



## In Silico Study of Bioactive Compounds from *Cinchona* Bark as Potential Antimalarial Against Human Glucokinase Receptor

Kezia Stella Carmencinta Salvi, Alifa Dhia Shalima, Alya Novia Hanifa, Johnessa Cung, Bagus Adhinagoro, Shela Salsabila, Muchtaridi✉

Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran Jl. Raya Bandung Sumedang KM.21 Telp. (022) 84288828 Jatinangor 45363

### Info Artikel

Diterima : 29-11-2024

Disetujui : 14-01-2025

Dipublikasikan : 05-05-2025

### Keywords:

Antimalarials

*Cinchona bark*

Glucokinase

Molecular Docking

Mefloquine

### Abstrak

Malaria masih menjadi masalah kesehatan di Indonesia, dengan daerah endemis yang melaporkan penularan parasit *Plasmodium* secara terus-menerus. Penelitian ini mengeksplorasi potensi senyawa yang berasal dari *Cinchona succirubra*, yang dikenal memiliki sifat antimalaria, dengan menggunakan pendekatan *in silico*. Memanfaatkan prediksi Lipinski, ADME-Tox, skrining farmakofor, dan teknik penambatan molekuler, kami menilai potensi farmakologis senyawanya terhadap enzim glukokinase. Melalui 10 senyawa alkaloid yang diambil dari kulit batang kina, di antaranya memberikan hasil terbaik dalam perannya terhadap reseptor tersebut yaitu meflokuin. Hasilnya menunjukkan bahwa meflokuin memiliki BE sebesar -3,95 kkal/mol, konstanta penghambatan 1,27  $\mu$ M, tetapi tidak ada interaksi dengan residu asam amino esensial. Nilai HIA dan CaCo-2 masing-masing sebesar 93,737% dan 22,686 nm/detik, sedangkan nilai PPB dan BBB sebesar 74,270% dan 74,270%. Zat ini juga tidak bersifat karsinogenik dan mutagenik. Energi pengikatan rendah dan interaksi yang paling disukai dengan reseptor diamati untuk meflokuin. Dengan demikian, meflokuin menunjukkan potensi sebagai inhibitor glukokinase prospektif.

### Abstract

Malaria remains a significant health concern in Indonesia, with endemic regions reporting persistent transmission of *Plasmodium* parasites. This study explores the potential of compounds derived from *Cinchona succirubra*, traditionally known for its antimalarial properties, using a comprehensive *in silico* approach. Utilizing Lipinski's prediction, ADME-Tox, pharmacophore screening, and molecular docking techniques, we assessed the pharmacological potential of its compounds against glucokinase enzymes. Through 10 alkaloid compounds taken from the bark of the cinchona tree, among which the one that gives the best results in its role on the receptor is mefloquine. The result showed that mefloquine had a BE of -3.95 kcal/mol, an inhibition constant of 1.27  $\mu$ M, but no interactions with any important amino acid residues. The HIA and CaCo-2 values were 93.737% and 22.686 nm/sec, respectively, whereas the PPB and BBB values were 74.270% and 74.270%. Neither is this substance carcinogenic or mutagenic. Low binding energy and the most favored interaction with the receptor were observed for mefloquine. Thus, mefloquine exhibits potential as a prospective glucokinase inhibitor.

## Pendahuluan

Malaria merupakan salah satu penyakit yang menjadi masalah nasional maupun internasional. Prevalensi malaria tertinggi di Indonesia terjadi pada tahun 2012 dengan jumlah kasus sebesar 417.819 dan terus meningkat setelah tahun 2018. Berdasarkan data Kementerian Kesehatan, jumlah kasus malaria di Indonesia terus meningkat dalam kurun waktu 2020-2022, yakni dari 254.055 kasus di tahun 2020 menjadi 443.530 kasus di tahun 2022.

Tren peningkatan jumlah kasus ini linear dengan peningkatan tren kematian. Angka kematian tertinggi dalam kurun waktu 2018-2022 terjadi pada tahun 2022 dengan jumlah kematian mencapai 71 jiwa (Kemenkes, 2023). Komitmen pemerintah menangani kasus malaria sejalan dengan Keputusan Menteri Kesehatan Nomor 293 Tahun 2009 tentang Eliminasi Malaria pada tahun 2024 sebesar 405 kabupaten/kota di Indonesia dan Rencana Strategis Kementerian Kesehatan 2020-2024. Data Kementerian Kesehatan menyebutkan bahwa masih terdapat 11 persen penduduk berada di daerah endemis malaria yang tersebar di 142 kabupaten/kota (Pusat Analisis Anggaran dan Akuntabilitas Keuangan Negara, 2023).

Malaria merupakan salah satu penyakit infeksius yang disebabkan oleh spesies parasit *Plasmodium* sp. yang hidup dan berkembang biak di dalam sel darah manusia. Penyakit ini dapat menular, menurunkan produktivitas, serta meningkatkan kematian bayi, anak, serta orang dewasa (Avichena & Anggriyani, 2023). Penyakit malaria pada manusia disebabkan oleh empat jenis *Plasmodium*, yaitu *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium falciparum*, dan *Plasmodium ovale* (Yunita *et al.*, 2019). Di Indonesia sendiri, *Plasmodium vivax* merupakan spesies yang paling banyak ditemukan dalam transmisi penyakit malaria (Surjadjaja *et al.*, 2016).

Intensitas transmisi malaria ditentukan oleh beberapa variabel terkait parasit, seperti inang manusia dan lingkungan. Mengingat *Anopheles* betina cenderung menggigit manusia dibandingkan dengan hewan lain, kelangsungan hidup nyamuk *Anopheles* sangat berperan dalam penularan malaria. Adapun *Plasmodium* membutuhkan waktu 7-10 hari untuk matang di dalam vektor serangga dan menjadi infeksius (Wu *et al.*, 2023).

Klorokuin merupakan terapi malaria lini pertama yang telah banyak digunakan di seluruh dunia. Namun, di Indonesia, resistensi terhadap obat ini telah menjadi dominan sehingga penggunaannya sudah banyak digantikan oleh terapi kombinasi artemisinin (ACT) (Surjadjaja *et al.*, 2016). Salah satu kombinasi artemisinin yang memiliki efektivitas tinggi untuk mengobati malaria pada manusia adalah dihidroartemisinin-piperakuin (DHA-PPQ). Meski demikian, beberapa penelitian melaporkan terdapat beberapa kasus mengenai pembersihan parasit yang lambat. Namun, pada analisis selanjutnya terhadap kasus-kasus tersebut diungkapkan bahwa hal tersebut terkait dengan beban parasit yang lebih tinggi sehingga baru tereliminasi di hari ke-7 (Asih *et al.*, 2022).

Berdasarkan buku saku penatalaksanaan malaria yang dikeluarkan Kementerian Kesehatan RI tahun 2017, primakuin merupakan obat tambahan yang melengkapi pemberian ACT pada pasien malaria tanpa komplikasi. Primakuin dapat membunuh hypnozoite dari *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale* untuk mencegah kekambuhan di masa depan. Akan tetapi, pada pasien dengan defisiensi G6PD, pemberian primakuin dapat menyebabkan terjadinya hemolisis pada sel darah merah sehingga dapat menyebabkan anemia. Pada individu normal, total kapasitas G6PD intraeritrositik terpenuhi untuk mengurangi radikal bebas oksidatif yang dihasilkan oleh metabolit aktif primakuin. Sebaliknya, pasien dengan defisiensi G6PD genetik memiliki aktivitas G6PD total yang tidak mencukupi untuk mencegah hemolisis. Eritrosit yang lebih tua menjadi target yang paling rentan karena mengalami penurunan fisiologis dalam kapasitas antioksidan (Baird, 2019; Douglas *et al.*, 2023; Watson *et al.*, 2017).

Penemuan dan perancangan obat berbasis komputer (CADD atau *computer-aided drug discovery*) menjadi pendekatan yang kuat dalam mengidentifikasi dan menetapkan potensi kandidat tumbuhan sebagai agen terapeutik yang berefikasi tinggi. Simulasi *molecular docking* dan *molecular dynamics* menjadi salah satu metode komputasi yang banyak digunakan dalam mengidentifikasi kandidat obat potensial, pemahaman mekanisme kerja, dan interaksi serta cara pembentukan ikatannya (Faloye *et al.*, 2024).

Kina (*Cinchona succirubra*) merupakan salah satu tanaman yang memiliki aktivitas sebagai antimalaria. Umumnya, bagian tanaman kina yang banyak digunakan adalah batangnya. Senyawa yang paling melimpah dari alkaloid kina adalah kuinin, kuinidin, sinkonin dan sinkonidin, yakni sekitar 16% dari masa kulit batang pohonnya. Selain senyawa alkaloid kina, kulit batang pohon kina juga mengandung asam sinovik, asam kuini, asam fenolik, flavonoid, fitosterol (Avichena & Anggriyani, 2023; Alonso, 2004). Senyawa kuinin yang merupakan komponen utama metabolit sekunder pada tanaman kina hingga saat ini masih digunakan sebagai obat malaria yang cukup ampuh.

Kuinin merupakan basa lemah, yang terkonsentrasi di vakuola makanan *P. falciparum* (Ernawati *et al.*, 2018). Mekanisme aksi senyawa kuinin sebagai metabolit sekunder utama dalam mengatasi demam malaria, antara lain pengurangan asupan oksigen dan metabolisme karbohidrat, gangguan replikasi DNA dan transkripsi melalui interkalasi DNA, pengurangan rangsangan serat otot melalui perubahan distribusi

kalsium, penghambatan glikoprotein yang diekspresikan berlebihan pada tumor yang resisten terhadap beberapa obat dan dapat meningkatkan efikasi beberapa agen antineoplastik (O'Neil, 2013).

Selain kuinin, terdapat senyawa metabolit sekunder lain pada kulit batang kina meliputi kuinidin, kuinin sulfat, sinkonin, sinkonidin, meflokuin, dihidrokuinin, klorokuin, amodiakuin, dan isokuinolin yang bertindak sebagai antimalaria dengan menghambat aktivitas *P. falciparum* sehingga senyawa-senyawa metabolit sekunder tersebut kami uji dalam penelitian *in silico* ini untuk menemukan senyawa yang paling berpotensi sebagai agen obat baru terhadap reseptor glukokinase. Adapun glukokinase sendiri merupakan enzim yang memiliki peran penting dalam mengkatalisis tahap pertama dalam mengkonversi glukosa menjadi glukosa 6 fosfat dalam proses glikolisis (Yang *et al.*, 2021). Glikolisis sendiri merupakan jalur produksi ATP utama untuk parasit malaria (van Niekerk *et al.*, 2016).

## Metode

Instrumen atau alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain perangkat keras berupa laptop dengan spesifikasi Lenovo IdeaPad 5 dengan 11th Gen Intel(R) Core(TM) i5-1135G7 dengan RAM 8GB. Perangkat lunak yang digunakan di antaranya; PubChem, SwissADME, Pre-ADMET, Chem3D Pro 12.0, DUD.E A Database of Useful Decoys: Enhanced, LigandScout, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank, BIOVIA Discovery Studio 2021, dan AutoDock Tools-1.5.6. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain Human Glucokinase Receptor, 10 senyawa kulit batang kina yaitu kuinin, kuinidin, sinkonin, sinkonidin, kuinin sulfat, dihidrokuinon, meflokuin, klorokuin, amodiakuin, dan isokuinolin, serta primakuin sebagai obat pembanding.

Metabolit sekunder dalam kina dilakukan prediksi *Lipinski Rule of Five* (RO5) untuk mengetahui sifat fisikokimia suatu senyawa dengan menggunakan situs <http://www.swissadme.ch/>. Parameter uji Lipinski Rule of Five diantaranya nilai log P, bobot molekul, ikatan hidrogen akseptor, dan ikatan hidrogen donor. Hasil dianalisis untuk memastikan apakah senyawa tersebut memenuhi persyaratan Lipinski RO5. Selain itu prediksi profil ADMET juga dilakukan melalui situs <https://preadmet.webservice.bmdrc.org/> dengan memilih satu fitur prediksi dari Pre-ADMET: *Drug-likeness Prediction*, *ADME Prediction*, dan *Toxicity Prediction* untuk menganalisis dan mengetahui profil *drug-likeness* dan toksisitas senyawa uji.

Penapisan farmakofor dilakukan dengan preparasi database active dan decoy yang diunduh dari DUD.E (<https://dude.docking.org/targets>) dengan format .ldb. Preparasi database dengan mengunduh 10 struktur senyawa uji dari database Pubchem dan disimpan dalam format .ldb. Selanjutnya, model farmakofor dibuat menggunakan database active yang di-cluster dan diskriminasi sehingga mendapatkan 10 model farmakofor. 10 model farmakofor divalidasi performanya dalam membedakan senyawa 127 active dan 4.803 decoy kemudian menganalisis kurva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Model terbaik yang didapatkan diskriminasi terhadap database senyawa uji.

Penambatan molekuler dilakukan melalui situs <https://dude.docking.org/>, dimulai dengan mengunduh reseptor target yang sesuai. Ligan standar pada reseptor target dipisahkan dengan menggunakan BIOVIA Discovery Studio 2021. Selanjutnya, struktur reseptor target diperbaiki dengan menambahkan atom hidrogen polar dan muatan kollman dengan menggunakan AutoDock Tools. Struktur kemudian disimpan dalam format .pdbqt.

Selanjutnya, dilakukan persiapan ligan uji dengan mengunduh struktur 3D pada database PubChem. Struktur ligan uji yang diunduh kemudian dioptimasi dengan menggunakan perangkat lunak Chem3D. Struktur yang telah dioptimasi ditambahkan parameter torsi, atom H, dan muatan gasteiger dengan menggunakan AutoDock Tools. Struktur kemudian disimpan dalam format .pdbqt.

Reseptor target dan ligan yang telah dipreparasi dibuka di software AutoDock Tools untuk dibuat grid box parameter dan docking parameter. Setelah itu, dilakukan proses penambatan molekuler menggunakan Command Prompt dengan memasukkan perintah: `autogrid4 -p dock .gpf -l dock.dlg` dan `autodock4 -p dock .dpf -l dock.dlg`. Berkas baru akan terbentuk dengan format .glg dan .dlg.

Berkas dengan format .glg dan .dlg dapat dianalisis dengan membukanya melalui Notepad. Konformasi terbaik dapat dilihat dengan melihat energi ikat rata-rata. Semakin kecil energi ikatnya, maka konformasi tersebut akan semakin baik. Selanjutnya interaksi antara ligan dan reseptor dapat ditentukan dengan menggunakan AutoDock Tools dan divisualisasikan menggunakan Biovia Discovery Studio.

## Hasil dan Pembahasan

Sepuluh senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam kulit kayu batang kina, yaitu, kuinin, kuinidin, sinkonin, sinkonidin, kuinin sulfat, dihidrokuinin, meflokuin, klorokuin, amodiakuin, dan isokuinolin, terlebih dahulu diuji dengan prediksi Lipinski *Rule of Five* (RO5). Berdasarkan hasil evaluasi RO5, nantinya dapat diketahui sifat fisikokimia senyawa mana yang memiliki potensi dibuat sediaan oral. Adapun parameter yang dijadikan persyaratan, di antaranya: berat molekul kurang dari 500 Da, nilai koefisien partisi (Log P) kurang dari 5, jumlah ikatan donor hidrogen tidak lebih dari 5, dan ikatan hidrogen

akseptor tidak lebih dari 10. Senyawa obat dapat dikatakan memenuhi persyaratan RO5 apabila tidak melanggar lebih dari satu persyaratan aturan RO5 (Sen *et al.*, 2021).

Berdasarkan data pada Tabel 1, dalam pengujian potensi senyawa aktif dalam kulit kayu batang kina, diketahui semua senyawa uji memenuhi semua aturan Lipinski *Rule of Five* sehingga dapat diprediksi seluruh senyawa tersebut memiliki kelarutan, permeabilitas, dan absorpsi yang baik apabila nantinya dikembangkan menjadi sediaan obat oral. Adapun sediaan oral yang dapat dipilih diantaranya seperti tablet, kapsul, kaplet, dan sirup.

**Tabel 1.** Hasil Prediksi Lipinski *Rule of Five*

Nama Senyawa	Berat Molekul <500 Da	Nilai Koefisien Partisi (Log P) <5	Ikatan		Lipinski <i>Rule of Five</i>
			Donor <5	Akseptor <10	
Kuinin	324,42	2,81	1	4	Sesuai
Kuinidin	324,42	2,79	1	4	Sesuai
Sinkonin	294,39	2,75	1	3	Sesuai
Sinkonidin	294,39	2,78	1	3	Sesuai
Kuinin sulfat	422,50	1,51	3	8	Sesuai
Dihidrokuinin	326,43	2,86	1	4	Sesuai
Meflokuin	378,31	4,13	2	9	Sesuai
Klorokuin	319,87	4,15	1	2	Sesuai
Amodiakuin	355,86	4,22	2	3	Sesuai
Isoquinolin	355,86	4,22	2	3	Sesuai

Setelah mengetahui prediksi sifat fisikokimia dari 10 senyawa melalui prediksi RO5, pengujian dilanjutkan dengan melakukan prediksi ADME-Tox. Tujuan dari prediksi ADME-Tox adalah untuk mengetahui absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi dan toksisitas dari senyawa uji. Prediksi ADME-Tox dapat menghindari kegagalan pada tahap akhir proses penemuan obat dengan diketahui stabilitas dan keamanan obat dari kandidat senyawa obat sekaligus menghemat waktu dan biaya (Kar dan Leszczynski, 2020). Pemeriksaan ini terdiri dari beberapa bagian, yaitu *Toxicity Prediction* pada mencit dan tikus, *ADME Prediction*, serta *Drug-Likeness Prediction*, yang hasilnya tertera pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Hasil Prediksi ADME-Tox

Nama Senyawa	Absorpsi		Distribusi		Toksistas		
	HIA (%)	Caco-2 (nm/sec)	PBB (%)	BBB	Mutagen	Karsinogen	
						Mencit	Tikus
Kuinin	96,091	50,173	59,459	0,188	Mutagen	Negatif	Negatif
Kuinidin	96,091	50,173	59,459	0,188	Mutagen	Negatif	Negatif
Sinkonin	96,484	52,985	66,275	0,450	Mutagen	Negatif	Negatif
Sinkonidin	96,484	52,985	66,275	0,450	Mutagen	Negatif	Negatif

Kuinin sulfat	95,094	20,898	55,074	0,193	Mutagen	Positif	Negatif
Dihidrokuinin	95,969	50,293	66,389	0,245	Mutagen	Negatif	Negatif
Meflokuin	93,737	22,686	74,270	5,264	Non mutagen	Negatif	Negatif
Klorokuin	98,056	56,615	92,534	7,733	Mutagen	Negatif	Positif
Amodiakuin	94,986	41,784	95,918	5,765	Mutagen	Negatif	Negatif
Isoquinolin	100,000	56,243	100,000	2,400	Mutagen	Negatif	Negatif

Suatu senyawa parameter yang dilihat pada penilaian kemampuan absorpsi dalam ADME-Tox adalah *Human Intestinal Absorption* (HIA) dan *Human Colon Adenocarcinoma* (Caco-2). HIA memprediksi kemampuan absorpsi suatu senyawa dalam usus manusia (Nursamsiar *et al.*, 2016). Hasil %HIA dikategorikan menjadi tiga, yaitu senyawa yang diserap dengan buruk memiliki rentang nilai 0-20%, diserap dengan sedang memiliki rentang nilai 20-70%, dan diserap dengan baik memiliki rentang nilai 70-100% (Ranjith & Ravikumar, 2019). Berdasarkan hasil prediksi, ditemukan bahwa sepuluh senyawa ini memiliki kemampuan absorpsi yang baik di usus manusia, dengan senyawa isoquinolin menunjukkan nilai %HIA tertinggi. Adapun Caco-2 merupakan prediksi kemampuan permeabilitas perpindahan obat melalui sel epitel adenocarcinoma usus besar. Hasil Caco-2 dikategorikan menjadi tiga, yaitu senyawa dengan kemampuan permeabilitas rendah memiliki nilai kurang dari empat, kemampuan permeabilitas sedang 4-70, dan kemampuan permeabilitas tinggi lebih dari 70 (Prasetiawati, 2023). Berdasarkan hasil prediksi, diketahui semua senyawa memiliki kemampuan permeabilitas pada usus besar dengan kategori sedang, dengan senyawa klorokuin menunjukkan nilai Caco-2 tertinggi.

Sementara itu, pada penilaian kemampuan distribusi, parameter yang dilihat terdiri dari *Plasma Protein Binding* (PPB) dan *Blood Brain Barrier* (BBB). %PBB memprediksi kemampuan distribusi suatu senyawa berdasar ikatan protein dalam darah. Nilai %PBB lebih dari 90% menandakan ikatan protein dalam darah sangat kuat. Senyawa obat dianggap memiliki distribusi yang baik dalam darah jika kemampuan ikatannya dengan protein plasma sangat kuat. Berdasarkan hasil prediksi, terdapat 3 senyawa, yaitu isokuinolin, amodiakuin, dan klorokuin secara berurutan yang memiliki kemampuan ikatan yang sangat kuat, sementara 7 senyawa lain memiliki kemampuan ikatan senyawa yang lemah.

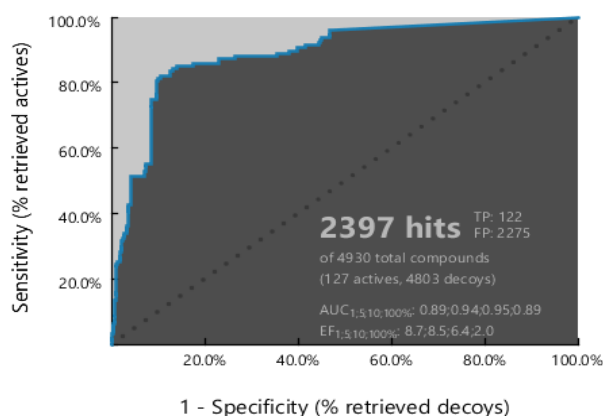
Adapun prediksi distribusi melalui BBB merepresentasikan kemampuan distribusi senyawa obat menembus sawar darah otak. Hasil BBB dikategorikan menjadi tiga, yaitu senyawa dengan kemampuan tinggi memiliki nilai lebih dari 2, dikatakan kemampuan sedang apabila nilainya ada pada rentang 0,1-2,0, dan dikatakan rendah apabila nilainya kurang dari 0,1. Distribusi senyawa obat dalam menembus sawar darah otak sangatlah penting apabila target kerja obat ada pada sistem saraf pusat tetapi apabila target kerja obat bukan pada sistem saraf pusat, maka kemampuan distribusi senyawa obat tidak boleh menembus hingga darah sawar otak. Pada penyakit malaria target kerja obat bukanlah pada sistem saraf pusat, sehingga terdapat 6 senyawa yang memiliki kemampuan sedang dalam menembus sawar darah otak, dengan senyawa kuinin dan kuinidin menunjukkan nilai BBB terendah. Sementara terdapat 4 senyawa yang memiliki kemampuan tinggi yakni klorokuin, amodiakuin, meflokuin, dan isoquinolin.

Penilaian terakhir dari prediksi ADME-Tox adalah nilai toksisitas yang dilihat dari kemampuan mutagenik dan karsinogenik yang menunjukkan apakah ligan yang diuji memiliki potensi mutagenik dan/atau karsinogenik pada tikus dan mencit. Langkah awal adalah memeriksa sifat mutageniknya. Nilai mutagen pada hasil prediksi menyatakan adanya potensi mutasi genetik pada sel. Berdasarkan hasil prediksi, diketahui bahwa hanya ada satu senyawa yang tidak memiliki potensi mutagen, yaitu senyawa meflokuin. Sementara itu, 9 senyawa lainnya diketahui memiliki potensi mutagenik. Selanjutnya, berdasarkan data karsinogen yang diuji pada tikus melalui prediksi ADME/Tox, nilai karsinogenik menyatakan adanya potensi yang dapat memicu pertumbuhan sel kanker dalam tubuh. Dari hasil prediksi karsinogenik pada mencit, diketahui senyawa kuinin sulfat berpotensi karsinogenik sementara 9 senyawa lain tidak memiliki potensi karsinogenik. Adapun hasil prediksi karsinogenik pada tikus diketahui terdapat hanya 1 senyawa, yaitu klorokuin sementara 9 senyawa lain tidak memiliki potensi karsinogenik. Senyawa yang diprediksi memiliki sifat mutagenik dan karsinogenik mengindikasikan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut melalui pengujian secara *in vivo* dan *in vitro*.

Dalam memastikan hal tersebut, melalui tahapan pedoman ICH M7 (penilaian dan pengendalian pengotor reaktif DNA (mutagenik) dalam obat-obatan untuk membatasi potensi risiko karsinogenik). Dalam pedoman ICH M7, ditinjau secara terperinci penilaian toksisitas menggunakan dua sistem *in silico*

yang saling melengkapi, misalnya DEREK dan Leadscope. Pedoman ICH M7 juga dapat memastikan ambang batas dosis toksik suatu senyawa obat (Amberg *et al.*, 2016).

Pemodelan farmakofor dilakukan dengan perangkat lunak LigandScout menggunakan *Ligand-Based Perspective*. *Ligand-based screening* menggunakan prinsip pencocokan bentuk antara templat ligan tiga dimensi dan senyawa yang diskriming (Moyano-Gómez *et al.*, 2024). Setelah dilakukan pemodelan farmakofor, 10 model farmakofor dilanjutkan ke tahap validasi farmakofor. Validasi farmakofor menggunakan sebanyak 127 senyawa *active* sebagai *data true positive* dan 4.803 senyawa *decoy* sebagai *data false positive*. *Training set* yang diskriming menghasilkan 10 model farmakofor yang kemudian model terbaiknya digunakan untuk skrining senyawa uji, yaitu kuinin, kuinidin, sinkonin, sinkonidin, kuinin sulfat, dihidrokuinin, meflokuin, klorokuin, amodiakuin, isokuinolin.

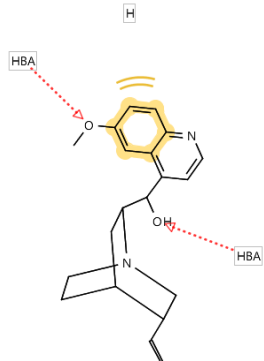
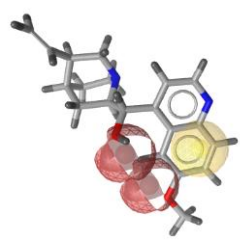
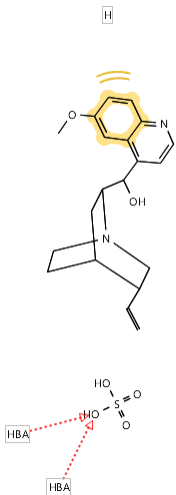
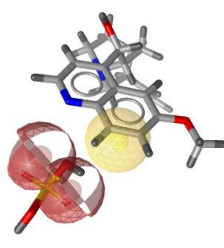
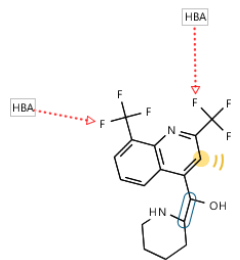
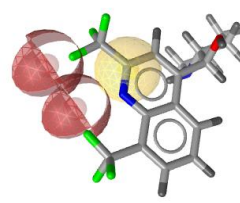


**Gambar 1.** Model Farmakofor Terpilih Hasil Visualisasi

Parameter validasi dari *Receiver Operating Characteristic* (ROC) yang terdiri dari area dibawah kurva/*areas under the curves* (AUC100%) dan *enrichment factor* (EF 1%) dapat menentukan sensitivitas, spesifisitas, dan akurasi dari model farmakofor (Hariyanti *et al.*, 2021). Sensitivitas didefinisikan sebagai kemampuan model farmakofor membedakan senyawa aktif sedangkan spesifisitas didefinisikan sebagai kemampuan model farmakofor dalam mengidentifikasi senyawa tidak aktif sebagai senyawa tidak aktif (Arba, 2019). Senyawa tidak aktif (*decoy*) mempunyai sifat fisikokimia yang serupa dengan senyawa aktif tetapi topologi dua dimensinya berbeda (Moussa *et al.*, 2021). Kurva ROC adalah representasi grafis dari sensitivitas (proporsi *true positive*) sebagai fungsi spesifisitas (proporsi *false positive*) (Sanachai *et al.*, 2022). Selain itu, kualitas model farmakofor dapat dijelaskan dengan empat parameter, di antaranya yaitu sensitivitas (kemampuan dalam mendeteksi senyawa aktif), spesifisitas (kemampuan dalam mengeliminasi senyawa yang tidak aktif), *yield* zat aktif (perbandingan antara hasil positif sejati dengan jumlah hasil positif), serta faktor pengayaan (yang menghubungkan hasil zat aktif dengan komposisi kumpulan data skrining) (Giordano *et al.*, 2022). Jika kurva ROC tajam dan rata, maka model tersebut dapat meletakkan peringkat senyawa aktif pada peringkat yang lebih tinggi dibandingkan senyawa tidak aktif (Moussa *et al.*, 2021).

Suatu model farmakofor dengan nilai AUC100% > 0,7 menandakan model tersebut mampu membedakan senyawa yang aktif dan tidak aktif dengan baik (Hosmer *et al.*, 2013). Hasil yang didapatkan dari skrining virtual yang telah dilakukan, yaitu model terbaik dengan total senyawa *active* dan *decoy* yaitu 2.397, didapatkan 122 data *true positive* (senyawa aktif) dan 2.275 *false positive* (senyawa tidak aktif). Dengan nilai AUC 100% yang bernilai 0,89, model farmakofor tersebut masih dapat dinyatakan valid untuk selanjutnya digunakan dalam skrining senyawa uji, meskipun kurva yang dihasilkan masih kurang spesifik. Senyawa uji yang hit terhadap reseptor glukokinase adalah kuinidin, kuinin sulfat, dan meflokuin dengan nilai *Pharmacophore-Fit Score* berturut-turut sebesar 35,98; 35,16; 35,07 dengan jenis ikatan seperti yang tertera pada Tabel 3. Nilai *Pharmacophore-Fit Score* menunjukkan tingkat kecocokan yang lebih tinggi dengan model farmakofor dan menunjukkan aktivitas penghambatan yang lebih tinggi terhadap reseptor glukokinase. Akan tetapi, senyawa uji yang diprediksi memiliki aktivitas perlu dibandingkan nilai *Pharmacophore-Fit Score*-nya dengan senyawa kontrol positif (Hariyanti *et al.*, 2021; Moussa *et al.*, 2021). Ketiga senyawa hit hasil skrining farmakofor tersebut selanjutnya dievaluasi berdasarkan sifat *drug-likeness*-nya menggunakan *Lipinski Rule of Five* dan dinyatakan bahwa ketiga senyawa tersebut memenuhi peraturan *Lipinski Rule of Five*.

**Tabel 3.** Hasil Skrining Farmakofoor

Nama Senyawa	Model 2D	Model 3D	Jenis Ikatan
Kuinidin			2 akseptor ikatan hidrogen; 1 ikatan hidrofobik
Kuinin sulfat			2 akseptor ikatan hidrogen; 1 ikatan hidrofobik
Meflokuin			2 akseptor ikatan hidrogen; 1 ikatan hidrofobik

Pada proses penambatan molekul atau *molecular docking*, digunakan sepuluh senyawa uji dan didapatkan hasil seperti yang tertera pada Tabel 4. Senyawa uji dibandingkan dengan kontrol positif berupa obat antimalaria yang telah beredar di pasaran, yakni primakuin. Terdapat tiga penilaian yang menjadi parameter pembandingan antara primakuin dan ligan uji, yakni interaksi dengan residu asam amino, energi bebas Gibbs, dan konstanta inhibisi.

Penilaian dilakukan terhadap energi bebas Gibbs ( $\Delta G$ ) atau energi afinitas ikatan (*binding energy*, BE). Penurunan energi bebas adalah kemampuan maksimum senyawa-senyawa saling bereaksi, sehingga semakin negatif energi bebas Gibbs maka semakin stabil ikatan senyawa tersebut (Suhadi *et al.*, 2019). Energi bebas memiliki hubungan yang linear dengan konstanta inhibisi (KI). Nilai konstanta inhibisi yang rendah menunjukkan bahwa ligan memiliki kemampuan yang lebih besar untuk menghambat protein target (Fiona *et al.*, 2024).

Dari hasil penambatan molekul, senyawa yang memiliki nilai energi bebas Gibbs dan konstanta inhibisi paling rendah adalah kuinin. Namun, apabila melihat dari parameter interaksi dengan residu asam amino, tidak ada satupun asam amino dari kuinin yang memiliki kesamaan dengan asam amino kontrol

positif. Selain itu, pada pengujian skrining farmakofor sebelumnya, kuinin bukanlah senyawa yang dapat memberikan hit ketika berinteraksi dengan reseptor glukokinase.

Berdasarkan hasil visualisasi, dari parameter interaksi asam amino, senyawa uji kuinidin, kuinin sulfat, sinkonin, sinkonidin, serta isokuinolin memiliki kemiripan dengan residu asam amino primakuin. Di antara kelima senyawa tersebut, kuinin sulfat memiliki nilai  $\Delta G$  yang paling rendah. Selain itu, pada pengujian skrining farmakofor, senyawa tersebut juga memberikan respon interaksi dengan reseptor. Meskipun demikian, jika ditinjau dari hasil prediksi ADME-Tox, senyawa kuinin sulfat memberikan hasil mutagen untuk uji toksisitas dan juga karsinogen terhadap mencit.

Adapun senyawa yang memberikan hasil negatif terhadap prediksi mutagenik dan karsinogenik ADME-Tox adalah meflokuin. Senyawa ini juga memberikan respon hit terhadap reseptor glukokinase pada pengujian skrining farmakofor. Dari hasil uji penambatan molekul, senyawa ini menunjukkan nilai  $\Delta G$  sebesar -3,95 kkal/mol dan nilai KI sebesar 1,27  $\mu M$ . Meski tidak menunjukkan kesamaan terhadap asam amino kontrol positif, tetapi jika ditinjau dari parameter lainnya senyawa meflokuin ini memiliki potensi sebagai lead compound antimalaria dari kulit batang kina selain kuinin.

Meflokuin sebagai antimalaria adalah obat oral untuk menangani malaria *multidrug-resistant*. Senyawa ini memiliki waktu paruh 2-3 minggu pada pasien dengan malaria yang memiliki fase eliminasi secara bi-atau tri eksponensial, dengan penurunan konsentrasi dalam darah yang lambat pada fase terminal. Fase ini memberikan periode yang cukup panjang di mana konsentrasi mefloquine dalam darah tetap berada pada tingkat aktivitas penghambatan menengah (kerja panjang) (Simpson *et al.*, 2000).

Semenjak dikembangkan sebagai obat, meflokuin diindikasikan sebagai profilaksis dan pengobatan malaria meskipun mekanisme kerjanya belum dipahami secara memadai (Taylor dan White, 2004). Meflokuin sudah dikembangkan sejak tahun 1970 oleh Amerika Serikat sebagai upaya menyelamatkan para prajurit di daerah yang resisten terhadap galur *Plasmodium* sehingga tidak dapat menggunakan klorokuin (Ahmad *et al.*, 2021). Meflokuin memiliki waktu paruh yang panjang, yakni hingga 13-30 hari sehingga memberikan keunggulan dibandingkan profilaksis lain karena cukup digunakan sekali dalam seminggu dengan dosis yang lebih rendah (WHO dan F. Hoffmann-La Roche, 1991). Namun, melalui perkembangannya, McCarthy (2015) menyatakan bahwa meflokuin pada dosis antimalarial bersifat neurotoksik dengan adanya lesi permanen pada batang otak hewan percobaan. Sedangkan di India, Kebijakan Obat Nasional untuk Malaria (2013), menggunakan meflokuin sebagai kemoprofilaksis jika tinggal di daerah malaria selama lebih dari 6 minggu terutama pada kelompok tertentu dan di wilayah dengan prevalensi tinggi *P. falciparum* dan masih digunakan hingga saat ini meskipun disertai peringatan pada kemasannya. Hal ini membuktikan bahwa meflokuin sudah terbukti efektif sebagai obat antimalaria, tetapi dosis terapi dan efek sampingnya terhadap manusia terutama pada kelompok dan daerah tertentu perlu dikaji kembali.

**Tabel 4.** Hasil Penambatan Molekul

Nama senyawa	Interaksi Asam Amino	Energi Bebas Gibbs ( $\Delta G$ )	Konstanta Inhibisi (KI)
Primakuin (+)	<b>LYS A90</b> , ASP A73, <b>VAL A101</b> , TRP A99, <b>THR A103</b>	-3,52 kkal/mol	2,62 $\mu M$
Kuinin	ILE A225, LYS A169, ASP A78, GLY A80, ARG A85	-6,23 kkal/mol	27,24 $\mu M$
Kuinidin	<b>LYS A90</b> , <b>VAL A101</b> , <b>THR A103</b> , LYS A104	-3,18 kkal/mol	4,46 $\mu M$
Kuinin sulfat	<b>LYS A90</b> , <b>THR A103</b> , <b>VAL A101</b> , LYS A104, LEU A88	-3,21 kkal/mol	4,47 $\mu M$
Sinkonin	<b>VAL A101</b> , <b>LYS A90</b> , <b>THR A103</b> , LYS A102	-3,45 kkal/mol	2,95 $\mu M$



Sinkonidin	<b>LYS A90, VAL A101, THR A103</b>	-3,14 kkal/mol	5,01 $\mu$ M
Klorokuin	LEU A134, LEU A144, MET A139, LEU A75, PHE A133, LEU A88, HIS A137, LYS A104	+319,92 kkal/mol	-
Isokuinolin	<b>THR A103, VAL A101</b>	-2,72 kkal/mol	10,00 $\mu$ M
Amodiaquin	CYS A230, ILE A225, ASN A231, ASP A205, PHE A152, GLU A290, LYS A169, PRO A153, ASP A78	-6,22 kkal/mol	27,71 $\mu$ M
Meflokuin	ARG A85, ASP A409, GLY A227, ILE A225, ASP A205, GLY A229, LYS A169	-3,95 kkal/mol	1,27 $\mu$ M
Dihidrokuinin	ASN A83, ARG A85, GLY A80, ILE A225, SER A151, LYS A169	-6,23 kkal/mol	27,22 $\mu$ M

### Simpulan

Hasil dari studi *in silico* pada penelitian ini menunjukkan karakteristik meflokuin terhadap reseptor enzim glukokinase memiliki *binding energy* yang baik sebesar -3,95 kkal/mol dan nilai konstanta inhibisi 1,27  $\mu$ M, penyerapan dan permeabilitas yang baik, pengikatan protein yang signifikan dan kemampuan untuk melewati sawar darah-otak, serta profil yang aman terkait karsinogenisitas dan mutagenisitas untuk menjadi sediaan oral. Namun, kurangnya interaksi dengan residu asam amino senyawa pembandingnya menunjukkan bahwa mekanisme kerja meflokuin kurang spesifik.

### Daftar Referensi

- Ahmad, S.S., Rahi, M., Ranjan, V., & Sharma A. 2021. Mefloquine as a prophylaxis for malaria needs to be revisited. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 17:23-26.
- Alonso, J. 2004. *Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos*. Barcelona: Corpus.
- Amberg, A., Beilke, L., Bercu, J., *et al.* 2016. Principles and procedures for implementation of ICH M7 recommended (Q)SAR analyses. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 7: 13–24.
- Arba, M. 2019. *Buku Ajar Farmasi Komputasi*, Yogyakarta: Deepublish.
- Asih, P. B. S., Rozi, I. E., Dewayanti, F. K., *et al.* 2022. Efficacy and safety of dihydroartemisinin–piperaquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria in Papua and Sumatra, Indonesia. *Malar J*, 21: 95.
- Avichena dan Anggriyani, R. 2023. Analisis Penyakit Malaria Akibat Infeksi Plasmodium sp terhadap Darah Manusia. Ekotonia. *Jurnal Penelitian Biologi, Botani, Zoologi dan Mikrobiologi*, 8(1): 30-37.
- Baird, J. K. 2019. 8-aminoquinoline therapy for latent malaria. *Clin Microbial Rev*, 32: 1–68.
- Douglas, N. M., Piera, K. A., Rumaseb, A., Ley, B., Anstey, N. M., Price, R. N. 2023. Primaquine-induced Severe Hemolysis in the Absence of Concomitant Malaria: Effects on G6PD Activity and Renal Function. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 108(1): 76-80.
- Ernawati, T., Lotulung, P. D. N., Megawati. 2018. Bioaktivitas Senyawa Turunan Alkaloid Kinkona. *Jurnal Agrosains dan Teknologi*, 3(2): 96-87.

- Faloye, K. O., Ambali, O. A., Ogundele, S. B. 2024. Elucidating the antimalarial activity of pityriacitrin isolated from *Strophanthus hispidus* (DC) whole plant extract: A detailed experimental and in-silico investigation. *Journal of Molecular Structure*, 1318: 139268.
- Fiona, Pebralia, J., Restianingsih, T., Sirait F. Y., Regina, I. 2024. Analisis *Molecular Docking* in Silico Terhadap Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* pada Daun Tanaman Herbal Eukaliptus Lemon (*Corymbia citriodora*). *Newton-Maxwell Journal of Physics*, 5(1): 19-27.
- Giordano, D., Biancaniello, C., Argenio, M. A., Facchiano, A. 2022. Drug Design by Pharmacophore and Virtual Screening Approach. *Pharmaceuticals (Basel)*, 15(5): 646.
- Hariyanti, Kusmardi, Yanuar, A., Hayun. 2021. Ligand Based Pharmacophore Modelling, Virtual Screening, and Molecular Docking Studies of Asymmetrical Hexahydro-2H-Indazole Analogs of Curcumin (AIACs) to Discover Novel Estrogen Receptors Alpha (ER $\alpha$ ) Inhibitor. *Indones. J. Chem*, 21(1): 137–147.
- Hosmer, D. W., Lemeshow, S., Sturdivant, R. X. 2013. *Applied Logistic Regression 3rd Edition*. USA: John Wiley & Sons.
- Kar, S. and Leszczynski, J., 2020. Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 15(12), pp.1473–1487.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2023. *Laporan Kinerja Direktorat Jenderal Pencegahan dan Pengendalian Penyakit Tahun 2022*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2017. *Buku Saku Penatalaksanaan Kasus Malaria*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Mccarthy, S. 2015. Malaria prevention, mefloquine neurotoxicity, neuropsychiatric illness, and risk-benefit analysis in the Australian defence force. *Journal Of Parasitology Research*, 1-23.
- Moussa, N., Hassan, A., Gharaghani, S. 2021. Pharmacophore model, docking, QSAR, and molecular dynamics simulation studies of substituted cyclic imides and herbal medicines as COX-2 inhibitors. *Heliyon*, 7(4): e06605.
- Moyano-Gómez, P., Lehtonen, J. V., Pentikäinen, O. T., *et al.* 2024. Building shape-focused pharmacophore models for effective docking screening. *Journal of Cheminformatics*, 16: 97.
- Nursamsiar, Toding, A. T., Awaluddin, A. 2016. Studi In Silico Senyawa Turunan Analog Kalkon Dan Pirimidin Sebagai Antiinflamasi: Prediksi Absorpsi, Distribusi, Dan Toksisitas. *Pharmacy: Jurnal Farmasi Indonesia (Pharmaceutical Journal of Indonesia)*, 13(1): 92-100.
- O'Neil, M. J. 2013. *The Merck Index-An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Prasetiawati, R. 2023. Prediksi Senyawa Secara Penambatan Molekul Senyawa Yang Terkandung Di Dalam Kacang Panjang (*Vigna unguiculata*) Dan Kacang Hijau (*Vigna radiata*) Sebagai Obat Antikanker Paru. *Jurnal Ilmiah Farmasi Farmasyifa*, 6: 216-225.
- Pusat Analisis Anggaran dan Akuntabilitas Keuangan Negara. 2023. *Buletin APBN Volume III Edisi 23*. Jakarta: Badan Keahlian Sekretariat Jenderal DPR RI.
- Ranjith, D., Ravikumar, C. 2019. SwissADME predictions of pharmacokinetics and drug-likeness properties of small molecules present in *Ipomoea mauritiana* Jacq. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8: 2063–2073.
- Sanachai, K., Mahalapbutr, P., Hengphasatporn, K., *et al.* 2022. Pharmacophore-Based Virtual Screening and Experimental Validation of Pyrazolone-Derived Inhibitors toward Janus Kinases. *American Chemical Society*, 7(37): 33548-33559.
- Sen, K., Nandi, Saha, D. 2021. Rule of five: The five men army to cross the blood brain barrier for therapeutically potent. *World Journal of Advance Healthcare Research*, 5(3): 206-211.
- Simpson, J.A., Watkins, E.R., Price, R.N., Aarons, L., Kyle, D.E., & White, N.J. 2000. Mefloquine pharmacokinetic-pharmacodynamic models: implications for dosing and resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(12):3414–3424.
- Suhadi, A., Rizarullah, R., Feriyani F. 2019. Simulasi docking senyawa aktif daun binahong sebagai inhibitor *enzyme* aldose reductase sel. *Jurnal Penelitian Kesehatan*, 6(2): 55-65.

- Surjadjaja, C., Surya, A., Baird, K. 2016. Epidemiology of Plasmodium vivax in Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 95(6): 121-132.
- Taylor, W. R., White, N. J. 2004. Antimalarial drug toxicity: a review. *Drug Saf*, 27(1): 25-61.
- van Niekerk, D. D., Penkler, G. P., du Toit, F., & Snoep, J. L. 2016. Targeting glycolysis in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *The FEBS journal*, 283(4): 634–646.
- Watson, J., Taylor, W. R. J., Menard, D., Kheng, S., White, N. J. 2017. Modelling primaquine-induced haemolysis in G6PD deficiency. *eLife*, 6(e23061): 1-19.
- World Health Organization (WHO), F. Hoffman-La Roche. 1991. Review of the Central Nervous System Adverse Events Related to the Anti-malarial Drug, Mefloquine (1985-1990). *Tech. Rep.* WHO/MAL/91.1063.
- Wu, S., Nie, Q., Tan, S., et al. 2023. The immunity modulation of transforming growth factor- $\beta$  in malaria and other pathological process. *International Immunopharmacology*, 122: 110658.
- Yang, A. S. P., van Waardenburg, Y. M., van de Vegte-Bolmer, M., van Gemert, G. A., Graumans, W., de Wilt, J. H. W., & Sauerwein, R. W. 2021. Zonal human hepatocytes are differentially permissive to Plasmodium falciparum malaria parasites. *The EMBO journal*, 40(6), e106583.
- Yunita, N. N., Tatontos, E. Y., Urip, U. 2019. Analisis jenis plasmodium penyebab malaria terhadap hitung jumlah trombosit. *Jurnal Analis Medika Biosains (JAMBS)*, 6(1): 58-61.