

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Malaria merupakan masalah dari kesehatan global yang menyebabkan kematian terutama di wilayah endemis malaria. Pada tahun 2022 terdapat 249 juta kasus dan 608.000 kematian, pada masa lampau di tahun 2021 penyakit malaria ditaksirkan peningkatan sekitar 5 juta kasus. Penderita utama yang terbesar datang dari negara Pakistan sekitar 2,1 juta penderita, Nigeria 1,3 juta penderita, Euthopia 1,3 juta penderita, Uganda 597.000 juta penderita, Papua nugini 423.000 penderita. Dilaporkan jumlah kasus sebesar 443.530 dengan persentase 89% kasus positif terdapat di provinsi papua (World Malaria Report, 2023). World Health Organization melaporkan bahwa kasus malaria periode 2000 sampai dengan 2022 yang terdapat di beberapa wilayah endemik malaria di antaranya negara Afrika, Asia Tenggara, Amerika, Mediterania Timur dan Pasifik Timur mengalami penurunan. Strategi Teknis Global (GTS) bertujuan untuk mengurangi angka insiden dan kematian akibat malaria setidaknya sebesar 40% pada tahun 2020, 75% pada tahun 2025, dan 90% pada tahun 2030, dibandingkan dengan baseline tahun 2015. Meskipun telah terjadi kemajuan signifikan sejak tahun 2000, terdapat kemungkinan besar bahwa target GTS tahun 2025 tidak akan tercapai secara global jika tren saat ini terus berlanjut. Pada tahun 2022, insiden malaria tercatat sebesar 58 kasus per 1.000 populasi berisiko, yang sekitar 55% lebih tinggi dibandingkan target GTS tahun 2025 sebesar 26 kasus per 1.000 populasi berisiko (Shin *et al*, 2024).

Obat antimalaria yang tersedia saat ini secara garis besar dikategorikan ke dalam tiga jenis senyawa, yaitu (1) aril amino alkohol termasuk kina, kuinidin, halofantrin, lumefantrin, klorokuin, amodiakuin, meflokuin, sikloakuin dll., (2) Senyawa antifolat: proguanil, pirimetamin, trimetoprim, dll., (3) Senyawa artemisinin seperti artemisinin, dihidroartemisinin, artesunate, artemether, arteether, dll (Kumar *et al*, 2018). Sebagian besar obat antimalaria menargetkan tahap eritrositik aseksual parasit (obat skizonisida darah). Ada dua jenis yang bekerja cepat yaitu (Klorokuin, kina, dan meflokuin) dan yang bekerja lambat (Pirimetamin dan sulfonamid). Obat skizontosida jaringan menargetkan hipnozoit (stadium dorman parasit) di dalam hati, sedangkan obat gametosida menghancurkan bentuk eritrositik seksual parasit di dalam aliran darah sehingga mencegah penularan malaria ke nyamuk. Sporontosida mencegah atau menghambat pembentukan ookista dan sporozoit malaria pada nyamuk yang terinfeksi (Alam *et al*, 2009).

Resistensi terhadap obat antimalaria muncul karena parasit mengalami mutasi genetik atau amplifikasi gen yang menyebabkan kerentanan berkurang (Reyburn, 2010). Penelitian menunjukkan bahwa kegagalan pengobatan telah terjadi karena resistensi terhadap antimalaria dengan obat-obatan yang umum digunakan untuk infeksi *Plasmodium falciparum* yang dilaporkan di berbagai daerah endemis. Akibatnya, kebijakan pengobatan saat ini merekomendasikan penggunaan kombinasi obat. WHO telah merekomendasikan enam kombinasi pengobatan berbasis artemisinin, termasuk artemether–lumefantrin, artesunate–amodiakuin, artesunate–meflokuin, artesunate–sulfadoksin–pirimetamin, dihidroartemisinin–piperakuin, dan artesunate–pironaridin (Poespoprodjo *et al*, 2023). Kombinasi ini sangat direkomendasikan dan diterima secara umum sebagai pengobatan terbaik untuk malaria tanpa komplikasi (Elisabeth *et al*, 2018). Namun, fokus kami adalah pada munculnya resistensi terhadap artemisinin, yang pertama kali dilaporkan di Kamboja pada tahun 2008. Oleh karena itu, penemuan obat baru yang bekerja secara efektif dan cepat terhadap target parasit baru sangat dibutuhkan. Selain itu perlu investigasi mengenai mekanisme molekuler yang mendasari profil antimalaria dari obat-obat baru tersebut. Pemahaman ini dapat digunakan untuk

mengembangkan strategi yang tepat untuk mengidentifikasi agen baru untuk menggantikan artemisinin (Bharti *et al*, 2016).

Kemajuan dalam genomik inang dan parasit, termasuk studi proteomik berperforma tinggi serta pengurutan genom, telah meningkatkan jumlah data biologis yang tersedia. Data ini membantu menggambarkan perubahan spesies dari waktu ke waktu, terutama pada tahap metabolisme dan perkembangan patogen. Oleh karena itu, penerapan pendekatan komputasional yang efisien dalam menganalisis interaksi fungsional antar sesama spesies penting dalam mengatasi tantangan yang ditimbulkan oleh penyakit antimalaria (Agamah *et al*, 2020). Studi sistematis dan komprehensif tentang interaksi kompleks ini sangat penting dalam menjelaskan jalur yang relevan, indikasi, pola resistensi obat, hubungan antar gen produk dan target obat serta mengembangkan hipotesis dan model baru untuk memprediksi kausalitas penyakit (Zuck *et al*, 2017). Kerangka kerja komputasi integratif berbasis jaringan dimanfaatkan untuk memprediksi target protein yang dapat digunakan untuk mengarahkan perkembangan desain rasional terapi yang diarahkan pada patogen dan inang untuk pengobatan malaria. Setelah prediksi target, pendekatan tersebut digunakan untuk memprioritaskan obat-obatan yang berpotensi sehingga dapat direkayasa ulang untuk pengobatan malaria. Analisis lebih lanjut tentang jalur terpendek jaringan inang-patogen memungkinkan prediksi proses dan jalur biologis terkait imun yang berpotensi dirusak oleh *Plasmodium Falciparum* untuk meningkatkan kelangsungan hidupnya di dalam inang (Agamah *et al*, 2021).

Skrining biokimia berbasis target telah dilakukan terhadap berbagai target malaria dan telah menemukan beberapa senyawa dengan aktivitas fenotipik dan biokimia. Target yang divalidasi secara kimia dan klinis pada *Plasmodium falciparum* adalah Enzim protease aspartat (plasmepsin IV dan II) dan protease sistein (falcipain-2) yang memainkan peran penting dalam kelangsungan hidup parasit sebagai hidrolase peptida utama. Jalur degradasi hemoglobin dan perannya dalam menyediakan nutrisi serta menjadi target yang menjanjikan dalam pengembangan obat antimalaria baru (Kekessie *et al*, 2021). Hingga saat ini, inhibitor falcipain-2 dan plasmepsin (II dan IV) dapat menghambat parasit dan akan mencegah penyerapan nutrisi (Nahli *et al*, 2022).

Tanaman herbal telah digunakan lebih luas dari pada obat sintetis karena khasiatnya lebih tinggi, tidak memiliki efek samping, dan mudah diimplementasikan. Daun Maja (*Aegle marmelos* L.) dimanfaatkan sebagai tanaman obat tradisional untuk mengatasi berbagai penyakit, termasuk malaria. Pemanfaatan ini didukung oleh hasil penelitian ilmiah yang menunjukkan bahwa Daun Maja (*Aegle marmelos* L.) memiliki aktivitas antiplasmodial, mampu menekan tingkat parasitemia serta meningkatkan daya tahan hidup mencit yang terinfeksi parasit (Gandhi *et al*, 2019). Hal ini didukung oleh berbagai kandungan senyawa bioaktif di dalamnya, seperti β -sitosterol, flavonoid (rutin, flavone), alkaloid (aeglin, skimmianine) (Gupta *et al*, 2019) serta senyawa terpenoid dan fenolik lainnya yang dilaporkan memiliki aktivitas antiplasmodial (Maity *et al*, 2009). Keberadaan senyawa-senyawa tersebut berperan dalam menghambat pertumbuhan dan perkembangan parasit *Plasmodium* melalui berbagai mekanisme, seperti gangguan metabolisme parasit, inhibisi enzim protease penting, serta efek antioksidan yang dapat menekan stres oksidatif akibat infeksi malaria (Monika *et al*, 2023).

Berdasarkan penjelasan tersebut maka dilakukan penelitian dari ekstrak Daun Maja (*Aegle Marmelos* L.) untuk mengetahui kandungan senyawa secara *In Silico* dan *In Vivo* terhadap *Plasmodium Berghei*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas antimalaria dari ekstrak Daun Maja (*Aegle Marmelos* L.) secara *In Vivo* ?
2. Kandungan kimia apa yang terdapat dalam ekstrak Daun Maja (*Aegle Marmelos* L.) yang diidentifikasi dengan LC-HRMS ?

3. Bagaimana prediksi model interaksi senyawa kimia dalam ekstrak Daun Maja (*Aegle Marmelos* L.) dengan target protein yang terlibat dalam pertumbuhan plasmodium menggunakan pendekatan *Molecular docking* dan *Molecular dynamic* ?
4. Bagaimana prediksi ADMET senyawa bioaktif dari ekstrak Daun Maja (*Aegle Marmelos* L.) ?

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.3.1 Tujuan

1. Menentukan aktivitas antimalaria beberapa senyawa dalam ekstrak Daun Maja (*Aegle Marmelos* L.) secara *In Vivo*.
2. Menentukan kandungan kimia ekstrak Daun Maja (*Aegle Marmelos* L.) menggunakan LC-HRMS.
3. Menentukan prediksi model interaksi senyawa kimia dalam ekstrak Daun Maja (*Aegle Marmelos* L.) dengan target protein yang terlibat dalam pertumbuhan plasmodium menggunakan pendekatan *Molecular docking* dan *Molecular dynamic*.
4. Menentukan prediksi ADMET senyawa bioaktif dari ekstrak Daun Maja (*Aegle Marmelos* L.)

1.3.2 Manfaat

Dengan menggunakan prediksi *in silico* dan *in vivo*, penelitian ini diharapkan dapat mengembangkan ilmu pengetahuan terutama dibidang ilmu farmasi dengan menawarkan potensi obat baru untuk mengatasi penyakit yang malaria.

1.4 Teori

1.4.1 Docking

Docking Molekuler telah menjadi aspek penting dalam pengembangan obat *in silico*. Studi ini melibatkan prediksi interaksi antara molekul kecil dan protein pada tingkat atom (Sahoo *et al*, 2022). Hal ini memungkinkan peneliti untuk mempelajari molekul kecil, seperti nutraceuticals, dalam situs pengikatan protein target dan memahami proses biokimia mendasar yang mendasari interaksi ini (Meng *et al*, 2011). Teknik ini berbasis struktur dan memerlukan representasi 3D resolusi tinggi dari protein target yang diperoleh melalui teknik seperti kristalografi sinar-X, Spektroskopi Resonansi Magnetik Nuklir, atau Mikroskopi Krio-Elektron (Smyth & Martin 2000).

Ada beberapa alat dan algoritma komputasional yang tersedia untuk teknik docking molekuler, baik yang komersial maupun yang gratis. Program dan alat ini telah dikembangkan dan saat ini sedang digunakan dalam penelitian obat dan bidang akademis (Jorgensen, 2004). Beberapa program docking yang paling umum digunakan meliputi AutoDock Vina, Discovery Studio, Surflex, AutoDock GOLD, Glide, MCDock, MOE-Dock, FlexX, DOCK, LeDock, rDock, ICM, Cdcker, LigandFit, FRED, dan UCSF Dock. Di antara program-program ini, AutoDock Vina, Glide, dan AutoDock GOLD telah diidentifikasi sebagai pilihan peringkat teratas dengan skor terbaik (Potluri *et al*, 2021). Elektrostatis komputasional kompleks ligan-reseptor dapat dinilai, disaring, dan diprediksi melalui studi docking. Studi ini biasanya mengikuti dua langkah berbeda, Pertama, konformasi ligan diambil sampelnya menurut situs aktif protein. Kedua, konformasi diberi peringkat menurut fungsi penilaian. Algoritme pengambilan sampel secara teoritis harus mereproduksi mode pengikatan eksperimental, dan konfirmasi yang diperoleh harus diberi peringkat menurut fungsi penilaian (Dash *et al*, 2019). Pendekatan laboratorium menawarkan keuntungan yang signifikan dibandingkan studi lab *in vivo* dalam hal investasi sumber daya dan waktu (Sahoo *et al*, 2022., Pramanik *et al*, 2021., Nanda *et al*, 2018). Pendekatan ini memprediksi orientasi ligan dalam kompleks yang dibentuk oleh ligan itu sendiri dengan protein atau enzim. Selain itu, bentuk kompleks yang didocking dan interaksi elektrostatis mengukur interaksi tersebut.

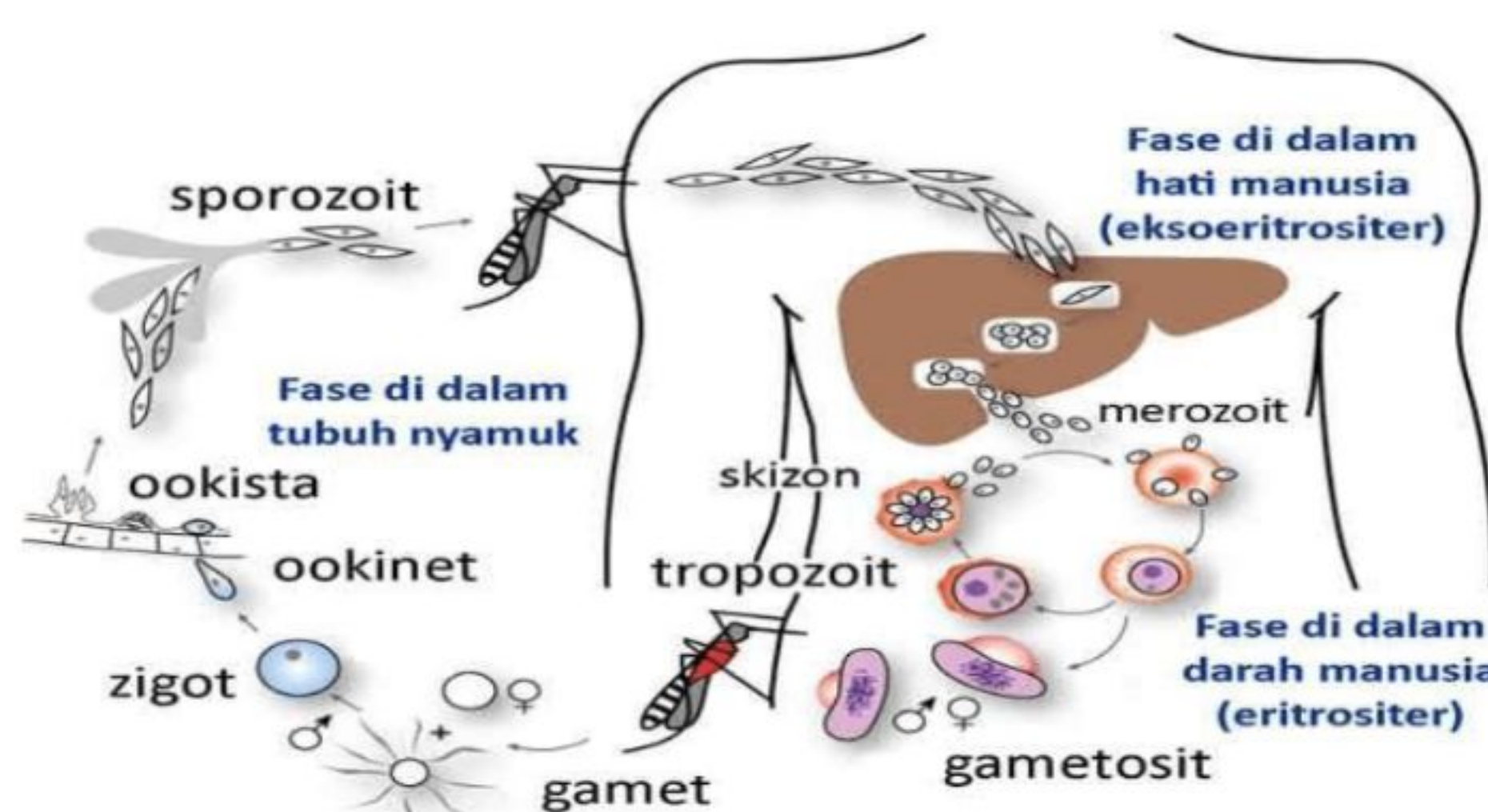
Berbagai faktor berkontribusi pada perencanaan dan perancangan protokol prosedural untuk studi eksperimental praklinis. Karena faktor-faktor ini beragam, fase perencanaan dan penelitian sangat penting untuk menciptakan studi yang aman dan praktis bagi hewan dan staf yang terlibat. Salah satu tantangan paling besar dalam merancang studi adalah memilih model hewan untuk evaluasi *in vivo* dari artikel uji (misalnya, terapi obat, teknik bedah, atau perangkat). Setiap model hewan berbeda dari manusia dalam beberapa hal anatomi dan fisiologi. Perbedaan ini dapat menimbulkan kendala, seperti bagi ahli bedah yang menerjemahkan hasil operasi dalam studi hewan ke manusia dalam uji klinis (Andrade *et al*, 2016). Beberapa peneliti tanpa sadar berasumsi bahwa hasil yang luar biasa dari model teoritis dan komputasional akan menghasilkan hasil yang sedikit berkurang atau bahkan identik dalam model hewan. Namun, hal ini jarang terjadi. Lebih sering, model hewan memberikan kesempatan untuk pelatihan bedah *in vivo* dan pengembangan awal perangkat. Saat memilih model hewan, melakukan penelusuran literatur menyeluruh diperlukan karena beberapa alasan. Pertama, penelusuran literatur akan membantu menentukan model hewan yang paling sesuai untuk percobaan, seperti menunjukkan model hewan mana yang paling mirip dengan struktur anatomi manusia yang sedang dipelajari. Kedua, penelusuran literatur dapat membantu menentukan bahwa belum ada penelitian serupa yang dilakukan. Selain itu, tinjauan literatur membantu menyusun kerangka kerja yang dapat digunakan untuk menentukan keberhasilan penelitian (Pubrica, 2023).

1.4.2 Mekanisme Target Protein Antimalaria

Malaria Adalah salah satu masalah kesehatan masyarakat yang dapat menyebabkan kematian terutama pada kelompok risiko tinggi, yaitu bayi, anak balita, dan ibu hamil. Selain itu, malaria secara langsung menyebabkan anemia dan dapat menurunkan produktivitas kerja (Permenkes RI, 2013). Parasit plasmodium memiliki siklus hidup multi tahap, yang menyebabkan demam siklus yang khas. Dengan pengobatan yang tepat waktu, kebanyakan orang mengalami gejala yang cepat namun komplikasi yang signifikan dapat terjadi termasuk malaria serebral, anemia berat, koma, atau kematian. Regimen terapi antimalaria dan kemoprolifaksis yang disukai ditentukan oleh spesies, geografi, kerentanan, dan demografi pasien. Infeksi laten atau reaktivasi dapat dilaporkan bertahun-tahun setelah paparan (Garcia, 2010).

Siklus hidup parasit di dalam tubuh manusia dimulai dengan inokulasi sporozoit ke dalam kulit manusia melalui gigitan nyamuk yang terinfeksi sporozoit ini (yang memiliki morfologi seperti larva) dengan cepat diangkut ke hati setelah mencapai aliran darah dan sporozoit tersebut ditahan di sana oleh molekul-molekul tertentu yang memastikan bahwa parasit tersebut tidak tereliminasi di dalam limpa (Frevert *et al*, 2005). Sporozoit ini menginfeksi hepatosit menyebabkan perkembangan intrahepatik yang (melalui proliferasi dan diferensiasi) berpuncak pada pelepasan merozoit yang mampu menginfeksi eritrosit (Ishino *et al*, 2004).

Siklus eritrosit parasit dimulai dengan pengenalan merozoit, pengikatan, dan invasi sel darah merah. Setelah eritrosit diinvasi, parasit ditemukan di dalam vakuola parasitofor. Perkembangan intraeritrosit parasit melewati beberapa tahap (cincin, trofozoit, dan skizon); merozoit baru akhirnya berkembang, yang dibebaskan setelah lisis eritrosit untuk menginfeksi eritrosit baru (Bannister & Mitchell, 2003). Beberapa merozoit mengembangkan morfologi parasit seksual (gamet jantan dan betina) yang diangkut ke perut nyamuk saat menelan makanan darah manusia. Setelah berada di perut, parasit mengalami serangkaian transformasi, yang berpuncak pada perkembangan sporozoit baru yang menyerang kelenjar ludah sehingga dapat diinokulasi ke inang lain (James, 2003).



Gambar 1. Siklus Hidup Parasit Plasmodial

Dalam pendekatan penyaringan fenotipik yang umum untuk mengidentifikasi titik awal baru bagi penemuan obat antimalaria, sintesis diprofilkan terhadap parasit sel utuh yang dikultur pada tahap siklus hidup yang diinginkan untuk menentukan aktivitas *In Vitro*nya. Prinsip bebas target dari metode ini memungkinkan penyaringan yang tidak bias terhadap semua target yang dapat diberi obat, bergantung pada keberadaan molekul aktif dalam pustaka senyawa yang diuji. Contoh dalam metode HTS (*high-throughput screening*) yang berhasil terhadap parasit tahap darah aseksual *Plasmodium falciparum* telah dilaporkan (Plouffe *et al*, 2008). Pendekatan ini memiliki keuntungan dalam memperhitungkan sifat-sifat senyawa, seperti permeabilitas sel dan interaksi pada target dan menyediakan potensi terbesar untuk menemukan senyawa poten dengan cara kerja baru (Hovlid & Winzeler, 2018). Banyak antimalaria dalam jalur produksi ditemukan dari penyaringan fenotipik, termasuk ganaplacide (KAF156), cipargamin (KAE609), cabamiquine (M5717, DDD107498, MMV643121). Baru-baru ini, penyaringan fenotipik telah dilakukan pada stadium hati dan gametosit (Delves, 2018). Pendekatan berbasis target melengkapi penyaringan fenotipik dan memberikan peluang untuk mengembangkan uji biokimia baru untuk target baru yang menjanjikan. Senyawa dirancang secara rasional dengan potensi dan selektivitas yang lebih baik terhadap target, termasuk penggunaan metode seperti penyaringan pustaka yang dikodekan DNA, pembangkitan hit berbasis fragmen dan berbasis struktur, dan penyaringan virtual dimana struktur senyawa secara komputasional disambungkan ke dalam struktur protein (Forte *et al*, 2021).

Falcipain-II adalah salah satu enzim protease yang berasal dari *Plasmodium falciparum*. Enzim ini termasuk dalam kelompok protease sistein dan memiliki peran penting dalam pencernaan hemoglobin oleh parasit selama fase eritrositik dalam siklus hidupnya. Falcipain-II memecah hemoglobin manusia menjadi peptida kecil yang kemudian digunakan oleh parasit sebagai sumber asam amino untuk pertumbuhan dan replikasi (Rosenthal, 2004). Falcipain-II bekerja di dalam vakuola makanan parasit yang merupakan lingkungan asam (pH rendah) kondisi yang optimal untuk aktivitas enzim (Sijwali & Rosenthal, 2004).

Plasmepsin-II memiliki domain aktif yang terdiri dari dua residu aspartat yang berperan sebagai katalis, enzim ini memulai proses degradasi hemoglobin dengan memecah rantai polipeptida di dekat heme. Produk awalnya adalah peptida besar yang kemudian didegradasi lebih lanjut oleh enzim lain seperti plasmepsin-IV dan protease tambahan. Plasmepsin-II memotong peptida hasil degradasi hemoglobin menjadi fragmen yang lebih kecil, fragmen kecil yang dihasilkan akhirnya digunakan untuk kebutuhan energi parasit setelah heme dioksidasi menjadi senyawa yang tidak toksik oleh enzim *heme detoxification*, berperan dalam langkah-langkah lanjutan degradasi hemoglobin dan memiliki aktivitas proteolitik spesifik terhadap ikatan tertentu dalam peptida (Ersmark *et al*, 2006). Enzim protease ini merupakan target utama untuk mencari obat antimalaria. Docking molekular digunakan dalam desain obat

karena kemampuannya untuk secara substansial memprediksi konformasi ligan dalam situs pengikatan target yang tepat (Meng *et al*, 2011).

1.4.3 Daun Maja (*Aegle marmelos* L.)

Menurut BPOMRI (2008), kedudukan taksonomi tanaman maja (*Aegle marmelos* L.) dalam tatanan atau sistematika (taksonomi) tumbuhan adalah sebagai berikut:

Divisi : Spermatophyta

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledoneae

Bangsa : Sapindales

Suku : Rutaceae

Marga : *Aegle*

Jenis : *Aegle marmelos* (L.) Correa



Gambar 2. Daun Maja (*Aegle marmelos* L.)

Daun Maja (*Aegle marmelos* L.) merupakan tanaman subtropis yang bersifat gugur daun (*deciduous*) dan memiliki kemampuan adaptasi tinggi sehingga dapat tumbuh pada berbagai kondisi lingkungan. Tanaman ini memiliki tangkai daun relatif panjang dengan susunan daun majemuk, dimana daun lateral berukuran sekitar 4,1 cm dan umumnya terdiri atas dua hingga tiga anak daun. Secara etimologis, nama genus berasal dari bahasa Yunani, sedangkan epitet spesies *marmelos* berasal dari bahasa Portugis. Pohon *Aegle marmelos* dapat tumbuh hingga ketinggian 6–8 m dengan daun majemuk trifoliat yang bersifat aromatik. Daun terminal berukuran panjang sekitar 5,7 cm dan lebar 2,8 cm, sedangkan daun lateral memiliki panjang sekitar 4,1 cm hingga 2,2 cm dengan tangkai sangat pendek atau hampir tidak bertangkai (Baliga *et al.*, 2011). Beberapa kelainan morfologi pada daun maja (*Aegle marmelos* L.) telah dilaporkan (Rao *et al.*, 2003). Karakteristik pola perkembangan daun dan pertumbuhan tunas dari delapan genotipe terpilih juga telah dikaji (Baliga *et al.*, 2011). Tanaman ini memiliki cabang yang khas dengan duri aksiler yang kuat, serta kulit batang yang beralur dangkal dan menyerupai gabus. Bunganya bersifat biseksual, berukuran relatif kecil dengan ketebalan sekitar 3 mm, serta menghasilkan buah berdaging lunak berwarna kuning hingga jingga yang sangat aromatik dan beraroma khas. Jumlah ruang biji (lokulus) pada buah yang tersusun melingkar sesuai dengan jumlah ruang pada bakal buah. Biji berjumlah banyak, padat, dan tersusun rapat dalam tiap lokulus. Perbungaan tersusun dalam malai lateral yang terdiri atas sekitar 10 bunga berwarna putih kehijauan dengan aroma manis. Kelopak bersifat gamosepalus, berlobus lima dan berbulu, sedangkan mahkota bunga umumnya terdiri atas lima helai (kadang empat) yang bersifat polipetalus dengan tekstur agak kasar.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian *in vivo* dilakukan di Laboratorium Parasitologi-Fitokimia Universitas Hasanuddin dan Penelitian *in silico* dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang dimulai pada 1 Oktober 2025 sampai dengan 30 Desember 2025.

2.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada pengujian observatif meliputi: Batang pengaduk, blender, cawan porselin, corong pisah, canula, gelas kimia (Pyrex®), labu ukur (Pyrex®), oven, pipet, rotary evaporator (Heidolph®), toples kaca, vial, timbangan analitik, waterbath (Memmer®) dan LC-HRMS, tissue. Adapun bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah aquadest, aluminium foil, artesunate murni, DMSO 0,1%, ekstrak Daun Maja (*Aegle Marmelos* L.), etanol 96 %, etil-asetat, heparin, ketamin, kertas saring, n-heksan, nacl 0,9% piggy bag, primaquine tablet, strain *Plasmodium berghei* ANKA diperoleh dari Prof. Laurent Renia di Badan Sains, Teknologi, dan Penelitian (A*STAR) di Singapura dengan izin dari Profesor Syafruddin dari Institut Eijkman untuk Biologi Molekuler dan Dr. Puji Setia Budi Asih dari Badan Inovasi dan Penelitian Nasional (BRIN). Studi *in vivo* adalah mencit (*mus musculus*).

Studi *in silico* ini terdiri dari perangkat keras berupa laptop dengan spesifikasi: *Processor* Intel i5-1235U CPU @ 1.30 GHz, RAM 8,00 GB DDR4-3200, 64-bit *Operating system*, dan SSD 512 GB, Autodock Vina, Marvin Sketch, Chimera, Discovery Studio 2016, Microsoft Excel.

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Determinasi Sampel

Daun Maja (*Aegle Marmelos* L.) ditentukan di Laboratorium Farmakognosi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Indonesia dengan nomor deposit: 014/SKIT/Farmakognosi/VIII/2025. Hasil penentuan kunci determinasi : 133. Rutaceae., 1b..., 2a..., 3b..., 4a. (22. *Aegle*), termasuk dalam famili Rutaceae.

2.3.2 Pengambilan dan Penyiapan Sampel

Sampel Daun Maja (*Aegle marmelos* L.) segar diperoleh dari wilayah administratif Kelurahan Antang, Kecamatan Manggala, Kota Makassar sebanyak 1,5 kg. Identifikasi morfologi daun menunjukkan ukuran panjang sekitar 5,7 cm, lebar 2,8 cm, daun lateral sepanjang 4,1 cm dan yang lebih pendek sekitar 2,2 cm, dengan tangkai sangat pendek atau hampir tidak bertangkai (Baliga *et al.*, 2011). Sampel kemudian disortasi basah dan dicuci berulang menggunakan air mengalir untuk menghilangkan tanah serta pengotor lainnya yang melekat. Selanjutnya dilakukan perajangan dengan memotong sampel menjadi bagian kecil, kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50–60 °C selama 30 menit. Sampel kering selanjutnya dihaluskan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan nomor 40 hingga diperoleh simplisia Daun Maja (*Aegle marmelos* L.).

2.3.3 Metode Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi. Sebanyak 845 g Daun Maja (*Aegle marmelos* L.) dimasukkan ke dalam bejana maserasi, kemudian ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 10L dan diaduk untuk meningkatkan kontak antara sampel dan pelarut. Setelah proses maserasi berlangsung selama tiga hari, cairan penyari diganti dengan etanol 96% segar sebanyak 10L, dan proses penggantian pelarut dilakukan sebanyak tiga kali. Selanjutnya, seluruh ekstrak dikumpulkan dan disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan ampas dari filtrat. Filtrat yang diperoleh kemudian

dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40 °C hingga pelarut menguap dan diperoleh ekstrak kental (Aliah *et al.*, 2019).

2.3.4 Metode Fraksinasi

Fraksinasi memiliki tujuan untuk memisahkan senyawa berdasarkan kepolarannya. Fraksinasi yang digunakan yaitu metode ekstraksi cair-cair. Ekstrak etanol yang dilarutkan dalam aquadest dengan perbandingan (1:10). Pertama n-heksan digunakan sebagai pelarut untuk mengekstrak senyawa non-polar dari campuran. Setelah pencampuran dikocok selama 15 menit, kemudian didiamkan hingga membentuk dua fase terbentuk: fase organik (n-heksan) yang mengandung senyawa non-polar dan fase yang tidak larut. Proses hingga n-heksan berwarna bening. Proses fraksinasi terus berlanjut dengan cara kerja yang sama menggunakan pelarut yang berbeda yaitu etil asetat, sehingga dihasilkan dua fraksi: n-heksan (non-polar) dan etil asetat (semi-polar). Setelah didapatkan hasil fraksinasi kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator dan waterbath (Wahyukurnia *et al.*, 2023).

2.3.5 Analisis LC-HRMS Ekstrak Daun Maja (*Aegle marmelos* L.)

Ekstrak Daun Maja (*Aegle Marmelos* L.) masing-masing dianalisis menggunakan LC-HRMS dengan cara ekstrak sebanyak ± 0.1 mg dilarutkan dalam pelarut etanol kemudian dihomogenisasi dengan menggunakan vortex kemudian disaring menggunakan 0.2 μ M miles. Selanjutnya masing-masing 5 μ L ekstrak diinjeksi ke LC-HRMS kemudian hasilnya ditunggu dan dibaca (Dwiyanti *et al.*, 2023).

2.4 Uji *In Vivo* senyawa-senyawa dari *Aegle marmelos* L.

2.4.1 Etika Penelitian

Penelitian yang menggunakan hewan uji harus mematuhi prinsip-prinsip etika penelitian, termasuk prinsip 3R (Replacement, Reduction, Refinement), yang bertujuan untuk menggantikan hewan dengan metode alternatif, mengurangi jumlah hewan yang digunakan, serta memperbaiki metode agar mengurangi rasa sakit dan penderitaan hewan. Selain itu, penelitian ini telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Hewan dari Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin dengan nomor : **2673/UN4.1.23/KP.06.05/2025** serta mengikuti pedoman internasional seperti yang ditetapkan oleh OECD dan ARRIVE Guidelines (Festing & Wilkinson, 2007).

2.4.2 Determinasi Sampel

Daun Maja (*Aegle Marmelos* L.) ditentukan di Laboratorium Farmakognosi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Indonesia dengan nomor deposit: 014/SKIT/Farmakognosi/VIII/2025. Hasil penentuan kunci penentuan: 133. Rutaceae., 1b..., 2a..., 3b..., 4a. (22. *Aegle*), termasuk dalam famili Rutaceae.

2.4.3 Pengelompokkan Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan hewan uji mencit (*Mus musculus*) sebanyak 25 ekor dengan berat badan 20 – 30 gram dikelompokkan menjadi 6 kelompok perlakuan kelompok fraksi n-heksan, etil asetat, ekstrak etanol dan primaquine, artesunate sebagai kontrol positif dan Na-CMC sebagai kontrol negatif. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor mencit (*Mus musculus*) (Kadir & Yuniarto, 2022).

2.4.4 Aklimatisasi Hewan Uji

Proses aklimatisasi dilakukan dengan cara meletakkan mencit diruang hewan selama 7 hari sebelum percobaan. Mereka ditempatkan pada suhu 25-28 °C dan diberi pelet diet standar AD I dan air minum (Yusuf, 2024).

2.4.5 Preparasi sediaan dan Obat uji

Sediaan obat uji adalah fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan ekstrak etanol Daun Maja (*Aegle Marmelos* L.), Dosis obat uji dimulai dari 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB dan 600

mg/kgBB disetiap kelompok perlakuan pemberian obat selama 4 hari berturut-turut (Kadir & Yuniarto, 2022).

Perhitungan konsentrasi sediaan ekstrak yang akan diberikan ke mencitnya (berat mencit berdasarkan dari berat yang ditimbang adalah 0,029mg/KgBB) Volunteers (2002). :

- Dosis 200mg : $200 \times 0,029\text{mg/KgBB} = 5,8 \text{ mg/ KgBB per mencit.}$
- Dosis 400mg : $400 \times 0,029\text{mg/KgBB} = 11,6 \text{ mg/ KgBB per mencit.}$
- Dosis 600mg : $600 \times 0,029\text{mg/KgBB} = 17,4 \text{ mg/ KgBB per mencit.}$

2.4.6 Inokulasi *Plasmodium Berghei* pada hewan uji

Mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* diambil darahnya melalui ekor dan ditentukan bagaimana rumus persen parasitemia. Setelah diketahui, mencit sumber infeksi diambil semua darahnya melalui punksi jantung dengan menggunakan spuit 1 ml yang telah diberi antikoagulan, lalu diencerkan sampai konsentrasinya 1×10^7 . Larutan ini digunakan untuk menginfeksi hewan coba secara injeksi intraperitoneal sebanyak 0,1 ml (Iqbal *et al*, 2013). Sebelum punksi jantung mencit dianestesi menggunakan ketamin dengan dosis 0,1 mg/kgBB untuk memastikan prosedur berlangsung tidak menyebabkan rasa sakit atau stres pada hewan.

2.4.7 Uji Aktivitas antimalaria secara *in vivo*

Pada hari pertama uji aktivitas antimalaria (hari ke-0), mencit diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* kemudian diberi sediaan obat uji sesuai dengan dosis yang telah ditentukan 3 jam setelah injeksi dilanjutkan pemberian ekstrak 3 hari berturut-turut. Darah mencit diambil pada hari ke-4 dengan cara dipotong ujung ekornya untuk diperiksa parasitemianya (Iqbal *et al*, 2013). Preparat sediaan apusan darah tipis dibuat menggunakan metode (Markell *et al*, 1986) dengan pewarnaan Giemsa 10%.

2.4.8 Parameter Persentase parasitemia

Parameter yang diukur adalah persentase parasitemia hari ke-4 dari sediaan darah yang diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran kuat (lensa okuler 10x dan lensa objektif 100x) menggunakan minyak immersi. Pemeriksaan ini dilakukan untuk setiap 1000 eritrosit (Iqbal *et al*, 2013).

Rumus untuk menghitung persentase penekanan adalah sebagai berikut (Philipsson, 1991).

$$\text{Penekanan parasit (\%)} : \frac{P_n - P_t}{P_n} \times 100$$

Catatan : P_n = parasitemia dari kelompok kontrol negatif (rata-rata); P_t = parasitemia dari kelompok yang diobati (rata-rata).

2.4.9 Daya Tahan Hidup (Survival)

Pengamatan terhadap daya tahan hidup dilakukan dengan mencatat jumlah hewan uji yang bertahan hidup setiap hari. Seluruh parameter diamati dan dicatat secara harian sejak hari infeksi, selama periode pemberian pengobatan, hingga setelah pengobatan selesai (Sadikin, 1989).

Adapun rumus untuk menghitung persentase survival sebagai dasar perhitungan kurva Kaplan-Meier (Peters, 1965).

$$\text{Survival (\%)} : \frac{N_t}{N_0} \times 100$$

Catatan : N_t = jumlah hewan uji yang masih hidup pada hari ke-t ; N_0 = jumlah total hewan uji pada awal penelitian (H-0).

2.5 Uji *In Silico* senyawa-senyawa dari *Aegle marmelos* L.

2.5.1 Molecular Docking

Struktur ligan dibuat menggunakan aplikasi Chem Draw. Struktur kristal protein target diunduh dari protein data bank ([https://www.rcsb.org./](https://www.rcsb.org/)) dengan kode PDB : Falcipain-2 protease (PDB ID: 6SSZ), Plasmepsin II (PDB ID: 1LF3), Plasmepsin IV (PDB ID: 1LS5) (Amengor *et al.*, 2024). UCSF-Chimera yang terhubung dengan Autodock Vina digunakan untuk melakukan *molecular docking*. Tahap pertama dimulai dari preparasi struktur ligan dan protein dengan menggunakan menu *dock-prep*. Selanjutnya dilakukan proses docking dengan menentukan *grid-box* dan direktori penyimpanan *file* melalui menu Autodock Vina. Adapun visualisasi hasil docking dilakukan menggunakan aplikasi Discovery Studio (Butt *et al.*, 2020).

2.5.2 Molecular Dynamic

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 (Wang *et al.*, 2004). Kompleks diatur pada suhu 310 K dan pH 7,4. Pelarut TIP3P (Mark & Nilsson, 2001).

Counterion (Na^+ , Cl^-) ditambahkan untuk menetralkan sistem. Kemudian, sistem dijalankan selama 100 ns pada rentang waktu 0,25 fs (femtosecond). Data lintasan dikumpulkan setiap 25 ps (picosecond) dan digunakan untuk menganalisis deviasi kuadrat rata-rata (RMSD), fluktuasi kuadrat rata-rata (RMSF) dan jari-jari putaran.

2.5.3 Prediksi ADMET

Pada tahap ini, dilakukan prediksi profil farmakokinetika yakni Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, dan Ekskresi menggunakan webserver SwissADMET (<https://www.swissadme.ch/index.php>) (Daina *et al.*, 2017), ADMETlab 2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com/>) (Xiong *et al.*, 2021), pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction>) (Pires *et al.*, 2015), SmartCYP (https://smartcyp.sund.ku.dk/mol_to_som) (Olsen *et al.*, 2019). Sedangkan untuk pengujian toksikologi menggunakan webserver ProTox II (https://tox-new.charite.de/protox_II/index.php?site=compound_input) (Banerjee *et al.*, 2018).