Molecular Dynamics Simulation of Estrogen Receptor Alpha Against Andrographolid as Anti Breast Cancer

Doni Dermawan^{1*}, Riyadi Sumirtanurdin², Deti Dewantisari²

¹Program Studi Profesi Apoteker Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran

²Program Studi Sarjana Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran

Submitted 6 August 2018; Revised 7 December 2019; Accepted 22 January 2019; Published 27 June 2019

*Corresponding author: donidermawan07@gmail.com

Abstract

Breast cancer is the most common cancer suffered by women with 1.67 million new cases in the world by 2012 with a mortality rate of 12.9%. Tamoxifen is a standard therapy for breast cancer but can cause endometrial and thromboembolic cancer. Andrographolid is an active compound from *Andrographis paniculata* which has antiproliferation activity of MCF-7 breast cancer cells with IC₅₀ was 61.11 μ M. The purpose of this study was to design andrographolide modification structures as human estrogen receptor alpha (hER- α) antagonists. Molecular docking simulation results showed that the andrographolide and AND5 have free binding energy (ΔG) values of -9.65 kcal/mol and -12.43 kcal/mol, respectively, and hydrogen bonds were formed with Gly521, Asp351, and Met343. The ΔG value of AND5 was lower than tamoxifen (-11.40 kcal/mol). Pharmacophore modeling results showed that andrographolide and AND5 had a high pharmacophore-fit value of 46.39% and 63.47%, respectively. Molecular dynamics simulation showed that the hER α -AND5 system has a value of $\Delta G_{TOTAL} = -50.52$ kcal/mol compared to the hER α -estradiol system with a value of $\Delta G_{TOTAL} = -40.86$ kcal/mol. These results suggested that AND5 has better affinity for hER α compared to estradiol so that AND5 is a very promising anti breast cancer agent.

Keywords: Andrographolide, Breast cancer, Estrogen receptor alpha, Molecular docking, Molecular dynamics.

Simulasi Dinamika Molekular Reseptor Estrogen Alfa dengan Andrografolid sebagai Anti Kanker Payudara

Abstrak

Kanker payudara merupakan kanker yang paling banyak diderita oleh perempuan dengan jumlah 1,67 juta kasus baru di dunia pada tahun 2012 dengan tingkat kematian 12,9%. Tamoxifen merupakan terapi standar untuk kanker payudara namun dapat menyebabkan kanker endometrium dan tromboemboli. Andrografolid merupakan senyawa aktif dari daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) yang memiliki aktivitas antiproliferasi sel kanker payudara MCF-7 dengan nilai IC₅₀ 61,11 μ M. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendesain struktur modifikasi andrografolid sebagai antagonis reseptor estrogen alfa (hER- α). Hasil simulasi penambatan molekular menunjukkan bahwa nilai energi bebas ikatan (ΔG) andrografolid dan AND5 masing-masing -9,65 kkal/mol dan -12,43 kkal/mol, serta terbentuk ikatan hidrogen dengan Gly521, Asp351, dan Met343. Nilai ΔG AND5 lebih rendah dari tamoxifen (-11,40 kkal/mol). Hasil pemodelan farmakofor menunjukkan bahwa andrografolid dan AND5 memiliki nilai pharmacophore-fit sebesar 46,39% dan 63,47%. Hasil simulasi dinamika molekular menunjukan bahwa sistem hER α -AND5 memiliki nilai $\Delta G_{TOTAL} = -50,52$ kkal/mol dibanding sistem hER α -estradiol dengan nilai $\Delta G_{TOTAL} = -40,86$ kkal/mol. Hal ini menunjukkan bahwa AND5 memiliki afinitas yang lebih baik terhadap kantung aktif hER α dibanding estradiol sehingga AND5 merupakan agen antikanker payudara yang sangat menjanjikan.

Kata Kunci: Andrografolid, Dinamika molekular, Kanker payudara, Penambatan Molekular, Reseptor estrogen alfa

1. Pendahuluan

Kanker payudara merupakan kanker yang paling umum di kalangan wanita di wilayah Asia Pasifik, menyumbang 18% dari semua kasus kanker, dan merupakan penyebab paling umum keempat dari kematian terkait kanker.¹ Di Indonesia selama tahun 2014, kanker payudara menduduki peringkat pertama penyakit kanker yang menyerang wanita, yaitu 48.998 kejadian, jauh di atas kanker serviks (20.928 kejadian) dan kanker kolorektum (11.787 kejadian).² Kasus kematian akibat kanker pun sangat tinggi, tercatat 92.200 wanita Indonesia meninggal akibat kanker dan 21,4% diantaranya diakibatkan oleh kanker payudara.³

Sel payudara normal dan kebanyakan sel kanker payudara memiliki reseptor yang menempel pada sirkulasi estrogen dan progesteron. Kanker payudara memiliki reseptor estrogen dan progesteron positif (yaitu, ER + dan PR +) yang lebih menanggapi terapi hormonal dan memiliki prognosis yang lebih baik daripada kanker dengan reseptor negative.^{4,5}

Obat yang sering digunakan dalam terapi kanker adalah tamoxifen yang dikonsumsi secara oral sebagai tablet, obat ini mengganggu aktivitas estrogen. Namun tamoxifen juga memiliki efek samping yang berbahaya mencakup tromboemboli, penyakit hati berlemak non-alkoholik, dan dapat mengakibatkan peningkatan proliferasi karsinoma endometrium.^{6,7}

Saat ini, pendekatan pemodelan molekuler yang didorong oleh perkembangan kimia komputasi yang meningkat cepat, memegang peran penting dalam perancangan obat dan penemuan mekanisme baru obat berbasis struktur. Metode ini telah menjadikan banyak penelitian menghasilkan penemuan obat dengan sukses.⁸ Senyawa penuntun unggulan untuk pemodelan obat baru pada terapi kanker payudara adalah andrografolid, yang telah menunjukkan aktivitas anti-proliferasi yang luas pada berbagai lini sel kanker termasuk kanker payudara.^{9,10} Andrografolid merupakan senyawa yang berasal dari tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata*), tanaman ini banyak ditemukan di

Asia tropis dan subtropis termasuk Indonesia. Pada tahun 2013 produksi sambiloto mencapai 2.257.368 kg dengan total luas panen mencapai 1.897.377 m².¹¹ Banyaknya ketersediaan sambiloto di Indonesia dan senyawa aktif andrografolid yang terbukti memiliki aktivitas dalam pengendalian sel kanker payudara menjadi potensi besar dalam pengembangan obat kanker payudara dengan pendekatan molekuler menggunakan senyawa penuntun andrografolid untuk mendapatkan obat baru yang lebih baik dan efektif dibandingkan obat yang sudah ada.

2. Metode

Penelitian ini menggunakan metode *in silico* untuk merancang kandidat obat yakni andrografolid beserta modifikasi strukturnya sebagai senyawa antagonis reseptor estrogen alfa.

2.1. Alat

Perangkat keras yang digunakan adalah *personal computer* dengan spesifikasi Intel® Core™ i5-6600 CPU @ 3,90 GHz (4CPUs), GPU Nvidia Geforce GTX 970 4 Gigabyte OC Edition, dan RAM 8 Gigabyte DDR4. Adapun pada pengujian secara *in silico* menggunakan perangkat lunak yang dapat diunduh secara gratis bagi akademisi. Perangkat lunak yang digunakan meliputi:

1. Program ChemOffice 2010 dan ChemDraw Ultra 12.0 (PerkinElmer Inc, diunduh di <http://www.cambridgesoft.com/>) untuk menggambar struktur 2D dan mengonversinya menjadi struktur 3D.
2. Program LigandScout 4.0 (Wolber and Inte:Ligand GmbH) untuk melakukan pemodelan farmakofor.
3. Program AutoDock 4.2.6 dan AutoDockTools 1.5.6 (*The Scripps Research Institute*, diunduh di <http://www.autodock.scripps.edu/>) untuk melakukan simulasi penambatan molekuler.
4. Program BIOVIA Discovery Studio 2017 yang diunduh di <http://www.accelrys.com/> untuk memvisualisasikan kompleks pdb, ikatan antara ligan dengan *human estrogen receptor* (hER)- α , optimasi geometri, dan *overlay* pada proses

validasi.

5. Program AMBER 14 (*University of California, San Francisco*, diunduh di <http://www.ambermd.org/>) untuk melakukan simulasi dinamika molekular.

2.2. Bahan

Bahan yang digunakan meliputi struktur tiga dimensi hER- α yang diunduh dari *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.rcsb.org/>) dengan kode ID 3ERT (hER- α yang mengikat tamoxifen) serta struktur tiga dimensi andrografolid dan struktur turunannya yang telah digambarkan menggunakan perangkat lunak ChemOffice 2010.

2.3. Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian mencakup:

1) Preparasi reseptor; dimana struktur reseptor estrogen alfa yang digunakan pada penelitian ini diunduh dari situs *Protein Data Bank* (PDB) yang kemudian dipisahkan dengan ligan dan air serta ditambahkan muatan.

2) Preparasi ligan; dimana ligan standar tamoxifen diperoleh dari hasil pemisahan dengan reseptor estrogen alfa sedangkan andrografolid dan modifikasinya didesain dengan bantuan perangkat lunak yang selanjutnya dilakukan optimisasi. Desain modifikasi andrografolid didasarkan pada aturan Lipinski's *Rule of Five* (RO5).

3) Validasi metode komputasi; dimana meliputi validasi metode penambatan molekul yang berdasarkan pada nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) hasil penambatan ulang (*re-docking*) ligan standar dan validasi metode pemodelan farmakofor yang berdasarkan pada nilai $AUC_{100\%}$ kurva *Receiver Operating Characteristic* (ROC) hasil skrining 626 *actives set* dan 20.773 *decoys set*.

4) Pemodelan farmakofor; dilakukan untuk melihat tingkat kemiripan antara andrografolid dan modifikasinya dengan ligan standar tamoxifen dimana dilakukan skrining virtual menggunakan model 3D farmakofor berbasis struktur yang telah tervalidasi dan memanfaatkan bantuan dari perangkat lunak. Tingkat kemiripan tiap strukturnya

diperlihatkan melalui nilai *pharmacophore-fit*.

5) Simulasi penambatan molekul (*docking simulation*), dimana dilakukan pada pusat dari sisi aktif dari reseptor dengan koordinat ($x = 30.010$, $y = -1.913$, dan $z = 24.207$) dan volume ruang $40 \times 40 \times 40$ titik. Parameter docking berdasarkan pada *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA) dengan jumlah *runs* 100 kali, ukuran populasi 150, energi evaluasi 2.500.000, laju mutasi gen 0,02, dan laju *crossover* 0,8. Konformasi hasil simulasi penambatan molekul dikluster dengan menggunakan toleransi RMSD 1.0 Å. Konformasi ligan dengan energi ikatan terendah (ΔG) dari kluster terbaik digunakan untuk tahap analisis selanjutnya. Kompleks ligan-reseptor yang terbentuk divisualisasikan dengan bantuan perangkat lunak.

6) Simulasi dinamika molekul, diawali tahapan parameterisasi ligan dengan menambahkan medan gaya ff14SB dan dilanjutkan dengan penentuan koordinat awal sistem dan minimisasi sistem. Tahapan penentuan koordinat terdiri atas penambahan ion dan dolvasi sisten dengan air secara eksplisit model air TIP3P. Selanjutnya dilakukan ekuilibrasi sistem melalui pemanasan bertahap 0 hingga 310°K yang disertai penurunan daya tahan dan pergantian dengan tahanan konstan. Simulasi dinamika molekul dijalankan pada suhu konstan 310°K selama 5 tahapan dengan masing-masing 10 ns.

3. Hasil

3.1. Hasil Preparasi Struktur Reseptor Estrogen Alfa (ER α)

Struktur makromolekul (reseptor) yang digunakan pada penelitian ini adalah reseptor estrogen alfa (hER α) yang diunduh dari situs *Protein Data Bank* (PDB) melalui <http://www.rcsb.org/> dengan kode ID PDB 3ERT yang merupakan ER α pada manusia yang terkompleks dengan ligan antagonisnya (tamoxifen) yang diperoleh dari difraksi sinar X dengan resolusi 1,9 Å dan diunduh dengan format berkas .pdb.

Rancangan modifikasi struktur andrografolid dan tamoxifen sebagai ligan

Table 1. Struktur Tamoxifen dan Andrografolid serta Modifikasi Strukturnya

Nama	Struktur	Lipinski's rule
Tamoxifen		MW : 388.531 HBD : 2 HBA : 2 LogP : 4.285
Andrographolide (AND)		MW : 354.487 HBD : 3 HBA : 4 LogP : 2.122
Modifikasi AND1		MW : 408.696 HBD : 4 HBA : 6 LogP : 3.264
Modifikasi AND2		MW : 434.427 HBD : 4 HBA : 5 LogP : 1.898
Modifikasi AND3		MW : 471.438 HBD : 3 HBA : 4 LogP : 2.886
Modifikasi AND4		MW : 445.576 HBD : 3 HBA : 4 LogP : 1.221
Modifikasi AND5		MW : 495.538 HBD : 3 HBA : 5 LogP : 4.665

Gambar 1. Interaksi Tamoxifen pada Kantung Aktif Reseptor Estrogen Alfa

standar dapat dilihat pada Tabel 1. Konsiderasi pada tahapan modifikasi struktur ini adalah dengan tidak mengubah farmakofor dari struktur andrografolid itu sendiri. Dari Tabel 1. diketahui bahwa ligan andrografolid beserta modifikasi strukturnya telah memenuhi aturan Lipinski.

3.2. Hasil Validasi Metode Komputasi

Validasi metode komputasi dilakukan untuk membuktikan dan memastikan bahwa metode yang digunakan memenuhi syarat validitas dan dapat digunakan untuk pengujian

molekul lainnya serta dapat meminimalisir kesalahan. Hasil *re-docking* tamoxifen menghasilkan nilai energi bebas ikatan (ΔG) sebesar -11.40 kkal/mol dan membentuk ikatan hidrogen dengan residu asam amino Glu353 dan Arg394 yang dapat dilihat pada Gambar 1.

3.3. Hasil Pemodelan Farmakofor

Pemodelan farmakofor memiliki tujuan untuk dapat mengidentifikasi bagian esensial dari senyawa andrografolid yang bertanggung jawab atas aktivitas farmakologis. Hasil

Keterangan : panah (dan bulatan) merah merepresentasikan donor ikatan hidrogen, panah (dan bulatan) hijau merepresentasikan akseptor ikatan hidrogen, bulatan kuning merepresentasikan daerah hidrofobik.

Gambar 2. Hasil Pemodelan Farmakofor Andrografolid.

Tabel 2. Hasil Pharmacophore-fit Andrographolide dan Modifikasinya

No	Nama Molekul	Pharmacophore-fit (%)
1	Andrographolide (AND)	46,39
2	Modifikasi AND1	56,03
3	Modifikasi AND2	62,76
4	Modifikasi AND3	64,07
5	Modifikasi AND4	62,39
6	Modifikasi AND5	63,47

pemodelan farmakofor andrografolid dapat dilihat pada Gambar 2 hasil pemodelan farmakofor andrografolid. Hasil pengujian pharmacophore-fit andrografolid dan modifikasi strukturnya terhadap tamoxifen menunjukkan bahwa kelima modifikasi struktur dari andrografolid memiliki kemiripan dengan tamoxifen lebih dari 50% dan lebih baik dari andrografolid dasarnya (Tabel 2).

3.4. Hasil Simulasi Penambatan Molekular (*Docking Simulation*)

Metode penambatan molekul bertujuan

untuk melihat interaksi antara ligan yakni andrografolid dengan reseptor targetnya yakni hER α . Hasil tahapan ini adalah nilai ΔG , Ki, jumlah klaster, dan jenis ikatan terhadap residu asam amino. Hasil docking andrografolid dan modifikasi strukturnya beserta tamoxifen terhadap hER α dapat dilihat pada Tabel 3. Interaksi yang terbentuk antara andrografolid dengan hER α dapat dilihat pada Gambar 3.

3.5. Hasil Simulasi Dinamika Molekular

Analisis yang dilakukan terhadap hasil simulasi dinamika molekul dilakukan pada tiga aspek yakni *Root Mean Square*

Tabel 3. Hasil Simulasi Docking Andrographolide dan Modifikasi Strukturnya Beserta Tamoxifen terhadap ER α

No	Nama Molekul	ΔG kkal/ mol	Jumlah Klaster	Ki (nM)	Interaksi dengan Asam Amino	
					Ikatan Hidrogen	van der Waals (Hidrofobik)
1	Tamoxifen	-11.40	99	1.92	Arg394, Glu353	Gly521,His524,Glu419, Thr347,Leu384,Asp351, Trp383,Phe404
2	Andrographolide (AND)	-9.65	47	243.1	Gly521	His524,Met421,Ile424, Leu4 28,Leu391,Arg394,Glu353,Tr p383,Thr347, Leu540
3	Modifikasi (AND1)	-8.95	22	421.81	Gly521	Asp351,Arg394,Glu419, Ile424,
4	Modifikasi (AND2)	-10.05	39	43.25	Gly521, Met343	Leu428,Val418,Trp383 Arg394,Gly420,Ile424, Leu346, Leu536,Trp383 Arg394,Asp351,Glu353 ,Gly420,Ile424,Leu354, Leu391,Phe404
5	Modifikasi (AND3)	-8.79	63	361.17	Gly521, Met343	Arg394,Glu353,Ile421, Leu384, Leu428,Leu536
6	Modifikasi (AND4)	-8.95	55	277.10	Gly521, Asp351, Met421	Cys530,Leu349,Leu384, Leu387,Phe404,Val533
7	Modifikasi (AND5)	-12.43	68	1.08	Gly521, Asp351, Met343

Gambar 3. Interaksi Andrographolide pada Kantung Aktif Reseptor Estrogen Alfa

Deviation (RMSD), Root Mean Square Fluctuation (RMSF), dan perhitungan energi ikatan metode Molecular Mechanics-Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA).

3.6. Root Mean Square Deviation (RMSD)

Analisis hasil simulasi dinamika molekular dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak AMBER14. *Root Mean Square Deviation* (RMSD) merupakan suatu nilai deviasi yang merepresentasikan perbandingan antara konformasi ligan-reseptor pada proses simulasi berlangsung dengan konformasi ligan-reseptor awal. Secara keseluruhan, sistem mencapai kondisi stabil setelah mencapai waktu simulasi 50 ns dan grafik RMSD, ditunjukkan Gambar 4.

3.7. Root Mean Square Fluctuation (RMSF)

Nilai *Root Mean Square Fluctuation*

(RMSF) menunjukkan fluktuasi residu asam amino penyusun reseptor selama proses simulasi sehingga dapat merepresentasikan fleksibilitas residu. Ligan AND5 menunjukkan fluktuasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan struktur dasar andrografolid dan estradiol seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.

3.8. Perhitungan Energi Ikatan Metode MM-PBSA

Tabel 4 menunjukkan bahwa kompleks hER α -AND5 memiliki nilai energi bebas ikatan total (ΔG_{TOTAL}) yang lebih rendah dibandingkan dengan sistem hER α -estradiol sebagai kompleks agonis dan dapat diketahui bahwa interaksi Van der Waals (VdW) merupakan komponen energi yang paling besar memberikan pengaruhnya terhadap sistem.

Gambar 4. Nilai RMSD Sistem Simulasi

Gambar 5. Nilai RMSF Sistem Simulasi

4. Pembahasan

4.1. Preparasi Struktur Reseptor Estrogen Alfa ($ER\alpha$)

Struktur $hER\alpha$ ini selain terkompleks dengan ligan juga mengikat molekul air. Molekul air dapat menyebabkan proses penambatan molekul (*docking*) terjadi lebih kompleks dikarenakan persamaan matematika nya lebih banyak dan juga dapat memungkinkan terjadinya ikatan hidrogen dengan ligan sehingga molekul air perlu dipisahkan menggunakan perangkat lunak BIOVIA *Discovery Studio* sebelum dilakukan *docking*. Hasil dari proses ini disimpan dalam berkas dengan format .pdb. Pada struktur makromolekul ditambahkan muatan Kollman agar sesuai dengan lingkungan *docking* dan dapat dilakukan kalkulasi yang tepat.

4.2. Preparasi Ligan

Tamoxifen sebagai ligan standar diperoleh dari proses pemisahannya dari struktur $ER\alpha$ menggunakan perangkat lunak BIOVIA *Discovery Studio*. Sedangkan ligan uji yakni andrographolid dibuat dan dimodelkan struktur 2D nya dengan perangkat lunak ChemDraw Ultra dan dioptimasi geometri strukturnya menjadi 3D menggunakan Chem3D lalu disimpan dalam bentuk berkas .pdb. Optimasi ligan dilakukan dengan penambahan muatan *Gasteiger* dengan menggunakan perangkat lunak *AutoDock Tools* kemudian dilakukan merge non-polar sehingga hanya atom hidrogen polar yang muncul. Sebelum ligan ditambatkan pada reseptor perlu adanya identifikasi kantung aktif ikatannya terlebih dahulu pada reseptor

Tabel 3. Hasil Simulasi Docking Andrographolide dan Modifikasi Strukturnya Beserta Tamoxifen terhadap $ER\alpha$

Komponen Energi (kkal/mol)	Sistem	
	$hER\alpha$ – Estradiol	$hER\alpha$ – AND5
Interaksi Van der Waals (VdW)	-44,87	-57,92
Energi Elektrostatik (EEL)	1,16	-9,67
Kontribusi Elektrostatik terhadap Energi Bebas Solvasi (EGB)	7,39	19,56
Kontribusi Non-polar terhadap Energi Bebas Solvasi (ESURF)	-4,54	-5,54
ΔG_{gas} (VdW + EEL)	-43,71	-67,54
ΔG_{solv} (EGB + ESURF)	2,85	14,02
ΔG_{TOTAL} (VdW + EEL + EGB + ESURF)	-40,86	-50,52

melalui *parameter grid*.

Ligand-binding domain (LBD) yang dikenal sebagai sisi ikatan ligan pada ER α didominasi oleh daerah hidrofobik yang menyusun helix 3,6,7,8,11, dan 12 dimana yang merupakan penentu aktivitas ligan apakah bertindak sebagai agonis atau antagonis terhadap reseptor adalah helix 12.12 Upaya desain obat baru perlu memperhatikan *Lipinski's Rule of Five* (RO5) dimana aturan ini menentukan dan mengevaluasi senyawa dengan aktivitas tertentu dapat menembus membran atau tidak bila diberikan secara oral. Aturan ini terdiri atas bobot molekul ≤ 500 ; donor ikatan hidrogen ≤ 5 ; akseptor ikatan hidrogen ≤ 10 , nilai LogP ≤ 5 , dan reaktivitas molar pada rentang 40-130.13 Rancangan modifikasi struktur andrografolid dan tamoxifen sebagai ligan standar dapat dilihat pada Tabel 1.

4.3. Validasi Metode Penambatan Molekul (*Docking*)

Validasi metode penambatan molekul (*docking*) dilakukan dengan menambatkan ulang ligan standar yang sudah dipisahkan dari reseptornya atau dikenal dengan istilah re-docking dimana pada penelitian ini ligan standarnya yakni tamoxifen dan reseptornya adalah hER α . Optimasi koordinat jarak perlu dilakukan untuk menentukan nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) terbaik dan memenuhi persyaratan yakni $< 2\text{\AA}$.¹⁴ Penentuan grid box (daerah ikatan) dilakukan untuk membatasi ruang pencarian konformasi ligan pada proses docking. Grid box yang dihasilkan melalui re-docking tamoxifen terhadap ER α adalah x=30,282; y=-1,1913; z=24,207 dengan volume ruang 40x40x40 titik dengan nilai RMSD yakni 1,01 $\text{\AA}$ maka dapat dikatakan metode penambatan molekul valid dikarenakan nilai RMSD $< 2\text{\AA}$ serta berada di kategori close pose dalam hal reproduktibilitas pose ligan awal.¹⁵

Dua residu asam amino pada Gambar 1, merupakan bagian dari beberapa asam amino krusial yang terdapat pada sisi aktif dari estrogen alfa, yaitu Glu353, Arg394, Gly521, His524, Asp351, dan Leu346. Residu asam amino Arg394 dan Glu353 dari

estrogen alfa diketahui masing-masingnya memperlihatkan satu ikatan hidrogen dengan gugus hidroksil pertama dari ligan alami steroid estradiol, sedangkan gugus hidroksil kedua dari steroid estradiol membentuk ikatan hidrogen dengan sisi polar His524 pada estrogen alfa. Adanya interaksi antara tamoxifen dengan sisi muatan positif Arg394 dan sisi muatan negatif Glu353 ini yang membuat interaksi tamoxifen-estrogen alfa memiliki nilai energi bebas ikatan (ΔG) yang rendah.¹⁶

4.4. Validasi Metode Pemodelan Farmakofor

Validasi metode pemodelan dan skrining farmakofor pada perangkat lunak LigandScout 4.1 dilakukan dengan menggunakan test set yang terdiri dari actives set (kumpulan ligan aktif pada reseptor tertentu) dan decoys set (ligan yang mirip secara struktur dengan actives set namun tidak aktif terhadap reseptor).

Total senyawa yang digunakan pada validasi pemodelan farmakofor yakni 21.399 senyawa terdiri dari 626 actives set dan 20.773 decoys set yang diperoleh dari Database of Useful Decoys (DUDe). Hasil yang diperoleh 8.464 hit (kumpulan ligan terbaik) dengan nilai AUC100% adalah tepat 1,00 maka dikatakan valid. Kurva *Receiver Operating Characteristic* (ROC) pada validasi metode pemodelan farmakofor memiliki sumbu x yakni laju senyawa decoy dan sumbu y adalah laju senyawa aktif.

4.5. Pemodelan Farmakofor

Pemodelan farmakofor memiliki tujuan untuk dapat mengidentifikasi bagian esensial dari senyawa andrografolid yang bertanggung jawab atas aktivitas farmakologis.

Pemodelan farmakofor juga dapat digunakan untuk melihat tingkat kemiripan senyawa andrografolid dan modifikasi strukturnya dengan ligan standarnya yakni tamoxifen. Tingkat kemiripan dilihat dari fitur dan gugus kimia yang dimiliki oleh ligan sehingga jika nilai kemiripan (*pharmacophore-fit*) lebih dari 50% maka dapat diasumsikan bahwa aktivitasnya terhadap reseptor ER α adalah sama. Berdasarkan hasil pengujian *pharmacophore-*

fit andrografolid dan modifikasi strukturnya terhadap tamoxifen menunjukkan bahwa kelima modifikasi struktur dari andrografolid memiliki kemiripan dengan tamoxifen lebih dari 50% dan lebih baik dari andrografolid dasarnya (Tabel 2). Oleh karena itu, kelima ligan ini dapat dinyatakan memiliki tingkat afinitas yang baik terhadap reseptor estrogen alfa.

4.6. Simulasi Penambatan Molekular (*Docking Simulation*)

Metode penambatan molekul bertujuan untuk melihat interaksi antara ligan yakni andrografolid dengan reseptor targetnya yakni hER α . Hasil tahapan ini adalah nilai ΔG , K_i , jumlah klaster, dan jenis ikatan terhadap residu asam amino. Hasil docking andrografolid dan modifikasi strukturnya beserta tamoxifen terhadap hER α dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan hasil penambatan molekul, modifikasi AND2 dan AND5 menunjukkan nilai ΔG yang lebih kecil dibandingkan dengan andrografolid dasar sehingga tingkat afinitas terhadap hER α semakin tinggi dikarenakan energi yang dibutuhkan untuk berikatan dengan reseptor lebih rendah. Bahkan modifikasi AND5 memiliki ΔG yang lebih kecil dari tamoxifen sebagai ligan standarnya sehingga menjadi kandidat yang menjanjikan sebagai terapi kanker payudara positif ER α . Jumlah klaster yang lebih banyak menunjukkan bahwa pose informasi yang dihasilkan lebih stabil. Nilai K_i (konstanta inhibisi) berbanding lurus dengan nilai ΔG sehingga semakin kecil nilai K_i maka konsentrasi yang dibutuhkan senyawa tersebut lebih kecil untuk menghasilkan efek inhibisi terhadap reseptor target. Interaksi yang terbentuk antara andrografolid dengan hER α dapat dilihat pada Gambar 3.

Interaksi dengan kantung aktif pun perlu untuk diidentifikasi karena menunjukkan ikatan apa saja yang terjadi antara ligan dan reseptornya. Pada penelitian ini yang perlu diperhatikan adalah ikatan hidrogen antara ligan dengan asam amino His524 dikarenakan dapat menentukan sifat suatu ligan apakah bertindak sebagai agonis atau antagonis dimana ketika ligan

berikatan dengan His524 pada helix-11 dapat menyebabkan helix-12 terbuka dan berikatan dengan koaktivator sehingga ligan bersifat agonis begitu pula sebaliknya. Ligan akan bersifat antagonis ketika tidak membentuk ikatan hidrogen dengan His524.^{17,18} Hasil penelitian menunjukkan bahwa andrografolid dan modifikasi strukturnya tidak membentuk ikatan hidrogen dengan asam amino His524 sehingga dapat dikatakan memiliki aktivitas antagonis seperti halnya tamoxifen yang juga tidak membentuk ikatan hidrogen dengan asam amino His524 pada helix-11.

4.7. Simulasi Dinamika Molekular

Analisis yang dilakukan terhadap hasil simulasi dinamika molekul dilakukan pada tiga aspek yakni *Root Mean Square Deviation* (RMSD), *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF), dan perhitungan energi ikatan metode *Molecular Mechanics-Poisson Boltzmann Surface Area* (MM-PBSA).

Secara keseluruhan, sistem mencapai kondisi stabil setelah mencapai waktu simulasi 50 ns dan grafik RMSD, ditunjukkan Gambar 4, memperlihatkan bahwa kompleks hER α -AND5 memiliki nilai RMSD yang lebih tinggi (2,5 – 3,0 Å) yang dibandingkan dengan hER α -estradiol (1,5 – 2,5 Å).^{19,20} Hasil ini menunjukkan bahwa hER α memiliki fleksibilitas yang lebih tinggi ketika berinteraksi dengan AND5 dan struktur protein hER α dapat terbuka.

4.8. *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF)

Residu asam amino yang memiliki fluktuasi tinggi pada Gambar 5 yakni Pro333, Thr371, Ser463 pada semua ligan pada penelitian ini, namun hanya Lys416 dan Glu419 yang memiliki fluktuasi tinggi akibat AND5. Kristal PDB 3ERT diketahui memiliki rangkaian ikatan hidrogen yang terbentuk antara Glu419 dengan Lys531 dan Glu419 dengan His524.²¹ Pada kompleks AND5 terganggunya ikatan hidrogen yang terbentuk pada Lys419-Glu419, dengan terjadi fluktuasi yang meningkat pada residu tersebut sehingga dapat diinterpretasikan bahwa AND5 memiliki aktivitas sebagai

antagonis hER α .

4.9. Perhitungan Energi Ikatan Metode MM-PBSA

Metode perhitungan *Molecular Mechanics-Poisson Boltzmann Surface Area* (MM-PBSA) merupakan suatu metode kalkulasi energi bebas ikatan sistem ligan-reseptor yang paling representatif pada simulasi dinamika molekul.²² Tabel 4 menunjukkan bahwa kompleks hER α -AND5 memiliki nilai energi bebas ikatan total (Δ GTOTAL) yang lebih rendah dibandingkan dengan sistem hER α -estradiol sebagai kompleks agonis dan dapat diketahui bahwa interaksi Van der Waals (VdW) merupakan komponen energi yang paling besar memberikan pengaruhnya terhadap sistem.

Kontribusi energi dari interaksi VdW yang besar terhadap sistem mengindikasikan bahwa residu asam amino penyusun kantung aktif protein hER α didominasi oleh residu dengan sifat hidrofobik. Nilai total energi bebas ikatan (Δ G) pada sistem hER α -AND5 yang lebih rendah (-50,52 kkal/mol) menunjukkan bahwa tingkat afinitas AND5 (antagonis) terhadap hER α lebih baik dibandingkan dengan estradiol sebagai agonis dengan nilai total Δ G sebesar -40,86 kkal/mol.

5. Simpulan

Penelitian ini menunjukkan bahwa andrografolid dan modifikasi struktur terbaiknya (AND5) memiliki aktivitas antagonis terhadap reseptor hER α dengan membentuk ikatan hidrogen dengan Gly521, Asp351, Met343 dan tidak terbentuknya ikatan hidrogen dengan His524.

Pengujian potensi aktivitas antikanker payudara dari modifikasi struktur andrografolid dilakukan melalui simulasi penambatan molekul, pemodelan farmakofor, dan simulasi dinamika molekular. Hasil simulasi penambatan molekul menunjukkan bahwa nilai energi bebas ikatan (Δ G) andrografolid dan AND5 sebesar -9,65 kkal/mol dan -12,43 kkal/mol, secara berurutan. Nilai Δ G AND5 lebih rendah dibandingkan dengan Δ G tamoxifen yaitu sebesar -11,40

kkal/mol. Hasil pemodelan farmakofor menunjukkan bahwa andrografolid dan AND5 memiliki nilai pharmacophore-fit yang cukup tinggi sebesar 46,39% dan 63,47%, secara berurutan. Berdasarkan hasil simulasi dinamika molekular menggunakan metode kalkulasi MM-PBSA, diketahui bahwa sistem hER α -AND5 memiliki nilai Δ GTOTAL = -50,52 kkal/mol dibandingkan dengan sistem hER α -estradiol dengan nilai Δ GTOTAL = -40,86 kkal/mol. Hal ini menunjukkan bahwa AND5 memiliki afinitas yang lebih baik terhadap kantung aktif hER α dibandingkan dengan estradiol sehingga AND5 merupakan agen antikanker payudara yang sangat menjanjikan.

6. Saran

Perlu dilakukannya sintesis senyawa modifikasi terbaik dari andrografolid yakni senyawa AND5 yang kemudian dikonfirmasi dengan uji *in vitro* dan *in vivo* untuk memastikan aktivitas senyawa AND5 sebagai antikanker payudara dengan mekanisme sebagai antagonis reseptor estrogen alfa (hER α).

Daftar Pustaka

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
2. Kementerian Kesehatan RI. Data Dan Informasi Profil Kesehatan Indonesia 2016. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta; 2017.
3. WHO. Cancer country profiles 2014. Tersedia online di <http://www.who.int/cancer/country-profiles/en/>; 2017.
4. Mathew, Alex J. and Nixon RN. Docking Studies on Anticancer Drugs for Breast Cancer Using Hex. Proceedings of the International MultiConference of Engineers and Computer Scientists 2009 Vol I IMECS 2009. Hongkong; 2009.
5. Nelson E, Chang C, and McDonnell D. Cholesterol and Breast Cancer

- Pathophysiology. *Trends Endocrinology and Metabolism*. 2014;25(12):649-55.
6. Crew K. et al. How Do We Increase Uptake of Tamoxifen and Other Anti-Estrogens for Breast Cancer Prevention? *NPJ Breast Cancer*. 2017;3(1): 20–7.
 7. Gu W, Xu W, Sun X, Buring Z, Shuangjie W. et al. Anordrin Eliminates Tamoxifen Side Effects without Changing Its Antitumor Activity. *Nature Scientific Reports*. 2017;7(7): 1–9.
 8. Ruyck J, Brysbaert R, Blossey R, and Lensink M. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. *Adv Appl Bioinform Chem*. 2016; 9(1):1–11.
 9. Geethangili YK, Rao SH, Fang YM, Tzeng. 2008. Cytotoxic constituents from *Andrographis paniculata* induced cell cycle arrest in Jurkat cells. *Phytother Res*. 2008; 22(10):1336-41.
 10. Ahmad MS, Ahmad S, Arshad M, Afzal M. *Andrographia paniculata* a miracle herbs for cancer treatment: In vivo and in vitro studies against aflatoxin B1 toxicity. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2014;15(2):163-71.
 11. Kementerian Pertanian. 2014. Statistik Produksi Hortikultura Tahun 2013. Dirjen Hortikultura .Jakarta; 2014.
 12. Leeuw R, Jacques N, Rob M. A Role for Estrogen Receptor Phosphorylation in the Resistance to Tamoxifen. *Int J Breast Cancer*. 2011; 2011: 232-35.
 13. Lipinski C. Lead Profiling Lead- and Drug-like Compounds : The Rule-of-Five Revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2004;1(4): 337–41.
 14. Puratchikody A, Dharmaraj S, Umamaheswari A, and Irfan N. 3-D structural interactions and quantitative structural toxicity studies of tyrosine derivatives intended for safe potent inflammation treatment. *Chem Cent J*. 2016; 10(24) : 1-19.
 15. Bajda M, Jonczyk J, Malawska B, Filipek S. Application of Computational Methods for the Design of BACE-1 Inhibitors: Validation of in Silico Modelling. *Int. J. Mol. Sci*. 2014; (15): 5128-39
 16. Josh M, Pradeep S, Adarshc VK, Vijayalekshmi A, Sudha DR, Balachandrand S, Sreejithc MN, Abdul Jaleelc UC, Benjamina S. In silico evidences for the binding of phthalates onto human estrogen receptor α , β subtypes and human estrogen-related receptor γ . *Molecular Simulation*. 2014; 40(5):408-17.
 17. Muchtaridi M, Syahidah HN, Subarnas A, Yusuf M, Bryant SD, Langer T. Molecular Docking and 3D-Pharmacophore Modeling to Study the Interactions of Chalcone Derivatives with Estrogen Receptor Alpha. *Pharmaceuticals*. 2017;10(4):1-12.
 18. Ramachandran B, Kesavan, S., Rajkumar, T. Molecular modeling and docking of small molecule inhibitors against NEK2. *Biomed Informatics*. 2016;12(2):62–8.
 19. Maiorov VN dan Gordon C. Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins. *J Mol Biol*. 1994; 235(1):625–34.
 20. Shaw DE. et al. Atomic-level characterization of the structural dynamics of proteins. *Science*. 2010;330(1):341–46.
 21. Celik L, Lund J, Schiott B. Conformational dynamics of the estrogen reseptor alpha: molecular dynamics simulations on the influence of binding site structure on protein dynamics. *Biochemistry*. 2007;46(1): 1743-58.
 22. Abroshan H, Akbarzadeh H, Parsafar A. Molecular Dynamics Simulation and MM-PBSA Calculations of Sickel Cell Hemoglobin in Dimer Form with Val, Trp, or Phe at the Lateral Contact. *Journal of Physical Organic Chemistry*. 2010;23(9): 866–77.