

## STUDI *IN SILICO* SENYAWA AKTIF MINYAK IKAN TINDARUNG SEBAGAI PENURUN KOLESTEROL MELALUI INHIBITOR HMG-KoA

Christhalia Rumalutur<sup>1)\*</sup>, Putri Pani<sup>2)</sup>, Deshanda Prayoga<sup>3)</sup>, Alda Lopian<sup>4)</sup>, Brigita Goni<sup>5)</sup>,  
Fatimawali<sup>6)</sup>, Irma Antasionasti<sup>7)</sup>

<sup>1)</sup>Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi

\*christhaliaiewanda@gmail.com

### ABSTRACT

*Tindarung fish oil contains omega-3 fatty acids, namely DHA and EPA. Therefore, tindarung fish oil has the potential to be developed as a cholesterol drug. This study aims to determine the activity of HMG-CoA reductase from fatty acids of tindarung fish oil using an in silico study with molecular docking. The receptor used was the enzyme HMG-CoA reductase (PDB ID: 1HW9) with the native ligand simvastatin prepared using YASARA. The fatty acid compounds were drawn using MarvinSketch at pH 7.4 with 10 confirmations. In the molecular anchoring process, the PLANTS program was used and visualized in 2D with Discovery Studio Visualizer and in 3D with Pymol. The native ligand showed a docking value of -76.4052. Compounds 1,2,3,8,11, and 12 had relative values for simvastatin >95%. These compounds have molecular anchoring activity similar to simvastatin so it's predicted to be able to reduce cholesterol levels by inhibiting the HMG-CoA reductase enzyme.*

**Keywords:** *Tindarung fish, fish oil, DHA, EPA*

### ABSTRAK

Minyak ikan tindarung mengandung asam lemak omega-3 yaitu DHA dan EPA. Oleh karena itu, minyak ikan tindarung berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat penurun kolesterol. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas HMG-KoA reduktase dari asam lemak minyak ikan tindarung menggunakan uji secara studi *in silico* dengan penambatan molekul (*molecular docking*). Reseptor yang digunakan adalah enzim HMG-KoA reduktase (PDB ID: 1HW9) dengan ligan native simvastatin yang dipreparasi menggunakan YASARA. Senyawa asam lemak digambar menggunakan MarvinSketch pada pH 7,4 dengan 10 bentuk konformasi. Pada proses penambatan molekul digunakan program PLANTS dan divisualisasi secara 2D dengan Discovery Studio Visualizer dan secara 3D dengan Pymol. Ligan native menunjukkan nilai docking -76,4052. Senyawa 1,2,3,8,11, dan 12 memiliki nilai relatif terhadap simvastatin >95%. Senyawa-senyawa tersebut memiliki aktivitas penambatan molekul yang mirip dengan simvastatin sehingga diprediksikan mampu menurunkan kadar kolesterol dengan penghambat enzim HMG-KoA reduktase.

**Kata kunci:** Ikan tindarung, minyak ikan, DHA, EPA

## Pendahuluan

Di negara berkembang seperti Indonesia, angka kejadian penyakit tidak menular (PTM) meningkat dengan sangat pesat (Suci dan Adnan, 2020). Kolesterol merupakan salah satu penyakit tidak menular (PTM) dengan angka kematian tertinggi ketiga di dunia. Kadar kolesterol darah yang tinggi merupakan faktor resiko utama terjadinya penyakit kardiovaskuler seperti jantung coroner (PJK), hipertensi dan stroke (Yunarto *et al.*, 2019).

HMG KoA reduktase merupakan enzim kunci yang berperan dalam mensintesis kolesterol didalam hati. Obat-obat sintentis yang bermanfaat dalam penghambat enzim 3-hidroksi-3-metilglutaril (HMG) KoA reductase adalah obat golongan statin. Obat golongan statin merupakan obat “*first line therapy*” yang digunakan pada pasien untuk menurunkan kadar kolesterol (Sulistiyani *et al.*, 2017).

Ikan tindarung merupakan ikan yang termasuk dalam *tuna-like-species* dan merupakan jenis ikan yang paling banyak ditemukan di perairan di Sulawesi Utara. Mengonsumsi daging ikan tindarung yang kaya akan omega-3 dapat menurunkan kadar lemak dalam darah, sehingga menurunkan resiko penyakit jantung (Inara, 2020). Pengolahan dan pemanfaatan minyak ikan dari daging ikan tindarung belum dimaksimalkan.

Minyak ikan mengandung banyak nutrisi penting yang dibutuhkan oleh tubuh manusia. Minyak ikan mengandung sekitar 25% asam lemak jenuh dan 75% asam lemak tak jenuh. Contoh asam lemak tak jenuh atau *polyunsaturated fatty acid* (PUFA), diantaranya adalah DHA (*Docosahexanoic acid*) dan EPA (*Eicosapentaenoic acid*) (Pandiangan *et al.*, 2019). Asam-asam lemak ini (DHA dan EPA) mempunyai fungsi biologis yang dapat meningkatkan kesehatan otak, penglihatan (mata) dan mencegah penyakit pembuluh darah (aterosklerosis) (Megasanti *et al.*, 2020). Secara farmakologis minyak ikan omega-3 dapat mengatasi kadar kolesterol yang tinggi dalam darah. Salah satu mekanisme dalam menghambat pembentukan kolesterol yaitu dengan penghambatan sintesis kolesterol melalui enzim HMG-KoA (Yunarto *et al.*, 2019).

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk melihat dan memprediksikan aktivitas penghambatan enzim melalui pengujian *in silico*. Salah satu PDB ligan native turunan statin yang digunakan untuk berikatan dengan enzim HMG-KoA adalah PDB: 1HW9 yang merupakan ligan simvastatin.

Berdasarkan uraian tersebut maka penelitian ini mengarah pada pencarian senyawa-senyawa yang terkandung dalam minyak ikan tindarung yang berpotensi sebagai inhibitor HMG-KoA melalui uji secara *in silico*.

## Metode Penelitian

Penelitian dilakukan di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi Manado pada bulan November 2022 hingga Januari 2023. Alat yang digunakan adalah Laptop Acer Intel® Core I3 Gen10, CPU(@1,2GHz TurboBoost up to 3,5GHz), RAM (Random Access Memory) 4 gigabyte dan Garphic Card (Intel UHD Graphics G1). Laptop terhubung dengan internet.

Bahan yang digunakan adalah Struktur 2D dari HMG-KoA reduktase diunduh dari situs Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) dengan PDB ID : 1HW9 dan Struktur dua dimensi ligan yaitu senyawa-senyawa minyak ikan tindarung yang diperoleh dari hasil GC-MS Rumalutur *et al* (2022). Diunduh dari situs PubChem (<http://PubChem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Preparasi reseptor dan ligan native dilakukan dengan mengunduh enzim HMG-KoA reductase dari <https://www.rcsb.org> (PDB ID: 1HW9) dalam format \*.pdb (rantai A) yang kemudian dihilangkan molekul air serta natif ligannya menggunakan aplikasi YASARA versi 19.7.20 (Lisensi dari Hari Purnomo) dan disimpan dalam format \*.mol2. Ligan native (simvastatin) diperoleh dengan menghilangkan protein dan molekul air dan disimpan dalam bentuk \*.mol2 (Purnomo, 2013).

minyak ikan tindarung digambar kembali dan dilakukan optimasi geometri dengan energi rendah masing-masing pada setiap senyawa sebanyak 10 bentuk dan diatur pada pH 7,4 menggunakan aplikasi MarvinSketch 16.8.8 (trial version) yang disimpan sebagai ligand dengan format \*.mol2.

Penambatan molekul senyawa aktif dan natif ligan dilakukan menggunakan program PLANTS versi 1.1. Nilai penambatan atau skor docking ditentukan berdasarkan bestranking dari hasil *molecular docking* (Purnomo, 2013). Struktur ikatan antara protein dan ligan hasil penambatan dengan skor terkecil digabungkan menggunakan aplikasi YASARA dan disimpan dalam format \*.pdb yang kemudian divisualisasi secara 2D dengan aplikasi Discovery Studio Visualizer untuk melihat interaksi residu asam amino dan secara 3D menggunakan aplikasi PyMOL. Penentuan % relatif dihitung berdasarkan (Normaidah and Nurmansyah, 2021) yaitu perhitungan ligan uji terhadap ligan native dengan persamaan berikut:

$$\% \text{ relatif} = \frac{\text{skor docking ligan uji}}{\text{skor docking ligan native}} \times 100\%$$

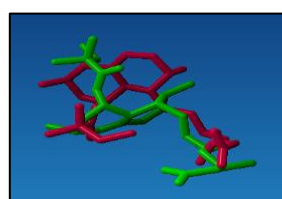
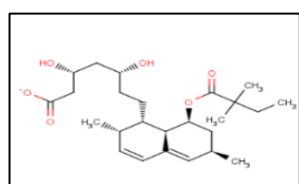
**Tabel 1.** Senyawa Minyak Ikan Tindarung Hasil GCMS

No. Puncak	Waktu Retensi	Nama Senyawa	% relatif kadar asam lemak
59	41.00	DHA	7.10
73,44	45.23, 37.80	EPA	1.06
35	35.09	9-octadecenoic acid, methyl ester	37.18
24	31.72	Hexadecanoic acid, 2-methyl	18.46
23	31.20	(Z)-Methyl hexadec-11-enoate	6.27
36	35.45	Heptadecanoic acid, methyl ester	5.86
13	27.44	Tridecanoic acid, methyl ester	2.71
60	41.20	Ethyl 6,9,12,15,18-heneicosapentaenoate	2.79
29	33.06	Methyl 8-heptadecenoate	1.46
31	33.51	Hexadecanoic acid, 15-methyl	1.08
47	38.45	Cis-methyl-11-eicosenoate	4.44
77	46.87	Cis-15-tetracosenoic acid, propyl ester	1.34

## Hasil dan Pembahasan

### Validasi Ligan Simvastatin dan Penambatan Molekul

Reseptor yang diunduh ini masih terikat dengan molekul air sehingga dibersihkan sebelum melakukan penambatan karena molekul air dapat mengganggu proses penambatan. Molekul air menyebabkan waktu penambatan semakin kompleks dan lama (Robert, 2008). Hasil penambatan molekul reseptor HMG-KoA reduktase (PDB ID: 1HW9) dengan ligan natif menunjukkan nilai docking -76,4052 (Gambar 1). Senyawa yang digunakan dalam penambatan adalah senyawa-senyawa dengan persen relatif terhadap asam lemak tertinggi. Penambatan semua ligan uji dengan enzim HMG-KoA reduktase dilakukan pada pH 7,4 karena pH ini sesuai dengan pH darah pada manusia.



**Gambar 1.** Struktur

(A), Visualisasi validasi native ligan (hijau) dan ref\_ligand (merah) (B)

senyawa pada pH 7,4

**Tabel 2.** Hasil penambatan molekul senyawa minyak ikan tindarung terhadap reseptor HMG-KoA reductase

Nama senyawa	Kode senyawa	Skor Docking	% relatif terhadap ligan native
<b>DHA</b>	<b>1</b>	<b>-75,4976</b>	<b>98,81</b>
<b>EPA</b>	<b>2</b>	<b>-72,6515</b>	<b>95,08</b>
<b>9-octadecenoic acid, methyl ester</b>	<b>3</b>	<b>-76,3529</b>	<b>99,93</b>
Hexadecanoic acid, 2-methyl	4	-68,3792	89,49
(Z)-Methyl hexadec-11-enoate	5	-71,2787	93,29
Heptadecanoic acid, methyl ester	6	-71,2986	93,31
Tridecanoic acid, methyl ester	7	-63,3427	82,90
<b>Ethyl 6,9,12,15,18-heneicosapentaenoate</b>	<b>8</b>	<b>-77,6810</b>	<b>101,67</b>
Methyl 8-heptadecenoate	9	-70,0842	91,73
Hexadecanoic acid, 15-methyl	10	-71,4683	93,54
<b>Cis-methyl-11-eicosenoate</b>	<b>11</b>	<b>-76,5133</b>	<b>100,14</b>
<b>Cis-15-tetracosenoic acid, propyl ester</b>	<b>12</b>	<b>-86,8198</b>	<b>113,63</b>

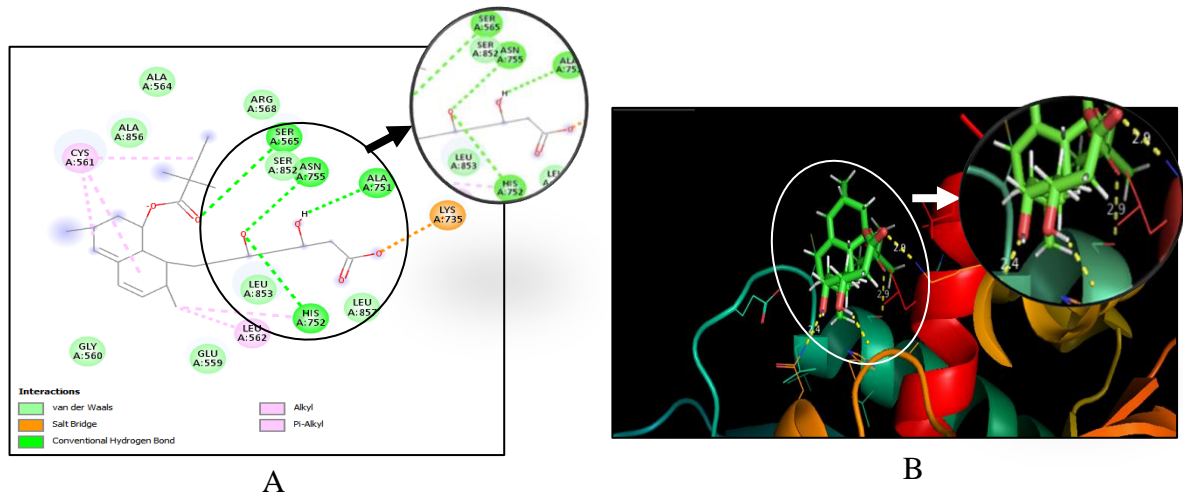
Berdasarkan **Tabel 2**, senyawa 1,2,3,8,11, dan 12 memiliki nilai penambatan docking terbesar yaitu masing-masing sebesar -75,4976; -72,6515; -76,3529; -77,6810; -76,5133; -86,8198 dengan persen relatif terhadap simvastatin sebesar >95%. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tersebut memiliki aktivitas penghambatan kolesterol yang mirip dengan simvastatin. *Molecular docking* akan menghasilkan senyawa dengan konformasi tertentu yang memiliki energi ikatan paling rendah untuk berikatan dengan protein target. Nilai energi ikatan (skor *docking*) menunjukkan kekuatan ikatan (afinitas) antara senyawa uji dengan protein target (Susanti *et al.*, 2019). Semakin rendah skor *docking*, maka energi afinitasnya semakin rendah sehingga kestabilan ikatan protein dan ligan lebih tinggi. Selain itu, skor *docking* dapat memprediksikan kemampuan senyawa untuk menghambat kerja enzim.

### Analisis dan Visualisasi

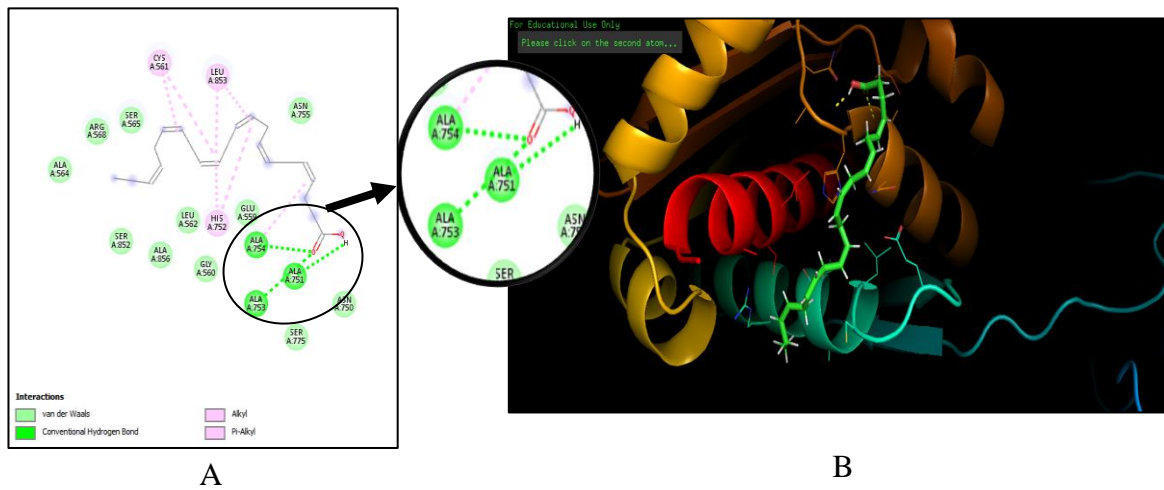
Analisa hasil penambatan molekul pada penelitian ini meliputi nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) dan interaksi ligan dengan residu reseptor menggunakan Biovia Discovery Studio Visualizer dan PyMOL.

Analisa hasil penambatan molekul pada penelitian ini meliputi nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) dan interaksi ligan dengan residu reseptor menggunakan Biovia Discovery Studio Visualizer dan PyMOL. Besarnya nilai RMSD yang umumnya digunakan sebagai nilai standar dalam penambatan molekul yaitu <2.00Å karena semakin kecil nilai RMSD maka semakin kecil pula kesalahan yang terjadi (Daisy *et al.*, 2013). Pada validasi dengan ref\_ligand menunjukkan nilai RMSD yaitu 0Å.

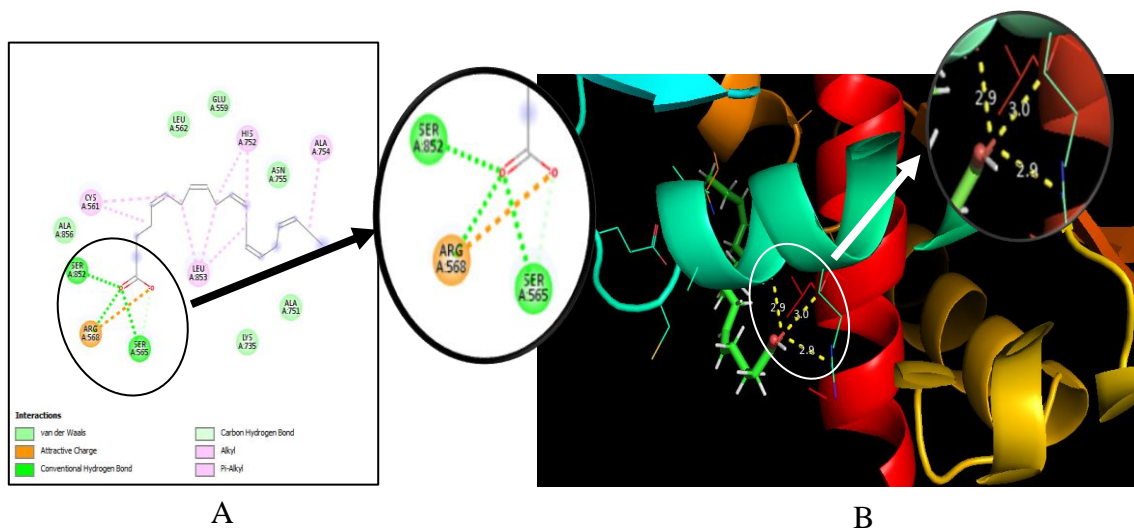
Hasil visualisasi 2 dimensi (2D) dan 3 dimensi (3D) dari interaksi ligan natif enzim HMG-COA reductase dengan ligan uji senyawa 1,2,3,8,11, dan 12 dapat dilihat pada **Gambar 2- Gambar 8**.



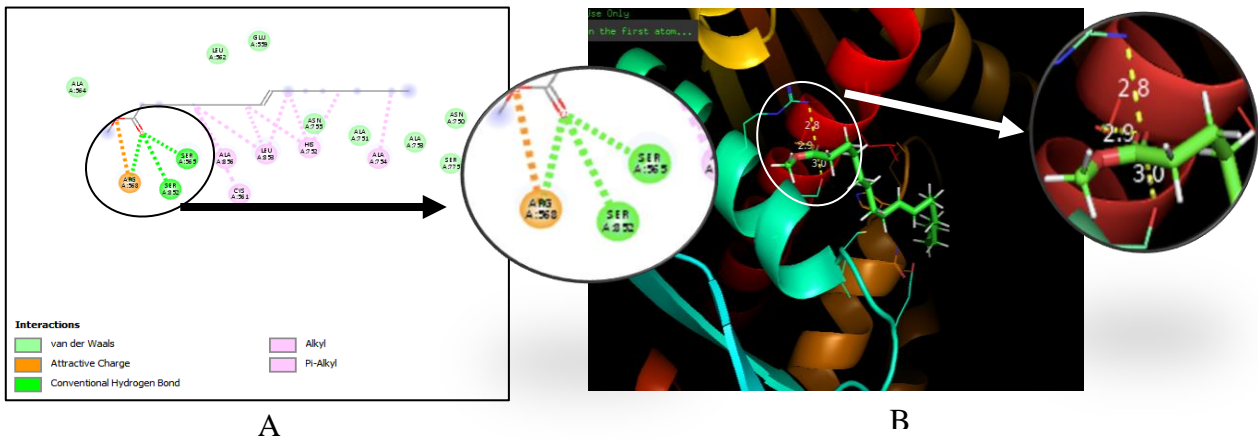
Gambar 2. Visualisasi ligan native secara 2D (A) dan 3D (B)



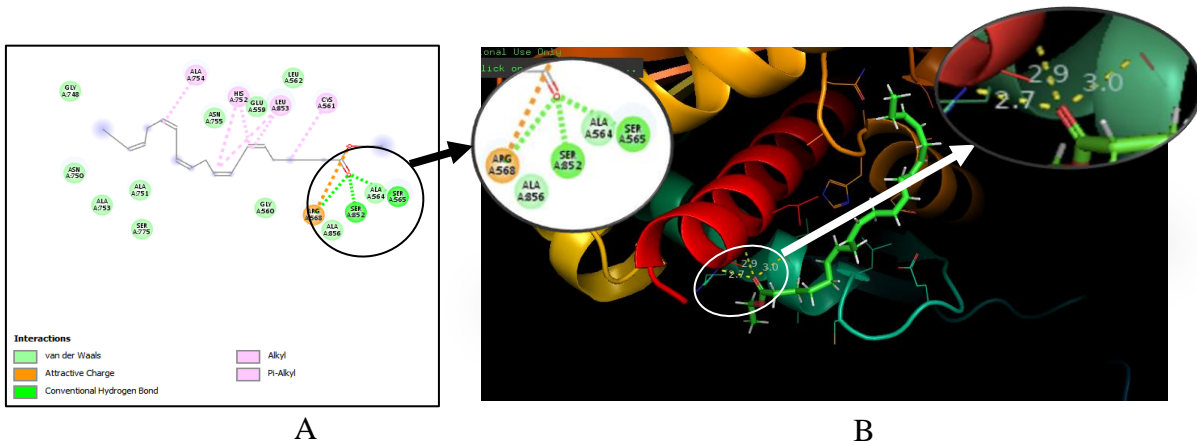
Gambar 3. Visualisasi senyawa DHA secara 2D (A) dan 3D (B)



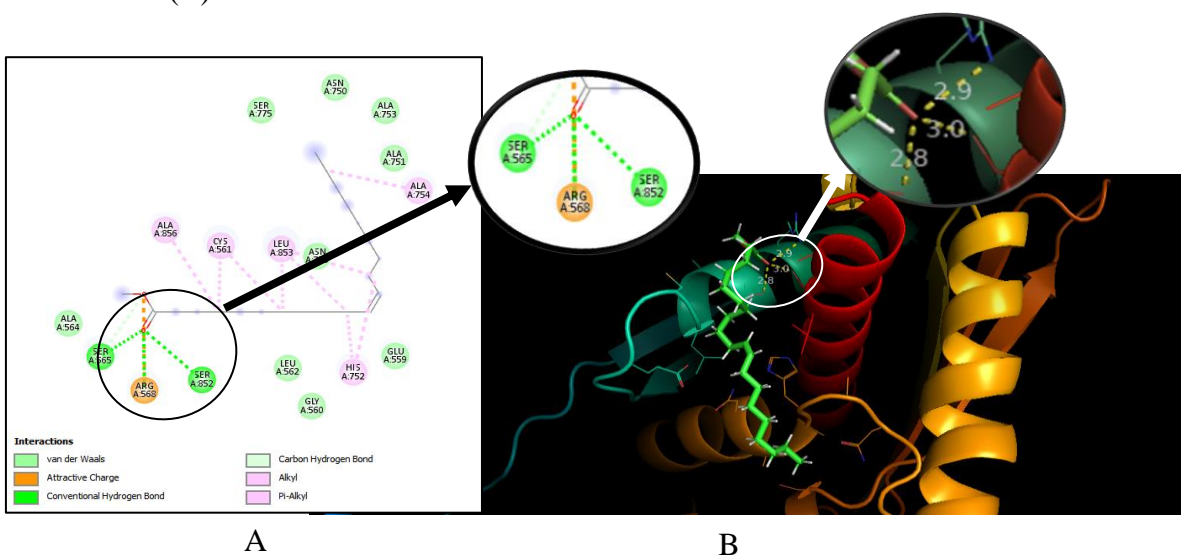
Gambar 4. Visualisasi senyawa EPA secara 2D (A) dan 3D (B)



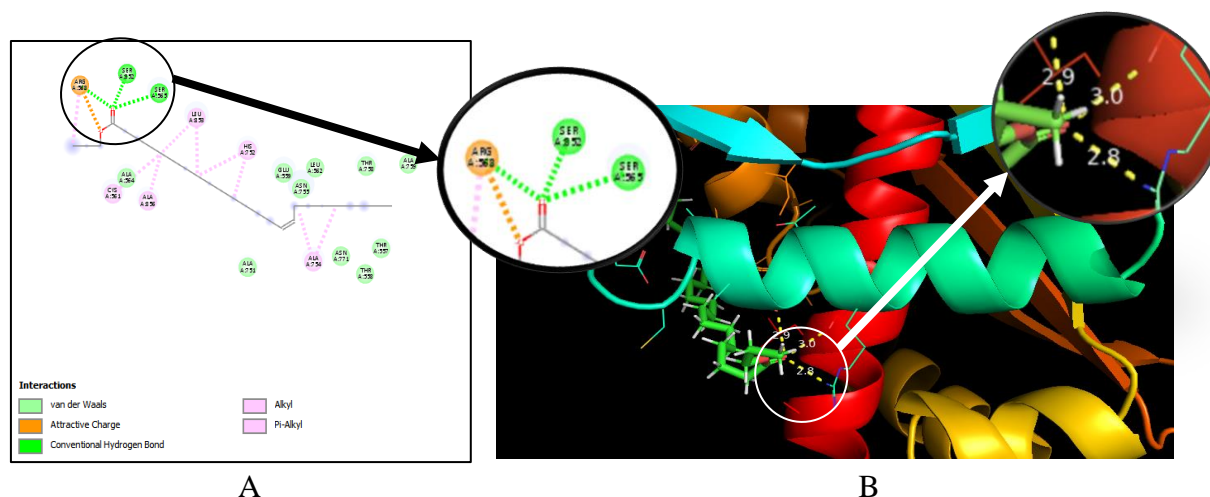
**Gambar 5.** Visualisasi senyawa *9-octadecenoic acid, methyl ester* secara 2D (A) dan 3D (B)



**Gambar 6.** Visualisasi senyawa *Ethyl 6,9,12,15,18-heneicosapentaenoate* secara 2D (A) dan 3D (B)



**Gambar 7.** Visualisasi senyawa *Cis-methyl-11-eicosenoate* secara 2D (A) dan 3D (B)



**Gambar 8.** Visualisasi senyawa *Cis-15-tetracosanoic acid, prophyll ester* secara 2D (A) dan 3D (B)

Berdasarkan residu asam-asam amino yang didapatkan dari setiap ligan uji, terdapat residu asam amino yang sama dengan ligan native yaitu pada ikatan hidrogen residu asam amino Ala-A:751 untuk ligan uji DHA dan Ser-A:565 untuk ligan uji EPA, *9-octadecenoic acid, methyl ester, Ethyl 6,9,12,15,18-heneicosapentaenoate, Cis-methyl-11-eicosenoate, Cis-15-tetracosanoic acid, prophyll ester*. Residu asam amino yang sama dengan simvastatin menandakan bahwa hasil docking telah sesuai atau dengan kata lain senyawa-senyawa tersebut memiliki efek yang sama dengan simvastatin.

Pada visualisasi 3D menunjukkan jarak interaksi antara ligan dengan enzim HMG-KoA. Jarak interaksi untuk native ligan berjarak 2,4Å; 2,9Å; 2,9Å (**Gambar 2**). Pada senyawa EPA jarak interaksinya berjarak 2,9Å; 2,9Å; 3,0Å (**Gambar 4**). Pada senyawa *9-octadecenoic acid, methyl ester* jarak interaksinya berjarak 2,8Å; 2,9Å; 3,0Å (**Gambar 5**). Pada senyawa *Ethyl 6,9,12,15,18-heneicosapentaenoate* jarak interaksinya berjarak 2,7Å; 2,9Å; 3,0Å (**Gambar 6**). Senyawa *Cis-methyl-11-eicosenoate* jarak interaksinya berjarak 2,8Å; 2,9Å; 3,0Å (**Gambar 7**). Senyawa *Cis-15-tetracosanoic acid, prophyll ester* jarak interaksinya berjarak 2,8Å; 2,9Å; 3,0Å (**Gambar 8**). Seluruh senyawa memiliki jarak interaksi yang kurang dari 3,0Å, hal ini menunjukkan bahwa ikatan tersebut kuat dan stabil.

### Kesimpulan

Kandungan asam-asam lemak yang terdapat dalam minyak ikan tinarung mampu menurunkan kadar kolesterol melalui jalur penambatan enzim HMG-KoA reduktase dengan %relatif terhadap simvastatin > 95% yang menandakan senyawa-senyawa tersebut memiliki aktivitas penghambatan kolesterol yang mirip dengan simvastatin.

### Ucapan Terima Kasih

1. Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi yang telah mendanai penelitian saya
2. PUI-PT Pusat Studi Bioteknologi dan Konservasi Kawasan Wallacea, LPPM, Universitas Sam Ratulangi yang telah mendanai penelitian saya.

### Daftar Pustaka

Daisy P., Nivedha R., Bakiya R., 2013. In Silico Drug Designing Approach For Biotin Protein Ligase Of Mycobacterium Tuberculosis. *Asian J. Pharm.* 6(1): 103-107.

- Inara, C. 2020. Manfaat Asupan Gizi Ikan Laut Untuk Mencegah Penyakit Dan Menjaga Kesehatan Tubuh Bagi Masyarakat Pesisir. *Jurnal Kalwedo Sains*, 1(2):92–95.
- Megasanti, N. M., Pontoh, J. and Koleangan, H. S. J. 2020. Pengayaan Asam Lemak Omega-3 Dari Minyak Ikan Tuna (*Thunnus sp.*) Di Sulawesi Utara. *Chemistry Progress*. 13(2): 96-101.
- Pandiangan, M., Kaban, J., Wirjosentono, B. and Silalahi, J. 2019. Analisis Kandungan Asam Lemak Omega 3 dan Omega 6 pada Minyak Ikan Mas (*Cyprinus Carpio*). *Talenta Conference Series: Science and Technology (ST)*, 2(1): 37–44.
- Purnomo, H. 2013. *Kimia Komputasi Uji In Silico Senyawa Antikanker*. Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Robert, Benjamin dan Ricardo L Mancera. 2008. Ligand–Protein Docking with Water Molecules. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 48(2):397-408.
- Suci, L dan Adnan, N. 2017. Hubungan Kadar Kolesterol Tinggi (Hiperkolesterol) Dengan Kejadian Hipertensi Derajat 1 Pada Pekerja di Bandara Soekarno Hatta Tahun 2017. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*. 10(2):97-104.
- Sulistiyani, S., Sari, R., Triwahyuni, W. 2017. Eksplorasi Tumbuhan Obat Hutan Berkhasiat Inhibitor HMG-KoA Reduktase. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kayu Tropis*. 15(2): 141-154.
- Susanti, N., Laksmiani, N., Noviyanti, N., Arianti, K., Duantara, I. 2019. *Molecular Docking Terpinen-4-ol Sebagai Antiinflamasi Pada Arteriosklerosis Secara In Silico*. *Journal Of Chemistry*. 13(2):221-228.
- Yunarto, N., Aini, N., Oktoberia, I., Sulistyowati, I., Kurniatri, A. 2019. Aktivitas Antioksidan serta Penghambatan HMG CoA dan Lipase dari Kombinasi Ekstrak Daun Binahong-Rimpang Temu Lawak. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. 9(2): 89–96.