

Fraksinasi Ekstrak Butanolik Kaldu Fermentasi Isolat Kapang Tanah Banjarmasin Biomcc-F.T.3762 Berbasis Uji Aktivitas Penghambatan Dihidroorotat Dehidrogenase *Plasmodium falciparum*

(Bioguided-Fractionation of Butanolic Extract of Banjarmasin Soil Fungus Biomcc-F.T.3762 Fermentative Broth Against *Plasmodium falciparum* Dihydroorotate Dehydrogenase)

AMILA PRAMISANDI^{1,2*}, HARMITA¹, ANIS HERLIYATI MAHSUNAH²

¹Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia, Depok

²Balai Bioteknologi-BPPT, Gedung 630, Kawasan PUSPIPTEK, Tangerang Selatan

Diterima 21 November 2016, Disetujui 3 Februari 2017

Abstrak: Ekstrak butanolik kaldu fermentasi isolat kapang tanah BioMCC-F.T.3762 menunjukkan aktivitas penghambatan enzim dihidroorotat dehidrogenase *Plasmodium falciparum* (*Pf*DHODH), rantai *transport* elektron mitokondrial bergantung flavin, enzim yang diperlukan dalam jalur biosintesis pirimidin parasit. Ekstrak butanolik kasar menunjukkan aktivitas penghambatan enzim *Pf*DHODH sebesar 97% pada konsentrasi 413 µg/mL dan tidak menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap enzim homolog manusia. Isolasi senyawa aktif dilakukan dengan fraksinasi berbasis uji aktivitas terhadap ekstrak butanolik kaldu fermentasi mikroba. Isolasi fraksi aktif menggunakan partisi cair-cair, kromatografi kolom silika gel, kromatografi kolom oktadesilsilan (ODS), dan pemurnian dengan *high performance liquid chromatography* (HPLC) preparatif. Puncak dominan di dalam fraksi aktif, FS10-2-12 dan FS10-2-13, dideteksi dengan HPLC PDA, terelusi pada waktu retensi 12,6 menit dan 13,9 menit pada panjang gelombang 254 nm, secara berturut - turut. Fraksi aktif menunjukkan aktivitas penghambatan enzim *Pf*DHODH sebesar 75% dan 40%, secara berturut - turut, pada konsentrasi 100 µg/mL. Sebagai pembanding, atpenin A5, inhibitor poten kompleks II mitokondrial menunjukkan aktivitas penghambatan enzim *Pf*DHODH sebesar 75% pada konsentrasi 366 µg/mL.

Kata kunci: dihidroorotat dehidrogenase, kapang tanah, *Plasmodium falciparum*, fraksinasi berbasis uji aktivitas.

Abstract: Butanolic extract of soil fungus BioMCC-F.T.3762 fermentation broth exhibited inhibitory activity against *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase (*Pf*DHODH), a flavin dependent mitochondrial electron transport chain, an essential enzyme in de novo pyrimidine biosynthesis pathway of the parasite. The crude butanolic extract exhibited *Pf*DHODH inhibition of 97% at a concentration of 413 µg/mL, and showed no inhibitory activity against its human homolog. Bioassay-guided fractionation was performed on butanolic extract of microbial fermentation broth to isolate the active compounds. The active fraction was isolated using liquid-liquid partition, silica gel column chromatography, octadecylsilane (ODS) column chromatography and was purified by preparative high performance liquid chromatography (HPLC). Major peak of active fractions, FS10-2-12 and FS10-2-13, were detected by PDA HPLC, which showed a retention time of 12.6 minute and 13.9 minute at 254 nm, respectively. The active fractions exhibited 75% and 40% inhibitory activity against *Pf*DHODH, respectively, at a concentration of 100 µg/mL. In comparison, atpenin A5, a known potent mitochondrial complex II inhibitor exhibited 75% inhibitory activity against *Pf*DHODH at 366 µg/mL.

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

* Penulis korespondensi, Hp. 021-7563120
e-mail: amila.pramisandi@bppt.go.id

PENDAHULUAN

MALARIA masih menjadi penyakit infeksi yang mematikan di dunia. Pada tahun 2015, infeksi malaria mencapai 214 juta kasus dan menyebabkan 438.000 kematian di seluruh dunia. Sebagian besar kasus kematian terjadi pada anak di bawah 5 tahun⁽¹⁾. Menurut data Riskesdas 2013, kasus malaria mencapai 6% dari keseluruhan kasus penyakit yang dilaporkan dengan prevalensi tertinggi di Papua (28,6%) dan Nusa Tenggara Timur (23,3%)⁽²⁾. Resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap artemisinin telah terdeteksi di Kamboja, Laos, Myanmar, Thailand dan Vietnam⁽¹⁾. Vaksin malaria masih dalam tahap pengembangan, walaupun tidak memberikan perlindungan penuh terhadap infeksi, vaksin mampu menurunkan risiko bentuk infeksi terberat yaitu malaria serebral⁽³⁾. Karena itulah penemuan obat baru dalam rangka pengendalian infeksi sangat dibutuhkan.

Rantai *transport* elektron mitokondria dalam *Plasmodium falciparum* merupakan target spesifik dalam terapi malaria karena mempunyai perbedaan fungsional yang signifikan dengan sistem pada mamalia⁽⁴⁾. Salah satu enzim dehidrogenase yang terlibat dalam rantai *transport* elektron tersebut adalah enzim *PfDHODH*, enzim yang terlibat dalam biosintesis pirimidin parasit dalam siklus darah, sehingga sangat diperlukan dalam kelangsungan hidup parasit⁽⁵⁾. Analisis kristalografi enzim dihidroorotat dehidrogenase manusia (*HsDHODH*) dan *Plasmodium falciparum* menunjukkan variasi susunan asam amino, sehingga memungkinkan identifikasi inhibitor spesifik terhadap spesies^(6, 7, 8, 9).

Mikroorganisme telah memberikan kontribusi fenomenal dalam bidang kesehatan dunia. Selain mampu memproduksi metabolit primer seperti asam amino, vitamin dan nukleotida, mikroorganisme mampu memproduksi metabolit sekunder yang secara luas digunakan dalam bidang farmasi dan pertanian. Beberapa inhibitor enzim telah diisolasi dari mikroorganisme seperti asam klavulanat dan turunan statin⁽¹⁰⁾. Leucinostatin A, metabolit sekunder yang diisolasi dari kaldu fermentasi isolat kapang menunjukkan aktivitas antimalaria *in vitro* yang poten dengan IC_{50} 0,9 nM, setara dengan 0,001 µg/mL, terhadap galur *Plasmodium falciparum* resisten⁽¹¹⁾.

Inhibitor enzim *PfDHODH* yang selama ini telah dilaporkan, berasal dari penapisan terhadap koleksi senyawa kimia, dan masih dalam tahapan uji klinis. 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 kapang tanah Banjarmasin BioMCC-F.T.3762 berbasis uji aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH*, dalam rangka isolasi dan purifikasi senyawa aktif sebagai inhibitor enzim *PfDHODH*.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Kapang BioMCC-f.T.3762, gliserol, *potato dextrose agar* (PDA), media vegetasi, n-butanol, kloroform, metanol, heksana, enzim *PfDHODH*, asetonitril, DMSO, HEPES 100 mM (pH 8,0), NaCl, Triton X-100 0,05%, sodium 2,6-dikloroindofenolat hidrat (DCIP) 120 µM, desilubiquinon (dUQ) 15 µM, dihidroorotat (L-DHO).

Alat: alat gelas dan volumetrik, *incubator shaker*, *centrifuge*, *rotary evaporator*, kromatografi kolom terbuka, HPLC (Shimadzu), *microplate reader*.

METODE. **Kapang.** Kapang BioMCC-F.T.3762 adalah koleksi Balai Bioteknologi BPPT. Kapang diisolasi dari tanah yang diambil dari Banjarmasin, Kalimantan Selatan, Indonesia, dan diisolasi dengan metode pengenceran. Kapang yang sudah murni dan diidentifikasi kemudian disimpan dalam gliserol 15% pada suhu -80° C.

Fermentasi. Isolat kapang disebarkan kembali dari stok gliserol 15% ke dalam media *potato dextrose agar* (PDA) sebelum proses fermentasi. Proses fermentasi dilakukan dalam 2 tahapan, yaitu proses vegetasi dan fermentasi. Pada tahap vegetasi, 1 potong kultur kapang dalam media PDA 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), KH_2PO_4 (1 g/L), dan $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5 g/L) tanpa penyesuaian pH. Kultur diinkubasi dalam *incubator shaker* dengan kecepatan 220 rpm pada suhu 28° C selama 3x24 jam. Dua mililiter dari miselia yang sudah tumbuh kemudian diinokulasikan ke dalam 50 buah labu erlenmeyer 500 mL yang masing-masing berisi 100 mL media fermentasi dengan komposisi yang sama dengan media vegetasi. 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 450 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* hingga diperoleh ekstrak kering.

Partisi Cair-Cair. Ekstrak butanolik dipartisi

dengan air dan kloroform. Fase kloroform dikeringkan menggunakan *rotary evaporator*. Partisi kloroform kering dipartisi dengan heksana dan metanol 90%. Fase metanol 90% diencerkan hingga konsentrasi 60% dan dipartisi kembali dengan kloroform. Fase air dipartisi dengan n-butanol. Semua fase hasil partisi dikeringkan menggunakan *rotary evaporator*. Semua hasil partisi dianalisis aktivitas penghambatannya terhadap enzim *PfDHODH*.

Fraksinasi. Fraksinasi dilakukan terhadap hasil partisi aktif menggunakan kromatografi kolom terbuka dengan adsorben silika gel 60 (0,063–0,200 mm; Merck) yang dielusi campuran kloroform-metanol-air dengan perbandingan 100:0:0, 98:2:0, 95:5:0, 90:10:0, 80:20:1, 70:30:5, 60:40:10 dan 50:50:15 secara berturut-turut. Fraksi aktif diaplikasikan dalam kromatografi kolom terbuka dengan adsorben *ODS YMC*GEL ODS-A 12 nm S-75 μ m* (YMC Group) yang dielusi dengan asetonitril 20%, 30%, 40%, 50%, 60% dan 100% secara berturut-turut. Fraksi aktif dipurifikasi menggunakan Shimadzu HPLC dengan kolom *Pegasil ODS SPI100* (5 μ m; 4,6 x 250 mm). Sistem *gradien* yang digunakan adalah asetonitril 5% sampai dengan 100% selama 30 menit, dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit. Semua fraksi dianalisis aktivitas penghambatannya terhadap enzim *PfDHODH*.

Penetapan Profil Fraksi Aktif. Ekstrak dan fraksi aktif yang dihasilkan dari setiap tahap fraksinasi dianalisis profilnya menggunakan Shimadzu HPLC yang terhubung PDA dengan kolom *Waters Symmetry® C18* (5 μ m; 4,6 x 150 mm), dielusi secara *gradien* dengan asetonitril 5% (asam fosfat 0,05%) hingga asetonitril 100% (asam fosfat 0,05%) selama 20 menit, kecepatan alir 1,0 mL/menit, dan direkam pada rentang panjang gelombang 200–600 nm.

Uji Aktivitas Penghambatan Enzim *PfDHODH* dan Enzim *HsDHODH*. Sampel uji dikeringkan dan dilarutkan dengan 50% DMSO dalam plat 96 sumuran. Ke dalam setiap sumuran ditambahkan 192 μ L larutan yang mengandung bahan-bahan dengan konsentrasi akhir sebagai berikut: HEPES 100 mM (pH 8,0), natrium klorida (NaCl) 150 mM, gliserol 10%, Triton X-100 0,05%, natrium 2,6-dikloroindofenolat hidrat (DCIP) 120 μ M, desilubiquinon (dUQ) 15 μ M, enzim *PfDHODH* atau *HsDHODH* 100 nM. Kemudian ditambahkan dihidroorotat (L-DHO) 5 mM sebanyak 8 μ L. Kinetika reaksi enzimatik diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 600 nm selama 20 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

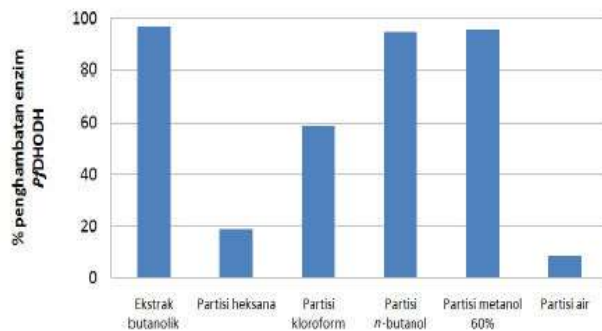
Hasil skrining aktivitas penghambatan enzim

PfDHODH terhadap 58 ekstrak butanolik kaldu fermentasi isolat kapang hasil isolasi dari tanah, serasah, binatang laut dan bagian dalam perut rayap yang diambil dari Banjarmasin, Kalimantan Selatan menunjukkan bahwa isolat kapang tanah dengan kode galur BioMCC-F.T.3762 berpotensi untuk menghasilkan metabolit sekunder sebagai inhibitor enzim *PfDHODH* (belum dipublikasikan).

Kultur fermentasi cair isolat kapang tanah BioMCC-F.T.3762 diinkubasi selama 7 hari dengan media sederhana yang mengandung tepung beras sebagai sumber karbon dan tepung kedelai sebagai sumber nitrogen. Pada hari terakhir kultur fermentasi diperoleh kaldu fermentasi berwarna coklat yang lebih gelap dan lebih kental dibandingkan pada hari pertama fermentasi. Lima liter kaldu fermentasi diekstraksi dengan n-butanol dengan perbandingan volume 1:1. Pemilihan pelarut n-butanol sebagai ekstrak 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 8,0 g. Ekstrak n-butanol menunjukkan aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* sebesar 97% dan 79% pada konsentrasi 413 μ g/mL dan 83 μ g/mL.

Partisi cair–cair terhadap ekstrak kering n-butanol dilakukan dengan pelarut heksana, kloroform, metanol 60%, n-butanol dan air. Tahap ini bertujuan untuk memisahkan komponen–komponen dalam ekstrak sesuai dengan tingkat polaritasnya. Pada konsentrasi yang sama, 250 μ g/mL, hasil partisi dalam pelarut n-butanol dan metanol menunjukkan aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* yang tidak berbeda secara berarti, 94% dan 95% secara berturut-turut, dan menunjukkan aktivitas paling dominan dibandingkan hasil partisi pelarut yang lain. Pada konsentrasi yang lebih kecilpun, yaitu 50 μ g/mL, kedua hasil partisi tersebut menunjukkan aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* yang paling dominan dibanding hasil partisi yang lain, yaitu 86% dan 75% secara berturut-turut. Hasil tersebut menunjukkan bahwa komponen yang terkandung dalam partisi n-butanol dan metanol merupakan komponen yang poten dalam menghambat aktivitas enzim *PfDHODH*. Aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* ekstrak n-butanol dan hasil partisi cair–cair tersaji dalam Gambar 1.

Partisi n-butanol (2,1 g) diaplikasikan ke dalam kromatografi kolom terbuka dengan adsorben silika gel 60. Elusi *gradien* dengan campuran kloroform-metanol-air dimulai dari tingkat kepolaran rendah di mana masing-masing perbandingan dipisahkan menjadi 2 fraksi berturutan. Pemilihan sistem kromatografi berdasarkan sifat komponen dalam

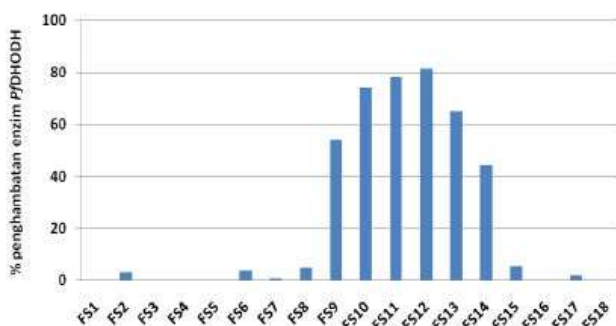


Gambar 1. Aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* ekstrak butanolik pada konsentrasi 413 µg/mL dan hasil partisi cair-cair pada konsentrasi 250 µg/mL.

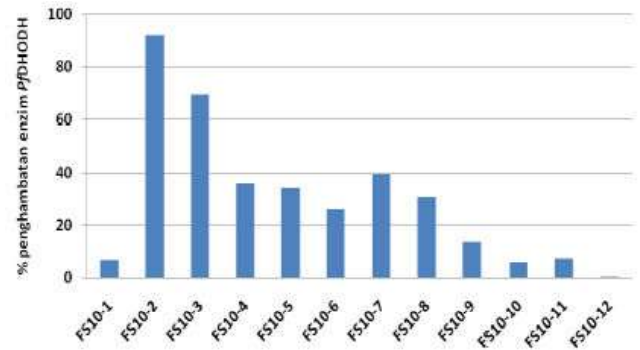
partisi n-butanol yang semi polar. Fraksi aktif yang menunjukkan aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* adalah fraksi kloroform-metanol-air dengan perbandingan 80:20:1 (fraksi FS9 dan fraksi FS10), 70:30:5 (fraksi FS11 dan fraksi FS12) dan 60:40:10 (fraksi FS13) dengan nilai penghambatan enzim *PfDHODH* lebih dari 50% seperti tersaji dalam Gambar 2.

Fraksi aktif FS10 (291 mg), yang mempunyai profil HPLC lebih sederhana dibanding fraksi aktif yang lain, difraksinasi lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom terbuka dengan adsorben ODS dengan elusi gradien campuran asetonitril-air, dimulai dari asetonitril 20%, 30%, 40%, 50%, 60% dan 100% di mana masing-masing konsentrasi dipisahkan menjadi 2 fraksi berturut-tan. Sistem kromatografi tersebut digunakan untuk memisahkan komponen aktif dengan komponen-komponen pengotor dengan resolusi yang lebih besar. Fraksi aktif yang menunjukkan aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* adalah fraksi asetonitril 20% (fraksi FS10-2) dan fraksi asetonitril 30% (fraksi FS10-3) dengan aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* sebesar 92% dan 69% seperti tersaji dalam Gambar 3.

Fraksi FS10-2 (35 mg) dimurnikan lebih lanjut menggunakan HPLC preparatif dan menghasilkan fraksi aktif FS10-2-12 dan FS10-2-13 dengan aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* sebesar 86%



Gambar 2. Aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* oleh hasil fraksinasi kromatografi kolom SiO₂, yaitu FS1- FS18.

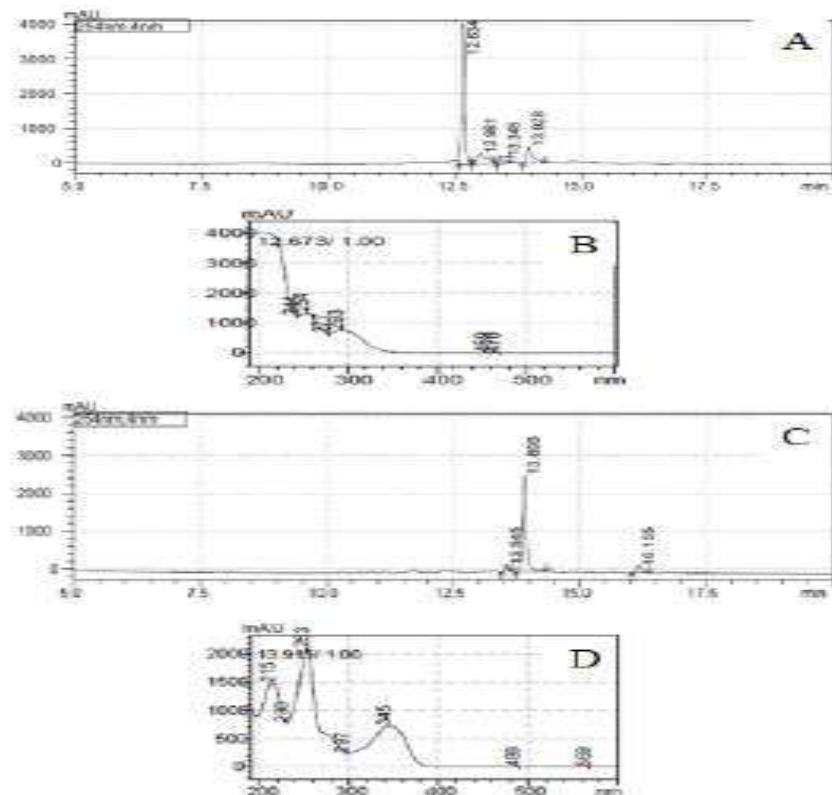


Gambar 3. Aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* oleh hasil fraksinasi kromatografi kolom ODS, yaitu FS10-1 - FS10-12.

dan 81%. 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 teradsorbsi di permukaan fase diam sehingga komponen dengan kepolaran yang lebih besar akan terelusi pada waktu retensi yang lebih awal⁽¹²⁾. Pada panjang gelombang 254 nm, fraksi aktif FS10-2-12 (1,3 mg) menunjukkan puncak dominan dengan waktu retensi 12,6 menit dan kemurnian 65% pada elusi gradien asetonitril 5% sampai dengan 100%. Sedangkan fraksi FS10-2-13 (2,2 mg) menunjukkan puncak dominan dengan waktu retensi 13,9 menit dan kemurnian 88% pada kondisi elusi gradien yang sama. Kedua puncak dominan menunjukkan waktu retensi yang berbeda dan pola spektra UV yang berbeda (Gambar 4) sehingga kedua komponen tersebut mempunyai struktur kimia berbeda tetapi mempunyai nilai polaritas yang hampir sama.

Fraksi FS10-2-12 dan FS10-2-13 menunjukkan aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* sebesar 75% dan 40%, pada konsentrasi 100 µg/mL. Kedua fraksi mempunyai aktivitas yang lebih poten dibandingkan dengan atpenin A5, senyawa yang telah dilaporkan mempunyai aktivitas penghambatan suksinat-ubiquinon reduktase yang termasuk dalam kompleks II rantai *transport* elektron mitokondrial⁽¹³⁾. Atpenin A5 menunjukkan aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* sebesar 75% pada konsentrasi 366 µg/mL. Hasil tersebut menunjukkan bahwa fraksi FS10-2-12 dan FS10-2-13 mempunyai potensi dan spesifitas yang lebih besar dalam menghambat



Gambar 4. Kromatogram HPLC dan spektra UV fraksi aktif FS10-2-12 dan FS10-2-13 pada panjang gelombang 254 nm.

Keterangan :

- A. Kromatogram HPLC fraksi aktif FS10-2-12
- B. Spektra UV fraksi aktif FS10-2-12
- C. Kromatogram HPLC fraksi aktif FS10-2-13
- D. Spektra UV fraksi aktif FS10-2-13

aktivitas enzim *PfDHODH*. Fraksi FS10-2-12 mempunyai kemurnian yang lebih rendah dibanding fraksi FS10-2-13, tetapi fraksi tersebut menunjukkan aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* yang lebih besar. Hal tersebut menunjukkan bahwa fraksi FS10-2-12 mengandung komponen yang lebih poten menghambat enzim *PfDHODH* dibanding fraksi FS10-2-13.

Fraksi FS10-2-12 dan FS10-2-13 mempunyai tingkat kemurnian yang relatif rendah untuk proses identifikasi bobot molekuler dan struktur kimia senyawa, sehingga memerlukan tahap purifikasi lebih lanjut.

SIMPULAN

Ekstrak butanolik kaldu fermentasi isolat kapang tanah Banjarmasin BioMCC-F.T.3762 menunjukkan aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH*. Fraksinasi berbasis uji aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH* digunakan untuk isolasi dan pemurnian komponen aktif. Fraksi aktif HPLC preparatif FS10-2-12 menunjukkan puncak utama pada waktu retensi 12,6 menit dan 75% aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH*, fraksi FS10-2-13 menunjukkan puncak

utama pada waktu retensi 13,9 menit dan 40% aktivitas penghambatan enzim *PfDHODH*, masing-masing pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$. Fraksi FS10-2-12 lebih poten dalam menghambat enzim *PfDHODH* dibanding fraksi FS10-2-13.

UCAPAN TERIMA KASIH

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

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. 2015. World malaria report 2015. diambil dari: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf. diakses 4 Februari, 2016.
2. Kemenkes RI. 2013. Riset kesehatan dasar, Riskesdas 2013. diambil dari <http://www.depkes.go.id/resources/download/general/Hasil%20Riskesdas%202013.pdf>.

- diakses 4 Februari, 2016.
3. RTS,S Clinical Trials Partnership *et al.* A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African Infants. *N Engl J Med.* 2012. 367:2284-95.
 4. Rodrigues T, Lopes F, & Moreira R. Inhibitors of the mitochondrial electron transport chain and the novo pyrimidine biosynthesis as antimalarials: the present status. *Curr Med Chem.* 2010.17:929-56.
 5. Nixon GL, Pidathala C, Shone AE, Antoine T, Fisher N, O'neill PM *et al.* Targeting the mitochondrial electron transport chain of *Plasmodium falciparum*: new strategies towards the development of improved antimalarials for the elimination era. *Future Med Chem.* 2013.5(13):1573-91.
 6. Baumgartner R, Walloschek M, Kralik M, Gotschlich A, Tasler S, Mies J, *et al.* Dual binding mode of a novel series of DHODH inhibitors. *J Med Chem.* 2006.49:1239-47.
 7. Phillips MA, White KL, Kokkonda S, Deng X, White J, Mazouni FE, *et al.* Triazolopyrimidine-based dihydroorotate dehydrogenase inhibitors with potent and selective activity against the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Med Chem.* 2008.51:3649-53.
 8. Deng X, Gujjar R, El Mazouni F, Kaminsky W, Malmquist NA, Goldsmith EJ, *et al.* Structural plasticity of malaria dihydroorotate dehydrogenase allows selective binding of diverse chemical scaffolds. *J Biol Chem.* 2009.284:26999-27009.
 9. Stocks PA, Barton V, Antoine T, Biagini GA, Ward SA, & O'neill PM. Novel inhibitors of the *Plasmodium falciparum* electron transport chain. *J Parasitol.* 2014.141:50-65.
 10. Demain AL & Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot.* 2009.62:5-16.
 11. Otoguro K, Ui H, Ishiyama A, Arai N, Kobayashi M, Takahashi Y, *et al.* *In vitro* antimalarial activities of the microbial metabolites. *J Antibiot.* 2003.56(3):322-4.
 12. Sunaryanto R & Mahsunah AH. Isolation, purification, and characterization of antimicrobial substances from endophytic actinomycetes. *Makara J Sci.* 2013.17(3):87-92.
 13. Kita K, Shiomi K & Ōmura S. Advances in drug discovery and biochemical studies. *Trends in Parasitology.* 2007.23(5):223-9.