

## ABSTRAK

# ISOLASI SENYAWA ANTIHIPERKOLESTEROLEMIA DARI BEKATUL DAN KAJIAN SENYAWA ANALOG ORIZANOL SEBAGAI PENGHAMBAT HMG-KOA REDUKTASE

Oleh  
**Syaikhul Aziz**  
**NIM: 30715004**  
**(Program Studi Doktor Farmasi)**

Bekatul adalah lapisan terluar dari beras dan merupakan produk samping yang diperoleh selama penggilingan padi. Lapisan tersebut kaya akan kandungan nutrisi makro dan mikro yang bermanfaat untuk kesehatan. Orizanol yang terdapat dalam bekatul telah diketahui sebagai senyawa bioaktif utama, yang bertanggung jawab terhadap berbagai aktivitas biologinya, meliputi antioksidan, antimikroba, antialergi, antikarsinogenik, antidiabetes, antiinflamasi, dan antihiperkolesterolemia. Khususnya untuk aktivitas antihiperkolesterolemia, orizanol menunjukkan hasil yang menjanjikan, sehingga menjadikan potensial untuk dikembangkan. Akan tetapi, yang menjadi tantangan berikutnya adalah mendapatkannya dalam jumlah banyak, mengingat bekatul mengandung orizanol yang jumlahnya relatif kecil dan metode isolasinya yang juga tidak mudah.

Penelitian ini memiliki dua tujuan utama. Tujuan pertama adalah untuk mendapatkan senyawa aktif antihiperkolesterolemia dari bekatul. Tujuan kedua adalah untuk mengkaji senyawa analog orizanol, ergosteril ferulat, dalam menghambat aktivitas HMG-KoA reduktase melalui beberapa tahapan, yaitu kajian secara *in silico* terhadap HMG-KoA reduktase, sintesis, dan pengujian *in vitro* terhadap aktivitas penghambatan HMG-KoA reduktase.

Senyawa aktif antihiperkolesterolemia diperoleh berdasarkan kajian aktivitas antihiperkolesterolemia pada model tikus uji. Tahap tersebut diawali dengan ekstraksi pelarut panas menggunakan metode refluks dengan pelarut tunggal dan biner, yaitu n-heksana, kloroform, etil asetat, diklorometana, isopropanol, aseton, n-heksana - etil asetat (1:1, v/v), kloroform - etil asetat (1:1, v/v), dan n-heksana - isopropanol (1:1, v/v). Ekstrak yang dipilih untuk fraksinasi lebih lanjut berdasarkan karakteristik ekstrak yang memiliki kandungan orizanol terbanyak. KLT densitometri digunakan untuk menganalisis secara kuantitatif kandungan orizanol total dalam berbagai ekstrak. Model tikus hiperkolesterol diinduksi dengan cara pemberian intragastrik 0,5 ml/100 g berat badan campuran 2% kolesterol, 1% asam kolat, dan 0,6% propiltiourasil dalam minyak yang diberikan selama 30 hari. Terhadap fraksi yang dapat menurunkan kolesterol total, selanjutnya dilakukan serangkaian metode pemisahan dan pemurnian menggunakan teknik kromatografi. Struktur senyawa yang terisolasi ditentukan berdasarkan data spektrum RMI satu

dimensi ( $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$ ) dan dua dimensi (HSQC dan HMBC). Kajian senyawa analog orizanol dalam menghambat aktivitas HMG-KoA reduktase diawali dengan simulasi penambatan molekul senyawa ergosteril ferulat menggunakan perangkat lunak *AutoDockTools* untuk memprediksi interaksi senyawa tersebut dengan HMG-KoA reduktase. Di samping itu, empat senyawa utama orizanol yaitu 24-metilen sikloartenil ferulat, sikloartenil ferulat, sitosteril ferulat, dan kampesteril ferulat digunakan untuk perbandingan. Senyawa ergosteril ferulat dan sitosteril ferulat disintesis dalam empat tahapan, di antaranya: asetilasi senyawa asam ferulat, pembentukan asil klorida, konjugasi struktur ferulat dengan steroid/triterpenoid alkohol, dan deproteksi gugus asetil. Pemantauan produk hasil sintesis dari setiap tahapan dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis. Struktur kimia dari hasil sintesis ditentukan berdasar data spektrum RMI satu dimensi dan dua dimensi. Terakhir, ergosteril ferulat dan sitosteril ferulat dievaluasi aktivitas penghambatannya terhadap HMG-KoA reduktase menggunakan kit pengujian komersial.

Hasil uji pendahuluan menunjukkan bahwa semua pelarut organik mampu mengekstraksi orizanol, dengan kandungan orizanol berkisar antara  $27,92 \pm 4,45$  sampai  $43,59 \pm 3,36$  mg/100 g bekatul. n-Heksana diketahui sebagai pelarut terbaik dalam mengekstrak orizanol menggunakan metode refluks ( $43,59 \pm 3,36$  mg/100 g bekatul). Oleh sebab itu, ekstrak n-heksana dipilih untuk fraksinasi dan evaluasi aktivitas antihiperkolesterolemia-nya. Hasil uji *in vivo* memperlihatkan bahwa fraksi F2 dan F5 mampu menurunkan kadar kolesterol total pada hari keempat masing-masing sebesar  $38,15 \pm 3,04$  dan  $37,32 \pm 4,02$  %, dan berbeda bermakna secara statistik dibandingkan terhadap kontrol sakit ( $p < 0,05$ ). Di samping itu, fraksi F2 dan F5 juga memiliki laju penurunan kolesterol total yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol sakit. Berdasarkan analisis KG-SM, fraksi F2 mengandung asam lemak tak jenuh yang lebih tinggi dibanding asam lemak jenuh. Senyawa A telah berhasil diisolasi dari fraksi F5 sebagai padatan putih dengan jarak lebur  $134,3$ - $135,8$  °C. Berdasarkan data spektrum RMI satu dimensi dan dua dimensi, senyawa A adalah  $\beta$ -sitosterol.

Hasil penambatan molekul menunjukkan bahwa orizanol dan ergosteril ferulat memiliki afinitas ikatan terhadap HMG-KoA reduktase dengan nilai energi bebas Gibbs ( $\Delta G$ ) dan konstanta inhibisi ( $K_i$ ) berturut-turut, yaitu  $\Delta G = -4,17$  sampai  $-3,45$  Kkal/mol dan  $K_i = 0,88$  sampai  $2,97$  mM. Di samping itu, kajian ini menunjukkan bahwa senyawa ergosteril ferulat ( $\Delta G = -4,17$  Kkal/mol;  $K_i = 0,88$  mM) menunjukkan interaksi dengan residu asam amino yang penting (*cis loop*) pada sisi pengikatan enzim HMG-KoA reduktase, meliputi Ser684, Asp690, dan Lys691. Berdasarkan nilai  $\Delta G$ ,  $K_i$ , dan residu asam amino, maka ergosteril ferulat diprediksi memiliki potensi yang lebih besar dalam menghambat HMG-KoA reduktase dibandingkan orizanol.

Ergosteril ferulat dan sitosteril ferulat telah berhasil disintesis dan diujikan untuk aktivitas penghambatan HMG-KoA reduktase. Ergosteril ferulat diperoleh sebagai padatan kekuningan dengan jarak lebur  $166,4$ - $170,9$  °C, sedangkan sitosteril ferulat sebagai padatan tidak berwarna dengan jarak lebur  $131,2$ - $136,6$  °C. Hasil pengujian secara *in vitro* menunjukkan bahwa senyawa ergosteril ferulat dan sitosteril ferulat

masing-masing memiliki aktivitas penghambatan terhadap HMG-KoA reduktase sebesar  $16,17 \pm 5,84$  dan  $9,57 \pm 2,02$  %.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa fitosterol dan asam lemak tidak jenuh yang terdapat dalam bekatul diduga bertanggung jawab dalam aktivitas antihiperkolesterolemia. Di samping itu, senyawa analog orizanol (ergosteril ferulat) telah berhasil disintesis dan memiliki potensi aktivitas penghambatan yang lebih baik terhadap HMG-KoA reduktase dibanding orizanol.

Penelitian ini diharapkan memberikan kontribusi yang positif terhadap pengembangan mengenai senyawa antihiperkolesterolemia dari bekatul dan pengembangan obat, khususnya untuk alternatif selain orizanol (ergosteril ferulat) dalam menghambat aktivitas HMG-KoA reduktase.

Kata kunci: bekatul, antihiperkolesterolemia, sintesis, ergosteril ferulat, HMG-KoA reduktase.

## **ABSTRACT**

### **ISOLATION OF ANTIHYPERCHOLESTEROLEMIC AGENT FROM RICE BRAN AND STUDY OF ORYZANOL ANALOG AS HMG-COA REDUCTASE INHIBITOR**

By

**Syaikhul Aziz**

**NIM: 30715004**

**(Doctoral Program in Pharmacy)**

*Rice bran is the outermost layer of rice, a by-product was obtained during rice milling. This layer is rich in macro and micro-nutrients that have health benefits. The oryzanol contained in the rice bran has been known as the major bioactive component, which is responsible for various biological activities, including antioxidant, antimicrobial, antiallergenic, anticarcinogenic, antidiabetic, anti-inflammatory, and antihypercholesterolemic. Especially for antihypercholesterolemic activity, oryzanol shows promising results, making it potential to be developed. However, the next challenge is to get it in large quantities, since the rice bran contains a relatively small amount of oryzanol, and the isolation method is not easy.*

*This study has two main objectives. The first objective is to obtain antihypercholesterolemic active compound from rice bran. The second objective is to study the oryzanol analog, ergosteryl ferulate, as HMG-CoA reductase inhibitor through several steps, i.e. in silico study against HMG-CoA reductase, synthesis, and in vitro evaluation of HMG-CoA reductase inhibitor activity.*

*The antihypercholesterolemic active compound was obtained based on antihypercholesterolemic activity study in the rat model. That step was begun with hot solvent extraction by reflux method using single and binary solvents, i.e. n-hexane, chloroform, ethyl acetate, dichloromethane, isopropanol, acetone, n-hexane - ethyl acetate (1:1, v/v), chloroform - ethyl acetate (1:1, v/v), and n-hexane - isopropanol (1:1, v/v). The selected extract for further fractionation was chosen by the characteristic of extract that has the highest amount of oryzanol. TLC densitometry was used to quantitatively analyze the total oryzanol content in various extracts. The hypercholesterolemic rat models were induced by intragastric administration of 0.5 ml/100 g body weight of cocktail containing 2% of cholesterol, 1% of cholic acid, and 0.6% of propylthiouracil in palm oil which is given for 30 days period. To total cholesterol-lowering fraction, a series of separation and purification methods were then performed by chromatographic techniques. The structure of an isolated compound was determined by one-dimensional ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ) and two-dimensional (HSQC and HMBC) NMR spectra. The study of oryzanol analog as HMG-CoA reductase inhibitor started with*

molecular docking simulation using AutoDockTools software to predict the interaction of oryzanol analog in complexes with HMG-CoA reductase. In addition, four major oryzanol compounds i.e. 24-methylene cycloartanyl ferulate, cycloartenyl ferulate, sitosteryl ferulate, and campesterol ferulate were used for comparison. Ergosteryl ferulate and sitosteryl ferulate were synthesized in four steps, including acetylation of ferulic acid, the formation of acyl chloride, conjugation of ferulate structure with steroid/triterpenoid alcohol, and deprotection of acetyl group. The synthesized product for each step was monitored by thin layer chromatography. The chemical structure of the synthesized product was determined by one-dimensional and two-dimensional NMR spectra. Finally, ergosteryl ferulate and sitosteryl ferulate were evaluated for their HMG-CoA reductase inhibitory activity using the commercial assay kit.

The preliminary results showed that all organic solvents could extract oryzanol, in which its content ranged from  $27.92 \pm 4.45$  to  $43.59 \pm 3.36$  mg/100 g rice bran. n-Hexane has been found to be the best solvent to extract oryzanol by reflux method ( $43.59 \pm 3.36$  mg/100 g rice bran). Therefore, n-hexane extract was selected for fractionation and evaluation of its antihypercholesterolemic activity. The *in vivo* results exhibited that the F2 and F5 fractions were able to reduce total cholesterol levels on the 4<sup>th</sup> day of administration by  $38.15 \pm 3.04$  and  $37.32 \pm 4.02$  %, respectively, and statistically significant compared to control ( $p < 0.05$ ). In addition, the F2 and F5 fraction also had a higher rate of total cholesterol reduction than the control group. Based on the GC-MS analysis, F2 fraction contained higher unsaturated fatty acid than saturated fatty acid. Compound A has been successfully isolated from the F5 fraction as a white solid with a melting range of 134.3-135.8 °C. According to one-dimensional and two-dimensional NMR spectra, compound A is  $\beta$ -sitosterol.

The results of molecular docking exhibited that oryzanol and ergosteryl ferulate had binding affinity against HMG-CoA reductase with Gibbs free energy score ( $\Delta G$ ) and inhibition constant ( $K_i$ ) of  $\Delta G = -4.17$  to  $-3.45$  Kcal/mol and  $K_i = 0.88$  to  $2.97$  mM, respectively. In addition, the study showed that the ergosteryl ferulate ( $\Delta G = -4.17$  Kcal/mol;  $K_i = 0.88$  mM) interacted with important amino acid residue (cis loop) of HMG-CoA reductase - binding pocket, including Ser684, Asp690, and Lys691. Based on  $\Delta G$  score,  $K_i$ , and amino acid residue, ergosteryl ferulate was predicted to have greater potential in inhibiting HMG-CoA reductase compared to oryzanol.

Ergosteryl ferulate and sitosteryl ferulate have been successfully synthesized and evaluated for their HMG-CoA reductase inhibitory activity. Ergosteryl ferulate was obtained as a yellowish solid with melting range of 166.4-170.9 °C, while sitosteryl ferulate as a colorless solid with melting range of 131.2-136.6 °C. The *in vitro* assay demonstrated that ergosteryl ferulate and sitosteryl ferulate has the inhibitory activity against HMG-CoA reductase by  $16.17 \pm 5.84$  and  $9.57 \pm 2.02$  %, respectively.

Overall, the results of the present study suggest that the composition of phytosterols and unsaturated fatty acids contained in rice bran is responsible for anti-

*hypercholesterolemic activity. In addition, the oryzanol analog (ergosteryl ferulate) has been successfully synthesized and has the potential to improve HMG-CoA reductase inhibitory activity compared to oryzanol.*

*This research was expected to give a positive contribution to the development of antihypercholesterolemic agent from rice bran and drug development, especially for another alternative than oryzanol (ergosteryl ferulate) as HMG-CoA reductase inhibitory activity.*

*Keywords: rice bran, antihypercholesterolemic, synthesis, ergosteryl ferulate, HMG-CoA reductase.*