

Aktiviti Antimalaria dan Skizontisida Sebatian Analog 4-aminokuinolina-pirano[2,3-c]pirazol terhadap *Plasmodium knowlesi* A1H1 dan Analisis Dok Molekul

(Antimalarial and Schizonticidal Activities of 4-aminoquinoline-pyrano[2,3-c]pyrazole Analogs against *Plasmodium knowlesi* A1H1 and Molecular Docking Analysis)

SITI NURFATEHAH KAMAL^{1,#}, AMATUL HAMIZAH ALI^{2,#}, NG YEE LING³, MOHD ASYRAF SHAMSUDIN², SITI NUR HIDAYAH JAMIL², HANI KARTINI AGUSTAR¹, NURUL IZZATY HASSAN², MOHD RIDZUAN MOHD ABD RAZAK⁴, LAU YEE LING³ & JALIFAH LATIP^{2,*}

¹Jabatan Sains Bumi dan Alam Sekitar, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

²Jabatan Sains Kimia, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

³Jabatan Parasitologi, Fakulti Perubatan, Universiti Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia

⁴Pusat Penyelidikan Perubatan Herba, Institut Penyelidikan Perubatan, Kompleks Institut Kesihatan Negara, Kementerian Kesihatan Malaysia, 40170 Shah Alam, Selangor, Malaysia

Diserahkan: 4 Disember 2023/Diterima: 7 Oktober 2024

#These authors contributed equally

ABSTRAK

Kemunculan jangkitan zoonosis *Plasmodium knowlesi* dan perkembangan kerintangan parasit terhadap ubat antimalaria sedia ada memacu penyelidikan dinamik bagi meneroka dan mencari agen antimalaria yang baharu. Penghibridan farmakoforik ialah suatu strategi gabungan dua sebatian yang berlainan farmakofor untuk mencegah kerintangan parasit terhadap ubat antimalaria sedia ada dan mengurangkan kesan sampingan ubat antimalaria. Lima terbitan kuinolina telah menunjukkan aktiviti antimalaria terhadap parasit malaria iaitu kesan analog 4-aminokuinolina-pirano[2,3-c]pirazol terhadap strain *Plasmodium falciparum* 3D7 dan K1. Oleh itu, objektif kajian ini adalah untuk menilai aktiviti antimalaria dan skizontisida analog 4-aminokuinolina-pirano[2,3-c]pirazol terhadap strain parasit zoonotik iaitu *Plasmodium knowlesi* A1H1 yang telah diadaptasi dalam darah manusia. Kesemua analog kuinolina telah diuji secara *in vitro* terhadap *P. knowlesi* A1H1 menggunakan plasmodium laktat dehidrogenase (pLDH) dan ujian pematangan skizon (SMA). Analisis dok molekul analog kuinolina turut dilakukan pada satu protein sasaran, *Plasmodium* sp. pengangkut rintang-klorokuina (PfCRT) yang bertujuan untuk memahami kemungkinan potensi protein ini sebagai sasaran antimalaria analog kuinolina tersebut. Hasil yang diperolehi menunjukkan bahawa analog **2** dan **5** ($EC_{50} = 0.15-0.16 \mu\text{M}$) mempunyai kesan antiplasmodium yang poten terhadap *P. knowlesi*. Tambahan lagi, analog **2** dan **5** mempunyai kesan skizontisida yang poten terhadap *P. knowlesi* berbanding sebatian analog yang lain. Suatu kajian menggunakan analisis dok *in silico* menunjukkan bahawa analog **2** dan **5** mempunyai konformasi pengikatan sempurna dalam tapak domain transmembran-1 PfCRT dengan masing-masing mempunyai nilai afiniti pengikatan -9.1 kcal/mol . Hasil kajian ini mencadangkan bahawa analog **2** dan **5** menghalangi pertumbuhan parasit zoonotik *P. knowlesi* dan menyasarkan protein parasit PfCRT sebagai sasaran molekul berpotensi.

Kata kunci: Aktiviti antiplasmodium; dok molekul; malaria; *Plasmodium knowlesi*; skizontisid; 4-aminokuinolina-pirano[2,3-c]pirazol

ABSTRACT

The emergence of the zoonotic infection *Plasmodium knowlesi*, as well as the development of parasite resistance to current antimalarial drugs, is driving the dynamic research into a new antimalarial agent. Pharmacophoric hybridization is a combination strategy to prevent drug resistance and drug-drug interactions. Five quinoline derivatives namely 4-aminoquinoline-pyrano[2,3-c]pyrazole analogues showed potent antimalarial activities against *Plasmodium falciparum* strains 3D7 and K1. The objective of this study is to evaluate the antimalarial and schizonticidal activities of 4-aminoquinoline-pyrano[2,3-c]pyrazole analogs against the human-adapted zoonotic parasite strain, *Plasmodium knowlesi* A1H1. All quinoline analogs were tested *in vitro* against *P. knowlesi* A1H1 using the plasmodium lactate

dehydrogenase (pLDH) and schizont maturation assays (SMA). Molecular docking analysis of these quinoline analogs on a protein target, *Plasmodium* sp. chloroquine resistant transporter (PfCRT), was performed to understand the possible antimalarial target of these quinoline analogs. The results showed that analogs **2** and **5** have potent antiplasmodial effects against *P. knowlesi* ($EC_{50} = 0.15-0.16 \mu\text{M}$). Furthermore, compared to all test compounds, analogs **2** and **5** had good schizonticidal effects. A study using *in silico* docking showed that analogs **2** and **5** had perfect binding conformations in the PfCRT's transmembrane domain 1 site, with binding affinities of -9.1 kcal/mol, respectively. The results of this study suggested that quinoline analogs **2** and **5** inhibited the growth of the zoonotic parasite *P. knowlesi* and targeted the parasite protein PfCRT as a potential molecular target.

Keywords: Antiplasmodial activities; malaria; molecular docking; *Plasmodium knowlesi*; schizonticide; 4-aminoquinoline-pyrano[2,3-c]pyrazole

PENGENALAN

Malaria adalah penyakit berjangkit yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium* sp. dan disebarkan oleh nyamuk *Anopheles* sebagai vektor utama. Pada tahun 2021, 247 juta kes malaria dan 619,000 kes kematian telah direkodkan yang mana kebanyakannya berlaku di negara-negara Afrika, bagaimanapun separuh daripada penduduk dunia di 84 negara adalah berisiko dijangkiti malaria (WHO 2022). Di Malaysia, kes jangkitan malaria kekal tinggi terutamanya di negeri-negeri Pulau Borneo iaitu Sabah dan Sarawak. Di Semenanjung Malaysia pula, wabak penyakit malaria baru-baru ini dilaporkan meningkat 75% pada tahun 2023 di negeri Terengganu (MOH 2023; Tobin et al. 2023), menunjukkan bahawa penyakit itu masih menjadi isu kesihatan di negara ini. Jangkitan malaria zoonotik adalah ancaman baharu kepada negara dengan statistik kesihatan negara menunjukkan pada tahun 2021, kes jangkitan malaria zoonotik meningkat dengan jumlah 17,125 daripada tahun 2017 hingga 2021 (WHO 2022). Di negara ini, jangkitan *Plasmodium knowlesi* telah meningkat di kawasan yang mana jangkitan parasit malaria manusia seperti *Plasmodium falciparum* dan *P. vivax* dalam keadaan terkawal. Situasi ini sekali gus mengancam dan merumitkan usaha untuk menghapuskan jangkitan malaria di Malaysia. Protozoa apikompleksa, *P. knowlesi* dikenali sebagai parasit malaria manusia kelima oleh Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO) selepas *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* dan *P. ovale*. *Plasmodium knowlesi* adalah kebiasaannya menyebabkan jangkitan kronik kepada kera ekor panjang (*Macaca fascicularis*) dan kera ekor babi (*M. nemestrina*) dan penularan jangkitan berlaku di negara-negara di Asia Tenggara (Singh & Daneshvar 2013). Kitaran hidup *Plasmodium knowlesi* adalah unik dalam darah primat dan manusia kerana ia mempunyai kitar intraeritrosit untuk replikasi dalam tempoh 24 jam berbanding 48 jam kitar eritrosit bagi *P. falciparum* (Lau et al. 2011), akibatnya komplikasi yang berlaku disebabkan jangkitan akan bertambah cepat (Daneshvar et al. 2009). Di Asia Tenggara, kemunculan jangkitan zoonotik iaitu transmisi *P. knowlesi* kepada manusia dan perkembangan kerintangan parasit terhadap ubat antimalaria sedia ada adalah faktor utama penyumbang kepada penyebaran penyakit itu. Tambahan pula, pada masa ini tiada vaksin

yang tersedia secara komersial terhadap malaria dan calon vaksin yang sedang diuji di peringkat percubaan klinikal adalah RTS,S/AS01 yang hanya menunjukkan keberkesanan yang sederhana pada bayi dan kanak-kanak di kawasan endemik malaria iaitu di Afrika (WHO 2021). Kemunculan kes kerintangan *P. falciparum* terhadap ubat antimalaria barisan hadapan seperti klorokuina dan terapi gabungan artemisinin (ACT) di kebanyakan negara di rantau Asia Tenggara serta ketiadaan vaksin malaria yang berkesan telah meningkatkan usaha untuk meneroka ubat antimalaria baharu dengan mod tindakan yang berpotensi bagi meningkatkan keberkesanan atau menggantikan ubat antimalaria sedia ada.

Kuinolina mempunyai sejarah sebagai ubat antimalaria yang sangat berkesan (Makarov et al. 2009) dan sebatian terbitannya juga menunjukkan pelbagai aktiviti biologi seperti anti-HIV, anti-kulat, anti-bakteria dan anti-leishmania (Kaur et al. 2010; Streckowski et al. 1991). Antara terbitan kuinolina, iaitu 4-amino-7-klorokuinolina merupakan ubat barisan hadapan melawan parasit malaria kerana keberkesanan klinikalnya yang sangat baik, mempunyai kadar ketoksikan yang rendah, mudah dan murah untuk disintesis (Chauhan et al. 2013). Hibrid berasaskan kuinolina seperti 15 terbitan analog hibrid kalkon-klorokuina (Vinindwa et al. 2021) dan azalida-4-aminokuinolina (Starčević et al. 2012) telah dilaporkan sebagai agen antiparasit. Sebatian 4-aminokuinolina menghalang detoksifikasi hem dengan mengikat ferriprotoporfirin IX lalu menyekat pembentukan hemozoin parasit (de Villiers & Egan 2021).

Protein pengangkut dalam *Plasmodium* sp. telah dikaji mengenai peranannya dalam pembentukan proses kerintangan kepada ubat antimalaria. Protein pengangkut utama yang menyebabkan kerintangan ubat antimalaria dalam parasit ialah *Plasmodium* sp. pengangkut rintang-klorokuina (PfCRT). Kerintangan klorokuina dikaitkan dengan mutasi pada PfCRT, yang menggalakkan klorokuina diangkut keluar daripada vakuol makanan, sekali gus mengurangkan jumlah klorokuina yang tersedia untuk mengikat sasarannya (Roux et al. 2021). Semua strain parasit rintang-klorokuina membawa mutasi pada residu PfCRT K76T (Coulibaly et al. 2022). Beberapa terbitan klorokuina, seperti amodiakuina dan piperakuina,

telah dibangunkan untuk mengatasi kerintangan parasit terhadap klorokuina dan ia digunakan pada masa kini dalam gabungan terapi dengan artesunat. Walaupun amodiakuina berkesan terhadap strain rintang-klorokuina, ubat tersebut juga menunjukkan beberapa kerintangan silang. Keberkesanan ubat piperakuina juga berkurang terhadap strain parasit yang membawa haplotip *PfCRT* rintang-klorokuina (Folarin et al. 2011).

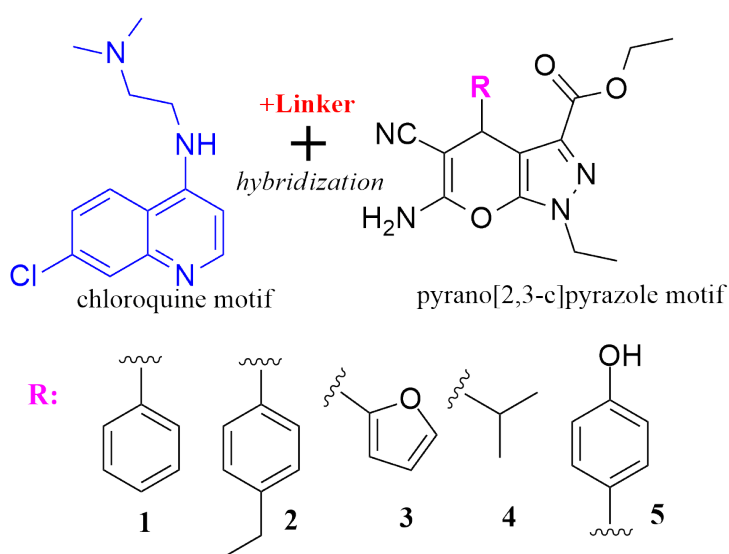
Konsep penghibridan dua atau lebih farmakofor aktif menjadi satu entiti kimia tunggal, menghasilkan satu 'hibrid antimalaria' adalah menjadi satu kaedah meningkatkan keberkesanan ubat antimalaria bagi menghalang mutase kerintangan berlaku. Kaedah penghibridan sebatian kimia sering diguna pakai oleh saintis dan penyelidik pada masa kini. Dalam kajian yang lalu, kami telah menguji hibrid 4-aminoakuinolina-pirano[2,3-c]pirazol terhadap *P. falciparum* sensitif dan rintang-CQ yang menunjukkan potensi yang sangat tinggi (Shamsuddin et al. 2021). Berdasarkan analisis hubungan struktur aktiviti (SAR), farmakofor 4-aminokuinolina diperlukan untuk interaksi ikatan π - π dengan hem untuk meningkatkan aktiviti perencatan β -hematin (Shamsuddin et al. 2021). Ubat antimalaria yang mengandungi moeti kuinolina berkumpul di dalam vakuol makanan parasit lalu menyekat penghadaman sitosol sel perumah oleh parasit dan seterusnya merencat pertumbuhan parasit. Kumpulan 4-aminokuinolina, seperti klorokuina dan amodiakuina, juga merupakan agen skizontisid darah yang menyasarkan pencernaan hemoglobin parasit pada peringkat aseksual untuk perencatan parasit (Aguiar et al. 2012; Warhurst 2001). Agen skizontisid darah seperti klorokuina dan artemisinin bertindak ke atas fasa aseksual parasit dan seterusnya

menghentikan jangkitan klinikal malaria. Agen skizontisid darah ialah ubat yang bertindak pantas untuk menghalang jangkitan parasit dan merupakan agen yang paling berkesan dalam kemoterapi malaria. Oleh itu, penyelidikan ini bertujuan untuk mengkaji aktiviti antimalaria dan kesan skizontisid *in vitro* sebatian analog hibrid 4-aminokuinolina-pirano[2,3-c]pirazol dan menentukan sama ada analog ini menyasarkan protein plasmodium CRT sebagai sasaran terapeutik yang berkesan dalam jangkitan *P. knowlesi*. Sensitiviti analog yang diuji secara *in vitro* terhadap *P. knowlesi* dinilai dengan menentukan keberkesanan antimalaria menggunakan asai plasmodium laktat dehidrogenase dan kesan skizontisid dinilai dengan menggunakan asai perencatan kematangan skizon terhadap parasit zoonotik, *P. knowlesi* yang telah diadaptasi dalam darah manusia. Seterusnya, analisis *in silico PfCRT* dan interaksinya dengan molekul analog telah dijalankan untuk menentukan kesan analog ini pada protein *Plasmodium* rintang-klorokuina, *PfCRT* tersebut. Kajian ini adalah penting untuk memahami potensi mekanisme tindakan dan hubungan struktur-aktiviti analog hibrid 4-aminokuinolina-pirano[2,3-c]pirazol untuk membentuk agen yang mampu menghalang jangkitan parasit dengan pantas dan berpotensi dikembangkan sebagai sebatian baharu untuk menggantikan ubat antimalaria sedia ada.

KAEDAH PENYELIDIKAN

BAHAN KIMIA DAN SEBATIAN KAJIAN

Semua sebatian yang digunakan dalam kajian ini telah disintesis berdasarkan kaedah Shamsuddin et al. (2021) dan diperoleh daripada Jabatan Sains Kimia, Fakulti



RAJAH 1. Konsep penghibridan farmakofor 4-aminokuinolina-pirano[2,3-c]pirazol

Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia. Prosedur am untuk mensintesis sebatian analog **1-5** telah diterangkan sebelum ini dalam artikel Shamsuddin et al. (2021). Analog **1-5** telah disintesis daripada campuran 4-(bromoetilamino)-7-klorokuinolina (1.4284 g, 5 mmol), pirano[2,3-c]pirazole-3-karboksilat yang sepadan (1.5515 g, 5 mmol) dan natrium bikarbonat (0.8401 g, 10 mmol) dalam DMSO pada 30-40 °C selama 24 jam (Rajah 1). Klorokuina difosfat (CQ) berfungsi sebagai dadah rujukan piawai untuk ujian *in vitro* dan CQ dibeli daripada Sigma Aldrich, USA. Semua bahan kimia dan pelarut dibeli daripada Sigma Aldrich, USA.

PENKULTURAN *Plasmodium knowlesi* A1H1

Untuk pengkulturan parasit, parasit zoonotik *Plasmodium knowlesi* A1H1 telah diadaptasi dalam darah manusia, diperolehi daripada Makmal Kultur Malaria, Jabatan Parasitologi, Fakulti Perubatan, Universiti Malaya (disumbangkan oleh Robert W. Moon, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK). Kaedah untuk penyesuaian parasit *P. knowlesi* ke dalam darah manusia telah direka oleh Moon et al. (2013) dan dijadikan panduan dalam kajian ini. Parasit telah dibiakkan dalam darah manusia segar rhesus O+ dalam medium kultur RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, NY, USA). Medium kultur telah ditambah dengan 10% serum kuda (Gibco, New Zealand), glukosa (3 g/L), hipoxantin (45 µg/L) dan gentamisin (50 µg/L).

ASAI *in vitro* ANTIPLASMODIUM

Keberkesanan analog yang diuji merencat pertumbuhan parasit diukur secara *in vitro* terhadap strain *P. knowlesi* A1H1 dengan mengukur penghasilan enzim plasmodium laktat dehidrogenase (pLDH) (Makler & Hinrichs 1993). Darah terjangkit *P. knowlesi* pada tahap 2% parasitemia dan 2% hematokrit telah dikultur untuk asai pLDH. Sebanyak 100 µL daripada sebatian analog yang telah dicairkan secara bersiri dengan julat kepekatan 1000 hingga 0.001 µM dalam medium kultur menggunakan piring 96-telaga dan seterusnya darah berparasit telah ditambah dalam piring 96-telaga yang sama untuk proses pengeraman selama 24 jam. Piring 96-telaga yang mengandungi darah berparasit dan analog yang dicairkan diinkubasi dalam inkubator steril pada 5% O₂, 5% CO₂ dan 90% N₂ pada 37 °C. Klorokuina dengan julat kepekatan 10 hingga 0.00001 µM ialah ubat antimalaria rujukan dalam kajian ini. Selepas proses inkubasi, campuran sebatian analog dan darah berparasit diasai dengan reagen NBT-PES dan Malstat. Hasil asai dibaca dengan penyerapan spektrofotometer pada gelombang 650 nm. Semua uji kaji diulang sebanyak tiga replikasi. Keputusan asai dianalisis menggunakan perisian GraphPad Prism dan dinyatakan sebagai nilai EC₅₀ iaitu nilai kepekatan sebatian yang mengurangkan parasitemia sebanyak 50%.

ASAI KEMATANGAN SKIZON

Asai kematangan skizon *in vitro* bagi analog sebatian kajian digunakan untuk mengukur aktiviti perencatan parasit pada kitar perkembangan aseksual dalam eritrosit dan dinilai dengan mengukur bilangan skizon yang matang menggunakan ujian WHO Mark III yang telah diubah suai (WHO 2001). *Plasmodium knowlesi* telah dikultur dalam fasa cincin segerak atau *synchronise* pada parasitemia 2% sebelum diuji dengan sebatian analog. Fasa kultur telah diseragamkan menggunakan kaedah Moon et al. (2013) untuk mendapatkan 90% parasit pada fasa cincin. Skizon *P. knowlesi* dikumpulkan dalam larutan histodenz 55% (Sigma Aldrich, USA) yang dicairkan dalam medium kultur dan diempar pada kelajuan 900×g selama 10 minit. Darah terjangkit parasit fasa skizon dicairkan dengan darah normal segar dalam medium kultur lengkap selama satu jam pada suhu 37 °C untuk membolehkan skizon pecah dan membiarkan merozoit menjangkiti darah baharu dan menghasilkan pembentukan parasit fasa cincin yang baru berlaku. Sebanyak 100 µL sebatian analog yang dicairkan dalam piring 96-telaga secara bersiri menggunakan julat kepekatan 1000 hingga 0.001 µM dan parasit sebanyak 2% parasitemia dan 2% hematokrit telah ditambah dalam telaga yang mengandungi sebatian analog yang telah dicairkan. Pengeraman piring 96-telaga yang mengandungi larutan sebatian analog dan parasit dibiarkan dalam inkubator steril yang dibekalkan dengan 5% O₂, 5% CO₂ dan 90% N₂ pada suhu 37 °C sehingga 17 jam untuk *P. knowlesi* kumpulan parasit kawalan mencapai fasa skizon (skizon mempunyai 3 nukleus atau lebih). Pemantauan kematangan skizon dijalankan setiap 2 jam dengan pewarnaan calitan darah nipis Giemsa yang dilakukan ke atas kultur parasit yang terdedah dengan rawatan sebatian analog. Apabila parasit dalam kultur kawalan sepenuhnya telah mencapai fasa skizon, kultur parasit dirawat dengan sebatian analog dituai dan seterusnya calitan darah tebal dan nipis Giemsa pada slaid kaca disediakan dan slaid diperiksa di bawah mikroskop (Leica, Germany) dengan 1000× pembesaran. Analisis mikroskopi dijalankan dan peratusan perencatan parasit oleh sebatian analog dikira berbanding kultur parasit kawalan tanpa rawatan (Amir et al. 2016; Fatih et al. 2013). Nilai skizontisida sebatian analog iaitu IC₅₀ dan IC₉₀ dijana menggunakan GraphPad Prism. Bilangan skizon dikira pada setiap 200 bilangan parasit yang ditemui dan peratusan perencatannya dihitung mengikut formula berikut;

$$\text{Perencatan skizon parasit (\%)} = \left[\frac{\text{Bilangan Skizon Kawalan} - \text{Bilangan Skizon Rawatan}}{\text{Bilangan skizon kawalan}} \right] \times 100$$

ANALISIS *in silico* DOK MOLEKUL

Untuk memahami interaksi antara analog (ligan) dan protein (reseptor) dalam *Plasmodium* sp., PfCRT

digunakan sebagai protein sasaran. Struktur 3D molekul PfCRT (PDB: 6UKJ) telah dimuat turun daripada pangkalan data Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/structure/6UKJ>, diakses pada 1 Januari 2023). Struktur 3D analog telah dibina menggunakan Marvin Sketch versi 1.5.6. dan wizard penyediaan ligan dalam Schrodinger Small Molecule Drug Discovery Suite 2017-1. Semua molekul air dalam struktur protein PfCRT telah dikeluarkan daripada molekul dan atom hidrogen serta cas telah ditambah kepada geometri piawainya. Dimensi grid untuk tapak pengikat protein ligan dikenal pasti sebagai $x = 149.5$, $y = 169.9$ dan $z = 138.9$ (kotak grid $30 \times 30 \times 30$) terletak di domain transmembran 1 PfCRT (Antony et al. 2019). Analog itu kemudiannya didok ke tapak pengikat menggunakan perisian AutoDock Vina. Ligan dibenarkan melentur manakala reseptor adalah tegar semasa proses penyaringan. Konformasi ligan yang dihasilkan telah dikelaskan mengikut interaksi pengikatannya. Protokol dok molekul telah disahkan dengan mengedok ligan rujukan ke tapak pengikatan protein PfCRT (Rao et al. 2007).

HASIL DAN PERBINCANGAN

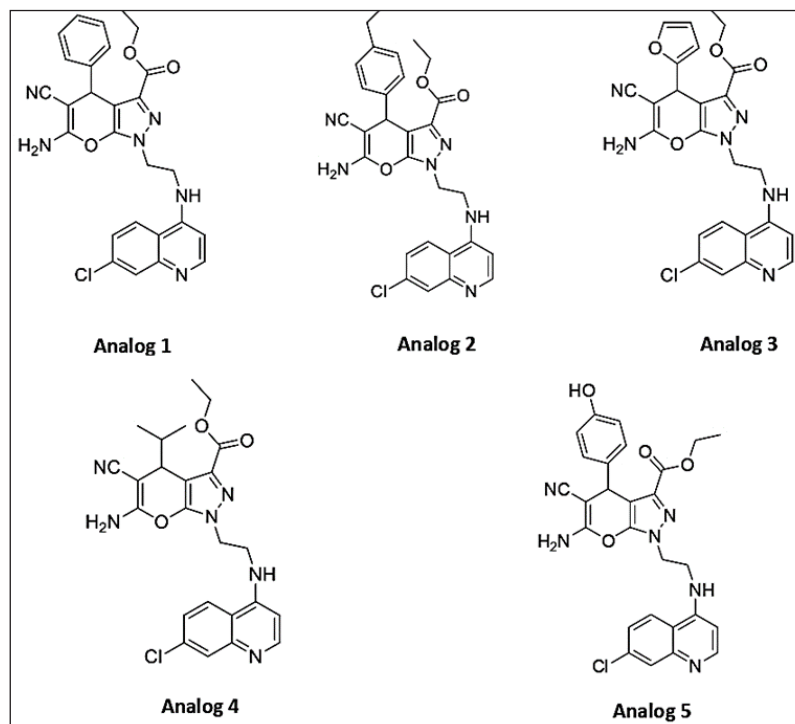
Berdasarkan sifat sebatian analog yang dikaji, analog 1 dikenali sebagai etil-6-amino-1-(2-((7-klorokuinolina-4-il)amino)etil)-5-siano-4-fenil-1,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-3-karboksilat ($C_{27}H_{23}ClN_6O_3$) merupakan serbuk putih dengan takat lebur $260\text{--}261\text{ }^\circ\text{C}$ dan berat molekul bernilai 514.96 g/mol. Analog 2 adalah etil-6-amino-1-(2-((7-klorokuinolina-4-il)amino)etil)-5-siano-4-(4-etilfenil)-1,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-3-karboksilat ($C_{29}H_{27}ClN_6O_3$) merupakan serbuk putih dengan takat lebur $145\text{--}147\text{ }^\circ\text{C}$ dan berat molekul 543.02 g/mol. Analog 3 adalah etil-6-amino-1-(2-((7-klorokuinolina-4-il)amino)etil)-5-siano-4-(furan-2-il)-1,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-3-karboksilat ($C_{25}H_{21}ClN_6O_4$) merupakan serbuk putih dengan takat lebur $232\text{--}234\text{ }^\circ\text{C}$ dengan berat molekul 504.13 g/mol. Analog 4 adalah etil-6-amino-1-(2-((7-klorokuinolina-4-il)amino)etil)-5-siano-4-isopropil-1,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-3-karboksilat ($C_{24}H_{25}ClN_6O_3$) ialah suatu serbuk putih dengan takat lebur $221\text{--}223\text{ }^\circ\text{C}$ dengan berat molekul sebanyak 480.95 g/mol. Seterusnya, analog 5 adalah etil-6-amino-1-(2-((7-klorokuinolina-4-il)amino)etil)-5-siano-4-(4-hidroksifenil)-1,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-3-karboksilat ($C_{27}H_{23}ClN_6O_4$) merupakan serbuk putih dengan takat lebur $233\text{--}234\text{ }^\circ\text{C}$ dengan berat molekul 530.96 g/mol (Shamsuddin et al. 2021). Struktur sebatian analog kuinolina yang disintesis dilukis dalam Rajah 2.

Seterusnya, aktiviti antiplasmodium dan aktiviti skizontisida analog kuinolina terhadap parasit zoonotik, *P. knowlesi* A1H1 telah dinilai dalam kajian ini. Data daripada asai pLDH *in vitro* menunjukkan bahawa kesemua analog kuinolina yang diuji mempunyai kesan antiplasmodium yang poten ($EC_{50} < 1\text{ }\mu\text{M}$) terhadap *P. knowlesi* A1H1 dengan nilai EC_{50} antara 0.15 hingga 0.95 μM yang mana

analog 2 dan 5 memberikan aktiviti antiplasmodium yang terbaik dengan nilai EC_{50} masing-masing adalah 0.15 dan 0.16 μM (Jadual 1). Ubat antimalaria rujukan iaitu CQ menunjukkan nilai kepotenan yang tinggi terhadap *P. knowlesi* dengan nilai EC_{50} iaitu 0.002 μM . Analog kuinolina 2 menunjukkan nilai EC_{50} 75 kali lebih tinggi daripada CQ, manakala analog 5 menunjukkan nilai EC_{50} 80 kali ganda lebih tinggi daripada CQ.

Untuk memahami kesan skizontisida analog kuinolina terhadap *P. knowlesi* A1H1, ujian kematangan skizon telah dijalankan. Ujian kematangan skizon diukur berdasarkan perencatan peringkat aseksual parasit matang iaitu fasa skizon (Gupta & Vasudeva 2010). Data yang diperolehi daripada ujian ini menunjukkan bahawa semua sebatian analog adalah poten terhadap *P. knowlesi* A1H1 yang mana analog 2 dan 5 masing-masing menunjukkan nilai IC_{50} sebanyak 0.16 μM dan 0.17 μM , manakala analog kuinolina lain berada dalam julat antara 0.16 hingga 0.84 μM . Kesemua analog kuinolina menunjukkan perencatan skizon parasit bergantung kepada dos yang diuji. Aktiviti skizontisida analog kuinolina muncul dalam susunan berikut; analog 2 > analog 5 > analog 3 > analog 1 > analog 4. Dalam ujian kematangan skizon, CQ menunjukkan nilai IC_{50} sebanyak 0.0018 μM . Analog 2 menunjukkan nilai IC_{50} 89 kali lebih tinggi daripada CQ, manakala analog 5 menunjukkan nilai IC_{50} 94 kali ganda lebih tinggi daripada CQ (Jadual 2). Berdasarkan pemerhatian perkembangan kematangan skizon, setiap kultur yang dirawat dengan analog kuinolina menunjukkan perubahan morfologi yang berbeza. Analog kuinolina 2 dan 5 juga mampu melambatkan perubahan fasa cincin parasit, iaitu memperlambatkan peralihan fasa daripada cincin ke fasa trofozoit dan skizon. Perlakuan analog ke atas kultur *P. knowlesi* telah menunjukkan tempoh peralihan perkembangan skizon yang lebih panjang. Sebahagian struktur parasit telah dilisiskan dan mengalami kehilangan seni bina sel. Khususnya, pendedahan analog 2 dan 5 menyebabkan pengurangan saiz skizon berbanding dengan saiz skizon normal dalam kultur kawalan (kultur tanpa rawatan) (Rajah 3). Kesan perencatan skizon oleh analog 2 dan 5 menunjukkan pada kepekatan 1 μM terdapat lebih daripada 80% perencatan skizon (Jadual 2).

Menurut garis panduan WHO, kepekatan sebatian kimia yang dibenarkan dalam darah adalah tidak boleh melebihi 5 μM sebagai ubat yang selamat (Singh et al. 2021; WHO 2021). Berdasarkan ini, nilai kepekatan sebatian analog pada 90% pertumbuhan parasit (berdasarkan nilai IC_{90}) diperhatikan adalah kurang daripada 5 μM untuk analog 2 dan 5, menunjukkan bahawa sebatian ini adalah berkesan dan berpotensi selamat sebagai ubat antimalaria. Berdasarkan kajian kami sebelum ini, analog 2 (etil-6-amino-1-(2-((7-klorokuinolina-4-il)amino)etil)-5-siano-4-(4-etilfenil)-1,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-3-karboksilat) menunjukkan aktiviti antiplasmodium yang ketara terhadap *P. falciparum* 3D7 dan *P. falciparum* K1 dengan



RAJAH 2. Struktur kimia analog sintesis 4-aminokuinolina-pirano[2,3-c]pirazol 1-5

JADUAL 1. Aktiviti antiplasmodium dan skizontisida sebatian analog kuinolina terhadap *P. knowlesi* A1H1

Sebatian kajian	Aktiviti antiplasmodium (asai pLDH)		Aktiviti skizontisida (asai SMA)	
	EC ₅₀ (μM) ± SP	EC ₉₀ (μM) ± SP	IC ₅₀ (μM) ± SP	IC ₉₀ (μM) ± SP
Analog 1	0.82 ± 0.01	7.38 ± 0.09	0.37 ± 0.04	3.33 ± 0.36
Analog 2	0.15 ± 0.05	1.35 ± 0.45	0.16 ± 0.01	1.44 ± 0.03
Analog 3	0.56 ± 0.15	5.04 ± 1.35	0.26 ± 0.04	2.34 ± 0.36
Analog 4	0.95 ± 0.25	8.55 ± 2.25	0.84 ± 0.30	7.56 ± 2.79
Analog 5	0.16 ± 0.03	1.44 ± 0.27	0.17 ± 0.01	1.53 ± 0.03
CQ	0.002 ± 0.0001	0.018 ± 0.009	0.0018 ± 0.0001	0.016 ± 0.009

EC₅₀: kepekatan berkesan pada 50% pertumbuhan parasit; IC₅₀: kepekatan perencatan pada 50% pertumbuhan parasit; pLDH: plasmodium laktat dehidrogenase; SMA: ujian kematangan skizon; SP: sisihan piawai

EC₅₀ masing-masing 0.013 dan 0.02 μM, serta ketoksikan dan indeks rintangan yang rendah (Shamsuddin et al. 2021). Bagaimanapun, dalam kajian ini, semua analog kuinolina menunjukkan julat potensi antiplasmodium dan kesan skizontisida terhadap *P. knowlesi* yang selari (0.16 hingga 0.84 μM) dengan kesan antiplasmodium yang pernah dilaporkan terhadap *P. falciparum* oleh Shamsuddin et al. (2021). Kajian ini adalah laporan pertama mengenai aktiviti antiplasmodium dan skizontisida sebatian analog kuinolina terhadap parasit zoonotik *P. knowlesi* yang teradaptasi dalam darah manusia.

Protein parasit rintang-CQ yang disasarkan dalam kajian ini ialah PfCRT daripada *Plasmodium falciparum*. Oleh kerana tiada laporan kes kerintangan *P. knowlesi* terhadap CQ atau ART setakat ini dilaporkan, maka tiada protein rintang daripada *P. knowlesi* telah ditemui. Oleh itu, kajian kami memilih *P. falciparum* CRT sebagai protein sasaran yang mempunyai kerintangan untuk menilai potensi analog kuinolina. Struktur protein PfCRT telah didokkan dengan analog kuinolina di tapak pengikatan berdasarkan kaedah Antony et al. (2019). Kompleks dok PfCRT-analog kuinolina divisualisasikan dalam 2-dimensi

JADUAL 2. Peratus perencatan kematangan skizon *P. knowlesi* oleh analog kuinolina berdasarkan dos kepekatan tertentu (μM)

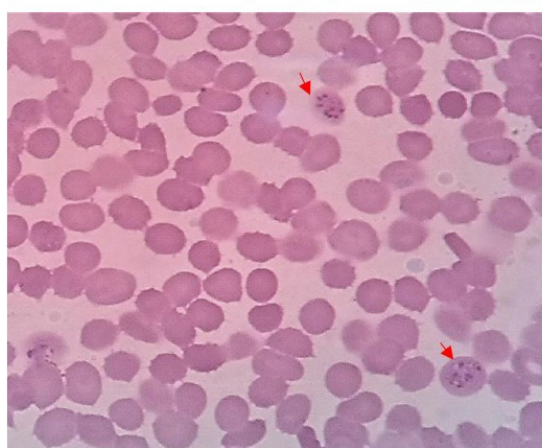
Sebatian kajian	Perencatan kematangan skizon (%)					
	0.001 μM	0.01 μM	0.1 μM	1 μM	10 μM	100 μM
Analog 1	0	1.2	28.1	73.5	78.2	98.4
Analog 2	0	17.8	38.3	89.7	94.5	98.8
Analog 3	0	27.1	31.9	81.1	87.1	98.8
Analog 4	0	2.4	17.8	73.5	78.4	97.8
Analog 5	0	17.5	30.1	90.8	92.4	98.8
CQ	59.6	99.8	99.8	99.9	100	100



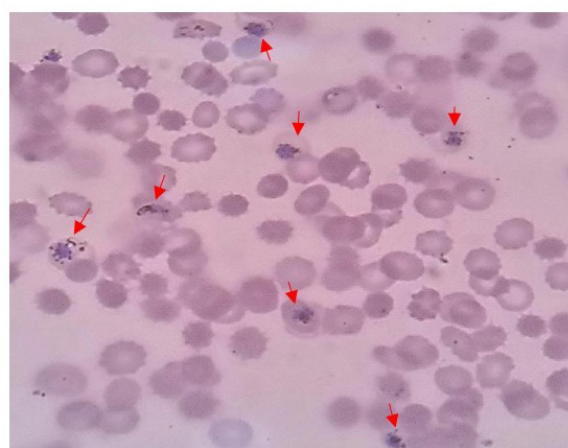
(a) Kultur *P. knowlesi* dirawat CQ (0.1 μM)



(b) Kultur *P. knowlesi* dirawat analog 2 (0.1 μM)



(c) Kultur *P. knowlesi* dirawat analog 5 (0.1 μM)



(d) Kultur *P. knowlesi* tanpa rawatan (Kawalan)

RAJAH 3. Sel eritrosit yang dijangkiti *P. knowlesi* telah dirawat dengan klorokuina (A), sebatian analog 2 (B) dan analog 5 (C) berbanding kultur parasit tanpa rawatan (D)

dan 3-dimensi dan ditunjukkan dalam Jadual 3. Kompleks dok untuk analog **1-5** menunjukkan nilai pengikatan dalam julat -8.9 hingga -9.1 kcal/mol. Analog kuinolina **2** menunjukkan nilai afiniti pengikatan terendah (-9.1 kcal/mol), menunjukkan bahawa pengikatan antara sebatian dan protein adalah signifikan kerana berlaku interaksi melibatkan jenis ikatan hidrogen dengan asid amino, Ser65 dengan panjang ikatan adalah 3.06Å. Nilai pemalar perencatan yang diramalkan ($K_{i\text{pred}}$) analog **2** adalah dalam kepekatan mikromolar (0.21 μM) adalah selari dengan nilai EC_{50} dalam ujian antiplasmodium (0.15 μM) yang menunjukkan kekuatan fungsi analog **2** sebagai agen perencat antiplasmodium dan protein PfCRT.

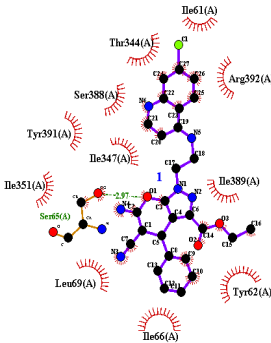
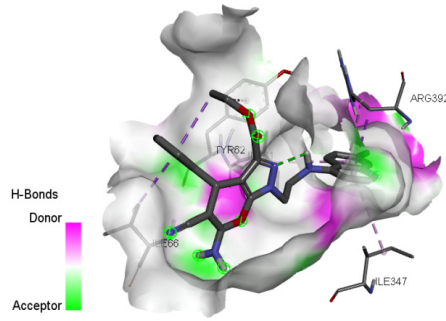
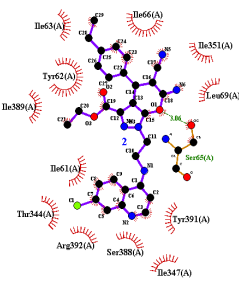
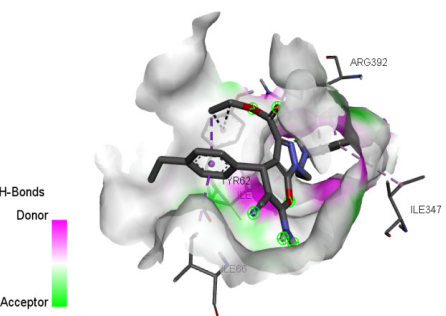
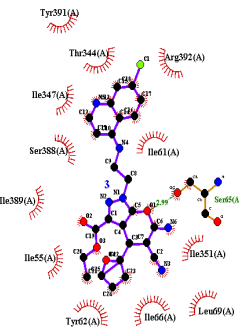
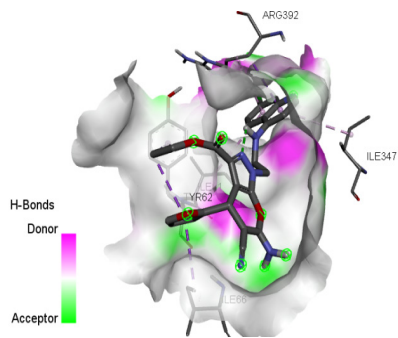
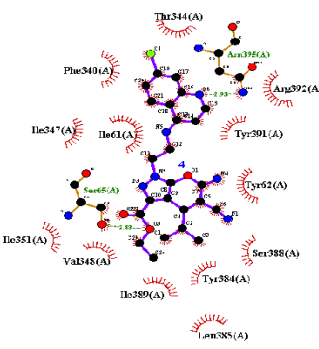
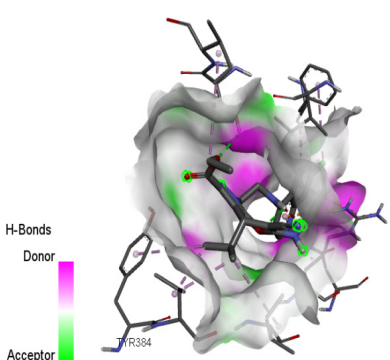
Daripada hasil berdasarkan visualisasi Ligplot+ 2-D, terdapat interaksi hidrofobik dengan dua belas asid amino antara analog **2** dengan protein PfCRT iaitu Ile63, Tyr62, Ile389, Ile61, Thr344, Arg392, Ser388, Ile347, Tyr391, Leu69, Ile351 dan Ile66. Sebatian analog **5** juga memberikan interaksi pengikatan yang kuat dengan PfCRT (-9.1 kcal/mol, $K_{i\text{pred}}=0.21 \mu\text{M}$) iaitu interaksi ikatan hidrogen dengan Ser65 dengan panjang ikatan 2.98Å. Interaksi hidrofobik dengan asid amino Leu69, Ile351, Ser388, Ile347, Tyr391, Arg392, Thr344, Ile61, Ile389, Tyr62 dan Ile66 telah diperhatikan dalam visualisasi 2-D interaksi analog **5** dengan PfCRT. Keputusan daripada analog **2** dan **5** adalah hampir sama dengan keputusan *in vitro* pada *P. knowlesi* dalam kedua-dua sistem ujian pLDH dan SMA. Sebatian analog **1**, **3** dan **4** juga menunjukkan interaksi pengikatan yang baik dengan PfCRT dengan interaksi pengikatan -8.9 hingga -9.1 kcal/mol dan nilai pemalar perencatan 0.21 hingga 0.29 μM . Ikatan hidrogen yang kuat pada asid amino Ser65 dan Asn395 juga dilihat dalam interaksi analog ini dengan PfCRT. Sebagai ligan rujukan, nilai pertalian pengikatan yang terhasil daripada interaksi ligan CQ dan PfCRT dikaji iaitu menunjukkan interaksi pengikatan -7.4 kcal/mol ($K_{i\text{pred}}=3.74 \mu\text{M}$), yang lebih lemah berbanding interaksi pengikatan yang ditunjukkan oleh interaksi analog kuinolina **1-5** dengan PfCRT. Keputusan daripada kajian ini menunjukkan bahawa CQ tidak dapat memberikan konformasi pengikatan sempurna dengan protein PfCRT kerana protein telah diuji secara uji kaji sebagai rintang terhadap CQ (Kim et al. 2019). Pengikatan CQ dalam PfCRT menjadi lemah disebabkan oleh mutasi. Interaksi kompleks CQ-PfCRT tidak mempunyai sebarang ikatan hidrogen tetapi hanya interaksi hidrofobik yang diperhatikan. Kerintangan ubat antimalaria pada PfCRT, pengangkut metabolit dan superfamili seperti protein EamA telah ditunjukkan berlaku pada tapak mutasi K76T (Ecker et al. 2012). Dalam kajian ini, pertalian pengikatan sebatian analog **1-5** dan PfCRT adalah lebih baik daripada CQ. Analog **1-5** boleh mengikat lebih kuat dalam protein rintang PfCRT daripada CQ.

Agen skizontisida yang menyasarkan fasa aseksual eritrositik parasit malaria dianggap sebagai ubat antimalaria yang paling penting dan paling pantas bertindak. Mekanisme antimalaria skizontisida antaranya adalah

pertama, menghalang pembentukan pigmen malaria (Dorn et al. 1998) iaitu menyekat laluan yang membawa kepada peningkatan pengumpulan hem bebas parasit, kedua, melisiskan membran vakuolar dan menyebabkan kematian parasit (Fong & Wright 2013), ketiga, mengganggu metabolisme parasit melalui sekatan biosintesis folat dan keempat, menghalang gametogenesis dalam parasit. Antimalaria skizontisida juga boleh menyasarkan peringkat hepatic skizon pada peringkat awal perkembangan (Shibeshi et al. 2020). Berdasarkan kajian hubungan aktiviti-struktur (SAR), setiap perancah iaitu *scaffolding* dan farmakofor analog kuinolina mempunyai kepentingan dalam mekanisme antimalaria dalam jangkitan *P. knowlesi*.

Farmakofor 4-aminokuinolina dalam analog yang dikaji ini adalah agen skizontisida yang dikenali berpotensi menghalang pempolimeran ferriprotoporfirin IX, mengakibatkan kerosakan membran oksidatif dan kematian parasit, manakala farmakofor pirano[2,3-c]pirazol yang dikaji dalam kajian ini telah meningkatkan keberkesanan aktiviti antimalaria sebatian analog secara signifikan. Kehadiran kumpulan besar dan lipofilik iaitu fenil dan furana dalam analog kuinolina meningkatkan lagi aktiviti skizontisida terhadap strain sensitif-CQ *P. knowlesi* dalam kajian ini. Ada beberapa kajian lepas yang telah menggunakan farmakofor kuinolina dan terbitannya dalam kajian mereka juga menunjukkan aktiviti antimalaria yang poten terhadap parasit malaria. Antaranya kajian lepas mendedahkan bahawa hibrid kuinolina-pirimidin menunjukkan aktiviti antimalaria yang ketara dalam julat nanomolar (Singh et al. 2014). Smit dan N'Da (2014) melaporkan sebatian *novel* daripada terbitan kuinolina lain 4-aminokuinolinil-kalkon amida menunjukkan nilai EC_{50} antara 0.04 hingga 0.50 μM terhadap strain 3D7 sensitif-CQ adalah setanding dengan EC_{50} yang dilaporkan dalam kajian ini. Terbitan pirazol juga telah diuji untuk aktiviti antimalaria *in vitro* terhadap *P. falciparum* yang memberikan aktiviti yang kuat terhadap perencatan parasit (Domínguez et al. 2002; Ravindar et al. 2022). Selain itu, Insuasty et al. (2015) menilai pirazolin dan terbitan pirazol-[3,4-b] [1,4] diazepin terhadap *Plasmodium* sp. dan diuji memberikan aktiviti yang baik. Kajian terdahulu menunjukkan bahawa sebatian 4-methylamino-kuinolina yang disintesis daripada gabungan 4,7-diklorokuinolina dengan kumpulan amino mempunyai nilai IC_{50} kurang daripada 0.5 μM , iaitu aktiviti poten terhadap perencatan kedua-dua strain *P. falciparum* 3D7 dan K1 (Tiwari et al. 2021). Ini menunjukkan bahawa terbitan kuinolina masih relevan dalam penerokaan ubat berasaskan templat kuinolina sebagai agen antimalaria. *Novel* endokin serupa kuinolon (ELQs) telah dilaporkan mempunyai perencatan kuat terhadap *P. knowlesi* (<117nM) dan mempunyai keberkesanan yang sama terhadap *P. falciparum* (Van Schalkwyk et al. 2020). Penemuan baru-baru ini menunjukkan bahawa sebatian 1,2,4-triazol dan benzokuinona mempunyai perencatan sederhana terhadap *P. knowlesi* A1H1 dengan nilai EC_{50} dalam julat 13.39

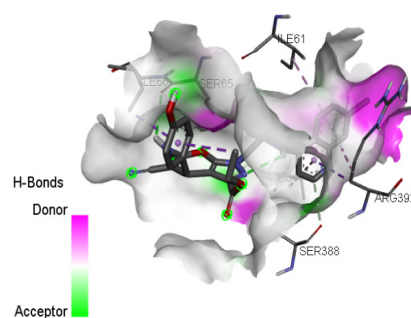
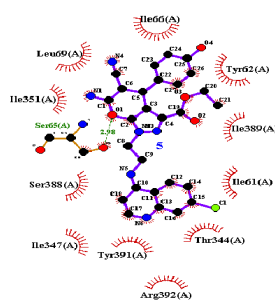
JADUAL 3. Nilai afiniti pengikatan (kcal/mol) dan nilai ramalan perencatan malar ($K_{i\text{pred}}$) sebatian analog kuinolina terhadap PfcRT

Sebatian kajian	Afiniti pengikatan, kcal/mol (Nilai ramalan perencatan malar, $K_{i\text{pred}}$)	Interaksi 2-dimensi (2D)	Interaksi 3-dimensi (3D)
Analog 1	-9.1 kcal/mol (0.21 μM)		
Analog 2	-9.1 kcal/mol (0.21 μM)	<p>Analog 1-PfcRT complex</p>  <p>complex 6b</p>	
Analog 3	-8.9 kcal/mol (0.29 μM)	 <p>complex 6c</p>	
Analog 4	-9.1 kcal/mol (0.21 μM)	 <p>complex 6d</p>	

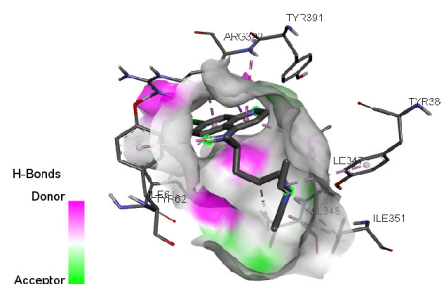
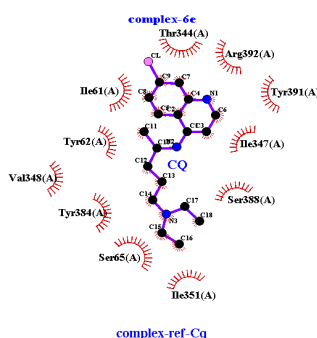
bersambung ke halaman seterusnya...

...bersambung dari halaman sebelumnya

Analog **5** -9.1 kcal/mol (0.21 μ M)



CQ -7.4 kcal/mol (3.72 μ M)



hingga 28.85 μ M (Rezali et al. 2023). Tidak banyak kajian yang melaporkan kesan terbitan kuinolina pada kultur *P. knowlesi*. Penemuan ini ialah laporan pertama tentang sifat antimalaria sebatian analog 4-aminokuinolina-pirano[2,3-c]pirazol terhadap kultur *P. knowlesi* yang telah diadaptasi dengan darah manusia. Penyelidikan yang melibatkan pengkulturan *P. knowlesi* dalam darah manusia telah dijalankan untuk memahami tingkah laku dan ciri parasit dalam perumah manusia. Bidang kajian ini penting dalam memahami biologi dan patologi parasit malaria tertentu ini, terutamanya dalam jangkitan manusia dan ia menyumbang kepada penyelidikan berterusan dalam bidang malaria.

KESIMPULAN

Kesimpulannya, penilaian kesan antimalaria sebatian analog kuinolina menunjukkan bahawa analog **2** iaitu etil-6-amino-1-(2-((7-klorokuinolina-4-yl)amino)etil)-5-siano-4-(4-etilfenil)-1,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-3-karboksilat dan analog **5** iaitu etil-6-amino-1-(2-((7-klorokuinolina-4-yl)amino)etil)-5-siano-4-(4-hidroksifenil)-1,4-dihidropirano[2,3-c]pirazol-3-karboksilat menunjukkan aktiviti antiplasmodium dan skizontisida yang kuat dan selektif terhadap *P. knowlesi*. Melalui analisis pengkomputeran dok *in silico* mencadangkan bahawa protein PfCRT adalah sasaran molekul perencatan yang munasabah bagi analog kuinolina **2** dan **5**. Penemuan penting kajian ini akan membawa kepada pembangunan

agen antiparasitik yang mempunyai sifat perencatan skizon yang selektif, serta mereka bentuk mekanisme tindakan terapeutik baharu dalam jangkitan *P. knowlesi*.

PENGHARGAAN

Penyelidikan ini dibiayai oleh geran daripada Universiti Kebangsaan Malaysia (DIP-2024-006) dan Kementerian Pengajian Tinggi Malaysia (FRGS/1/2019/STG03/UKM/03/2).

RUJUKAN

- Aguiar, A.C.C., Santos, R.D.M., Figueiredo, F.J.B., Cortopassi, W.A., Pimentel, A.S., França, T.C.C., Meneghetti, M.R. & Krettli, A.U. 2012. Antimalarial activity and mechanisms of action of two novel 4-aminoquinolines against chloroquine-resistant parasites. *PLoS ONE* 7(5): e37259.
- Amir, A., Russell, B., Liew, J.W.K., Moon, R.W., Fong, M.Y., Vythilingam, I., Subramaniam, V., Snounou, G. & Lau, Y.L. 2016. Invasion characteristics of a *Plasmodium knowlesi* line newly isolated from a human. *Scientific Reports* 6(1): 24623.
- Antony, H.A., Topno, N.S., Gummadi, S.N., Sankar, D.S., Krishna, R. & Parija, S.C. 2019. *In silico* modeling of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter protein and biochemical studies suggest its key contribution to chloroquine resistance. *Acta tropica* 189: 84-93.

- Chauhan, K., Sharma, M., Saxena, J., Singh, S.V., Trivedi, P., Srivastava, K., Puri, S.K., Saxena, J.K., Chaturvedi, V. & Chauhan, P.M. 2013. Synthesis and biological evaluation of a new class of 4-aminoquinoline–rhodanine hybrid as potent anti-infective agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 62: 693-704.
- Coulibaly, A., Diop, M.F., Kone, A., Dara, A., Ouattara, A., Mulder, N., Miotto, O., Diakite, M., Djimde, A. & Amambua-Ngwa, A. 2022. Genome-wide SNP analysis of *Plasmodium falciparum* shows differentiation at drug-resistance-associated loci among malaria transmission settings in southern Mali. *Frontiers in Genetics* 13: 943445.
- Daneshvar, C., Davis, T.M., Cox-Singh, J., Rafa'ee, M.Z., Zakaria, S.K., Divis, P.C. & Singh, B. 2009. Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. *Clinical Infectious Diseases* 49(6): 852-860.
- de Villiers, K.A. & Egan, T.J. 2021. Heme detoxification in the malaria parasite: A target for antimalarial drug development. *Accounts of Chemical Research* 54(11): 2649-2659.
- Domínguez, J.N., Charris, J.E., Caparelli, M. & Riggione, F. 2002. Synthesis and antimalarial activity of substituted pyrazole derivatives. *Arzneimittelforschung* 52(6): 482-488.
- Dorn, A., Vippagunta, S.R., Matile, H., Jaquet, C., Vennerstrom, J.L. & Ridley, R.G. 1998. An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials. *Biochemical Pharmacology* 55(6): 727-736.
- Ecker, A., Lehane, A.M., Clain, J. & Fidock, D.A. 2012. PfCRT and its role in antimalarial drug resistance. *Trends in Parasitology* 28(11): 504-514.
- Fatih, F.A., Staines, H.M., Siner, A., Ahmed, M.A., Woon, L.C., Pasini, E.M., Kocken, C.H., Singh, B., Cox-singh, J. & Krishna, S. 2013. Susceptibility of human *Plasmodium knowlesi* infections to anti-malarials. *Malaria Journal* 12: 425.
- Folarin, O.A., Bustamante, C., Gbotosho, G.O., Sowunmi, A., Zalis, M.G., Oduola, A.M.J. & Happi, C.T. 2011. *In vitro* amodiaquine resistance and its association with mutations in pfert and pfmdr1 genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Nigeria. *Acta Tropica* 120(3): 224-230.
- Fong, K.Y. & Wright, D.W. 2013. Hemozoin and antimalarial drug discovery. *Future Medicinal Chemistry* 5(12): 1437-1450.
- Gupta, P. & Vasudeva, N. 2010. *In vitro* antiplasmodial and antimicrobial potential of *Tagetes erecta* roots. *Pharmaceutical Biology* 48(11): 1218-1223.
- Insuasty, B., Ramírez, J., Becerra, D., Echeverry, C., Quiroga, J., Abonia, R., Robledo, S.M., Vélez, I.D., Upegui, Y., Muñoz, J.A. & Ospina, V. 2015. An efficient synthesis of new caffeine-based chalcones, pyrazolines and pyrazolo [3, 4-b][1, 4] diazepines as potential antimalarial, antitrypanosomal and antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 93: 401-413.
- Kaur, K., Jain, M., Reddy, R.P. & Jain, R. 2010. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45(8): 3245-3264.
- Kim, J., Tan, Y.Z., Wicht, K.J., Erramilli, S.K., Dhingra, S.K., Okombo, J., Vendome, J., Hagenah, L.M., Giacometti, S.I., Warren, A.L. & Nosol, K. 2019. Structure and drug resistance of the *Plasmodium falciparum* transporter PfCRT. *Nature* 576(7786): 315-320.
- Lau, Y.L., Tan, L.H., Chin, L.C., Fong, M.Y., Noraishah, M.A.A. & Rohela, M. 2011. *Plasmodium knowlesi* reinfection in human. *Emerging Infectious Diseases* 17(7): 1314.
- Makarov, V., Manina, G., Mikusova, K., Möllmann, U., Ryabova, O., Saint-Joanis, B., Dhar, N., Pasca, M.R., Buroni, S., Lucarelli, A.P. & Milano, A. 2009. Benzothiazinones kill Mycobacterium tuberculosis by blocking arabinan synthesis. *Science* 324(5928): 801-804.
- Makler, M.T. & Hinrichs, D.J. 1993. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48(2): 205-210.
- Ministry of Health Malaysia (MOH). 2023. <https://www.sinarharian.com.my/article/257431/edisi/terengganu/kes-malaria-meningkat-75-peratus-di-terengganu>
- Moon, R.W., Hall, J., Rangkuti, F., Ho, Y.S., Almond, N., Mitchell, G.H., Pain, A., Holder, A.A. & Blackman, M.J. 2013. Adaptation of the genetically tractable malaria pathogen *Plasmodium knowlesi* to continuous culture in human erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(2): 531-536.
- Rao, S.N., Head, M.S., Kulkarni, A. & LaLonde, J.M. 2007. Validation studies of the site-directed docking program LibDock. *Journal of chemical information and modelling* 47(6):2159-2171.

- Ravindar, L., Hasbullah, S.A., Rakesh, K.P. & Hassan, N.I. 2022. Pyrazole and pyrazoline derivatives as antimalarial agents: A key review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2022: 106365.
- Rezali, N.S., Zahrin, N.A., Ali, A.H., Ling, N.Y., Agustar, H.K. & Ling, L.Y. 2023. Antimalarial assessment of certain 1, 2, 4-triazoles and benzoquinolones against *Plasmodium knowlesi* A1H1. *Journal of Science and Mathematics Letters* 11(1): 43-50.
- Roux, A.T., Maharaj, L., Oyegoke, O., Akoniyon, O.P., Adeleke, M.A., Maharaj, R. & Okpeku, M. 2021. Chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine resistance in Sub-Saharan Africa - A review. *Frontiers in Genetics* 12: 668574.
- Shamsuddin, M.A., Ali, A.H., Zakaria, N.H., Mohammat, M.F., Hamzah, A.S., Shaameri, Z., Lam, K.W., Mark-Lee, W.F., Agustar, H.K., Mohd Abd Razak, M.R. & Latip, J. 2021. Synthesis, molecular docking, and antimalarial activity of hybrid 4-Aminoquinoline-pyrano [2, 3-c] pyrazole derivatives. *Pharmaceuticals* 14(11): 1174.
- Shibeshi, M.A., Kifle, Z.D. & Atnafie, S.A. 2020. Antimalarial drug resistance and novel targets for antimalarial drug discovery. *Infection and Drug Resistance* 13: 4047-4060.
- Singh, B. & Daneshvar, C. 2013. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clinical Microbiology Reviews* 26(2): 165-184.
- Singh, J., Mansuri, R., Atul, P.K., Kumar, M. & Sharma, A. 2021. Development of selective inhibitors of crucial drug target Phosphoethanolamine methyltransferase of *Plasmodium falciparum* based on Chemo informatics and *in vitro* experiments. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 10(2): 298-309.
- Singh, K., Kaur, H., Smith, P., de Kock, C., Chibale, K. & Balzarini, J. 2014. Quinoline-pyrimidine hybrids: Synthesis, antiplasmodial activity, SAR, and mode of action studies. *Journal of Medicinal Chemistry* 57(2): 435-448.
- Smit, F.J. & N'Da, D.D. 2014. Synthesis, *in vitro* antimalarial activity and cytotoxicity of novel 4-aminoquinolinyl-chalcone amides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22(3): 1128-1138.
- Starčević, K., Pešić, D., Toplak, A., Landek, G., Alihodžić, S., Herreros, E., Ferrer, S., Spaventi, R. & Perić, M. 2012. Novel hybrid molecules based on 15-membered azalide as potential antimalarial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 49: 365-378.
- Strekowski, L., Mokrosz, J.L., Honkan, V.A., Czarny, A., Cegla, M.T., Wydra, R.L., Patterson, S.E. & Schinazi, R.F. 1991. Synthesis and quantitative structure-activity relationship analysis of 2-(aryl or heteroaryl) quinolin-4-amines, a new class of anti-HIV-1 agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 34(5): 1739-1746.
- Tiwari, V.S., Joshi, P., Yadav, K., Sharma, A., Chowdhury, S., Manhas, A., Kumar, N., Tripathi, R. & Haq, W. 2021. Synthesis and antimalarial activity of 4-methylaminoquinoline compounds against drug-resistant parasite. *ACS Omega* 6(20): 12984-12994.
- Tobin, R., Harrison, L.E., Tully, M.K., Lubis, I.N., Noviyanti, R., Anstey, N.M., Rajahram, G.S., Grigg, M.J., Flegg, J.A., Price, D.J. & Shearer, F.M. 2023. Updating estimates of *Plasmodium knowlesi* malaria risk in response to changing land use patterns across Southeast Asia. *MedRxiv* <https://doi.org/10.1101/2023.08.04.23293633>
- Van Schalkwyk, D.A., Riscoe, M.K., Pou, S., Winter, R.W., Nilsen, A., Duffey, M., Moon, R.W. & Sutherland, C.J. 2020. Novel endochin-like quinolones exhibit potent *in vitro* activity against *Plasmodium knowlesi* but do not synergize with proguanil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* <https://doi.org/10.1128/aac.02549-19>
- Vinindwa, B., Dziwornu, G.A. & Masamba, W. 2021. Synthesis and evaluation of Chalcone-Quinoline based molecular hybrids as potential anti-malarial agents. *Molecules* 26(13):4093.
- Warhurst D.C. 2001. The parasite. *Travelers' Malaria*. p. 104.
- World Health Organization (WHO). 2022. World Malaria Report. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022> Accessed on January 1, 2023.
- World Health Organization (WHO). 2021. WHO working group on late-stage development for malaria vaccines to reduce disease burden: Phase 3 considerations on the path to licensure and wide-scale implementation: report on a virtual meeting, 12 and 19 April 2021. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/354356>. Accessed on January 1, 2023.
- World Health Organization (WHO). 2001. *In vitro* micro-test (Mark III) for the assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, quinine, amodiaquine, sulfadoxine (No. CTD/MAL/97.20 Rev. 2 2001). <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67373>. Accessed on January 1, 2023.

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: jalifah@ukm.edu.my