

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Landasan Teori

2.1.1 Etiologi Malaria

Malaria merupakan penyakit yang mengancam jiwa yang diakibatkan oleh infeksi eritrosit dengan parasit protozoa dari genus *Plasmodium* yang ditularkan ke manusia melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi. Terdapat lima spesies *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* dan *P. ovale* dan *P. knowlesi*)(Varo *et al.*, 2020). Secara global *Plasmodium falciparum* menjadi penyebab kematian tertinggi akibat malaria. Malaria berat merupakan penyakit heterogen dengan beberapa komplikasi yang merupakan penyebab utama kematian dan itu termasuk malaria serebral, anemia malaria berat, sindrom gangguan pernapasan akut terkait malaria, malaria plasenta, cedera ginjal akut, dan gangguan metabolisme(Possemiers *et al.*, 2021).

2.1.2 Peran Protein pada *Plasmodium sp.*

Protein adalah zat yang sangat kompleks yang terdiri dari residu asam amino yang dihubungkan oleh ikatan peptida. Protein mengandung banyak sinyal biologis penting seperti enzim, hormon, dan antibodi(Protein | Definition, Structure, & Classification | Britannica, n.d.). Protein memainkan peran krusial dalam kelangsungan hidup *Plasmodium* dan terlibat dalam mekanisme patofisiologi malaria, peran penting yang dimaksud antara lain sebagai berikut:

1. Penempelan dan invasi sel inang: Protein-protein yang ada pada permukaan *Plasmodium* memungkinkan parasit

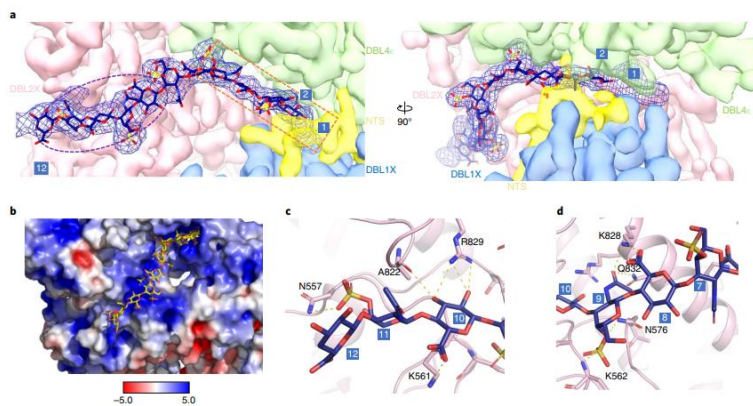
untuk melekat pada permukaan sel inang, memasuki sel, dan mulai menginfeksi sel inang(J. Wang *et al.*, 2021). Beberapa protein terlibat dalam mengenali reseptor permukaan sel inang yang memungkinkan parasit untuk berinteraksi secara spesifik. Contohnya adalah penempelan pada sel eritrosit yang dimediasi oleh *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1* (PfEMP1). Selama tahap aseksual dalam siklus hidup parasit, PfEMP1 membantu parasit melekat pada permukaan sel eritrosit dan membentuk ikatan yang kuat dan memungkinkan parasit untuk bertahan hidup dalam eritrosit yang terinfeksi serta mencegah eritrosit yang terinfeksi hancur lebih cepat oleh sistem imun(Lopez-Perez *et al.*, 2020).

2. Infeksi hepatosit: Setelah invasi eritrosit, *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale* dapat mengalami tahap hibernasi dalam hepatosit. Contoh protein yang penting dalam tahap ini yaitu *circumsporozoite protein* (CSP) yang terlibat dalam motilitas dan invasi sporozoit ke dalam hepatosit. Protein-protein tertentu dalam tahap ini penting dalam mengatur proses diferensiasi dan perkembangan parasit dalam sel hati, serta keluar dari tahap dorman dan memasuki fase aseksual dalam eritrosit(Pratt-Riccio *et al.*, 2019). Contoh protein lain dalam tahap sporozoit adalah *Thrombospondin-Related Adhesion Protein* (TRAP) dan *Liver Stage Antigen-1* (LSA-1)(J. Zheng *et al.*, 2019).

3. Reproduksi aseksual dalam eritrosit: *Plasmodium* mengalami tahap reproduksi aseksual di dalam eritrosit, yang melibatkan pembelahan sel dan pembentukan bentuk merozoit. Contoh protein penting dalam tahap ini

yaitu *Merozoite Surface Proteins* (MSPs) dan *Apical membrane antigen 1* (AMA-1)(J. Zheng *et al.*, 2019).

Berikut adalah contoh penelitian aplikasi molecular docking pada interaksi *Plasmodium falciparum* VAR2CSA dengan kondroitin sulfat A (CSA)



Gambar 2. 1 *Plasmodium falciparum* VAR2CSA berikatan dengan kondroitin sulfat A (CSA).

a) Dua pandangan dari struktur menunjukkan sebuah dodekamer dari CSA yang terikat di saluran pengikatan utama. Kepadatan peta cryo-EM dari NTS, DBL1X, DBL2X, dan DBL4ε ditunjukkan sebagai solid dengan transparansi. Kepadatan cryo-EM dari CSA ditunjukkan sebagai jaringan yang dilapisi di atas model CSA sebagai tongkat. Monosakarida kiri dan kanan adalah BDP-12 dan BDP-2, ditandai dengan angka 12 dan 2, masing-masing. Kepadatan untuk monosakarida pertama dari rantai juga diamati dan diberi label 1. Situs pengikatan 1 dan 2 dihighlight dengan oval ungu dan persegi panjang oranye, masing-masing. b) Permukaan elektrostatik VAR2CSA menunjukkan saluran pengikatan positif dari CSA. c,d) Interaksi terperinci antara

CSA dan situs pengikatan 1. Setiap monosakarida diberi nomor. Nomor urut protein dan rantai samping dari residu yang terlibat dalam pengenalan CSA ditunjukkan(Ma *et al.*, 2021).

2.1.3 *Alstonia scholaris*

Alstonia scholaris adalah tanaman famili *Apocynaceae* yang telah lama digunakan sebagai obat herbal tradisional karena kualitas farmakologisnya yang baik untuk kesehatan manusia termasuk kandungan *antiplasmodial*(Pandey *et al.*, 2020). *A. scholaris* memiliki sejarah penggunaan yang panjang dalam pengobatan tradisional, termasuk untuk mengobati demam dan malaria(Zhao *et al.*, 2023a). Beberapa studi in vitro menunjukkan bahwa ekstrak dan senyawa yang diisolasi dari *A. scholaris* memiliki aktivitas *antiplasmodial* yang kuat terhadap berbagai spesies parasit malaria, termasuk *P.falciparum* dan *P.vivax*.



Gambar 2. 2 Batang pohon *Alstonia scholaris*.

Sumber : Koleksi pribadi



Gambar 2. 3 Daun *Alstonia scholaris*

Sumber : Koleksi pribadi

Hasil skrining farmakologis *A.scholaris* menunjukkan hasil *antiplasmodial* pada uji invitro terhadap *plasmodium*. Uji terhadap *P. falciparum* menghasilkan zona penghambatan

Universitas Pertahanan Republik Indonesia

sebesar 14 mm 200mg / mL dari ekstrak kulit maupun daun *A.scholaris*(Singh *et al.*, 2023).

Senyawa yang diketahui memiliki aktivitas *antiplasmodial* dari tanaman ini termasuk alstoscholarisine, akuamarin, dan echitamine(Akbar *et al.*, 2020). Aktivitas fitokonstituen dari kulit batang *A.scholaris* dilaporkan mengandung vitamin, echitamine, echitenine, echicaoutchin, echicerin, echitin, echitein, echiretin, ditain, ditamine, losbanine, 6,7-seco angustilobine B, Nb - demethyl echitmaine, 17-Oacetyl echitamine, picraline deacetyl, lupeol dan β -sitosterol yang memiliki manfaat untuk mengatasi keadaan tonik, afrodisiak, demam, stimulan, ekspektoran, alteratif, karminatif, anti-periodik, astringent dan sakit perut serta digunakan untuk mengobati demam malaria, kusta, pencernaan yang terganggu, dan infeksi *Leishmania*(Chhajed *et al.*, 2023).

Diperoleh total 392 konstituen kimia dari genus *Alstonia*. Komposisi kimia tanaman *A.scholaris* melibatkan alkaloid, triterpene, flavonoid, asam lemak, asam fenolik, ligan, dan ester. Protein kelas utama pada *A.scholaris* yang berpotensi sebagai *antiplasmodial* yaitu alkaloid, dengan turunan senyawa yang lebih kecil lagi yaitu akuamarin, alstonidin, ditubuhonin dan golongan titrepenoid berupa veneterpene, alstiphyllanine, akuammicine(Zhao *et al.*, 2023b).

Dari hasil uji *invivo* ekstraksi kulit batang pohon *A.scholaris* didapatkan fraksi dibuat dari ekstrak metanol AC-2 80% mampu secara signifikan mengurangi parasitemia pada tikus yang terinfeksi dengan cara yang tergantung dosis(Cimanga *et al.*, 2019).

2.1.4 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)

LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) adalah teknik analisis yang menggabungkan pemisahan fisik senyawa target (atau analit) menggunakan kromatografi cair dengan deteksi berbasis massa yang disediakan oleh spektrometri massa. Alat analisis yang kuat ini digunakan untuk mendeteksi dan mengukur tingkat mikrogram atau bahkan nanogram dari berbagai senyawa dalam matriks kompleks (*Basics of LC/MS*, n.d.). LC-MS terdiri dari LC atau Kromatografi cair yang terkoneksi dengan MS atau Spektrometer masa (Beccaria & Cabooter, 2020). LC-MS merupakan teknik yang sangat efisien dan sensitif untuk menganalisis dan mengkarakterisasi senyawa kompleks dalam berbagai macam sampel. Keunggulannya termasuk kemampuan untuk mendeteksi senyawa dalam jumlah yang sangat kecil dan dapat digunakan dalam berbagai aplikasi analisis dan penelitian kimia (C. F. Wang & Li, 2022). LCMS yang digunakan yaitu jenis Instrumen LCMS Quadropole Tunggal.

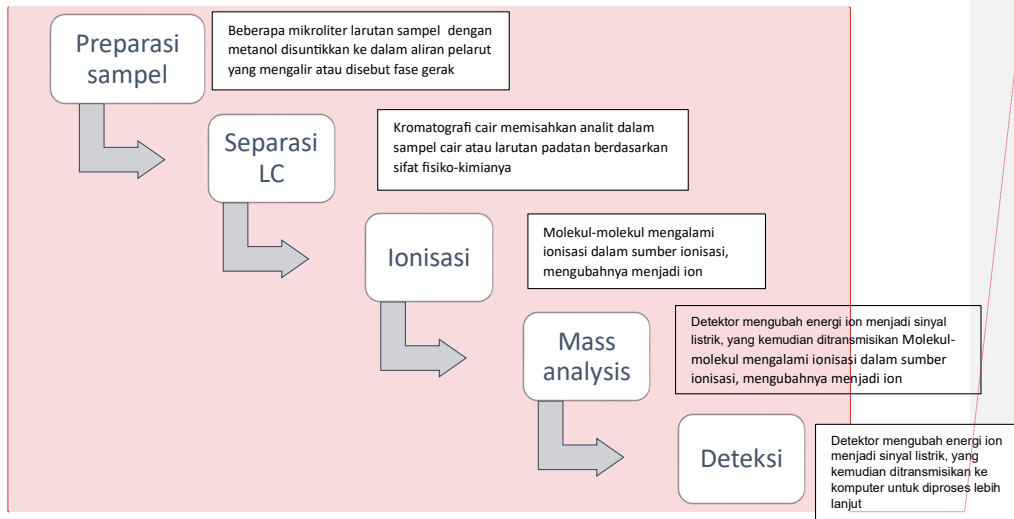


Gambar 2. 4 Alat LC-MS Qtof

LCMS Quadrupole Time-of-Flight (QTOF) memiliki perbedaan utama dengan jenis LCMS lainnya, seperti LCMS Triple Quadrupole (QqQ). QTOF-MS menggabungkan keunggulan dua penganalisis massa dengan efisiensi fragmentasi tinggi dari teknologi quadrupole dan kemampuan resolusi massa tinggi dalam waktu penerbangan. LCMS QTOF menggunakan kombinasi Quadrupole dan Time-of-Flight sebagai analiser massa, dengan Quadrupole memfilter ion berdasarkan massa dan Time-of-Flight mengukur waktu tempuh ion (Hu *et al.*, 2021).

Dibandingkan dengan LCMS Triple Quadrupole (QqQ), LCMS QTOF memiliki resolusi lebih tinggi, memungkinkan pemisahan yang baik antara ion-ion serupa. LCMS QTOF umumnya digunakan untuk penelitian dan analisis senyawa kompleks, serta penentuan struktur senyawa yang tidak diketahui. Di sisi lain, LCMS Triple Quadrupole (QqQ) biasanya diterapkan dalam analisis kuantitatif yang sensitif, terutama dalam industri farmasi dan pengukuran residu pestisida (Cavaliere *et al.*, 2019).

Bagan Tahapan LC-MS



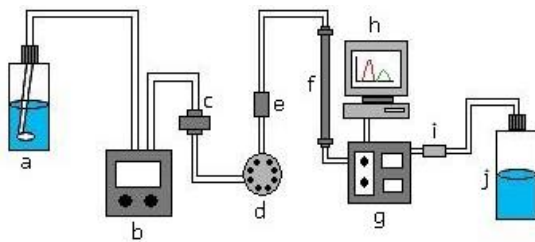
Commented [er1]:

2.1.4.1 Liquid Chromatography (LC)

Kromatografi cair merupakan tahap pertama, di mana campuran kompleks senyawa diinjeksikan ke dalam kolom kromatografi cair (*Liquid Chromatography*, n.d.). Proses kromatografi cair didasarkan pada afinitas molekul terhadap fase gerak. Jika komponen memiliki afinitas tinggi terhadap fase gerak, mereka akan bergerak lebih cepat dan keluar dari kolom dengan cepat. Namun, jika afinitasnya rendah, molekul akan bergerak perlahan dan keluar dari kolom kemudian. Ketika dua molekul dalam campuran memiliki polaritas yang berbeda dan fase gerak memiliki polaritas yang berbeda, mereka akan bergerak dengan kecepatan yang berbeda melalui fase diam (*Microbe Notes - Online Microbiology and Biology Study Notes*, n.d.).

2.1.4.2 Mass Spectrometry (MS)

Setelah keluar dari kolom LC, senyawa yang dipisahkan dialirkan ke spektrometer massa. Metode analitik menggunakan ionisasi dan analisis massa senyawa untuk menentukan massa, rumus dan struktur senyawa yang dianalisis. Penganalisis massa adalah komponen spektrometer massa yang mengambil massa terionisasi dan memisahkannya berdasarkan rasio muatan terhadap massa dan mengeluarkannya ke detektor tempat mereka terdeteksi dan kemudian diubah menjadi output digital (MASS SPECTROMETRY, n.d.).



Gambar 2. 5 Komponen Sistem *Liquid Chromatography* Dasar

Sumber : <https://chem.libretexts.org/@go/page/309>

Gambar 2.3. Sistem LC dasar terdiri dari (a) filter saluran masuk pelarut, (b) pompa, (c) filter pelarut inline, (d) katup injeksi, (e) filter prakolom, (f) kolom, (g) detektor, (h) perekam, (i) regulator tekanan balik, dan (j) reservoir limbah. Gambar diambil melalui link berikut: *Liquid Chromatography-Chemistry LibreTexts (Liquid Chromatography, n.d.)*

2.1.4.3 Interpretasi Hasil LC-MS

Hasil spektrum massa mencerminkan massa masing-masing ion dan kekuatan sinyalnya. Dengan membandingkan spektrum massa dengan basis data spektral yang ada, senyawa spesifik dalam sampel dapat diidentifikasi berdasarkan pola massa karakteristiknya. Jumlah ion yang terdeteksi juga dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi relatif senyawa dalam sampel (Chidella *et al.*, 2021).

Beberapa alat yang digunakan dalam analisis kimia yang memiliki fungsi serupa dengan LC-MS adalah:

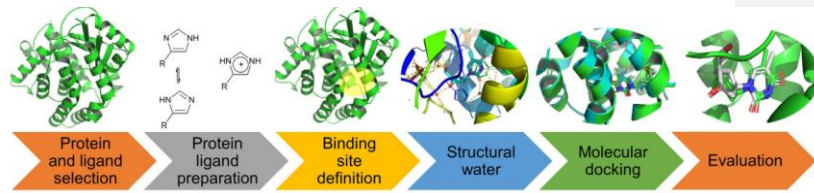
1. GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry): Mirip dengan LC-MS, namun metode ini menggunakan kromatografi gas (GC) untuk memisahkan senyawa-senyawa yang teruapkan sebelum masuk ke spektrometri massa. GC-MS lebih cocok untuk senyawa yang memiliki stabilitas uap yang baik (Ralte *et al.*, 2022).
2. HPLC-MS (High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry): Seperti LC-MS, namun menggunakan kromatografi cair berkualitas tinggi untuk pemisahan sampel sebelum analisis dengan spektrometri massa (Rodell *et al.*, 2022).
3. MALDI-TOF (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight): Spektrometer massa menyediakan spektrum bio-analit yang cepat, akurat, dan sensitif. MALDI-TOF MS sering digunakan dalam identifikasi mikroorganisme, analisis protein, dan bidang penelitian biologi molekuler dan kimia (Condina *et al.*, 2019).

2.1.5 Molecular Docking

Molecular docking adalah teknik komputasi yang sangat berguna dalam penelitian obat karena memungkinkan para peneliti untuk secara virtual menyaring ribuan senyawa kandidat potensial dan memprioritaskan senyawa-senyawa yang paling mungkin berinteraksi dengan reseptor target dan telah menjadi alat utama dalam desain obat yang dibantu komputer untuk memprediksi afinitas pengikatan dan menganalisis mode interaktif (Fan *et al.*, 2019). Teknik ini melibatkan memprediksi interaksi antara molekul kecil dan protein pada tingkat atom. Hal ini memungkinkan para peneliti untuk mempelajari perilaku molekul kecil, seperti nutraceuticals, dalam situs pengikatan protein target dan memahami proses biokimia mendasar yang mendasari interaksi ini. Teknik ini berbasis struktur dan membutuhkan representasi 3D resolusi tinggi dari protein target (Agu *et al.*, 2023).

Langkah-langkah kunci yang umum pada semua protokol *docking* yaitu dimulai dari memilih struktur tiga dimensi dari makromolekul target dan molekul kecil, kemudian setiap struktur harus dipersiapkan sesuai dengan persyaratan metode *docking* yang digunakan. Situs pengikatan harus didefinisikan menggunakan alat komputasi atau informasi eksperimental. Struktur aktif atau struktural juga harus dimasukkan. Setelah proses *docking*, hasilnya harus dianalisis dengan memilih mode pengikatan dengan skor terbaik, dan dievaluasi (Abdolmaleki *et al.*, 2021).

Langkah-langkah dasar dari mekanisme *molecular docking*:



Gambar 2. 6 Diagram alur langkah-langkah *docking*.

Sumber : *Use of molecular docking computational tools in drug discovery* - ScienceDirect. Oleh: Francesca Stanzione *et al.*

Gambar 2.6 Diagram alur langkah-langkah kunci yang umum untuk protokol *docking*. Struktur 3D dari makromolekul target dan molekul kecil harus dipilih terlebih dahulu, dan kemudian setiap struktur harus disiapkan sesuai dengan persyaratan metode *docking* yang digunakan. Situs pengikatan harus didefinisikan menggunakan alat komputasi atau menggunakan informasi eksperimental. Air aktif atau struktural harus dimasukkan juga. Setelah *docking*, hasilnya harus dianalisis, memilih mode pengikatan dengan skor terbaik, dan dievaluasi (Stanzione *et al.*, 2021).

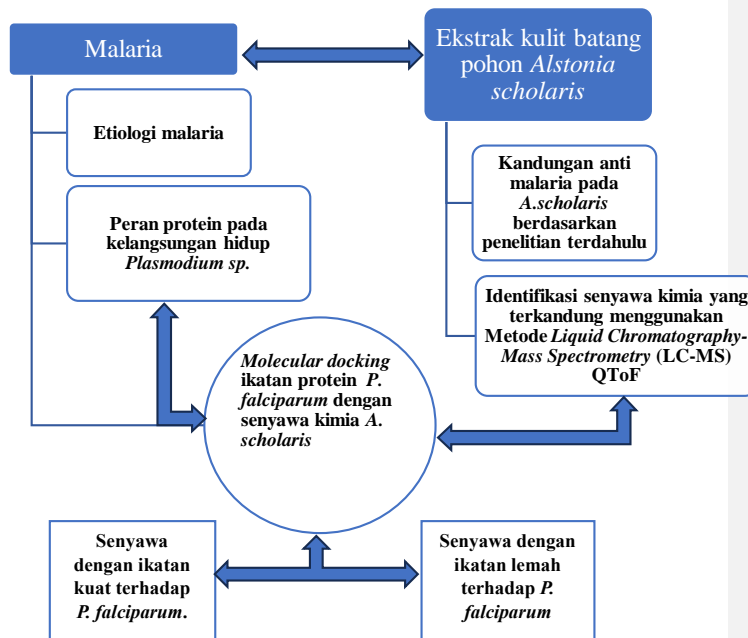
2.1.5 Redocking dan Crossdocking

Redocking dan crossdocking merupakan dua metode yang umum digunakan dalam *docking* molekuler. Redocking melibatkan proses memasukkan kembali ligan ke tempat pengikatan aslinya dalam kompleks protein-ligan, sementara crossdocking melibatkan proses memasukkan ligan ke dalam kompleks protein-ligan yang berbeda.

Redocking seringkali digunakan sebagai evaluasi cepat terhadap program docking. Meskipun dapat memberikan hasil yang tampak bagus, redocking tidak disarankan untuk memperkirakan akurasi docking secara menyeluruh. Sebaliknya, crossdocking dianggap lebih dapat diandalkan dalam mengevaluasi keakuratan program docking, meskipun prosedurnya bisa lebih rumit(L. Zheng *et al.*, 2022). Crossdocking memberikan hasil yang lebih akurat karena menguji kemampuan program docking untuk memprediksi interaksi ligan dengan berbagai kompleks protein-ligan(Wierbowski *et al.*, 2020).

Kedua metode ini digunakan untuk mengevaluasi keakuratan program docking dan membantu dalam memprediksi afinitas pengikatan ligan terhadap protein, mendukung pengembangan lebih lanjut dalam desain obat dan penelitian kimia medisinal.

2.2 Kerangka Teori



2.3 Hasil Penelitian Terdahulu

Tabel 2.1 Tinjauan literatur penelitian terdahulu

No	Penulis dan Tahun	Judul	Tujuan & Metode	Hasil
1	M. Abinaya, M. Gayathri 2019	<i>Inhibition of biofilm formation, quorum sensing activity and molecular docking study of isolated 3, 5, 7-Trihydroxyflavone from Alstonia scholaris leaf against P.aeruginosa</i>	<p>Tujuan: mengevaluasi penghambatan pembentukan biofilm dan aktivitas quorum sensing terisolasi 3, 5, 7-Trihydroxyflavone (TF) dari ekstrak daun A.scholaris terhadap Pseudomonas aeruginosa</p> <p>Metode: Analisis docking molekuler Trihydroxyflavone (TF) terisolasi</p>	Senyawa TF yang diisolasi dari A.scholaris mengungkapkan potensi yang lebih besar untuk menghambat produksi faktor virulensi tergantung biofilm dan QS pada P.aeruginosa. Studi interaksi docking kompleks TF-LasR mengekspresikan afinitas pengikatan yang lebih tinggi daripada gen QS lainnya di P.aeruginosa.
2	Bapan Banik,, et al 2023	<i>Anti-arthritis potential of latex of Alstonia scholaris (L.) R. Br.: an in silico and in vivo approach</i>	<p>Tujuan: Mengeksplorasi lateks AS untuk profil kimia, aktivitas anti-reumatik in vivo dan docking molekuler in silico terhadap siklooksigenase (COX-2).</p>	Sidik jari HPTLC dan LC-MS / MS dari lateks AS mengkonfirmasi adanya komponen anti-reumatik yang kuat seperti quercetin, kaempferol, dan asam ursolat.

			Metode: AS lateks secara kimia diprofilkan oleh FTIR, HPTLC dan LC-MS / MS.	
3	HANAFI <i>et al.</i> , Orient. J. Chem.,	<i>Novel Cinchona Alkaloid Derivatives as Potential Antimalarial Agents Through Receptor–Inhibitor Interaction Fingerprint and Biosynthesis Design</i>	Tujuan: Menyelidiki turunan alkaloid cinchona baru (CAD) sebagai agen antimalaria potensial melalui docking molekuler dan desain biosintesis Metode: docking molekuler dan desain biosintesis	Inhibitor prospektif terbesar Pf falcipain-2 adalah cinchonidine salisilat (-9,1 kkal / mol) melalui pendekatan docking molekuler. Cinchonidine salicylate menunjukkan senyawa yang paling potensial sebagai inhibitor antimalaria atas turunan alkaloid cinchona lainnya.
4	Yan Qin <i>et al</i> 2022	<i>Targeted quantitative analysis of monoterpenoid indole alkaloids in Alstonia scholaris by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time of flight mass spectrometry</i>	Tujuan: Tujuan dari penelitian ini adalah untuk Investigasi Variasi Alkaloid Indol Monoterpen A. scholaris Metode: Kromatografi cair kinerja ultra-tinggi ditambah dengan quadrupole time of flight mass spectrometry	Hasil penelitian menunjukkan bahwa target-MS2 Mode dapat meningkatkan kemampuan kuantitatif kromatografi cair kinerja ultra-tinggi ditambah dengan spektrometri massa time-of-flight quadrupole untuk alkaloid indol monoterpen struktur-kompleks dalam matriks herbal.

2.3 Hipotesis Penelitian

" Kulit batang pohon *A.scholaris* mengandung senyawa kimia tertentu yang dapat berinteraksi dengan protein *P.falciparum* sehingga mengganggu stabilitas protein tersebut. Identifikasi dan analisis interaksi antara senyawa-senyawa tersebut dengan protein *P.falciparum* dapat dilakukan dengan menggunakan metode *LC-MS QToF* dan *Molecular docking*. Kami beranggapan bahwa interaksi ini dapat memiliki potensi untuk menghambat aktivitas protein *Plasmodium falciparum*, yang nantinya dapat memberikan kontribusi pada pengembangan potensial baru dalam bidang terapi antimalaria."