

Sintesis Tetrapeptida PSWY dan PSKY Fase Padat dan Evaluasi Aktivitas Antioksidannya

Rani Maharani^{1,2,*}, Siska Mulya Octavia¹, Achmad Zainuddin¹, Ace Tatang Hidayat^{1,2}, Dadan Sumiarsa¹, Desi Harneti¹, Nurlelasari¹, Unang Supratman^{1,2}

¹Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jln. Raya Bandung-Sumedang km. 21 Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat 45363

²Laboratorium Sentral, Universitas Padjadjaran, Jln. Raya Bandung-Sumedang km. 21 Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat 45363

*Penulis korespondensi: r.maharani@unpad.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v8.n3.32205>

Abstrak: Untuk mempelajari hubungan struktur dan aktivitas dari senyawa antioksidan PAGY, dua analog dari PAGY, PSWY and PSKY, disintesis dan dievaluasi aktivitas antioksidannya. Sintesis dari kedua analog dilakukan dengan metode sintesis peptida fase padat, mengikuti protocol sintesis PAGY dan analog sebelumnya. Strategi Fmoc diterapkan dalam sintesis dan kombinasi reagen HATU/HOAt digunakan dalam pembentukan ikatan peptida. PSWY dan PSKY diperoleh dengan rendemen berturut-turut 21,8% dan 98,9%. Kedua peptida dimurnikan dengan RP-HPLC preparatif. Peptida hasil pemurnian dianalisis kemurniannya dengan RP-HPLC dan dikarakterisasi dengan HR-TOFMS, ¹H- and ¹³C-NMR. Selanjutnya, kedua peptida diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH yang menunjukkan bahwa kedua peptida memiliki aktivitas penghambatan yang rendah dibandingkan dengan PAGY dan analog PSGY. Nilai IC₅₀ untuk PSWY dan PSKY berturut-turut 3,079 dan 4,340 mg/mL. Penggantian glisin pada PSGY dengan triftofan (PSWY) dan lisin (PSKY) tidak dapat meningkatkan aktivitas antioksidannya. Meskipun terdapat fakta dari penelitian sebelumnya bahwa penggantian glisin pada PAGY dengan lisin (PAKY) dapat meningkatkan aktivitas antioksidannya, namun hal yang sama yang diterapkan pada PSGY tidak memberikan hasil yang serupa. Sepertinya, komposisi residu pada PSKY yang lebih polar dibandingkan dengan PAKY menjadi penyebab aktivitas antioksidan yang lebih rendah.

Kata kunci: peptida antioksidan, tetrapeptida antioksidan, PAGY, sintesis peptida fase padat

Abstract: In regards to relate structure and activity of antioxidant PAGY and its analogues, two tetrapeptide analogues of antioxidant PAGY, PSWY and PSKY, were synthesized and evaluated for their antioxidant properties. The synthesis of two analogues were undertaken by solid-phase peptide synthesis, following a previous protocol of the reported synthesis of PAGY and other analogues. Fmoc strategy was applied and a combination of HATU/HOAt was used to facilitate all amide bond formations. PSWY and PSKY were obtained in 21.8% and 98.9% yields, respectively. The peptides were analysed and purified using RP-HPLC. All purified peptides were characterised using HR-TOFMS, ¹H- and ¹³C-NMR. The two peptides were evaluated on DPPH assay showing lower inhibition properties on DPPH compared to PAGY and also PSGY. IC₅₀ values for PSWY and PSKY on DPPH assay were calculated at subsequent 3.079 and 4.340 mg/mL. The replacement of glycine of PSGY with tryptophan (PSWY) and lysine (PSKY) could not enhance the antioxidant activity any further. Though there was a fact that the replacement of glycine of PAGY with lysine (PAKY) could increase the activity significantly, its similar replacemet on PSGY did not give similar enhancement it the antioxidant activity. It seems that composition of PSKY that is much more polar than PAKY was not the best composition for the antioxidant properties.

Keywords: antioxidant peptides, antioxidant tetrapeptides, PAGY, solid-phase peptide synthesis

PENDAHULUAN

Peptida antioksidan telah berkontribusi dalam meningkatkan kesehatan manusia melalui pencegahan dan pengobatan terhadap penyakit kronis seperti penyakit kardiovaskular, kanker, atau

diabetes. Peptida dengan aktivitas antioksidan memiliki kemampuan pengkelat ion logam (Fe²⁺ atau Cu²⁺) dan menghambat peroksidasi lipid pada makanan. Bilamana peptida antioksidan ini terdegradasi dalam tubuh, produk yang dihasilkan

merupakan asam amino (Uhlig et al., 2014), sehingga penggunaan peptida antioksidan tidak memberikan efek samping yang berbahaya terhadap tubuh manusia, sehingga aman untuk digunakan (Zou et al., 2016). Peptida antioksidan dapat digunakan sebagai makanan fungsional ataupun sebagai obat herbal untuk mencegah penyakit yang bersifat degeneratif (Samaranayaka & Li-Chan, 2011). Selain itu, sudah banyak dilaporkan penggunaan peptida antioksidan sebagai bahan kosmetik (Doucet et al., 2012; Zhang & Zeng, 2015).

Salah satu peptida antioksidan dari produk perairan adalah senyawa tetrapeptida dengan urutan asam amino Pro-Ala-Gly-Tyr (PAGY) (Gambar 1) yang diperoleh dari hidrolisat gelatin kulit ikan amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) oleh Nikoo et al. (2014). Senyawa PAGY beserta analognya yakni, PSGY, PAFY, PFFY, PAIY, PAKY, PACY, dan PADY telah berhasil disintesis dan telah dilaporkan sebelumnya (Sumiarsa et al., 2019; Maharani et al., 2019). Studi hubungan struktur dan aktivitas (SAR) biologi telah menunjukkan bahwa kehadiran lisin (PAKY), serin (PSGY), fenilalanin (PAFY and PFFY), sistein (PACY) and isoleusin (PAIY) dapat meningkatkan sifat antioksidan pada peptida setelah dibandingkan terhadap senyawa induknya yaitu PAGY. Kehadiran asam aspartat (PADY) diketahui telah menurunkan aktivitas antioksidan pada pengujian DPPH.

Studi SAR dilanjutkan untuk mengamati generasi kedua dari senyawa PAGY. Laporan sebelumnya menunjukkan bahwa PSGY merupakan analog yang paling aktif dibandingkan terhadap aktivitas PAGY. Pada PSGY, residu asam amino prolin dan tirosin tidak digantikan karena menurut Zou et al. (2016), kedua asam amino ini berkontribusi dalam aktivitas antioksidan senyawa peptida. Asam amino glisin pada PSGY dirancang untuk digantikan oleh triftopan (PSWY) dan oleh lisin (PSKY).

PSWY dan PSKY disintesis dengan metode sintesis peptida fase padat. Sintesis peptida fase padat (SPPS) lebih dipilih dibandingkan dengan sintesis peptida fase larutan. Sintesis peptida fase larutan membutuhkan waktu yang lebih lama dan pemurnian pada setiap tahap sintesis akan dibutuhkan, sehingga dapat mempengaruhi rendemen produk akhir (Maharani et al., 2015). Kekurangan dalam sintesis peptida fase larutan ini dapat diatasi dengan metode SPPS yang memiliki kelebihan, yaitu cepat dan mudah dalam pengerjaannya (Merrifield, 1963). Namun, metode SPPS tidak berarti tanpa masalah, metode ini membutuhkan pemilihan reagen kopling yang tepat untuk membentuk ikatan amida pada peptida secara sempurna pada resin (Maharani, 2013). Reagen kopling yang digunakan dalam penelitian ini adalah kombinasi antara HBTU dan HOBt, yaitu reagen kopling yang termasuk dalam golongan garam uronium/aminium. Senyawa O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronium heksafluorofosfat (HBTU) merupakan reagen kopling

yang telah menunjukkan performa kopling yang sangat baik, sedangkan senyawa 1-hidroksibenzotriazol (HOBt) diketahui dapat meningkatkan rendemen dan mengurangi terjadinya epimerisasi (Valeur & Bradley, 2009). Strategi SPPS yang digunakan adalah strategi Fmoc/t-Bu yang berdasarkan penggunaan gugus pelindung Fmoc pada gugus amino yang labil dalam basa, dan strategi perlindungan gugus pelindung t-Bu pada rantai samping yang labil dalam asam (Chan & White, 2000). Selain itu, resin yang akan digunakan dalam SPPS ini adalah resin 2-klorotritilklorida yang juga labil dalam asam (García-Martín et al., 2007). Oleh karena itu, selama proses deproteksi gugus Fmoc, gugus pelindung rantai samping dan rantai peptida pada resin tidak akan terganggu.

Krud peptida kemudian dimurnikan menggunakan RP-HPLC preparatif, dikarakterisasi menggunakan spektrometer massa dan NMR serta diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH. Sintesis senyawa tetrapeptida PSWY dan PSKY belum pernah dilaporkan sebelumnya. 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 resin 2-klorotritilklorida, diklorometana (DCM), dimetilformamida (DMF), HATU, HOAt, DIPEA, DPPH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH, Fmoc-Ser(t-Bu)-OH, TFA, metanol, piperidin, asam asetat, asetonitril, asetaldehida, *p*-kloranil, dan plat kromatografi lapis tipis.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah tabung sintesis peptida fase padat (tabung SPPS), *freeze dryer*, *rotary evaporator*, *magnetic stirrer*, *rotary suspension mixer*, *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) merk Waters 1500-Series, detektor Photo Diode Array (PDA), spektrometer massa Waters TQ Detector dengan sistem Electron Spray (ES), spektrofotometer UV-Vis merk Perkin Elmer, dan alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

Prosedur Sintesis

Prosedur penelitian didasarkan pada prosedur total sintesis senyawa siklopepsi-peptida [2S,3S-Hmp]-aureobasidin L (Maharani et al., 2014).

Pengikatan asam amino ujung C.

Sebanyak 0,4 g resin 2-klorotritilklorida ditambahkan dengan 5 mL diklorometana, kemudian dikocok selama 5 menit dan disaring. Larutan Fmoc-AA1*-OH (0,56 mmol), diklorometana (5 mL) dan

DIPEA (2,22 mmol) ditambahkan ke dalam resin dan dikocok pada suhu ruang. Resin disaring, kemudian dicuci dengan DMF dan diklorometana. Untuk menghitung loading resin, beberapa butir resin ditimbang kemudian dimasukkan dalam tabung eppendorf, lalu ditambahkan 0,3 mL piperidin 20% dan didiamkan selama satu jam. Selanjutnya, 2700 µL 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 pada resin yang kemudian dikocok selama 10 menit dan prosedur ini dilakukan dua kali. Resin disaring dan dicuci dengan DMF dan diklorometana. Resin dikeringkan selama 5 menit sehingga didapatkan Fmoc-AA1-resin yang sudah kering.

Pelepasan gugus pelindung Fmoc menggunakan 20% piperidin dalam DMF dan dikocok selama 30 menit. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DMF dan diklorometana. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc dilakukan dengan menggunakan uji kloranil.

Kopling asam amino kedua (Fmoc-AA2*-OH).

Pada tabung reaksi disiapkan Fmoc-AA2-OH (2 ek.) yang ditambahkan dengan HATU (2 ek.) dan HOAt (2 ek.), kemudian dilarutkan dalam 4 mL diklorometana:DMF (1:1) yang sebelumnya telah ditambahkan DIPEA (8 ek.). Larutan kuning ditambahkan ke dalam peptida resin (resin-AA1-NH₂) kering dan dikocok selama 4 jam. Resin disaring dan dicuci dengan DMF dan diklorometana. Kontrol kopling asam amino kedua dilakukan dengan menggunakan uji kloranil. Gugus pelindung Fmoc dilepaskan dengan menggunakan 20% piperidin dalam DMF selama 30 menit. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DMF dan diklorometana. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc pada asam amino kedua dilakukan dengan uji kloranil.

Kopling asam amino ketiga (Fmoc-AA3*-OH)

Pada tabung reaksi disiapkan Fmoc-AA3-OH (2 ek.) yang ditambahkan dengan HATU (2 ek.) dan HOAt (2 ek.), kemudian dilarutkan dalam 4 mL diklorometana:DMF (1:1) yang sebelumnya telah ditambahkan DIPEA (8 ek.). Larutan kuning ditambahkan ke dalam peptida resin (resin-AA1-AA2-NH₂) kering dan dikocok selama 4 jam. Resin disaring dan dicuci dengan DMF dan diklorometana. Kontrol kopling asam amino ketiga dilakukan dengan menggunakan uji kloranil. Gugus pelindung Fmoc

dilepaskan dengan menggunakan 20% piperidin dalam DMF selama 30 menit. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DMF dan diklorometana.

Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc pada asam amino ketiga dilakukan dengan uji kloranil.

Kopling asam amino keempat (Fmoc-AA4*-OH)

Pada tabung reaksi disiapkan Fmoc-AA4-OH (2 ek.) yang ditambahkan dengan HATU (2 ek.) dan HOAt (2 ek.), kemudian dilarutkan dalam 4 mL diklorometana:DMF (1:1) yang sebelumnya telah ditambahkan DIPEA (8 ek.). Larutan kuning ditambahkan ke dalam peptida resin (resin-AA1-AA2-AA3-AA4-NH₂) kering dan dikocok selama 4 jam. Resin disaring dan dicuci dengan DMF dan diklorometana. Kontrol kopling asam amino keempat dilakukan dengan menggunakan uji kloranil. Gugus pelindung Fmoc dilepaskan dengan menggunakan 20% piperidin dalam DMF selama 30 menit. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DMF dan diklorometana. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc pada asam amino keempat dilakukan dengan uji kloranil.

Pelepasan peptida dari resin

Resin peptida (resin-AA1-AA2-AA3-AA4-NH₂) seperti disajikan pada Tabel 1 ditempatkan dalam tabung peptida, kemudian 10 mL larutan 95% TFA dalam air dan ditambahkan dan campuran reaksi dikocok selama 10 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 × 5 mL) TFA (95%). Filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Selanjutnya padatan tetrapeptida dikeringkan dengan freeze dryer, diuji kemurniannya dengan RP-HPLC analitik, dimurnikan dengan RP-MPLC semi preparatif, dan hasil pemurnian diuji kemurniannya kembali dengan RP-HPLC analitik, kemudian peptida yang sudah murni dikarakterisasi menggunakan ESI-MS.

Uji kloranil

Larutan stok disimpan dalam lemari es selama maksimal satu bulan.

Larutan 1: 2% asetaldehida dalam DMF

Larutan 2: 2% p-kloranil dalam DMF

Beberapa butir resin ditempatkan dalam tabung reaksi kecil dan 2-5 tetes larutan 1 dan larutan 2 ditambahkan. Campuran dicampur untuk waktu yang singkat dan dibiarkan pada suhu kamar selama 5 menit dan warna butiran resin diamati.

Tabel 1. Susunan peptida yang disintesis pada penelitian ini

Senyawa	AA1	AA2	AA3	AA4
PSWY	Fmoc-Tyr(<i>t</i> -Bu)	Fmoc-Trp(Boc)-OH	Fmoc-Ser(<i>t</i> -Bu)	Fmoc-Pro
PSKY	Fmoc-Tyr(<i>t</i> -Bu)	Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fmoc-Ser(<i>t</i> -Bu)	Fmoc-Pro

Kromatografi lapis tipis

Beberapa butir dari resin ditempatkan dalam tabung reaksi kecil dan 5 tetes TFA:diklorometana (2:8) ditambahkan. Campuran dikocok selama 5 menit. Campuran reaksi ditotolkan pada plat lapis tipis dan dielusi dengan eluen dari kloroform/metanol/asam asetat (90:8:2). Plat kemudian diamati di bawah sinar UV.

Uji DPPH

Peptida murni dibuat menjadi konsentrasi 2000 ppm dalam metanol. Kemudian dibuat peptida dengan berbagai macam variasi konsentrasi sebanyak 1 mL (sudah termasuk 0,2 mL DPPH di dalamnya), kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit di ruangan terhindar cahaya. Absorbansi campuran diukur pada 517 nm. Blanko (pelarut) disiapkan dengan perlakuan yang sama. Kemudian dihitung nilai % inhibisi DPPH.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sintesis senyawa tetrapeptida PSWY dan PSKY telah berhasil dilakukan dengan metode sintesis peptida fase padat (SPPS). Sebelum dilakukan pengikatan asam amino ujung C pada resin, resin 2-klorotritil klorida diaktifkan dengan proses swelling terlebih dahulu dalam diklorometana, hal ini dilakukan agar sisi aktif pada resin yang tersembunyi dapat lebih terbuka untuk dapat memudahkan masuknya asam amino ke dalam resin (Bonskowski et al., 2013). Asam amino ujung C baik pada peptida PSWY dan PSKY adalah tirosin, dikarenakan tirosin mengandung gugus hidroksil pada rantai sampingnya, maka selain gugus amino yang dilindungi Fmoc, gugus hidroksil pada rantai samping tirosin pun dilindungi dengan tersier butil (t-Bu). Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH diikatkan pada resin 2-klorotritil klorida dengan penambahan DIPEA dalam diklorometana. Reaksi ini dilakukan selama 12 jam untuk sintesis PSWY dan PSKY. Setelah dilakukan *loading* resin, tahap selanjutnya adalah penentuan nilai *loading* resin menggunakan teknik spektrofotometri UV, nilai *loading* resin pada sintesis PSWY adalah 0,66 mmol/g resin dan pada PSKY adalah 0,8 mmol/g. Nilai *loading* resin ini dikatakan baik karena berada diantara nilai 0,2-1,2 mmol/g resin berdasarkan Chan and White (2020). Nilai ini akan digunakan untuk perhitungan jumlah asam amino kedua yang akan ditambahkan.

Tahap selanjutnya adalah *capping* resin. *Capping* resin dilakukan dengan penambahan campuran diklorometana/metanol/DIPEA (80:15:5) pada resin yang bertujuan untuk menutup sisi aktif dari resin yang tidak bereaksi dengan asam amino. Hal ini dilakukan agar asam amino selanjutnya bereaksi dengan sisi aktif asam amino pertama yang terikat pada resin bukan bereaksi dengan sisi aktif resin yang tidak berikatan dengan asam amino pertama. Sebelum mengikatkan asam amino kedua, pelepasan gugus pelindung Fmoc (deproteksi) dilakukan untuk

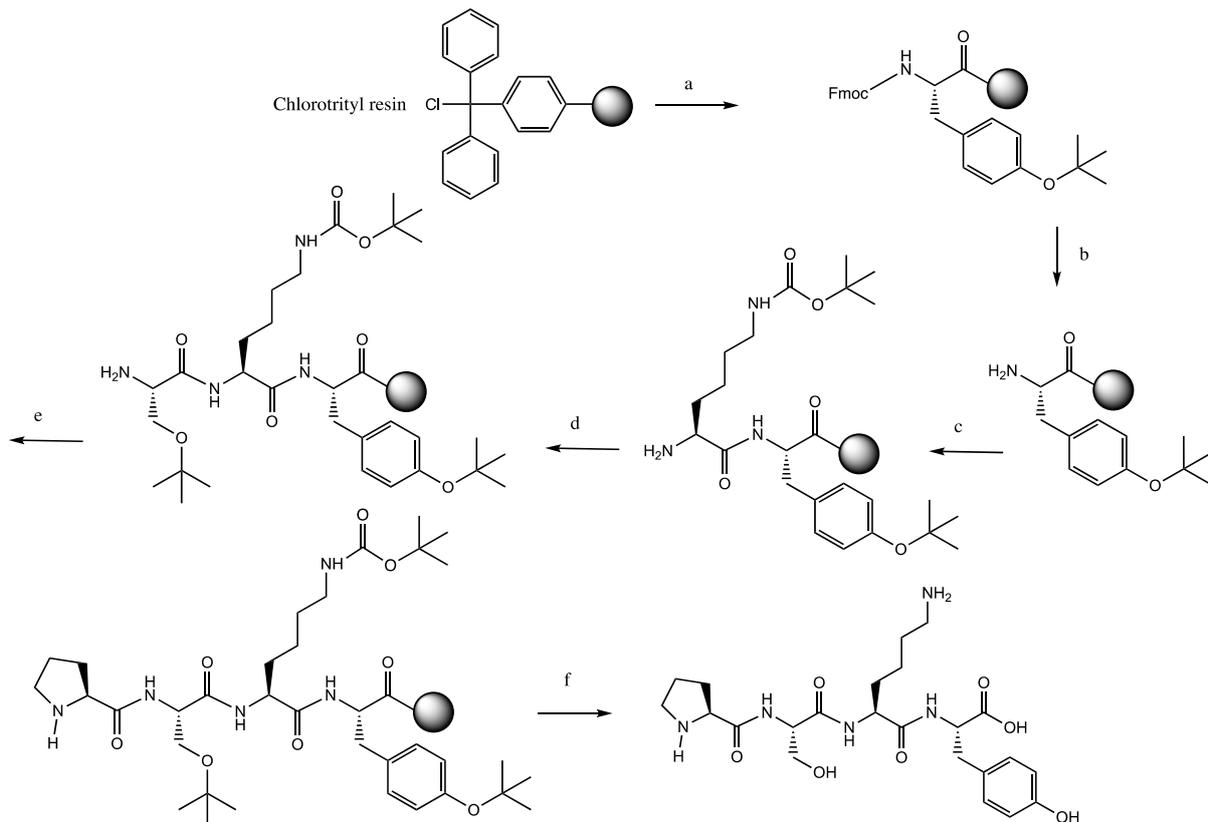
menyediakan sisi aktif asam amino pertama untuk bereaksi dengan asam amino kedua. Gugus pelindung Fmoc merupakan gugus pelindung yang stabil pada kondisi asam namun dapat dilepaskan pada kondisi basa. Deproteksi dilakukan dengan menambahkan larutan piperidin 20% dalam DMF selama 30 menit, penggunaan DMF sebagai pelarut sudah tepat karena DMF tidak bersifat terlalu volatil. Atom hidrogen pada cincin fluorena dalam gugus Fmoc diikat oleh piperidin membentuk gugus asam amino bebas dan senyawa intermediet tipe aromatik siklopentadiena (Chan & White, 2000). Senyawa ini dengan mudah terurai menjadi senyawa dibenzofulven dan karbondioksida. Gugus pelindung Fmoc memiliki elektron π yang terdelokalisasi antara dua cincin benzena. Delokalisasi elektron π ini menyebabkan gugus pelindung Fmoc berpendar di bawah sinar UV, sehingga keberhasilan tahap ini dapat dilihat dari tidak adanya noda pada plat kromatografi lapis tipis (KLT) di bawah sinar UV. Namun, hasil dari KLT setiap tahap deproteksi selalu menghasilkan noda pada plat KLT, hal ini dapat dikarenakan pada saat sintesis, asam amino pertama yang dimasukkan adalah tirosin yang memiliki gugus aromatik yang juga memiliki delokalisasi elektron π , sehingga noda pada KLT tidak dapat diidentifikasi berasal dari gugus Fmoc atau dari gugus aromatik pada asam amino tirosin. Oleh karena itu, uji kloranil dilakukan sebagai kontrol deproteksi Fmoc. Keberhasilan deproteksi dengan uji kloranil ditandai dengan berubahnya warna resin menjadi warna kemerahan untuk asam amino primer dan hijau untuk asam amino sekunder. Jumlah asam amino selanjutnya yang ditambahkan adalah sebanyak 2 ek. dari nilai *loading* resin, hal ini dikarenakan pada sintesis fase padat reaksi yang berjalan bersifat heterogen dan pergerakan molekul terbatas, sehingga jumlah asam amino yang ditambahkan sebanyak dua kali lipat agar meningkatkan konsentrasi dan dapat meningkatkan laju reaksinya dengan memperbesar frekuensi tumbukan antar molekul.

Penyusunan rantai peptida dilakukan dengan menggunakan reagen kopling. Untuk mengkoplingkan asam amino kedua, ketiga, dan keempat digunakan reagen pengkopling kombinasi antara HATU dan HOAt. Jumlah HATU dan HOAt. yang ditambahkan sebanding dengan jumlah asam amino, yaitu 2 ek, agar satu mol asam amino diaktivasi dengan satu mol HATU dan HOAt..

Pembuatan reagen kopling dilakukan dengan melarutkan Fmoc-asam amino (2 ek), HATU (2ek), HOAt (2ek), dan basa DIPEA (8 ek.) dalam pelarut diklorometana:DMF (1:1) sehingga membentuk larutan homogen yang berwarna kekuningan. Setelah larut, reagen kopling disonikasi selama 5 menit, hal ini bertujuan untuk meningkatkan kinetika reaksi dan diharapkan dapat meningkatkan rendemen hasil reaksi. Pada sintesis PSWY dan PSKY, kopling asam amino kedua, ketiga, dan keempat dilakukan selama 24 jam. Pada penggunaan reagen pengkopling

HATU/HOAt, reaksi aktivasinya diawali dengan pengikatan atom hidrogen asam pada gugus karboksil asam amino oleh basa DIPEA, sehingga terbentuk ion karboksil. Ion karboksil yang terbentuk bersifat nukleofil, sehingga dapat menyerang karbokation pada reagen kopling HATU, menghasilkan suatu senyawa garam karboksil uronium. Atom karbon pada gugus karbonil yang bermuatan parsial positif diserang oleh atom oksigen gugus benzotriazol pada reagen HOAt. Setelah itu, gugus uronium akan lepas sebagai gugus pergi, sehingga menghasilkan senyawa O-asil ester. Gugus amino pada asam amino dalam resin bertindak sebagai suatu nukleofil, yang kemudian menyerang karbon karbonil yang bermuatan parsial positif pada senyawa O-asil ester, kemudian gugus benzotriazol akan lepas sebagai gugus pergi dan akan membentuk suatu ikatan peptida. Reaksi yang sama terjadi pada kopling asam amino ketiga dan keempat. Setiap dilakukan kopling asam amino, dilanjutkan dengan tahap deproteksi gugus pelindung kembali menggunakan 20% piperidin dalam DMF selama 30 menit. Asam amino keempat atau yang terakhir adalah asam amino prolin, baik pada peptida PSWY dan PSKY. Kopling asam amino terakhir ini dilakukan selama

semalaman, karena menurut penelitian sebelumnya proses kopling asam amino prolin pada N terminal cukup sulit dilakukan. Deproteksi kembali dilakukan dengan menambahkan larutan piperidin dalam DMF 20% selama 30 menit. Keberhasilan kopling asam amino kedua, ketiga, dan keempat ditunjukkan dengan tidak berubahnya warna resin (kuning) pada uji kloranil. Hal ini disebabkan karena tidak adanya sisa-sisa gugus NH₂ bebas (hasil deproteksi Fmoc sebelumnya) yang bereaksi dengan kloranil. Pelepasan peptida linear dilakukan dengan mereaksikan peptida pada resin dengan TFA 95% dalam air selama 10 menit. Penggunaan TFA 95% dikarenakan terdapat gugus pelindung *t*-Bu dan Boc pada rantai samping asam amino tirosin, serin, triftopan dan lisin yang hanya dapat lepas dengan penggunaan TFA 95% dalam air. Air digunakan sebagai scavenger karbokation yang terbentuk setelah pelepasan peptida dari resin. Warna resin yang berubah menjadi kemerahan hingga kehitaman menandakan bahwa proses pelepasan peptida linear dari resin sedang berlangsung (Chan & White, 2000). Resin kemudian disaring dan filtratnya dipekatkan menggunakan rotary evaporator. Prosedur pelepasan



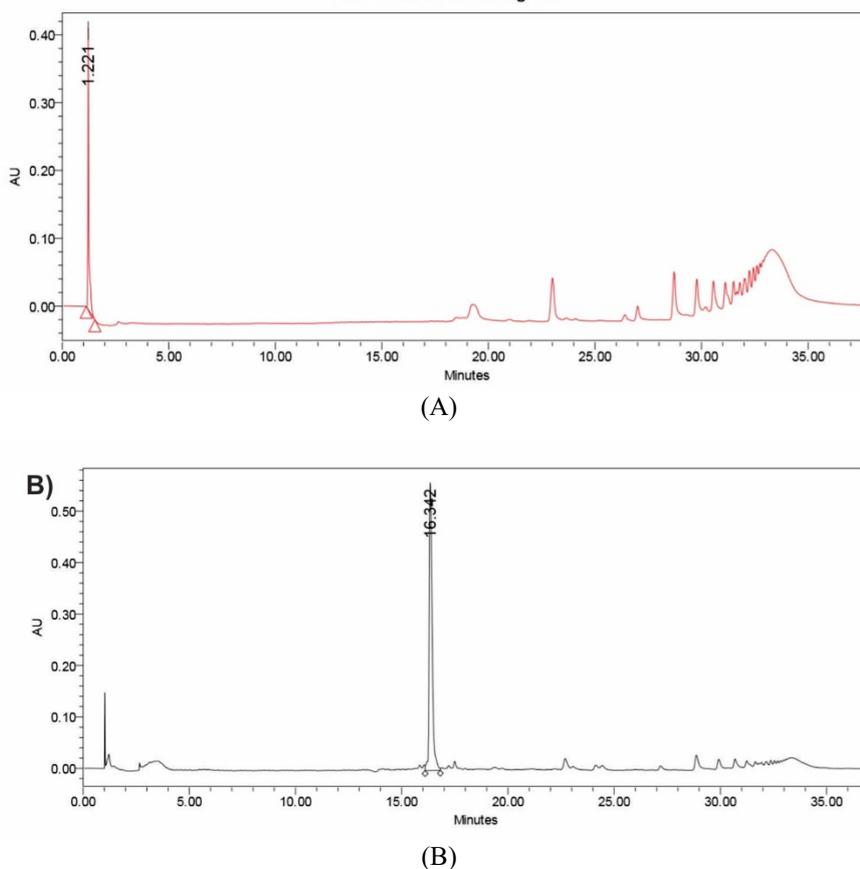
Gambar 1. Skema sintesis PSKY dengan metode fase padat. a. 1. Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH, DIPEA, diklorometana. b. 20% piperidina dalam DMF. 2. diklorometana:metanol:DIPEA, c. 1. Fmoc-Lys(Boc)-OH, HATU, HOAt, DIPEA, diklorometana:DMF. 2. 20% piperidina dalam DMF, d. 1. Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH, HATU, HOAt, DIPEA, diklorometana:DMF. 2. 20% piperidina dalam DMF, e. 1. Fmoc-Pro-OH, HATU, HOAt, DIPEA, diklorometana:DMF. 2. 20% piperidina dalam DMF, f. 95% TFA dalam air.

rantai peptida menggunakan TFA 95% dilakukan sebanyak tiga kali untuk memastikan bahwa seluruh senyawa peptida linear telah benar-benar terlepas dari resin. Reaksi yang terjadi pada saat pelepasan rantai peptida dari resin dimulai dari protonasi atom oksigen pada rantai peptida oleh TFA, sehingga menghasilkan oksigen terprotonasi yang kemudian dapat lepas sebagai gugus pergi menghasilkan rantai peptida dan juga karbokation dari resin dan tersier-butyl yang kemudian ditangkap oleh molekul air yang bertindak sebagai scavenger karbokation. Filtrat yang dihasilkan ditampung dan dipekatkan menggunakan rotary evaporator menghasilkan krud produk PSWY dan PSKY. Skema sintesis PSWY dapat dilihat pada Gambar 1. Skema sintesis PSKY serupa dengan skema sintesis PSWY, yang membedakannya adalah asam amino kedua yang ditambahkan. Pada PSWY, asam amino kedua adalah Fmoc-Trp(Boc)-OH, sedangkan asam amino kedua pada PSKY adalah Fmoc-Lys(Boc)-OH.

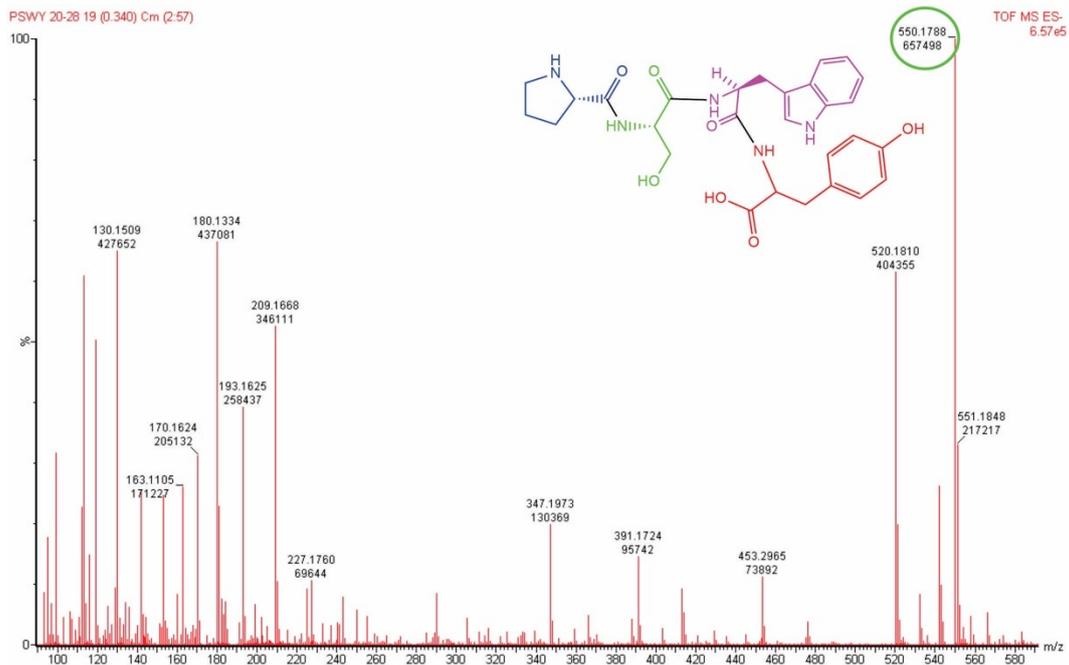
Krud PKWY (580 mg) dan PSKY (170 mg) kemudian dianalisis kemurniannya menggunakan RP-HPLC (*Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*) analitik menggunakan kolom fase terbalik yang dielusi menggunakan eluen bergradien asetonitril:air (10:90-100:0) dengan buffer TFA 1% selama 30 menit, laju alir 1 mL/menit menggunakan

detektor PDA dengan deteksi panjang gelombang 254 nm. Panjang gelombang yang digunakan merupakan panjang gelombang yang umum digunakan untuk analisis peptida yaitu 210, 220 dan 254 nm. Hasil analisis HPLC menunjukkan bahwa PSWY perlu dimurnikan dan PSKY telah murni. PSWY dimurnikan menggunakan RP-MPLC (*Reverse Phase Medium Pressure Liquid Chromatography*) semi preparatif dengan kolom Sepacore 4 g, yang dielusi menggunakan eluen bergradien asetonitril:air (10:90-100:0) selama 1 jam dengan laju alir 3 mL/menit. Peptida hasil pemisahan ditampung berdasarkan serapan UV, dengan panjang gelombang yang digunakan adalah 254 nm. Setelah dimurnikan, hasil dari pemurnian dari RP-HPLC dan RP-MPLC dikeringkan menggunakan freeze dryer dan dianalisis kembali dengan RP-HPLC analitik. Kromatogram analisis RP-HPLC analitik untuk PSWY dan PSKY dapat dilihat pada Gambar 2.

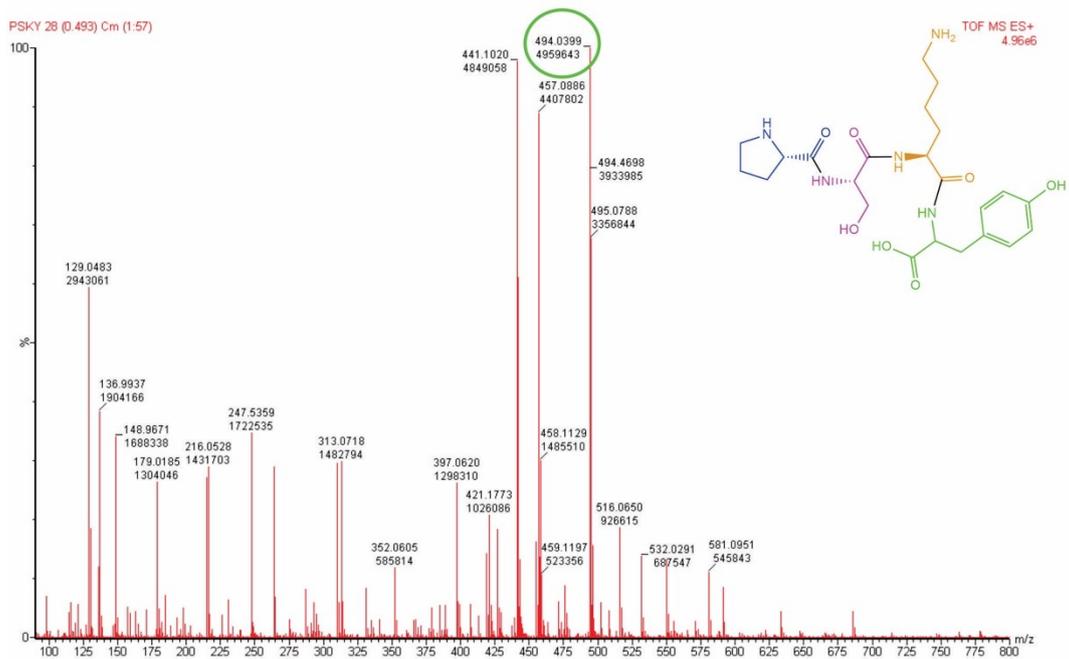
PSWY dan PSKY hasil pemurnian kemudian dikarakterisasi menggunakan TOF-HR-ESMS. Hasil karakterisasi menggunakan spektroskopi massa menunjukkan adanya puncak ion molekul PSWY pada m/z [M-H] 550,1788 dan puncak ion molekul PSKY pada m/z [M+H] 494,0399 (Gambar 3 dan Gambar 4).



Gambar 2. Kromatogram RP-HPLC analitik untuk PSKY dan PSWY dilarutkan dalam ACN:Air (1:4) dengan elusi menggunakan asetonitril:air (0:100-100:0) selama 35 menit dengan laju alir 1 mL/menit.



Gambar 3. Spektrum massa TOF-HR-ESMS [M+H] senyawa PSWY.



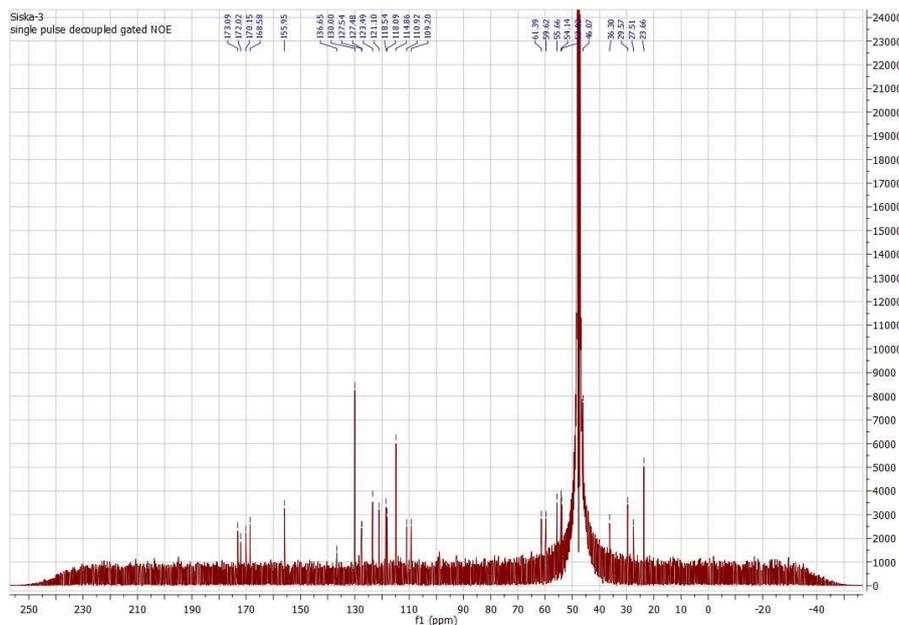
Gambar 4. Spektrum massa TOF-HR-ESMS [M+H] senyawa PSKY.

Tetrapeptida PSWY dan PSKY yang telah murni dikarakterisasi menggunakan $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ dengan frekuensi 600 MHz menggunakan pelarut metanol- d_4 . Karakterisasi peptida target menggunakan NMR dilakukan untuk mengetahui jumlah dan jenis atom karbon dan hidrogen pada peptida target.

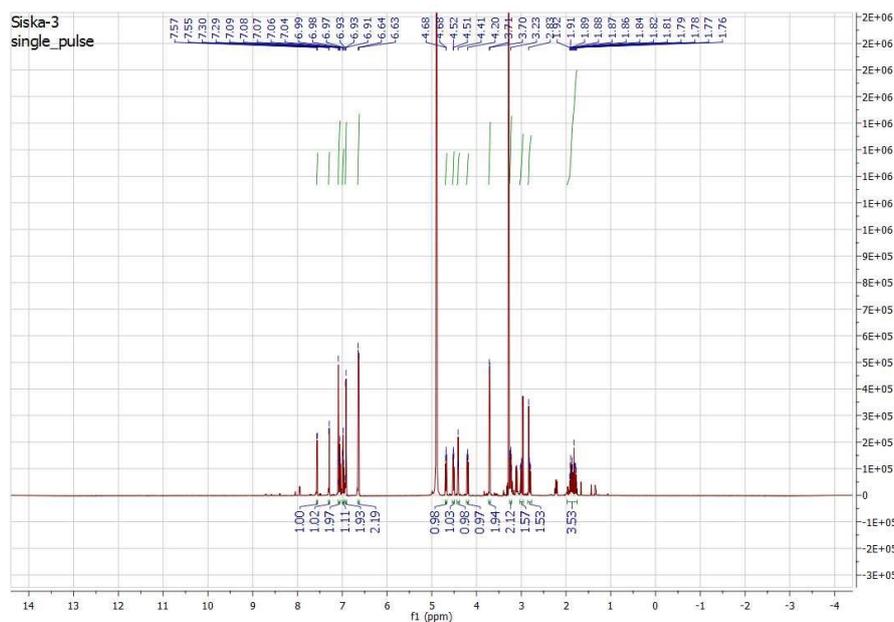
Hasil karakterisasi $^{13}\text{C-NMR}$ dan DEPT dari senyawa tetrapeptida PSWY (Gambar 5)

menunjukkan terdapat 28 karbon. Hasil $^{13}\text{C-NMR}$ juga menunjukkan beberapa geseran khas senyawa peptida yaitu $-\text{COOH}$ ($\delta\text{C} = 173,09$ ppm), tiga atom C=O amida ($\delta\text{C} = 172,02; 170,15; 168,58$ ppm), empat CH sp^3 ($53,91; 54,14; 55,66; 61,39$ ppm) serta geseran khas rantai samping asam amino.

Hasil $^1\text{H-NMR}$ PSWY (Gambar 6) (600MHz) menunjukkan 15 sinyal proton. Proton yang terdapat pada gugus $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, dan $-\text{NH}$ tidak terdeteksi,



Gambar 5. Spektrum ^{13}C -NMR (600 MHz) senyawa tetrapeptida PSWY.



Gambar 6. Spektrum ^1H -NMR (600 MHz) senyawa tetrapeptida PSWY.

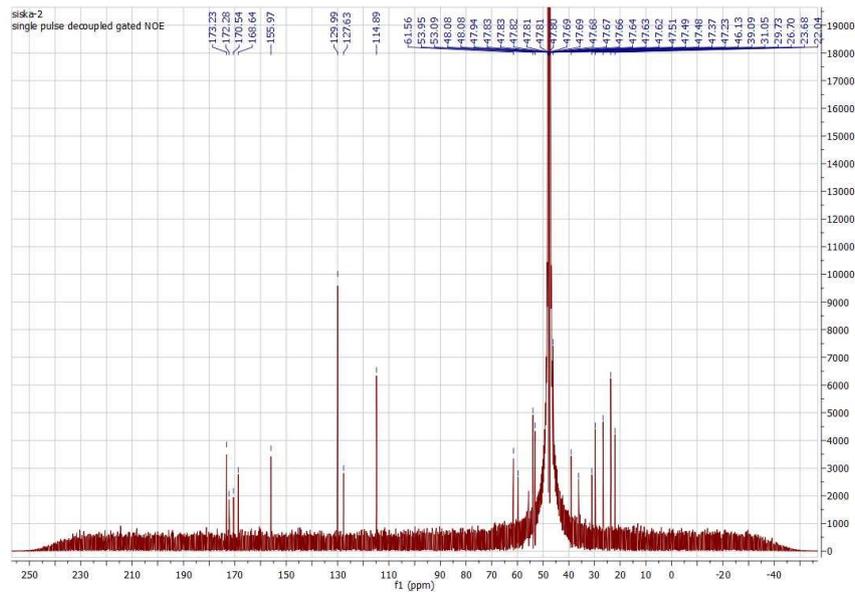
hal tersebut dapat disebabkan oleh pertukaran proton yang terdapat pada $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, dan $-\text{NH}$ dengan deuterium dari pelarut. Hasil karakterisasi ^1H -NMR pada senyawa tetrapeptida PSWY menunjukkan beberapa sinyal khas pada proton aromatik dari asam amino Tyr dan Trp pada geseran 6,64-7,55 ppm, proton pada CH_α pada geseran 4,68-4,20 ppm serta proton pada rantai samping asam amino.

Karakterisasi ^{13}C -NMR pada senyawa tetrapeptida PSKY (Gambar 7) menunjukkan beberapa sinyal khas peptida seperti $-\text{COOH}$ pada geseran 173,23 ppm; gugus amida pada geseran 168,64; 170,54; 172,29 ppm; metin sp^3 pada geseran

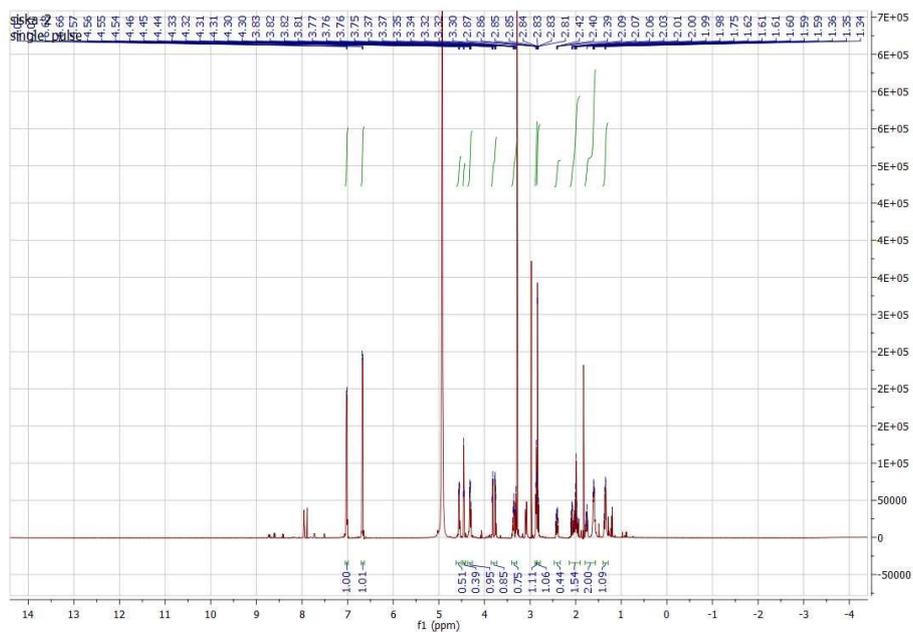
53,09; 53,95; 55,60; 59,64 ppm serta sinyal khas dari gugus rantai samping asam amino.

Hasil ^1H -NMR senyawa tetrapeptida PSKY (Gambar 8) (600MHz) menunjukkan 13 sinyal proton dengan proton yang terdapat pada gugus $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, dan $-\text{NH}$ tidak terdeteksi. Hasil karakterisasi ^1H -NMR pada senyawa tetrapeptida PSKY menunjukkan beberapa sinyal khas pada proton aromatik dari asam amino Tyr pada geseran 6,67-7,02 ppm, proton pada CH_α pada geseran 4,31-4,56 ppm serta proton pada rantai samping asam amino.

Dari hasil uji aktivitas antioksidan didapatkan nilai IC_{50} dari PSWY dan PSKY adalah 3,079 dan



Gambar 7. Spektrum ^{13}C -NMR (600 MHz) senyawa tetrapeptida PSKY.



Gambar 8. Spektrum ^1H -NMR (600 MHz) senyawa tetrapeptida PSKY.

4,340 mg/mL. Hasil uji antioksidan senyawa PSWY dan PSKY menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih rendah dari aktivitas senyawa tetrapeptida PAGY dan PSGY hasil sintesis dengan nilai IC_{50} sebesar 1,750 mg/mL dan 1,116 mg/mL. Fakta bahwa penggantian glisin pada PAGY dengan lisin (PAKY) dapat meningkatkan aktivitas, sayangnya, hal yang sama tidak ditemukan pada penggantian glisin pada PSGY dengan lisin (PSKY). Komposisi residu yang terlalu polar pada PSKY diduga menjadi penyebab penurunan aktivitas antioksidannya. PSKY bahkan memiliki aktivitas antioksidan yang lebih

rendah dari PSWY dalam studi ini. Penggantian glisin dengan triptofan pada PSWY yang memberi hidrofobisitas pada peptida memberikan aktivitas yang lebih baik dibandingkan penggantian glisin dengan lisin pada PSKY. Namun, PSWY masih memiliki aktivitas yang lebih rendah dari PAGY dan PSGY.

KESIMPULAN

Senyawa tetrapeptida PSWY dan PSKY telah berhasil disintesis menggunakan metode SPPS dengan rendemen berturut-turut sebesar 21,8% dan

98,9%. Senyawa tetrapeptida PSWY dan PSKY telah diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH dengan nilai IC₅₀ sebesar 3,079 dan 4,340 mg/mL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin mengucapkan terima kasih pada hibah RKDU-HIU Universitas Padjadjaran 2018 untuk pendanaan riset.

DAFTAR PUSTAKA

- Bonkowski, B., Wieczorek, J., Patel, M., Craig, C., Gravelin, A. & Bonche, T. (2013). Basic concepts of using solid phase synthesis to build small organic molecules using 2-chlorotriyl chloride resin. *Modern Chemistry and Applications*. **1**: 1-4.
- Chan, W. C. & White, P. D. (2000). Fmoc solid phase peptide synthesis. University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK.
- Doucet, O., Pujos, M., Robert, C. & Bernini, D. (2012). Cosmetic composition for use in increase Chemical Society Reviews ng collagen synthesis in skin cells. *PCT Int. Appl. WO 2012143364 A2 20121026*.
- García-Martín, F., Bayó-Puxan, N., Cruz, L. J., Bohling, J.C. & Albericio, F. (2007). Chlorotriyl chloride (CTC) resin as a reusable carboxyl protecting group. *QSAR & Combinatorial Science*. **26**: 1027-1035.
- Maharani, R. 2013. Studies of highly N-methylated cyclodepsipeptides, the aureobasidins. Ph.D Thesis. La Trobe University. Melbourne.
- Maharani, R., Sumiarsa, D., Marpaung, C., Zainuddin, A., Hidayat, A.T., Harneti, D., Nurlelarsi, N. & Supratman, U. (2019). Sintesis tetrapeptida PADY menggunakan metode fasa padat dan aktivitas antioksidannya. *Jurnal Kimia Valensi*. **5(1)**: 87-96.
- Maharani, R., Sumiarsa, D., Zainuddin, A., Ammatillah, N., Hidayat, A. T., Harneti, D. & Supratman, U. (2019). Synthesis of tetrapeptides and screening of their antioxidant Properties. *Current Bioactive Compounds*. **15(6)**: 680-685.
- Maharani, R., Yanti, E.F., Melati, M.D.I. & Sihotang, D. (2015). Synthesis of trypsin-modulating oostatic factor (TMOF) and its analogues by solid-phase peptide synthesis using DIC/oxyma as coupling reagent. *Procedia Chemistry*. **17**: 125-131.
- Merrifield, R.B. (1963). Solid phase synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. Contribution From The Rockefeller Institute. New York.
- Nikoo, M., Benjakul, S., Ehsani, A., Li, J., Wu, F., Yang, N., Xu, Baocai, X., Jin, Z. & Xu, X. (2014). Antioxidant and cyroprotective effects of a tetrapeptide isolated from *Amur sturgeon* skin gelatin. *Journal of Functional Foods*. **7**: 609-620.
- Samaranayaka, A.G.P. & Li-Chan, E.C.Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*. **3**: 229-254.
- Uhlig, T., Kyprianou, T., Martinelli, F.G., Oppici, C.A., Heiligers, D. & Hills, D. (2014). The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. *EuPA Open Proteomics*. **4**: 58-69.
- Valeur, E & Bradley, M. (2008). Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews*. **38**: 606-631.
- Zhang, X., & Zeng, Q. 2015. Hexapeptide and its application in preparation of pharmaceutical and cosmetic. Faming Zhuanli Shenqing, CN 105131086 A 20151209.
- 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.