

Sintesis, Karakterisasi Struktur, dan Kajian *Molecular Docking* Senyawa Turunan 4'-Metoksi Flavonol sebagai Antagonis *Estrogen Reseptor Alpha* (ER- α) pada Kanker Payudara

Ihsan Ikhtiarudin^{a*}, Rahma Dona^a, Neni Frimayanti^a, Rahayu Utami^a, Nurul Susianti^a,
Abdi Wira Septama^b

^aDepartment of Pharmacy, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Jalan Kamboja, Simpang Baru, Panam, Pekanbaru, Riau

^bPusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Tradisional, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong, Indonesia

Corresponding Author:
Ihsan Ikhtiarudin
ihsanikhtiarudin@stifar-riau.ac.id

Received: July 2022
Accepted: September 2022
Published: September 2022

©Ihsan Ikhtiarudin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

A long period of drug administration in breast cancer chemotherapy can cause various side effects. These situations encourage researchers to search for and develop alternative anticancer drugs through various approaches. This study aimed to synthesize a flavonol derivative (TF4) and to study the interactions of the synthesized compound with ER- α as one of the targeted receptors in breast cancer treatment. The synthesis was carried out using the stirring method and the study of interactions of TF4 with ER- α was performed through molecular docking against ER- α crystal structures bound to an antagonist (PDB ID: 3ERT) and agonist (PDB ID: 1A52). The synthesis of TF4 produced crude product in 58 % yield and pure product in 6 % yield. The structure of TF4 was confirmed by spectroscopic analyses including UV, FT-IR, 1D, and 2D NMR. The docking results showed that the TF4 does not form any conventional hydrogen bond with ER- α . However, it can form carbon-hydrogen (C-H) bonds and van der Waals interactions with several important residues on the active site of ER- α . In addition, the binding free energy values of TF4 (-9.14 and -9.50 kcal/mol) are more negative than estradiol (E₂) as one of the natural ligands for ER- α . Thus, it can be estimated that TF4 can be bounded easier on the active site of ER- α than its natural ligand. It may presume that it can act as an estrogen antagonist because of the similarity in interactions and binding poses compared to TAM, TOR, dan 4-OHT as reference drug molecules.

Keywords: *Methoxy flavonol; chlorinated flavonol; docking study; estrogen receptor; breast cancer*

Pendahuluan

Kanker payudara merupakan jenis kanker yang banyak menyerang wanita. Berdasarkan data *Global Cancer Observatory*, total kasus baru kanker di dunia tahun 2020 adalah sebanyak 19.3 juta kasus, di mana kanker payudara

menduduki peringkat pertama^[1]. Di Indonesia, kanker payudara juga menduduki peringkat pertama dari total 136.2 ribu kasus kanker^[2].

Salah satu metode dalam penatalaksanaan kanker payudara adalah kemoterapi^[3]. Pada pasien kanker payudara jenis luminal A dan B,

tamoxifen (TAM) merupakan jenis terapi hormonal lini pertama yang direkomendasikan dengan lama pemberian 5-10 tahun^[4]. Selain TAM, obat lainnya yang telah disetujui adalah toremifene (TOR). Baik TAM maupun TOR bekerja pada reseptor estrogen sebagai *Selective Estrogen Receptor Modulator* (SERM)^[5] yang dapat menimbulkan efek agonis parsial maupun antagonis parsial, tergantung di jaringan mana mereka bekerja, sehingga secara selektif dapat menghambat atau merangsang kerja hormon estrogen pada berbagai jaringan tubuh^[6]. Pada jaringan payudara, SERM bertindak sebagai antiestrogenik, sedangkan pada jaringan lainnya seperti jaringan di hati, rahim, dan tulang, SERM dapat memberikan efek estrogenik^{[7],[8]}.

Estrogen receptor alpha (ER- α) merupakan salah satu reseptor estrogen yang mengatur proses transkripsi dan mempengaruhi aktivitas biologi hormon estrogen. Hormon dan reseptor ini diketahui berperan penting dalam proses genesis dan perkembangan keganasan kanker payudara luminal A dan B^[9]. Oleh karena itu, reseptor ini menjadi target yang menarik bagi para peneliti dalam riset pencarian senyawa-senyawa yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen kemoterapi. Kemoterapi dilakukan melalui pemberian obat secara bertahap sebanyak 6-8 siklus agar memperoleh efek yang diharapkan dengan efek samping yang masih dapat diterima^[4]. Namun kenyataannya tidak semua efek samping tersebut dapat ditolerir. Jangka waktu pemberian obat yang sangat lama tersebut dapat menimbulkan berbagai efek samping seperti kardiotoxicitas^[10], hepatotoxicitas^[11], dan juga resistensi^[12].

Flavonoid merupakan kelompok senyawa bahan alam yang banyak disintesis karena memiliki potensi antikanker yang menjanjikan^{[13],[14]}. Flavonoid dapat menghambat proliferasi berbagai sel kanker melalui beragam mekanisme penghambatan, salah satunya adalah dengan memblok pengikatan hormon estrogen (estradiol, E₂) ke ER- α ^[15]. Kalkon dan flavon dilaporkan dapat menghasilkan efek antiestrogenik tanpa harus

berikatan langsung dengan ER- α . Senyawa-senyawa tersebut dapat menekan aktivitas ER- α melalui stimulasi *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) yang diaktifkan oleh c-Jun N-terminal kinase (JNK)1 dan JNK2^[16]. Namun, aktivitas antiestrogenik beberapa flavon lainnya seperti luteolin dan chrysin diketahui berkorelasi langsung dengan kemampuan mereka dalam menghambat pengikatan E₂ ke ER- α secara kompetitif^[15]. Selain itu, senyawa flavonol seperti kuersetin^[17], kaempferide dan tamarixetin^[15] juga telah dilaporkan dapat menghambat secara signifikan aktivitas proliferasi sel kanker payudara yang diinduksi oleh E₂.

Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa kehadiran gugus hidroksi pada cincin aromatik berperan penting pada proses pengikatan ke ER- α ^[18]. Penelitian lain juga melaporkan bahwa kehadiran gugus metoksi baik pada cincin *chromen* maupun fenil dapat membantu dalam proses pengikatan senyawa tersebut ke ER- α melalui pembentukan ikatan hidrogen dengan Arg394 dan His524. Selain itu, kehadiran suatu rantai samping yang dapat berikatan dengan Asp351 juga menjadi suatu hal penting untuk menghasilkan konformasi antagonis yang menyerupai TAM^[19]. Di samping itu, pemasukan suatu rantai alkil juga dilaporkan dapat mengubah efek biologis senyawa tersebut dari agonis menjadi antagonis^[20].

Berdasarkan latar belakang di atas, peneliti tertarik untuk melakukan sintesis, karakterisasi struktur, dan kajian *molecular docking* suatu senyawa turunan flavonol, 3-(3-chloropropoxy)-2-(4-methoxyphenyl)-4H-chromen-4-on (TF4). Sintesis senyawa ini telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya^[21]. Namun, penelitian terkait potensi bioaktivitas senyawa ini belum pernah dilaporkan. Pada penelitian ini, sintesis senyawa TF4 dilakukan dengan mereaksikan 4'-metoksiflavonol dan 1-bromo-3-kloropropana dengan tujuan untuk memasukkan suatu rantai samping alkil. Kehadiran gugus 4'-metoksifenil pada senyawa TF4 diharapkan dapat berkontribusi dalam pembentukan ikatan hidrogen antara senyawa tersebut dengan ER- α ^[19]. Selain itu, kehadiran

rantai samping alfatik yang mengikat Cl juga diharapkan membuat senyawa TF4 dapat meniru struktur TOR⁵¹. Kajian awal potensi bioaktivitas senyawa ini dilakukan dengan pendekatan *in silico* melalui *molecular docking*. Pendekatan ini menawarkan keuntungan sebagai pendekatan yang cepat untuk memprediksi potensi interaksi antara ligan dengan suatu reseptor yang ditargetkan^[22] sebelum dilakukan pengujian bioaktivitas lebih lanjut di laboratorium.

Metodologi Penelitian

Bahan Kimia

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian adalah 4'-metoksi flavonol (4F)^[23] (Pubchem CID: 97141), potassium karbonat *for analysis* (Merck), 1-bromo-3-kloropropana 99% (Sigma-Aldrich), plat KLT *Silica gel* F254 (Merck), pelarut-pelarut organik *for analysis* seperti asetonitril (Merck), etanol absolut (Merck), metanol (Merck), dan kloroform (Merck), serta beberapa pelarut organik teknis yang telah didestilasi seperti *n*-heksana dan etil asetat (CV. Amal Parlagutan Niaga).

Peralatan

Peralatan yang digunakan antara lain timbangan analitik (Precisa), pompa vakum (Brinkman), lampu UV 254/366 (Camag), alat pengukur titik leleh (DMP-600), HPLC (Shimadzu Lc solution), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1900i), spektrofotometer FT-IR (Shimadzu IR Spirit QATR-S), spektrometer NMR (Agilent, 500 dan 125 MHz), dan komputer LG Intel® Core™ i7-8700 CPU 3,20 GHz 16 GB RAM dengan sistem operasi Windows 10, yang dilengkapi dengan *software* ChemDraw Professional 15 (PerkinElmer

Informatics, Inc), MOE 2021.0901 (Chemical Computing Group), dan Discovery Studio Visualizer 2021 (Biovia).

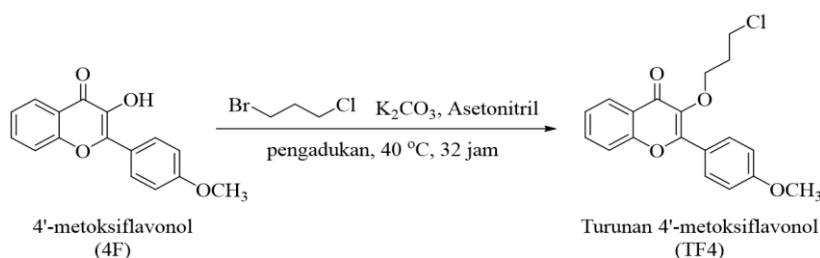
Prosedur penelitian

Sintesis senyawa 3-(3-kloropropoxy)-2-(4-methoxyphenyl)-4H-chromen-4-one (TF4)

Sintesis dilakukan dengan memodifikasi metode sebelumnya^{[21],[24]} (Gambar 1). Sebanyak 2.5 mmol senyawa 4F dilarutkan dalam 20 mL asetonitril, kemudian ditambahkan dengan 6 mmol potassium karbonat anhidrat. Campuran reaksi diaduk di atas *hotplate magnetic stirrer* pada suhu 40°C selama 5 menit, kemudian ke dalam campuran reaksi ditambahkan tetes demi tetes larutan yang terbuat dari 12.5 mmol 1-bromo-3-kloropropana dalam 10 mL asetonitril. Pengadukan dilanjutkan hingga reaksi selesai dan jalannya reaksi dipantau melalui uji KLT. Setelah reaksi selesai, campuran reaksi disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan larutan produk (filtrat) dari residu potassium karbonat. Kemudian pelarut dibiarkan menguap pada temperatur kamar dan *crude product* yang diperoleh selanjutnya dimurnikan dengan metode rekristalisasi menggunakan etanol absolut panas.

Analisis kemurnian dan karakterisasi struktur produk hasil sintesis

Analisis kemurnian dilakukan dengan HPLC fase terbalik dengan memodifikasi prosedur sebelumnya^[23] menggunakan fase gerak asetonitril:air dan deteksi dilakukan pada panjang gelombang 329 nm. Struktur TF4 dikarakterisasi melalui analisis spektroskopi UV dan FT-IR di STIFAR Pekanbaru. Selanjutnya, pengukuran spektrum ¹H NMR, ¹³C NMR, dan HSQC TF4 dilakukan di ITB, Bandung.



Gambar 1. Rute sintesis senyawa TF4

Preparasi struktur protein

Kajian *docking* dilakukan dengan memodifikasi prosedur sebelumnya^{[25]-[27]}. Struktur kristal ER- α yang berikatan dengan 4-OHT (PDB ID: 3ERT)^[26] dan struktur kristal ER- α yang berikatan dengan E₂ (PDB ID: 1A52)^[27] diunduh dalam format PDB dari website <http://www.rcsb.org>. Molekul air dan ion logam dihilangkan dan interaksi antara ligan bawaan dan protein diamati dengan DSV. Selanjutnya, ligan bawaan (4-OHT) dan ligan alami (E₂) dihilangkan, dan reseptor kemudian dipreparasi menggunakan *force field* CHARMM27, *fix hydrogens*, *fix charges*, dan *gradient* 0,001 pada menu *QuickPrep* menggunakan MOE.

Isolasi dan optimasi struktur 3D ligan bawaan dan ligan alami

Struktur 4-OHT dan E₂ diisolasi dari struktur kristal 3ERT dan 1A52, lalu dioptimasi menggunakan *forcefield* MMFF94x, *fix hydrogens*, *fix charges*, dan *gradient* 0.0001. Struktur isolat yang telah dioptimasi disimpan dalam format MDB sebagai *database ligand* untuk proses *redocking*.

Penandaan sisi aktif pada protein, redocking 4-OHT dan E₂

Penandaan sisi aktif dilakukan menggunakan menu *site finder* pada MOE. Site 1 diset sebagai *dummy atoms*, *receptor* diset sebagai MOE, *ligand* diatur sebagai *MDB file*, *placement* dan *refinement method* diatur sebagai *Triangle Matcher* dan *Rigid Receptor*, *placement* dan *refinement score* diatur sebagai London dG dan GBVI/WS dG, *placement* dan *refinement poses* diatur menjadi 100 dan 10. Dalam hal ini, 4-OHT di-*redocking* ke sisi aktif 3ERT, sedangkan E₂ di-*redocking* ke sisi aktif 1A52.

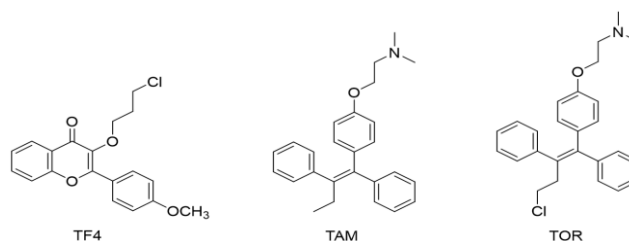
Preparasi struktur ligan, docking ligan ke sisi aktif protein, dan visualisasi hasil docking

Struktur TF4, TAM, dan TOR digambarkan menggunakan aplikasi ChemDraw (Gambar 2). Kemudian struktur 3D dioptimasi mengikuti prosedur optimasi ligan bawaan. Ketiga ligan di-*docking* ke 3ERT mengikuti prosedur *redocking* 4-OHT dan TF4 di-*docking* ke 1A52 mengikuti prosedur *redocking* E₂. Pose pengikatan terbaik dengan nilai RMSD < 2.0 dipilih dan hasil *docking* divisualisasikan dalam bentuk gambar dan tabel, lalu diinterpretasikan.

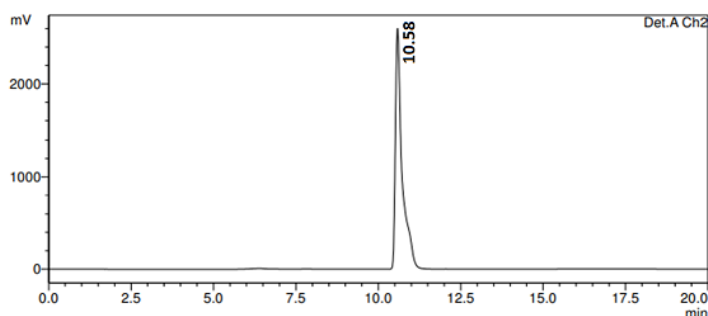
Hasil dan Diskusi

Mekanisme reaksi sintesis TF4 diawali oleh perebutan hidrogen asam pada gugus 3-OH senyawa 4F oleh potassium karbonat, sehingga dihasilkan suatu nukleofil anion 4F yang kemudian menyerang karbon elektrofilik C-Br pada 1-bromo-3-kloropropana melalui reaksi substitusi nukleofilik S_N2. Dalam hal ini, gugus Br pada alkil dihalida tersebut akan digantikan oleh atom O nukleofil dalam 1 tahap reaksi, sehingga terbentuklah senyawa TF4.

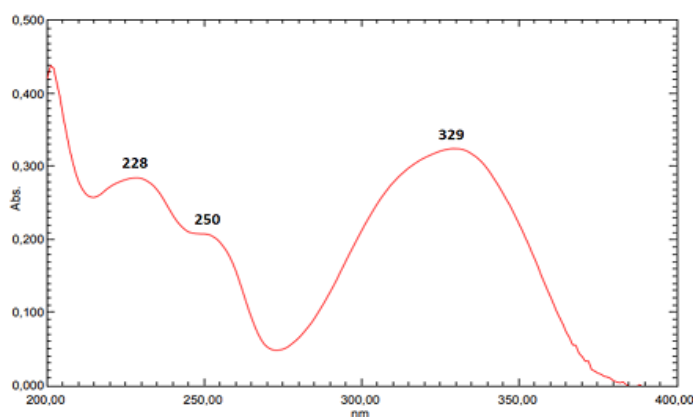
Berdasarkan pengamatan hasil uji KLT di bawah lampu UV 254 dan 366 nm, pada reaksi sintesis TF4 ini dihasilkan beberapa produk samping yang belum dapat diidentifikasi. Sehingga *crude product* perlu dimurnikan sebelum dilakukan karakterisasi lebih lanjut. *Crude product* diperoleh dalam bentuk amorf berwarna putih jingga dengan rendemen 58%, sedangkan produk murni dengan bentuk kristal jarum berwarna putih hanya berhasil diperoleh 6%. Sehingga kedepannya perlu dilakukan optimasi metode sintesis TF4 agar dapat menghasilkan rendemen yang lebih baik.



Gambar 2. Struktur 2D TF4, TAM, dan TOR



Gambar 3. Kromatogram HPLC TF4

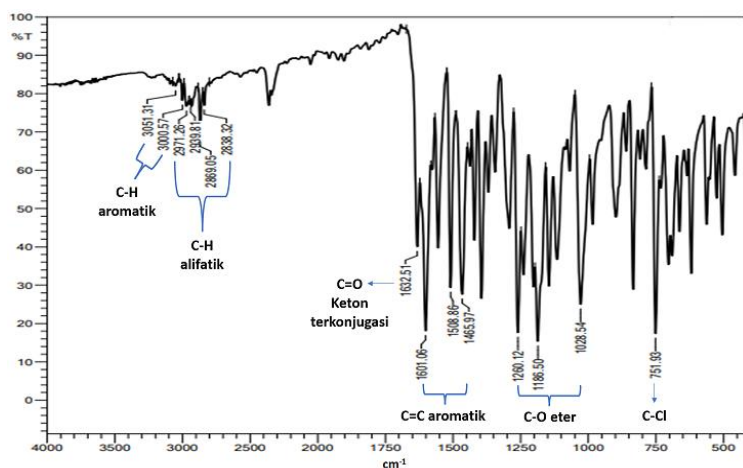


Gambar 4. Spektrum UV Senyawa TF4

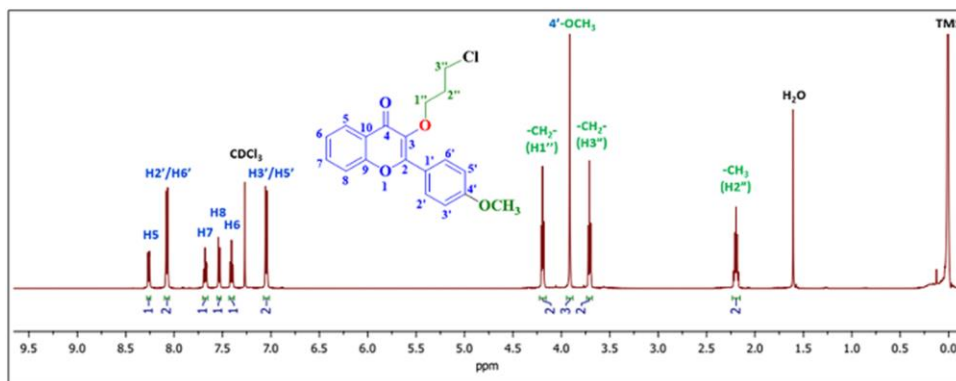
Hasil pengukuran titik leleh menunjukkan bahwa kristal senyawa TF4 memiliki titik leleh 68-69°C (literatur = 66°C)^[21]. Berdasarkan jarak lelehnya yang tajam (1°C), dapat diprediksi bahwa padatan TF4 hasil rekristalisasi telah memiliki kemurnian yang baik. Untuk memastikan kemurniannya, kemudian dilakukan analisis HPLC. Hasil analisis HPLC (Gambar 3) menunjukkan puncak tunggal pada $t_R = 10.58$ menit. Munculnya puncak tunggal tersebut mengindikasikan bahwa senyawa TF4 telah murni

Hasil pengukuran spektrum UV (Gambar 4) menunjukkan dua pita serapan khas yang dihasilkan oleh dua jenis sistem konjugasi pada flavonoid. Berdasarkan literatur, flavonol dengan gugus 3-OH tersubstitusi akan menghasilkan pita I pada panjang gelombang 328-357 nm, sedangkan pita II nya akan muncul pada panjang gelombang 250-280 nm^[28], sedangkan literatur lainnya menyebutkan

bahwa pita I akan muncul pada rentang 300-380 nm dan pita II akan muncul pada rentang 240-280 nm^[29]. Pada penelitian ini, pita I muncul pada panjang gelombang 329 nm dengan absorbansi 0.324; sedangkan pita II muncul pada panjang gelombang 250 nm dengan absorbansi 0.219. Munculnya dua pita serapan ini masing-masing disebabkan oleh kehadiran jenis sistem konjugasi sinamoil dan sistem konjugasi benzoil pada senyawa flavonol^[23]. Kemudian pita serapan pada 228 nm dapat diinterpretasikan sebagai pita K yang menandakan adanya gugus fenil pada senyawa TF4. Berdasarkan literatur, pita K pada benzena muncul pada 204 nm. Namun jika benzena tersebut terkonjugasi dengan gugus karbonil, maka akan menyebabkan terjadinya pergeseran batokromik pada pita K ke panjang gelombang 230 nm^[30].



Gambar 5. Spektrum FT-IR Senyawa TF4

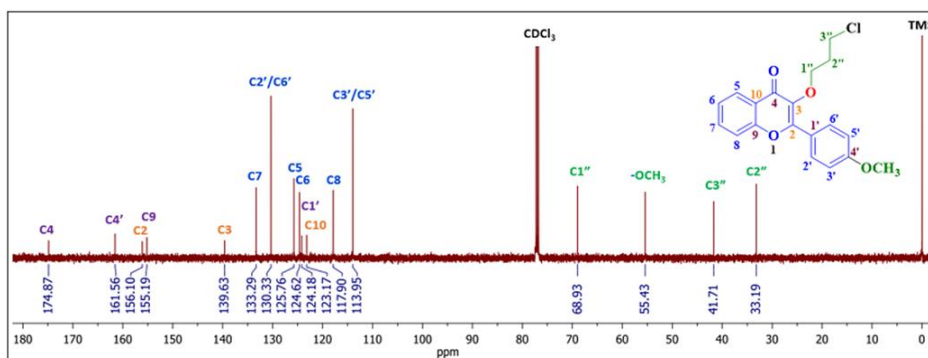


Gambar 6. Spektrum ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) senyawa TF4

Hasil pengukuran spektrum FT-IR pada Gambar 5 menunjukkan bahwa kehadiran ikatan C–Cl alifatik pada TF4 ditandai dengan munculnya pita serapan pada bilangan gelombang 751 cm^{-1} . Pita serapan pada 3051 dan 3000 cm^{-1} dihasilkan oleh vibrasi ikatan C–H aromatik, sedangkan pita serapan pada 2971 – 2838 cm^{-1} dihasilkan oleh vibrasi ikatan C–H alifatik. Selanjutnya, pita serapan pada 1632 cm^{-1} mengindikasikan kehadiran ikatan C=O keton terkonjugasi dan beberapa pita serapan pada bilangan gelombang 1601 , 1508 , dan 1465 cm^{-1} mengindikasikan kehadiran ikatan C=C aromatik. Selain itu, beberapa pita serapan pada bilangan gelombang 1260 , 1186 , dan 1028 cm^{-1} dihasilkan oleh vibrasi ikatan C–O eter^[31].

Pengukuran spektrum NMR dilakukan untuk mengkonfirmasi kesesuaian antara jumlah dan

jenis lingkungan kimia proton dan karbon yang terdapat pada struktur produk hasil sintesis. Spektrum ^1H NMR (Gambar 6) dan ^{13}C NMR (Gambar 7) produk masing-masing menunjukkan total integrasi yang sesuai dengan jumlah proton dan karbon pada TF4, yaitu sebanyak 17 proton dan 19 karbon. Penandaan sinyal pada spektrum ^1H dan ^{13}C NMR TF4 telah dikonfirmasi melalui analisis HSQC. Hasil analisis HSQC menunjukkan korelasi yang sesuai antara sinyal-sinyal proton dan karbon yang terikat secara langsung pada struktur TF4, sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 1. Dengan demikian, keseluruhan hasil analisis spektroskopi telah menyetujui bahwa produk hasil sintesis yang diperoleh pada penelitian ini memiliki struktur yang sesuai dengan struktur TF4.



Gambar 7. Spektrum ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) senyawa TF4

Tabel 1. Interpretasi data spektrum ^1H NMR, ^{13}C NMR, dan HSQC senyawa TF4

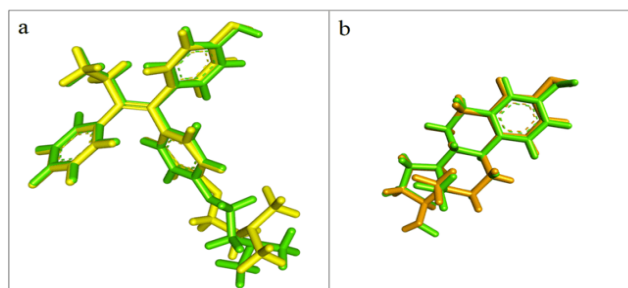
Penomoran Atom	Korelasi ^1H - ^{13}C (HSQC)		Jenis Karbon
	δ_{H} (ppm)*, J (Hz)	δ_{C} (ppm)	
1	-	-	-
2	-	156.10	kuarterner
3	-	139.63	kuarterner
4	-	174.87	kuarterner
5	8.26 (dd, 1H, J = 8.0; 1.0)	125.76	tersier
6	7.41 (ddd, 1H, J = 8.0; 7.5; 0.5)	124.62	tersier
7	7.68 (ddd, 1H, J = 8.5; 7.0; 1.5)	133.29	tersier
8	7.54 (d, 1H, J = 8)	117.90	tersier
9	-	155.19	kuarterner
10	-	123.17	kuarterner
1'	-	124.18	kuarterner
2' dan 6'	8.08 (d, 2H, J = 9)	130.33	tersier
3' dan 5'	7.05 (d, 2H, J = 9)	113.95	tersier
4'	-	161.56	kuarterner
4'-OCH ₃	3.92 (s, 3H)	55.43	primer
1''	4.19 (t, 2H, J = 5.5)	68.93	sekunder
2''	2.20 (quin, 2H, J = 6.0)	33.19	sekunder
3''	3.71 (t, 2H, J = 6.5)	41.71	sekunder

*Literatur: ^1H NMR (CDCl_3), δ_{H} (ppm): 2.20 (quin, 2H), 3.70 (t, 2H), 3.95 (s, 3H), 4.20 (t, 2H), 6.80 – 8.40 (m, 8H)^[21]

Kajian *molecular docking* kemudian dilakukan untuk mempelajari potensi interaksi antara senyawa TF4 dengan ER- α sebagai salah satu reseptor yang ditargetkan dalam pengobatan kanker payudara^[9]. Struktur kristal 3ERT dipilih sebagai target *docking* karena terikat dengan 4-OHT, suatu metabolit aktif dari TAM yang bekerja pada ER- α sebagai SERM^[5] yang dapat bertindak sebagai antiestrogenik pada kanker payudara^[6] dengan memblokir pengikatan suatu koaktivator ke reseptor tersebut, sehingga dapat menghambat jalur sinyal yang bertanggung jawab atas proliferasi sel kanker payudara^[32]. Struktur kristal 1A52 dipilih sebagai target *docking* karena terikat

dengan E₂, salah satu ligan alami ER- α di dalam tubuh manusia^{[27],[33]}. Pada penelitian ini, kajian *docking* juga dilakukan terhadap TOR, dikarenakan pada struktur TOR terdapat bagian struktur yang menyerupai struktur TF4, yaitu terdapat gugus Cl yang terikat pada karbon alifatik metilena^[5].

Sebelum dilakukan *docking*, terlebih dahulu dilakukan *redocking* ligan bawaan. Hasil *redocking* menunjukkan kemiripan yang sangat baik dengan interaksi ligan bawaan. Dalam hal ini, ikatan hidrogen terbentuk antara gugus -OH pada 4-OHT dengan Glu353.

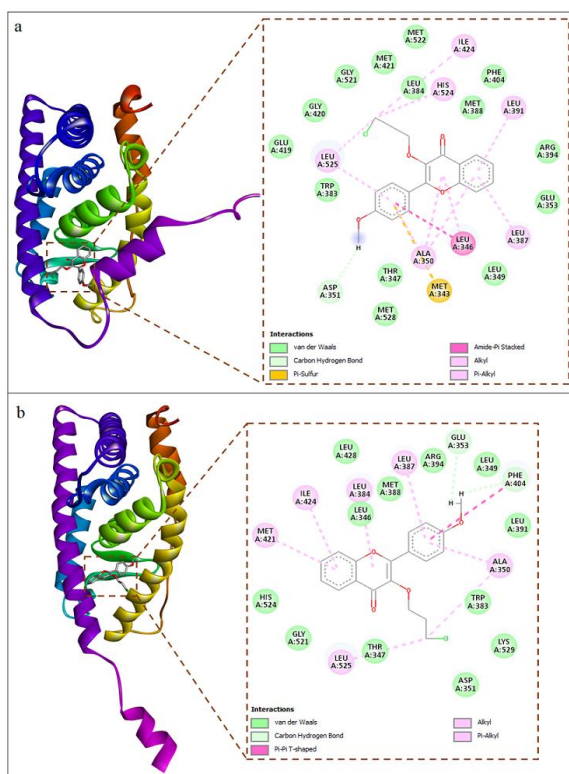


Gambar 8. Overlay pose pengikatan *redocked ligands* a) ligan bawaan 4-OHT (hijau) dan *redocked ligand* 4-OHT (kuning) b) ligan alami E₂ (hijau) dan *redocked ligand* E₂ (orange)

Tabel 2. Hasil *docking* ke sisi aktif ER- α 3ERT

Senyawa	Energi bebas pengikatan (kcal/mol)	Nilai RMSD	Jenis interaksi			
			Ikatan Hidrogen	Interaksi van der Walls	Ikatan Hidrogen Kabon (C- -H)	Interaksi lainnya
TF4	-9.14	1.56	-	Thr347, Leu349, Glu353, Trp383, Leu384, Met388, Arg394, Phe404, Glu419, Gly420, Met421, Gly521, Met522, Met528	Asp351	Met343 ^a , Leu346 ^{b,c} , Ala350 ^c , Leu387 ^c , Leu391 ^c , Ile424 ^c , His524 ^c , Leu525 ^c
TAM	-8.89	1.61	-	Thr347, Leu349, Glu353, Leu354, Trp383, Leu384, Met388, Leu391, Arg394, Phe404, Glu419, Gly420, Met421, Ile424, Leu428, Gly521, His524, Leu536	Asp351	Met343 ^a , Leu346 ^b , Ala350 ^c , Leu387 ^c , Leu525 ^c ,
TOR	-10.08	1.25	-	Thr347, Glu353, Leu354, Trp383, Leu384, Leu387, Leu391, Arg394, Val418, Glu419, Gly420, Gly521, Met522, His524, Leu536	Asp351	Met343 ^a , Leu346 ^c , Leu349 ^c , Ala350 ^c , Met388 ^c , Phe404 ^d , Met421 ^c , Ile424 ^c , Leu428 ^c , Leu525 ^c ,
4-OHT (ligan bawaan)	-11,25	1,67	Glu353 (1,79 Å)	Thr347, Leu349, Leu354, Trp383, Leu384, Arg394, Phe404, Val418, Glu419, Gly420, Gly521, Met522, His524, Met528, Leu536	Asp351	Met343 ^a , Leu346 ^c , Ala350 ^c , Leu387 ^c , Met388 ^c , Leu391 ^c , Met421 ^c , Ile424 ^c , Leu428 ^c , Leu525 ^c

a = Pi-Sulfur, b = Amida-Pi Stacked, c = Alkyl or Pi-Alkyl



Gambar 9. Pose pengikatan dan interaksi antara TF4 dengan ER- α a) pada sisi aktif 3ERT b) pada sisi aktif 1A52

Sedangkan pada E₂, ikatan hidrogen terbentuk antara gugus -OH fenolik dengan Glu353 dan antara gugus -OH alkohol dengan His524. Hasil *overlay* (Gambar 8) menunjukkan bahwa pose pengikatan antara *redocked ligand* dengan masing-masing ligan bawaan terlihat sangat mirip, dengan nilai *root mean square deviation* (RMSD) masing-masing sebesar 1.67 dan 1.57. Nilai RMSD ≤ 2 tersebut menunjukkan bahwa protokol yang digunakan pada prosedur *redocking* telah memenuhi persyaratan protokol *docking* yang baik dan dapat dipercaya, sehingga dapat digunakan untuk proses *docking* ligan uji lainnya^[34].

Protokol *docking* yang sama kemudian diaplikasikan untuk senyawa TF4, TAM, dan TOR. Berdasarkan hasil *docking*, meskipun TF4 belum mampu menyaingi TOR dan 4-OHT, dapat diamati bahwa nilai energi bebas pengikatan TF4 lebih negatif dibandingkan TAM (Tabel 2) dan E₂ (Tabel 3). Sehingga dapat diprediksi bahwa senyawa TF4 dapat terikat dengan lebih mudah ke ER- α dibandingkan dengan ligan alaminya (E₂) dan juga memiliki kemampuan pengikatan yang lebih baik

dibandingkan dengan TAM sebagai salah satu molekul obat pembanding.

Berdasarkan visualisasi hasil *docking* pada Gambar 9, dapat diamati bahwa gugus metoksi yang awalnya diharapkan dapat membentuk ikatan hidrogen konvensional^[19], ternyata tidak dapat membentuk ikatan tersebut. Berbeda dengan 4-OHT dan E₂ yang pada strukturnya terdapat gugus hidroksi teramati berperan dalam pembentukan ikatan hidrogen^[18]. Namun demikian, gugus metoksi tetap terlibat dalam pembentukan ikatan hidrogen karbon (C-H) dengan Asp351 pada 3ERT (Gambar 9a), di mana interaksi ini juga teramati pada TAM, TOR, dan 4-OHT sebagai obat pembanding (Tabel 2). Selanjutnya ketika TF4 di-*docking* ke ER- α 1A52, posisi gugus metoksi TF4 menjadi lebih dekat dengan Glu353 dan Phe404, yang menyebabkan pembentukan ikatan hidrogen karbon dengan kedua asam amino tersebut (Gambar 9b), di mana kedua asam amino ini juga terlibat pada interaksi antara E₂ dengan ER- α . Dalam hal ini, E₂ berinteraksi dengan Glu353 melalui ikatan hidrogen konvensional dan dengan Phe404 melalui interaksi

Pi-Pi T-shaped (Tabel 3). Di sisi lain, kehadiran gugus Cl yang terikat pada rantai samping alifatik TF4 tampaknya tidak memberikan pengaruh yang besar terhadap peningkatan kemampuan senyawa TF4 untuk terikat ke kedua reseptor tersebut. Dalam hal ini, rantai samping tersebut teramati hanya dapat menyumbangkan interaksi van der Waals, alkil, dan p alkil. Sedangkan rantai samping pada TAM, TOR, dan 4-OHT yang mengandung gugus dimetilamino teramati mampu membentuk ikatan hidrogen karbon dengan Asp351.

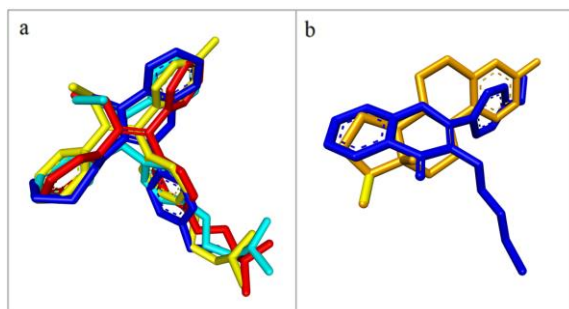
Berdasarkan hasil *docking* pada Tabel 2 dan Tabel 3 juga dapat diamati bahwa kemiripan mode interaksi (pose pengikatan) antara TF4 dengan TAM, TOR, dan 4-OHT pada sistem antagonis lebih tinggi dibandingkan dengan E2 sebagai ligan alami pada sistem agonis. Berdasarkan perbandingan tersebut, TF4 diprediksi cenderung bersifat antagonis. Prediksi sifat antagonis senyawa TF4 ini juga didukung oleh beberapa kajian sebelumnya yang melaporkan bahwa suatu senyawa jika

dapat membentuk ikatan hidrogen konvensional dengan dua residu asam amino (His524 dan Glu353) atau (His524 dan Arg394) diprediksi bersifat agonis, sedangkan jika tidak dapat membentuk ikatan hidrogen konvensional dengan His524 diprediksi bersifat antagonis^{[27],[35],[36]}. Berdasarkan hasil *docking* pada Tabel 3, dapat diamati bahwa hanya E2 sebagai ligan alami yang bersifat agonis, karena dapat membentuk ikatan hidrogen konvensional dengan His524 dan Glu353. TF4 dan molekul obat perbandingan tidak dapat membentuk ikatan hidrogen konvensional dengan His524, sehingga dapat diprediksi bersifat antagonis. Literatur lainnya juga telah menyebutkan bahwa interaksi dengan Asp351 sangat penting untuk mengurangi risiko efek agonis pada uterus. Semakin kuat interaksi suatu ligan dengan Asp351, maka akan semakin menurunkan risiko efek agonisnya^[37]. Berdasarkan hasil *docking* pada Tabel 2 dan 3 dapat diamati bahwa TF4 dan semua ligan perbandingan (TAM, TOR, dan 4-OHT) memiliki interaksi dengan Asp351, kecuali ligan alami E2.

Tabel 3. Hasil *docking* ke sisi aktif ER- α 1A52

Senyawa	Energi bebas pengikatan (kcal/mol)	Nilai RMSD	Jenis interaksi			
			Ikatan Hidrogen	Interaksi van der Waals	Ikatan Hidrogen Karbon (C-H)	Interaksi lainnya
TF4	-9.50	1.73	-	Leu346, Thr347, Leu349, Asp351, Trp383, Met388, Leu391, Arg394, Leu428, Gly521, His524, Lys529	Glu353, Phe404	Ala350 ^c , Leu384 ^c , Leu387 ^c , Phe404 ^d , Met421 ^c , Ile424 ^c , Leu525 ^c
E2 (ligan alami)	-8.74	1.57	Glu353 (1,82 Å) His524 (1,94 Å)	Met343, Thr347, Leu349, Trp383, Arg394, Leu428, Gly521, Met528,	-	Leu346 ^c , Ala350 ^c , Leu384 ^c , Leu387 ^c , Met388 ^c , Leu391 ^c , Phe404 ^d , Met421 ^c , Ile424 ^c , Leu525 ^c ,

a = Pi-Sulfur, b = Amida-Pi Stacked, c = Alkyl or Pi-Alkyl, d = Pi-Pi T-shaped



Gambar 10. *Overlay* pose pengikatan ligan TF4 (biru), TAM (merah), TOR (hijau tosca), 4-OHT (kuning), dan E₂ (jingga) pada sisi aktif ER- α a) sisi aktif 3ERT b) sisi aktif 1A52

Overlay pose pengikatan masing-masing ligan dilakukan untuk membandingkan pose pengikatan TF4 dengan ligan bawaan atau obat pembanding pada sisi aktif 3ERT dan juga untuk membandingkan pose pengikatan TF4 dengan E₂ pada sisi aktif 1A52 (Gambar 10). Berdasarkan gambar dapat diamati bahwa senyawa TF4 memiliki pose pengikatan yang sangat mirip dengan pose pengikatan TAM, TOR, dan 4-OHT sebagai molekul obat pembanding (Gambar 10a) dan memiliki pose pengikatan yang berbeda dengan E₂ sebagai ligan alami (Gambar 10b). Dengan demikian dapat dijelaskan bahwa meskipun kehadiran rantai samping alkil tidak memberikan pengaruh yang besar terhadap interaksi antara TF4 dengan ER- α , kehadiran rantai samping alkil tersebut tampaknya tetap diperlukan oleh TF4 dalam meniru pose pengikatan TAM, TOR, dan 4-OHT sebagai molekul obat pembanding, agar dapat menghasilkan efek antiestrogenik pada kanker payudara.

Kesimpulan

Suatu senyawa turunan flavonol yang mengandung substituen metoksi dan kloro (TF4) telah berhasil disintesis melalui reaksi sintesis eter Williamson menggunakan metode pengadukan. Struktur produk hasil sintesis telah dikonfirmasi melalui analisis spektroskopi UV, FT-IR, 1D and 2D NMR. Hasil kajian *molecular docking* menunjukkan bahwa senyawa TF4 tidak dapat membentuk ikatan hidrogen konvensional dengan ER- α , namun senyawa tersebut dapat membentuk ikatan hidrogen karbon (C-H) dan beberapa

jenis interaksi lainnya dengan residu asam amino penting yang terdapat pada sisi aktif ER- α . Selain itu, nilai energi bebas pengikatan senyawa TF4 lebih negatif dibandingkan dengan E₂ sebagai salah satu ligan alami ER- α . Sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa TF4 dapat terikat dengan lebih mudah pada sisi aktif ER- α dibandingkan dengan ligan alaminya. Kemudian berdasarkan kemiripan interaksi dan pose pengikatan dengan TAM, TOR, dan 4-OHT sebagai molekul obat pembanding, senyawa TF4 diprediksi dapat memberikan efek antagonis. Namun, kajian *in silico* lanjutan tentunya diperlukan untuk memastikan estimasi mode aksi dari senyawa tersebut.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kepada DRPM KEMENDIKBUD yang telah mendukung terlaksananya penelitian ini melalui hibah penelitian dosen pemula (PDP) tahun pelaksanaan 2022 dengan nomor kontrak turunan 004/LL10/PG-APTV/2022 dan 04a.05.15.P3M.STIFAR.VI.2022.

Daftar Pustaka

1. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F., Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J. Clin.*, **71(3)**: 209–249 (2021).
2. Kemkes RI., Hari Kanker Sedunia 2019.
3. Yudissanta, A. & Ratna, M., Analisis

- pemakaian kemoterapi pada kasus kanker payudara dengan menggunakan metode regresi logistik multinomial (studi kasus pasien di Rumah Sakit "X" Surabaya). *J. Sains dan Seni ITS*, **1(1)**: D112–D117 (2012).
4. KemkesRI., *Panduan Penatalaksanaan Kanker Payudara*. Komite Penanggulangan Kanker Nasional, (2015).
 5. Riggs, B. L. & Hartmann, L. C., Selective Estrogen-Receptor Modulators - Mechanisms of Action and Application to Clinical Practice. *N. Engl. J. Med.*, **348(7)**: 618–629 (2003).
 6. Roelfsema, F., Yang, R. J., Takahashi, P. Y., Erickson, D., Bowers, C. Y. & Veldhuis, J. D., Effects of toremifene, a selective estrogen receptor modulator, on spontaneous and stimulated GH secretion, IGF-I, and IGF-binding proteins in healthy elderly subjects. *J. Endocr. Soc.*, **2(2)**: 154–165 (2018).
 7. Fujimura, T., Takahashi, S., Kume, H., Urano, T., Takayama, K., Yamada, Y., Suzuki, M., *et al.*, Toremifene, a Selective Estrogen Receptor Modulator, Significantly Improved Biochemical Recurrence in Bone Metastatic Prostate Cancer: a Randomized Controlled Phase II a Trial. *BMC Cancer*, **15(1)**: 836 (2015).
 8. Mirkin, S. & Pickar, J. H., Selective estrogen receptor modulators (SERMs): A review of clinical data. *Maturitas*, **80(1)**: 52–57 (2015).
 9. Hayashi, S. I., Eguchi, H., Tanimoto, K., Yoshida, T., Omoto, Y., Inoue, A., Yosida, N., *et al.*, The expression and function of estrogen receptor α and β in human breast cancer and its clinical application. *Endocr. Relat. Cancer*, **10(2)**: 193–202 (2003).
 10. Gunawan, S. G., *Farmakologi dan Terapi*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, (2012).
 11. Mudd, T. W., Khalid, M. & Guddati, A. K., Cardiotoxicity of chemotherapy and targeted agents. *Am J Cancer Res*, **11(4)**: 1132–1147 (2021).
 12. Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S. & Baradaran, B., The Different Mechanisms of cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv. Pharm. Bull.*, **7(3)**: 339–348 (2017).
 13. Burmistrova, O., Marrero, M. T., Estévez, S., Welsch, I., Brouard, I., Quintana, J. & Estévez, F., Synthesis and effects on cell viability of flavonols and 3-methyl ether derivatives on human leukemia cells. *Eur. J. Med. Chem.*, **84**: 30–41 (2014).
 14. Ikhtiarudin, I., Frimayanti, N., Teruna, H. Y. & Zamri, A., Microwave-assisted synthesis, molecular docking study and in vitro evaluation of halogen-substituted flavonols against P388 murine leukemia cells. *Appl. Sci. Technology*, **1(1)**: 375–381 (2017).
 15. Collins-Burow, B. M., Burow, M. E., Duong, B. N. & McLachlan, J. A., Estrogenic and antiestrogenic activities of flavonoid phytochemicals through estrogen receptor binding-dependent and -independent mechanisms. *Nutr. Cancer*, **38(2)**: 229–244 (2000).
 16. Collins-Burow, B. M., Antoon, J. W., Frigo, D. E., Elliott, S., Weldon, C. B., Boue, S. M., Beckman, B. S., *et al.*, Antiestrogenic activity of flavonoid phytochemicals mediated via the c-Jun N-terminal protein kinase pathway. Cell-type specific regulation of estrogen receptor alpha. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **132(1–2)**: 186–193 (2012).
 17. Resende, F. A., de Oliveira, A. P. S., de Camargo, M. S., Vilegas, W. & Varanda, E. A., Evaluation of the estrogenic potential of flavonoids using a recombinant yeast strain and MCF7/BUS cell proliferation assay. *PLoS One*, **8(10)**: e74881 (2013).
 18. Ward, H. A. & Kuhnle, G. G. ., Phytoestrogen consumption and association with breast, prostate and colorectal cancer in EPIC Norfolk. *Arch. Biochem. Biophys.*, **501(1)**: 170–175 (2010).
 19. Sharma, D., Kumar, S. & Narasimhan, B., Estrogen alpha receptor antagonists for the treatment of breast cancer: a review. *Chem. Cent. J.*, **12**: 107 (2018).
 20. Maruyama, K., Nakamura, M., Tomoshige, S., Sugita, K., Makishima, M., Hashimoto, Y. & Ishikawa, M., Structure-activity relationships of bisphenol A analogs at estrogen receptors (ERs): discovery of an

- ER α -selective antagonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23**: 4031–4036 (2013).
21. Zeiller, J.-J., Berthelon, J.-J., Quentin, Y. & Depin, J.-C., Benzopyran and benzothiopyran derivatives as PAF antagonists. *Organ. Mond. La Propr. Intellect. Bur. Int.*, **WO19940014**: (1994).
 22. Wadood, A., Ahmed, N., Shah, L., Ahmad, A., Hassan, H. & Shams, S., In-silico drug design: An approach which revolutionarised the drug discovery process. *OA Drug Des. Deliv.*, **1(1)**: 1–4 (2013).
 23. Ikhtiarudin, I., Agistia, N., Frimayanti, N., Mora, E., Dona, R., Rahmawati, R. D. & Zamri, A., Sintesis, karakterisasi struktur, dan kajian molekular docking senyawa 4'-metoksi flavonol sebagai inhibitor main protease (M Pro) SARS-CoV-2. *MFF*, **26(April)**: 8–14 (2022).
 24. Habibi, R., Herfindo, N., Hendra, R., Teruna, H. Y. & Zamri, A., Synthesis and molecular docking study of 1-(3-chloropropyl)-3,5-Bis((E)-4-methoxybenzylidene) piperidin-4-one as dengue virus type 2 (DEN2)NS2B/NS3 protease inhibitor candidate. *PCPR*, **5(1)**: 14–22 (2020).
 25. Ikhtiarudin, I., Dona, R., Frimayanti, N., Utami, R., Susanti, E., Mentari, M., Nurmaida, N., *et al.*, (E)-4-(3-(3-(4-methoxyphenyl)acryloyl)phenoxy)butyl 2-Hydroxybenzoate. *Molbank*, **2021(1)**: M1195 (2021).
 26. Puranik, N. V., Srivastava, P., Bhatt, G., John Mary, D. J. S., Limaye, A. M. & Sivaraman, J., Determination, and analysis of agonist and antagonist potential of naturally occurring flavonoids for estrogen receptor (ER α) by various parameters and molecular modeling approach. *Sci. Rep.*, **9(1)**: 1–12 (2019).
 27. Mirza, D. M., Ma'arif, B., Purbosari, I., Hardjono, S. & Agil, M., Prediksi aktivitas fitoestrogenik senyawa golongan flavonoid terhadap receptor estrogen α (ER- α) dengan pendekatan In Silico. *J. Sains dan Kes*, **3(4)**: 512–519 (2021).
 28. Markham, K. R., *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Institut Teknologi Bandung, (1998).
 29. Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M. ., *The Ultraviolet Spectra of Flavones and Flavonols. In: The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer, (1970).
 30. Suhartati, T., *Dasar-dasar spektrofotometri UV-Vis dan spektrometri massa untuk penentuan struktur senyawa organik*. CV. Anugrah Utama Raharja, (2017).
 31. Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R. & Ragadhita, R., How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material. *Indones. J. Sci. Technol.*, **4(1)**: 97–118 (2019).
 32. Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A. & Greene, G. L., The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, **95(7)**: 927–937 (1998).
 33. Purwani, S., Nahar, J., Zulfikar, Z., Nurlelarsi, N. & Mayanti, T., Molecular docking on kokosanolide A and C for anticancer activity against human breast cancer cell MCF-7. *JKV*, **7(1)**: 52–57 (2021).
 34. Sari, I. W., Junaidin, J. & Pratiwi, D., Studi molekular docking senyawa flavonoid herba kumis kucing (*Orthosiphon stamineus* B.) pada reseptor α -glukosidase sebagai antidiabetes tipe 2. *J. Farmagazine*, **7(2)**: 54–60 (2020).
 35. Prasetiawati, R., Zamri, A., Barliana, M. I. & Muchtaridi, M., In silico predictive for modification of chalcone with pyrazole derivatives as a novel therapeutic compound for targeted breast cancer treatment. *JAPS*, **9(02)**: 20–28 (2019).
 36. Aditama, A. P. R., Ma'arif, B., Mirza, D. M., Laswati, H. & Agil, M., In Vitro and in silico analysis on the bone formation activity of n-hexane fraction of semanggi (*Marsilea crenata* Presl.). *Sys Rev Pharm*, **11(11)**: 837–849 (2020).
 37. Muchtaridi, M., Syahidah, H. N., Subarnas, A., Yusuf, M., Bryant, S. D. & Langer, T., Molecular docking and 3D-pharmacophore modeling to study the interactions of chalcone derivatives with estrogen receptor alpha. *Pharmaceuticals*, **10(81)**: 1–12