

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Beban malaria secara global masih menjadi permasalahan kesehatan masyarakat yang serius. Data terkini menunjukkan adanya peningkatan kembali jumlah kasus dan kematian akibat malaria. Laporan *World Malaria Report 2023* dari Organisasi Kesehatan Dunia menyatakan bahwa jumlah kasus malaria pada tahun 2022 telah melampaui tingkat sebelum pandemi, yang menegaskan bahwa malaria tetap menjadi ancaman kesehatan global yang berkelanjutan (Venkatesan, 2024). Pada tahun 2021, diperkirakan terdapat sekitar 247 juta kasus malaria, dengan sebagian besar kasus terjadi di negara-negara Afrika yang masih menanggung beban penyakit tertinggi (Amoah *et al.*, 2023). Estimasi tahun 2022 menunjukkan peningkatan menjadi sekitar 249 juta kasus dengan 608.000 kematian di 85 negara, di mana wilayah Afrika menyumbang sekitar 95% dari total kasus dan mayoritas kematian, terutama pada kelompok anak usia di bawah lima tahun (Diseases, 2024). Di Indonesia, khususnya di wilayah Papua dan Papua Barat, angka kejadian malaria masih tinggi dan berkontribusi lebih dari 90% terhadap total beban malaria nasional ((Ashar *et al.*, 2025)

Terapi antimalaria yang saat ini tersedia mencakup turunan kina, senyawa 8-aminokuinolin seperti primaquin, serta obat golongan antifolat (Alghamdi *et al.*, 2024). *Artemisinin based Combination Therapies* (ACT) termasuk dihydroartemisinin–piperaquine, artemether–lumefantrine, dan artesunate–amodiaquine, merupakan regimen yang paling banyak digunakan dalam penatalaksanaan malaria tanpa komplikasi (Rajendran, 2013). Kina, sebagai senyawa alami yang diekstraksi dari kulit batang pohon *Cinchona*, terutama bekerja pada fase eritrositik dari siklus hidup *Plasmodium*. Mekanisme kerjanya melibatkan gangguan terhadap proses pencernaan hemoglobin oleh parasit, yang mengakibatkan akumulasi heme toksik sehingga bersifat letal bagi parasit (Rawe & McDonnell, 2020). Senyawa 8-aminoquinolin bekerja dengan menghambat aktivitas sitokrom c reduktase pada kompleks III rantai transpor elektron mitokondria parasit, yang menyebabkan disfungsi mitokondria dan memicu kematian sel menyerupai apoptosis (Carvalho *et al.*, 2010). Sementara itu, obat antifolat, seperti kombinasi sulfadoksin–pirimetamin, menargetkan jalur biosintesis folat yang esensial bagi pembentukan asam nukleat dan protein. Penghambatan jalur ini mengakibatkan terganggunya sintesis DNA dan proses pembelahan sel, sehingga berujung pada kematian parasit (Schlitzer, 2009)

Meskipun telah terjadi kemajuan dalam pengembangan terapi dan strategi pengendalian, pengobatan malaria hingga saat ini masih dihadapkan pada berbagai tantangan yang signifikan. Salah satu permasalahan utama adalah meningkatnya resistensi obat, khususnya terhadap ACT yang selama ini menjadi pilar utama dalam tata laksana malaria. Fenomena resistensi ini terutama dilaporkan di kawasan Asia Tenggara, sehingga menurunkan efektivitas pengobatan dan mendorong kebutuhan mendesak akan pengembangan agen antimalaria generasi baru (Alghamdi *et al.*, 2024). Pengembangan senyawa antimalaria baru yang menargetkan protease parasit, seperti *Plasmepsin II* (PMII), *Plasmepsin IV* (PMIV), dan *Falcipain 2* (FP2), menjadi semakin penting seiring dengan meningkatnya resistensi *P. falciparum* terhadap terapi yang ada. PMII dan PMIV merupakan protease aspartat yang berperan dalam proses degradasi hemoglobin di dalam vakuola makanan parasit, sehingga menjadikannya target molekuler yang potensial dalam perancangan obat antimalaria (Patrick, 2020). Selain itu, FP2 yang termasuk dalam golongan protease sistein, juga memiliki peran krusial dalam pemecahan hemoglobin dan telah diidentifikasi sebagai target terapeutik yang menjanjikan. Berbagai jenis inhibitor FP2 telah dikembangkan dan dievaluasi, termasuk inhibitor ireversibel seperti klorometil keton dan vinil sulfon, serta inhibitor kovalen yang bersifat reversibel. Sejumlah studi menunjukkan bahwa inhibitor yang menargetkan FP2 memiliki potensi yang signifikan, di mana pendekatan skrining virtual dan *molecular docking* berhasil mengidentifikasi senyawa-senyawa kandidat dengan afinitas pengikatan yang tinggi serta karakteristik *drug-like* yang menguntungkan (Darmin *et al.*, 2024). Secara keseluruhan, penerapan desain obat berbasis struktur yang dikombinasikan dengan metode komputasi terus mendorong kemajuan dalam penemuan inhibitor baru terhadap protease tersebut, sehingga membuka peluang bagi pengembangan terapi antimalaria yang lebih efektif di masa mendatang (González *et al.*, 2023).

Arcangelisia flava yang dikenal luas dengan nama kayu kuning, telah diidentifikasi sebagai kandidat potensial dalam pengembangan obat antimalaria. Hal ini didukung oleh pemanfaatannya secara tradisional dalam pengobatan malaria di berbagai wilayah Asia Tenggara serta kandungan metabolit bioaktifnya yang beragam. Tanaman ini diketahui mengandung berbagai senyawa aktif secara fisiologis, seperti furanoditerpen, alkaloid, flavonoid, tanin, dan senyawa fenolik, yang berkontribusi terhadap aktivitas farmakologinya, termasuk sifat antimikroba dan antioksidan (Yabansabra *et al.*, 2025). Studi eksperimental terkini melaporkan bahwa ekstrak *A. flava* menunjukkan aktivitas antimalaria secara *in vitro* terhadap strain *P. falciparum* 3D7 dengan nilai IC₅₀ sebesar 1,811 µg/mL, yang mengindikasikan potensi kuat tanaman ini sebagai sumber senyawa antimalaria baru (Lovin *et al.*, 2012). Penelitian terhadap senyawa antimalaria yang berasal dari tumbuhan memiliki peran strategis karena dapat menyediakan kerangka kimia dan mekanisme kerja baru yang berpotensi mengatasi meningkatnya resistensi parasit terhadap obat antimalaria yang ada (Batista *et al.*, 2009). Berdasarkan bukti-bukti tersebut, *A. flava* menunjukkan prospek yang menjanjikan untuk dikaji lebih lanjut sebagai kandidat dalam pengembangan agen antimalaria berbasis bahan alam.

Pengembangan obat antimalaria berbasis bahan alam memerlukan pendekatan terpadu untuk menjawab tantangan terapi yang ada, khususnya resistensi obat. Pemanfaatan potensi bioaktif senyawa yang terkandung dalam *A. flava* serta penerapan metode komputasi menjadi strategi yang relevan dalam upaya penemuan agen antimalaria baru. Pendekatan *in vivo* yang dilakukan pada mencit yang diinfeksi *P. berghei* memberikan informasi penting terkait efektivitas dan profil keamanan kandidat senyawa antimalaria yang berasal dari tanaman *A. flava*. Pendekatan *in silico* digunakan sebagai pelengkap dengan memprediksi serta mengidentifikasi senyawa-senyawa potensial yang memiliki afinitas pengikatan tinggi terhadap target Protein kunci parasit malaria, seperti PMII, PMIV, dan FP2 (Ezugwu *et al.*, 2022). Integrasi kedua pendekatan ini memungkinkan evaluasi yang lebih komprehensif terhadap potensi antimalaria suatu bahan alam. Berdasarkan pertimbangan tersebut, penelitian ini dirancang untuk mengevaluasi aktivitas antimalaria ekstrak daun kayu kuning *A. flava* melalui pendekatan *in vivo* dan *in silico* sebagai langkah awal dalam pengembangan kandidat obat antimalaria baru.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas antimalaria senyawa-senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak daun *A. flava* berdasarkan pengujian *in vivo*?
2. Apa saja profil dan komposisi senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak daun *A. flava* yang dapat diidentifikasi menggunakan metode *Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry* (LC-HRMS)?
3. Bagaimana prediksi interaksi molekul antara senyawa-senyawa bioaktif dalam ekstrak daun *A. flava* dengan protein target yang berperan dalam pertumbuhan dan kelangsungan hidup *Plasmodium* berdasarkan pendekatan *molecular docking* dan *molecular dynamic*?
4. Bagaimana prediksi sifat farmakokinetik dan toksikologi (ADMET) dari senyawa bioaktif utama yang teridentifikasi dalam ekstrak daun *A. flava*?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan aktivitas antimalaria secara *in vivo* dari beberapa senyawa yang terkandung dalam ekstrak *A. flava*.
2. Mengidentifikasi dan mengkarakterisasi kandungan kimia dalam ekstrak *A. flava* menggunakan teknik LC-HRMS
3. Memprediksi model interaksi molekul antara senyawa-senyawa kimia bioaktif dalam ekstrak *A. flava* dengan protein target melalui pendekatan *molecular docking* dan *molecular dynamic*.
4. Memprediksi (ADMET) dari senyawa bioaktif yang teridentifikasi dalam ekstrak *A. flava*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memperkaya khasanah ilmu pengetahuan di bidang kimia bahan alam dan bioinformatika dengan memberikan pemahaman ilmiah mengenai potensi senyawa bioaktif dari ekstrak *A. flava* sebagai agen antimalaria. Selain itu, hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam pemahaman mekanisme molekuler interaksi antara senyawa kimia alami

dengan protein target yang berperan dalam pertumbuhan *Plasmodium*, khususnya melalui pendekatan *in vivo* dan komputasional.

1.5. Teori Penelitian

1.5.1 Klasifikasi Tanaman *A. flava*

Kingdom : Plantae
Order : Tracheophyta
Subclass : Magnoliopsida
Suborder : Ranunculales
Family : Menispermaceae
Genus : *Arcangelisia*
Species : *Arcangelisia flava* (L). Merr (Sulistiarini *et al.*, 2020)

1.5.2 Morfologi tanaman *A. flava*.

A. flava merupakan spesies tumbuhan yang umumnya ditemukan pada ketinggian 100–800 meter di atas permukaan laut, terutama di kawasan tepi hutan. Tumbuhan ini tumbuh sebagai liana atau tanaman merambat yang menjalar di permukaan tanah maupun pada batang tumbuhan lain. Spesies ini dilaporkan telah dikoleksi dari wilayah Kalimantan Tengah. Daunnya sebagian besar tersusun berseling, bertekstur tebal, dengan bentuk bervariasi mulai dari lonjong meruncing, elips, hingga menyerupai jantung. Daun memiliki lima tulang daun utama yang bercabang dari pangkal, dengan warna hijau muda pada daun muda dan berubah menjadi hijau tua saat dewasa. Bunga bersifat uniseksual, tumbuh di ketiak daun, tidak memiliki kelopak, berwarna kuning keputihan, dan telah dilaporkan berbunga oleh (Liem *et al.*, 2018)

Menurut (Galingging *et al.*, 2021), buah *A. flava* berwarna kuning dengan ujung tangkai berbentuk seperti gada, memiliki endokarp berkayu yang sedikit melebar ke samping, berbentuk subo void melintang, berlandir, serta memiliki aroma dan rasa yang lemah dan pahit. Endosperm, kotiledon, dan bijinya berbentuk elips lebar. Kulit batang luar bertekstur kasar dan berwarna coklat gelap, sedangkan bagian dalam batang berwarna kuning cerah. Sistem perakarannya berupa akar tunggang yang tebal dengan warna coklat gelap. Istilah “kuning” merujuk pada warna kayu serta getah berwarna kuning yang keluar saat batang dipotong. Warna tersebut berkaitan dengan kandungan berberin, yaitu alkaloid berwarna kuning keemasan yang terdapat pada akar dan batang tanaman ini (Z. Kusuma *et al.*, 2018)



A



B

Gamabar 1. A: Daun *A. flava*, B: Bunga *A. flava*

1.5.3 In silico

1.5.3.1 Molecular docking

Penelitian eksperimental yang dilakukan secara *in silico* merupakan pendekatan berbasis komputer yang semakin banyak digunakan dalam penemuan obat. *Molecular docking* adalah teknik

yang menggunakan simulasi virtual untuk menguji interaksi antara senyawa dan protein. Dalam proses ini, struktur tiga dimensi yang dihasilkan oleh komputer diberi kebebasan untuk berinteraksi dalam berbagai posisi, orientasi, dan konformasi, memungkinkan pemahaman yang lebih mendalam tentang cara molekul kecil berikatan dengan targetnya. Pendekatan ini memungkinkan para peneliti untuk mengevaluasi potensi pengikatan dan afinitas molekul terhadap target secara efisien. (Sahoo *et al.*, 2022)

Perkembangan program dan alat dalam melakukan teknik *molecular docking* baik yang komersial maupun yang gratis, meliputi AutoDock Vina, Discovery Studio, Surflex, AutoDock GOLD, Glide, MCDock, MOE-Dock, FlexX, DOCK, LeDock, rDock, ICM, CDOCKER, LigandFit, FRED, dan UCSF Dock (Potluri *et al.*, 2021).

Metode *molecular docking* merupakan salah satu pendekatan komputasional yang banyak digunakan dalam penelitian penemuan obat untuk memprediksi interaksi antara ligan dan protein target. Proses *molecular docking* umumnya meliputi tahap persiapan struktur protein dan ligan, pemilihan algoritma *docking* yang sesuai, serta analisis hasil interaksi yang diperoleh. Struktur protein target biasanya diperoleh dari basis data Protein Data Bank (PDB), yang menyediakan informasi tiga dimensi protein hasil penentuan eksperimental. Sementara itu, ligan dipersiapkan melalui optimasi geometri dan penentuan muatan listrik guna memastikan kestabilan dan akurasi interaksi yang diprediksi (Morris *et al.*, 2009). Pemilihan algoritma *docking* merupakan faktor krusial dalam menentukan keberhasilan simulasi. Berbagai algoritma, seperti *grid-based*, Monte Carlo, dan algoritma genetika, telah dikembangkan dengan karakteristik dan keunggulan masing-masing. Algoritma *grid-based* sering digunakan pada sistem berskala besar karena efisiensinya dalam perhitungan energi interaksi, sedangkan algoritma Monte Carlo lebih sesuai untuk eksplorasi ruang konformasi yang kompleks dan luas (Yang *et al.*, 2022). Akurasi hasil *molecular docking* sangat dipengaruhi oleh kualitas model protein dan ligan yang digunakan. Kesalahan dalam pemodelan struktur dapat menurunkan validitas prediksi interaksi molekuler. Studi oleh Koes *et al.* (2013) menunjukkan bahwa penggunaan model protein hasil pemodelan homologi yang tervalidasi mampu meningkatkan ketepatan prediksi ikatan ligan–protein. Oleh karena itu, kualitas input data menjadi faktor penentu utama reliabilitas hasil *docking*.

1.5.3.2 Molecular dynamic

Molecular dynamic (MD) merupakan metode *in silico* yang digunakan untuk mensimulasikan pergerakan atom dan molekul dalam sistem biologis selama rentang waktu tertentu, sehingga memungkinkan analisis mendalam terhadap struktur, dinamika, dan stabilitas biomolekul. Pendekatan ini banyak dimanfaatkan untuk mempelajari mekanisme interaksi protein–ligan serta perubahan konformasi protein di bawah berbagai kondisi lingkungan, yang berperan penting dalam pemahaman fungsi biologis dan pengembangan obat (Oladejo *et al.*, 2023). Keunggulan utama metode MD terletak pada kemampuannya menyediakan informasi temporal mengenai perilaku molekuler yang tidak dapat diperoleh melalui metode statis. Melalui simulasi MD mampu menggambarkan perubahan konformasi dan stabilitas kompleks biomolekul secara realistis. Sebagai contoh, pada studi *G-Protein Coupled Receptors* (GPCRs), MD telah digunakan untuk mengamati perubahan struktural reseptor akibat pengikatan ligan, yang memberikan wawasan penting dalam desain dan optimasi kandidat obat (Zou *et al.*, 2019). Penggunaan metode MD dalam penelitian biomedis terus mengalami peningkatan signifikan. Laporan menunjukkan bahwa sebagian besar studi *in silico* dalam bidang penemuan obat selama dekade terakhir mengandalkan simulasi MD untuk mengevaluasi interaksi biomolekul. Tren ini menegaskan peran penting MD sebagai alat komputasional yang mendukung penelitian dan pengembangan di bidang farmasi dan bioteknologi (Ganesan *et al.*, 2017).

1.5.3.3 Prediksi profil farmakokinetik

Farmakokinetik merupakan cabang ilmu yang mempelajari proses absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi obat di dalam tubuh, yang berperan penting dalam menentukan efektivitas dan keamanan terapi. Oleh karena itu, prediksi profil farmakokinetik menjadi aspek krusial dalam pengembangan obat untuk mengoptimalkan dosis serta meminimalkan risiko efek samping. Pendekatan prediksi farmakokinetik dapat dilakukan melalui pemodelan matematis, simulasi komputasional, dan analisis

data klinis, termasuk penggunaan model farmakokinetik populasi yang memungkinkan evaluasi variasi respons individu berdasarkan faktor demografis dan biologis ((Pires *et al.*, 2015)

PKCSM (*Pharmacokinetics, Toxicity, and Chemical Space Modeling*) merupakan platform *in silico* berbasis *machine learning* yang digunakan untuk memprediksi parameter ADME suatu senyawa. Alat ini mampu memperkirakan karakteristik penting seperti permeabilitas usus, ikatan protein plasma, penetrasi sawar darah-otak, ekskresi ginjal, serta potensi interaksi metabolik dengan Protein sitokrom P450. Prediksi absorpsi dalam PKCSM didasarkan pada parameter fisikokimia, termasuk lipofilisitas (logP), *polar surface area* (PSA), dan kepatuhan terhadap aturan Lipinski, yang berkaitan dengan kemampuan senyawa menembus membran biologis (Pires *et al.*, 2015)

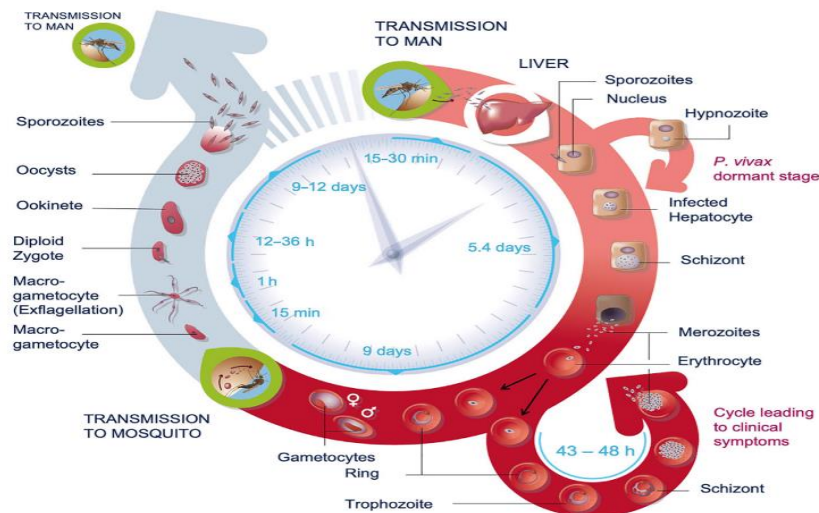
SwissADME merupakan alat prediksi farmakokinetik yang dikembangkan oleh Swiss Institute of Bioinformatics dan memanfaatkan berbagai model komputasional untuk mengevaluasi sifat fisikokimia serta parameter ADMET suatu senyawa. Platform ini memungkinkan analisis bioavailabilitas, absorpsi gastrointestinal, interaksi dengan transporter seperti P-glycoprotein, serta potensi penetrasi sawar darah-otak. Keunggulan SwissADME terletak pada kemampuannya memberikan prediksi komprehensif terkait distribusi dan eliminasi obat, yang menjadikannya alat penting dalam tahap awal pengembangan obat, termasuk untuk senyawa yang menargetkan sistem saraf pusat (Daina *et al.*, 2017).

1.5.4 In Vivo

Dalam penelitian ilmiah, istilah *in vivo* berasal dari bahasa latin dan berarti dalam hidup dan merujuk pada eksperimen atau proses yang dilakukan di dalam organisme hidup. *In vivo* juga digunakan untuk menggambarkan penelitian yang dilakukan pada organisme utuh, seperti hewan atau manusia, untuk melihat dampak biologis atau respon terhadap intervensi tertentu (Atanasov *et al.*, 2015).

1.5.5 Malaria

Malaria merupakan penyakit infeksi yang ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang membawa parasit *Plasmodium*. Beberapa spesies *Plasmodium* diketahui sebagai penyebab malaria pada manusia, di antaranya *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, dan *P. knowlesi*. Di antara spesies tersebut, *P. falciparum* dan *P. vivax* masih menjadi penyebab utama tingginya angka morbiditas dan mortalitas malaria secara global, karena kontribusinya yang signifikan terhadap sebagian besar kasus dan kematian akibat penyakit ini (Forte *et al.*, 2021). Proses infeksi dimulai ketika nyamuk *Anopheles* yang terinfeksi menghisap darah manusia, sehingga parasit dalam bentuk sporozoit masuk ke dalam aliran darah. Sporozoit ini kemudian dengan cepat bermigrasi menuju hati dan menginvasi sel-sel hepatosit dalam waktu relatif singkat, yaitu kurang dari satu jam setelah masuk ke dalam tubuh (Armstrong *et al.*, 2023). Di dalam hati, parasit mengalami fase perkembangan aseksual melalui proses skizogoni hepatic selama periode inkubasi sekitar 9 hingga 16 hari. Selama fase ini, parasit berkembang dan menghasilkan sejumlah besar merozoit yang kemudian dilepaskan ke dalam sirkulasi darah dan menginfeksi sel darah merah. Di dalam eritrosit, merozoit berkembang menjadi tahap cincin dan trofozoit, sebelum melanjutkan siklus reproduksi aseksual melalui skizogoni eritrositik untuk menghasilkan lebih banyak merozoit. Pecahnya eritrosit yang terinfeksi menyebabkan pelepasan merozoit baru, yang selanjutnya menginfeksi eritrosit sehat dan mengulangi siklus infeksi. Sebagian kecil merozoit kemudian berdiferensiasi menjadi bentuk seksual, yaitu gametosit jantan dan betina. Apabila gametosit ini tertelan oleh nyamuk *Anopheles* betina saat menghisap darah, maka akan terjadi proses pembuahan dan perkembangan parasit di dalam tubuh nyamuk, yang menghasilkan sporozoit infeksius. Sporozoit tersebut kemudian bermigrasi ke kelenjar ludah nyamuk dan siap ditularkan kembali ke manusia, sehingga siklus penularan malaria berlanjut (Alldredge, 2013).



Gambar 2. Siklus hidup parasit di manusia dan nyamuk nyamuk *Anopheles betina*

1.5.6 Mekanisme Target Protein Antimalaria

Malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh parasit protozoa eritrositik dari *P. falciparum* sebagai spesies yang paling virulen dan paling banyak ditemukan. *P. falciparum* adalah protease sistein yang termasuk dalam keluarga papain (C1A) dan memiliki peran penting dalam berbagai tahap siklus hidup parasit. Protein ini berfungsi mendegradasi protein eritrosit, khususnya hemoglobin, menjadi peptida berukuran kecil yang dimanfaatkan sebagai sumber nutrisi selama proses replikasi parasit. Aktivitas FP2 berlangsung di dalam vakuola makanan parasit yang memiliki kondisi asam dengan pH sekitar 5–6, yaitu lingkungan yang optimal bagi aktivitas proteolitiknya (Kesavulu *et al.*, 2005). Penghambatan FP2 dan protein prolognya terbukti mampu menghentikan pematangan parasit, sehingga menunjukkan bahwa FP2 berpotensi menjadi target yang menjanjikan dalam pengembangan obat antimalaria baru (Hogg *et al.*, 2006).

PMII memiliki situs aktif yang tersusun atas dua residu aspartat yang berfungsi sebagai pusat katalitik. Protein ini berperan pada tahap awal degradasi hemoglobin dengan memutus rantai polipeptida di sekitar gugus heme. Hasil dari proses ini berupa peptida berukuran besar yang selanjutnya mengalami pemecahan lanjutan oleh Protein lain, termasuk PMIV serta protease tambahan. PMIV bekerja secara sinergis dengan PMII dengan menghidrolisis peptida hasil degradasi hemoglobin menjadi fragmen yang lebih kecil. Fragmen peptida tersebut kemudian dimanfaatkan sebagai sumber energi bagi parasit setelah heme dioksidasi menjadi bentuk yang tidak bersifat toksik melalui mekanisme detoksifikasi heme. Dalam proses ini, PMIV berperan pada tahap lanjutan degradasi hemoglobin dan menunjukkan aktivitas proteolitik yang spesifik terhadap ikatan tertentu dalam peptida (Gutiérrez-de-Terán *et al.*, 2006). Karena perannya yang krusial, Protein ini menjadi salah satu target utama dalam pengembangan obat antimalaria. Pendekatan molekular docking banyak digunakan dalam desain obat karena kemampuannya untuk memprediksi secara akurat konformasi ligan di dalam situs pengikatan target (Meng *et al.*, 2011).

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh persetujuan oleh Ketua Komite Etik Penelitian Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt dan Sekretaris Komite Etik Penelitian Nurhasni Hasan, M.Si., M.Pharm. Sc.,Ph.D.,Apt Fakultas Farmasi (Dokumen No. 2682/UN4.1.23/KP.06.05/2025). Penelitian ini dilaksanakan menggunakan pendekatan eksperimental melalui uji *in vivo* untuk mengevaluasi kemampuan ekstrak etanol daun *A. flava* dalam menghambat tingkat parasitemia. Selanjutnya, penelitian dilanjutkan dengan pendekatan pra-eksperimental menggunakan metode komputasi melalui program komputer berbasis web dan jaringan, guna mendukung dan memperkuat hasil pengujian biologis yang telah diperoleh.

2.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai Mei 2025 di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, yang mencakup proses pengolahan simplisia hingga diperoleh ekstrak kental. Selanjutnya, pengujian *in vivo* dilaksanakan mulai September 2025 di Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi serta Laboratorium Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Pada Desember 2025, penelitian dilanjutkan dengan pengujian *in silico* yang dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Hasanuddin.

2.3 Alat dan Bahan Penelitian

2.3.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam proses ekstraksi meliputi blender, kertas saring Whatman No. 40, gelas kimia dan gelas ukur bermerek Pyrex, perangkat filtrasi vakum, rotary evaporator, water bath, cawan porselen, serta toples ekstraksi.

Peralatan yang digunakan pada pengujian *in vivo* meliputi spuit 1 cc, kanula untuk mencit, vial berkapasitas 10 mL, kaca preparat, mikropipet beserta tabung mikrosentrifus, serta mikroskop cahaya.

Sementara itu, studi *in silico* dilakukan menggunakan perangkat keras berupa komputer personal (PC) dengan spesifikasi prosesor AMD Ryzen 7 5800X 8-Core @3,80 GHz, sistem operasi 64-bit, dan RAM sebesar 32 GB. Perangkat lunak yang digunakan dalam analisis meliputi AutoDock Vina, ChemDraw, UCSF Chimera, BIOVIA Discovery Studio Visualizer, YASARA Structure, serta PKCSM Online Tools.

2.3.2 Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan daun tanaman *A. flava* yang dikumpulkan dari area hutan di Desa Wagari, Kecamatan Lasalimu, Kabupaten Buton, Provinsi Sulawesi Tenggara. Bahan yang digunakan dalam tahap ekstraksi dan fraksinasi meliputi alkohol 96% (JK Care), etil asetat, dan n-heksana.

Isolat *P. berghei* diperoleh dari dr. Yenni Yusuf, M.InfectDis., Ph.D., Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran. Parasit tersebut dipelihara melalui inokulasi intraperitoneal pada mencit percobaan. Artesunat murni digunakan sebagai kontrol positif pada penelitian ini, dengan dosis 10 mg/kg berat badan yang disuspensikan dalam larutan Na- CMC 1%. Hewan uji yang digunakan adalah mencit berusia 12–14 minggu dengan kisaran berat badan 22–50 gram.

2.4 Prosedur Kerja

2.4.1 Preparasi Simplisia daun *A. flava*

Bahan penelitian berupa daun *A. flava* yang telah dikumpulkan lalu disortasi basah untuk memisahkan kotoran dan bahan asing, kemudian dicuci menggunakan air mengalir hingga bersih. Sampel selanjutnya ditiriskan dan dikeringkan dengan metode pengeringan tidak langsung, yaitu diangin-anginkan pada suhu ruang serta terlindung dari paparan sinar matahari langsung hingga diperoleh simplisia kering. Simplisia kering kemudian dilakukan sortasi kering dan dipotong menjadi

bagian yang lebih kecil. Selanjutnya, bahan dihaluskan menggunakan blender hingga diperoleh serbuk simplisia dengan ukuran partikel relatif seragam. Serbuk simplisia yang dihasilkan siap untuk ekstraksi.

2.4.2 Preparasi ekstraksi

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode maserasi. Sebanyak 200 gram simplisia ditimbang, kemudian direndam dalam toples maserasi menggunakan etanol 96% sebanyak 2.500 mL. Proses maserasi berlangsung selama 72 jam dengan perendaman sempurna. Setelah itu, disaring menggunakan metode filtrasi vakum dengan kertas saring Whatman No. 40. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarut, sedangkan ampasnya dilakukan proses remaserasi. Selanjutnya, hasil filtrasi kembali diuapkan hingga diperoleh ekstrak yang lebih pekat. Apabila ekstrak belum mencapai kekentalan yang diinginkan, proses penguapan dilanjutkan menggunakan *water bath* pada suhu 60 °C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang dihasilkan kemudian disimpan dalam wadah tertutup yang berisi silika gel untuk menjaga kestabilan kelembaban.

2.4.3 Preparasi Fraksi

Melarutkan 5 gram ekstrak *A. flava* dalam 200 mL air suling, aduk hingga hampir homogen, lalu letakkan dalam corong pemisah. Tambahkan pelarut seperti n-hexane sebanyak 200 mL. Campuran dibiarkan mengendap selama beberapa jam hingga terbentuk dua lapisan yang terpisah antara n-hexane dan air suling, hal ini terjadi akibat perbedaan densitas spesifik keduanya. Lapisan air, yang terletak di bagian bawah, dikeluarkan terlebih dahulu dengan hati-hati, diikuti oleh lapisan n-hexane di atasnya. Lapisan n-hexane kemudian diuapkan untuk mendapatkan fraksi yang diinginkan. Sisa lapisan airnya dikembalikan ke corong pemisah, setelah itu etil asetat ditambahkan sebanyak 200 mL. Prosedur diulangi dengan langkah-langkah yang sama.

2.4.4 Pengujian Aktivitas Antimalaria

Penilaian efektivitas dilakukan menggunakan uji supresi selama 5 hari, mencit donor tersebut sebelumnya telah diinokulasi dengan kultur stok parasit. Parasitemia ditentukan secara mikroskopis menggunakan sampel darah yang diambil dari vena ekor mencit untuk menyiapkan sediaan darah tipis pada slide kaca. Sediaan tersebut difiksasi dengan metanol dan kemudian diwarnai dengan larutan Giemsa 5% selama 30 menit. Tingkat parasitemia diekspresikan sebagai persentase sel darah merah terinfeksi per seribu sel darah merah yang diperiksa (Fentahun *et al.*, 2017).

Aktivitas antiplasmodial *in vivo* dari ekstrak kasar (ekstrak etanol 96%) dan dua fraksi pelarut (fraksi n-heksana dan etil asetat) daun *A. flava* dievaluasi terhadap *P. berghei* sesuai prosedur yang dijelaskan oleh Peters *et al.* Sebanyak 55 mencit jantan dibagi secara acak ke dalam 11 kelompok, setiap kelompok terdiri 4- 5 ekor mencit. 9 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol. Kelompok perlakuan menerima dosis oral 200, 400, dan 600 mg/kg berat badan dari ekstrak kasar atau fraksi masing-masing. Kelompok kontrol diberikan suspensi 1% Na-CMC, 10 mg/kg BB artesunat, (Fentahun *et al.*, 2017).

Perawatan dimulai tiga jam setelah inokulasi intraperitoneal mencit dengan 0,2 mL darah terinfeksi yang mengandung sekitar 1×10^7 parasit pada hari ke-0, menggunakan jarum hipodermik. Perawatan dilanjutkan selama tiga jam berikutnya (Trager W, 1976). Perawatan diberikan sekali sehari selama tiga hari tambahan (hari ke-1 hingga ke-3). Pada hari keempat setelah dimulainya pengobatan (bertepatan dengan hari ke-5 pasca-inokulasi), darah dikumpulkan dari vena ekor setiap mencit untuk menyiapkan sediaan darah tipis pada slide kaca untuk pemeriksaan mikroskopis selanjutnya (Saidu *et al.*, 2000). Sediaan darah difiksasi dengan metanol dan kemudian diwarnai dengan larutan Giemsa 10% pada pH 7,2 selama 30 menit. Evaluasi mikroskopis dilakukan untuk menilai tingkat parasitemia dan menghitung persentase penghambatan pertumbuhan parasit. Selain itu, setiap mencit dipantau setiap hari untuk mencatat durasi kelangsungan hidupnya (Yusuf *et al.*, 2024).

Penekanan parasit (%) = $(P_n - P_t) / P_n \times 100$

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

2.4.5 Uji Survival

Kematian hewan dicatat setiap hari, dan durasi dari inokulasi parasit hingga kematian dicatat untuk setiap mencit dalam kelompok perlakuan dan kelompok kontrol selama periode pengamatan. (Fentahun dkk., 2017).

2.5 Analisis LC- HRMS (*Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry*)

Analisis metabolomik dilakukan menggunakan sistem LC-HRMS di Corpora Science. Pemisahan kromatografi dilakukan dengan Thermo Scientific™ Vanquish™ Horizon UHPLC menggunakan kolom Accucore™ Phenyl Hexyl (100 × 2,1 mm; 2,6 μm). Fase gerak terdiri atas air dan asetonitril berkualitas MS yang masing-masing mengandung 0,1% asam format, dengan laju alir 0,3 mL/menit. Program gradien dimulai dari 5% fase B, meningkat hingga 90% selama 16 menit, dipertahankan selama 4 menit, kemudian dikembalikan ke kondisi awal hingga menit ke-25. Suhu kolom dijaga pada 40 °C dengan volume injeksi 5 μL. Deteksi massa dilakukan menggunakan Orbitrap™ Exploris 240 HRMS dengan mode akuisisi Full MS/dd-MS² pada polaritas positif dan negatif. Rentang pemindaian massa ditetapkan pada 70–800 m/z dengan resolusi Full MS 60.000 FWHM dan dd-MS² 30.000 FWHM. Ionisasi dilakukan menggunakan sumber H-ESI, dengan energi tumbukan ternormalisasi 30, 50, dan 70 serta gas nitrogen sebagai gas tumbukan (Windarsih *et al.*, 2022)

Preparasi sampel dilakukan dengan melarutkan 10 mg sampel dalam 1 mL metanol 90% berkualitas HPLC, dihomogenisasi menggunakan vortex, kemudian disaring melalui membran nilon 0,20 μm sebelum dianalisis. Pengolahan dan identifikasi metabolit dilakukan menggunakan perangkat lunak Compound Discoverer 3.3 dengan pencocokan terhadap berbagai pustaka metabolit dan produk alam. Data LC-HRMS yang diperoleh diproses menggunakan perangkat lunak Thermo Scientific Compound Discoverer versi 3.3 untuk dilakukan deteksi puncak, penyelarasan waktu retensi, dan normalisasi intensitas. Identifikasi senyawa dilakukan berdasarkan akurasi massa, pola fragmentasi MS/MS, dan toleransi massa ≤ 5 ppm dengan membandingkan data terhadap pustaka mzCloud, ChemSpider, serta berbagai basis data metabolit dan produk alam. Senyawa yang teridentifikasi kemudian dianotasi dan diklasifikasikan berdasarkan kelas kimianya untuk mendukung interpretasi profil metabolomik sampel (J. Kusuma *et al.*, 2025)

2.6 In Silico

2.6.1 Protein Dan Ligan

Struktur tiga dimensi (3D) dari protein target yang dipilih diperoleh dari Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Senyawa acuan, ligan, dan molekul uji diidentifikasi dari hasil LC–HRMS dan kemudian diunduh dari basis data PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam format File Data Struktur (.sdf).

2.6.2 Molecular Docking

Kode protein target PMII (ID PDB: 1lf3), PMIV (IDE PDB: 1ls5), dan FP2 (IDE PDB: 5ssz) diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) (Amengor *et al.*, 2024). Persiapan protein dilakukan menggunakan UCSF Chimera, di mana semua molekul air dihapus, residu yang tidak lengkap dihapus, dan atom hidrogen ditambahkan. Selanjutnya, minimisasi energi dilakukan di bawah batasan spesifik untuk meredakan ketegangan struktural tanpa mengubah konformasi keseluruhan. Struktur protein yang dioptimalkan diproses lebih lanjut menggunakan modul Dock Prep di Chimera. Ligand atau senyawa yang sesuai diperoleh dari PubChem, ditambahkan ke struktur reseptor yang telah disiapkan, dan kompleks yang dihasilkan diuji dengan *molecular docking* menggunakan AutoDock Vina dengan kotak grid yang didefinisikan untuk mengevaluasi interaksi ikatan. Pembuatan diagram interaksi protein-senyawa 2D, bersama dengan visualisasi 3D dan penilaian analitis, dilakukan melalui perangkat lunak Discovery Studio (Pratama *et al.*, 2023).

2.6.3 Molecular Dynamic

Simulasi MD dilakukan untuk mengevaluasi stabilitas kompleks protein–ligan yang paling optimal. Simulasi dijalankan menggunakan medan gaya AMBER14 dalam perangkat lunak YASARA Dynamics.

Setiap eksperimen dilakukan dalam kondisi fisiologis (310 K, pH 7,4, 1 atm, dan 0,9% NaCl), dengan waktu simulasi total 100 nanosekon (Ahmed *et al.*, 2022).

SwissADME digunakan untuk mengevaluasi sifat fisiko-kimia ligan, sedangkan prediksi toksisitas dilakukan menggunakan pkCSM (Margulis *et al.*, 2021). Penyaringan senyawa dilakukan berdasarkan berbagai kriteria farmakokinetik dan toksikologi, termasuk penyerapan oral, luas permukaan yang dapat diakses pelarut (SASA), QlogP, kepatuhan terhadap Aturan Lima Lipinski dan Aturan Veber, serta indikator keamanan seperti mutagenisitas AMES, dosis maksimum yang dapat ditoleransi manusia, risiko inhibisi hERG I, hepatotoksitas, sensitisasi kulit, dan parameter relevan lainnya. (Ahmed *et al.*, 2022).