

Sintesis Tetrapeptida Antioksidan TKPS dengan Metode Fasa Padat

Nety Kurniaty*, Predi Mubarak

Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung

*Penulis korespondensi: nety.kurniaty@unisba.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v8.n2.30345>

Abstrak: Senyawa tetrapeptida antioksidan threonin-lysin-prolin-serin (TKPS) merupakan salah satu derivat hasil isolasi dari jamur *Tolypocladium inflatum* dan telah berhasil disintesis menggunakan metode *solid-phase peptide synthesis* (SPPS). Penelitian ini bertujuan untuk menyintesis senyawa tetrapeptida TKPS dengan metode SPPS dan mengetahui aktivitas antioksidan senyawa tetrapeptida hasil sintesis dengan uji DPPH. Tetrapeptida TKPS disintesis menggunakan strategi SPPS pada resin 2-klorotritilklorida sebagai padatan penyangga, strategi gugus pelindung Fmoc, dan penggunaan reagen kopling HBTU/HOBt. Padatan TKPS berhasil dimurnikan menghasilkan TKPS sebanyak 111,4 mg. Setelah dimurnikan, TKPS dikarakterisasi dengan HR-TOF-MS yang memberikan nilai m/z $[M+H]^+$ 431,2588 yang sesuai untuk TKPS. Uji aktivitas antioksidan dilakukan pada TKPS dengan nilai IC_{50} sebesar 4,039 mg/mL.

Kata kunci: antioksidan, tetrapeptida, sintesis peptida fase padat (SPPS)

Abstract: Tetrapeptide threonine-lysine-proline-serine (TKPS) is one of the derivate that had been successfully isolated from the *Tolypocladium inflatum* fungi and has been synthesized using solid phase peptide synthesis (SPPS) method. This research aims is to synthesize of tetrapeptide TKPS using SPPS method, and to find out about the antioxidant activity of the synthesized tetrapeptide using DPPH test. TKPS has been synthesized on 2-chlorotritilchloride resin as solid phase, Fmoc group protection strategy, and the use of coupling reagent HBTU/HOBt. TKPS has been purified, resulting in TKPS 111.4 mg. The tetrapeptide was characterized using HR-TOF-MS with m/z is $[M+H]^+$ 431.2588 for TKPS. The antioxidant activity of TKPS was obtained with IC_{50} value of 4.039 mg/mL.

Keywords: antioxidant, tetrapeptide, solid phase peptide synthesis (SPPS)

PENDAHULUAN

Senyawa radikal bebas merupakan senyawa yang sangat reaktif karena memiliki elektron yang tidak berpasangan sehingga mudah bereaksi dengan molekul sel tubuh dengan cara mengikat elektron pada molekul sel tersebut. Radikal bebas yang dihasilkan selama proses metabolisme normal, dapat menyebabkan terjadinya kerusakan fungsi sel-sel tubuh dan memicu timbulnya penyakit degeneratif (Juniarti *et. al.*, 2009). Resiko terjadinya penyakit tersebut dapat dikurangi dengan penggunaan senyawa antioksidan.

Antioksidan merupakan senyawa yang bertindak sebagai donor elektron atau reduktan yang mampu menghambat, mencegah maupun menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan merupakan parameter penting untuk memantau kesehatan seseorang. Tubuh manusia memiliki sistem antioksidan untuk menangkal reaktivasi radikal bebas, yang secara kontinu dibentuk sendiri oleh tubuh (Winarsi, 2007).

Peptida bioaktif dapat dihasilkan secara *in vivo* maupun *in vitro*, dengan memanfaatkan peptida bioaktif maka akan memberikan peluang untuk menjadikan biopeptida sebagai sumber alternatif bahan sintesis baik sebagai makanan fungsional seperti multivitamin dan kosmetik dalam bidang farmasi (Kim and Wijesekara, 2010). Peptida bahan alam diketahui memiliki potensi antioksidan yang dapat menstabilkan senyawa radikal bebas secara enzimatik dan mereduksi radikal hidroperoksida. Senyawa peptida di dalam tubuh lebih mudah diserap dengan efek samping yang ringan. Peptida bahan alam bisa disintesis dengan metode peptidomimetik dimana peptida dirancang untuk meniru susunan asam amino yang terdapat pada peptida bahan alam dengan beberapa modifikasi struktur maupun susunan asam aminonya untuk meningkatkan fungsi biologis dan mekanis dari peptida bahan alam seperti meningkatkan bio-afibilitas, bio-stabilitas, bio-efisiensi dan bio-selektifitasnya (Li *et. al.*, 2002).

Peptida Thr-Lys-Pro-Arg (TKPR) yang diisolasi dari jamur *Tolypocladium inflatum* dan salah satu

derivatnya (Thr-Lys-Pro-Ser, TKPS) diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Agnieszka *et al.*, 2017). Senyawa TKPS telah berhasil disintesis dan menunjukkan aktivitas antioksidan yang baik. Sintesis senyawa peptida dengan metode *Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)* dipercaya lebih efektif daripada isolasi dari bahan alam diantaranya karena penggunaan pelarut yang sedikit, sehingga dapat dikatakan ramah lingkungan karena limbah yang dihasilkan pun sedikit, selain itu waktu sintesis yang lebih cepat dibanding isolasi dari bahan alam dan hasil yang lebih pasti (Irwansyah, 2010). Peptida sintesis yang diperoleh dari pengkoplingan asam amino sintesis ini tidak dianggap benda asing di dalam tubuh karena memiliki struktur yang sama dengan bahan alamnya. Dari hasil sintesis dan uji aktivitas, diketahui bahwa tetrapeptida TKPS memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai inhibisi 45%. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidannya lemah karena masih mengandung lisin yang bersifat ionik yang dapat menurunkan aktivitas antioksidan pada asam amino serin dan prolin, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mencari senyawa antioksidan dari tetrapeptida dengan susunan asam amino yang berbeda hingga didapat aktivitas antioksidan yang tinggi, karena aktivitas antioksidan ditentukan oleh asam amino penyusunnya (Zou, *et al.*, 2016).

Sintesis tetrapeptida TKPS dilakukan dengan metode sintesis peptida fasa padat (SPPS) karena waktu sintesis yang lebih singkat dibandingkan dengan penggunaan fasa cair, dan pemurnian dapat dilakukan di tahap akhir saja, sehingga dapat disimpulkan bahwa metode SPPS lebih mudah dan cepat (Maharani *et al.*, 2015).

Pada metode SPPS digunakan adalah strategi penggunaan gugus pelindung Fmoc pada gugus amino yang tidak stabil dalam suasana basa, dan strategi perlindungan gugus pelindung pada rantai samping dan penggunaan resin 2-klorotritilklorida dipilih karena tidak stabil terhadap asam (Chan & White, 2000). Reagen kopling yang digunakan pada penelitian ini adalah kombinasi HBTU/HOBt yang termasuk dalam kelompok benzotriazol yang dapat membuat gugus amina menjadi lebih reaktif. Reagen tersebut berfungsi memberi suasana basa pada reaksi asam amino dimana dapat mengganggu kestabilan asam amino sehingga mendesak ion H^+ lepas dan mengaktifasi gugus karboksilat sehingga gugus amina yang ada pada asam amino berikutnya dapat bereaksi dengan gugus karboksilat. Reagen ini dapat meningkatkan kereaktifan gugus amina sehingga lebih mudah bereaksi dengan asam amino berikutnya.

Produk hasil sintesis TKPS yang didapat diuji kemurniannya menggunakan RP-HPLC dan diketahui bahwa senyawa tetrapeptida tersebut belum murni sehingga perlu dilakukan pemurnian terlebih dahulu karena masih terdapat gugus pelindung. Untuk itu dilakukan deproteksi kembali untuk melepaskan gugus pelindungnya dan dianalisis

kembali menggunakan RP-HPLC, lalu dikarakterisasi menggunakan spektrometer massa dan diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH. Sintesis senyawa tetrapeptida TKPS merupakan suatu hal belum pernah dilakukan. Penelitian ini diharapkan memberikan informasi mengenai senyawa tetrapeptida baru dengan potensi antioksidan serta mengetahui peran asam amino terhadap aktivitas antioksidan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah asam amino Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Thr(*t*-Bu)-OH, resin 2-klorotritilklorida, pelarut diklotometan (DCM), dimetilformamida (DMF), reagen *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU), *N*-Hydroxybenzotriazole (HOBt), *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU), *N,N*-Diisopropylethylamine (DIPEA), Trifluoroacetic acid (TFA), *1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-2-ene* (DBU), larutan kloranil 2%, asam asetat, metanol, piperidin, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl-diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) serta pembanding Vitamin C. Semua bahan yang digunakan adalah bahan proanalisis.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah tabung sintesis peptida fasa padat (tabung SPPS), freeze dryer, rotary evaporator, rotary suspension mixer, kompresor, RP-HPLC analitik, spektrofotometer massa, spektrofotometer UV-Vis, hot plate stirrer, sonikator, neraca analitik, magnet stirrer, desikator, tabung eppendorf dan alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

Pengikatan asam amino pertama (Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH) ujung C

Sebanyak 0,3 g resin 2-klorotritilklorida ditempatkan dalam reaktor, kemudian ditambahkan 5 mL DCM, lalu diputar dalam tabung SPPS menggunakan *rotary suspension mixer* selama 10 menit lalu dikeringkan menggunakan R-Compressor. Kemudian ke dalam vial disiapkan larutan Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH (172,55 mg), DCM (5 mL) dan DIPEA (153,1 μ L) lalu disonikasi selama 5 menit dan dimasukkan ke dalam tabung SPPS yang berisi resin dan diputar menggunakan *rotary suspension mixer* selama 4 jam pada suhu ruang. Resin disaring, kemudian dicuci dengan DMF dan DCM, lalu dikeringkan menggunakan R-Compressor. Resin yang sudah kering diambil sedikit untuk uji kloranil dan diamati perubahan warnanya untuk melihat apakah pengikatan asam amino ujung C sudah terbentuk, kemudian dilakukan pemuatan resin.

Untuk menghitung nilai *loading* resin, 0,8 mg Fmoc-Ser(*t*-Bu)-resin yang sudah kering ditimbang dan ditambahkan 2 mL piperidin 20% dalam DMF ad 10 mL dalam gelas ukur, didiamkan selama 1 jam, diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 290 nm.

Pelepasan gugus pelindung Fmoc menggunakan 10% DBU dalam DMF (8 mL), campuran dikocok selama 15 detik. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DMF dan DCM. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc dilakukan dengan menggunakan uji kloranil. NH₂-Ser(*t*-Bu)-resin dihasilkan dan siap untuk tahap kopling kedua.

Kopling asam amino kedua (Fmoc- Pro-OH)

Pada vial disiapkan Fmoc-Pro-OH (180,97 mg) lalu ditambahkan dengan HBTU (203,43), HOBt (72,48 mg), dan DIPEA (182,45 µL) yang dilarutkan dalam 5 mL DCM, larutan kemudian disonikasi selama 5 menit. Larutan dimasukkan ke dalam tabung SPPS yang berisi peptida resin (NH₂-Ser(*t*-Bu)-resin) kering dan diputar selama 4 jam pada *rotary suspension mixer* untuk menghasilkan Fmoc-Pro-Ser(*t*-Bu)-resin. Resin disaring dan dicuci dengan DMF dan DCM kemudian dikeringkan. Kontrol kopling asam amino kedua dilakukan dengan menggunakan uji kloranil.

Pelepasan gugus pelindung Fmoc menggunakan 10% DBU dalam DMF (8 mL), larutan dikocok selama 15 detik. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DMF dan DCM. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc dilakukan dengan menggunakan uji kloranil. NH₂-Pro-Ser(*t*-Bu)-resin dihasilkan dan siap untuk tahap kopling ketiga.

Kopling asam amino ketiga (Fmoc- Lys(Boc)-OH)

Pada vial ditimbang Fmoc-Lys(Boc)-OH sebanyak 251,32 mg, lalu ditambahkan dengan HBTU sebanyak 203,43 mg dan HOBt 72,48 mg serta DIPEA 182,45 µL yang dilarutkan dalam 5 mL DCM, larutan kemudian disonikasi selama 5 menit. Larutan kuning dimasukkan ke dalam peptida resin (NH₂-Pro-Ser(*t*-Bu)-resin) kering dan diputar selama 4 jam pada *rotary suspension mixer* untuk menghasilkan Fmoc-Lys(Boc)-Pro-Ser(*t*-Bu)-resin. Resin disaring dan dicuci dengan DMF dan DCM kemudian dikeringkan. Kontrol kopling asam amino kedua dilakukan dengan menggunakan uji kloranil.

Pelepasan gugus pelindung Fmoc menggunakan 10% DBU dalam DMF (8 mL), larutan dikocok selama 15 detik. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DMF dan DCM. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc dilakukan dengan menggunakan uji kloranil. NH₂-Lys(Boc)-Pro-Ser(*t*-Bu)-resin dihasilkan dan siap untuk tahap kopling keempat.

Kopling asam amino keempat (Fmoc-Thr(*t*-Bu)-OH)

Pada vial ditimbang Fmoc-Thr(*t*-Bu)-OH sebanyak 251,32 lalu ditambahkan dengan HBTU sebanyak 203,43 mg dan HOBt sebanyak 72,48 mg serta DIPEA sebanyak 182,45 µL yang dilarutkan dalam 5 mL DCM, larutan kemudian disonikasi selama 5 menit. Larutan kuning ditambahkan ke dalam peptida resin (NH₂-Lys(Boc)-Pro-Ser(*t*-Bu)-resin) kering dan dikocok selama 4 jam untuk menghasilkan Fmoc-Thr(*t*-Bu)-Lys(Boc)-Pro-Ser(*t*-Bu)-resin. Resin disaring dan dicuci dengan DMF dan DCM kemudian dikeringkan. Kontrol kopling asam amino kedua dilakukan dengan menggunakan uji kloranil.

Pelepasan gugus pelindung Fmoc menggunakan 10% DBU dalam DMF (8 mL), larutan dikocok selama 15 detik. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DMF dan DCM. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc dilakukan dengan menggunakan uji kloranil. NH₂-Thr(*t*-Bu)-Lys(Boc)-Pro-Ser(*t*-Bu)-resin dihasilkan dan siap untuk tahap pelepasan tetrapeptida dari resin.

Pelepasan Peptida dari Resin

Resin peptida (NH₂-Thr(*t*-Bu)-Lys(Boc)-Pro-Ser(*t*-Bu)-OH) ditambahkan 5 mL larutan 95% TFA dalam air. Campuran dikocok selama 10 menit menggunakan *rotary suspension mixer* 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) 95% TFA dalam air. Filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Linear tetrapeptida yang telah disintesis selanjutnya dianalisis menggunakan RP-HPLC analitik, dimurnikan dan dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer massa.

Uji Kloranil

Tetrapeptida yang telah dikopling dicuci dengan 3 mL DCM, 3 mL DMF dan 3 mL DCM, lalu dikeringkan menggunakan *R-Compressor* sampai menjadi resin kering. Kemudian beberapa butir resin diambil lalu dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* dan ditambahkan larutan asetaldehida 2% sebanyak 40 µL dan larutan kloranil 2% sebanyak 40 µL lalu dikocok dan diamati perubahan warna yang terjadi pada butiran resin.

Pengujian dengan RP-HPLC (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*)

Sampel diambil 1 mg dan pada sampel ditambahkan 1 mL metanol dalam tabung *Eppendorf* tersebut, larutan dianalisis menggunakan HPLC dengan sistem kolom fase balik C18 (250 mm×4,6 mm), fase gerak eluen A 7,75% asetonitril dan TFA sedangkan eluen B Milli Q water dan TFA 0,1 % selama 20 menit, dengan laju alir 1 mL/menit dengan suhu 40°C dan dilihat pada panjang gelombang 210 nm dan 240 nm.

Spektrofotometer Massa

Sampel diambil 1 mg dan pada sampel ditambahkan 1 mL metanol dalam tabung *Eppendorf* tersebut kemudian larutan sampel diuji menggunakan spektrofotometer massa dengan diamati puncak dari fragmennya.

Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

DPPH sebanyak 0,0039 gram ditambahkan 18,75 mL metanol. Lalu pada sampel tetrapeptida ditambahkan 3 pipet metanol, setelah itu larutan disonikasi sampai larut. Lalu sampel tetrapeptida dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL yang ditambahkan metanol sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen. Selanjutnya, sebanyak 1,5 mL larutan sampel dimasukkan ke tabung *ependorf*. Kemudian larutan disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 1000 rpm pada suhu 4°C. Larutan blanko dibuat dengan menggunakan metanol 800 µL lalu ditambahkan 200 µL DPPH kedalam tabung reaksi lalu ditunggu selama 30 menit sebelum diukur serapannya pada spektrofotometer dengan λ 517 nm.

Sampel tetrapeptida diencerkan pada 8000 ppm dengan beberapa macam konsentrasi yang berbeda (0,1700, 3400, 5100,6800 dan 8500 ppm). Sebanyak 1 mL sampel (sudah termasuk 200 µL DPPH di selanjutnya ditambahkan metanol, dan larutan didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit di ruangan terhindar cahaya dan diamati perubahan warna yang terjadi. Absorbansi campuran diukur pada panjang gelombang 517 nm. Blanko (pelarut) disiapkan dengan perlakuan yang sama, kemudian dihitung nilai % inhibisi DPPH.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Senyawa tetrapeptida TKPS telah berhasil disintesis menggunakan metode sintesis fase padat menggunakan resin 2-klorotritil klorida dengan strategi Fmoc dan reagen kopleng HBTU/HOBt. Pada sintesis senyawa tetrapeptida TKPS, asam amino pertama yang diikatkan pada resin adalah asam amino serin. Asam amino serin mempunyai gugus samping OH yang dilindungi oleh gugus pelindung *t*-Bu serta gugus amino pada N-terminal yang dilindungi oleh gugus pelindung sementara Fmoc. Perpanjangan rantai peptida dilakukan dari arah C-terminal menuju N-terminal.

Pengkondisian dengan menggunakan pelarut DCM bertujuan untuk menyesuaikan suasana pada tabung SPPS pada saat proses sintesis tetrapeptida, sehingga dapat menghasilkan proses yang optimum dan stabil. Pencucian dilakukan untuk mengurangi senyawa lain yang akan dapat mengganggu proses reaksi. Sebelum proses sintesis tetrapeptida ini dimulai, resin 2-klorotritil klorida dihitung dengan perbandingan terhadap asam amino pertama dengan DIPEA maka resin ditimbang 0,3 gram kemudian dimasukkan ke dalam tabung SPPS dan ditambahkan pelarut DCM. Proses ini dilakukan untuk mengembangkan resin agar gugus pada resin dapat

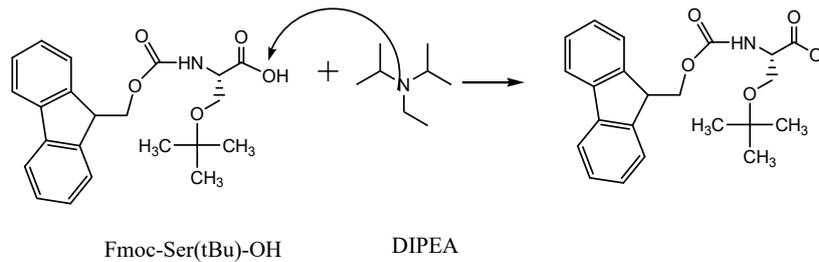
meruah sehingga sisi aktif pada resin dapat lebih terbuka dan dapat mengoptimalkan pengikatan sisi aktif antara resin dengan asam amino yang akan direaksikan pada tahapan selanjutnya.

Pengikatan asam amino serin pada resin 2-klorotritil klorida diawali dengan cara melarutkan Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH dengan DCM dan DIPEA. Penggunaan DIPEA berfungsi sebagai basa organik dan juga sebagai reagen pada proses pengikatan asam amino dengan resin. Selanjutnya tabung reaktor dimasukan ke dalam *rotary suspension mixer* untuk dilakukan pengocokan selama 4 jam. Pengocokan dilakukan untuk mempercepat terjadinya pendistribusian molekul sehingga dapat memperbesar luas permukaan kontak antar molekul asam amino dengan reagen. Selanjutnya uji kloranil dilakukan dengan penambahan larutan asetaldehida dan larutan kloranil pada beberapa butir resin kering kemudian dikocok. Tidak terjadinya perubahan warna dapat diartikan tidak adanya gugus NH/NH₂ bebas pada resin.

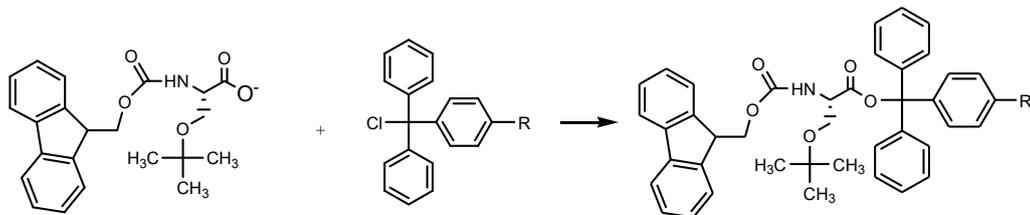
Reaksi pengikatan asam amino pertama Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH ke resin 2-klorotritil klorida tidak melibatkan aktivasi gugus karboksil sehingga dapat mencegah terjadinya reaksi rasemisasi yang tidak diinginkan. Proses awal reaksi yang terjadi yaitu reaksi asam basa antara asam amino dan basa DIPEA, dimana hidrogen pada gugus karboksil pada Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH diambil oleh basa DIPEA membentuk nukleofil karboksilat. Kemudian nukleofil yang terbentuk menyerang dan menggantikan atom klorida pada atom karbon kuartener yang terdapat pada resin 2-klorotritil klorida, kemudian mensubstitusikan atom klorida dan membentuk ikatan dengan resin melalui reaksi substitusi nukleofilik unimolekuler (SN1) sehingga membentuk Fmoc-Ser(*t*-Bu)-resin (Maharani, *et al.*, 2016:5-6).

Pada Gambar 1 dan Gambar 2 menunjukkan tahapan reaksi yang terjadi pada proses pengikatan asam amino pertama pada resin. Berdasarkan reaksi yang terjadi, tahapan reaksi yang pertama pada Gambar 1 yaitu melalui reaksi asam basa antara Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH dengan DIPEA yang bersifat basa sebagai reagen yang membentuk ion karboksil. Ion karboksil kemudian menyerang ion klorida pada atom karbon kuartener resin 2-klorotritil klorida. Dengan demikian, asam amino pertama Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH terikat pada resin. Atom klorida dengan tanda merupakan gugus pergi yang sangat baik, karena dipengaruhi oleh tiga gugus benzena yang dapat menstabilkan intermediet ditunjukkan pada Gambar 2. Atom klorida dapat disingkirkan oleh nukleofil lemah karboksil sekalipun (Maharani, *et al.*, 2016:5-6).

Reaksi pengikatan antara asam amino Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH dengan resin dilakukan selama 4 jam untuk mengoptimalkan suatu reaksi dan tidak dilakukan lebih dari 4 jam dikarenakan agar tidak terlalu banyak asam amino yang terikat pada resin



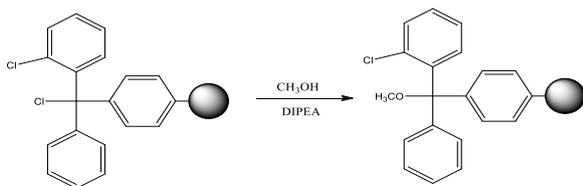
Gambar 1. Reaksi Fmoc-Ser(tBu)-OH dengan DIPEA



Gambar 2. Reaksi Fmoc-Ser(tBu)-OH dengan resin

sehingga akan mengganggu saat perpanjangan rantai peptida yang akan mempersulit asam amino yang bergugus pelindung menjangkau gugus α -amino bebas (Maharani, *et al.*, 2016).

Setelah dilakukan pengikatan asam amino pertama pada resin, perlu dilakukan *capping resin*. Tujuan dilakukannya *capping resin* adalah untuk menutup sisi aktif resin 2-klorotriptyl klorida sehingga asam amino selanjutnya tidak berikatan dengan sisi aktif resin yang tidak berikatan dengan asam amino pertama (Gambar 3). *Capping resin* dilakukan dengan cara menambahkan campuran diklorometana:metanol:DIPEA dengan perbandingan 80:15:5 pada resin.



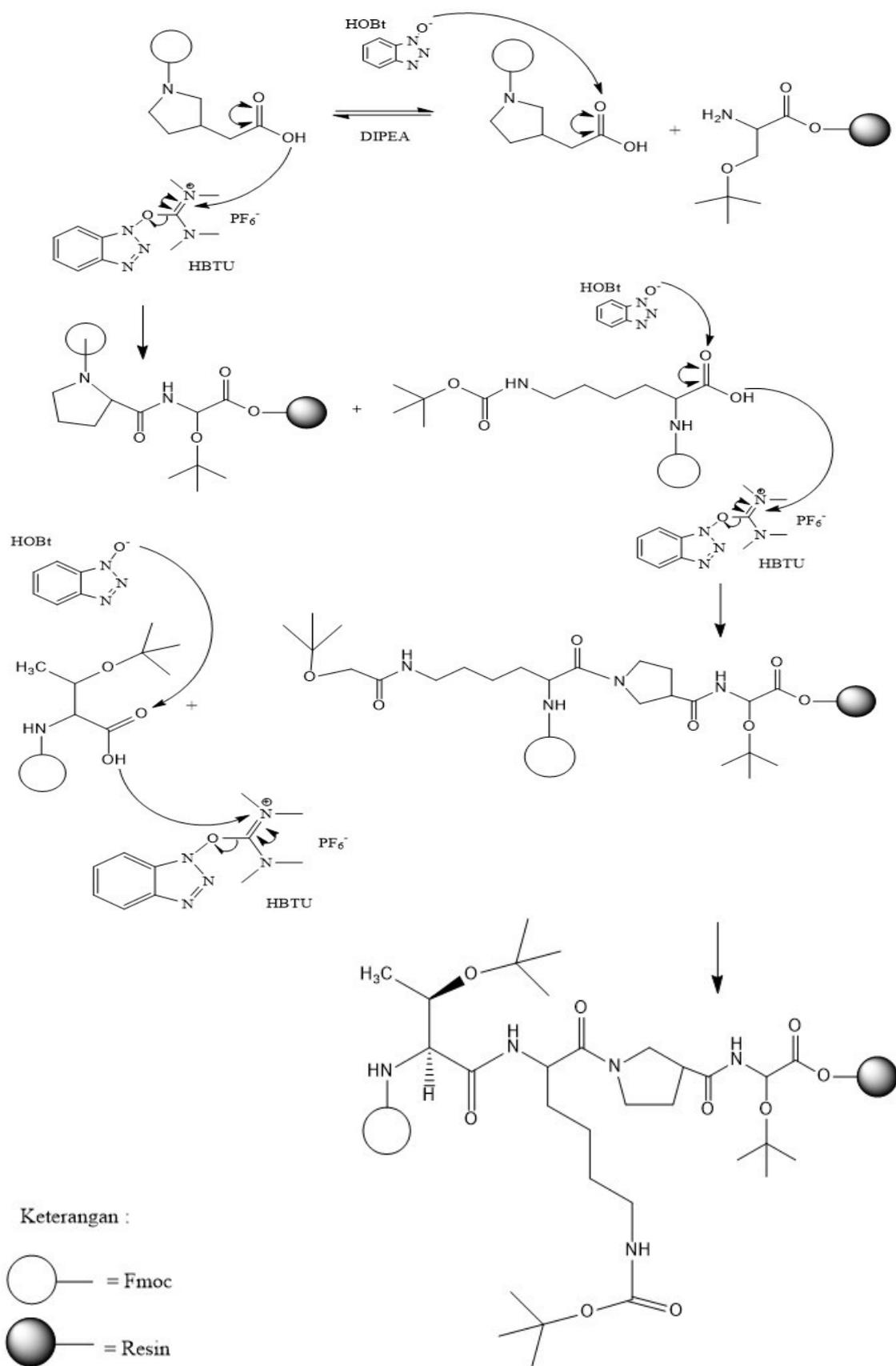
Gambar 3. Reaksi *capping resin* menggunakan metanol dan DIPEA (Chan & White, 2000).

Setelah dilakukan *capping resin*, dilakukan pelepasan gugus pelindung sementara (deproteksi). Pelepasan gugus pelindung Fmoc bertujuan untuk membebaskan sisi aktif asam amino pertama sehingga dapat berinteraksi dengan asam amino selanjutnya melalui reaksi kopling (Gambar 4). Gugus pelindung Fmoc merupakan gugus pelindung yang labil terhadap basa, sehingga pada saat deproteksi digunakan larutan basa, dalam penelitian ini digunakan larutan DBU 10% dalam DMF. Pelepasan gugus pelindung Fmoc diawali dengan penyerangan atom hidrogen pada gugus fluorena yang terdapat pada Fmoc oleh piperidin sehingga

membentuk senyawa intermediet siklopentadiena (Chan & White, 2000). Keberhasilan deproteksi dapat dibuktikan melalui uji kloranil. Uji positif keberhasilan deproteksi ditandai dengan perubahan warna resin dari kuning menjadi hijau.

Setelah gugus amino bebas tersedia, dilakukan kopling dengan asam amino kedua. Penyusunan fragmen peptida linear dilakukan dengan cara menambahkan asam amino berikutnya pada resin. Asam amino akan membentuk ikatan peptida melalui ikatan kondensasi antara gugus amino dengan gugus karboksilat yang diaktivasi oleh reagen kopling. Sintesis peptida fase padat merupakan reaksi heterogen sehingga interaksi antar molekul pada fase padat dan fase larutan menjadi terbatas. Oleh karena itu, penambahan jumlah asam amino dilakukan 2 kali lipat dari seharusnya untuk meningkatkan konsentrasi dan laju reaksi. Pada umumnya asam amino yang ditambahkan sebanyak 2 ekuivalen dari nilai *loading resin*.

Kopling asam amino kedua, Fmoc-Pro-OH, dilakukan menggunakan kombinasi reagen kopling HBTU/HOBt (Gambar 4). Kopling asam amino kedua dilakukan dengan melarutkan 2 ekuivalen Fmoc-asam amino, 2 ekuivalen HBTU, 2 ekuivalen HOBt dan 8 ekuivalen basa DIPEA dalam pelarut DCM. Reagen kopling disonikasi selama 5 menit agar reagen larut sempurna serta dapat meningkatkan kinetika reaksi. Kopling asam amino kedua dilakukan selama 4 jam agar tidak terlalu banyak asam amino yang terikat pada resin sehingga akan mengganggu saat perpanjangan rantai peptida yang akan mempersulit asam amino yang bergugus pelindung menjangkau gugus α -amino bebas. Keberhasilan kopling asam amino kedua dibuktikan dengan uji kloranil yang ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna resin. Setelah



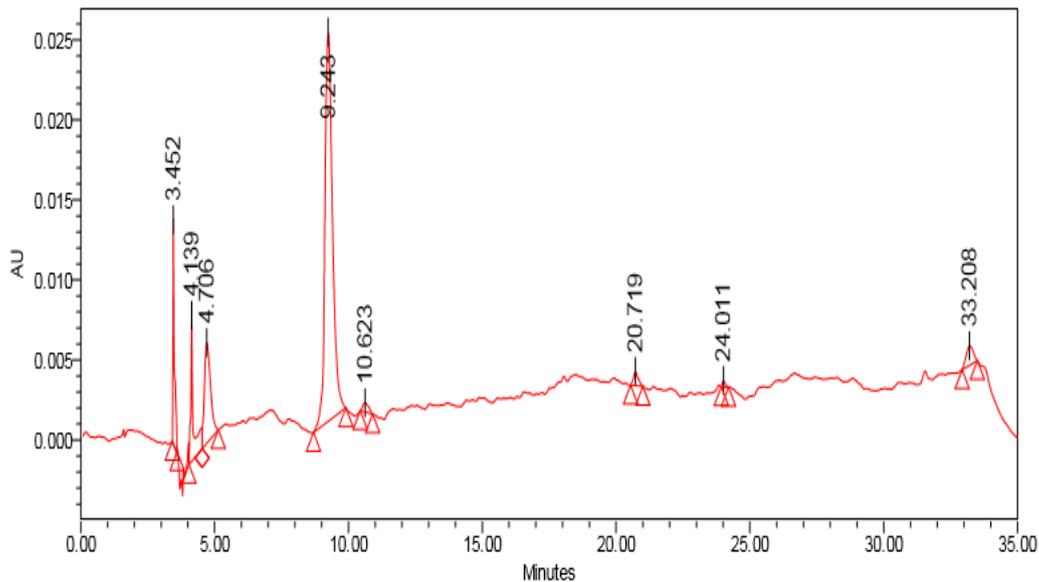
Gambar 4. Skema pengkoplingan asam amino

dilakukan kopling asam amino kedua dilakukan deproteksi gugus Fmoc menggunakan larutan basa DBU 10% dalam DMF selama 15 detik. Tahap selanjutnya adalah tahapan kopling asam amino ketiga dan keempat yang diawali dengan kopling asam amino ketiga dengan urutan kopling dan deproteksi Fmoc yang dilanjutkan dengan kopling asam amino keempat dengan tahapan yang sama hingga tetrapeptida tersusun pada resin.

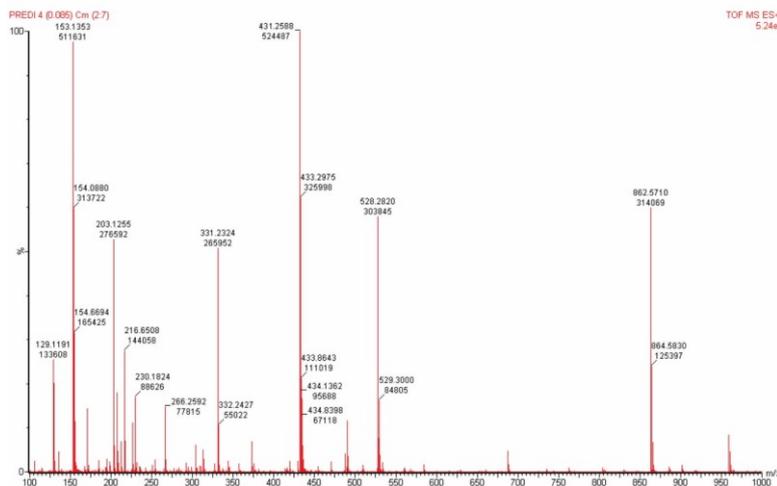
Setelah terbentuk tetrapeptida target (TKPS), dilakukan pelepasan peptida target dari resin. Pelepasan peptida target dari resin dilakukan menggunakan larutan asam TFA 95% dalam air. TFA 95% digunakan karena selain untuk melepaskan peptida target dari resin, konsentrasi yang tinggi dari reagen TFA juga dimaksudkan untuk melepaskan gugus pelindung rantai samping *t*-Bu. Air bertindak sebagai *scavenger* kation yang terbentuk selama reaksi pelepasan peptida terjadi. Filtrat merah

kecoklatan yang terbentuk setelah pelepasan peptida dari resin ditampung dalam vial lalu dipekatkan menggunakan rotary evaporator.

Filtrat peptida yang telah dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan menghasilkan selai kuning kecoklatan TKPS sebanyak 162,4 mg. Krud TKPS kemudian dianalisis kemurniannya menggunakan RP-HPLC analitik menggunakan kolom fase terbalik yang dielusi menggunakan eluen bergradien 7,75% asetonitril:air dengan buffer TFA 1% selama 20 menit, laju alir 1mL/menit menggunakan detektor PDA dengan deteksi panjang gelombang 210 nm dan 240 nm. Hasil analisis HPLC menunjukkan bahwa tetrapeptida yang disintesis belum murni, ditunjukkan dengan adanya beberapa puncak diduga masih ada gugus pelindung, sehingga perlu dilakukan deproteksi kembali. Setelah dilakukan pemurnian didapat tetrapeptida berupa selai berwarna kecoklatan sebanyak 111,4 mg.



Gambar 5. Hasil kromatogram RP-HPLC tetrapeptida linear TKPS pada λ 240 nm



Gambar 6. Spektrum massa TOF-HR-ESMS $[M+H]^+$ senyawa TKPS

Senyawa tetrapeptida target TKPS yang telah dimurnikan dianalisis kembali menggunakan RP-HPLC dan didapat 1 puncak pada waktu retensi 9,243 menit, dengan demikian dapat disimpulkan bahwa tetrapeptida TKPS hasil sintesis sudah murni (Gambar 5).

Selanjutnya dilakukan karakterisasi tetrapeptida TKPS dengan menggunakan spektrofotometer massa menunjukkan adanya ion puncak dari molekul TKPS pada m/z [M+H] 431,2588 dan m/z [2M+H] pada 862,5710 (Gambar 6).

Senyawa tetrapeptida TKPS yang telah dimurnikan dan dikarakterisasi kemudian diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH. Uji antioksidan dilakukan menggunakan skala mikro dengan variasi konsentrasi 0,1700, 3400, 5100, 6800 dan 8500 ppm.

Dari hasil uji aktivitas antioksidan terhadap tetrapeptida TKPS didapatkan nilai inhibisi sebesar 45% yang menunjukkan aktivitas antioksidan yang lemah.

KESIMPULAN

Senyawa tetrapeptida TKPS telah berhasil disintesis menggunakan metode SPPS dan telah dimurnikan menghasilkan produk TKPS sebanyak 111,7 mg. Hasil karakterisasi dengan HR-TOF-MS yang memberikan nilai m/z [M+H] 431,2588 dan m/z [2M+H] pada 862,5710 untuk TKPS. Senyawa tetrapeptida TKPS telah diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH dengan nilai inhibisi 45%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin mengucapkan terima kasih pada hibah LPPM Universitas Islam Bandung 2019 untuk pendanaan riset.

DAFTAR PUSTAKA

- Aschenbrenner, D.S. & Venable, S.J. (2009). *Drug Therapy in Nursing*. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Bruice, P.Y. (2007). *Organic Chemistry*. 5th ed. Pearson Prentice Hall. London.
- Chan, W.C.W.P.D. & White, P. eds., (1999). *Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach*. Oxford University Press. Oxford.
- Clayden, J., Greeves, N. & Warren, D. (2012) *Organic Chemistry*. 2nd ed. Oxford University Press. Oxford.
- Fosgerau, K., & Hoffmann, T. (2015). Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*. 20(1): 122-128.
- Góngora-Benítez, M., Tulla-Puche, J. & Albericio, F. (2013). Handles for Fmoc solid-phase synthesis of protected peptides. *ACS Combinatorial Science*. 15(5): 217-228.
- Hu, G. (2009) Peptide synthesis in pharmaceutical manufacturing. *BioProcessing Journal*. 8(3): 51-53.
- Irwansyah (2010). Studi Struktur Self-Asembly Peptida Ampifil. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia. Depok.
- Juniarti, Osmeli, D. & Yuhernita. (2009). Kandungan senyawa kimia, uji toksisitas (Brine Shrimp Lethality Test) dan antioksidan (1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazyl) dari ekstrak daun saga (*Abrus precatorius* L.). *Makara Sains*. 13(1): 50-54.
- Khopkar, S.M. (1990). *Konsep Dasar Kimia Analitik*. UI-Press. Jakarta.
- Kim, S. K., & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*. 2(1): 1-9.
- Kurniaty, N. (2012) Synthesis of Peptidomimetics Using Olefin Metathesis. Master Thesis. Monash University. Melbourne.
- Li, P., Roller, P. P. & Xu, J. (2002). Current synthetic approaches to peptide and peptidomimetic cyclization. *Current Organic Chemistry*. 6(5): 411-440.
- Maharani, R. & Yanti, E.F. (2016). Sintesis heptapeptida linear (H-Tyr-Asp-Pro-Ala-Pro-Pro-Pro-OH) dengan menggunakan Dic/Oksima sebagai reagen pengkopling. *Al-Kimia*. 4(1): 1-12.
- Maharani, R., Octavia, S.M., Zainuddin, A., Hidayat, A.T., Sumiarsa, D., Harneti, D., Nurlelasari, N. & Supratman, U. (2019). Sintesis tetrapeptida PSSY dengan metode fasa padat. *Chimica et Natura Acta*. 7(2): 69-75.
- Maharani, R., Sumiarsa, D., Marpaung, C., Zainuddin, A., Hidayat, A.T., Harneti, D., Nurlelasari, N. & Supratman, U. (2019). Sintesis tetrapeptida PADY menggunakan metode fasa padat dan aktivitas antioksidannya. *Jurnal Kimia Valensi*. 5(1): 87-96.
- Marlisa. (2010). Hubungan Obat-Obatan Terhadap Terjadinya Xerostomia. Skripsi. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Robinson, A.J., Elaridi, J., Van Lierop, B.J., Mujcinovic, S. & Jackson, W.R. (2007). Microwave-assisted RCM for the synthesis of carbocyclic peptides. *Journal of Peptide Science*. 13(4): 280-285.
- Sánchez, A. & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*. 1(1): 29-46.
- Sánchez-Moreno, C., 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*. 8(3): 121-137.
- Siebert, A., Gensicka-Kowalewska, M., Cholewinski, G. & Dzierzbicka, K. (2017). Tufts -

-
- Properties and Analogs. *Current Medicinal Chemistry*. **24(34)**: 3711–3727.
- Whitford, D. (2013). *Proteins: structure and function*. John Wiley & Sons. New York.
- Winarsi, H. (2007) *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius. Yogyakarta.
- Zou, T.B., He, T.P., Li, H.B., Tang, H.W. & Xia, E.Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*. **21(1)**: 72.
-