

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit malaria masih menjadi masalah kesehatan yang perlu ditangani di dunia dan Indonesia dikarenakan angka kematian masih cukup tinggi. Malaria menyerang sekitar 209 negara di dunia. *World Health Organization* (WHO) melaporkan kasus malaria pada tahun 2019-2021 mengalami peningkatan yang terjadi di dunia (World Health Organization, 2022). Kejadian malaria di Indonesia cenderung meningkat dari tahun 2019-2021. Indonesia menyumbang kasus terbesar malaria kedua di region Asia setelah India, terutama pada wilayah bagian timur diantaranya Provinsi Papua, Provinsi Papua Barat, Provinsi Nusa Tenggara Timur, dan Provinsi Maluku. Angka kematian akibat malaria masih terjadi di beberapa provinsi di Indonesia (Kemenkes, 2022). Baru-baru ini, sekitar 241 juta kasus malaria telah dilaporkan di seluruh dunia pada tahun 2021, dimana sekitar 627.000 orang, hingga 690.000 orang diperkirakan meninggal akibat penyakit ini (World Health Organization, 2021). Hal ini dikarenakan resistensi obat antimalaria terhadap *Plasmodium falciparum* yang menghambat strategi pengendalian dan pemberantasan yang ada saat ini (Thu et al., 2017).

Munculnya penyebaran dan resistensi obat antimalaria telah menjadi masalah yang signifikan di seluruh dunia. Terdapat tantangan dalam pencarian senyawa baru untuk pengembangan obat antimalaria baru. Dengan demikian, tujuan pemberantasan penyebaran malaria bergantung pada penemuan terapi obat untuk melawan *P. falciparum* (Belete, 2020). Salah satu senyawa yang memiliki potensi sebagai antimalaria yakni senyawa turunan asam sinamat (Perković et al., 2020).

Asam sinamat, asam karboksilat aromatik alami, adalah bahan kimia utama yang ditemukan pada tanaman seperti *Cinnamomum cassia* (kayu manis Cina), bermacam-macam buah serta tanaman lainnya (Nitish Kumar, 2019), dan madu (Chandra et al., 2018). Kehadiran gugus asam akrilat yang tersubstitusi pada cincin fenil memberikan asam sinamat konfigurasi cis atau trans, dimana konfigurasi trans adalah yang paling umum diantara keduanya (Yilmaz et al., 2018). Berbagai penelitian telah melaporkan bahwa asam sinamat menunjukkan berbagai aktivitas farmakologis salah satunya adalah sebagai antiplasmodial (Abd El-Raouf et al., 2015; Guo et al., 2019; R. Wang et al., 2019). Beragam aktivitas biologis dari turunan asam sinamat dikaitkan dengan sifat dan posisi gugus substituen (Ruwezhi & Aderibigbe, 2020).

Perkovic et.al., (2020) telah mensintesis hibrida dari asam harmin dan asam sinamat menggunakan penghubung triazol (6a-8i) yang dilakukan untuk menilai korelasi antara lipofilisitas dan aktivitas. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa turunan O-harmicine merupakan senyawa turunan yang paling efektif, dan substituen O-harmicine 7h dan 7g menunjukkan aktivitas antiplasmodium yang paling efektif dengan nilai log P rendah (Perković et al., 2020). Menurut penelitian Feng et.al., tahun 2020 menunjukkan bahwa nilai log P yang rendah cenderung meningkatkan aktivitas antiplasmodium karena senyawa dengan log P rendah cenderung lebih larut dalam air dan lebih efisien menembus membran sel parasit Plasmodium, sehingga meningkatkan potensi antimalaria (Feng et al., 2020).

Modifikasi asam harmin dengan turunan asam sinamat melalui penghubung triazol menghasilkan hibrida dengan aktivitas antiplasmodium yang sangat baik jika dibandingkan dengan senyawa induk. Modifikasi hibrida tersebut menghasilkan 26 senyawa yang memiliki aktivitas antimalaria. Meskipun demikian, perlu dilakukan kajian lebih lanjut untuk membuktikan kemungkinan adanya hubungan secara struktural dan aktivitas, agar didapatkan model turunan asam sinamat dengan aktivitas antimalaria (Perković et al., 2020).

Analisis Struktur Aktifitas (HKSA) adalah model matematika yang menghubungkan aktivitas dari kelompok senyawa dengan aktifitasnya (Yellsubbaiah & Velmurugan, 2023). Penelitian dilakukan Ramadhan et. Al., (2023) berhasil melakukan kajian analisis persamaan linier antara 25 struktur senyawa turunan *phenyl benzimidazoles*, diperoleh 6 senyawa dari hasil



persamaan HKSA terbaik dengan nilai Log IC₅₀ yang lebih rendah dari senyawa induknya, sehingga 6 senyawa tersebut menunjukkan peluang yang potensial, dan dapat dilanjutkan dengan analisis *molecular docking* (Ramadhan et al., 2023).

Molecular docking adalah suatu metode penambatan yang digunakan untuk mengetahui kemampuan dalam memprediksi nilai energi inhibisi dari inhibitor saat berinteraksi dengan reseptornya sehingga didapatkan nilai afinitas sebagai output (Kumari et al., 2016). Sedangkan, analisis HKSA digunakan untuk menemukan hubungan linear antara sifat molekul dengan aktivitas biologis dari suatu seri senyawa sehingga diperoleh persamaan yang dapat digunakan untuk mendesain senyawa baru (Yellasubbaiah & Velmurugan, 2023). Namun, *molecular docking* hanya melihat interaksi antara ligan dengan reseptor tanpa adanya pengaruh dari biomolekul lainnya, sehingga perlu dilanjutkan dengan simulasi dinamika secara molekuler (Salo-Ahen et al., 2021)

Simulasi dinamika molekul adalah salah satu teknik simulasi yang bertujuan untuk mendapatkan informasi mengenai sifat struktur, dinamika, dan termodinamika dari suatu biomolekul. Biomolekul yang dimaksud seperti protein, enzim, atau kumpulan lipid, air atau elektrolit sehingga teknik tersebut dapat mengatasi keterbatasan pengambilan sampel yang kaku dalam analisis *molecular docking* (Salo-Ahen et al., 2021).

Melengkapi metode tersebut, analisis sifat fisikokimia dan profil farmakokinetik toksikologi (ADMET) secara *in silico* juga diperlukan sebagai rujukan awal dalam pengembangan senyawa obat. Hal tersebut karena analisis aktifitas secara *in vitro* dan *in vivo* membutuhkan waktu yang lama dan biaya yang lebih besar (Jahnabi Kalita et al., 2019). Studi ADMET dilakukan setelah data awal tentang aktivitas biologis suatu senyawa dikumpulkan, karena data ini dapat membantu peneliti memilih kandidat obat yang paling menjanjikan dan mempercepat proses pengembangan obat dengan mengurangi risiko toksisitas atau efek samping yang tidak diinginkan. (Ahmed & Alkali, 2019; Pires et al., 2015)

Dalam penelitian ini, peneliti akan melakukan kombinasi dari studi *in silico*. Metode ini memberikan wawasan dalam merancang senyawa bioaktif yang lebih baik melalui Analisis HKSA, dilanjutkan dengan *molecular docking*, *molecular dynamics simulation* untuk mengetahui stabilitas kompleks senyawa turunan asam sinamat terhadap enzim falcipain-2, falcipain-3, plasmepsin-2, plasmepsin-4 dan dilanjutkan analisis profil farmakokinetik toksikologi (ADMET).

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana model persamaan HKSA senyawa turunan asam sinamat sebagai antimalaria?
2. Bagaimana afinitas dan model interaksi senyawa turunan asam sinamat dengan beberapa protein target sebagai antimalaria?
3. Bagaimana gambaran dinamika molekul senyawa turunan asam sinamat dengan protein target penyebab malaria?
4. Bagaimana prediksi profil farmakokinetik dan toksisitas senyawa turunan asam sinamat?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan model persamaan HKSA senyawa turunan asam sinamat sebagai antimalaria.
2. Memprediksi afinitas dan model interaksi senyawa turunan asam sinamat dengan beberapa protein target penyebab malaria.
3. Memberikan gambaran dinamika molekul senyawa turunan asam sinamat dengan protein target penyebab malaria.
4. Memprediksi profil farmakokinetik dan toksisitas senyawa turunan asam sinamat.



tian

arapkan dapat memberikan informasi dan pengembangan ilmu pengetahuan dibidang ng pengembangan obat antimalaria melalui prediksi *in silico*. Diharapkan senyawa ang disintesis dapat menjadi kandidat obat baru dalam upaya penurunan penyakit

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah studi *Computer-aided drug design*, yaitu menentukan secara sistematis HKSA, afinitas dan model interaksi, dan gambaran dinamika molekul senyawa turunan asam sinamat sebagai agen antimalaria. Selain itu, juga menentukan profil farmakokinetik dan toksisitas senyawa turunan asam sinamat.

2.2 Lokasi dan Waktu

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang dimulai bulan April sampai November 2024.

2.3 Alat dan Bahan

2.3.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah perangkat keras berupa laptop dengan spesifikasi: *Processor Intel i7-12700H CPU @ 2.30 GHz*, RAM 8,00 GB DDR5 4800, 64-bit *Operating system*, Nvidia GeForce RTX3050-4GB dan SSD 512 GB Perangkat lunak yang digunakan yakni *Avogadro*, *ChemDraw*, *BuildQSAR* (de Oliveira & Gaudio, 2000), *PaDeL Deskriptor* (Yap, 2011), *DTC Lab. Software Tools* (dtclab.web.com), *UCSF Chimera*, *BIOVIA Discovery Studio Visualizer*, *Yasara Structure*, dan *pkCSM Online Tools* (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/prediction>).

2.3.2 Bahan Penelitian

Sebanyak 26 turunan asam sinamat dari referensi yang ditujukan pada Lampiran 1, struktur kompleks enzim falcipain-II (PDB ID: 3BPF), struktur kompleks enzim falcipain-III (PDB ID: 3BWK), struktur kompleks enzim plasmepsin-II (PDB ID: 4Z22), dan struktur kompleks enzim plasmepsin-IV (PDB ID: 1LS5) yang diperoleh dari *Protein Data Bank* (PDB) (www.rcsb.org).

2.4 Prosedur Kerja

2.4.1 Analisis HKSA

2.4.1.1 Pengumpulan Data dan Optimalisasi

Sebanyak 26 senyawa turunan dari asam sinamat dikumpulkan dari referensi yang dilaporkan oleh Perković et al., (2020). Semua senyawa tersebut diuji aktivitasnya pada tahap eritrositik dari siklus hidup *Plasmodium* dievaluasi secara *in vitro* terhadap dua *strain P. falciparum*, yaitu *strain* yang peka terhadap klorokuin (Pf3D7) dan *strain* yang resisten terhadap klorokuin (PfDd2). Senyawa-senyawa tersebut dimodelkan dan dioptimasi menggunakan metode DFT B3LYP 6-311G (d,p) pada program *Gaussian* (Neese et al., 2020) dan divisualisasikan menggunakan perangkat lunak Avogadro (Hanwell et al., 2012).

2.4.1.2 Perhitungan Deskriptor

Struktur yang dioptimalkan dari turunan asam sinamat kemudian dilanjutkan dengan perhitungan deskriptor. Tahap perhitungan deskriptor menggunakan *software PaDeL-Descriptor*. *Input* data dengan folder yang telah ditandai sebelumnya dan memilih *output* hasil perhitungan deskriptor pada folder berbeda. Perhitungan deskriptor dilakukan hanya dengan deskriptor 3D dengan mencentang hanya 3D pada pilihan *descriptor*, kemudian mencentang tanda *remove salt*, *add hydrogen* dan log pada pilihan *options*, lalu tekan *start* untuk memulai perhitungan deskriptor. *Output data* akan tersimpan dalam bentuk *file .csv*, kemudian dilanjutkan pembagian data (Yap, 2011).

2.4.1.3 Pembagian Data



Senyawa antimalaria yang digunakan dalam penelitian ini, dibagi secara random menjadi yaitu *training set* dan *test set*. Pembagian data dilakukan dengan 80% *training set* dan pemilihan manual dilakukan dengan mengurutkan *data set* menjadi 3 kelompok yaitu dengan aktivitas kuat, aktivitas sedang, dan aktivitas lemah. Pemilihan *test set* harus di tiga kelompok tersebut sehingga diperoleh *test set* dengan aktivitas yang merata, *set* akan menjadi *training set*.

2.4.1.4 Penyusunan Model

Pembuatan model persamaan HKSA dilakukan menggunakan aplikasi BuildQSAR (de Oliveira & Gaudio, 2000). Data deskriptor *training set* dimasukkan ke dalam aplikasi bagian data X kemudian data nilai IC_{50} senyawa data *training set* dimasukkan ke bagian data Y. Pilih jumlah deskriptor yang akan diambil dengan membagi nilai jumlah *training set* dan *test set* lalu jalankan dengan algoritma *genetic algorithm*. Deskriptor yang didapatkan dari hasil tersebut digunakan untuk membuat persamaan HKSA secara *Multi Linear Regression* (MLR) (Jafar La Kilo, 2019).

2.4.1.3 Validasi Model

Persamaan HKSA yang diperoleh kemudian divalidasi dengan validasi internal yang menggunakan data *training set* dan validasi eksternal yang menggunakan data *test set*. Parameter validasi internal antara lain parameter koefisien determinasi (R^2) dimana nilai R^2 harus lebih besar dari 0,6 ($R^2 > 0,6$) (Frimayanti et al., 2011), cross validation (Q^2), selisih R^2 dan Q^2 , *Prediction Sum of Square* (PRESS) paling kecil, $SEE < 0,3$ (Mishra et al., 2014). Parameter validasi eksternal antara lain R^2_{test} (Motta & Almeida, 2011), $r^2 - r_0^2 / r^2$ (Mishra et al., 2014), dan r_m^2 (Golbraikh et al., 2003).

2.4.1.4 Perancangan Senyawa Baru Turunan Asam Sinamat

Untuk senyawa turunan asam sinamat yang baru dan belum dilakukan pengujian aktivitas secara *in vitro* dimodelkan struktur 3D menggunakan ChemDraw kemudian dioptimasi menggunakan optimasi metode DFT B3LYP 6-311G (d,p) pada program *Gaussian*. Deskriptor yang berperan sesuai hasil pemilihan deskriptor BuildQSAR diambil nilainya dan dimasukkan pada persamaan HKSA yang diperoleh sehingga didapatkan nilai IC_{50} dan Log IC_{50} senyawa turunan asam sinamat yang baru, nilai tersebut dikonversi sehingga diperoleh nilai IC_{50} prediksi.

2.4.2 Analisis Molecular Docking

Mengevaluasi mekanisme penghambatan, *molecular docking* dilakukan pada struktur kompleks enzim falcipain-II (PDB ID: 3BPF), struktur kompleks enzim falcipain-III (PDB ID: 3BWK), struktur kompleks enzim plasmepsin-II (PDB ID: 4Z22), dan struktur kompleks enzim plasmepsin-IV (PDB ID: 1LS5) yang diperoleh dari *Protein Data Bank* (PDB) (Himangini et al., 2018). Tahap preparasi dilakukan menggunakan perangkat lunak *Chimera* untuk menyiapkan protein dan ligan dengan menggunakan fitur *Dockprep* (Pettersen et al., 2004). Protokol *docking* diatur dalam ukuran kotak yang sebelumnya ditentukan dalam program *AutoDock Vina* (Butt et al., 2020; Morris et al., 2009). Algoritma Lamarckian digunakan dan diatur untuk menghasilkan 9 konformasi (Forli et al., 2016). Visualisasi interaksi dilakukan dalam program *Discovery Studio Visualizer*.

2.4.3 Analisis Molecular Dynamics

Stabilitas kompleks dari hasil konformasi terbaik pada tahap penambatan molekul dianalisis lebih lanjut menggunakan simulasi dinamika molekuler pada perangkat lunak *YASARA Structure* (*YASARA Bioscience GmbH, Wina, Austria*) (Land & Humble, 2018). Medan gaya yang digunakan adalah Amber14 dalam kondisi batas periodik (J. Wang et al., 2004). Kompleks diatur pada suhu 310 K dan pH 7,4. Pelarut TIP3P (Mark & Nilsson, 2001) dan *counterion* (Na^+ , Cl^-) ditambahkan untuk menetralkan sistem. Kemudian, sistem dijalankan selama 100 ns pada *time step* 0,25 fs. Data *snapshot* dikumpulkan setiap 25 ps dan digunakan untuk menganalisis *Root Mean Square Deviation* (RMSD), *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF), *Binding Free Energy*, *Total H-Bond* dan *Radius of Gyration* (RG).

2.4.4 Analisis ADMET

Prediksi sifat fisikokimia dan toksisitas senyawa turunan asam sinamat yang dilakukan menggunakan web server pkCSM online tools (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/prediction>) untuk memprediksi sifat fisikokimia senyawa dan mendapatkan parameter untuk diklasifikasikan ke dalam *Lipinski Rule of Five*

