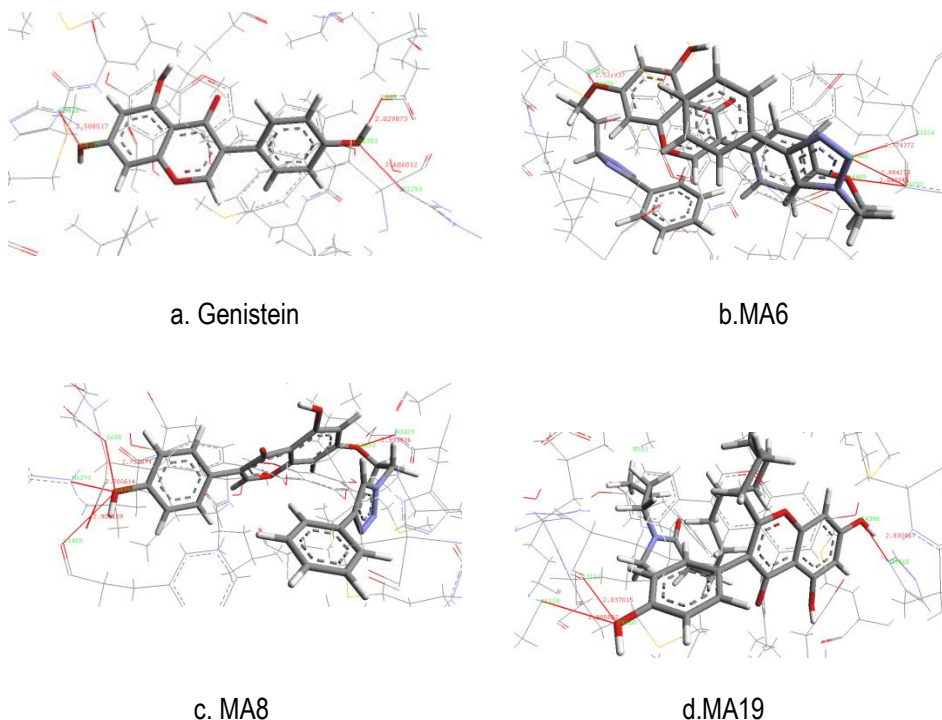
Hasil ini berkorelasi dengan data analisis *in vitro* sebelumnya dimana MA8 memiliki aktivitas inhibisi kedua tertinggi setelah MA6 dengan IC₅₀ pada sel T47D sebesar 1,1 μ M (Radharani, et al, 2011).

Jarak ikatan -4'OH pada residu Glu353 yang lebih kecil daripada jarak genistein (2,732874Å < 2,829873Å) menandakan afinitas ikatannya lebih kuat, ikatannya pada Phe404 juga menunjang data tersebut. Substituen -7OR menggeser afinitas ikatan pada His524. Perbedaan ikatan terjadi pada grup -7OR dimana genistein dan MA6 berinteraksi dengan His524 sedangkan MA8 berinteraksi dengan Leu525.

Ikatan ini belum dapat diidentifikasi apakah berkontribusi terhadap aktivitas agonis atau antagonis. Tidak ada data interaksi maupun densitas ikatan pada HER α dari tamoxifen, genistein, serta estradiol yang menunjukkan keterkaitan dengan residu tersebut. Perlu kajian lebih lanjut guna membandingkan interaksi dan densitas ikatan MA8, khususnya interaksi -7OR pada Leu525 dengan senyawa aktif/obat lain, baik itu yang memiliki aktivitas agonis maupun antagonis agar kaitannya terhadap pengaruh aktivitas yang dihasilkan dapat dijelaskan.

Tabel 4. Hasil *Docking* Genistein dan Analognya pada HERα dengan Keberadaan Air

Senyawa	Ascore (kcal/mol)	Jumlah Ikatan H	Jarak (Å)	Asam Amino	No. Atom Asam Amino	Gugus Berikatan H
Genistein	-10,24 -10,35 -10,28 -10,24 -10,25 -10,25 -10,27 -10,27 -10,29 -10,28 (x= -10,27)	3	2,508517 2,829873 2,686012	His524 Glu353 Arg394	-NH 3418 -O 605 -NH ₂ 1293	-7OH (O 4379) Cincin C -4'OH (O 4383) Cincin A -4'OH (O 4383) Cincin A
MA 6	-14,39 -14,81 -14,28 -14,65 -14,40 -14,65 -14,53 -14,47 -14,69 -14,27 (x= -14,51)	4	2,884278 2,647946 2,531933 2,774372	Arg394 Arg394 His524 Leu391	-NH ₂ 1293 -NH ₂ 1293 -NH 3418 -NH 1224	=N- (N 4403) Cincin A -4'OR (O 4409) Cincin A -7OR (O4406) Cincin C =N- (N 4403) Cincin A
MA 8	-13,66 -14,04 -14,09 -14,08 -13,90 -14,08 -14,16 -14,05 -14,15 -13,99 (x= -14,02)	4	2,700614 2,732874 2,900159 2,993936	Arg394 Glu353 Phe404 Leu525	-NH ₂ 1239 -O 605 -O 1460 -NH 3429	-4'OH (O 4394) Cincin A -4'OH (O 4394) Cincin A -4'OH (O 4394) Cincin A -7OR (O 4393) Cincin C
MA 19	-11,02 -11,08 -11,29 -11,44 -11,36 -11,55 -11,39 -11,50 -11,76 -11,75 (x= -11,41)	3	2,830967 2,037015 2,885802	His524 Leu384 Glu385	-NH 3418 -O 1112 -NH 1128	-7OH (O 4396) Cincin C -4'OH (O 4400) Cincin A -4'OH (O 4400) Cincin A



Gambar 2. Docking Genistein dan Analognya Terhadap HER α dengan Keberadaan Air

Energi interaksi ligan-reseptor dari hasil *docking* keseluruhan adalah < 0 kcal/mol. Semakin rendah energi ikatan maka interaksi menjadi semakin stabil, semakin dekat jarak ikatan dan semakin banyak Analog genistein lainnya adalah MA19, memiliki IC₅₀ pada sel T47D paling besar diantara analog lainnya, akan tetapi masih 10 kali lebih kecil daripada senyawa induknya, yaitu sebesar 1,2 μ M (Radharani, et al, 2011). Parameter fisikokimia menunjukan senyawa MA19 memiliki lipofilisitas tertinggi sebesar 6,92729 dan CMR sebesar 14,9587 (Tabel 1). MA19 memiliki energi ikatan LUMO terbesar -0,614 EV (Tabel 3) menunjukan MA19 sedikit lebih sulit dalam menerima donor elektron dari molekul reseptor. MA19 Memiliki tiga ikatan hidrogen. Grup -7OH (O17, muatan parsial -0,238) berinteraksi pada His524 dengan jarak ikatan MA19 lebih besar dari genistein maupun analog genistain lainnya (2,830987Å). Dua ikatan hidrogen lainnya yaitu grup -4'OH genistein (O22, muatan parsial -0,262) berinteraksi dengan residu Leu384 dan Glu385. Energi ikatan minimum MA19 adalah yang paling besar diantara semua analog genistein yaitu -11,41 kcal/mol (Tabel 4), tetapi masih

ikatan hidrogen terhadap sisi aktif maka interaksi ligan-reseptor semakin kuat (efek farmakologi sebagai inhibitor dengan potensi tinggi).

di bawah genistein, menunjukkan MA19 cenderung memiliki afinitas dan stabilitas ikatan yang paling rendah analog genistein lainnya. Pada MA19 tidak ditemukan ikatan dengan Arg394. Grup -4'OH yang pada genistein berikatan dengan Arg394 dan Glu353, pada MA19 berikatan dengan Leu384 dan Glu385. Hal tersebut mungkin terjadi karena substituent pada C2 cincin B genistein menyebabkan pergeseran afinitas ikatan karena muatan O karbonil pada substituent lebih tinggi daripada O pada -4'OH dan terbentuk halangan sterik karena rantai panjang substituent pada Arg394. Pada genistein, tamoxifen, dan estradiol tidak ditemukan keterkaitan dengan dua residu HER α tersebut baik dari ikatan hidrogen maupun densitas ikatannya. Maka dari itu perlu kajian kimia komputasi lebih lanjut agar pengaruh ikatan tersebut terhadap aktivitas yang mungkin dihasilkan dapat terdeskripsikan, walaupun jika dikaitkan dengan data IC₅₀ ikatan ini diprediksi cenderung

berkontribusi terhadap ikatan antagonis karena aktivitas inhibisi yang dihasilkan masih jauh lebih besar daripada genistein. Hasil analisis kimia komputasi ini dapat mengkonfirmasi analisis *in vitro* sebelumnya yang menunjukkan bahwa aktivitas MA19 adalah yang paling rendah diantara analog genistein lainnya. Pada senyawa MA19 muatan parsial ekstrim negatif tidak lagi pada O karbonil cincin B (O21, muatan parsial -0,713), melainkan pada O karbonil substituen (O41) dengan nilai muatan parsial -0,871 dan muatan parsial positif terbesar dimiliki gugus N alifatik tersier pada substituen, (N35, muatan parsial 0,394). Reaktivitas molekul senyawa yang tidak teridentifikasi pada ArgusLab, kemungkinan membentuk ikatan elektrostatik dengan residu HER α .

Seluruh analisis *in silico* yang telah dilakukan dapat mengkonfirmasi, mengevaluasi, dan menjelaskan interaksi genistein dan analognya pada HER α . Pengembangan senyawa aktif baru dapat dilakukan terutama pada grup -4'OH cincin A genistein yang diprediksi merupakan farmakofor paling penting dalam interaksinya dengan Arg394 yang diasumsikan sebagai interaksi yang bertanggung jawab terhadap aktivitas inhibisi. Pengembangan senyawa aktif baru dapat dilakukan dengan cara :

Substitusi pada senyawa induk genistein (isoflavon) dapat memenuhi parameter fisikokimia obat yang optimum untuk menghasilkan aktivitas farmakologi obat yang tinggi. Substitusi dapat mengacu pada senyawa MA6. Keelektronegatifan (O) pada -4'OH dapat ditingkatkan dengan cara disubstitusi oleh substituen yang memiliki keelektronegatifan tertentu yang sesuai yang dapat meningkatkan keelektronegatifan O pada -4'OH atau substituent lain yang sesuai. Substituen tidak boleh memiliki muatan yang lebih negatif daripada -4'OH atau molekul dengan muatan yang dapat menggeser afinitas ikatan -4'OH pada Arg394. Substituen dengan reaktivitas =N aromatik serta rantai samping yang meruah dan kaku seperti pada MA6 dapat diaplikasikan dalam *men-design* senyawa baru karena terbukti secara *in silico* dan *in vitro* mampu menghalangi ikatan agonis, meningkatkan selektivitas, dan aktivitas inhibisi 15 kali lebih tinggi dari senyawa induk. Substitusi dengan molekul rantai panjang pada gugus nonfarmakofor (C2 genistein cincin B) seperti pada MA19 kurang dianjurkan karena walaupun meningkatkan keruahan, lipofilisitas, dan meningkatkan aktivitas inhibisi secara *in vitro* 10 kali dibandingkan senyawa induk tetapi secara kimia komputasi

substituent tersebut justru menyebabkan halangan sterik yang menghalangi ikatan hidrogen pada Arg394 yang mungkin dapat menurunkan aktivitas inhibisi, selain itu afinitas -4'OH pada Arg394 tergeser oleh gugus karbonil pada substituent yang memiliki muatan lebih negatif daripada O pada -4'OH. Gugus nonfarmakofor dapat disubstitusi oleh molekul yang stabil dan tidak meruah agar posisi saat senyawa berikatan dengan situs aktif HER α lebih stabil tanpa menghalangi interaksi -4'OH pada Arg394.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat

Satu unit komputer dengan prosesor berkecepatan 2.5GHz dan kapasitas memori 2GB, perangkat lunak ChemDraw Ultra[®] 8.0, Chem3D Ultra[®] 8.0, dan ArgusLab[®] 4.0.1.

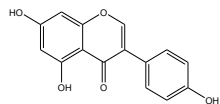
Bahan

Protein reseptor (Genistein-HER α) kode **1X7R** diperoleh dari Protein Data Bank (www.rcsb.org), struktur genistein dan 3 analognya yang berhasil disintesis oleh Radharani *et al.* (Gambar 2) (Radharani, et al. 2011; Manas, et al, 2004).

Prosedur

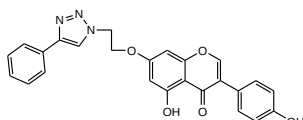
Koefisien Partisi (CLogP) dan Refraktivitas Molar(CMR)

Dibuat model 2D senyawa uji pada program ChemDraw, kemudian struktur senyawa uji di-*block*, pada menu *view* dipilih *show molecule properties windows* hingga muncul *molecule properties*. Nilai CLogP dan CMR yang muncul dicatat dan dilakukan interpretasi hasil.



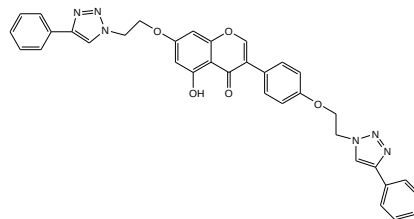
5,7-dihidroxy-3-4(4-hidroxyphenyl)
-4H-chromen-4-one

a. Genistein



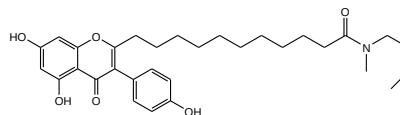
5-hydroxy-3-(4-hidroxyphenyl)-7-
(2-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)
-4H-chromen-4-one

c. MA8



5-hydroxy-7-(2-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-
yl)ethoxy)-3-
(4-(2-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-
yl)ethoxy)phenyl)
-4H-chromen-4-one

b. MA6



N-butyl-11-(5,7-dihidroxy-3-
(4-hidroxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-2-yl)-
N-methylundecanamide

d. MA19

Gambar 2. Struktur genistein dan analognya

Reaktivitas Muatan Parsial

Menggunakan program Chem3D, dibuat model 3D senyawa uji. Dipilih menu MOPAC, lakukan *minimize energy*, *run*, dan ditunggu sampai kalkulasi selesai. Masih pada menu MOPAC, dipilih *compute properties*, selanjutnya pilih *molecular surface* dan *run*, program ditunggu sampai perhitungan selesai. Pada menu *analyze*, submenu *extended Huckel charge* di klik. Pada menu *view* lalu submenu *settings*, pilih *box atom display*, dan pada *subbox solid spheres*, pilih *partial charge*.

Energi Ikatan (HOMO-LUMO & E-Gap)

Menggunakan model 3D struktur senyawa uji pada program Chem3D, energi sterik diminimalisasi dengan metode MM2, dan energi HOMO-LUMO struktur dihitung dengan MOPAC. Digunakan AM1 sebagai model perhitungan dan hasil perhitungan disimpan dalam folder. Pada file hasil yang telah disimpan, nilai energi HOMO-LUMO dapat diketahui dalam file notepad (.txt).

Menentukan Kemiripan Struktur Senyawa Uji dengan *Overlaying*

Senyawa pembanding dibuka pada program Chem3D, kemudian ditempatkan pula model 3D senyawa uji yang akan dibandingkan dengan senyawa pembanding. Pada menu *tool* dipilih menu *deselect show H's and Lp's*. Pada menu *view*, submenu *setting*, dipilih *atom display*, dan klik *serial number*. Setelah itu dipasangkan senyawa uji dengan senyawa pembanding. Klik tombol "A" pada atom C nomer tertentu dari senyawa uji, kemudian tekan tombol *shift* pada *keyboard* dan klik pada atom C nomer tertentu dari senyawa pembanding, kemudian pada menu *object* dipilih menu *set distance* (ctrl L). Langkah tersebut diulangi untuk untuk setiap pasangan atom-atom lainnya. Setelah pemasangan atom selesai, pada menu *view*, pilih submenu *setting*, pilih *atom labels*, dan *deselect serial number*, kemudiankotak *setting* ditutup. Pada menu *tool* dipilih submenu *overlay* kemudian klik *start*. Jarak atom hasil *overlay* dicatat.

Optimasi Geometri

Optimasi geometri dilakukan dengan menggunakan program ArgusLab. Beberapa metode optimasi dilakukan untuk mencapai energi minimum dan posisi molekul senyawa uji yang paling sesuai/stabil untuk kemudian dilakukan proses *docking* pada HER α . Metode optimasi geometri yang dipilih adalah mekanika kuantum semiempiris. Pada ArgusLab tersedia 3 metode optimasi geometri mekanika kuantum semiempiris, yaitu: AM1 (*Austin Model 1*), PM3 (*Parameterized Model 3*) dan MINDO (*Modified Neglect Differential Overlap*)¹¹

Validasi Metode *Docking*

Validasi perangkat lunak dan metode *docking* dilakukan dengan cara kalkulasi *Rate Mean Square Deviation* (RMSD). Nilai diperoleh dari hasil *docking* senyawa ligan pembanding dengan ligan *copy*-nya pada *binding site* ligan pembanding pada reseptor HER α . Validasi dilakukan menggunakan program ArgusLab. Metode *docking* yang akan dibandingkan adalah GADock dan ArgusDock dengan sifat/kondisi ligan *flexible* maupun *rigid*. Metode dikatakan reliabel/valid jika nilai RMSD ≤ 2 , yang artinya posisi ligan *copy* yang berikatan pada *binding site* reseptor semakin mirip dan dekat dengan ligan aslinya. Validasi dilakukan pada kondisi dengan adanya molekul air agar semakin dekat dengan kondisi biologis yang sebenarnya.¹¹

Docking Senyawa Uji

Docking senyawa uji terhadap ligan *binding site* HER α dilakukan dengan program ArgusLab. Model HER α (.pdb) diperkirakan sisi aktifnya berdasarkan sisi aktif acuan dari sisi aktif HER α yang telah berikatan dengan ligan pembanding. Pada ArgusLab, ligan yang berikatan pada sisi aktifnya dapat dilihat pada folder *Misc* pada *tool-folder tree view*. *Docking* dilakukan dengan mengganti ligan pembanding oleh ligan uji yang telah disiapkan dan telah dilakukan optimasi geometri. Proses *docking* dilakukan dengan metode yang paling cocok yang diperoleh dari hasil validasi GADock (*docking* direplikasi sebanyak 10 kali) (Kartasmita, et al, 2009) atau ArgusDock, pada kondisi *rigid* atau *flexible*). Hasil *docking* di-*scoring* dan diperoleh *output* berupa energi bebas (ΔG , *Gibbs Energy*) yang menyatakan kekuatan interaksi ligan-reseptor. Hasil dari *docking* tersebut akan menunjukan parameter ikatan ligan-reseptor sebagai dasar

untuk mengkaji hubungan struktur dan aktivitas dari senyawa uji (Anonymous, 2004).

Baik validasi maupun proses *docking* dilakukan pada kondisi dengan adanya molekul air agar semakin dekat dengan kondisi biologis yang sebenarnya dalam tubuh. Molekul air disekitar ligan tidak mengganggu analisis karena pada jarak *binding site bounding box* 3,0-3,5Å dari ligan hanya terdapat satu molekul air (7HOH).

KESIMPULAN

Secara keseluruhan analisis *in silico* yang telah dilakukan dapat menjelaskan mekanisme kerja genistein dan analognya secara molekular dan dapat mengkonfirmasi hasil penelitian-penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa genistein dan analognya memiliki aktivitas sebagai inhibitor kanker payudara ER α +. Selektifitas, reaktivitas, stabilitas, dan aktivitas senyawa dipengaruhi oleh sifat fisikokimia, geometri, dan konfigurasinya, dalam kajian ini terutama dipengaruhi oleh lipofilisitas dan keruahan. Substitusi yang diprediksi paling berpengaruh terhadap selektifitas, reaktivitas, stabilitas, dan aktivitas inhibisi adalah grup -4'OH cincin A dan -7OH cincin C genistein, dengan substituen merupakan molekul rantai panjang yang meruah dan kaku. Hasil analisis menunjukkan penambahan substituen bukan pada gugus farmakofor masih dapat meningkatkan aktivitas biologis tapi tidak jauh lebih besar. Substituen pada grup -7OH dan pada gugus nonfarmakofor tidak menyumbangkan ikatan hidrogen tetapi kemungkinan adanya ikatan elektrostatik karena reaktivitas muatan parsial molekul substituen tidak dapat tergambarkan oleh ArgusLab. Semakin banyak ikatan hidrogen dan semakin dekat jarak ikatan pada residu yang diprediksi bertanggung jawab terhadap aktivitas antagonis (Arg394) maka aktivitas inhibisi semakin tinggi, hal tersebut dikonfirmasi oleh hasil IC₅₀. Genistein, MA6, dan MA8 memiliki aktivitas menyerupai tamoxifen, bahkan diprediksi lebih poten untuk MA6, dikorelasikan terhadap ikatannya dengan Arg394. Interaksi MA6 terhadap HER α adalah yang paling baik

SARAN

Dilakukan pula penetaapan energi ikatan HOMO-LUMO & E-Gap dari HER α serta diperlukannya standarisasi metode *docking* karena perbedaan metode *docking* (*software*) dapat memberikan hasil yang berbeda pada hasil *docking*.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrew, K, Shiau., Danielle, Barstad., Paula, M, Loria., Lin, Cheng., Peter, J, Kushner., David, A, Agard., Geoffrey, L, Greene. (1998) : The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen. *Cell Press*, Vol. **95**, 927–937.
- Anonymous, 2004, ArgusLab 4.0.1., Tutorial and FAQs, Mark Thompson and Plannaria Software LLC.
- Dhananjaya, K., Sibi, G., H, Mallesha., K.R, Ravikumar., Saurabh, Awatshi. (2012) : Insilico Studies of Daidzein and Genistein with HER. India: R&D Centre Robust Material Technologi. *Elsevier.Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.SI747-SI753.
- Glover A. and Assinder, S.J. (2006) : Acute Exposure of Adult Male Dats to Dietary Phytoestrogen Reduces Fecundity and Alters Epididymal Steroid Hormon Receptor Expression.*Journal Endoc*.**189**. 565-573.
- Jane, LL and Valerie, S. (2004) : Phytoestrogen and Breast Cancer Chemoprevention.Molecular Medicine Unit, University of Leeds, St James, University Hospital, Leeds, UK.*Breast Cancer Research***6**.119-127.
- Kartasasmita, Emran, Rahmana., Herowati, Rina., Harmastuti, Nuraeni., Gusdiar, Tutus. (2009) : Quercetin Derivatives Docking Based on Study Of Flavonoids Interaction To Cyclooxygenase-2.*Indo. J. Chem*, **9** (2): 297-302.
- Manas, Eric, S., Zhang, B, Xu., Rayomand, J, Uwalla., William, S, Somers. (2004) : Understanding The Selectivity of Genistein for Human Estrogen Recetor- β Using X-Ray Crystallography and Computational Methods.*Elsevier Ltd. Sctructure*, Vol. **12**. 2197-2207.
- Payne, SJL., Bowen RL., Jones, JL.,& Wells CA. (2008) : Predictive Markers in Breast Cancer-The Present.*Histopathology* **52**. 82-90.
- Radharani, M., Madhan, A., Ravi, A., Vered, S., Christopher, BU., and Saed, K. (2011) : Poten Genistein Derivatives as Inhibitor of Estrogen Receptor Alpha-Positive Breast Cancer. Departemen of Surgery.John Hopkins University School of Medicine.Cancer Research Building. Baltimore MD. USA. *Cancer Biologi and Teraphy***11** (10): 883-892.
- Tanebaum, M, Davud., Wang, Yong., Williams, P, Shawn., Sigler, R, Paul. (1998) : Crystallographic Comparison of The Estrogen and Progesterone Receptor's Ligand Binding Domains.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. **95**, pp. 5998–6003.
- Turner, JV., Agatonovic-Kustrin, S., Glass, BD. (2007) : Molecular Aspect of PhytoestrogenSelective Binding at Estrogen Receptors. *J. Pharm Sci***96** (8): 1879-1888.