



Received 16th June 2019
Accepted 06th May 2020
Published 15th June 2020

Open Access

DOI: 10.35472/jsat.v4i1.191

Penambatan molekul senyawa turunan orizanol terhadap enzim 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reduktase

Syaikhul Aziz ^{*a}, Nur Adliani ^a, Sukrasno ^b

^a Program Studi Farmasi, Institut Teknologi Sumatera, Lampung Selatan, Indonesia, 35365

^b Kelompok Keilmuan Biologi Farmasi, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Indonesia, 40132

* Corresponding E-mail: syaikhul.aziz@fa.itera.ac.id

Abstract: Orizanol has been reported to reduce serum total cholesterol (hypolipidemic agent) by inhibiting HMG-CoA reductase, an enzyme responsible for the metabolic pathway that produces cholesterol and isoprenoid. The purpose of this experiment is to determine the inhibition activity of orizanol derivatives on HMG-CoA reductase by molecular docking. Four structure of orizanol derivatives, Lanosteryl-ferulate, Brassicasteryl-ferulate, Lupeol-ferulate, and Cholesteryl-ferulate were used as ligands for molecular docking. The HMG-CoA reductase structure was obtained from protein data bank and the study was performed using AutoDock Tools as a molecular docking software. All orizanol derivatives show binding affinity against HMG-CoA reductase. Lupeol-ferulate was predicted to be the best inhibitory activity against HMG-CoA reductase because of molecular docking.

Keywords: HMG-CoA reductase, hypolipidemic, molecular docking, orizanol derivative

Abstrak: Orizanol telah dilaporkan mampu menurunkan kolesterol total serum (hipolipidemia) dengan cara menghambat HMG-KoA reduktase, sebuah enzim yang bertanggung jawab untuk jalur metabolit yang memproduksi kolesterol dan isoprenoid. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan aktivitas penghambatan dari turunan orizanol pada HMG-KoA reduktase melalui penambatan molekul. Empat struktur dari turunan orizanol, Lanosteryl-ferulate, Brassicasteryl-ferulate, Lupeol-ferulate, dan Cholesteryl-ferulate digunakan sebagai ligan untuk penambatan molekul. Struktur HMG-KoA reduktase diperoleh dari bank data protein dan kajian penambatan molekul dilakukan menggunakan perangkat lunak *AutoDock Tools*. Semua turunan senyawa orizanol menunjukkan afinitas ikatan terhadap HMG-KoA reduktase. Berdasarkan penambatan molekul, Lupeol-ferulate diprediksikan memiliki aktivitas penghambatan yang terbaik terhadap HMG-KoA reduktase.

Kata Kunci: hipolipidemia, HMG-KoA reduktase, penambatan molekul, turunan orizanol

Pendahuluan

Desain obat berbasis struktur merupakan prediksi struktur tiga dimensi dari target obat yang digunakan sebagai dasar pengembangan obat. Perkembangan tersebut didasarkan atas dukungan teknik desain obat dengan bantuan komputer (*computer-aided drug design*). Penambatan molekular merupakan suatu alat bantu dalam biologi molekular struktural dan penemuan obat berbasis struktur. Tujuan dari penambatan ligan-protein tersebut adalah untuk memahami dan memprediksi pengenalan molekular, menemukan kemungkinan mode ikatan, dan memprediksi afinitas pengikatan. Saat ini banyak program komputer yang dapat digunakan untuk memprediksikan interaksi yang terjadi antara reseptor (protein) dengan ligan (senyawa uji), seperti GOLD, FlexX, Glide, DOCK, dan AutoDock [1]. Program

komputer komersial tersebut telah banyak digunakan karena memiliki tingkat kepercayaan (*reliability*) yang baik.

Orizanol termasuk ke dalam golongan lipid *non-saponifiable* dari minyak bekatul. Lebih spesifik lagi, orizanol merupakan campuran senyawa ester asam ferulat dengan steroid/ triterpenoid alkohol. Berbagai jenis ester ferulat dari fraksi orizanol yang digunakan sebagai komponen utama yaitu cycloartenyl-ferulate, 24-methylenecycloartanyl-ferulate, sitosteryl-ferulate, dan campesteryl-ferulate [2]. Berdasarkan penelitian sebelumnya, dilaporkan bahwa orizanol memiliki kemampuan untuk menurunkan kadar lemak dalam darah terutama kolesterol total [3]. Salah satu mekanisme dalam pengaturan kadar kolesterol total dalam darah adalah dengan cara menghambat enzim



HMG-CoA reduktase. HMG-CoA reduktase merupakan salah satu enzim yang berperan dalam pembentukan kolesterol dan isoprenoid lainnya dalam tubuh melalui jalur mevalonate [4]. Namun, informasi tentang aktivitas dari turunan oryzanol sebagai penurun kadar kolesterol masih terbatas. Penelitian tentang turunan oryzanol dalam kaitannya sebagai kandidat penurun kadar kolesterol darah dengan menggunakan pendekatan penambatan molekular perlu dilakukan. Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan aktivitas penghambatan dari turunan oryzanol pada HMG-CoA reduktase melalui penambatan molekular

Metode

Persiapan Struktur Molekul HMG-CoA reduktase

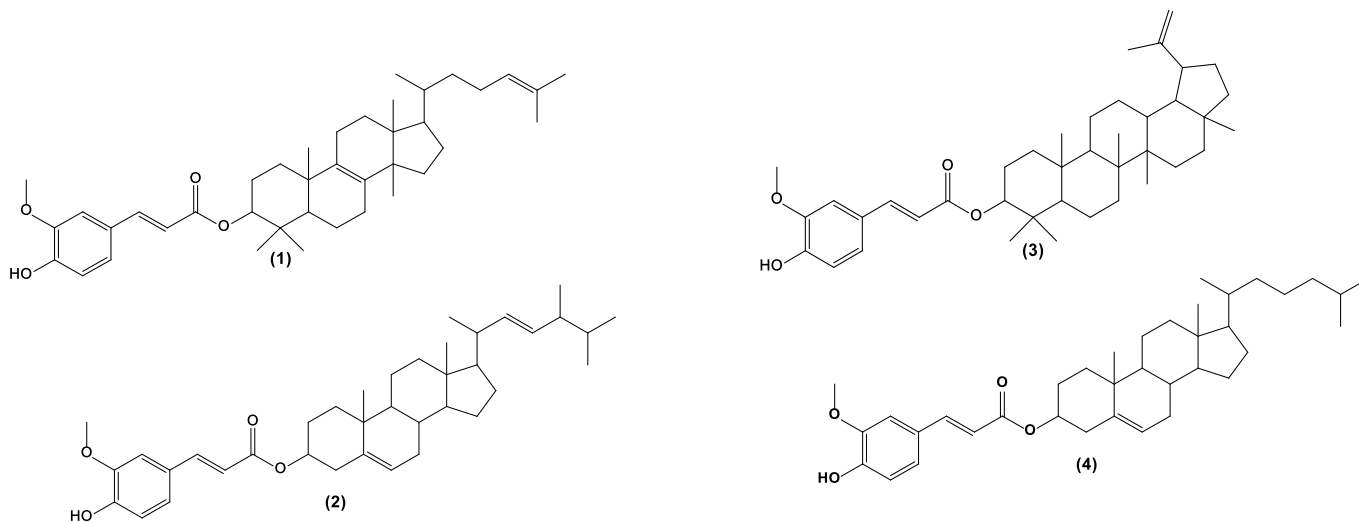
Berkas digital struktur kristal sinar-X molekul HMG-CoA reduktase diunduh dari bank data protein pada situs www.rcsb.org dengan kode identitas 1HW9. Struktur kristal tersebut selanjutnya dipersiapkan dengan perangkat lunak AutoDock Tools 1.5.6 (ADT) [5]. Tahapan persiapan struktur sebelum proses penambatan molekular diawali dengan pemisahan sub-unit rantai protein A dan B, ligan asli (simvastatin), dan pelarut dari struktur kristal. Struktur kristal dioptimasi dengan cara menambahkan atom hidrogen dan muatan Kollman.

Persiapan Struktur Ligan Uji

Empat buah struktur turunan oryzanol digunakan sebagai ligan uji yang akan ditambatkan pada protein target (**Gambar 1**). Struktur simvastatin dipilih sebagai ligan kontrol yang telah terbukti menghambat aktivitas dari enzim HMG-CoA reduktase [6]. Persiapan ligan uji diawali dengan mendesain struktur dua dimensi turunan oryzanol menggunakan perangkat lunak ChemBioDraw Ultra 12.0. Optimasi struktur geometri dilakukan menggunakan perangkat lunak ChemBio3D Ultra 12.0 dengan parameter MM2 dan AM1. Struktur tiga dimensi yang diperoleh kemudian dipersiapkan menggunakan perangkat lunak ADT [5] dengan cara menambahkan atom hidrogen dan muatan parsial Gestiger.

Penambatan Molekular

Perangkat lunak ADT [5] digunakan dalam penambatan molekular senyawa turunan oryzanol dengan enzim HMG CoA reduktase. Parameter *grid* yang digunakan dalam penelitian ini adalah pada dimensi 60 x 60 x 60 poin dengan jarak antara setiap poin adalah 0.375 Å. Pusat *grid box* diatur pada koordinat $x=3.981$; $y=-9.204$ dan $z=-11.326$. Parameter perhitungan penambatan yang digunakan adalah dengan algoritma Lamarckian. Proses penambatan pada setiap ligan uji dilakukan pengulangan, dengan setiap kali penambatan menghasilkan 10 konformasi.



Gambar 1. Struktur dua dimensi turunan oryzanol. (1) Lanosteryl-ferulate, (2) Brassicasteryl-ferulate, (3) Lupeol-ferulate, dan (4) Cholesteryl-ferulate.

Penambatan Molekular

Perangkat lunak ADT [5] digunakan dalam penambatan molekular senyawa turunan oryzanol dengan enzim HMG CoA reduktase. Parameter *grid* yang digunakan dalam penelitian ini adalah pada dimensi 60 x 60 x 60 poin dengan jarak antara setiap poin adalah 0.375 Å. Pusat *grid box* di atur pada koordinat $x=3.981$; $y=-9.204$ dan $z=-11.326$. Parameter perhitungan penambatan yang digunakan adalah dengan algoritma Lamarckian. Proses penambatan pada setiap ligan uji dilakukan pengulangan, dengan setiap kali penambatan menghasilkan 10 konformasi.

Analisis Data

Struktur rantai molekul dari HMG-CoA reduktase dan ligan hasil penambatan dibuka menggunakan perangkat lunak ADT [7] dan Discovery Studio digunakan untuk memvisualisasikan jarak dan interaksi hidrogen yang terjadi. Analisis hasil penambatan meliputi energi bebas ikatan dan ikatan hidrogen antara ligan dan protein target.

Hasil dan Pembahasan

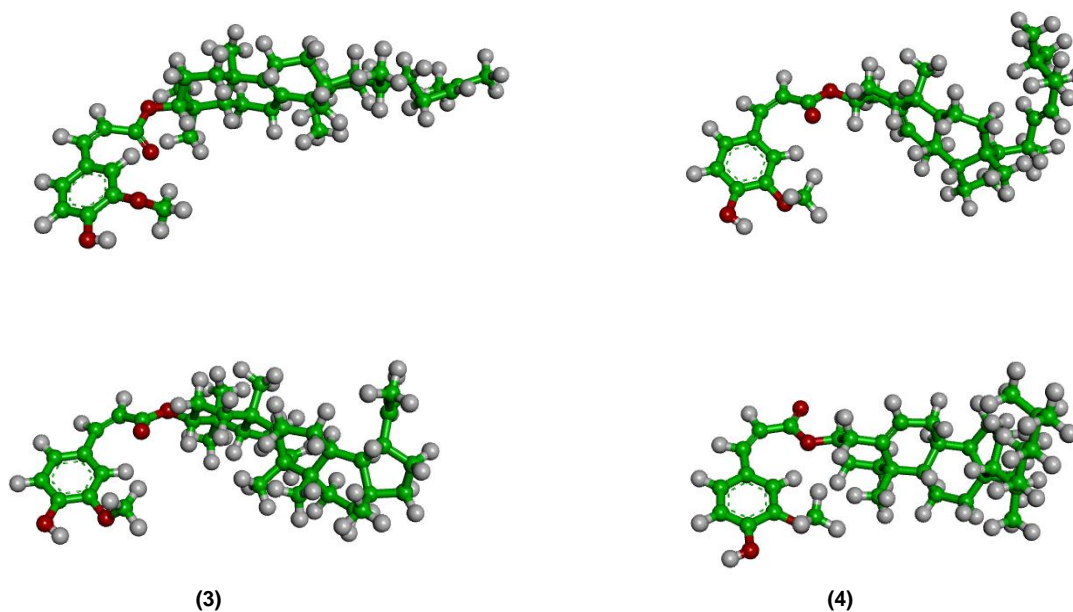
Tahap awal penelitian ini diawali dengan pengunduhan struktur molekul HMG-CoA reduktase dari bank data protein. Struktur dengan identitas 1HW9 memiliki 4 sub-unit (tetramer) yaitu sub-unit rantai A, B, C, dan D. Struktur 1HW9 ini dipilih karena merupakan enzim tetramer asli atau utuh, bukan hasil mutasi ataupun modifikasi. Pemilihan sub-unit rantai A dan B pada penelitian ini untuk memperoleh efisiensi waktu penambatan sebagaimana yang telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya [8].

Struktur dua dimensi ligan uji didesain seperti yang disajikan pada **Gambar 1**. Optimasi geometri didapatkan dari hasil optimasi seperti yang disajikan pada **Gambar 2**. Sebelum dilakukannya proses penambatan molekular, terlebih dahulu dilakukan validasi metode penambatan agar hasil yang diperoleh dapat diterima. Validasi metode penambatan dilakukan dengan cara penambatan ulang dari ligan yang terdapat dalam struktur kristal HMG-CoA reduktase. Penambatan ulang dilakukan dengan membandingkan posisi ligan simvastatin hasil penambatan terhadap sisi ikatan HMG-CoA reduktase dengan ligan asli seperti pada struktur kristal. Penilaian terhadap validasi didasarkan pada *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Nilai RMSD menunjukkan perbedaan posisi koordinat antara dua ligan (ligan pada

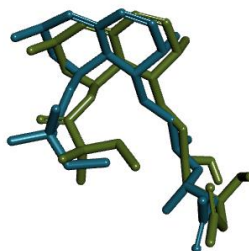
komplek kristal dan ligan hasil penambatan ulang). Semakin kecil nilai RMSD, maka posisi tumpang-tindih kedua ligan akan semakin mirip [8]. Nilai RMSD yang didapat pada penelitian yakni sebesar 1,50 Å dan hasil tumpang tindihnya seperti yang disajikan dalam **Gambar 3**. Hal ini menunjukkan metode penambatan menggunakan perangkat lunak ADT dengan parameter tersebut dapat dikatakan memiliki presisi dan akurasi yang dapat diterima.

Penelitian ini memperoleh hasil bahwa semua senyawa turunan oryzanol memiliki energi bebas ikatan yang lebih besar dari pada simvastatin. Hal ini menunjukkan bahwa semua senyawa turunan oryzanol memiliki afinitas yang lebih rendah pada sisi ikatan enzim HMG-CoA reduktase jika dibandingkan simvastatin. Berdasarkan hasil penelitian ini dimungkinkan potensi penghambatan semua senyawa turunan oryzanol dalam menurunkan kadar kolesterol tidak akan sebaik simvastatin. Turunan oryzanol juga berinteraksi dengan beberapa residu asam amino melalui ikatan hidrogen. Berdasarkan penelitian Istvan [6], telah digambarkan interaksi ligan asli (simvastatin) pada kompleks kristal enzim HMG-CoA reduktase. Residu asam amino SER684, ASP690, LYS691 dan LYS692 menjadi residu utama yang diduga berperan dalam proses penghambatan aktivitas pada sisi aktif. Oleh karena itu, senyawa turunan oryzanol yang memiliki interaksi dengan beberapa residu asam amino diprediksi dapat memberikan aktivitas penghambatan pada protein target.

Berdasarkan hasil penambatan molekular, jumlah ikatan hidrogen paling banyak terbentuk pada senyawa brassicasteryl-ferulate yaitu 4 ikatan hidrogen. Namun, pada nilai energi bebas ikatan paling tinggi dimiliki oleh senyawa lupeol-ferulate yang hanya membentuk 3 ikatan hidrogen. Penilaian terhadap penambatan lebih diutamakan pada hasil energi bebas ikatannya daripada penentuan jumlah ikatan hidrogennya. Hal ini dikarenakan nilai energi bebas ikatan merupakan kontribusi dari berbagai efek ikatan, efek-efek elektronik lain, dan nilai regresi yang terjadi selama proses penambatan. Secara eksperimental energi bebas ikatan (ΔG) berhubungan langsung dengan konstanta inhibisi. Oleh karena itu, penentuan nilai energi bebas ikatan dapat memprediksi kemampuan senyawa untuk menghambat kerja enzim [9]. Namun, penelitian lebih lanjut berupa eksperimen secara enzimatik masih diperlukan untuk meyakinkan dan membuktikan hasil prediksi tersebut.



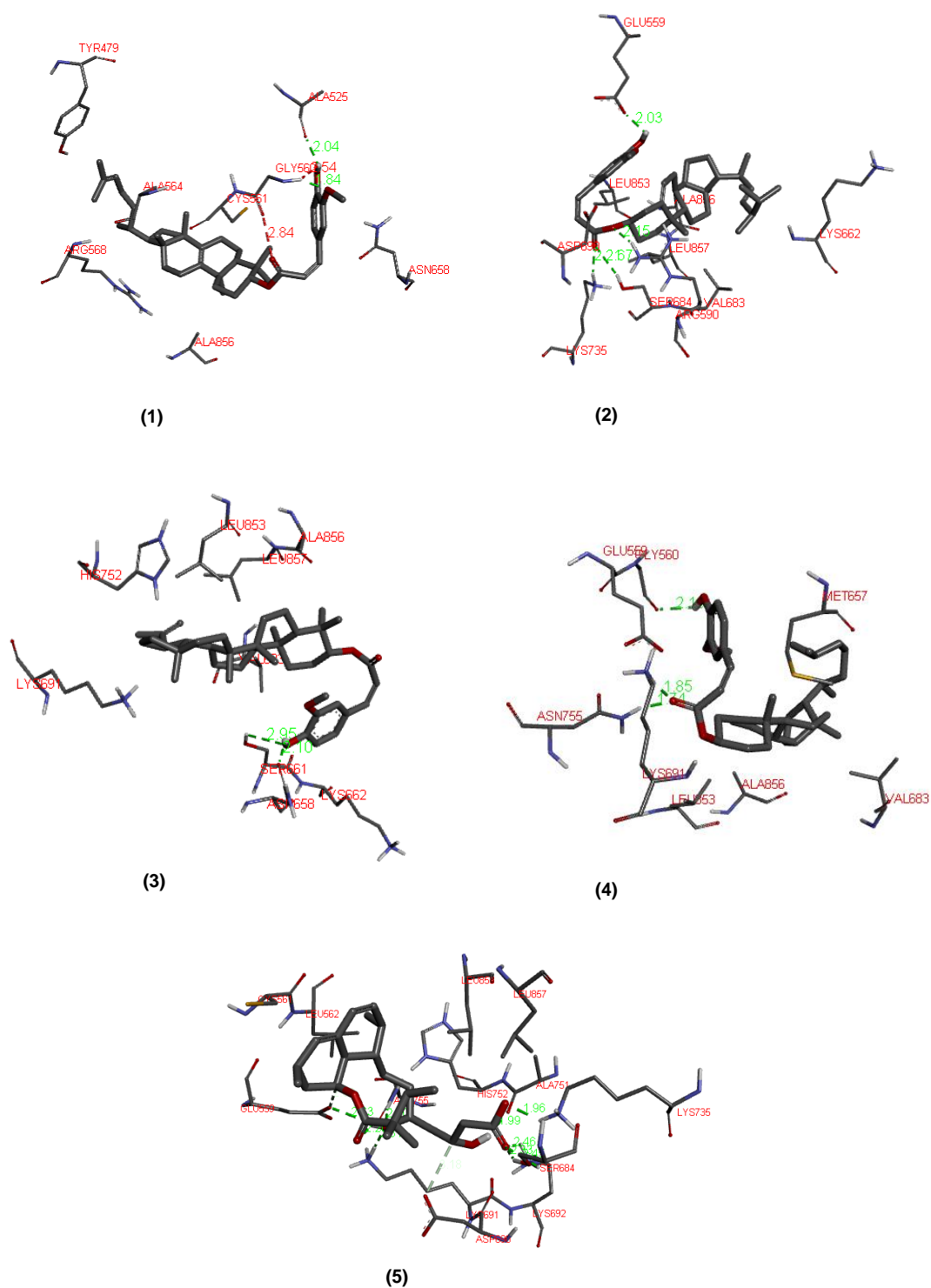
Gambar 2. Struktur tiga dimensi turunan orizanol hasil optimasi struktur. (1) Lanosteryl-ferulate, (2) Brassicasteryl-ferulate, (3) Lupeol-ferulate, dan (4) Cholesteryl-ferulate.



Gambar 3. Perbandingan konformasi ligan simvastatin dari struktur kristal kompleks (Biru) dan ligan simvastatin hasil penambatan ulang menggunakan perangkat lunak ADT (Hijau).

Tabel 1. Nilai energi bebas ikatan ligan uji hasil penambatan pada HMG-CoA reduktase(1HW9)

Ligan Uji	Energi Bebas Ikatan/ ΔG (kCal/mol)	Residu Asam Amino (Ikatan Hidrogen)
Lanosteryl-ferulate	-2.85	ALA525, GLY560
Brassicasteryl-ferulate	-3.36	GLU559, ARG590, SER684, LYS735
Lupeol-ferulate	-3.91	SER661, LYS691, HIS752
Cholesteryl-ferulate	-2.58	GLY560, LYS691, ASN755
Simvastatin	-4.68	GLU559, ALA751, LYS691, SER684, LYS692, LYS735, ASN755



Gambar 4. Visualisasi interaksi hidrogen ligan uji terhadap HMG-CoA reduktase(1HW9). (1) Lanosteryl-ferulate, (2) Brassicasteryl-ferulate, (3) Lupeol-ferulate, (4) Cholesteryl-ferulate, dan (5) Simvastatin.

Kesimpulan

Dari keempat senyawa turunan orizanol yang didesain, semuanya memiliki afinitas pengikatan terhadap enzim HMG-CoA reduktase. Semua turunan orizanol dimungkinkan akan memberikan hambatan terhadap enzim HMG-CoA reduktase. Lupeol-ferulate diprediksi akan memberikan aktivitas penghambatan terhadap HMG-CoA reduktase yang lebih baik jika dibandingkan dengan senyawa turunan orizanol lainnya.

Konflik Kepentingan

Tidak ada konflik kepentingan dalam penelitian ini

Penghargaan

Penelitian ini didanai oleh hibah penelitian ITERA SMART tahun 2018 dengan nomor kontrak SK 134ac/IT9.C1/PP/2018.

Pustaka

- [1] A. Oda, M. Okayasu, Y. Kamiyama, T. Yoshida, O. Takahashi, dan H. Matsuzaki, "Evaluation of Docking Accuracy and Investigations of Roles of Parameters and Each Term in Scoring Functions for Protein – Ligand Docking Using ArgusLab Software," *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 80, no. 10, hal. 1920–1925, 2007.
- [2] C. C. Spiazzi, V. Manfredini, F. E. B. da Silva, E. M. M. Flores, A. P. Izaguirry, L. M. Vargas, M. B. Soares, dan F. W. Santos, "Oryzanol protects against acute cadmium-induced oxidative damage in mice testes," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 55, hal. 526–532, 2013.
- [3] P. Chandrashekar dan P. K. P. Kumar, "Hypolipidemic effect of oryzanol concentrate and low temperature extracted crude rice bran oil in experimental male wistar rats," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 51, no. 7, hal. 1278–1285, 2014.
- [4] M. H. Puttananjaiah, M. A. Dhale, V. Gaonkar, dan S. Keni, "Statins : 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) Reduktase Inhibitors Demonstrate Anti-Atherosclerotic Character due to Their Antioxidant Capacity," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 163, no. 2, hal. 215–222, 2011.
- [5] R. Huey, G. M. Morris, dan S. Forli, "Using autodock 4 and autodock vina with autodocktools : a tutorial." The Scripps Research Institute, California, 2012.
- [6] E. S. Istvan dan J. Deisenhofer, "Structural mechanism for statin inhibition of hmg-coa reductase," 2001.
- [7] O. Trott dan A. J. Olson, "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading," *J. Comput. Chem.*, vol. 31, no. 2, hal. 455–461, 2010.
- [8] K. A. Hafidz, N. Puspitasari, A. Yanuar, Y. Artha, dan A. Mun'im, "HMG-CoA Reductase Inhibitory Activity of Gnetum gnemon Seed Extract and Identification of Potential Inhibitors for Lowering Cholesterol Level," *J. Young Pharm.*, vol. 9, no. 4, hal. 559–565, 2017.
- [9] R. E. Kartasamita, R. Herowati, N. Harmastuti, dan T. Gusdinar, "Quercetin Derivatives Docking Based on Study of Flavonoids Interaction to Cyclooxygenase-2," *Indones. J. Chem.*, vol. 9, no. 2, hal. 297–302, 2009.