

Studi In Silico Senyawa Turunan Flavonoid terhadap Enzim HMG-CoA Reduktase

Susan Sulastr¹, Hafrizal Riza¹, Inarah Fajriaty¹

Fakultas kedokteran Prodi Farmasi, Universitas Tanjungpura. Pontianak, Indonesia¹

Sigirosusan6@gmail.com

Abstrak : Senyawa flavonoid yang terdapat dalam jeruk memiliki aktivitas sebagai antikolesterol. Faktor penentu efek yang diinginkan terletak pada posisi dan jumlah kelompok OH dalam struktur flavonoid. Tujuan penelitian ini untuk melihat beberapa keteraturan dalam hubungan antara struktur, aktivitas sebagai antikolesterol dari hesperitin, *2-(3-hidroksi-4-metoksiphenyl)chroman-4-one* dan *5,7-dihidroksi-2-phenylchroman-4-one*. Metode *in silico* yaitu analisis sifat fisiskimia yang terkait dengan kelarutan, permeabilitas dan bioavailabilitas menggunakan ChemOffice 15.0, analisis afinitas reseptor-ligan secara docking menggunakan *Autodock Vina* dengan program *Autodock Tools*. Hasil analisis sifat fisiskimia dan docking menunjukkan bahwa hesperitin (log P 1.5), *2-(3-hidroksi-4-metoksiphenyl)chroman-4-one* (log P 2.28), *5,7-dihidroksi-2-phenylchroman-4-one* (log P 2.02) dan atorvastatin (log P 5.05) dengan energi pengikatan masing-masing -7.1, -7.4, -7.7 dan -8.2 kkal/Mol. Jenis interaksi antara reseptor dan ligan-ligan yaitu ikatan hidrogen dan hidrofobik. Kesimpulan bahwa kedua ligan uji dapat mengikat sisi aktif enzim HMG-CoA reduktase pada residu 426-888 sehingga terjadi penghambatan aktivitas pembentukan kolesterol.

Kata kunci: Antikolesterol, Hesperitin, Hubungan struktur dan aktivitas

Penulis :

Susan Sulastr¹

Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura Pontianak

Jl. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi, Kota Pontianak, Kalimantan Barat

Email : sigirosusan6@gmail.com

Study In Silico Flavonoid Derivate Compounds on The Enzyme HMG-CoA Reductase

Susan Sulastris¹, Hafrizal Riza¹, Inarah Fajriaty¹

Fakultas kedokteran Prodi Farmasi, Universitas Tanjungpura. Pontianak, Indonesia¹

Sigirosusan6@gmail.com

Abstract : Flavonoid compounds contained in oranges have anti-cholesterol activity. The determinant of the desired effect lies in the position and number of OH groups in the flavonoid structure. The purpose of this study is to see some order in the relationship between structures, activity as anti-cholesterol of hesperitin, 2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one and 5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one. The method were used the analysis of physicochemical properties associated with solubility, permeability and bioavailability using ChemOffice 15.0, to analyze the affinity of receptor-ligands docking using Autodock Vina with the Autodock Tools program. The analysis result of physicochemical properties and docking result show that the hesperidin (log P 1.5), 2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one (log P 2.28), 5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one (log P 2.02) and atorvastatin (log P 5.05) with their energies respective -7.7, -7,1, -7.4 and -8,2 kcal/mol. The type of interaction between receptors and ligand are the bond of hydrogen and hydrophobic bonds. The conclusion that test ligands can bind to the active side of HMG-CoA reductase enzyme on residue 426-888 resulting in inhibition of cholesterol formation activity.

Keywords : Anti-cholesterol, Hesperitin, Relationships structure activity

Pendahuluan

Satu faktor resiko bagi penyakit jantung dan pembuluh darah khususnya aterosklerosis, yaitu terbentuknya *plaque* pada arteri sebagai permulaan timbulnya penyakit yang berhubungan dengan jantung, seperti hipertensi, stroke dan serangan jantung yang disebabkan oleh Hiperkolesterolemia, kondisi dimana tingkat kolesterol total dalam darah >240 mg/dl dan menjadi salah.^(1,2) Berdasarkan data Riskesdas tahun 2013, prevalensi kolesterol di Indonesia dengan usia ≥ 15 tahun yaitu 35,9%, dengan penyakit jantung 12,9% dan stroke 21,1%.^(4,5) peningkatan kolesterol diperkirakan menyebabkan 2,6 juta kematian⁽³⁾

Flavonoid dengan struktur khas dapat berinteraksi dengan enzim sehingga menunjukkan polifarmakologi yang efektif karena adanya hubungan struktur dan aktivitas.⁽¹⁷⁾ Hesperidin terhidrolisis didalam tubuh oleh adanya glukoside atau bakteri usus yang dapat mengurai gula dari hesperidin sehingga memberikan bentuk anglikonnya yaitu hesperitin.^(21,22) Pemberian

hesperidin oral 500 mg memberikan efek antihiperkolestrolema.⁽⁷⁾ Mekanisme kerja hesperidin dengan menghambat HMG-CoA reduktase, *acyl-coA cholesterol acyltransferase* (ACAT), ekspresi reseptor LDL.⁽⁸⁾ Rendahnya bioavailabilitas membatasi penerapan lebih lanjut.⁽⁶⁾ Maka perlu dilakukan modifikasi struktur hesperitin, namun sebelum dilakukan modifikasi dilakukan uji pendahuluan tentang hubungan struktur dan aktivitas (HSA) gugus yang mempengaruhi penetrasi dan aktivitas hesperitin terhadap HMG-CoA reduktase secara *in silico*.

Metode ini mengintegrasikan teori kimia dan pemodelan dengan pengamatan eksperimental berdasarkan pada algoritma matematika, statistik, dan basis data. Metode ini juga menghitung hukum dasar fisika atom seperti partikel bermuatan, inti positif, elektron negatif dan pengaturan geometrik dari inti sesuai dengan molekul stabil, dan bagaimana atom berinteraksi satu sama lain. Oleh karena itu, metode ini dapat berkontribusi sebagai studi awal untuk

mendukung metode eksperimen *in vitro* dan *in vivo*.⁽²³⁾ Pelepasan gugus 5,7-dihidroksi pada cincin A diperoleh 2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one karena gugus hidroksil fenolik memberikan lebih banyak kelarutan dalam air. Selain itu, gugus-gugus tersebut memiliki aktivitas sebagai antivirus dan apoptosis sel kanker.⁽¹⁷⁾ Pelepasan gugus OH dan OCH₃ pada hesperitin menjadi 5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one. Selain mengurangi kelarutan dalam air dengan mengeliminasi gugus OH. Gugus OCH₃ berpengaruh pada konstanta disosiasi gugus hidroksil fenolik sehingga molekul bersifat hidrofobik.⁽⁹⁾ Kontribusi gugus metoksi dan gugus hidroksil pada cincin B dalam flavonoid memberikan aktivitas anti-diabetes, antineuropatologi dan kardioprotektif.^(17,10) Oleh karena itu, dilakukan penelitian terhadap dua struktur hesperitin yaitu menjadi 5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one dan 2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one terhadap HMG-CoA reduktase secara *in silico* untuk melihat penetrasi dan afinitasnya sebagai antikolesterol. HSA menunjukkan bahwa sifat fisika kimia yang dibawa oleh struktur senyawa akan mempengaruhi aktivitas biologinya. Analisis sifat fisika kimia dari struktur 2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one dan 5,7-dihydroxy-2-phenyl chroman-4-one dengan hukum lima Lipinski dengan menggunakan aplikasi chemdraw.⁽¹¹⁾ Studi interaksi penghambatan senyawa terhadap reseptor memberikan afinitas/aktivitas dengan cara *docking* menggunakan aplikasi *autodock vina*.⁽¹²⁾

Metodologi

Struktur tiga dimensi (3D) enzim diperoleh dari RSCB data bank protein (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Ligan yang digunakan yaitu hesperitin, 2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one dan 5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one. Ligan-ligan tersebut kemudian digambar dan analisis sifat fisikokimianya menggunakan program Chemoffice 15.0. Parameter yang dilihat adalah nilai log koefisien partisi oktanol-air (log P), berat

molekul (BM), H donor dan H akseptor. Perubahan struktur 3D dengan menggunakan *software Chemoffice 15.0* agar dapat melihat bentuk stereokimia senyawa 3D serta mengatur bentuk yang paling stabil dari senyawa dengan cara meminimalkan energi dengan *Tools MM2 Minimize Energy* pada program, sehingga dapat diperoleh bentuk yang paling serasi dalam berikatan dengan stereokimia reseptor. Proses docking menggunakan *Autodock Vina (Versi 4.2, updated for version 4.2.6)*. Dinilai energi yang terlibat melalui *Mol Dock Score*, *HBond*, serta nilai *RMSD (Root Mean Square Deviation)*. Kemudian dilakukan analisis data menggunakan SPSS.

Hasil dan pembahasan

Flavonoid memiliki berbagai efek bioaktif termasuk anti-virus, anti-inflamasi, kardioprotektif, anti-diabetes, anti-kanker dan anti-penuaan. Hubungan antara struktur kimia dan bioaktivitas telah dipelajari sebelumnya. Mengingat bioavailabilitasnya yang buruk, maka informasi tentang hubungan antara struktur dan nasib biologis sangat dibutuhkan. Tinjauan ini untuk melihat beberapa keteraturan dalam hubungan antara struktur -aktivitas dari hesperitin. Senyawa flavonoid yang digunakan sebagai ligan yaitu hesperitin, 2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one, 5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one. Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang tersebar secara luas pada tumbuhan. Posisi dan jumlah kelompok OH dalam struktur flavonoid merupakan faktor penentu untuk efek yang diinginkan. Hesperidin memiliki berbagai efek dalam tubuh seperti: menurunkan edema, antiinflamasi, antihipertensi, antibakterial serta memiliki efek signifikan dalam menurunkan kadar kolesterol total, kadar kol-LDL dan meningkatkan kadar kol-HDL.^(6,13,15) Bentuk aglikon flavonoid memiliki bioavailabilitas yang lebih tinggi dan penyerapan lebih awal daripada glikosida.⁽¹¹⁾ Maka digunakan aglikon hesperidin yaitu hesperitin untuk mengetahui hubungan struktur dan aktivitas terhadap bioavailabilitas dalam mempengaruhi penetrasi dan afinitas.

Tabel 1. afinitas masing-masing ligan

Ligan	Afinitas ikatan (kcal/mol)	Rmsd/ub	Rmsd /1b
Atorvastatin	-8,2	0.000	0.000
Hesperitin	-7,7	0.000	0.000
5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one	-8,4	0.000	0.000
2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one	-7,1	0.000	0.000

Aturan Lipinski untuk sediaan yang memiliki absorpsi dan permeabilitas yang baik yaitu

memiliki berat molekul yang tidak lebih besar dari 500, log P tidak lebih besar dari 5, jumlah H

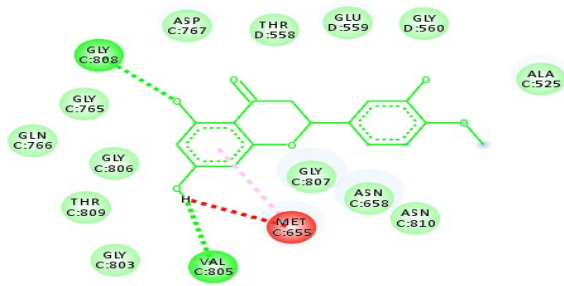
donor tidak lebih dari 5 dan jumlah H akseptor tidak lebih dari 10. Hasil analisis menunjukkan bahwa senyawa hesperitin, *2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one* memiliki H donor 1 dan H akseptor 3 sedangkan *5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one* memiliki H donor 2 dan H akseptor 2. Jumlah hidrogen donor dan akseptor mempengaruhi ikatan hidrogen yang terjadi. Ikatan hidrogen adalah ikatan atom H dengan atom lain yang bersifat elektronegatif seperti O, N, dan F. Ikatan hidrogen menunjukkan polaritas suatu senyawa dimana semakin banyak ikatan hidrogen maka senyawa akan semakin polar karena banyak berikatan dengan molekul oksigen dari air dalam cairan. Hasil analisis menunjukkan bahwa senyawa hesperitin, *2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one* dan *5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one* memiliki berat molekul <500 kecuali kontrol positif yaitu atorvastatin berat molekul >500 namun tidak semua obat yang memiliki aktivitas dan telah direkomendasi oleh *US Food and Drug Administration* memenuhi aturan Lipinski. Nilai log P masing-masing senyawa menunjukkan nilai log P < 5 kecuali senyawa kontrol positif yaitu atorvastatin memiliki nilai log P > 5. Lipofilisitas adalah penentu utama fisiko-kimia yang mempengaruhi bioavailabilitas, permeabilitas dan toksisitas suatu obat. Dilihat dari nilai log P terdapat perbedaan antara kedua ligan uji dan hesperitin. Ligan *2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one* memiliki log P lebih tinggi. Hal ini menunjukkan Gugus OCH₃

Nilai energi ikat *5,7-dihydroxy-2-phenyl chroman-4-one* -7,4 kkal / mol lebih rendah dari hesperitin dan kontrol positif (atorvastatin) namun lebih tinggi dari *2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one*. Energi ikat ligan *2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one* adalah yang paling rendah. Nilai energi pengikatan *5,7-dihydroxy-2-phenyl chroman-4-one*, hesperitin, *2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one* dan atorvastatin lebih rendah dari nol yang berarti bahwa pengikatan ligan dan reseptor menyebabkan melepaskan energi yang disebut eksoterm. Energi

berpengaruh pada konstanta disosiasi gugus hidroksil fenolik sehingga molekul bersifat hidrofobik.⁽⁹⁾ Senyawa lipofilik atau non polar akan lebih mudah menembus membran karena adanya kesamaan lipofilisitas dengan fase lipid.

Minimisasi energi bertujuan untuk meminimalkan energi sterik dari senyawa sehingga konformasi tiga dimensi suatu senyawa menjadi stabil yang dekat dengan ikatan senyawa dan reseptor yang sebenarnya dalam tubuh manusia. Struktur senyawa yang stabil mempunyai energi intramolekul yang paling kecil (energi sterik total) pada antar atom dan pasangan elektron bebasnya, sehingga gaya tolak menolak antar atom menjadi kecil.^(53,71) Minimalisasi energi akan memberikan pengaturan posisi atom terbaik dalam ruang untuk senyawa sehingga gaya inter-atom dan energi sterik setiap atom mendekati nol dan posisi pada permukaan energi potensial adalah titik stasioner. Hasil minimisasi energi masing-masing yaitu *2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one* 12.4689, *5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one* 7.6648, hesperitin 7.1494, dan atorvastatin 76.8511. Parameter grid untuk hesperitin, *2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one* dan *5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one* ditetapkan dekat dengan kotak kontrol positif dengan memilih area dimensi yang sama. Hal ini dilakukan agar hasil *docking* tetap berada di situs aktif reseptor. Situs aktif reseptor yang dipilih adalah residu asam amino yang mempengaruhi fungsi atau aktivitas enzim.

pengikat menunjukkan gaya inter-atomik, energi sterik dan energi potensial dihasilkan dari ikatan ligan-reseptor. Semakin rendah skor pengikatan energi dari ikatan ligan-reseptor, semakin stabil reseptor ligan untuk mengikat. Ini karena afinitas yang lebih baik dari ligan-reseptor ditentukan oleh stabilitas ikatan ligan reseptor.⁽¹⁴⁾ Skor RMSD menunjukkan iterasi model konformasi ligan yang dapat mengikat reseptor dengan skor energi ikat yang ditunjukkan pada tabel 1 secara signifikan tidak berbeda.⁽¹⁶⁾ Berdasarkan hasil diatas ligan *5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one*, hesperitin, *2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one* dapat terikat pada reseptor sama seperti kontrol positif



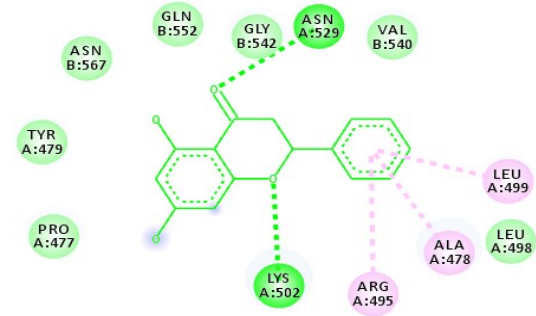
Interactions
 van der Waals
 Conventional Hydrogen Bond
 Unfavorable Donor-Donor
 Pi-Alkyl

2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one

Temuan mengenai SAR berasal dari studi farmakologi telah memberikan bukti yang menguntungkan dari peran berbagai kelompok fungsional. Berdasarkan hal tersebut di atas, adalah rasional untuk menyimpulkan bahwa gugus hidroksi pada cincin B merupakan bagian yang memiliki berbagai efek menguntungkan dari flavonoid. Terbukti dengan ligan *2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one* yang memiliki ikatan dengan residu Lys691, Lys691, Glu559, Asp767 dimana posisi-posisi tersebut dapat mengikat sisi aktif HMG-CoA. Ligan *5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one* juga dapat mengikat sisi aktif HMG-CoA pada residu yang berbeda namun masih dalam rentang daerah katalitik. Ligan atorvastatin memiliki ikatan hidrogen dengan sisi aktif pada residu Lys691, Glu559. Ligan Hesperitin mengikat sisi aktif pada HMG-CoA dengan ikatan hidrogen pada residu Asp559 dan Glu767. Fitur kunci seluruh asam amino pada HMG-CoA yaitu daerah domain berada pada posisi 61-218, daerah region 340-449 berfungsi sebagai penghubung sedangkan daerah region pada posisi 450-888 termasuk daerah katalitik.⁽⁸³⁾ Ligan *2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one* dapat mengikat sisi aktif Enzim HMG-CoA pada posisi 5' OH dengan residu Lys691 sehingga posisi ini sangat berguna dalam pengikatan dengan asam amino HMG-CoA sedangkan gugus 4' metoksi tidak memberikan pengaruh pada ikatan asam amino

Kesimpulan

Ligan *2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one* memiliki afinitas -7.1. Ligan *2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one* memiliki afinitas sebagai antikolesterol karena dapat mengikat sisi aktif enzim HMG-CoA reduktase pada residu Lys691, Asn658, Gly80, Gly808, Gln770, Asp690, Arg590, Gly560, Glu559, Met655,



Interactions
 van der Waals
 Conventional Hydrogen Bond
 Pi-Alkyl

5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one

tersebut pada enzim HMG-CoA namun memberi pengaruh pada log P karena nilai log P ligan *2-(3-hydroxy-4-methoxy-phenyl)chroman-4-one* lebih besar dibanding log P hesperitin dan *5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one*. Ligan *5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one* tidak memberikan ikatan pada sisi aktif HMG-CoA namun memiliki afinitas yang lebih tinggi walaupun posisi gugus 5,7 dihidroksi tidak memberikan pengaruh pada residu HMG-CoA. Hasil docking ini dapat dilihat bahwa ligan *2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one* dapat memberi pengaruh pada muatan dalam sistem pada posisi 5' hidroksil namun posisi 5,7 dihidroksi pada ligan *5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one* tidak terdapat pengaruh sebagai antikolesterol. pada ligan *2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one* dibandingkan ligan *5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one* namun memberi pengaruh pada log P karena nilai log P ligan *2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one* lebih besar dibanding log P hesperitin dan *5,7-hydroxy-2-phenylchroman-4-one*. Efek positif hidroksilasi telah berperan sebagai anti-virus/bakteri, anti kanker, dan kardioprotektif. Substitusi hidroksi pada cincin A berperan penting yaitu 5-7-hidroksil berpotensi sebagai sebagai anti-H5N1 virus influenza A.⁽¹⁸⁾ 3', 4'-*didemethyl-nobiletin*, telah diakui dengan sifat anti-tumor yang lebih kuat.^(19,20)

Met657, Gly806, Asp767 yang masih dalam rentang daerah katalitik. Ligan *5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one* memiliki afinitas -7,4 dan memiliki afinitas sebagai antikolesterol karena dapat mengikat sisi aktif enzim HMG-CoA reduktase. Ligan *5,7-dihydroxy-2-phenylchroman-4-one* dapat menghambat pada

residu aktif Lys502, Asn529, Pro477, Tyr479, Asn567, Gln552, Ala541, Val540, Leu498, rentang daerah katalitik pada enzim HMG-CoA.

Pro543, Leu449, Ala478, Arg495 yang masih pada

V.2 Saran

Perlu dilakukan modifikasi lanjutan terhadap struktur hesperitin yang telah dilepas gugus 5,7 dihidroksi pada cincin A atau struktur hesperitin yang dilepas gugus OH dan OCH₃ pada cincin B untuk meningkatkan afinitas dan sifat fisikokimianya secara *in silico*. Melakukan sintesis terhadap senyawa hesperitin yang telah dimodifikasi dan memiliki penetrasi dan afinitas yang

Hasil dari docking senyawa hesperitin yang telah dimodifikasi perlu dilanjutkan secara *in vivo* untuk melihat pengaruh terhadap makhluk hidup karena hasil *docking* masih bersifat deskriptif dimana metode ini hanya memperhitungkan sifat fisikokimia, energi yang mempengaruhi interaksi antar atom-atom sehingga dapat mempertimbangkan farmakokinetik dan farmakodinamik tubuh terhadap senyawa aktif.

Transferase are lower in rats fed citrus peel extract

Daftar Pustaka

1. Faridah U, Yulisetyaningrum, Prayitno S. Pengaruh pemberian jus kulit delima terhadap kadar kolesterol total di UPT puskesmas gondosari Kabupaten kudu 2016.
2. Victor VM, Apostolova N, Herance R, Hernandez A, Rocha M. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in atherosclerosis: Mitochondria-targeted antioxidants as potential therapy. *Current Medicinal Chemistry*. 2009; 16
3. WHO. Diambil dari http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/cholesterol_text/en/ diakses tanggal 23 Februari 2018. Global Health Observatory (GHO) data: Raised cholesterol: Situation and trends.
4. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Diambil dari <http://www.depkes.go.id/article/view/17061600003/> diakses tanggal 26 maret 2018. Tekanan angka kematian melalui program indonesia sehat dengan pendekatan keluarga. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
5. Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas). Pedoman Pewawancara Petugas Pengumpul Data. Jakarta: Badan Litbangkes, Depkes RI, 2013.
6. Garg A, Garg S. Zaneveld LJD, Singla AK. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother. Res*. 2001 (15): 655–669
7. Rizza S, Muniyappa R, Lantorno M, Kim J, Chen H, Pullikotil P, et al. Citrus polyphenol hesperidin stimulates production of nitric oxide in endothelial cells while improving endothelial function and reducing inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96:782–792
8. Bok SH, et al. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coa reductase and Acyl CoA : Cholesterol
9. or a mixture of citrus bioflavonoids. *J. Nutr*. 1999.129:1182–5
10. Yanagita RC, et al. Effect of methoxy group in the side chain of debromoaplysiatoxin on its tumor-promoting and antiproliferative activities
11. Matsuda H, Kogami Y, Nakamura S, et al. Structural requirements of flavonoids for the adipogenesis of 3T3-L1 cells. *Bioorg Med Chem*. 2011.(9)19: pp. 2835-2841
12. Wang TY. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate
13. Sandeep G, Nagasree KP, Hanisha M, Kumar MM. Audocker le: a gui for virtual screening with autodock vina. *BMC Res Notes*. 2011; 4: 445.
14. Kurowska E, et. al. HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subject with hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr* 2000;72:1095–100.
15. Jensen F. Introduction to computational chemistry. 2nd Ed. Hoboken: United States: John Wiley and Sons Ltd; 2006. p. 69416.
16. Lagor WR, Millar JS. Overview of the LDL receptor: Relevance to cholesterol metabolism and future approaches for the treatment of coronary heart disease. *Journal Of Receptor, Ligand And Channel Research*. 2010;3:1–14
17. Alberto C, Mattia S, Ivana M, Antonella C, Stefano M. Dock bench: an integrated informatic platform bridging the gap between the robust validation of docking protocols and virtual screening simulations. *Molecules* 2015.20:9977-93.
18. Carvalho OV, et al. In vitro inhibition of canine distemper virus by flavonoids and phenolic acids: implications of structural differences for antiviral design. *Res Vet Sci*, 2013(2)95:pp. 717-724
19. Sithisarn P, et al. Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A

- virus-infected cells Antiviral Res. 2013.(1) 9:pp. 41-48
20. Androustopoulos VP, et al. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes Pharmacol Ther, 2010.(1)21: pp. 9-20
 21. Surichan S, et al. Bioactivation of the citrus flavonoid nobiletin by CYP1 enzymes in MCF7 breast adenocarcinoma cells. Food Chem Toxicol, 2012.(9)50 pp. 3320-3328
 22. Almatier S. Prinsip Dasar Ilmu Gizi. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Umum; 2004; p.51-74.
 23. Wirahadikusumah, M. Biokimia : Metabolismi, Energi, Karbohidrat dan Lipid, Ed.1, Bandung: Penerbit ITB : 1985.164-172.
 24. Jensen F. *Introduction to Computational Chemistry*. 2nd Ed. Denmark: John Wiley and Sons, Ltd; 2007. p. 1-21