

Fraksinasi Isolat Fungi Tanah dari Biak-Papua BioMCC-f.T.7720 Berbasis Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Dihydroorotate Dehydrogenase *Plasmodium falciparum*

Indra Rachmawati^{1,3*}, Muhammad Yusuf², Evita Chrisnayanti³

¹Prodi Bioteknologi, Fakultas Sekolah Pascasarjana, Universitas Padjajaran, Jl. Dipati Ukur No.35, Kota Bandung, Jawa Barat 40132, Indonesia

²Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung-Sumedang KM 21, Jatinangor, 45363, Jawa Barat, Indonesia.

³Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, Gedung Botani-Mikrobiologi, Cibinong Science Center, Jl. Raya Jkt-Bogor Km.46, Cibinong, Bogor, Jawa Barat 16911, Indonesia.

*Penulis korespondensi: indra.rachmawati@brin.go.id, m.yusuf@unpad.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v12.n2.52447>

Abstrak: Enzim dihydroorotate dehydrogenase *Plasmodium falciparum* (PfDHODH) merupakan target menarik untuk mencari kandidat antimalaria. Enzim ini berperan penting untuk kehidupan *Plasmodium* karena diperlukan dalam jalur biosintesis *de novo* pirimidin parasit. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan fraksi aktif ekstrak fungi yang menunjukkan penghambatan terhadap aktivitas enzim PfDHODH. Pada penelitian ini telah dilakukan skrining penghambatan aktivitas enzim PfDHODH terhadap 80 ekstrak fungi yang diisolasi dari tanah. Berdasarkan hasil skrining diketahui bahwa ekstrak butanol kaldu fermentasi isolat fungi BioMCC-f.T.7720 dari Biak, Papua menunjukkan penghambatan paling tinggi terhadap aktivitas enzim PfDHODH, dengan nilai penghambatan mencapai 90% pada konsentrasi 0,5 µg/mL dan tidak menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap enzim homolog manusia (HsDHODH). Metode pemurnian ekstrak aktif dilakukan dengan fraksinasi berbasis uji aktivitas terhadap ekstrak butanol isolat fungi tersebut. Ekstrak aktif dimurnikan dengan kromatografi kolom silika gel dan dilanjutkan dengan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) preparatif. Diperoleh 2 fraksi aktif, yaitu Fr2A-2 dan Fr2A-3 dengan puncak dominan pada waktu retensi (Rf) 14,654 menit dan 15,060 menit, secara berturut – turut. Fraksi aktif menunjukkan penghambatan terhadap enzim PfDHODH sebesar 57,09% (Fr2A-2) dan 83,52% (Fr2A-3) pada konsentrasi 50 µg/mL. Fraksi Fr2A-3 lebih poten dalam menghambat enzim PfDHODH dibanding fraksi Fr2A-2, dengan nilai IC₅₀ 2,76 µg/mL.

Kata kunci: dihydroorotate dehydrogenase, *Plasmodium falciparum*, fraksinasi berbasis uji aktivitas.

Abstract: *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase (PfDHODH) is an attractive target to search for antimalarial candidates. This enzyme plays an important role in the life of *Plasmodium* because it is needed in the parasite's *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway. This research aims to obtain active fractions of fungal extracts that inhibit PfDHODH enzyme activity. In this study, screening was carried out on 80 fungal extracts isolated from soil. It was revealed that the butanol extract of fermentation broth of fungal isolate BioMCC-f.T.7720 from Biak, Papua showed the highest PfDHODH inhibition accounting for 90% at the concentration of 0.5 µg/mL and did not show inhibitory activity against human homologous enzyme (HsDHODH). The purification of active extract was done using Bioassay Guided Fractionation method. The active extract was purified using silica gel column chromatography and followed by preparative High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Two active fractions were obtained, Fr2A-2 and Fr2A-3 with dominant peaks at the retention times (Rf) of 14,654 minutes and 15,060 minutes, respectively. The active fraction showed PfDHODH inhibition of 57.09% (Fr2A-2) and 83.52% (Fr2A-3) at the concentration of 50 µg/mL. Fraction Fr2A-3 was more potent than fraction Fr2A-2 with an IC₅₀ value of 2.76 µg/mL.

Keywords: dihydroorotate dehydrogenase, *Plasmodium falciparum*, bioassay-guided fractionation.

PENDAHULUAN

Malaria masih menjadi salah satu penyakit menular paling serius dalam permasalahan kesehatan

masyarakat global. Endemik di daerah tropis dan subtropis, lebih dari 84 negara berisiko tertular parasit *Plasmodium* yang merupakan agen penyebab

penyakit ini. Secara global, 247 juta kasus malaria dilaporkan pada tahun 2021, dengan 619.000 kematian, dimana 76% di antaranya terjadi pada anak di bawah usia 5 tahun (WHO 2022). Munculnya resistensi *Plasmodium* terhadap obat anti malaria yang berkembang secara progresif, termasuk obat anti malaria lini pertama artemisinin, telah menjadi ancaman besar dalam pengendalian malaria. Resistensi terhadap artemisinin sudah menyebar ke beberapa negara di Asia Tenggara (Noisang *et al.* 2019). Oleh karena itu, terdapat kebutuhan mendesak untuk penemuan dan pengembangan obat antimalaria yang baru dan inovatif. Mencari senyawa untuk menghilangkan penyakit ini termasuk penghambatan berbagai enzim penting untuk aktivitas metabolisme parasit plasmodium terbukti menjadi pendekatan yang lebih berhasil.

Parasit *Plasmodium* bergantung secara eksklusif pada biosintesis *de novo* pirimidin untuk memenuhi prekursor biosintesis DNA dan RNA. Sementara itu, sel inang manusia mempunyai mesin enzimatis untuk biosintesis *de novo* pirimidin dan jalur penyelamatan untuk membentuk basa pirimidin dan nukleosida. Karena pirimidin adalah metabolit dasar yang merupakan prekursor penting untuk kelangsungan hidup parasit *Plasmodium*, maka enzim yang terlibat dalam jalur biosintesis pirimidin dapat menjadi target obat antimalaria (Stocks *et al.* 2014)

Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) adalah enzim mitokondria yang mengkatalisis oksidasi dihydroorotate (DHO) untuk menghasilkan orotate dan reduksi FMN menjadi dihydroflavin mononucleotide (FMNH₂), langkah keempat dalam biosintesis *de novo* pirimidin. Karena pentingnya *P. falciparum* DHODH (*PfDHODH*) untuk kelangsungan hidup parasit pada tahap intraeritrositik dan tahap hati, maka inhibitor *PfDHODH* adalah kandidat kuat untuk pengobatan dan pencegahan infeksi Plasmodium (Singh *et al.* 2017). Penghambatan *PfDHODH* telah terbukti menurunkan tingkat parasitemia secara in vitro dan uji klinis tahap IIA (Llanos-Cuentas *et al.* 2018).

Sebagian besar organisme, termasuk manusia dan parasit malaria, memiliki enzim DHODH. Inhibitor DHODH manusia (HsDHODH) digunakan sebagai terapi penyakit autoimun. Oleh karena itu, spesifisitas penghambatan terhadap *PfDHODH* merupakan aspek penting untuk memandu pencarian inhibitor *PfDHODH* dan kemungkinan pengembangan menjadi kandidat obat antimalaria. Struktur kristalografi sinar-X dari HsDHODH dan *PfDHODH* menunjukkan perbedaan urutan asam amino dalam struktur situs pengikatan inhibitor antara kedua enzim, sehingga perbedaan ini memberikan dasar struktural untuk identifikasi inhibitor spesifik spesies (Singh *et al.* 2017; Sato *et al.* 2020). Selain itu, berdasarkan analisis genom dan struktur 3D, tidak ditemukan sensitivitas silang antara penghambat DHODH pada bakteri, parasit, dan manusia (Chen *et al.* 1992; Copeland *et al.* 2000; Ohishi *et al.* 2018).

Inhibitor enzim *PfDHODH* yang selama ini telah dilaporkan, berasal dari penapisan terhadap koleksi senyawa kimia, dan masih dalam tahapan uji klinis. Sedangkan masih sangat minim informasi eksplorasi inhibitor enzim *PfDHODH* dari isolat mikroorganisme. Telah dilaporkan inhibitor enzim *PfDHODH* yang diisolasi dari kaldu fermentasi isolat fungi *Aspergillus assiutensis* BioMCC-f.T.7495, *Penicillium pedernalense* BioMCC-f.T.5350 dan *Hypomyces pseudocorticicola* FKI-9008 memproduksi gentisyl alcohol dengan IC₅₀ 3.4 µM, serta fungi *Penicillium citrinum* BioMCC-f.T.6730, memproduksi homogentisic acid yang juga inhibitor *PfDHODH* dengan nilai IC₅₀ 47.6 µM (Pramisandi *et al.* 2021). Sehingga isolasi inhibitor enzim *PfDHODH* dari kaldu fermentasi isolat mikroorganisme sebagai salah satu usaha eksplorasi sumber daya alam adalah sangat diperlukan.

Dalam penelitian ini dilaporkan hasil fraksinasi ekstrak butanolik kaldu fermentasi isolat fungi tanah Biak, Papua BioMCC-f.T.7720 berbasis uji aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH*, dalam rangka isolasi dan purifikasi senyawa aktif sebagai inhibitor enzim *PfDHODH*.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat gelas dan volumetrik, *incubator shaker*, *centrifuge*, *rotary evaporator*, kromatografi kolom terbuka, HPLC kolom C18 SunFire® C18 OBD Prep Column 100 Armstrong, 5µm, 10mm x 250mm, 1/pkg (Shimadzu CTO-20A), *microplate reader*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Fungi BioMCC-f.T.7720, gliserol, *Malt Extract Agar* (*Malt extract*, pepton, glukosa, agar), media vegetatif (tepung beras, glukosa, *soybean meal*, KH₂PO₄ dan MgSO₄·7H₂O), media fermentatif (glukosa, gliserol, dekstrin, *malt extract*, *yeast extract*, tripton, NH₄NO₃ dan KH₂PO₄), n-butanol, kloroform, metanol, heksana, asetonitril, DMSO, larutan uji skrining terhadap enzim *PfDHODH* mengandung 100 mM HEPES pH=8,50, 150 mM NaCl, 10% gliserol, 0,05 triton-X 100), 200 mM *desil-ubiquinon* dalam etanol (BM 322 mg/mol), 50mM *L-dihydroorotate* (L-DHO) (BM 158,11 mg/mol), 12 mM *dichlorophenolindolphenol* (DCIP) (BM 290,08 mg/mol) HEPES 100 mM (pH 8,0), NaCl, Triton X-100 0,05%, *sodium 2,6-dikloroindofenolat hidrat* (DCIP) 120 µM, *desilubiquinon* (dUQ) 15 µM *dihydroorotat* (L-DHO).

Fungi

Fungi BioMCC-f.T.7720 adalah koleksi Laboratorium Bioteknologi-BRIN. Fungi diisolasi dari tanah yang diambil dari Biak, Papua, Indonesia, dan diisolasi dengan metode pengenceran. Fungi yang sudah menjadi isolat tunggal dan diidentifikasi

kemudian disimpan dalam gliserol stock 15% pada suhu -80° C.

Fermentasi

Isolat fungi disebarkan kembali dari stok gliserol 15% ke dalam media MEA yang terdiri dari malt extract (20g/L), pepton (1g/L), glukosa (20g/L), agar (20g/L) sebelum proses fermentasi. Proses fermentasi dilakukan dalam 2 tahap, yaitu proses vegetasi dan fermentasi. Pada tahap vegetasi, 1 potong kultur kapang dalam media MEA diinokulasikan ke dalam 5 buah labu erlenmeyer 250 mL yang masing-masing berisi 30 mL media vegetasi yang terdiri dari tepung beras (20 g/L), glukosa (10 g/L), tepung kedelai (20 g/L), KH₂PO₄ (1 g/L), dan MgSO₄·7H₂O (0,5 g/L) tanpa penyesuaian pH. Kultur diinkubasi dalam incubator shaker dengan kecepatan 220 rpm pada suhu 28°C selama 72 jam. Tahap kedua proses fermentasi, 2 mL dari miselia yang sudah tumbuh dalam tahap vegetasi kemudian diinokulasikan ke dalam 10 buah labu erlenmeyer 500 mL yang masing-masing berisi 100 mL media fermentasi dengan komposisi terdiri dari glukosa (30g/L), gliserol (20g/L), dekstrin(10g/L), malt extract (10g/L), yeast extract (20g/L), tripton (1g/L), NH₄NO₃ (1g/L), KH₂PO₄ (1 g/L) dengan penyesuaian pH 6.5. Kultur diinkubasi dalam incubator shaker dengan kecepatan 220 rpm pada suhu 28° C selama 4x24 jam.

Ekstraksi Kaldu Fermentasi

Kaldu fermentasi diekstraksi dengan n-butanol (perbandingan volume 1:1). Campuran diaduk dengan kecepatan 350 rpm selama 1 jam. Fase organik dipisahkan dari fase air menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Fase organik dikeringkan menggunakan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak kering. Ekstrak yang dihasilkan kemudian dianalisis aktivitas penghambatannya terhadap enzim PfDHODH.

Fraksinasi Kolom Terbuka

Fraksinasi dilakukan dengan kromatografi kolom terbuka menggunakan *silica gel*. Ekstrak kering dari fraksi butanol difraksinasi menggunakan kromatografi kolom dengan resin *silica gel* 60 (0,063 – 0,200 mm). Sebelum dimasukkan kedalam tabung kaca, silika gel yang digunakan dilarutkan ke dalam kloroform untuk mengembangkannya, setelah itu dimasukkan ke dalam tabung kaca dan siap digunakan. Sampel dipreparasi dengan cara dilarutkan dengan metanol dan menambahkan silika sebagai bahan coating, kemudian dikeringkan dengan *rotary evaporator* sampai benar-benar kering dan siap untuk dipakai. Sistem pelarut organik yang digunakan adalah campuran kloroform dan metanol dengan sistem bertahap dengan perbandingan 100:0, 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 50:50, 0:100, dilakukan dalam 2x *batch volume* 400mL. *Adsorben* yang digunakan adalah sebanyak

30x bobot ekstrak yang akan difraksinasi. Hasil fraksinasi tiap ekstrak selanjutnya di ambil 1 mL fraksi dan dimasukkan kedalam tabung kosong, selanjutnya di keringkan dengan konsentrator vakum, setelah itu setiap sampel kering dilarutkan dengan DMSO, dan di ambil masing-masing 2 µL, di masukkan kedalam 96-well plate untuk dilakukan uji aktivitas terhadap enzim target PfDHODH.

Fraksi aktif dipurifikasi menggunakan HPLC Shimadzu dengan menggunakan kolom C18 (10 mm x 250 mm). Sampel dielusi menggunakan asetronitril : air dengan penambahan 0.05% trifluoroacetic acid (TFA) dengan metode *gradient* (5-100% selama 35 menit) atau isokratik. *Volume* injeksi 100 µL (konsentrasi sampel 200.000 ppm, laju alir : 4 mL/menit Deteksi dilakukan menggunakan UV. Eluen yang keluar dari kolom ditampung dalam beberapa fraksi dengan *fraction collector*. Selanjutnya fraksi yang telah ditampung diuapkan pada *rotary evaporator*, kemudian digunakan pada uji aktivitas terhadap enzim target PfDHODH.

Penetapan Profil Fraksi Aktif

Fraksi aktif yang dihasilkan dari setiap tahap fraksinasi dianalisis profilnya menggunakan Shimadzu HPLC menggunakan kolom C18 *reversed phase* YMC-Pack ODS-A (5µm, 12nm) 250 x 4,6mm I.D dan *eluen* asetronitril-air dengan gradien 5%, 10% dan 100% selama 35 menit dengan *flowrate* 1mL/menit pada sampel standar dan selanjutnya dilakukan menggunakan sampel fraksi yang aktif, dengan menginjektikan sebanyak 10µL sampel fraksi aktif yang telah di larutkan dalam metanol.

Uji Aktivitas Penghambatan Enzim PfDHODH dan Enzim HsDHODH

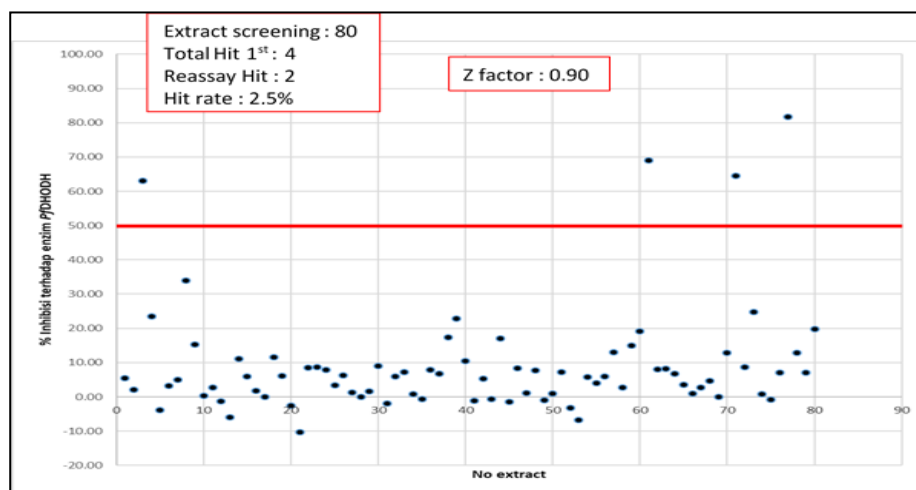
Sampel uji dikeringkan dan dilarutkan dengan DMSO dalam plat 96 sumuran. Ke dalam setiap sumuran ditambahkan 190 µL larutan uji yang mengandung 100 mM HEPES pH=8,50, 150 mM NaCl, 10% gliserol, 0,05% (w/v) triton-X 100), 200 mM *desil-ubiquinon* (dUQ), 12 mM 2,6-*Dichlorophenolindophenol* (DCIP), 100 nM enzim PfDHODH atau HsDHODH. Kemudian ditambahkan 50mM *L-dihydroorotate* (L-DHO) sebanyak 8 µL. Kinetika reaksi enzimatis diukur menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 600 nm selama 20 menit. Penetapan aktivitas enzim diamati secara kinetika diukur absorbansinya selama 20 menit pada panjang gelombang 600 nm. Senyawa hit ditetapkan dengan kriteria yang menunjukkan aktivitas hambatan diatas 50%. Nilai %hambatan dihitung dengan Persamaan (1).

$$\% \text{ inhibisi} = 100 - \left[\left(\frac{\text{sampel} - \text{kontrol positif}}{\text{kontrol negatif}} \right) \times 100\% \right] \dots (1)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Aktivitas Penghambatan Enzim PfDHODH

Hasil skrining aktivitas penghambatan enzim PfDHODH terhadap 80 ekstrak butanolik kaldu



Gambar 1. Skrining aktivitas hambatan 80 ekstrak butanolik kaldu fermentasi fungi terhadap PfdHODH

fermentasi isolat fungi dari beberapa wilayah di Indonesia tersaji dalam Gambar 1, dimana isolat fungi hasil isolasi dari tanah yang diambil dari Biak, Papua, Indonesia menunjukkan bahwa isolat fungi tanah dengan kode galur BioMCC-f.T.7720 berpotensi untuk menghasilkan metabolit sekunder sebagai inhibitor enzim PfdHODH (belum dipublikasikan). Proses ekstraksi mikroba menggunakan pelarut Butanol (BuOH) agar mudah diuapkan untuk mendapatkan ekstrak kering dari mikroba dalam proses skrining (Waluyo *et al.* 2021). Pelarut butanol digunakan sebagai pelarut organik dalam ekstraksi untuk mendapatkan metabolit sekunder (Sah *et al.* 2021). Skrining 80 mikroba berdasarkan target dilakukan dengan uji enzim-based assay terhadap enzim PfdHODH. Kriteria ekstrak aktif jika memiliki hambatan aktivitas > 50% dengan Z-factor > 0.5 (Waluyo *et al.* 2021). Upaya penemuan obat baru yang menargetkan pada enzim PfdHODH melalui metode HTS terhadap senyawa-senyawa yang telah teridentifikasi juga telah dilakukan, antara lain dengan ditemukannya senyawa DSM265 yang saat ini telah memasuki uji klinis Fase IIa (Llanos-Cuentas *et al.* 2018) dan enzim tersebut terbukti menjadi target tervalidasi untuk kemoterapi antimalaria (Gujjar *et al.* 2011). Namun, penggunaan ekstrak mikroba pada HTS berdasarkan pada target masih jarang dilakukan.

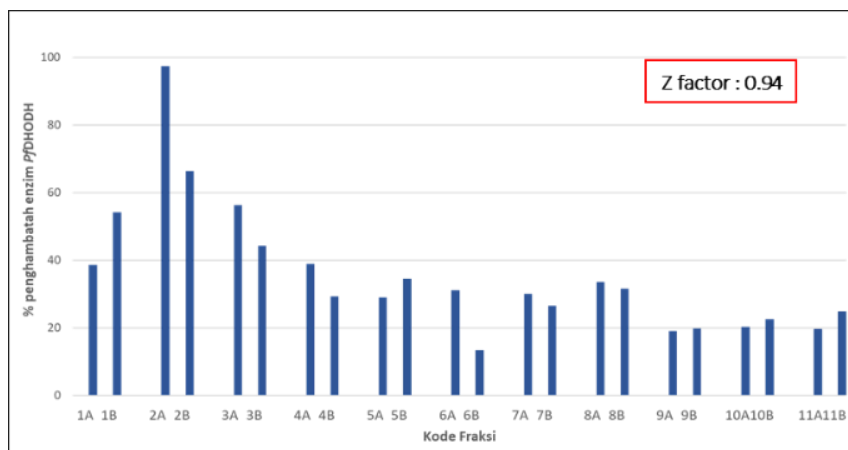
Berdasarkan hasil skrining uji aktivitas ekstrak isolat terhadap enzim target, selanjutnya dilakukan identifikasi jenis mikroba aktif. Identifikasi mikroba dilakukan dengan merunut data sekuens dari BPPT *microbial collection*. Berdasarkan hasil skrining, didapatkan isolat yang aktif adalah ekstrak dengan kode akses isolat BioMCC-f.T.7720 aktif terhadap enzim PfdHODH dan tidak menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap enzim homolog manusia (HsDHODH). Hasil identifikasi didapatkan mikroba golongan fungi *Cryptocoryneum pseudorilstonei* BioMCC-f.T.7720 yang memiliki aktivitas terhadap PfdHODH.

Fermentasi

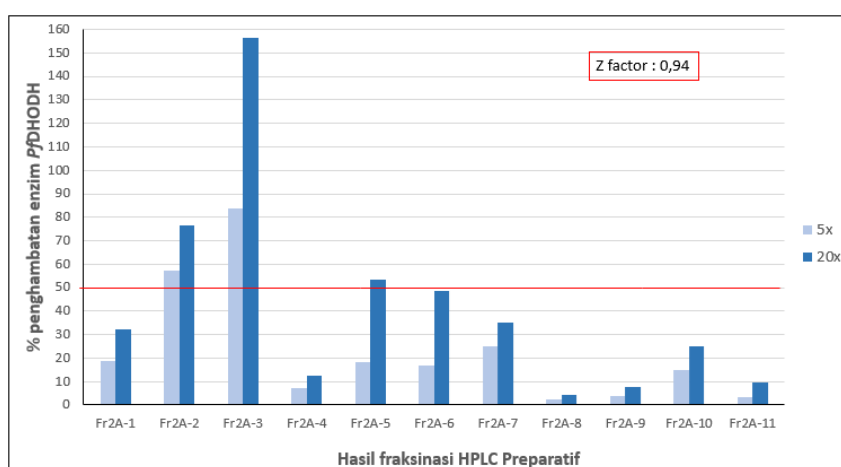
Proses purifikasi dilakukan dengan memproduksi ekstrak sebanyak 1L. Isolat fungi BioMCC-f.T.7720 ditumbuhkan kembali dari stok gliserol 15% ke dalam media MEA. Kultur fermentasi cair isolat fungi tanah BioMCC-f.T.7720 diinkubasi selama 7 hari dengan media sederhana yang mengandung tepung beras sebagai sumber karbon dan tepung kedelai sebagai sumber nitrogen. Setelah hari ke 7 fermentasi diperoleh kaldu fermentasi dengan aktivitas penghambatan enzim PfdHODH sebesar 81%, kaldu berwarna coklat yang lebih gelap dan lebih kental dibandingkan pada hari pertama fermentasi. Kaldu fermentasi total sebanyak 900mL diekstraksi dengan n-butanol dengan perbandingan volume 1:1. Pemilihan pelarut n-butanol sebagai *ekstraktan* bertujuan untuk melarutkan senyawa non polar dan senyawa polar dari kaldu fermentasi dengan perbandingan yang seimbang. Proses ekstraksi menghasilkan ekstrak n-butanol berwarna coklat tua dengan berat kering 9,72g. Ekstrak n-butanol menunjukkan aktivitas penghambatan enzim PfdHODH sebesar 90% konsentrasi 0,5 µg/mL.

Fraaksinasi Kolom Terbuka

Fraaksinasi dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi kolom terbuka. Kondisi kolom kromatografi dengan menggunakan fase diam (resin) silika yang memiliki sifat polar dan fase gerak menggunakan kloroform yang memiliki sifat non-polar. Kolom kromatografi bermanfaat dalam memisahkan fraksi senyawa berdasarkan polaritas dan mendapatkan fraksi dengan kandungan senyawa yang terbatas dan sesuai dengan sifat pelarut (Rao *et al.* 2017). Ekstrak n-butanol (9,72 g) diaplikasikan ke dalam kromatografi kolom terbuka dengan adsorben silika gel 60. Elusi *gradien* dengan campuran kloroform: metanol dimulai dari tingkat kepolaran rendah di mana masing-masing perbandingan dipisahkan menjadi 2 fraksi berturutan. Pemilihan sistem kromatografi berdasarkan sifat komponen



Gambar 2. Aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* hasil fraksinasi kromatografi kolom



Gambar 3. Aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* hasil HPLC Preparatif fraksi 2A BioMCC-f.T.7720

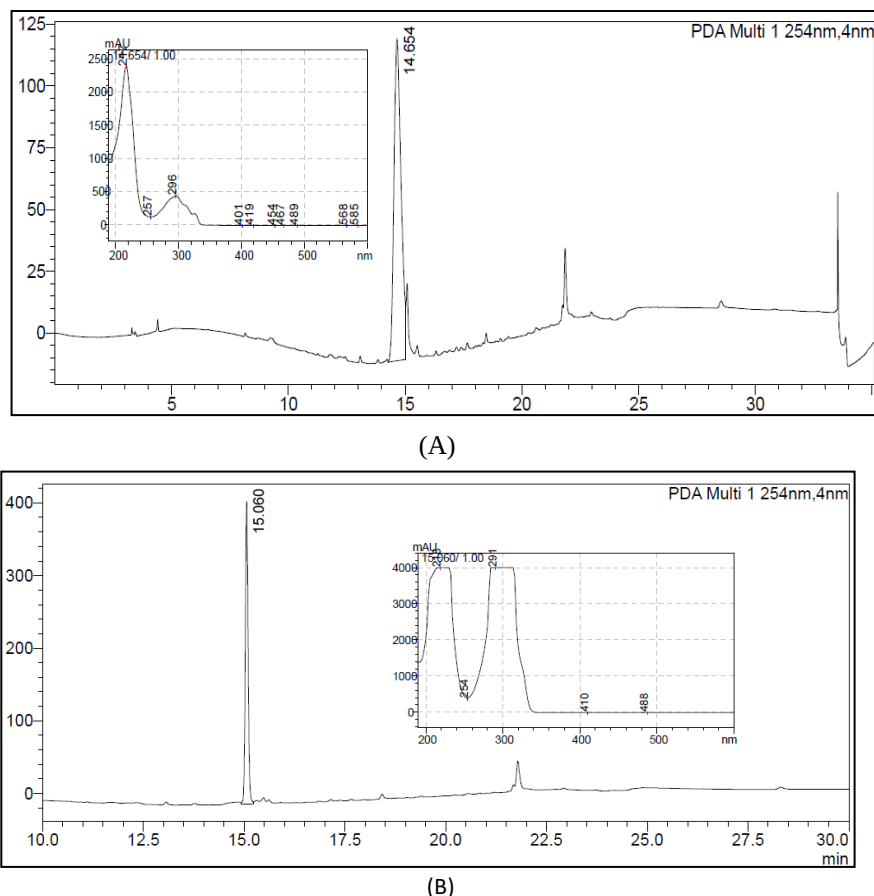
dalam partisi n-butanol yang semi polar. Fraksi aktif yang menunjukkan aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* adalah fraksi kloroform-metanol dengan perbandingan 100:0 (fraksi 1B), 99 : 1 (fraksi 2A dan fraksi 2B) dan 98 : 2 (fraksi 3A) dengan nilai penghambatan enzim *PfDHODH* lebih dari 50% seperti tersaji dalam Gambar 2. Hasil terbaik dengan hambatan >50% fraksi dengan 100% pelarut kloroform sedangkan fraksi dengan pelarut metanol tidak menunjukkan hambatan pada aktivitas enzim *PfDHODH*. Penggunaan pelarut kloroform pada proses fraksinasi memberikan hasil hambatan aktif terhadap enzim *PfDHODH*.

Fraksi aktif F2A (632.7 mg) dengan nilai penghambatan enzim *PfDHODH* 97.42%, mempunyai profil HPLC lebih sederhana dibanding fraksi aktif yang lain, dimurnikan lebih lanjut menggunakan HPLC preparatif terdapat 11 fraksi dan menghasilkan fraksi aktif Fr2A-2 dan Fr2A-3 dengan aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* lebih dari 50% pada 2 dosis 5x dan 20x. sebesar 57,09%, 76.36% pada Fr2A-2 dan 83,52 %, 156.64% pada Fr2A-3 seperti tersaji dalam Gambar 3.

Terdapat beberapa fraksi lain dari HPLC preparatif yang menunjukkan aktivitas penghambatan

enzim *PfDHODH*, tetapi profil kromatogram HPLC fraksi tersebut masih menunjukkan banyak komponen pengotor yang menyebabkan kemurniannya relatif sangat rendah.

Perbedaan polaritas masing-masing komponen serta perbedaan interaksi komponen dengan fase diam menjadi prinsip pemisahan dan pemurnian. Kromatografi fase terbalik dalam HPLC menggunakan fase diam hidrofobik dan fase gerak hidrofilik. Komponen hidrofobik yang terlarut dalam fase gerak teradsorpsi di permukaan fase diam sehingga komponen dengan kepolaran yang lebih besar akan terelusi pada waktu retensi yang lebih awal (Sunaryanto & Mahsunah 2014). Pada panjang gelombang 254 nm, fraksi aktif Fr2A-2 (2,4 mg) menunjukkan puncak dominan dengan waktu retensi 14.654 menit dan kemurnian 71% pada elusi *gradien* asetonitril 5% sampai dengan 100%. Sedangkan fraksi Fr2A-3 (4,3 mg) menunjukkan puncak dominan dengan waktu retensi 15.060 menit dan kemurnian 100% pada kondisi elusi *gradien* yang sama. Kedua puncak dominan menunjukkan waktu retensi yang sedikit berbeda dan pola spektra UV yang hampir mirip dengan sedikit pergeseran (Gambar 4) sehingga kedua komponen tersebut



Gambar 4. Kromatogram HPLC dan spektra UV fraksi aktif Fr2A-2 (A) dan Fr2A-3 (B) pada panjang gelombang 254nm

mempunyai nilai polaritas yang hampir sama.

Fraksi Fr2A-2 dan Fr2A-3 menunjukkan aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* sebesar 57,09% dan 83,52%, pada konsentrasi 50 µg/mL. Fraksi Fr2A-3 mempunyai aktivitas yang lebih poten dibandingkan dengan Fraksi Fr2A-2, dengan nilai IC_{50} 2,76 µg/mL. Gentisyl alcohol, senyawa yang telah dilaporkan mempunyai aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* dengan nilai IC_{50} 3,4 µM (Pramisandi *et al.* 2021). Hal tersebut menunjukkan bahwa fraksi Fr2A-3 mempunyai potensi dan spesifitas dalam menghambat aktivitas enzim *PfDHODH*.

KESIMPULAN

Ekstrak butanolik kaldu fermentasi isolat fungi tanah Biak-Papua BioMCC-f.T.7720 menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap enzim *PfDHODH*. Fraksinasi berbasis uji aktivitas penghambatan terhadap enzim *PfDHODH* digunakan untuk isolasi dan pemurnian komponen aktif. Fraksi aktif HPLC preparatif Fr2A-2 menunjukkan puncak dominan dengan waktu retensi 14.654 menit dan 57,09% aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH*, sementara itu fraksi Fr2A-3 menunjukkan puncak dominan dengan waktu retensi 15.060 menit dan 83,52% aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH*, masing-masing pada konsentrasi 50 µg/mL. Fraksi Fr2A-3

lebih poten dalam menghambat enzim *PfDHODH* dibanding fraksi Fr2A-2, dengan nilai IC_{50} 2,76 µg/mL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Dr. Erwahyuni Endang Prabandari yang telah menyediakan enzim *PfDHODH* dan enzim *HsDHODH*, dan Dr. Amila Pramisandi atas dukungannya. Penelitian ini didukung sepenuhnya oleh *Japan International Cooperation Agency (JICA)* melalui program *Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS)*.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen, S.F., Perrella, F.W., Behrens, D.L. & Papp, L. M. (1992). Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase activity by brequinar sodium. *Cancer Research*. **52**(13): 3521-3527.
- Copeland, R.A., Marcinkeviciene, J., Haque, T.S., Kopcho, L. M., Jiang, W., Wang, K., Ecret, L.D., Sizemore, C., Amsler, K.A., Foster, L., Tadesse, S., Combs, A.P., Stern, A.M., Trainor, G.L., Slee, A., Rogers, M.J. & Hobbs, F. (2000). *Helicobacter pylori*-selective antibacterials based on inhibition of pyrimidine

- biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. **275(43)**: 33373-33378.
- Gujjar, R., Marwaha, A., Mazouni, F.E., White, J., White, K.L., Creason S., Shackleford, D.M., Baldwin, J., Charman, W.N., Buckner, F.S., Charman, S., Rathod, P.K. & Phillips, M.A. (2011). Identification of a metabolically stable triazolopyrimidinebased dihydroorotate dehydrogenase inhibitor with antimalarial activity in mice. *Journal of Medicinal Chemistry*. **52(7)**: 1864-1872.
- Llanos-Cuentas, A., Casapia, M., Chuquiyauri, R., Hinojosa, J.C., Kerr, N., Rosario, M., Toovey, S., Arch, R.H., Phillips, M.A., Rozenberg, F.D., Bath, J., Ng, C.L., Cowell, A.N., Winzeler, E.A., Fidock, D.A., Baker, M., Möhrle, J., Huijsduijn, R.H.v., Gobeau, N., Araeipour, N., Andenmatten, N., Rückle, T. & Duparc, S. (2018). Antimalarial activity of single-dose DSM265, a novel plasmodium dihydroorotate dehydrogenase inhibitor, in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* or *Plasmodium vivax* malaria infection: a proof-of-concept, open-label, phase 2a study. *The Lancet Infectious Diseases*. **18(8)**: 874-883.
- Noisang, C., Prosser, C., Meyer, W., Chemoh, W., Ellis, J., Sawangjaroen, N. & Lee, R. (2019). Molecular detection of drug resistant malaria in Southern Thailand. *Malaria Journal*. **18**: 1-11.
- Ohishi, T., Inaoka, D. K., Kita, K. & Kawada, M. (2018). Dihydroorotate dehydrogenase as a target for the development of novel *Helicobacter pylori*-specific antimicrobials. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **66(3)**: 239-242.
- Pramisandi, A., Kurnia, K., Chrisnayanti, E., Bernawati, P., Dobashi, K., Mori, M., Mahsunah, A.H., Nonaka, K., Matsumoto, A., Kristiningrum, Hidayati, D.N., Dewi, D., Prabandari, E.E., Amalia, E., Rahmawati, Y., Nurkanto, A., Inaoka, D.K., Waluyo, D., Kita, K., Nozaki, T., Omura, S. & Shiomi, K. (2021). Gentisyl alcohol and homogentisic acid: *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase inhibitors isolated from fungi. *The Journal of General and Applied Microbiology*. **67(3)**: 114-117.
- Sah, S.N., Majhi, R., Regmi, S., Ghimire, A., Biswas, B., Yadav, L.P., Sah, R.K., Shah, P.K., (2021). Fermentation and extraction of antibacterial metabolite using *Streptomyces spp.* Isolated from Taplejung, Nepal. *Journal of Institute of Science and Technology*. **26**: 8-15.
- Sato, D., Hartuti, E. D., Inaoka, D. K., Sakura, T., Amalia, E., Nagahama, M., Yoshioka, Y., Tsuji, N., Nozaki, T., Kita, K., Harada, S., Matsubayashi. & Shiba, T. (2020). Structural and biochemical features of *Eimeria tenella* dihydroorotate dehydrogenase, a potential drug target. *Genes*. **11(12)**: 1468.
- Singh, A., Maqbool, M., Mobashir, M. & Hoda, N. (2017). Dihydroorotate dehydrogenase: An inevitable drug target for the development of antimalarials. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **125**: 640-651.
- Stocks, P.A., Barton, V., Antoine, T., Biagini, G. A., Ward, S.A. & O'Neill, P. M. (2014). Novel inhibitors of the *Plasmodium falciparum* electron transport chain. *Parasitology*. **141(1)**: 50-65.
- Sunaryanto, R. & Mahsunah, A. H. (2013). Isolation, purification, and characterization of antimicrobial substances from endophytic actinomycetes. *Makara Journal of Science*. **17(3)**: 87-92.
- Rao, K.V.R., Mani, P., Satyanarayana, B. & Rao, T.R. (2017). Purification and structural elucidation of three bioactive compounds isolated from *Streptomyces coelicoflavus* BC 01 and their biological activity. *3 Biotech*. **7(1)**: 1-12.
- Waluyo, D., Prabandari, E.E., Pramisanidi, A., Hidayati, D.N., Chrisnayanti, E., Puspitasari, D. J., Suryani, D.D., Kristininigrum, K., Oktaviani, A.N., Afrianti, K.R., Nonaka, K., Matsumoto, A., Tokiwa, T., Adipratiwi, N., Ariyani, T., Hartuti, E.D., Putri, T.Z., Rahmawati, Y., Inaoka, D.K. & Nozaki, T. (2021). Exploring natural microbial resources for the discovery of anti-malarial compounds. *Parasitology International*. **85**: 102432.
- WHO. (2022). World Malaria Report 2022. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022>