

# Sintesis Tetrapeptida (Ser-Pro-Lys-Thr) sebagai Kandidat Antioksidan dengan Metode Solid Phase Peptide Synthesis

Predi Mubarak, Nety Kurniaty, Rusnadi

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

*email: predimubarak@gmail.com, netykurniaty@yahoo.com, rusnadi@chem.itb.ac.id*

**ABSTRACT :** Antioxidant peptides are peptides with antioxidant activity that protects against free radicals by donating electrons to free radicals. One of the natural antioxidant peptides that researchers found was tetrapeptide (Ser-Pro-Lys-Thr) which was isolated from the fungus (*Tolypocladium inflatum*) located in the Norwegian soil and was found to have antioxidants activity. This research has succeeded in synthesizing tetrapeptide (Ser-Pro-Lys-Thr) using the solid phase peptide (SPPS) method using the Fmoc-amino acid strategy using 2-chlorotriyl chloride resin as a buffer and coupled with a coupling reagent, HOBt and DIPEA. The sample weight resulted was 111.4 mg which was then characterized using a mass spectrophotometer and it was obtained the peak of the fragment at  $m/z$  431. RP-HPLC was used to obtain the purity of the tetrapeptide mixture which resulted peak retention time at 9,243 minutes. Antioxidant activity was tested using the DPPH method, the results obtained from tetrapeptide compounds was 45% inhibition concentration indicating the antioxidant activity of tetrapeptide compounds is weak.

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

**ABSTRAK :** Peptida antioksidan merupakan peptida yang memiliki aktivitas antioksidan yang berperan untuk menangkal radikal bebas dengan cara mendonorkan elektronnya kepada radikal bebas. Salah satu peptida antioksidan alami yang telah ditemukan peneliti sebelumnya adalah tetrapeptida (Ser-Pro-Lys-Thr) yang diisolasi dari jamur (*Tolypocladium inflatum*) yang berada di tanah Norwegia dan dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan. Pada penelitian ini telah berhasil disintesis tetrapeptida (Ser-Pro-Lys-Thr) dengan menggunakan metode sintesis peptida fase padat (SPPS) menggunakan strategi Fmoc-asam amino, penyangga yaitu resin 2-klorotriyl klorida dan dikopling dengan reagen pengkopling diantaranya HBTU, HOBt dan DIPEA. Hasilnya didapat bobot sampel sebesar 111,4 mg yang kemudian dilakukan proses karakterisasi dengan menggunakan spektrofotometer massa didapat puncak fragmennya pada  $m/z$  431 dan untuk memastikan kemurnian dari senyawa tetrapeptida tersebut dilakukan proses RP-HPLC yaitu hasil yang didapat pada menit ke 9,243 menunjukkan puncak waktu retensinya. Pada pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH, hasil yang didapat dari senyawa tetrapeptida (Ser-Pro-Lys-Thr) yaitu nilai inhibisi sebesar 45% yang menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan dari senyawa tetrapeptida tersebut lemah.

**Kata kunci :** Antioksidan, tetrapeptida, sintesis peptida fase padat

## 1 PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan senyawa atau molekul dapat berdiri sendiri mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Elektron yang tidak berpasangan itu dapat menyebabkan molekul mudah tertarik pada suatu medan magnetik. Radikal bebas akan menyerang molekul yang stabil dan mengambil elektronnya, sehingga akan terjadi reaksi berantai membentuk radikal bebas baru yang menyebabkan kerusakan sel

dalam tubuh. Maka dari itu diperlukan aktivitas antioksidan dalam melindungi tubuh (Yuslianti, 2018).

Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas sehingga dapat berikatan dengan molekul antioksidan dan juga dapat memutus reaksi berantai yang disebabkan oleh radikal bebas (Murray, 2009).

Senyawa antioksidan alami salah satunya dapat diisolasi dari senyawa fenolik. Namun untuk mendapatkan suatu isolat dari suatu tanaman memerlukan ketelitian dan kecermatan karena kandungan senyawa dalam tanaman tersebut sangat beragam dan prosesnya membutuhkan waktu yang lama. Sehingga perlu dilakukan upaya untuk penyediaan senyawa kimia dengan cara sintesis peptida (Budimarwanti, 2009).

Pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Agnieszka Siebert, *et. al.*, 2017 yaitu isolasi dari jamur *Tolypocladium inflatum* yang berada di tanah Norwegia merupakan salah satu derivatnya tetrapeptida Ser-Pro-Lys-Thr yang memperhitungkan aktivitas antioksidan

Berdasarkan data diatas, maka dilakukan penelitian mengenai sintesis tetrapeptida dengan urutan asam amino Ser-Pro-Lys-Thr sebagai kandidat antioksidan. Sintesis tetrapeptida yang dilakukan secara kimia ini dapat dilakukan sebagai alternatif dari ekstraksi bahan alam dan untuk mendapatkan suatu senyawa yang mempunyai aktivitas farmakologi yang sama. Adapun keuntungan lainnya yaitu pelarut yang digunakan sedikit sehingga cocok untuk mendukung *go green*.

Sintesis peptida dilakukan dengan metode sintesis fase padat (*solid phase peptide synthesis*) menggunakan Fmoc-asam amino, suatu metode sintesis peptida yang efektif, cepat dan sederhana (Irwansyah, 2010).

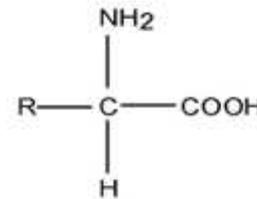
Berdasarkan uraian diatas, maka rumusan masalah pada penelitian ini yaitu bagaimana cara mensintesis tetrapeptida Ser-Pro-Lys-Thr dengan metode *solid phase peptide synthesis* dan menguji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mensintesis tetrapeptida Ser-Pro-Lys-Thr menggunakan metode *solid phase peptide synthesis* dengan dideteksi oleh instrumen HPLC dan dikarakterisasi dengan spektrometer massa.

Manfaat dari penelitian ini yaitu dapat memberikan alternatif bahwa tetrapeptida Ser-Pro-Lys-Thr yang disintesis dengan metode *solid phase peptide synthesis* (SPPS) akan menghasilkan obat antioksidan untuk menstabilkan suatu senyawa radikal bebas.

## 2 LANDASAN TEORI

Asam amino adalah suatu asam karboksilat yang terdiri atas atom karbon yang terikat dengan suatu gugus karboksil (-COOH), gugus amino (-NH<sub>2</sub>), satu gugus hidrogen (-H) dan satu gugus radikal (-R) atau rantai samping. Terdapat 20 asam amino yang berbeda-beda dimana asam amino mempunyai struktur dasar yang sama dan rantai cabang pada suatu sisinya yang berbeda jenis asam amino sehingga sifatnya berbeda. Sifat asam amino ada yang nonpolar, polar dan ionik



(Subandiono, 2016).

Gambar 1. Struktur asam amino (Subandiono, 2016).

Peptida adalah suatu molekul yang terbentuk dari dua asam amino atau lebih. Ikatan kovalen terbentuk dari beberapa molekul asam amino, yaitu dari gugus karboksil yang bereaksi dengan gugus amina dari asam amino yang lain disebut ikatan peptida (Komarudin, 2015).

Sintesis peptida fase padat (SPPS) dilakukan dengan arah sintesis dari gugus karboksil C-terminal ke gugus amina N-terminal. Dengan menggunakan penyangga yaitu resin sebagai penyangga untuk mendapatkan peptida yang diinginkan. Asam amino yang digunakan gugus aminanya terlindungi dengan Fmoc dan rantai sampingnya dilindungi oleh gugus pelindung yaitu tert-butiloksikarbonil (t-Boc) dan tert-butil (tBu) sifatnya labil terhadap asam dan yang labil terhadap basa yaitu Fmoc. Setelah gugus pelindung ini dihilangkan, asam amino terdeproteksi bertujuan untuk menyediakan sisi aktif NH<sub>2</sub> yang akan berikatan dengan asam amino lainnya. Berikutnya asam amino kedua ditambahkan ke dalam reaksi dengan menggunakan suatu reagen pengaktif (kopling reagen) proses tersebut diulang sampai terbentuk peptida yang diinginkan. Kemudian pemutusan peptida dari resin dengan cara dengan cara menambahkan asam kuat sehingga nantinya akan didapat suatu sampel senyawa peptida (Miriam, 2013).

DPPH adalah radikal bebas yang tidak stabil berwarna ungu. Ketika direduksi oleh antioksidan

akan berwarna kuning. Prinsip metode DPPH adalah interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH akan menetralkan radikal bebas dari DPPH. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning dengan jumlah elektron yang ditangkap dan diukur absorbansinya pada 517 nm (Sanchez, 2002).

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran. Beberapa asam amino yang digunakan yaitu Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH dan Fmoc-Thr(tBU)-OH dengan menggunakan metode *solid phase peptide synthesis* (SPPS) yang terdiri dari beberapa tahap, yaitu pengkondisian tabung reaktor, pengembangan resin, pengkoplingan asam amino pertama pada resin bertujuan sebagai penyangga. Selanjutnya *capping* resin bertujuan untuk menutupi gugus aktif pada resin agar tidak berikatan dengan asam amino lain. Selanjutnya dilakukan uji kloranil yang bertujuan untuk memastikan keberhasilan pengkoplingan ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada suatu sampel.

Selanjutnya dilakukan pelepasan gugus pelindung Fmoc (deproteksi) yang bertujuan untuk pengikatan antara asam amino satu dan asam amino berikutnya. Lalu dilakukan uji kloranil yang bertujuan mengetahui pelepasan gugus pelindung Fmoc (deproteksi) sudah lepas dengan ditandai perubahan warna pada suatu sampel.

Setelah itu dilakukan pengkoplingan asam amino kedua dan pelepasan gugus pelindung Fmoc (deproteksi), tahapan ini diulang sampai asam amino terbentuk tetrapeptida. Setelah itu dilakukan pelepasan tetrapeptida dari resin, setelah resin terlepas dari tetrapeptida dilakukan proses pemekatan dan pengeringan tetrapeptida menggunakan *rotary evaporator* yang bertujuan untuk menghilangkan pelarut pada sampel tetrapeptida. Selanjutnya didinginkan dengan menggunakan desikator.

Tahapan selanjutnya dilakukan karakterisasi dengan spektrofotometer massa yang bertujuan memastikan bentuk senyawanya dan melihat bobot molekul dari struktur tetrapeptidanya berdasarkan pola fragmentasinya yaitu masa per

muatan ion ( $m/z$ ). Kemudian dilakukan uji kemurnian dengan menggunakan RP-HPLC untuk memastikan kemurnian dari senyawanya dengan melihat puncak waktu retensinya. Selanjutnya dilakukan pengujian antioksidan dengan menggunakan metode DPPH yang bertujuan untuk mendapatkan nilai IC<sub>50</sub>.

## 3 HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan sintesis tetrapeptida dengan menggunakan metode *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS). Metode ini dipilih karena memiliki beberapa keuntungan yaitu cepat, sederhana dan dapat menghasilkan suatu produk yang lebih murni (Chan & White, 2000). Sedangkan penggunaan resin 2-klorotritil klorida sebagai penyangga pada proses sintesis. Resin ini dipilih karena gugus aktifnya dapat meruah sehingga dapat mengoptimalkan pengikatan sisi aktif antara resin dengan asam amino yang akan direaksikan pada tahapan selanjutnya. Penggunaan reagen pada metode ini diantaranya HBTU dan HOBt sebagai reagen pengkopling pada setiap penyusunan rangkaian asam amino Thr-Lys-Pro-Ser. Reagen HBTU merupakan reagen pengkoplingan untuk sintesis peptida berbasis Fmoc. Selain itu juga HBTU merupakan reagen yang efisien dengan sedikit rasemisasi tetapi reagen ini pada proses reaksinya membentuk N yang kurang reaktif. Sedangkan reagen HOBt sebagai reagen pengkopling lainnya untuk mencegah terjadinya rasemisasi dan menjadikan gugus-N yang lebih reaktif sehingga dapat mempercepat jalannya suatu reaksi (Subiros, et. al., 2009).

### Pengkoplingan Asam Amino Pertama

Pada sintesis tetrapeptida ini asam amino pertama yang dikopling yaitu asam amino serin menggunakan Fmoc-Ser(tBu)-OH. Gugus amino pada terminal-N telah dilindungi oleh Fmoc agar tidak mengganggu pada proses reaksi, gugus hidroksi terminal-C telah dilindungi oleh tersier butil (*t*-Bu). Pengikatan asam amino serin pada resin 2-klorotritil klorida diawali dengan cara

ditambahkan larutan DIPEA. Penggunaan DIPEA berfungsi sebagai reagen pada proses pengikatan asam amino dengan resin.

Tahapan selanjutnya *Loading* resin yang bertujuan untuk menentukan jumlah asam amino yang akan ditimbang pada tahap selanjutnya. Hasil Absorbansi yang diperoleh sebesar 1,383 A, kemudian dihitung dengan menggunakan persamaan yang diperoleh hasilnya sebesar 0,1788 mmol/mg. Nilai rata-rata *loading* yang baik adalah 0,1-1,3 mmol/mg menandakan bahwa peptida yang terikat pada resin baik. Jika nilai *loading* melebihi rata-rata dapat menyebabkan proses penyusunan peptida lebih sulit dan dapat terjadinya potensi agregasi asam amino semakin besar (Maharani, *et. al.*, 2016).

*Capping* resin sampel yang mengandung resin dan Fmoc-Ser(tBu)-OH ditambahkan metanol : DCM : DIPEA (2:7:1). Hal ini dilakukan untuk menutupi sisi aktif asam amino yang tidak berikatan dengan resin pada asam amino pertama sehingga dapat mencegah asam amino selanjutnya dapat berikatan dengan sisi aktif resin (Chan, 2000).

Selanjutnya dilakukan proses deproteksi gugus pelindung Fmoc asam amino berfungsi untuk menyediakan sisi aktif asam amino pertama yang nantinya akan bereaksi dengan asam amino kedua. Deproteksi dengan menggunakan basa karena gugus pelindung Fmoc sifatnya labil terhadap basa maka ditambahkan DBU 10%. Selanjutnya dilakukan uji kloranil untuk melihat keberhasilan dari proses deproteksi. Hasilnya yaitu ditandai dengan berubahnya warna resin menjadi warna hijau, karena terdapat gugus amina (-NH<sub>2</sub>) yang bebas.

### Pengkoplingan Asam Amino Kedua, Ketiga dan Keempat

Dilakukan pengkoplingan asam amino kedua yaitu Fmoc-Pro-OH dengan menggunakan reagen HBTU, HOBt dan DIPEA dipilih karena efisien, cepat, dapat menjadikan gugus-N lebih reaktif dan dapat mencegah terjadinya rasemisasi. Uji keberhasilan pengkoplingan dengan dilakukan uji kloramil kembali. Hasilnya tidak mengalami perubahan warna (kuning) disebabkan karena tidak ada gugus NH<sub>2</sub> yang bebas (Subiros, *et. al.*, 2009).

Deproteksi Fmoc asam amino kedua untuk menyediakan sisi aktif asam amino tersebut yang nantinya akan berikatan dengan asam amino ketiga Fmoc-Lys(Boc)-OH dan keempat Fmoc-Thr(tBu)-

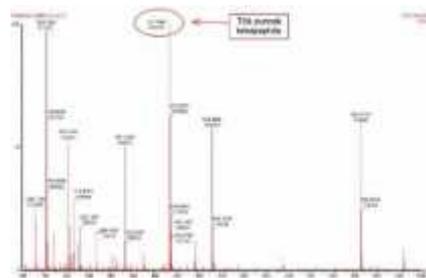
OH secara berurutan sampai terbentuk tetrapeptida pada resin.

### Pelepasan Tetrapeptida dari Resin

Pelepasan tetrapeptida dari resin dilakukan dengan penambahan TFA 95% dalam air. TFA 95% dipilih karena resin dan gugus pelindung rantai samping seperti t-Bu dan Boc sifatnya labil terhadap penambahan asam. Air dalam reaksi ini bertindak sebagai *scavenger* karbokation yang terbentuk setelah pelepasan peptida dari resin. Didapat hasilnya berupa larutan berwarna merah gelap. Selanjutnya dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampel yang didapat 162,4 mg.

### Hasil Spektrofotometer Massa

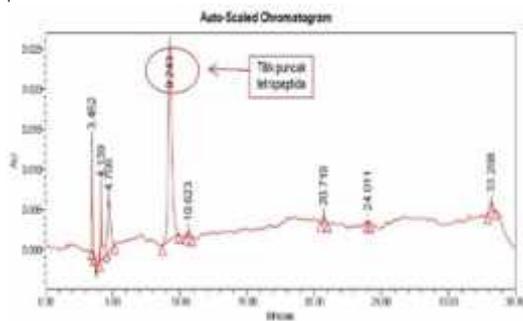
Hasil dari proses karakterisasi menggunakan spektrofotometer massa didapatkan puncak fragmen pada  $m/z$  431, puncak ini mengindikasikan puncak ion  $[M+H]^+$  untuk tetrapeptida. Hasil teoritis yang didapat untuk asam amino treonin, lysin, prolin dan serin menggunakan software *chemdraw* didapat rumus kimia C<sub>18</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> dengan bobot molekul  $m/z$  431.



Gambar 2. Hasil Spektrofotometer Massa Tetrapeptida

### Hasil RP-HPLC

Selanjutnya dilakukan proses RP-HPLC menggunakan fase diam ODS yang bergugus non-polar dan fase gerak polar karena tetrapeptida sifatnya polar sehingga nantinya akan terelusi pertama kali yang ditunjukkan dikromatogramnya. Berdasarkan dari hasil kromatogram bahwa sampel tetrapeptida belum murni karena masih banyak puncaknya. Maka dilakukan deproteksi dan dievaporasi kembali sampel tetrapeptida diperoleh sebanyak 111,4 mg dan dilakukan RP-HPLC kembali. Hasil kromatogram didapat waktu retensi pada menit ke 9,243 membentuk satu puncak. Sampel tetrapeptida ini disebut murni karena hanya terdapat satu puncak.



Gambar 3. Hasil Kromatogram RP-HPLC Tetraperpeptida

### Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH untuk melihat seberapa kuat suatu sampel dalam menangkal radikal bebas.

Tabel 1. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Sampel Tetraperpeptida

Konsentrasi (ppm)	% INH	ABS
0	0	0.7447
1700	15.2813	0.6485
3400	22.6131	0.589
5100	31.798	0.5338
6800	38.0287	0.4826
8500	45.2397	0.4289
IC 50	9057.67	
Rata-rata	9441.03	

Hasil dari pengujian aktivitas antioksidan metode DPPH, didapat nilai inhibisi sebesar 45% yang menandakan bahwa aktifitas antioksidan dari senyawa tetrapeptida tersebut lemah karena tidak mencapai nilai  $IC_{50}$  maka sampel tersebut kurang aktif dalam menangkal radikal bebas tetapi masih berposisi sebagai antioksidan jika jumlah sampelnya banyak, konsentrasinya dinaikan menjadi 9047,67. Adapun hal lain yang menyebabkan antioksidan menjadi lemah karena terdapat asam amino lysin yang bersifat ionik sehingga menurunkan aktifitas antioksidan pada asam amino serin dan prolin (Zou, *et. al.*, 2016).

Untuk pembandingan dari uji aktivitas antioksidan menggunakan Vitamin C karena sifatnya yang larut dalam air dan vitamin C merupakan antioksidan yang sangat kuat.

Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas Pembandingan Vitamin C

Konsentrasi (ppm)	% INH	ABS
0	0	0.8298
1	8.7491	0.7572
2	21.1135	0.6546
3	37.2861	0.5204
4	53.4466	0.3863
5	65.0759	0.2898
IC 50	3.90209	
Rata-rata	3.97049	

Dari hasil uji aktivitas antioksidan vitamin C memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 3.902  $\mu\text{g/mL}$ , yang menandakan bahwa antioksidan yang terkandung dalam vitamin C sangat kuat karena  $< 50 \mu\text{g/mL}$  (Molyneaux, 2004).

## 4 KESIMPULAN

Senyawa tetrapeptida Ser-Pro-Lys-Thr berhasil disintesis menggunakan metode *solid phase peptide synthesis* (SPPS) menghasilkan sebanyak 111,4 mg. Selanjutnya dilakukan karakterisasi dengan menggunakan spektrofotometer massa munculnya puncak fragmen pada  $m/z$  431 yang menandakan puncak ion  $[M+H]^+$ . Setelah itu dilakukan pengujian menggunakan RP-HPLC untuk melihat kemurnian dari senyawa tetrapeptida didapat waktu retensinya pada menit ke 9,243 yang ditandai dengan adanya satu puncak.

Uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH didapat nilai inhibisi sebesar 45 % yang artinya tidak mencapai nilai  $IC_{50}$  sehingga aktivitas antioksidan dari senyawa tersebut lemah tetapi masih berpotensi sebagai kandidat antioksidan.

## SARAN

Pada penelitian ini dilakukan sampai terbentuk tetrapeptida sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut sampai terbentuk tetrapeptida siklik sebagai perbandingan kestabilannya. Pengujian aktivitas senyawa tetrapeptida perlu dilakukan kembali uji aktivitas antioksidan dengan metode yang lebih sensitif seperti metode ABTS dan pembandingan yang digunakan untuk pengujian aktivitas antioksidan disarankan menggunakan senyawa yang memiliki mekanisme yang sama dengan antioksidan peptida. Pengujian aktivitas senyawa tetrapeptida bisa juga

dilakukan uji aktivitas antibakteri karena pada urutan asam amino yang digunakan terdapat asam amino lysin yang aktif terhadap aktivitas antibakteri.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Agnieszka, S., Kowalewska, M. G., Cholewiski, G., Dzierzbicka, K. (2017). *Review Article Tufsin-Properties and Analogs*. Poland: Department of Organic Chemistry. Gdansk University of Technology, Narutowicza St 11/12, PL 80-233 Gdansk.
- Budimarwanti, C. (2009). *Penyediaan senyawa berkhasiat obat secara sintesis dengan analisis retrosintesis*. Yogyakarta: Jurnal kimia FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta.
- Chan, W.C.A., White, P.D. (2000). *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Oxford University press, New York, 2: 11-36, 3: 61-72.
- Irwansyah. (2010). *Studi Struktur Self-Asembly Peptida Ampifil*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Khopkar, S.M. (1990). *Konsep Dasar Kimia Analitik* Jakarta: UI-Press.
- Komarudin, O. (2015). *Big Book Kimia SMA Kelas 1,2&3*. Jakarta: Cmedia.
- Maharani, R., Sumiarsa, D., Marpaung, C., Zainuddin, A., Hidayat, A. T., Harneti, D., Nurlelarsi, Supratman, U. (2019). Sintesis Tetrapeptida PADY menggunakan Metode Fasa Padat dan Aktivitas Antioksidannya. *Jurnal Kimia Valensi*. Bandung: Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran.
- Miriam, G. B., Judit, T. P., Fernando, A. (2013). Handles for Fmoc Solid-Phase Synthesis of Protected Peptides. *ACS Combinatorial Science*. 15: 217–228.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radikal diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal Science of Technology* 26(2): 211- 219.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Rodwell, V. W. (2009). *Biokimia harper (27 ed.)*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Sanchez, M., C. (2002) Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food SciTechnol Int* 8(3):121–137.