

## Upaya Optimasi Sintesis Pentapeptida Leu-Ala-Asn-Ala-Lys dengan Pengurangan Nilai *Loading Resin*

Rani Maharani<sup>1,2\*</sup>, Dessy Yulyani Kurnia<sup>1</sup>, Ace Tatang Hidayat<sup>1,2</sup>, Jamaludin Al-Anshari<sup>1</sup>, Dadan Sumiarsa<sup>1</sup>, Desi Harneti<sup>1</sup>, Nurlelasari<sup>1</sup>, dan Unang Supratman<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jalan Raya Bandung-Sumedang Km 21 Jatinangor 45363

<sup>2</sup>Laboratorium Sentral, Universitas Padjadjaran, Jalan Raya Bandung-Sumedang Km 21 Jatinangor 45363

\*Penulis korespondensi: [r.maharani@unpad.ac.id](mailto:r.maharani@unpad.ac.id)

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v8.n1.28671>

**Abstrak:** SCAP1 (*Saccostrea Cucullata Antioxidant Peptide 1*) dengan urutan asam amino LANAK (Leu-Ala-Asn-Ala-Lys) merupakan pentapeptida yang diisolasi dari hidrolisat tiram dan diketahui memiliki aktivitas antioksidan dengan *scavenging* radikal DPPH sebesar  $83,79 \pm 0,53\%$ . Peptida ini telah berhasil dibuat dengan metode sintesis peptida fase padat dengan persen rendemen 8,28%. Rendahnya persen rendemen yang diperoleh disebabkan karena adanya dua residu Ala serta 1 residu Asn yang dapat menyebabkan agregasi. Nilai *loading resin* yang terlalu besar juga menjadi salah satu penyebab terbentuknya agregasi karena *loading resin* dilakukan selama 15 jam. Penelitian ini bertujuan untuk menyintesis senyawa SCAP1 dengan pengurangan nilai *loading resin*. Untuk meningkatkan persen rendemen dari penelitian sebelumnya, pada penelitian ini dilakukan optimasi sintesis terhadap SCAP1. Sintesis dilakukan dengan pengurangan nilai *loading resin* dengan cara mempersingkat waktu *loading resin* menjadi 4 jam. Senyawa SCAP1 hasil sintesis memiliki massa *crude* sebesar 119,5 mg dan berhasil dimurnikan menggunakan RP-HPLC preparatif dengan massa murni 10,6 mg dan rendemen 16%. Penelitian ini menunjukkan bahwa pengurangan *loading resin* meningkatkan rendemen SCAP1 dari 8,28% menjadi 16%.

**Kata kunci:** SCAP1, LANAK, sintesis peptida fase padat, *loading resin*

**Abstract:** SCAP1 (*S. cucullata Antioxidant Peptide 1*) with amino acid sequence LANAK (Leu-Ala-Asn-Ala-Lys) is a pentapeptide isolated from the oyster hydrolysate, which has antioxidant activity with DPPH radical scavenging of  $83.79 \pm 0.53\%$ . This peptide has been successfully synthesized with a yield of 8.28%. The low percent yield obtained is due to the presence of two Ala residues and 1 Asn residue that can cause aggregation. The loading value of resin that is too large is also one of the causes of aggregation because it was undertaken for 15 hours. This study aims to synthesize SCAP1 compounds by reducing the loading value of resin. To increase the yield, an optimization of the synthesis of SCAP1 was conducted. The synthesis was undertaken by reducing the loading resin value through the shorter 4 hours loading process. The synthesized SCAP1 was obtained with a crude mass of 119.5 mg and was successfully purified using preparative RP-HPLC with a pure mass of 10.6 mg and a yield of 16%. The research showed that the reduction of loading resin value increased the yield, from 8.28% to 16%.

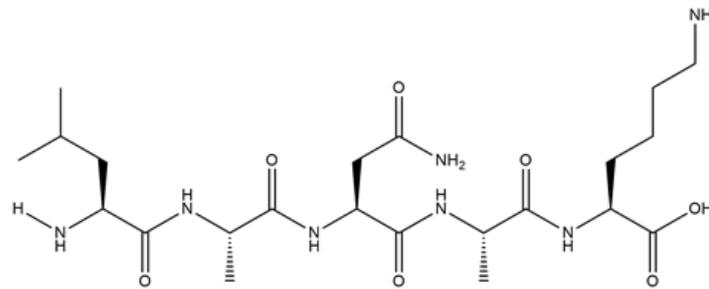
**Keywords:** SCAP1, LANAK, solid-phase peptide synthesis, *loading resin*

### PENDAHULUAN

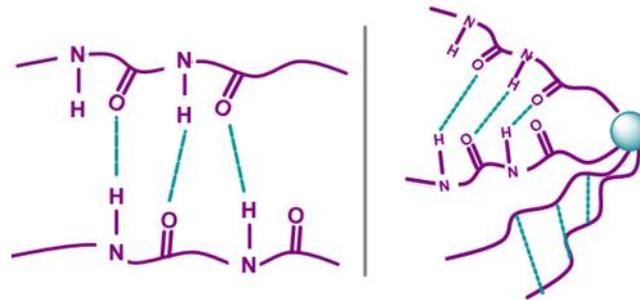
Umayaparvathi *et al.* (2014) telah berhasil mengisolasi peptida dari hidrolisat tiram (*Saccostrea cucullata*) yang memiliki aktivitas antioksidan. Salah satu peptida antioksidan yang berhasil diisolasi yaitu senyawa peptida SCAP1 (Leu-Ala-Asn-Ala-Lys) (Gambar 1) dengan persen aktivitas *scavenging* radikal DPPH sebesar  $83,79 \pm 0,5$ . Untuk eksplorasi lebih lanjut terhadap senyawa SCAP1 ini, diperlukan

metode lain untuk memperoleh senyawa tersebut selain melalui metode isolasi, yaitu dengan sintesis secara kimia.

SCAP1 berhasil disintesis pertama kali oleh Sabana *et al.* (2019) dengan metode Sintesis Peptida Fase Padat (SPPS) dengan rendemen sebesar 8,28%. Menurut Sabana *et al.* (2019) rendahnya rendemen dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya, kehadiran dua residu Ala dan satu residu Asn yang



**Gambar 1.** Pentapeptida SCAP1 (Leu-Ala-Asn-Ala-Lys)



**Gambar 2.** Interaksi antar-rantai ikatan hidrogen selama sintesis peptida (Paradis-Bas 2015)

dapat menyebabkan terjadinya agregasi. Selain itu, penggunaan gugus pelindung Trt pada Asn yang dianggap bukan pilihan tepat karena dapat menyebabkan agregasi selama proses sintesis. Asn bergugus pelindung Trt lebih efektif dalam meningkatkan agregasi dibanding dengan Asn bebas (Hyde *et al.* 1994). Faktor yang terakhir adalah dilakukannya dua kali tahap pemurnian.

Metode sintesis kimia untuk menyintesis peptida yang umum digunakan, yaitu metode sintesis peptida fase larutan dan metode sintesis peptida fase padat (SPPS). Metode sintesis peptida fase larutan umumnya digunakan untuk menyintesis peptida rantai pendek yang dibentuk dari beberapa residu asam amino. Hanya saja, pada metode ini digunakan fase yang homogen sehingga perlu dilakukan pemurnian pada setiap reaksinya (Nishiuchi *et al.* 1998). Sedangkan pada metode fase padat, produk akan terikat pada penyokong padat (resin) sehingga tahap pemurnian hanya dilakukan pada tahap akhir reaksi. Untuk menyintesis peptida SCAP1 digunakan metode sintesis peptida fase padat (SPPS), karena memiliki lebih banyak keunggulan dibandingkan dengan metode fase larutan, diantaranya pengerjaan yang cepat (Merrifield 1963).

Agregasi terjadi karena adanya interaksi ikatan hidrogen (Gambar 2) yang membentuk  $\beta$ -sheet pada antar- atau intra-molekul yang cukup signifikan untuk membentuk agregat. Menurut Paradis-Bas (2015), agregasi dapat disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya sifat rantai samping asam amino, gugus pelindung rantai samping asam amino, substituen-N<sup>α</sup> pada ikatan amida dan tipe pelarut. Selain itu, kecenderungan agregasi tergantung pada

sifat peptida dan gugus pelindung rantai samping, serta peptida yang mengandung residu Ala, Val, Ile, Asn, Gln besar kemungkinannya mengalami agregasi. Nilai *loading resin* yang besar juga dapat menjadi penyebab terjadinya agregasi (Chan & White 2000).

Hambatan utama yang umum pada *difficult peptides* dan juga sekuens agregat dalam larutan adalah kelarutannya. Urutan peptida dan yang paling penting, komposisi asam amino, memainkan peran kunci dalam hal struktur sekunder, sehingga secara langsung mempengaruhi kelarutan molekul. Dalam SPPS dan juga sintesis peptida fase larutan, membutuhkan sekuens yang terlindungi untuk memungkinkan kedua gugus fungsi bereaksi dengan baik untuk memperoleh ikatan amida yang diinginkan. Namun, sifat gugus pelindung ini berkontribusi untuk meningkatkan hidrofobitas sekuens dan dapat menginduksi interaksi yang mendukung ketidaklarutan peptida. Secara umum, diketahui bahwa peptida yang mengadopsi struktur sekunder  $\alpha$ -helix dalam larutan umumnya larut dalam air, sedangkan konformasi  $\beta$ -sheet tidak dapat larut karena kapasitasnya untuk berinteraksi dengan interaksi hidrofobik yang berevolusi menjadi agregat (Paradis-Bas 2015). Menurut Paradis-Bas (2015), terdapat beberapa cara untuk meningkatkan kelarutan peptida dengan mengganggu interaksi  $\beta$ -sheet, diantaranya penggunaan DMSO, peningkatan temperatur (50°C), penggunaan microwave, kontrol pH, serta penambahan garam chaotropic dan deterjen ke dalam larutan peptida.

Pada penelitian ini, optimasi sintesis SCAP1 telah dilakukan dengan pengurangan waktu *loading resin*

yang mana pada penelitian yang dilakukan oleh Sabana *et al.* (2019) dilakukan *loading resin* selama 15 jam, sedangkan pada penelitian ini dilakukan *loading resin* selama 4 jam.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah resin 2-klorotritil klorida, diklorometana (DCM), dimetilformamida (DMF), *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA), Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Lys(boc)-OH, Fmoc-L-Leu-OH, 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinium3-oksida heksafluorofosfat (HATU), 1-hidroksi-7-azabenzotriazol (HOAt), asam trifluoroasetat (TFA), asetaldehid, dan *p*-kloranil. Semua bahan bersifat proanalisis.

### Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung sintesis peptida fasa padat (tabung SPPS), *freeze dryer*, *rotary evaporator*, *shaking rotator*, desikator, *Analytical High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC analitik), *Reverse Preparative High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC preparatif), spektrometer massa HR-ToF ESI-MS Acquity UPLC dan alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

### Metode Penelitian

Prosedur penelitian ini didasarkan pada prosedur sintesis senyawa peptida antioksidan SCAP1 (Leu-Ala-Asn-Ala-Lys) (Sabana *et al.*, 2019). Prosedur deproteksi mengikuti penelitian yang telah dilakukan oleh Rahim *et al.*, 2020. Metode sintesis dilakukan dengan pengurangan nilai *loading resin* dengan cara *loading resin* selama 4 jam.

#### *Pengikatan Asam Amino Ujung C*

Sebanyak 0,25 g resin 2-klorotritil klorida ditambahkan dengan 10 mL diklorometana, kemudian dikocok selama 15 menit dan disaring. Larutan Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (0,6mmol), diklorometana (10 mL) dan DIPEA (385  $\mu$ L, 2.3 mmol) ditambahkan ke dalam resin dan dikocok selama 4 jam pada suhu ruang. Resin disaring, kemudian dicuci dengan DCM.

Untuk menghitung *loading resin*, beberapa butir resin ditimbang kemudian dimasukkan dalam tabung *ependorf*, lalu ditambahkan 0,3 mL piperidin 20% dan didiamkan selama satu jam. Selanjutnya, 2700  $\mu$ L piperidin 20% ditambahkan dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 290 nm.

Sebanyak 5 mL campuran metanol:diklorometana:DIPEA (15:80:5) ditambahkan ke resin yang kemudian dikocok selama 10 menit dan prosedur ini dilakukan dua kali. Resin disaring dan dicuci dengan DCM. Resin dikeringkan dalam vakum selama 30 menit sehingga didapatkan

Fmoc-L-Lys(Boc)-resin kering. Pelepasan gugus pelindung Fmoc menggunakan piperidin 20% dalam DMF 9 mL dan dikocok selama 2+3+5 menit. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DCM dan DMF.

#### *Kopling Asam Amino Kedua (Fmoc-Ala-OH)*

Pada tabung reaksi, Fmoc-L-Ala-OH (3 ek.) dimasukkan dan ditambahkan dengan HATU (3 ek.) dan HOAt (3 ek.), kemudian dilarutkan dalam DCM/DMF (1:1) yang sebelumnya telah ditambahkan DIPEA (6 ek.). Larutan kuning ditambahkan ke dalam peptida resin (NH<sub>2</sub>-Lys(Boc)-resin) kering dan dikocok selama 4 jam. Resin disaring dan dicuci dengan DCM dan DMF. Kontrol kopling asam amino kedua dilakukan dengan menggunakan uji kloranil. Gugus pelindung Fmoc dilepaskan dengan menggunakan piperidin 20% dalam DMF 9 mL dan dikocok selama 2+3+5 menit. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DCM dan DMF. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc pada asam amino kedua dilakukan dengan uji kloranil.

#### *Kopling Asam Amino Ketiga (Fmoc-Asn(Trt)-OH)*

Pada tabung reaksi, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH (3 ek.) dimasukkan dan ditambahkan dengan HATU (3 ek.) dan HOAt (3 ek.), kemudian dilarutkan dalam DCM/DMF (1:1) yang sebelumnya telah ditambahkan DIPEA (6 ek.). Larutan kuning ditambahkan ke dalam peptida resin (NH<sub>2</sub>-Ala-Lys(Boc)-resin) kering dan dikocok selama 4 jam. Resin disaring dan dicuci dengan DCM dan DMF. Kontrol kopling asam amino ketiga dilakukan dengan menggunakan uji kloranil. Gugus pelindung Fmoc dilepaskan dengan menggunakan piperidin 20% dalam DMF 9 mL dan dikocok selama 2+3+5 menit. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DCM dan DMF. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc pada asam amino ketiga dilakukan dengan uji kloranil.

#### *Kopling Asam Amino Keempat (Fmoc-Ala-OH)*

Pada tabung reaksi, Fmoc-L-Ala-OH (3 ek.) dimasukkan dan ditambahkan dengan HATU (3 ek.) dan HOAt (3 ek.), kemudian dilarutkan dalam DCM/DMF (1:1) yang sebelumnya telah ditambahkan DIPEA (6 ek.). Larutan kuning ditambahkan ke dalam peptida resin (NH<sub>2</sub>-Asn(Trt)-Ala-Lys(Boc)-resin) kering dan dikocok selama 4 jam. Resin disaring dan dicuci dengan DCM dan DMF. Kontrol kopling asam amino keempat dilakukan dengan menggunakan uji kloranil. Gugus pelindung Fmoc dilepaskan dengan menggunakan piperidin 20% dalam DMF 9 mL dan dikocok selama 2+3+5 menit. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DCM dan DMF. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc pada asam amino keempat dilakukan dengan uji kloranil.

### Kopling Asam Amino Kelima (*Fmoc-Leu-OH*)

Pada tabung reaksi, *Fmoc-L-Leu-OH* (3 ek.) dimasukkan dan ditambahkan dengan HATU (3 ek.) dan HOAt (3 ek.), kemudian dilarutkan dalam DCM/DMF (1:1) yang sebelumnya telah ditambahkan DIPEA (6 ek.). Larutan kuning ditambahkan ke dalam peptida resin ( $\text{NH}_2\text{-Ala-Asn(Trt)-Ala-Lys(Boc)-resin}$ ) kering dan dikocok selama 4 jam. Resin disaring dan dicuci dengan DCM dan DMF. Kontrol kopling asam amino kelima dilakukan dengan menggunakan uji kloranil. Gugus pelindung *Fmoc* dilepaskan dengan menggunakan piperidin 20% dalam DMF 9 mL dan dikocok selama 2+3+5 menit. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DCM dan DMF. Kontrol pelepasan gugus pelindung *Fmoc* pada asam amino kelima dilakukan dengan uji kloranil.

### Pelepasan Peptida dari Resin

Resin peptida ditempatkan dalam tabung peptida, kemudian 10 mL larutan 95% TFA dalam air ditambahkan dan campuran reaksi dikocok selama 2 x 15 menit pada suhu ruang. Lepasnya peptida dari resin ditandai dengan berubahnya warna resin menjadi merah. Tahap ini dilakukan dua kali. Resin disaring dan dicuci dengan (2 x 5 mL) TFA 95%. Filtrat dipekatkan dengan rotary evaporator. Selanjutnya krud peptida dikarakterisasi menggunakan spektrometer massa ESI-MS. Selanjutnya krud peptida diuji kemurniannya dengan RP-HPLC analitik, dimurnikan dengan RP-HPLC preparatif, dan fraksi hasil pemurnian diuji kemurniannya kembali dengan RP-HPLC analitik, kemudian peptida yang sudah murni dikarakterisasi kembali menggunakan ESI-MS.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

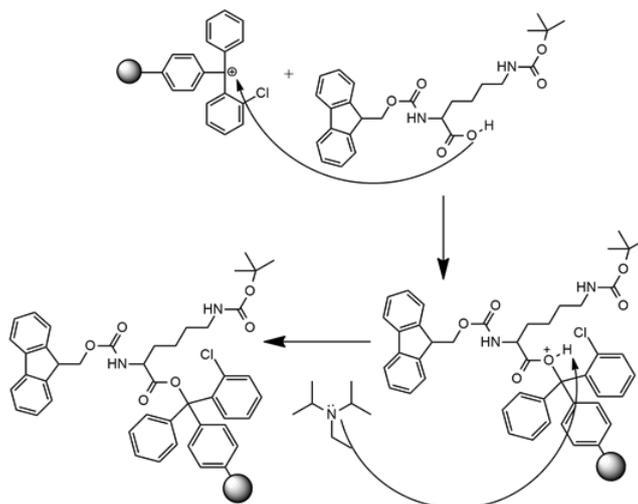
### Sintesis

Senyawa pentapeptida SCAP1 telah berhasil disintesis dengan metode optimasi yaitu dengan penggunaan waktu *loading resin* selama 4 jam. Sintesis LANAK dilakukan dengan metode sintesis

peptida fase padat (SPPS) dengan resin 2-klorotritil klorida sebagai penyokong padat. Resin 2-klorotritil klorida dipilih karena bersifat labil terhadap asam dan dapat meminimalisasi terbentuknya produk samping diketopiperazin karena adanya halangan sterik dari struktur resin 2-klorotritil klorida yang meruah. Karena digunakannya resin 2-klorotritil klorida yang labil terhadap asam, maka digunakan asam amino yang terproteksi *Fmoc* yang labil terhadap basa. Oleh karena itu, pelepasan *Fmoc* pada gugus  $\alpha$ -amino dengan basa piperidin 20%, tidak akan menyebabkan peptida terlepas dari resin. Resin 2-klorotritil klorida dikembangkan terlebih dahulu sebelum digunakan dengan cara dikocok dengan pelarut DCM 15 mL di dalam tabung reaktor SPPS selama 15 menit agar reaksi dengan asam amino yang masuk lebih mudah terjadi.

Selanjutnya dilakukan pengikatan asam amino pertama pada resin. Larutan asam amino pertama yang berisi asam amino *Fmoc-L-Lys(Boc)-OH* yang ditambah basa DIPEA dalam DCM kemudian ditambahkan pada resin 2-klorotritil klorida yang telah mengembang dan dikocok menggunakan *rotary mixer* selama 4 jam. Sabana *et al.* 2019 berhasil menyintesis senyawa LANAK dengan waktu *loading resin* semalaman dan dihasilkan rendemen 8,28%. Nilai *loading resin* senyawa LANAK yang dilakukan oleh Sabana *et al.* 2019 yaitu 1,31 mmol/g. Rendahnya rendemen dapat disebabkan karena adanya agregasi. Salah satu upaya untuk menekan terjadinya agregasi agar didapat rendemen tinggi yaitu dengan waktu *loading resin* selama 4 jam.

Reaksi pengikatan asam amino pertama pada resin diawali dengan deprotonasi gugus karboksil asam amino pertama oleh DIPEA menghasilkan ion karboksilat yang bereaksi dengan alkil halida tersier pada resin. Proses deproteksi gugus karboksil dilakukan untuk meningkatkan elektronegatifitas asam amino yang menyebabkan nukleofilitas dari asam amino juga meningkat, sehingga reaksi antara ion karboksilat dengan sisi aktif pada resin lebih mudah terjadi (Gambar 3).



**Gambar 3.** Reaksi pengikatan asam amino pertama ke resin (Chan & White 2000)

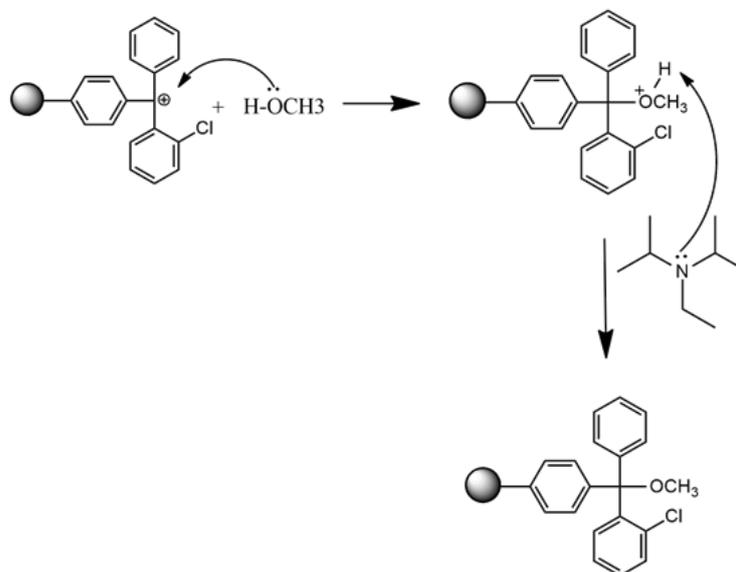
Setelah pengikatan asam amino pertama pada resin, kemudian dilakukan *loading resin*. Resin kering sebanyak 0,60 mg diambil dan ditambahkan piperidin 20% dalam DMF dan didiamkan selama 1 jam. Selanjutnya, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 290 nm menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran *loading resin* bertujuan untuk mengetahui berapa banyak asam amino pertama yang terikat pada resin, sehingga dapat dihitung berapa banyak asam amino selanjutnya yang diperlukan untuk berikatan dengan asam amino pertama. Nilai absorbansi yang terukur merupakan nilai absorbansi gugus Fmoc yang telah terlepas dari asam amino lisin. Pada penelitian ini, didapatkan nilai *loading resin* untuk metode sintesis 1 yaitu sebesar 0,51 mmol/g. Sementara itu, nilai *loading resin* untuk metode sintesis 2 yaitu sebesar 0,40 mmol/g. Nilai *loading resin* yang baik menurut Barlos *et al.* 1991 tidak lebih dari 0,60 mmol/g. Jika nilai *loading resin* terlalu besar akan mempersulit proses kopling asam amino selanjutnya, selain itu juga akan menyebabkan terjadinya agregasi. Dilihat dari nilai *loading resin* pada kedua metode sintesis dapat disimpulkan bahwa pengikatan amino lisin pada resin berhasil dilakukan karena nilai *loading resin* yang diperoleh masih berada di bawah 0,60 mmol/g. Nilai *loading resin* pada sintesis LANAK oleh Sabana *et al.* 2019 memberikan nilai *loading*

*resin* 1,31 mmol/g jauh di atas 0,60 mmol/g. Ini yang diduga menjadi penyebab, agregasi dan penyumbang terhadap rendemen produk yang rendah.

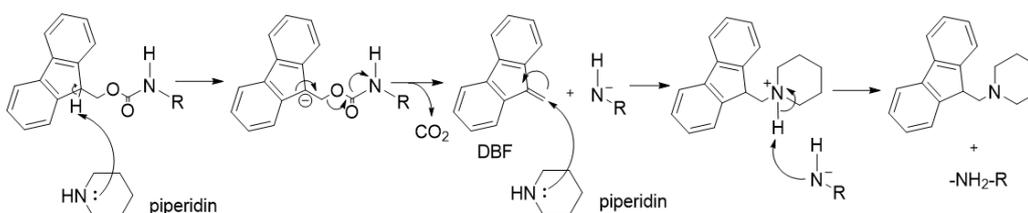
Setelah diketahui nilai *loading resin*, kemudian dilakukan *capping resin* yang berfungsi untuk menutup sisi aktif resin yang tidak berikatan dengan asam amino pertama. Hal ini agar asam amino kedua terikat pada asam amino pertama, tidak pada resin (Gambar 4). *Capping resin* dilakukan dengan cara mereaksikan campuran metanol:DCM:DIPEA (15:80:5) dengan resin dengan cara dikocok dalam tabung reaktor SPPS.

Sebelum dilakukan kopling asam amino pertama dengan asam amino kedua, gugus pelindung Fmoc harus dilepaskan terlebih dahulu dari asam amino pertama. Tahap deproteksi Fmoc ini dilakukan dengan cara direaksikannya basa piperidin 20% dalam DMF terhadap resin selama 2+3+5 menit (Gambar 5) mengikuti prosedur yang dilakukan oleh Rahim *et al.* 2020. Tahapan deproteksi dibuat bertahap yaitu 2+3+5 menit agar fmoc yang sudah terlepas dari N-terminal asam amino dapat terquenched oleh piperidin, menjadi fmoc-piperidin. Reaksi hanya dilakukan selama 10 menit, untuk menghindari terbentuknya produk samping antara N-terminal dengan fmoc yang sudah terlepas.

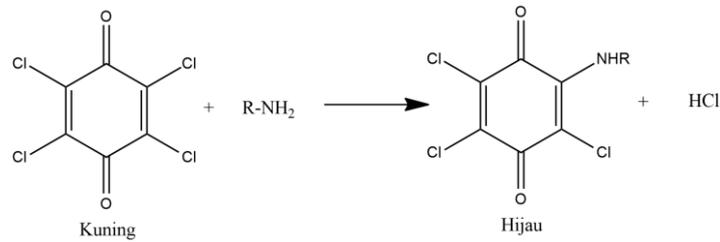
Untuk melihat keberhasilan reaksi pada tahap ini, dilakukan uji kloranil untuk mendeteksi adanya



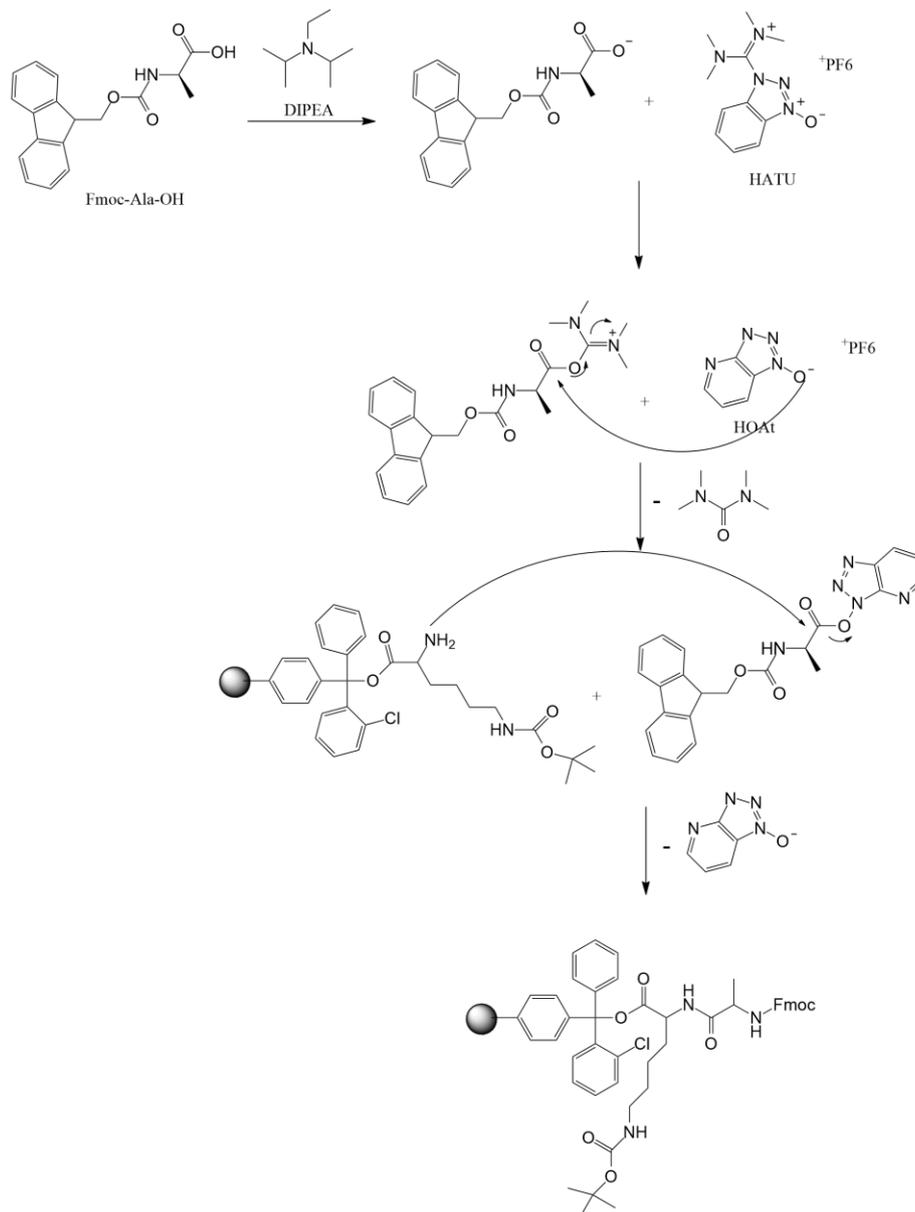
**Gambar 4.** Mekanisme *capping resin* (Jensen *et al.* 2013)



**Gambar 5.** Mekanisme deproteksi gugus pelindung Fmoc (Sewald & Jakubke 2002)



**Gambar 6.** Reaksi uji kloranil (Jensen *et al.* 2013)



**Gambar 7.** Mekanisme kopling asam amino kedua pada asam amino pertama (Valeur & Bradley 2009)

gugus amina sekunder bebas (Gambar 6). Apabila reaksi deproteksi Fmoc berhasil, maka warna resin berubah dari kuning menjadi biru-kehijauan. Perubahan warna ini menunjukkan bahwa gugus amino telah bebas dari gugus pelindung dan siap berikatan dengan asam amino selanjutnya.

Selanjutnya dilakukan kopling asam amino kedua pada asam amino pertama dengan reagen kopling HATU/HOAt. Asam amino kedua yaitu Fmoc-Ala-OH dilarutkan dalam campuran DIPEA, DCM dan DMF, dan ditambahkan reagen kopling HATU/HOAt. Reagen HATU dapat mengaktivasi

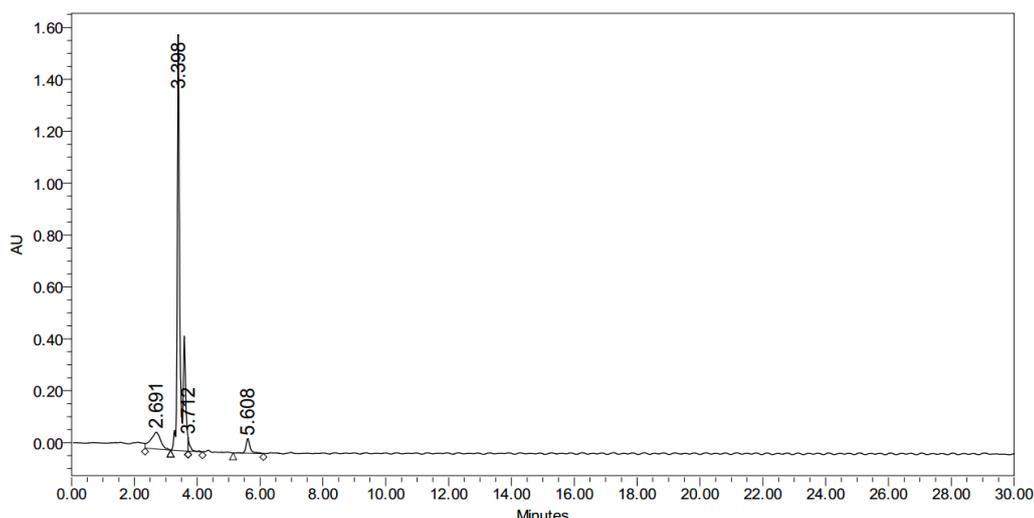
gugus karboksil pada asam amino kedua dengan membentuk intermediat ester yang lebih aktif. Gugus ester yang terbentuk bertindak sebagai gugus pergi yang baik, sehingga gugus karbonyl yang teraktivasi lebih mudah diserang oleh nukleofil dari asam amino pertama membentuk ikatan peptida. Reagen HOAt ditambahkan sebagai zat aditif untuk menekan laju rasemisasi karena dapat membentuk ikatan hidrogen intramolekular dengan asam amino. HATU dan HOAt merupakan kombinasi reagen kopling yang tidak dapat dipisahkan satu sama lain. Jika hanya digunakan HATU, kemungkinan terjadinya rasemisasi tinggi karena tidak adanya ikatan hidrogen antara asam amino dengan HOAt yang dapat memberikan halangan sterik pada saat reaksi kopling berlangsung. Aktivasi gugus karboksilat diawali dengan proses deprotonasi proton pada gugus karboksil oleh basa DIPEA, dan dihasilkan anion karboksilat yang bersifat nukleofil. Nukleofil tersebut akan menyerang karbokation pada HATU membentuk garam uranium karboksilat. Atom oksigen dari HOAt akan menyerang karbon pada karbonyl yang bersifat elektrophil membentuk *O*-asil ester. Gugus amino dari asam amino pertama yang bersifat sebagai nukleofil akan menyerang atom karbon dari karbonyl pada asam amino kedua, menyebabkan benzotriazol menjadi gugus pergi sehingga membentuk ikatan peptida (Gambar 7).

Perbandingan ekivalen asam amino, reagen kopling, dan basa yang digunakan pada tahap kopling ini adalah 3:3:6. Jumlah ekivalen asam amino yang besar digunakan untuk memperbesar konsentrasi asam amino, karena reaksi pada SPPS berlangsung secara heterogen antara fase padat dan fase cairan cenderung sulit terjadi. Konsentrasi yang tinggi dari asam amino pada fase larutan dapat meningkatkan laju reaksi karena frekuensi tumbukan antar molekulnya lebih besar. Selanjutnya, campuran reaksi ditambahkan ke dalam tabung reaktor SPPS

yang berisi resin dan dikocok selama 4 jam. Setelah itu, resin dikeringkan dan dicuci dengan DCM dan DMF.

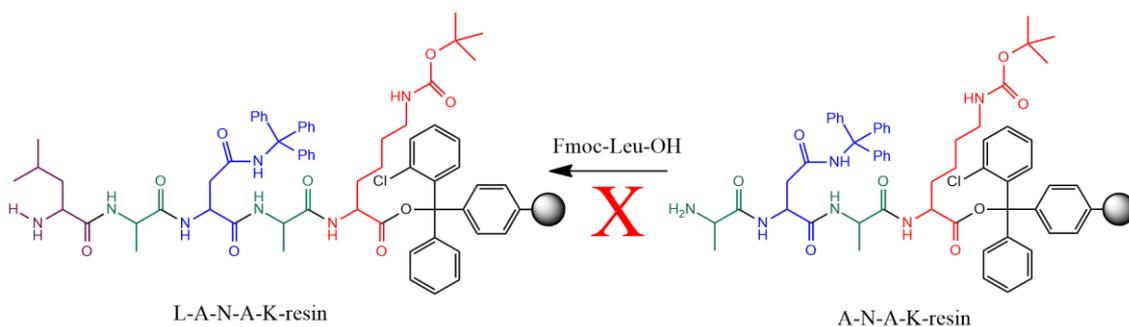
Setelah dicuci dengan larutan garam, resin dicuci kembali dengan DCM. Setiap reaksi kopling, dilihat keberhasilannya dengan uji kloranil dan menghasilkan warna resin tetap kuning. Hal ini dikarenakan tidak terdapat amina bebas pada peptida. Selanjutnya, dilakukan tahap deproteksi gugus Fmoc menggunakan basa piperidin 20% dalam DMF. Kemudian resin dicuci dengan DCM dan DMF. Keberhasilan reaksi deproteksi dapat dilihat dari uji kloranil yang ditandai dengan adanya perubahan warna dari kuning menjadi biru-kehijauan. Sementara untuk metode sintesis pertama, dilakukan protokol sintesis yang sama seperti yang dilakukan oleh Sabana *et al.* (2019). Tahapan selanjutnya adalah pengulangan kopling asam amino ketiga hingga kelima dan deproteksi gugus Fmoc sampai didapat rantai peptida SCAP1 yang masih terikat pada resin.

Setelah rantai peptida SCAP1 terbentuk, dilakukan pelepasan peptida dari resin dengan mereaksikan peptida yang masih terikat pada resin dengan TFA 95% dalam air selama 15 menit sebanyak dua kali. Asam trifluoroasetat (TFA) ( $pK_a = 0,23$ ) digunakan untuk melepaskan peptida dari resin 2-klorotritil klorida. Konsentrasi TFA yang digunakan 95% dalam air, dapat menyebabkan gugus pelindung rantai samping asam amino ikut terlepas (Boc pada lisin dan Trt pada asparagin), sementara itu air bertindak sebagai *scavenger* karbokation yang terbentuk selama reaksi. Tahap ini ditandai dengan warna resin yang berubah dari kuning menjadi kehitaman menandakan bahwa proses pelepasan peptida dari resin sedang berlangsung (Chan & White 2000). Filtrat kemudian ditampung dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga didapatkan *crude*. *Crude* yang didapatkan sebesar 119,50 mg.

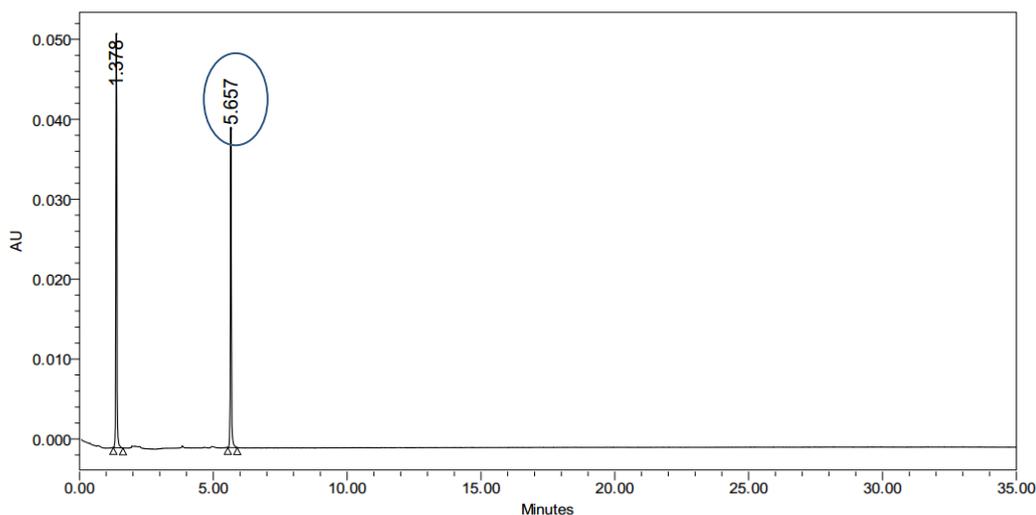


**Gambar 8.** Kromatogram RP-HPLC analitik SCAP1 hasil sintesis pertama, kolom LiChrospher RP-18 detektor PDA  $\lambda_{210nm}$  dengan eluen isokratik air:asetonitril (6:4), laju alir 1 mL/menit

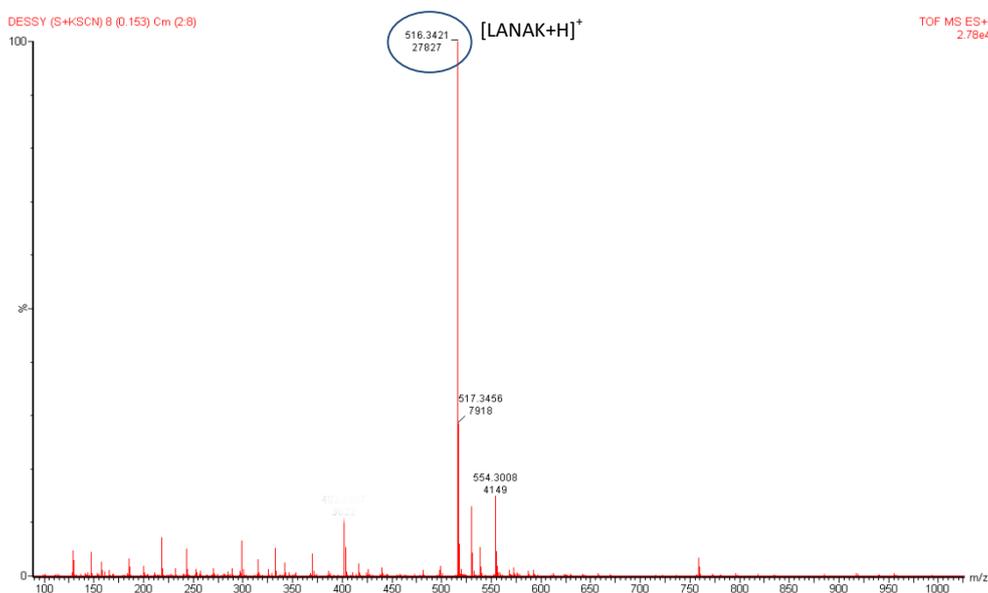




**Gambar 4.12.** Skema pembentukan tetrapeptida A-N-A-K



**Gambar 4.13.** Kromatogram RP-HPLC analitik LANAK sintesis pertama fraksi R1 14-34, kolom LiChrospher RP-18 detektor PDA  $\lambda_{210\text{nm}}$  dengan eluen gradien asetonitril:air (5%-40%), laju alir 1 mL/menit



**Gambar 4.14.** Spektrum HR-ToF ESI-MS  $\text{MS}^+$  LANAK sintesis pertama fraksi R1 14-34

Setelah dilakukan analisis dan karakterisasi, dapat disimpulkan bahwa *crude* hasil sintesis tidak murni. Oleh karena itu, dilakukan tahap pemurnian terhadap

dua *crude* SCAP1. *Crude* SCAP1 hasil sintesis dimurnikan menggunakan RP-HPLC preparatif dan didapatkan fraksi R1 14-34. Selanjutnya dilakukan

analisis terhadap fraksi tersebut menggunakan RP-HPLC analitik dengan eluen gradien asetonitril:air (5%-40%) dan laju alir 1 mL/menit selama 35 menit. Dapat dilihat pada kromatogram, terdapat dua puncak yaitu pertama pada menit ke 1,378 yang merupakan puncak untuk pelarut asetonitril, sedangkan puncak kedua pada menit ke 5,657 yang merupakan puncak untuk senyawa SCAP1 (Gambar 4.13). Pada spektrum, hanya terdapat satu puncak ion molekul  $[M+H]^+$  untuk pentapeptida SCAP1 dengan nilai 516,3421 (Gambar 4.14). Jadi, dapat disimpulkan bahwa setelah dimurnikan dengan RP-HPLC preparatif, SCAP1 berhasil dimurnikan dan diperoleh massa sebesar 10,50 mg dengan rendemen 16,00%. Terjadi kenaikan persen rendemen jika dibandingkan dengan hasil Sabana *et al.* (2019) yaitu dari 8,28% menjadi 16,00%.

### KESIMPULAN

Pengurangan *loading resin* dengan mempersingkat waktu reaksi telah berhasil meningkatkan rendemen SCAP1 dari 8% menjadi 16%.

### UCAPAN TERIMA KASIH

RM dan ATH mengucapkan terima kasih kepada Hibah PDUPT-DIKTI 2020.

### DAFTAR PUSTAKA

Chan, W. C. & White, P. D. (2000). *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*. University of Leeds. Leeds.

Hyde, C., Johnson, T., Owen, D., Quibell, M. & Sheppard, R.C. (1994). Some 'difficult sequences' made easy : A study of interchain association in solid-phase peptide synthesis. *International Journal of Peptide and Protein Research*. **43(5)**: 431-440.

Jensen, K.J., Shelton, P.T. & Pedersen, S.L. (2013). *Peptide Synthesis and Application*. Humana Press. New York.

Merrifield, R.B. (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*. **85(14)**: 2149-2154.

Nishiuchi, Y., Inui, T., Nishio, H., Bódi, J., Kimura, T., Tsuji, F.I. & Sakakibara, S. (1998). Chemical synthesis of the precursor molecule of the *Aequorea green* fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **95(23)**: 13549-13554..

Paradís-Bas, M. (2015). Development of New Tools for the Synthesis of "Difficult Peptides" . PhD Thesis. Universitat de Barcelona. Barcelona.

Rahim, A., Hidayat, A. T., Nurlelasari, Harneti, D., Supratman U. & Maharani, R. (2020). A total synthesis of cyclodepsipeptide [Leu]6-aerobasidin K using combination of solid- and solution- phase. *Current Chemistry Letters*. **9(2)**: 97-104.

Sabana, I. R., M. Naufal, I. Wiani, A. Zainuddin, A. T. Hidayat, D. Harneti, Nurlelasari, J. Al-Anshori, U. Supratman & R. Maharani. (2019). Synthesis of antioxidant peptide SCAP1 (Leu-Ala-Asn-Ala-Lys). *Egyptian Journal of Chemistry*. **63(3)**: 921-926.

Sewald, N., & Jakubke, H.D. (2002). *Peptides: Chemistry and Biology*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim.

Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Vimalraj, V., Arumugam, M., Civagami, G., & Balasubramanian, T. (2014). Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition*. **4(3)**: 343-353.

Valeur, E & Bradley, M. (2008). Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews*. **38(2)**: 606-631.