

Sintesis Tetrapeptida PADY menggunakan Metode Fasa Padat dan Aktivitas Antioksidannya

Synthesis of PADY Tetrapeptide using Solid Phase Method and Its Antioxidant Activity

Dadan Sumiarsa^{1,2}, Christina Marpaung¹, Achmad Zainuddin¹, Ace Tatang Hidayat,¹
Desi Harneti¹, Nurlelasari¹, Unang Supratman^{1,3}, Rani Maharani^{1,3,*}

¹Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jalan Raya Bandung Sumedang Km 21 Jatinangor Kabupaten Sumedang, 45363

²Program Studi Doktor dan Magister Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana, Universitas Padjadjaran, Jalan Dipati Ukur No 35 Bandung

³Laboratorium Sentral, Universitas Padjadjaran, Jalan Raya Bandung Sumedang Km 21 Jatinangor Kabupaten Sumedang, 45363

*Corresponding author: r.maharani@unpad.ac.id

Receive: January 2019; Revision: February 2019; Accepted: May 2019; Available online: May 2019

Abstrak

Peptida antioksidan merupakan kelompok peptida yang berperan penting karena dapat menetralkan radikal bebas, sehingga dapat mencegah dan mengobati penyakit kronis. Salah satu senyawa peptida antioksidan alami yang telah ditemukan peneliti sebelumnya adalah senyawa tetrapeptida PAGY (Pro-Ala-Gly-Tyr) yang diisolasi dari gelatin kulit ikan amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) dan dilaporkan memiliki aktivitas antioksidannya dengan IC_{50} 5.38 mg/mL dalam uji DPPH dan 0,008 mg/mL dalam uji ABTS berturut-turut. Kelompok kami telah berhasil mensintesis PAGY bersama dengan analognya yakni PSGY, PFFY, PAFY, dan PAIY dengan menggunakan metode sintesis peptida fase padat (SPPS). Pengujian aktivitas antioksidan pada senyawa hasil sintesis menunjukkan bahwa PSGY memiliki aktivitas antioksidan lebih baik dari PAGY. Pencarian analog tetrapeptida antioksidan yang lebih baik hingga saat ini masih terus dilakukan. Pada penelitian ini telah berhasil disintesis analog tetrapeptida lainnya PADY (Pro-Ala-Asp-Tyr) dengan metode sintesis peptida fase padat menggunakan strategi Fmoc/t-Bu pada resin 2-klorotritilorida dilanjutkan dengan pengujian aktivitas antioksidannya. HATU/HOAT digunakan sebagai reagen pengkopling dalam sintesis PADY. Pemurnian krud PADY dilakukan menggunakan RP-HPLC preparatif sehingga diperoleh PADY murni sebesar 14.7 mg (12.6%). Penentuan struktur peptida hasil sintesis dianalisis dengan menggunakan spektroskopi ¹H-NMR dan TOF-MS. Pada pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, PADY hasil sintesis memberikan nilai IC_{50} sebesar 1.850 mg/mL, yang mengindikasikan bahwa PADY menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih rendah daripada PAGY hasil sintesis peneliti sebelumnya.

Kata kunci: Antioksidan, tetrapeptida, sintesis peptida fase padat

Abstract

Antioxidant peptide is a class of peptides that play an important in neutralizing free radicals, therefore this compound can be used to prevent and treat chronic diseases. One of the natural antioxidant peptides reported by previous researcher is PAGY (Pro-Ala-Gly-Tyr), which is isolated from amur sturgeon fish (*Acipenser schrenckii*) gelatin that showed antioxidant activity with IC_{50} 5.38 and 0.008 mg/mL using DPPH and ABTS assay, respectively. Our group has successfully synthesized PAGY, along with its analogues of PSGY, PFFY, PAFY, and PAIY using solid phase peptide synthesis method (SPPS). Antioxidant assay on synthesised compounds showed that PSGY has better antioxidant activity than PAGY. The search on the analogues of the antioxidant tetrapeptide was continued. From this study, a tetrapeptide analogue PADY (Pro-Ala-Asp-Tyr) has been successfully synthesised by solid phase peptide synthesis method with Fmoc/t-Bu strategy on 2-chlorotrityl chloride resin and tested for its antioxidant activity. HATU and HOAt reagents were used as the coupling reagent for the synthesis of PADY. The resulting PADY peptide solid was then purified using preparative RP-HPLC yielding PADY of 14.7 mg (12.6%). Characterisation of the synthesized compound was analysed by ¹H-

NMR and TOF-MS. On the antioxidant assay using DPPH method, PADY showed IC_{50} value of 1.850 mg/mL indicating a lower activity than the synthetic PAGY.

Keywords: Antioxidant, tetrapeptide, solid phase peptide synthesis (SPPS).

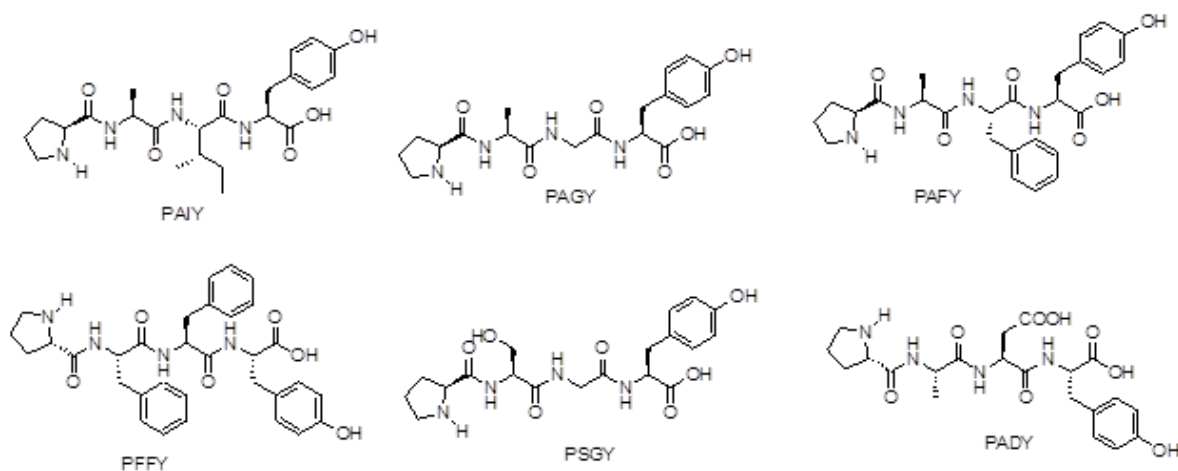
DOI: 10.15408/jkv.v5i1.10500

1. PENDAHULUAN

Peptida bioaktif telah menarik banyak perhatian ilmiah karena efek potensialnya dalam mempromosikan kesehatan dan mengurangi resiko penyakit. Dalam lingkup bioaktifnya yang luas, peptida bioaktif diketahui memiliki aktivitas antioksidan, antihipertensi, antikanker, dan sifat antimikroba (Zou *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2018; Maeno *et al.*, 1996; Li dan Wang, 2016; Mahlapuu *et al.*, 2016). Peptida bioaktif dapat dihasilkan secara *in vivo* maupun *in vitro*, seperti ekstraksi pelarut, hidrolisis enzimatis atau langkah-langkah pengolahan makanan, termasuk fermentasi dengan menggunakan mikroba. Dengan memanfaatkan peptida bioaktif, memberikan peluang untuk menjadikan biopeptida menjadi sumber alternatif bahan sintetis baik sebagai makanan fungsional seperti multivitamin, atau dalam bidang farmasi, maupun kosmetik (Kim and Wijesekara, 2010; Schagen, 2017; Uhlig *et al.*, 2014; Hayes and Tiwari, 2015). Salah satu peptida bioaktif yang menjadi kajian kami adalah peptida antioksidan yang merupakan kelompok senyawa peptida dengan aktivitas antioksidan.

Menurut Gu *et al.* (2012), Marcuse pertama kali menemukan efek antioksidan pada peptida pada tahun 1960, kemudian berkembang hingga sekarang ditemukan ratusan peptida antioksidan yang dihasilkan dari berbagai sumber alami yang mengandung protein termasuk dari organisme laut. Nikoo *et al.*, (2014) telah menemukan salah satu peptida antioksidan yang diperoleh dari gelatin kulit ikan amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*), yaitu tetrapeptida dengan urutan asam amino Pro-Ala-Gly-Tyr (PAGY) (Gambar 1) dengan IC_{50} pada uji DPPH 5.38 mg/mL, dan pada uji ABTS 0.008 mg/mL.

PAGY dan analognya yaitu PAFY, PAIY, PFFY, dan PSGY (Gambar 1) telah berhasil disintesis dengan menggunakan metode sintesis peptida fase padat dan telah menunjukkan aktivitas antioksidan yang baik jika dibandingkan dengan peptida antioksidan PAGY yang diperoleh dengan cara isolasi, dengan IC_{50} pada uji DPPH berturut-turut 1.750; 1.177; 1.642; 1.587 dan 1.116 mg/mL. Hasil ini menunjukkan bahwa gugus hidroksil pada rantai samping asam amino serin dapat meningkatkan aktivitas antioksidan (Maharani *et al.*, 2018).



Gambar 1. Struktur senyawa tetrapeptida PAGY (Pro-Ala-Gly-Tyr), PAFY (Pro-Ala-Phe-Tyr), PAIY (Pro-Ala-Ile-Tyr), PFFY (Pro-Phe-Phe-Tyr), PSGY (Pro-Ser-Gly-Tyr), dan PADY (Pro-Ala-Asp-Tyr).

Untuk mendapatkan senyawa tetrapeptida dengan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi, pada penelitian ini dilakukan sintesis senyawa tetrapeptida analog PAGY lainnya, yaitu dengan mengganti residu asam amino glisin pada PAGY dengan asam amino asam aspartat pada PADY (Pro-Ala-Asp-Tyr) (Gambar 1). Hal ini dilakukan untuk mengetahui peran asam aspartat dalam aktivitas antioksidan. Gugus karboksilat pada asam aspartat disebelah asam amino tirosin diharapkan dapat menginduksi pelepasan atom hidrogen pada gugus hidroksil pada tirosin untuk stabilisasi radikal. Hal ini ditunjukkan oleh asam glutamat disebelah tirosin yang diketahui dapat meningkatkan aktivitas antioksidan (Zou *et al.*, 2016). Residu asam amino prolin dan tirosin tidak digantikan karena kedua asam amino ini berkontribusi dalam aktivitas antioksidan senyawa peptida (Zou *et al.*, 2016).

Sintesis peptida fase padat (SPPS) dengan strategi Fmoc/*t*-Bu akan diaplikasikan dalam menyintesis PADY seperti yang telah dilaporkan sebelumnya (Coin *et al.*, 2007). SPPS sendiri merupakan teknik sintesis peptida pada suatu penyangga padat. Senyawa tetrapeptida PADY hasil sintesis dimurnikan dengan metode kromatografi (MPLC dan HPLC), dikarakterisasi dengan metode spektroskopi massa dan NMR, kemudian dilakukan uji antioksidan dengan metode uji DPPH. Sintesis senyawa tetrapeptida PADY belum pernah dilakukan sebelumnya, sehingga dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi baru mengenai senyawa peptida antioksidan hasil sintesis yang baru dengan aktivitas antioksidan yang tinggi.

2. METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah tabung sintesis peptida fase padat (tabung SPPS), *freeze dryer*, *rotary evaporator*, *magnetic stirrer*, *rotary suspension mixer*, *Reverse Phase Medium Pressure Liquid Chromatography* (RP-MPLC) semi-preparatif merk BUCHI Sepacore Control, *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) merk Waters 1500-Series, detektor Photo Diode Array (PDA), *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) preparatif merk Agilent SD1, detektor Photo Diode Array (PDA), Mass Spectrometer

Waters QToF MS dengan sistem Electron Spray (ES), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Agilent 500 MHz Spektrofotometer UV-Vis merk Perkin Elmer, dan alat gelas yang umum digunakan di laboratorium .

Bahan-bahan yang digunakan adalah resin 2-klorotritilklorida, diklorometana (DCM), dimetilformamida (DMF), HATU (1-[bis(dimetilamino)metilena]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid heksafluorofosfat, hexafluorofosfat azabenzotriazol tetrametiluronium), HOAt (1-hidroksi-7-azabenzotriazol), DIPEA (diisopropiletilamina), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH, Fmoc-Asp(O-*t*-Bu)-OH, TFA, metanol, piperidin, asam asetat, asetonitril, asetaldehida, *p*-kloranil, dan plat kromatografi lapis tipis.

Prosedur Penelitian

Pengikatan terminal C asam amino pertama (*loading resin*)

Sebanyak 0.4 g resin 2-klorotritilklorida ditambahkan dengan 5 mL DCM, kemudian dikocok selama 5 menit dan disaring. Larutan Fmoc-Tyr(O-*t*-Bu)-OH (0.56 mmol), DCM (5 mL) dan DIPEA (2.22 mmol) ditambahkan ke dalam resin dan dikocok pada suhu ruang. Resin disaring, kemudian dicuci dengan DMF dan DCM. 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 μ L piperidin 20% ditambahkan dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 290 nm.

Sebanyak 5 mL campuran metanol:DCM:DIPEA (15:80:5) ditambahkan pada resin yang kemudian dikocok selama 10 menit dan dilakukan dua kali. Resin disaring dan dicuci dengan DMF dan DCM. Resin dikeringkan selama 15 menit sehingga didapatkan Fmoc-Tyr(O-*t*-Bu)-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 DCM. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc dilakukan dengan menggunakan uji kloranil.

Kopling asam amino Fmoc-Asp(O-*t*-Bu)-OH

Pada labu dasar bundar disiapkan Fmoc-Asp(O-*t*-Bu)-OH (2 ek.) yang ditambahkan dengan HATU (2 ek.) dan HOAt (2 ek.), ditambahkan DIPEA (8 ek.) dan dilarutkan dalam 4 mL DCM:DMF (1:1), kemudian disonikasi selama 5 menit. Larutan kuning ditambahkan ke dalam peptida resin (resin-Tyr(O-*t*-Bu)-NH₂) kering dan dikocok semalaman. Resin disaring dan dicuci dengan DMF dan diklorometana kemudian dikeringkan. Kontrol kopling asam amino kedua dilakukan dengan menggunakan uji kloranil.

Pelepasan gugus pelindung Fmoc menggunakan 20% piperidin dalam DMF (3 mL) dan dikocok selama 30 menit. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DMF dan DCM. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc dilakukan dengan menggunakan uji kloranil.

Kopling asam amino ketiga (Fmoc-Ala-OH)

Pada labu dasar bundar disiapkan Fmoc-Ala-OH (2 ek.) yang ditambahkan dengan HATU (2 ek.) dan HOAt (2 ek.), kemudian ditambahkan DIPEA (8 ek.) dan dilarutkan dalam 4 mL DCM:DMF (1:1), kemudian disonikasi selama 5 menit. Larutan kuning ditambahkan ke dalam peptida resin (resin-Tyr(O-*t*-Bu)-AA2*-NH₂) kering dan dikocok semalaman. 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 20% piperidin dalam DMF (3 mL) dan dikocok selama 30 menit. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DMF dan DCM. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc dilakukan dengan menggunakan uji kloranil.

Kopling asam amino keempat (Fmoc-Pro-OH)

Pada labu dasar bundar disiapkan Fmoc-Pro-OH (2 ek.) yang ditambahkan dengan HATU (2 ek.) dan HOAt (2 ek.), ditambahkan DIPEA (8 ek.) dan dilarutkan dalam 4 mL DCM:DMF (1:1), kemudian disonikasi selama 5 menit. Larutan kuning ditambahkan ke dalam peptida resin (resin-Tyr(O-*t*-Bu)-AA2*-Ala-NH₂) kering dan dikocok semalaman. 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 20% piperidin dalam DMF (3 mL) dan dikocok selama 30 menit. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DMF dan DCM. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc dilakukan dengan menggunakan uji kloranil.

Pelepasan tetrapeptida dari resin

Resin tetrapeptida (resin-Tyr(O-*t*-Bu)-AA2*-Ala-Pro-NH₂) ditambahkan dengan 5 mL larutan 95% TFA. Campuran dikocok selama 10 menit pada suhu ruang, prosedur ini dilakukan sebanyak 2 kali. Lepasnya peptida dari resin ditandai dengan berubahnya warna resin menjadi merah. Resin disaring kemudian filtrat dipekatkan dengan rotary evaporator. Selanjutnya padatan tetrapeptida dikeringkan dengan freeze dryer. Krud peptida ini dianalisis kemurniannya dengan menggunakan RP-HPLC analitik menggunakan kolom fase terbalik LiChrospher RP-18, dan dielusi menggunakan eluen bergradien asetonitril:air (0:100-100:0) dengan buffer TFA 0.1% selama 30 menit, laju alir 1 mL/menit, dan menggunakan detektor PDA dengan deteksi pada panjang gelombang 254 nm, pada penelitian ini tidak dilakukan pemindaian panjang gelombang maksimum, sehingga panjang gelombang yang digunakan adalah panjang gelombang yang biasa digunakan dalam analisis peptida pada umumnya, dimana peptida akan tampak pada panjang gelombang 254 nm. Selanjutnya, krud peptida dimurnikan dengan RP-MPLC semi preparatif (kolom Sepacore 4 g; eluen bergradien asetonitril:air (0:100-90:0) selama 1 jam dengan laju alir 3 mL/menit; panjang gelombang 254 nm) dan RP-HPLC preparatif (kolom C-18 ukuran 150mmx10mm; eluen isokratik metanol:air (1.2:8.8) selama 35 menit dengan laju alir 6.25 mL/menit; panjang gelombang 254 nm). Fraksi-fraksi yang diperoleh diuji kemurniannya dengan RP-HPLC analitik (kolom C-18; eluen bergradien asetonitril:air (0:100-100:0) dengan buffer TFA 0,1% selama 30-35 menit dengan laju alir 1 mL/menit; panjang gelombang 254 nm) kemudian peptida yang sudah murni dikarakterisasi menggunakan TOF-MS dan NMR.

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.

Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Peptida murni dibuat menjadi konsentrasi 2000 ppm dalam metanol. Kemudian dibuat peptida dengan beberapa macam konsentrasi yang berbeda (800, 1200, dan 1600 ppm) sebanyak 200 μ L (sudah termasuk 40 μ L DPPH di dalamnya), kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit di ruangan terhindar cahaya. Absorbansi campuran diukur pada panjang gelombang 517 nm. Blanko (pelarut metanol) disiapkan dengan perlakuan yang sama. Kemudian dihitung nilai % inhibisi DPPH.

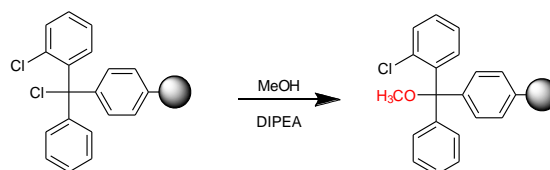
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Senyawa PADY disintesis pada pendukung padat, resin 2-klorotritil klorida. Oleh karena struktur dari resin ini yang meruah, resin harus dikembangkan terlebih dahulu agar sisi aktif pada resin tersebut dapat lebih terbuka sehingga asam amino pertama akan lebih mudah terikat pada sisi aktif resin (Sewald *et al.*, 2002).

Pada sintesis ini asam amino pertama pada tetrapeptida target PADY yang disintesis adalah asam amino tirosin (Tyr). Gugus hidroksil (-OH) pada rantai samping telah dilindungi dengan tersier butil (*t*-Bu) dan gugus amino pada terminal-N asam amino telah dilindungi dengan gugus Fmoc agar tidak mengganggu reaksi. Pengikatan asam amino tirosin pada resin diawali dengan pengikatan hidrogen asam pada gugus karboksil Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH oleh basa *N,N*-diisopropiletilamin (DIPEA) melalui reaksi asam basa yang sehingga terbentuk nukleofil. Nukleofil yang terbentuk akan menyerang karbon kuarterner pada resin 2-klorotritil klorida kemudian mensubstitusi atom klorida dan membentuk ikatan dengan resin melalui reaksi substitusi nukleofilik unimolekuler (S_N1), sehingga terbentuk senyawa Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-resin (Gambar 2). Reaksi ini dilakukan selama 18-24 jam untuk memastikan

bahwa asam amino pertama yang masuk ke dalam resin telah maksimal. Nilai *loading resin* atau jumlah asam amino pertama yang masuk ke dalam resin baiknya tidak terlalu besar karena padatnya peptida yang terbentuk dapat mempersulit asam amino bergugus pelindung menjangkau gugus α -amino bebas pada reaksi sintesis. Nilai *loading resin* akan menentukan jumlah asam amino yang akan ditambahkan selanjutnya (Chan dan White, 2000). Penentuan nilai *loading resin* dilakukan menggunakan spektrofotometer UV, dan diketahui nilai *loading resin* pada PADY sebesar 0.63 mmol/g resin (0.25 mmol/0.4 g resin) nilai ini lebih kecil dari jumlah mol asam amino tirosin yang dimasukkan (0.56 mmol/0.4 g resin).

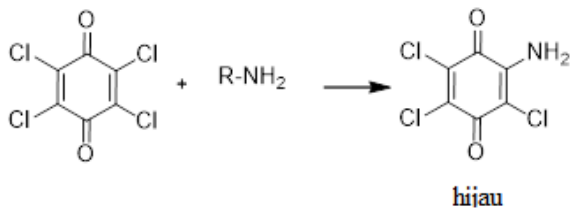
Melalui nilai *loading resin*, diketahui bahwa tidak semua resin mengikat asam amino, oleh karena itu perlu dilakukan *capping resin*. *Capping resin* dilakukan dengan penambahan campuran DCM:metanol:DIPEA (80:15:5) pada resin untuk menutup sisi aktif dari resin yang tidak terikat dengan asam amino. Hal ini dilakukan untuk mencegah asam amino selanjutnya tidak bereaksi dengan sisi aktif resin yang tidak berikatan dengan asam amino pertama dan hanya bereaksi dengan sisi aktif asam amino pertama yang terikat pada resin (Gambar 3).



Gambar 3. Reaksi *capping resin* menggunakan metanol

Pelepasan gugus pelindung Fmoc (deproteksi) dilakukan setelah *capping resin*, yaitu sebelum dilakukan kopling asam amino kedua. Pelepasan gugus pelindung Fmoc dilakukan untuk menyediakan sisi aktif asam amino pertama yang akan bereaksi dengan asam amino kedua. Gugus pelindung Fmoc merupakan gugus pelindung yang labil dalam kondisi basa sehingga dapat dilepaskan dengan menggunakan basa. Deproteksi dilakukan dengan menambahkan larutan piperidin 20% dalam DMF. DMF dipilih karena sifatnya yang tidak volatil. Hidrogen pada cincin fluorena dalam gugus Fmoc diikat oleh piperidin

membentuk gugus asam amino bebas dan senyawa intermediet tipe aromatik siklopentadiena (Chan dan White, 2000). Senyawa ini dengan mudah terurai menjadi senyawa dibenzofulven dan karbondioksida. Setelah dilakukan deproteksi asam amino, dilakukan uji kloranil. Uji kloranil dilakukan sebagai kontrol deproteksi Fmoc. Keberhasilan deproteksi dengan uji kloranil ditandai dengan berubahnya warna resin menjadi warna hijau, karena terdapat gugus amina (-NH₂). Reaksi pengujian gugus amino dengan kloranil dapat dilihat pada Gambar 4.



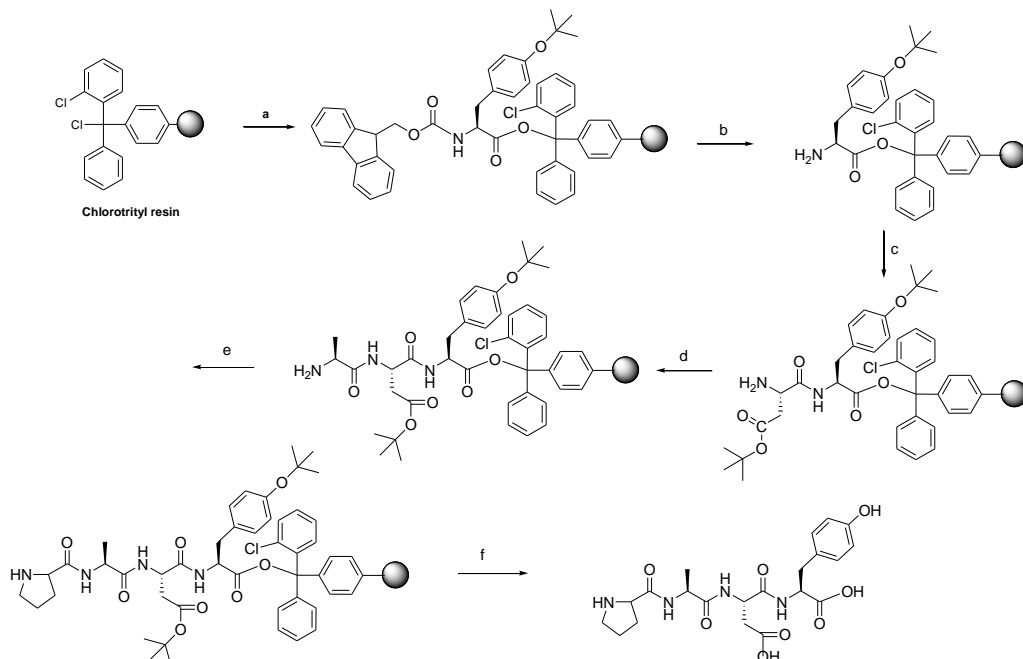
Gambar 4. Reaksi pengujian gugus amino dengan kloranil.

Setelah dihasilkan gugus NH₂ bebas pada asam amino pertama, tahap selanjutnya adalah reaksi kopling dengan asam amino kedua, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, dengan menggunakan reagen pengaktivasi HATU/HOAt. HATU/HOAt telah diketahui

sebagai reagen kopling yang dapat menunjukkan performa yang sangat baik jika dibandingkan dengan reagen kopling golongan uronium/aminium lainnya, selain itu juga dapat meningkatkan rendemen dan mengurangi terjadinya epimerisasi (Valeur dan Bradley, 2009). Aktivasi gugus karboksilat dengan HATU/HOAt menghasilkan ester *O*-asil yang reaktif untuk bereaksi dengan gugus amino pada asam amino kedua menghasilkan ikatan peptida. Hasil dari reaksi ini adalah resin-dipeptida-Fmoc (Gambar 1).

Tahap deproteksi gugus Fmoc kembali dilakukan dengan menambahkan larutan piperidin dalam DMF 20% selama 30 menit menghasilkan resin-dipeptida-NH₂ (Gambar 1). Keberhasilan kopling dapat ditelusuri dengan uji kloranil. Jika reaksi kopling telah berhasil warna resin (kuning) pada uji kloranil tidak akan mengalami perubahan. Hal ini disebabkan karena tidak adanya sisa-sisa gugus NH₂ bebas (hasil deproteksi Fmoc) yang bereaksi dengan kloranil.

Tahap selanjutnya adalah tahap pengulangan reaksi kopling dan deproteksi Fmoc untuk pemasukan asam amino ketiga (Fmoc-Ala-OH) dan keempat (Fmoc-Pro-OH) secara berurutan hingga tetrapeptida terbentuk pada resin (Gambar 4).



Gambar 2. Skema sintesis PADY, (a) (1) Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, DIPEA, DCM. (2) metanol:DCM:DIPEA. (b) 20% piperidin dalam DMF, (c) 1. Fmoc-Asp(OtBu)-OH, HATU/HOAt, DIPEA 2. 20% piperidin dalam DMF (d) 1. Fmoc-Ala-OH, HATU/HOAt, DIPEA 2. 20% piperidin dalam DMF, (e) 1. Fmoc-Pro-OH, HATU/HOAt, DIPEA 2. 20% piperidin dalam DMF (f) 95% TFA dalam air.

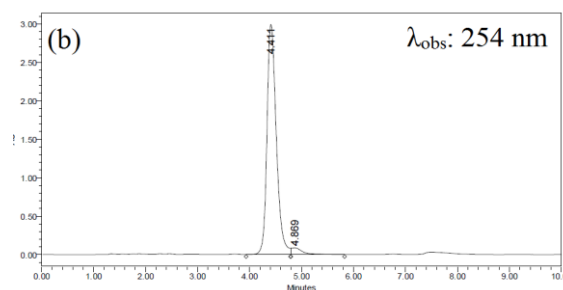
Pelepasan Linear Peptida dari Resin

Tetrapeptida target yang telah disintesis kemudian dilepaskan dari resin. Pelepasan peptida linear dilakukan dengan penambahan reagen TFA 95% dalam air selama 10 menit pada resin yang mengikat peptida yang diulang sebanyak dua kali untuk memastikan bahwa seluruh senyawa peptida linear telah benar-benar terlepas dari resin. Penggunaan konsentrasi yang tinggi dari TFA dimaksudkan untuk dapat juga melepaskan gugus pelindung rantai samping *t*-Bu pada asam amino Tyr dan Asp. Air dalam reaksi ini bertindak sebagai *scavenger* karbokation yang terbentuk setelah pelepasan peptida dari resin (Gambar 1). Pada reaksi pelepasan peptida warna resin berubah menjadi merah (Chan dan White, 2000). Setelah dipekatkan dengan *rotary evaporator*, krud peptida diperoleh sebagai selai kuning kecoklatan. Krud peptida diperoleh sebanyak 143.1 mg.

Hasil analisis dengan menggunakan RP-HPLC analitik menunjukkan bahwa peptida hasil sintesis masih perlu dilakukan pemurnian. Pemurnian dilakukan menggunakan RP-MPLC semi-preparatif yang dilanjutkan dengan RP-HPLC preparatif. Setelah dua tahapan pemurnian, diperoleh fraksi murni tetrapeptida PADY dan dianalisis dengan RP-HPLC analitik yang menunjukkan puncak murni pada waktu retensi 4.411 menit (Gambar 5). Selanjutnya tetrapeptida murni dikarakterisasi dengan spektroskopi massa dan NMR. Senyawa murni yang dihasilkan yaitu sebanyak 14.7 mg dengan rendemen 12.6%. Rendemen yang diperoleh relatif kecil, hal ini dapat dikarenakan beberapa faktor, salah satunya adanya reaksi samping yang terjadi menyebabkan reaksi sintesis peptida tidak berjalan sempurna, selain itu tidak maksimalnya reaksi pelepasan gugus Fmoc maupun gugus pelindung rantai samping serta reaksi kopling asam amino, serta kesalahan dalam pemurnian peptida baik dengan RP-MPLC semi preparatif maupun RP-HPLC preparatif membuat semakin besarnya massa yang hilang dari peptida target yang telah disintesis.

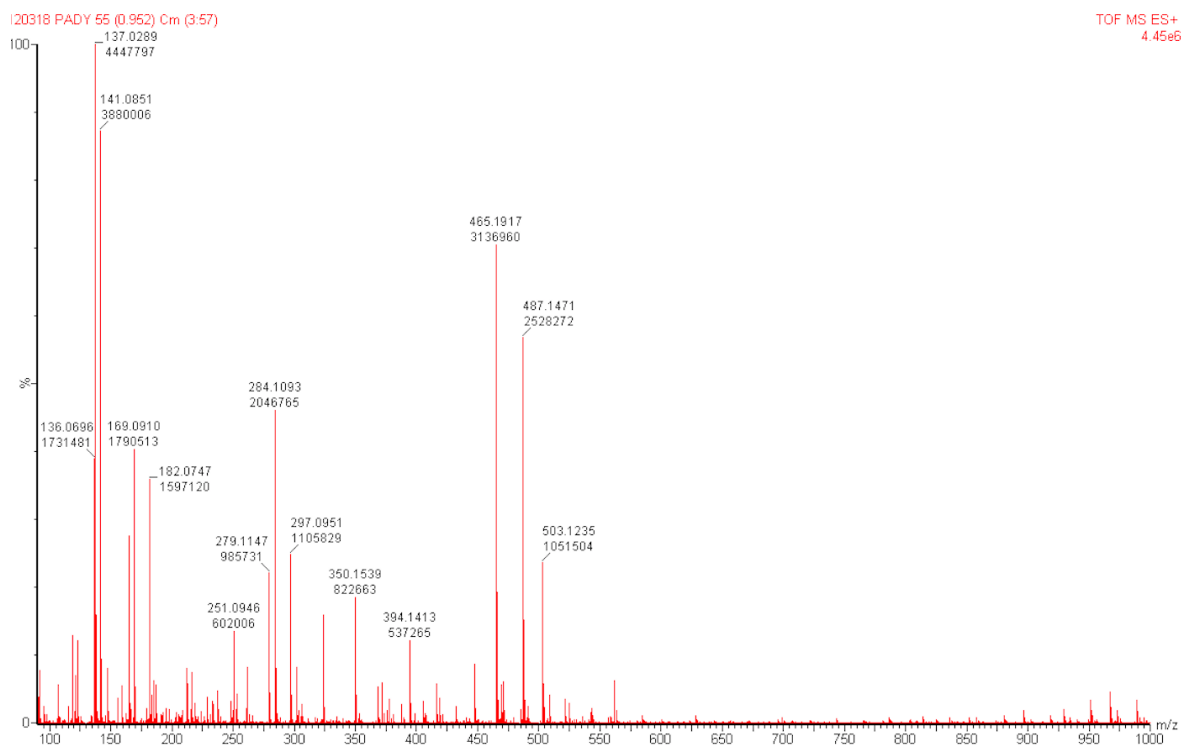
Dalam sintesis tetrapeptida PADY, urutan asam amino yang terdapat dalam peptida sudah diketahui secara pasti, sehingga

untuk karakterisasi dapat digunakan metode spektroskopi massa untuk mengetahui bobot molekul dari produk sintesis. Pada penelitian ini digunakan alat *Mass Spectrometer Waters QToF MS*. Hasil karakterisasi menggunakan spektroskopi massa menunjukkan adanya puncak ion molekul untuk senyawa PADY pada m/z 465,1917 [M+H] dan 487.1471 [M+Na] (Gambar 6).

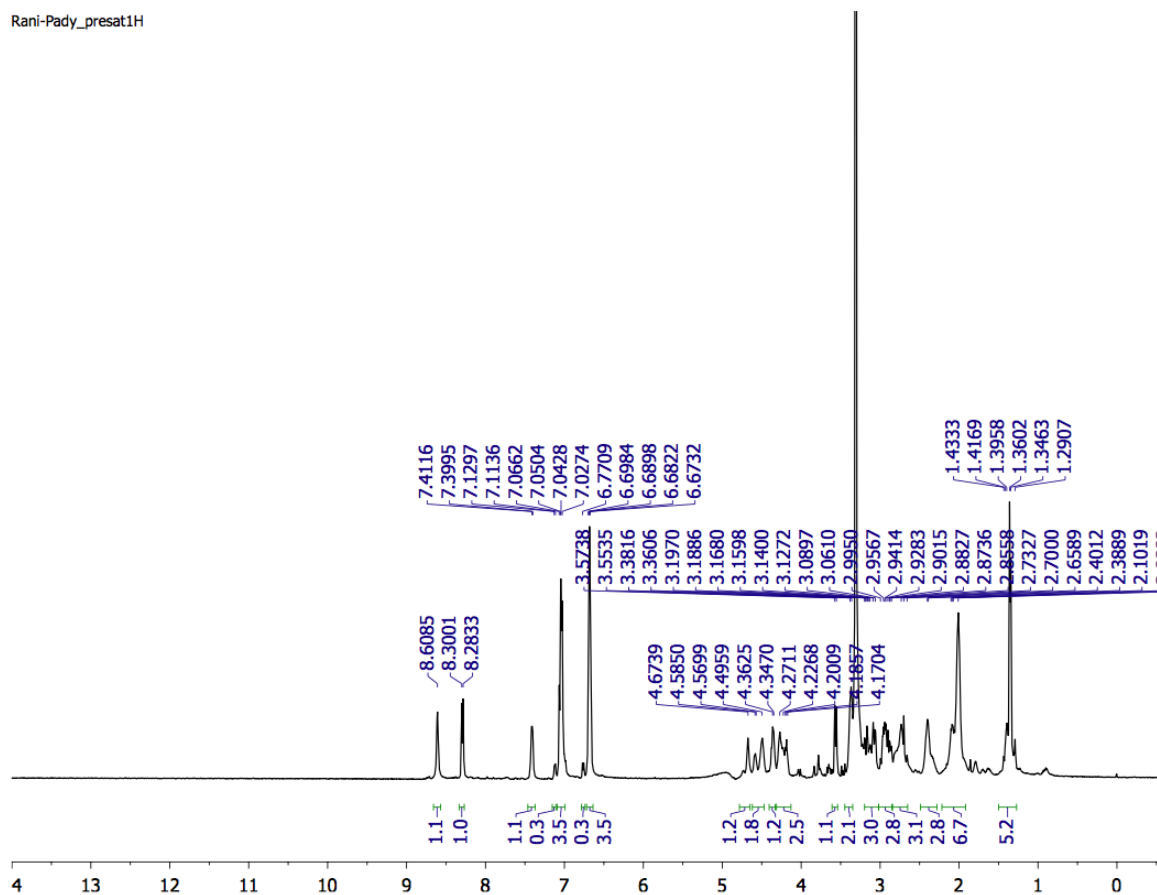


Gambar 5. Kromatogram RP-HPLC untuk PADY.

Hasil karakterisasi spektroskopi massa sebelumnya telah dapat memastikan bahwa tetrapeptida target telah berhasil disintesis. Karakterisasi dengan menggunakan NMR dilakukan untuk mengkonfirmasi konsistensi senyawa hasil sintesis dengan data spektroskopi NMR. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ (Gambar 7) menunjukkan sinyal proton yang sesuai untuk senyawa PADY. Pada spektrum $^1\text{H-NMR}$ ini tidak muncul sinyal dari proton karboksilat (-COOH) karena pertukaran proton antara H karboksilat dengan deuterium dari metanol yang merupakan pelarut protik. Sinyal proton yang karakteristik untuk peptida hasil sintesis yaitu proton NH amida pada geseran kimia 7.41; 8.30; and 8.60 ppm, proton CH aromatik tersubstitusi para dari Tyr pada geseran kimia 6.70 and 7.04 ppm, proton CH_α terdistribusi pada geseran kimia antara 3-5 ppm dan sinyal proton lainnya dari rantai samping asam amino muncul sesuai yang diharapkan. Data geseran kimia $^1\text{H-NMR}$ PADY dapat dilihat pada Tabel 1. Melalui hasil spektrum NMR proton ini, jumlah atom hidrogen yang terdapat dalam senyawa telah terkonfirmasi. Hal ini membuktikan bahwa senyawa tetrapeptida PADY telah berhasil disintesis dengan menggunakan metode sintesis peptida fase padat.



Gambar 6. Spektrum massa senyawa PADY.



Gambar 7. Spektrum ¹H-NMR (500 MHz) senyawa tetrapeptida PADY dalam metanol-d₄

Tabel 1. Data ¹H-NMR senyawa tetrapeptida PADY dalam metanol-*d*₄

δ_H	Jenis Hidrogen
8.61 (s, 1H)	NHCO
8.29 (d, $J=8.4$ Hz, 1H)	NHCO
7.41 (s, 1H)	NHCO
7.05 (d, 2H)	2 CH aromatik (Tyr)
6.70 (d, 2H)	2 CH aromatik (Tyr)
4.67 (s, 1H)	OH (Tyr)
4.59 (s, 1H)	CH α
4.49 (s, 1H)	CH α
4.27 (s, 1H)	CH α
2.06 (m, 2H)	CH ₂ (Pro)
3.16 (m, 1H)	CHH (Tyr)
2.95 (m, 1H)	CHH (Asp)
2.90 (m, 2H)	CH ₂ (Pro)
2.91 (m, 1H)	CHH (Tyr)
2.40 (m, 1H)	CHH (Asp)
2.10 (m, 2H)	CH ₂ (Pro)
2.07 (m, 2H)	CH ₂ (Pro)
1.35 (d, $J=6.95$ Hz, 3H)	CH ₃ (Ala)

Senyawa PADY selanjutnya diuji aktivitas antioksidannya dengan uji penghambatan DPPH. Pengujian DPPH dilakukan dalam skala mikro, pengujian aktivitas senyawa PADY dilakukan menggunakan larutan dengan tiga variasi konsentrasi yaitu pada konsentrasi 800, 1200, dan 1600 ppm.

Melalui hasil uji DPPH didapatkan nilai IC₅₀ pada masing-masing senyawa. Senyawa PADY hasil sintesis memiliki nilai IC₅₀ 1,850 mg/mL. Hasil uji DPPH ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan senyawa PADY hasil sintesis lebih rendah dibandingkan dengan senyawa PAGY hasil sintesis yang dilaporkan oleh Maharani *et al.* (2018), yaitu dengan IC₅₀ 1,750 mg/mL. Penggantian asam aspartat di dalam rantai peptida PADY tidak dapat meningkatkan aktivitas penghambatan radikal DPPH. Rantai samping yang lebih pendek pada asam aspartat dibandingkan asam glutamat tidak dapat mendorong gugus karboksilat pada asam aspartat tersebut untuk menginduksi pelepasan atom hidrogen pada gugus hidroksil pada tirosin sehingga aktivitas antioksidan tidak dapat meningkat.

4. SIMPULAN

Senyawa tetrapeptida PADY berhasil disintesis dengan metode SPPS dengan massa 14.7 mg (rendemen 12.6%) dan menunjukkan aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ 1.850 mg/mL pada uji DPPH. Penggantian glisin pada PAGY dengan asam aspartat pada PADY tidak dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dalam uji DPPH.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Hibah Internal Unpad-Riset Kompetensi Dosen Unpad (HIU-RKDU) tahun ke-2 untuk pendanaan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Chan WC, White PD. 2000. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis A Practical Approach. UK: University of Leeds.
- Coin I, Beyermann M, Bienert M. 2007. Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nature Protocols*. 2: 3247-3256.
- Gu L, Zhao M, Li W, You L, Wang J, Wang H, Ren J. 2012. Chemical and cellular antioxidant activity of two novel peptides designed based on glutathione structure. *Food and Chemical Toxicology*. 50: 4085-4091.
- Hayes M, Tiwari BK. 2015. Bioactive carbohydrates and peptides in foods: an overview of sources, downstream processing steps and associated bioactivities. *International Journal of Molecular Science*. 16: 22485-22508.
- Kim S, Wijesekara I. 2010. Development and biological activities of marine derived bioactive peptide: a review. *Journal of Functional Food*. 2: 1-9.
- Li F-M and Wang X-Q. 2016. Identifying anticancer peptides by using improved hybrid compositions. *Scientific Reports*. 6: 33910.
- Maeno M, Yamamoto N, Takano T. 1996. Identification of an Antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*. 79(8): 1316-1321.

- Maharani R, Sumiarsa D, Zainuddin A, Ammatillah N, Tatang AH, Harneti D, Supratman U. 2018. Synthesis of tetrapeptides and screening of their antioxidant properties. current bioactive compound. 14:1-6 (E-pub Ahead of Print).
- Mahlapuu M, Hakansson J, Ringstad L, Bjorn C. 2016. Antimicrobial Peptides: An emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 6: 194.
- Nikoo M, Benjakul S, Ehsani A, Li J, Wu F. 2014. Antioxidant and cyroprotective effects of a tetrapeptide isolated from amur sturgeon skin gelatin. *Journal of Functional Foods*. 7: 609-620.
- Schagen SK. 2017. Topical peptide treatments with effective anti-aging results. *Cosmetics*. 4(2): 16.
- Sewald N, Jakubke, Hans-Dieter. 2002. Peptides: Chemistry and Biology. Jerman: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Uhlig T, Kyprianou T, Martinelli FG, Oppici CA, Heiligers D, Hills D, Calvo XR, Verhaert, P. 2014. The Emergence of Peptides In The Pharmaceutical Business: From Exploration To Exploitation. *EuPA Open Proteomics*. 4. 58-69.
- Valeur E, Bradley M. 2009. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.* 38: 606–631.
- Ye N, Hu P, Xu S, Chen M, Wang S, Hong, J, Chen T, Cai T. 2018. Preparation and characterization of antioxidant peptides from carrot seed protein. *Journal of Food Quality*. 1-9
- Zou TB, He TP, Li HB, Tang HW, Xia EQ. 2016. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*. XXI (72): 1-14.