

Screening *In Silico* dan Penambatan Molekuler Senyawa Turunan 4-Hydroxytamoxifen (OHT) sebagai Kandidat Agen Anti Kanker Payudara terhadap Estrogen Receptor Alpha (ER- α)

Alfian Valentino Fernanda Putra Subhakti^{1*}, Nindita Dwi Ambarwati², Nurul Qomaryah Kiswa³, Dea Qoiril Ana⁴, Nur Hanna Fahimah⁵, Intan Asmi Saharani⁶, Mutia Kafa Ghania⁷, Aleind Aloysius Gonzaga⁸, Najma Tatsbita Satria⁹, Putri Andini Sutejo¹⁰, Imam Siswanto¹¹

¹⁻¹⁰Rekayasa Nanoteknologi, Fakultas Teknologi Maju & Multidisiplin, Universitas Airlangga, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia, 60115

¹¹Departemen Kimia, Fakultas Sains & Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia, 60115

*Penulis Korespondensi: alfian.valentino.fernanda-2024@ftmm.unair.ac.id

Abstract. Luminal breast cancer subtypes expressing Estrogen Receptor Alpha (ER- α) account for approximately 70% of breast cancer cases globally. Although hormonal therapy using the active ligand 4-hydroxytamoxifen (OHT) has been widely employed, its long-term efficacy is frequently hampered by drug resistance and adverse side effects. This study aims to design and evaluate, *in silico*, the potential of structurally modified OHT derivatives as more effective and selective ER- α inhibitor candidates. Ligand geometry optimization was performed using the semi-empirical PM6 method in Gaussian software. Molecular docking simulations were conducted using DOCK6 against the ER- α crystal structure (PDB ID: 3ERT), validated through a re-docking procedure of the reference ligand. Molecular interaction analysis was visualized in 2D/3D using BIOVIA Discovery Studio. Method validation showed high accuracy, with a Root Mean Square Deviation (RMSD) value of 1.032 Å (< 2.0 Å). Docking results revealed that the native ligand OHT-opt exhibited the best grid score (-59.47 kJ/mol), followed by pyrrolidine-OHT (-58.47 kJ/mol) and mono-fluoro-OHT (-56.11 kJ/mol). Interaction analysis showed that the mono-fluoro-OHT modification retains the essential hydrogen bond with the anchoring residue ARG101.A (2.716 Å) while forming a new hydrogen bond with GLU60 (2.668 Å) on helix 3 (H3). This new interaction may disrupt the receptor's allosteric conformation, potentially preventing transcriptional activation. This study concludes that structural modifications of OHT derivatives, particularly pyrrolidine-OHT and mono-fluoro-OHT, exhibit competitive binding affinities and hold strong potential to be developed as novel therapeutic agents for breast cancer, pending further validation through molecular dynamics simulations and *in vitro* experiments.

Keywords: Breast cancer; ER- α ; 4-Hydroxytamoxifen; Molecular Docking; DOCK6; PM6.

Abstrak. Kanker payudara sub tipe luminal yang mengekspresikan Estrogen Receptor Alpha (ER- α) mendominasi sekitar 70% kasus kanker payudara secara global. Meskipun terapi hormonal menggunakan ligan aktif 4-hidroxytamoxifen (OHT) telah digunakan secara luas, efektivitas jangka panjangnya kerap terhambat oleh resistensi obat dan efek samping. Penelitian ini bertujuan untuk merancang dan mengevaluasi secara *in silico* potensi senyawa turunan OHT hasil modifikasi struktural sebagai kandidat inhibitor ER- α yang lebih efektif dan selektif. Optimasi geometri ligan dilakukan menggunakan metode semiempiris PM6 pada *software* Gaussian. Simulasi penambatan molekuler dilakukan menggunakan program DOCK6 terhadap struktur kristal ER- α (PDB ID: 3ERT), yang divalidasi melalui prosedur *re-docking* ligan acuan. Analisis interaksi molekuler 2D/3D divisualisasikan menggunakan BIOVIA Discovery Studio. Hasil validasi metode menunjukkan akurasi yang sangat tinggi dengan nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) sebesar 1,032 Å (< 2,0 Å). Berdasarkan hasil penambatan, ligan *native* OHT-opt memiliki nilai *grid score* terbaik (-59,47 kJ/mol), disusul oleh pirolidin-OHT (-58,47kJ/mol) dan mono-fluor-OHT (-56,11 kJ/mol). Analisis interaksi menunjukkan bahwa modifikasi mono-fluor-OHT mampu mempertahankan ikatan hidrogen esensial dengan residu penjangkar ARG 101.A (2,716Å) sekaligus membentuk ikatan hidrogen baru dengan residu GLU60 (2,668 Å) pada helix 3 (H3). Interaksi baru ini berpotensi mengganggu konformasi alosterik reseptor untuk mencegah aktivasi transkripsi. Penelitian ini menyimpulkan bahwa modifikasi struktural turunan OHT, khususnya pirolidin-OHT dan

mono-fluor-OHT, memiliki afinitas pengikatan yang kompetitif dan berpotensi kuat untuk dikembangkan sebagai agen therapeutic baru kanker payudara melalui pengujian dinamis (*molecular dynamics*) dan eksperimen *in vitro* lanjutan.

Kata kunci: Kanker payudara; ER- α ; 4-Hydroxytamoxifen; Penambatan Molekuler; DOCK6; PM6.

1. LATAR BELAKANG

Di Indonesia, kanker payudara menjadi jenis kanker yang paling banyak ditemukan pada perempuan dan menjadi penyebab utama kematian akibat kanker. Peningkatan jumlah kasus terus terjadi membuktikan bahwa upaya pencegahan, deteksi dini, serta pengembangan terapi menjadi kebutuhan yang sangat mendesak (Bray dkk., 2024). Kanker payudara (*breast cancer*) disebabkan oleh keganasan sel epitel kelenjar payudara dan menjadi salah satu penyakit tidak menular dengan beban kesehatan global terbesar pada abad ke-21. Berdasarkan data GLOBOCAN 2022, kasus baru kanker payudara setiap tahunnya tercatat lebih dari 2,3 juta dengan sekitar 665.000 kematian (Bray dkk., 2024). Selain itu, kanker payudara menjadi kanker yang paling sering didiagnosis pada perempuan secara global dan memberikan beban kesehatan yang signifikan di berbagai negara (Giaquinto dkk., 2024).

Di antara berbagai sub tipe kanker payudara, kelompok luminal menjadi sub tipe yang paling dominan dan mencakup sekitar 70% dari seluruh kasus kanker payudara. Sub tipe ini ditandai ekspresi reseptor estrogen yang berperan dalam proliferasi, diferensiasi, dan kelangsungan hidup sel kanker melalui aktivasi gen siklus pertumbuhan tumor (Jeselson dkk., 2015). Pada kanker payudara sub tipe luminal, terapi hormonal menjadi pendekatan utama karena mampu menghambat aktivitas jalur pensinyalan estrogen yang berperan dalam pertumbuhan sel kanker. Pendekatan ini berkontribusi terhadap peningkatan angka kelangsungan hidup pasien dan penurunan risiko kekambuhan pada berbagai stadium penyakit. Meskipun demikian, efektivitas terapi yang tersedia saat ini masih terbatas dan belum menghasilkan respons optimal pada seluruh pasien.

Tantangan terbesar dalam terapi kanker payudara adalah munculnya resistensi terhadap pengobatan yang diberikan. Resistensi dapat terjadi sejak awal terapi (*intrinsic resistance*) maupun berkembang setelah penggunaan obat dalam jangka waktu tertentu (*acquired resistance*). Akibatnya, efektivitas terapi menurun, risiko kekambuhan meningkat, dan pilihan pengobatan menjadi semakin terbatas. Terapi saat ini menimbulkan berbagai efek samping yang memengaruhi kualitas hidup

pasien, sehingga pengembangan agen therapeutic efektif dan lebih aman menjadi prioritas penelitian kanker payudara (Cardoso dkk., 2024).

Keterbatasan efektivitas terapi menunjukkan ligan atau senyawa aktif konvensional memiliki kelemahan dari aspek afinitas pengikatan terhadap target biologis, selektivitas, dan kemampuan mengatasi mekanisme resistensi selama terapi. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan kandidat ligan baru yang dapat menghasilkan interaksi optimal dengan target molekuler relevan. Meskipun demikian, informasi karakteristik interaksi molekuler kandidat ligan baru terhadap target kanker payudara masih terbatas, terutama untuk memperoleh senyawa mempertahankan afinitas tinggi dan mengatasi mekanisme resistensi selama terapi. Untuk meningkatkan afinitas dan selektivitas terhadap ER- α , OHT dapat dimodifikasi melalui penambahan gugus fungsi tertentu, seperti alkil, halogen, atau amina siklik.

2. KAJIAN TEORITIS

Kanker payudara merupakan penyakit yang sangat heterogen dengan karakteristik molekuler beragam dan diklasifikasikan ke dalam sub tipe intrinsik Luminal A, Luminal B, HER2-*enriched*, dan *Triple-Negative Breast Cancer* (TNBC) yang menunjukkan karakteristik biologis, prognosis, dan respons terapi berbeda (Harbeck dkk., 2019). Perkembangan terapi kanker payudara mengalami kemajuan signifikan melalui kombinasi pembedahan, radioterapi, kemoterapi, terapi bertarget, imunoterapi, dan terapi hormonal (Harbeck dkk., 2019). Keberhasilan terapi dan variasi respon pengobatan dipengaruhi oleh heterogenitas genetik antar individu, adaptasi biologis sel kanker, serta perubahan molekuler yang terjadi selama pengobatan (Osborne & Schiff, 2011). Namun, berbagai penelitian menunjukkan mutasi gen jalur pensinyalan reseptor estrogen, aktivasi jalur proliferasi alternatif PI3K/AKT/mTOR dan MAPK, serta perubahan regulasi transkripsi dapat mempertahankan pertumbuhan sel kanker meskipun terapi telah diberikan (Jeselsohn dkk., 2015; Osborne & Schiff, 2011).

Perkembangan pendekatan *Structure-Based Drug Design* (SBDD) semakin banyak dimanfaatkan untuk mengidentifikasi serta mengoptimasi kandidat senyawa yang berpotensi dikembangkan sebagai agen *therapeutic* baru (Śledź & Caflisch, 2018). SBDD merupakan metode *molecular docking* yang memanfaatkan informasi struktur tiga dimensi protein target untuk merancang dan mengoptimasi kandidat ligan. Metode ini memungkinkan perancangan ligan yang menghasilkan efek farmakologis dan

therapeutic yang diinginkan (Ferreira dkk., 2015). SBDD mempelajari interaksi non-kovalen antara reseptor dan molekul obat untuk mengetahui mode ikatan serta energi interaksi ligan kandidat dengan situs aktif protein, kemudian menempatkan konformasi molekul kecil ke reseptor sesuai bentuk dan sifatnya, lalu dievaluasi menggunakan *scoring functions* untuk memperkirakan energi pengikatan kompleks ligan-reseptor. Hasil dari proses docking berupa *scoring* yang dinyatakan dalam satuan kcal/mol berdasarkan nilai afinitasnya (TilakVijay dkk., 2019). Riset komputasional menjadi komponen penting pengembangan obat modern dan memungkinkan identifikasi, seleksi, serta optimasi kandidat senyawa dilakukan lebih cepat, efisien, dan ekonomis dibanding pendekatan eksperimental konvensional (DiMasi dkk., 2016). Menurut Śledź & Caflisch (2018), berbagai metode *in silico* dapat mempercepat penyaringan senyawa potensial, memprediksi interaksi molekuler, dan membantu peneliti memahami hubungan struktur kimia dengan aktivitas biologis sebelum pengujian laboratorium kompleks dilakukan. Keunggulan *molecular docking* antara lain, tidak menggunakan bahan kimia, efisiensi waktu dan biaya penelitian, serta tingkat keamanan yang tinggi (Anjani dkk., 2022).

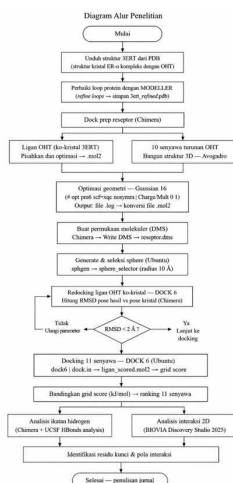
Dalam penelitian ini, protein target yang digunakan adalah struktur kristal ER- α yang tersimpan dalam Protein Data Bank dengan kode akses 3ERT. Struktur 3ERT memberikan informasi interaksi ligan dengan ER- α untuk memodulasi aktivitas biologisnya (Asaumi dkk., 2026). Struktur ini merupakan kompleks ER- α dengan ligan 4-hydroxytamoxifen (OHT) yang menjelaskan mekanisme auto inhibisi yang menghambat aktivitas transkripsi ER- α . OHT dipilih sebagai ligan referensi karena merupakan metabolit aktif utama tamoxifen dengan afinitas terhadap ER- α jauh lebih tinggi dibandingkan senyawa induknya sebagai kontrol positif. Penelitian TilakVijay dkk., (2019) mengenai docking molekuler ER- α terhadap 3ERT yang dikomplekskan dengan 4-hidroksitamoksifen menunjukkan hasil afinitas pengikatan yang lebih baik (-149,856 kcal/mol) dengan RMSD 0,85 Å daripada tamoxifen yang terikat 3ERT.

Optimasi geometri molekul senyawa turunan OHT hasil modifikasi struktural dilakukan sebelum proses *docking* menggunakan metode semiempiris PM6 pada *software* Gaussian. Metode PM6 digunakan karena memiliki tingkat akurasi yang lebih baik dibandingkan metode lain, dengan hasil perhitungan yang mendekati data eksperimen serta proses komputasi yang lebih sederhana (Asmuruf, 2017). Berdasarkan

uraian diatas, penelitian ini bertujuan menganalisis dan membandingkan mode interaksi, nilai energi ikatan, dan afinitas ligan kandidat terhadap reseptor 3ERT sebagai dasar seleksi senyawa dengan potensi aktivitas anti-kanker payudara secara optimal.

3. METODE PENELITIAN

Penelitian eksperimental komputasional *in silico* ini menggunakan pendekatan *molecular docking* yang dapat memprediksi interaksi molekul antara ligan dan protein target. Secara keseluruhan, alur penelitian ini dapat digambarkan pada Gambar 1 berikut.



Gambar 1. Diagram alur penelitian penambatan molekuler senyawa turunan OHT terhadap ER- α

Alat dan Bahan

Penelitian dilakukan menggunakan komputer/laptop (Intel Core i5, RAM $\geq$ 8 GB, *storage* $\geq$ 50 GB), sistem operasi Ubuntu 20.04 LTS (WSL/Linux), *software*: UCSF Chimera 1.16, DOCK 6.9, Gaussian16 dan GaussView 6.0, Avogadro 1.2, BIOVIA Discovery Studio. Molekul yang didocking adalah struktur ER- α (PDB ID: 3ERT) dari rcsb.org, ligan pembanding 4-Hydroxytamoxifen (OHT), serta struktur 3D dari 10 ligan turunan OHT hasil desain modifikasi gugus fungsi. Sepuluh senyawa turunan OHT yakni, OHT (senyawa induk/referensi), dietil-OHT, piperidin-OHT, pirolidin-OHT, mono-fluor-OHT, di-fluor-OHT, klor-OHT, trifluorometil-morfolin-OHT, metil-OHT, propil-OHT dirancang melalui modifikasi struktural pada senyawa induk menggunakan strategi *bioisostere* dan pengembangan gugus fungsional.

Preparasi dan Optimasi

Pemilihan Estrogen Receptor Alpha (ER- α) yang berupa kompleks ER- α dengan ligan 4-Hydroxytamoxifen (OHT) hasil *X-ray crystallography* beresolusi 1,90 Å

dikarenakan kualitas struktur yang tinggi serta keberadaan ligan ko-kristal. Preparasi reseptor dilakukan menggunakan UCSF Chimera 1.16 meliputi pemeriksaan struktur, perbaikan model dengan MODELLER, pemisahan ligan OHT, penghapusan pelarut, penambahan atom hidrogen, serta penetapan muatan parsial menggunakan AMBER ff14SB dan AM1-BCC, kemudian disimpan dalam format .pdb untuk docking. Ligan OHT dan sepuluh turunannya dioptimasi menggunakan Gaussian16 dengan metode PM6 (*#opt pm6 scf=xqc nosymm*) pada kondisi netral singlet, dengan struktur awal OHT dari 3ERT dan senyawa turunan dibangun menggunakan Avogadro 1.2, kemudian dipreparasi ulang melalui dockprep untuk penambahan hidrogen dan muatan. Situs pengikatan ditentukan melalui pembentukan permukaan molekuler (DMS) dan kluster bola menggunakan DOCK 6 di lingkungan Ubuntu/WSL, diikuti *selected_sphere* dalam radius 10 Å dari ligan OHT menggunakan *sphere_selector*. *Grid box* kemudian dibangun berdasarkan centroid sphere terpilih untuk mendefinisikan ruang docking dengan komponen energi van der Waals dan elektrostatik.

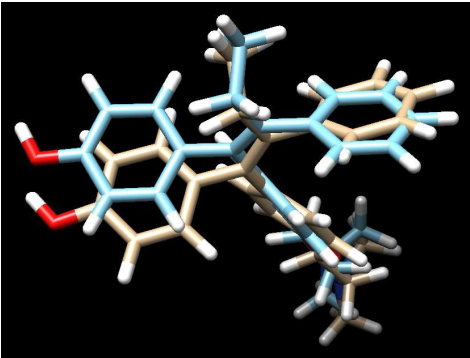
Metode Validasi dan Analisis Molecular Docking

Validasi metode penambatan molekuler dilakukan melalui *re-docking* ligan OHT ko-kristal pada reseptor ER- α (PDB 3ERT) untuk memastikan akurasi metode, dengan kriteria keberhasilan $\text{RMSD} \leq 2,0$ Å. Selanjutnya, penambatan molekuler 11 senyawa (OHT dan turunannya) dilakukan menggunakan DOCK 6.9 di lingkungan Ubuntu Linux dengan parameter yang dikontrol melalui file dock.in, menghasilkan nilai *grid score* (kJ/mol). Analisis interaksi dilanjutkan dengan identifikasi ikatan hidrogen menggunakan FindHBond pada UCSF Chimera, yang mencakup residu donor/akseptor, jarak $\text{D} \cdots \text{A}$, dan geometri ikatan, serta visualisasi interaksi ligan–reseptor 2D menggunakan BIOVIA Discovery Studio 2025.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Validasi dilakukan melalui prosedur *re-docking* ligan asli 4-hydroxytamoxifen (OHT) yang telah dioptimasi menggunakan Gaussian ke dalam kantung aktif ER- α manusia dengan 3ERT. Proses simulasi dan visualisasi menggunakan *software* UCSF Chimera 1.18. Parameter utama yang digunakan adalah nilai *Root Mean Square*

Deviation (RMSD) dari posisi konformasi ligan hasil docking terhadap kristal ligan eksperimental. Berdasarkan hasil perhitungan, diperoleh nilai RMSD sebesar 1,032Å yang dihitung berdasarkan 58 pasangan atom. Nilai RMSD tersebut berada jauh di bawah ambang batas kritis konvensional yang ditetapkan dalam pemodelan molekuler, yaitu <2,0 Å. Hal ini mengonfirmasi bahwa algoritma pencarian dan fungsi penilaian pada UCSF Chimera memiliki akurasi yang cukup tinggi dalam mereproduksi pose biologis ligan asli, seperti yang ditunjukkan oleh hasil superimposisi pada Gambar 1. Selain itu, hasil penambatan menunjukkan nilai *binding affinity* atau energi bebas ikatan (ΔG) sebesar -59,474 kJ/mol, yang mengindikasikan bahwa interaksi antara ligan OHT hasil optimasi dengan kantung aktif reseptor berlangsung spontan dan membentuk



kompleks stabil (Tripathi dkk., 2025).

Gambar 1. Superimposisi konformasi ligan OHT hasil docking (biru muda) terhadap ligan asli (cokelat) pada kantong aktif reseptor ER- α (PDB ID: 3ERT)

Tabel 1. Hasil analisis *grid score* senyawa OHT and 10 turunannya terhadap reseptor ER- α (3ERT)

No	Ligan	Grid Score (kJ/mol)
1	OHT	-59.473888
2	pirolidin-OHT	-58.470097
3	mono-fluor-OHT	-56.109146
4	metil-OHT	-50.936989
5	piperidin-OHT	-49.033463
6	klor-OHT	-41.539066
7	dietil-OHT	-40.505226
8	di-fluor-OHT	-39.082779
9	propil-OHT	-36.182514

10	amino-OHT	-35.874249
----	-----------	------------

Berdasarkan hasil docking pada Tabel 1, ligan OHT menunjukkan nilai grid score paling rendah (-59,47 kJ/mol) yang mengindikasikan afinitas pengikatan baik, sedangkan amino-OHT memiliki nilai tertinggi (-35,87 kJ/mol) sebagai afinitas paling rendah. Sebagai ligan referensi, OHT digunakan sebagai pembanding untuk mengevaluasi pengaruh substitusi gugus fenoksi terhadap kemampuan pengikatan ligan. Hasil analisis interaksi molekuler menunjukkan bahwa OHT dan mono-fluor-OHT masing-masing membentuk dua ikatan hidrogen dengan residu ARG 101.A bersama LEU94 dan GLU60. Ikatan hidrogen berperan dalam stabilitas ligan–reseptor karena mempertahankan orientasi ligan pada kantong aktif protein dan meningkatkan afinitas pengikatan (Chen dkk., 2016). Nilai *grid score* mono-fluor-OHT (-56,11 kJ/mol) menunjukkan bahwa substitusi satu atom fluor pada struktur OHT tidak menyebabkan penurunan afinitas pengikatan yang signifikan karena atom fluor dapat memodifikasi distribusi elektron pada molekul tanpa mengubah rangka utama ligan. Selain itu, pirolidin-OHT memiliki nilai *grid score* sebesar -58.47 kJ/mol yang menunjukkan potensi afinitas yang paling baik terhadap reseptor. Sedangkan, ligan amino-OHT, propil-OHT, dan di-fluor-OHT memiliki nilai *grid score* yang lebih tinggi sehingga afinitas pengikatannya lebih rendah. Jenis substituen yang ditambahkan pada struktur OHT memberikan pengaruh yang berbeda terhadap kemampuan pengikatan ligan terhadap reseptor target.

Tabel 2. Parameter Geometris Ikatan Hidrogen Ligan Terbaik dengan Reseptor ER- α (3ERT).

Nama Ligan	Residu Asam Amino (Reseptor)	Atom Donor/Akseptor (Ligan)	Jarak D $\cdots$ A (Å)	Jarak D-H $\cdots$ A (Å)
OHT	ARG 101.A NH2	UNK 1 O15	2.616	1.728
	UNK 1 O15	LEU 94.0 A O	3.109	2.202
mono-fluor-OHT	ARG 101.A NH2	UNK 1 O11	2.716	1.729
	UNK 1 O11	GLU 60.0 A OE2	2.668	1.923
klor-OHT	ARG 101.A	UNK 1 O11	2.779	1.880

Tabel 2 menjelaskan analisis ikatan hidrogen antara ligan dengan reseptor 3ERT menggunakan UCSF Chimera. Ikatan hidrogen hanya terbentuk apabila ada kesesuaian geometri antara donor dan akseptor dan akan meningkatkan energi pengikatan dan mode pengikatan. Ikatan hidrogen memengaruhi spesifisitas pengikatan ligan dengan reseptor, desain obat dalam proses kimia dan biologis, pengenalan molekuler, serta aktivitas biologis (Anandan et.al., 2022). Dalam ER- α , gugus hidroksil berfungsi

sebagai jangkar ligan di dalam kantong pengikatan ligan (LBP) ER- α melalui ikatan hidrogen dengan asam amino polar termasuk Thr347, Glu353, Arg394, dan His524 (Lee & Barron, 2017). Adapun hasil penelitian UCSF Chimera menunjukkan bahwa hanya 3 dari 10 ligan yang diuji, yaitu OHT, mono-fluor-OHT, dan klor-OHT yang dapat membentuk ikatan hidrogen dengan residu ARG. Sementara itu, 7 lainnya tidak terdeteksi adanya interaksi hidrogen.

OHT (4-hydroxytamoxifen) sebagai ligan referensi dan kontrol positif membentuk dua ikatan hidrogen, yaitu antara NH₂ ARG 101.A dengan O15 pada UNK 1 serta antara O15 UNK 1 dengan H42 LEU 94.A. Hal ini sesuai dengan penelitian Sakkih dkk., (2021), di mana ligan OHT membentuk interaksi ikatan hidrogen dengan Arg344 di sisi pengikatan ER- α yang menunjukkan peran arginin dalam stabilitas kompleks ligan-reseptor. Selanjutnya, mono-fluor-OHT menunjukkan ikatan hidrogen paling bagus di antara seluruh ligan yang diuji. Ligan ini mempertahankan jumlah ikatan hidrogen setara dengan OHT (dua ikatan) dan melibatkan residu tambahan GLU 60.A dengan jarak D–A yang lebih pendek dan optimal (2,668 Å) dibandingkan ikatan OHT dengan LEU 94.A (3,109 Å). Fluor merupakan elemen paling elektronegatif dalam tabel periodik, dan sifat ini memberikan dampak pada distribusi muatan elektron, konformasi, kapasitas ikatan hidrogen, polaritas, dan lipofilisitas (Pietruś dkk., 2022). Ligan klor-OHT hanya membentuk satu ikatan hidrogen di antara ligan yang lain yaitu residu NH₂ ARG 101.A terhadap O11 UNK 1. Atom klorin bersifat *electron-withdrawing* melalui efek induktif yang tidak reaktif pada aktivitas biologis senyawa yang muncul ketika menjadi substituen pada gugus aromatik, heteroaromatik, atau olefinik. Dalam kondisi tersebut, efek sterik dan/atau elektronik substituen klorin menghasilkan atraksi atau repulsi elektron lokal dan/atau interferensi sterik dengan asam amino di sekitar protein target.

Dalam penelitian yang dilakukan oleh Lee & Barron (2017) faktor penyebab terjadinya ketiadaan ikatan hidrogen ini antara lain, adanya halangan sterik terhadap residu ARG dan GLU di 3ERT, perubahan konformasi ligan dalam kantong pengikatan, dan sifat hidrofobik substituen yang dominan. Kantong 3ERT memiliki geometri yang lebih terbuka dibandingkan konformasi agonis, namun ruang aksesibilitas ke residu polar kunci (Arg394/GLU) tetap terbatas. Substituen besar seperti pirolidin, piperidin, dan dietil pada ligan-ligan tersebut menghalangi gugus hidroksil untuk menjangkau

ARG 101.A di dalam kantong 3ERT, sehingga ikatan hidrogen tidak dapat terbentuk. Substituen seperti pirolidin, piperidin, propil, dan dietil bersifat hidrofobik, sehingga pada ER- α , rantai samping hidrofobik membuat kontak yang luas dengan heliks H3, H5/6, dan H11 yang membuat interaksi hidrofobik dominan dan kemampuan membentuk ikatan hidrogen menurun. Pada ligan difluor-OHT terdapat dua atom fluor yang memengaruhi ikatan hidrogen secara tidak langsung melalui penurunan kekuatan ikatan hidrogen N-H $\cdots$ N. Dua atom fluor secara kumulatif dapat mengubah distribusi elektron secara lebih drastis sehingga gugus donor/akseptor utama kehilangan kemampuan interaksinya. Sedangkan, pada amino-OHT gugus amino ($-NH_2$) bersifat donor ikatan hidrogen namun kemungkinan posisi geometrinya dalam kantong tidak optimal untuk berinteraksi dengan residu ARG 101.A (Pietruś dkk., 2021)

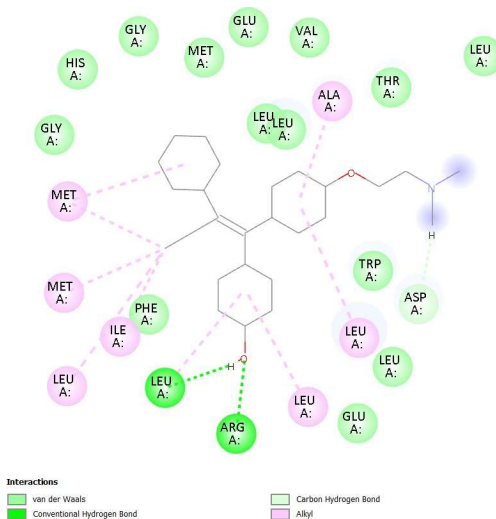
Tabel 3. Profil Interaksi Non-Kovalen Ligan dan Turunannya pada Reseptor ER- α (3ERT).

Nama Ligan	Interaksi Elektrostatik / Polar	Interaksi Hidrofobik	Interaksi Van der Waals
OHT-opt-ligan (Ref)	ARG, LEU	LEU, VAL, TRP, MET, ALA, ILE	MET, LEU, GLU, ASP, PHE, GLY
pirolidin-OHT	Tidak Terdeteksi	LEU, VAL, TRP, MET, ALA, ILE	LEU, GLU, ASP, PHE, GLY, VAL
mono-fluor-OHT	ARG, GLU	LEU, VAL, TRP, MET, ALA, PHE	MET, GLU, ASP, ILE, GLY, LEU
metil-OHT	Tidak Terdeteksi	LEU, VAL, TRP, MET, ALA, ILE	ARG, LEU, MET, GLU, ASP, GLY
piperidin-OHT	Tidak Terdeteksi	LEU, VAL, TRP, MET, ALA, ILE	MET, GLU, ASP, PHE, GLY, HIS, VAL
klor-OHT	ARG	LEU, VAL, TRP, MET, ALA, ILE	LEU, MET, GLU, ASP, PHE, GLY
dietil-OHT	Tidak Terdeteksi	LEU, VAL, TRP, MET, ALA	ARG, LEU, MET, GLU, ASP, ILE, GLY
di-fluor-OHT	Tidak Terdeteksi	LEU, VAL, TRP, MET, ALA, PHE	MET, GLU, ASP, ILE, GLY, LEU, VAL
propil-OHT	Tidak Terdeteksi	LEU, VAL, TRP, MET, ALA	MET, GLU, ASP, ILE, GLY, PHE, ARG
amino-OHT	Tidak Terdeteksi	LEU, VAL, TRP, MET, ALA	MET, GLU, ASP, ILE, GLY, LEU, THR

Dilakukan analisis visualisasi interaksi antara ligan dan reseptor 3ERT menggunakan BioVIA Discovery Studio. Analisis ini difokuskan pada tiga ligan dengan performa terbaik, yaitu OHT sebagai ligan *native*, dietil-OHT, dan mono-fluor-OHT. Visualisasi interaksi digunakan untuk mengidentifikasi residu asam amino yang terlibat dalam pengikatan serta jenis interaksi yang berkontribusi terhadap kestabilan kompleks ligan–reseptor. Visualisasi kompleks OHT *native* menunjukkan bahwa ligan berikatan pada kantong aktif reseptor melalui kombinasi interaksi hidrogen dan hidrofobik. Berdasarkan analisis ikatan hidrogen, OHT membentuk dua ikatan hidrogen utama,

yaitu dengan residu ARG 101.A pada jarak 2,616 Å dan LEU94 pada jarak 3,109 Å. Interaksi dengan ARG 101.A menunjukkan adanya pengenalan molekul yang kuat oleh reseptor, sedangkan interaksi tambahan dengan LEU94 membantu meningkatkan kestabilan kompleks. Selain ikatan hidrogen, cincin aromatik OHT juga berinteraksi dengan residu hidrofobik di sekitar kantong aktif melalui gaya van der Waals dan interaksi π -alkil. Kombinasi interaksi polar dan nonpolar menghasilkan orientasi pengikatan yang stabil sehingga OHT digunakan sebagai ligan pembanding untuk mengevaluasi pengaruh modifikasi struktur pada senyawa turunannya.

Hasil visualisasi menunjukkan sebagian besar turunan OHT mempertahankan interaksi hidrofobik dengan residu LEU, VAL, TRP, MET, dan ALA yang mendominasi lingkungan kantong aktif reseptor. Namun, pola interaksi elektrostatik mengalami perubahan akibat modifikasi struktur ligan. OHT referensi menunjukkan interaksi elektrostatik dengan ARG dan LEU, sedangkan mono-fluor-OHT mempertahankan interaksi dengan ARG serta membentuk interaksi tambahan dengan GLU yang mengindikasikan peningkatan kontribusi interaksi polar. Sedangkan, klor-OHT hanya mempertahankan interaksi dengan ARG, sementara pirolidin-OHT, metil-OHT, piperidin-OHT, dietil-OHT, di-fluor-OHT, propil-OHT, dan amino-OHT tidak menunjukkan interaksi elektrostatik yang terdeteksi sehingga pengikatannya lebih bergantung pada interaksi hidrofobik dan van der Waals. Residu MET, LEU, GLU, ASP, GLY, PHE, dan ILE banyak terlibat dalam interaksi van der Waals pada hampir seluruh ligan yang menunjukkan lingkungan hidrofobik kantong aktif relatif tetap ada meskipun terjadi modifikasi gugus fungsi. Temuan ini mengindikasikan bahwa perubahan struktur turunan OHT terutama memengaruhi komponen polar pengikatan tanpa mengubah secara signifikan pola interaksi hidrofobik pada reseptor 3ERT.



Gambar 2. Visualisasi Interaksi 2D Ligan OHT Native dengan Residu Aktif Reseptor ER- α (3ERT) Menggunakan BioVIA Discovery Studio.

Turunan dietil-OHT menunjukkan pola pengikatan yang masih mempertahankan interaksi dengan residu kunci pada kantong aktif reseptor. Namun, penambahan dua gugus etil menyebabkan peningkatan luas permukaan hidrofobik molekul dibandingkan OHT *native*. Berdasarkan visualisasi BioVIA Discovery Studio, gugus etil tambahan tersebut memungkinkan terbentuknya lebih banyak kontak hidrofobik dengan residu nonpolar di sekitar kantong aktif, sehingga meningkatkan kontribusi gaya van der Waals terhadap kestabilan kompleks. Berbeda dengan OHT *native* yang memperoleh stabilitas melalui kombinasi dua ikatan hidrogen, dietil-OHT mengandalkan interaksi hidrofobik sebagai sumber utama afinitas pengikatannya.

Mono-fluor-OHT menunjukkan pola interaksi yang berbeda dibandingkan OHT *native* maupun dietil-OHT. Selain mempertahankan ikatan hidrogen dengan ARG 101.A pada jarak 2,716 Å, ligan ini membentuk ikatan hidrogen tambahan dengan residu GLU60 pada jarak 2,668 Å. Kehadiran interaksi baru tersebut menunjukkan bahwa substitusi atom fluor memengaruhi orientasi spasial ligan di dalam kantong aktif sehingga memungkinkan terbentuknya kontak dengan residu yang sebelumnya tidak terjangkau oleh OHT *native*. Dibandingkan dengan dietil-OHT yang mengalami peningkatan interaksi hidrofobik, mono-fluor-OHT meningkatkan kestabilan kompleks melalui penambahan titik jangkar polar. Oleh karena itu, meskipun kedua ligan menunjukkan afinitas yang baik, mekanisme peningkatan interaksinya berbeda.

Dietil-OHT mengoptimalkan kontak nonpolar, sedangkan mono-fluor-OHT meningkatkan jumlah interaksi hidrogen dengan residu aktif reseptor.

Perbandingan ketiga ligan menunjukkan bahwa residu ARG 101.A merupakan residu yang paling konsisten terlibat dalam proses pengikatan ligan pada reseptor 3ERT. Interaksi ini ditemukan pada OHT *native* maupun turunan yang memiliki performa docking terbaik, mengindikasikan bahwa ARG 101.A berperan penting dalam mempertahankan orientasi ligan di dalam kantong aktif. Selain itu, hasil penelitian menunjukkan adanya dua strategi optimasi afinitas yang berbeda. Strategi pertama ditunjukkan oleh dietil-OHT melalui peningkatan interaksi hidrofobik akibat penambahan gugus etil. Strategi kedua ditunjukkan oleh mono-fluor-OHT melalui pembentukan ikatan hidrogen tambahan dengan GLU60. Temuan ini mengindikasikan bahwa modifikasi struktur OHT dapat meningkatkan kestabilan kompleks baik melalui pendekatan hidrofobik maupun polar. Secara biologis, kedua mekanisme tersebut berpotensi meningkatkan kemampuan ligan untuk mempertahankan pengikatan pada reseptor estrogen α , sehingga menjadikan dietil-OHT dan mono-fluor-OHT sebagai kandidat yang layak untuk dievaluasi lebih lanjut melalui simulasi dinamika molekul (*molecular dynamics*) dan pengujian eksperimental.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil analisis *molecular docking* dari sepuluh senyawa turunan 4-hydroxytamoxifen (OHT) terhadap Estrogen Receptor Alpha (ER- α) menggunakan DOCK6 diperoleh nilai *grid score* terbaik diperoleh dari ligan OHT, yakni sebesar -59,47 kJ/mol. Selain itu, pirolidin-OHT (-58,47 kJ/mol) dan mono-fluor-OHT (-56,11 kJ/mol) menjadi kandidat inhibitor baru dengan afinitas pengikatan yang baik. Sebaliknya, substitusi gugus amina polar pada amino-OHT memicu penurunan stabilitas termodinamika dengan *grid score* sebesar -35,87 kJ/mol akibat pergeseran orientasi ligan menjauhi residu jangkar ARG 101.A ke arah residu bermuatan negatif GLU353. Analisis jenis interaksi pada BIOVIA Discovery Studio menunjukkan bahwa molekul mono-fluor-OHT dapat mempertahankan ikatan hidrogen esensial dengan ARG 101.A (2,716 Å) sekaligus membentuk ikatan hidrogen baru dengan GLU60 (2,668 Å) pada Helix 3 (H3) karena sifat elektronegatif fluor. Sedangkan, pirolidin-OHT mengandalkan rigidifikasi cincin nitrogen yang meningkatkan kontribusi interaksi hidrofobik nonpolar

(π -alkil). Pada dietil dan propil-OHT, modifikasi dengan gugus alkil meruah justru memicu rintangan sterik yang memutuskan ikatan hidrogen sekunder esensial dengan LEU94. Oleh karena itu, senyawa pirolidin-OHT dan mono-fluor-OHT dapat diuji lebih lanjut pada *molecular dynamics* untuk menguji stabilitas fasa dinamis solvasi kompleks, serta sintesis dan uji aktivitas sitotoksik secara in vitro menggunakan kultur sel kanker payudara MCF-7.

DAFTAR REFERENSI

- Asaumi, S., Azra, F., & Kusnananda, A.J. (2026). Molecular Docking Senyawa Bioaktif Tempuyung (*Sonchus arvensis*) Terhadap Reseptor ER- α Sebagai Inhibitor Kanker Payudara. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 18(1), 105 – 112. <https://doi.org/10.35617/jfionline.v18i1.414>
- Asmuruf, F., Futwembun, A., & Kopeuw, A. J. (2017). Karakteristik Struktur Elektronik Pada Senyawa Goniotalamin, Infektokaryon, dan Kurzicalkolakton Menggunakan Metode Density Functional Theory (DFT). *Frans. Avogadro Jurnal Kimia*, 4(1), 24- 30.
- Ferreira, L. G., dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular Docking and Structure-based Drug Design Strategies. *Molecules*, 20(7), 13384–13421. <https://doi.org/10.3390/molecules20713384>
- TilakVijay, J., Vivek Babu, K., & Uma, A. (2019). Virtual Screening of Novel Compounds as Potential ER-alpha Inhibitors. *Bioinformation*, 15(5), 321–332. <https://doi.org/10.6026/97320630015321>
- Tripathi, A., Suri, K., K, S., & Murugan, N. A. (2025). Assessing the Accuracy of Binding Pose Prediction for Kinase Proteins and 7-azaindole Inhibitors: A Study with AutoDock4, Vina, DOCK 6, and GNINA 1.0. *RSC Advances*, 15(55), 47051–47065. <https://doi.org/10.1039/d5ra05526a>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Cardoso, F., Paluch-Shimon, S., Senkus, E., Curigliano, G., Aapro, M. S., André, F., Barrios, C. H., Bergh, J., Bhatt, D. L., Cardoso, M. J., Carey, L., Corneliussen-James, D., Cufer, T., El Saghir, N., Elzayat, M., Escalone, A., Fallowfield, L., Francis, P. A., Gelmon, K., & Winer, E. P. (2024). 7th ESO–ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 7). *Annals of Oncology*, 35(11), 953–984. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2024.08.009>
- Chen, D., Oezguen, N., Urvil, P., Ferguson, C., Dann, S. M., & Savidge, T. C. (2016). Regulation of Protein-ligand Binding Affinity by Hydrogen Bond Pairing. *Science Advances*, 2(3), e1501240. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501240>
- DiMasi, J. A., Grabowski, H. G., & Hansen, R. W. (2016). Innovation in the Pharmaceutical Industry: New Estimates of R&D Costs. *Journal of Health Economics*, 47, 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2016.01.012>
- Giaquinto, A. N., Sung, H., Newman, L. A., Freedman, R. A., Smith, R. A., Star, J., Jemal, A., & Siegel, R. L. (2024). Breast Cancer Statistics 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(6), 477–495. <https://doi.org/10.3322/caac.21863>
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast Cancer. *Nature Reviews*

Disease Primers, 5(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>

- Jeselsohn, R., Buchwalter, G., De Angelis, C., Brown, M., & Schiff, R. (2015). ESR1 mutations—A Mechanism for Acquired Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(10), 573–583. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.117>
- Osborne, C. K., & Schiff, R. (2011). Mechanisms of Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Annual Review of Medicine*, 62(1), 233–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-070909-182917>
- Śledź, P., & Caflisch, A. (2018). Protein Structure-based Drug Design: From Docking to Molecular Dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, 48, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.10.010>