

Sintesis Tetrapeptida Linier *Gly-Phe-Gly-Cys* (GFGC) sebagai Kandidat Antibakteri dengan Metode *Solid Phase Peptide Synthesis*

Rania Saida Afipah, Nety Kurniaty, Hilda Aprilia Wisnuwardhani

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

email: raniaafph@gmail.com, netykurniaty@yahoo.com, hilda.aprilia@gmail.com

ABSTRACT: Gly-Phe-Gly-Cys (GFGC) linear tetrapeptides have been successfully synthesized by the Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) method using a solid phase buffer 2-chlorotriethyl chloride resin. The use of Fmoc protected amino acids was chosen in this study. In the preparation of linear tetrapeptide ingredients, a combination of HBTU and HOBt coupling reagent is used. Chlorine test was carried out to ensure the success of amino acid coding and Fmoc deprotection. After obtaining the arrangement of linear tetrapeptide fragment in the resin, a trifluoroacetat (TFA) solution was added to the aquadest to release the resin from the GFGC linear tetrapeptide. The linear tetrapeptide obtained was evaporated using a rotary evaporator and analyzed using a Mass Spectrometer instrument marked by the emergence of molecular ion peaks $[M-H]^+$ m/z 647,236 for GFGC linear tetrapeptide compounds which have side protective groups and molecular ion peaks $[M-H]^+$ m/z 383,151 for GFGC linear tetrapeptide without side protective groups and their purity was seen using a Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) instrument characterized by the appearance were still impure and needed to be purified.

Keywords: Peptide synthesis, GFGC tetrapeptide, Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS), Antibacterial

ABSTRAK: Tetrapeptida linier *Gly-Phe-Gly-Cys* (GFGC) telah berhasil disintesis dengan metode *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS) menggunakan suatu penyangga fase padat yaitu resin 2-klorotrietil klorida. Penggunaan asam amino terlindung Fmoc dipilih pada penelitian ini. Pada penyusunan fragmen tetrapeptida linier digunakan suatu reagen pengkopling kombinasi HBTU dan HOBt. Dilakukan uji kloranil untuk memastikan keberhasilan pengkoplingan asam amino dan deproteksi Fmoc. Setelah diperoleh susunan fragmen tetrapeptida linier pada resin, ditambahkan larutan trifluoroasetat (TFA) dalam aquadest untuk pelepasan resin dari tetrapeptida linier GFGC. Tetrapeptida linier yang diperoleh dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dan dianalisis menggunakan instrumen Spektrometer Massa yang ditandai dengan munculnya puncak ion molekul $[M-H]^+$ m/z 647,236 untuk senyawa tetrapeptida linier GFGC yang memiliki gugus pelindung samping dan puncak ion molekul $[M-H]^+$ m/z 383,151 untuk tetrapeptida linier GFGC tanpa gugus pelindung samping serta dilihat kemurniannya menggunakan instrumen *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) yang ditandai dengan munculnya kromatogram dengan banyaknya puncak-puncak minor yang menandakan tetrapeptida linier GFGC masih belum murni dan perlu dilakukan pemurnian

Kata Kunci: Sintesis peptida, tetrapeptida GFGC, *Solid Phase Peptida Synthesis* (SPPS), Antibakteri

1 PENDAHULUAN

Infeksi bakteri merupakan salah satu penyakit yang sering terjadi di Indonesia yang merupakan daerah tropis. Keadaan tersebut didukung oleh beberapa hal seperti keadaan udara yang berdebu, temperatur yang hangat dan lembab yang dapat menyebabkan pertumbuhan mikroba menjadi lebih cepat, serta keadaan sanitasi yang kurang baik juga dapat menyebabkan suatu penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri menjadi lebih

mudah berkembang (Wattimena, 1991).

Dalam menangani penyakit yang disebabkan karena infeksi bakteri dapat digunakan antibakteri yang merupakan suatu senyawa yang dapat menghambat ataupun membunuh bakteri. Secara umum antibakteri bekerja dengan cara merusak dinding sel, menghambat kerja enzim, mengganggu sintesis protein, dan mengubah permeabilitas membran (Septiani, *et. al.*, 2017).

Senyawa kimia yang bersumber dari bahan alam banyak yang memiliki khasiat sebagai

Sintesis peptida dilakukan dengan menggunakan suatu metode *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS) dimana metode ini digunakan secara luas untuk memperoleh suatu peptida bahkan protein (Chan dan White, 2000). Dalam mengerjakan sintesis peptida fase padat dilakukan dengan menambahkan beberapa asam amino secara bergantian dimana gugus amina dan rantai samping dari asam amino yang digunakan telah terlindungi secara berurutan pada suatu polimer yang tidak larut. Penggunaan aditif untuk mendukung berbagai metode reaksi kopling sering digunakan dalam penelitian sintesis peptida fase padat (Subiros-Funosas *et al*, 2006).

Dalam melakukan sintesis peptida dengan metode *Solid Phase Peptide Synthesis* digunakan suatu penyangga yaitu resin 2-klorotritil klorida dimana resin ini merupakan resin yang terbaik dari terminal C suatu peptida asam. Resin 2-klorotritil klorida memiliki keuntungan yaitu dapat melepaskan peptida pada kondisi asam lembut (1% asam trifloroetanol) dan meminimalkan resensasi pada saat dilakukan pengkoplingan asam amino pertama (Chan and White, 2000).

Antibakteri merupakan suatu senyawa atau obat yang dapat membasmi bakteri, khususnya yaitu bakteri patogen yang dapat merugikan manusia. Antibakteri dihasilkan oleh suatu mikroba yang dapat menghambat pertumbuhan atau bahkan membunuh mikroba lain. Obat yang digunakan sebagai antibakteri harus memiliki ketentuan yaitu memiliki sifat toksisitas yang tinggi. Mekanisme antibakteri terbagi menjadi beberapa cara diantaranya dengan merusak dinding sel bakteri, merubah permeabilitas sel, merubah molekul protein dan asam nukleat, menghambat kerja enzim serta menghambat sintesis asam nukleat protein (Pelczar dan Chan, 1998).

Adanya daya hambat pada antibakteri dapat ditentukan dengan mengetahui nilai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum). KHM merupakan

antibakteri, salah satunya adalah golongan flavonoid yang terkandung dalam suatu tanaman. Namun, untuk memperoleh isolat murni dari suatu tanaman maka harus dilakukan isolasi terlebih dahulu dimana dalam melakukan isolasi ini diperlukan proses pengerjaan yang lebih panjang sehingga membutuhkan waktu yang lebih lama serta isolat yang diperoleh relatif lebih sedikit. Kemudian diketahui untuk mendapatkan suatu senyawa kimia yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri tidak hanya dapat diperoleh dari hasil isolasi tanaman saja tetapi terdapat cara lain yaitu dengan melakukan sintesis secara kimia.

Berdasarkan uraian di atas, maka dapat ditarik rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana cara mensintesis ikatan tetrapeptida dengan urutan asam amino *Gly-Phe-Gly-Cys* (GFGC) dengan menggunakan metode *Solid Phase Peptide Synthesis*.

Selanjutnya, penelitian ini bertujuan untuk melakukan sintesis *Gly-Phe-Gly-Cys* (GFGC) tetrapeptida linier dengan menggunakan metode *Solid Phase Peptide Synthesis*.

2 LANDASAN TEORI

Asam amino merupakan suatu monomer penyusun protein yang berperan dalam metabolisme tubuh. Asam amino terbagi menjadi dua kelompok yaitu asam amino esensial dan asam amino non esensial (Mandila dan Hadijati, 2013). Asam amino esensial merupakan suatu asam amino yang tidak dapat disintesis sendiri oleh tubuh sehingga untuk mendapatkan asam amino tersebut maka harus diperoleh dari luar tubuh seperti makanan yang menjadi sumber protein, sedangkan asam amino non esensial merupakan asam amino yang dapat disintesis sendiri oleh tubuh manusia. Untuk mengetahui mutu protein maka dapat dilihat dari perbandingan asam-asam amino yang terkandung dalam protein tersebut (Winarno, 2008).

Dalam mengasilkan suatu protein maka gugus karboksilat dari satu asam amino akan berikatan dengan gugus amina dari asam amino lain membentuk suatu ikatan peptida. (Winarno, 2004). Ikatan peptida memiliki sifat yang sangat stabil sehingga untuk melakukan hidrolisis kimia dibutuhkan kondisi yang sangat ekstrim. Namun di dalam tubuh ikatan peptida dapat diurai oleh enzim proteolitik atau disebut juga dengan enzim protease atau peptidase (Dawn *et al*, 2000). Asam

suatu konsentrasi terkecil dari antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan KBM merupakan konsentrasi minimal yang dapat membunuh 99,9% pertumbuhan bakteri (Forbes, et., al., 2007). Suatu zat dikatakan berpotensi tinggi sebagai antibakteri apabila memiliki daya hambat yang besar pada konsentrasi yang rendah.

Obat yang berasal dari peptida memiliki keunggulan, yaitu menghasilkan aktivitas yang lebih tinggi serta dapat berkerja dengan lebih spesifik. Selain itu, interaksi antara obat satu dengan obat yang lain menjadi lebih berkurang dan memiliki toksisitas yang lebih rendah karena tidak terakumulasi di dalam jaringan tubuh (Winarno, 2008).

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran Bandung dengan menggunakan beberapa asam amino, diantaranya yaitu Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Phe-OH, dan Fmoc-Cys (trt)-OH. Metode yang dipilih pada penelitian ini adalah *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS) dimana proses pengerjaannya terbagi menjadi beberapa tahap, yaitu pengkondisian tabung reaktor yang bertujuan untuk memastikan tabung reaktor yang akan digunakan bersih dan bebas dari pengotor yang dapat mempengaruhi sintesis, kemudian dilakukan pengembangan resin dengan tujuan untuk membuka sisi aktif dari resin sehingga dapat berikatan dengan asam amino.

Selanjutnya dilakukan pengikatan asam amino pertama pada resin dimana resin ini berfungsi sebagai penyangga fase padat, kemudian dilakukan *loading resin* untuk mengetahui jumlah asam amino yang telah terikat pada resin serta untuk menentukan jumlah asam amino selanjutnya yang akan ditambahkan. Kemudian dilakukan *capping resin* yang bertujuan untuk menutup gugus aktif resin yang mungkin tidak berikatan dengan asam amino pertama sehingga tidak dapat berikatan dengan asam amino lain.

Kemudian dilakukan pelepasan gugus Fmoc pada asam amino pertama agar dapat berikatan dengan asam amino berikutnya dan membentuk ikatan peptida, selanjutnya dilakukan uji kloranil untuk memastikan Fmoc telah terlepas yang ditandai dengan terbentuknya warna ungu pada butir resin.

Kemudian dilakukan penyusunan fragmen peptida dan dilakukan uji kloranil kembali untuk memastikan telah terbentuknya ikatan peptida antar asam amino yang ditandai dengan tidak adanya warna pada butir resin. Kemudian dilakukan pelepasan resin pada tetrapeptida linier dengan menambahkan suatu asam, selanjutnya pemekatan menggunakan *rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarut, kemudian dianalisis menggunakan spektrometer massa dengan melihat nilai m/z dilanjutkan dianalisis dengan RP-HPLC untuk melihat kemurniannya.

3 HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Pengkondisian Tabung Reaktor dan Pengembangan Resin

Dilakukan pengkondisian tabung reaktor dengan cara mencuci tabung menggunakan DCM untuk memastikan tabung reaktor bersih kemudian dikeringkan dengan *R-Compressor*. Selanjutnya dilakukan pengembangan resin dengan menimbang 300 mg resin yang merupakan penyangga fase padat kemudian dilarutkan dengan DCM agar sisi aktif dari resin dapat terbuka sehingga dapat bereaksi dan berikatan dengan asam amino yang ditambahkan.

Pengikatan Asam Amino Fmoc-Cys(trt)-OH pada Resin

Fmoc-Cys(trt)-OH yang telah dilarutkan menggunakan DCM dan DIPEA selanjutnya direaksikan dengan resin dimana reaksi terjadi diawali dengan pengikatan atom H dari gugus karboksil asam amino oleh DIPEA yang bersifat basa nitrogen yang akan menghasilkan suatu nukleofil dan nukleofil tersebut akan berikatan dengan gugus Cl pada resin. Kemudian dilakukan *loading resin* dengan mengukur absorbansi menggunakan Spektrometer UV pada panjang gelombang 290 nm untuk mengetahui jumlah asam amino yang berikatan dengan resin dan untuk menentukan jumlah asam amino selanjutnya yang akan ditambahkan.

Setelah dilakukan *loading resin* diketahui bahwa tidak semua gugus aktif dari resin berikatan dengan asam amino yang ditambahkan maka selanjutnya harus dilakukan *capping resin* yang bertujuan untuk menutup sisi aktif dari resin agar tidak berikatan dengan asam amino lain dan hanya berikatan dengan asam amino pertama saja.

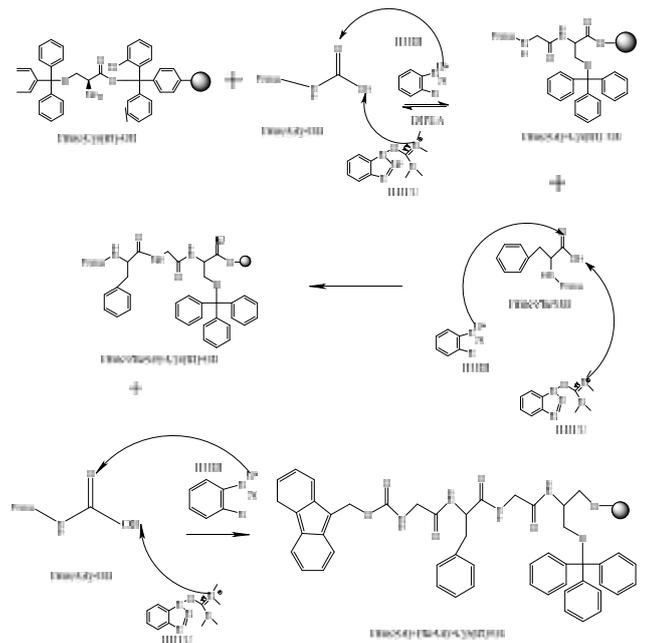
Capping resin dilakukan dengan menambahkan larutan metanol : DCM : DIPEA (2:7:1) (v/v/v) dimana DIPEA akan mengambil gugus OH dari metanol sehingga menghasilkan elektron bebas yang akan berikatan dengan resin dan menutup sisi aktifnya sedangkan DCM bertindak sebagai pelarut.

Deproteksi Gugus Pelindung Fmoc

Deproteksi dilakukan dengan menambahkan larutan DBU 10 % yang bersifat basa karena Fmoc yang melindungi gugus amina dari asam amino diketahui bersifat tidak stabil terhadap basa sehingga dengan menambahkan basa maka ikatan tersebut akan terlepas. Gugus pelindung Fmoc pada asam amino harus dilepaskan agar gugus karboksilat dari asam amino selanjutnya yang akan ditambahkan dapat berikatan dengan gugus amina dari asam amino sebelumnya sehingga akan membentuk ikatan peptida. Selanjutnya dilakukan uji kloranil untuk memastikan bahwa Fmoc telah terlepas sempurna dari asam amino dengan menambahkan larutan kloranil dan aldehyd dimana keberhasilan dari deproteksi Fmoc ditandai dengan adanya perubahan warna pada butir resin dari kuning menjadi ungu, perubahan warna tersebut disebabkan karena adanya gugus $-NH_2$ bebas sehingga gugus tersebut akan berikatan dengan larutan kloranil dan menghasilkan perubahan warna.

Penyusunan Fragmen Tetrapeptida Linier

Penyusunan fragmen tetrapeptida linier dilakukan dengan cara yang sama seperti pada menambahkan asam amino pertama. Namun, pada asam amino kedua hingga keempat yaitu Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Phe-OH dan Fmoc-Gly-OH ditambahkan suatu reagen pengkopling yaitu kombinasi HBTU dan HOBt. Penggunaan HBTU karena termasuk reagen kopling yang menunjukkan hasil yang baik sedangkan HOBt diketahui dapat meningkatkan rendemen yang dihasilkan. Selain itu, penggunaan HBTU dan HOBt akan mengaktifasi gugus OH pada asam amino dimana gugus OH merupakan *leaving group* yang buruk sehingga dengan ditambahkan dengan kombinasi reagen kopling tersebut akan membuat gugus OH pada asam amino menjadi lebih mudah terlepas sehingga asam amino yang satu akan lebih mudah berikatan dengan asam amino lainnya dan menghasilkan fragmen tetrapeptida dengan urutan asam amino



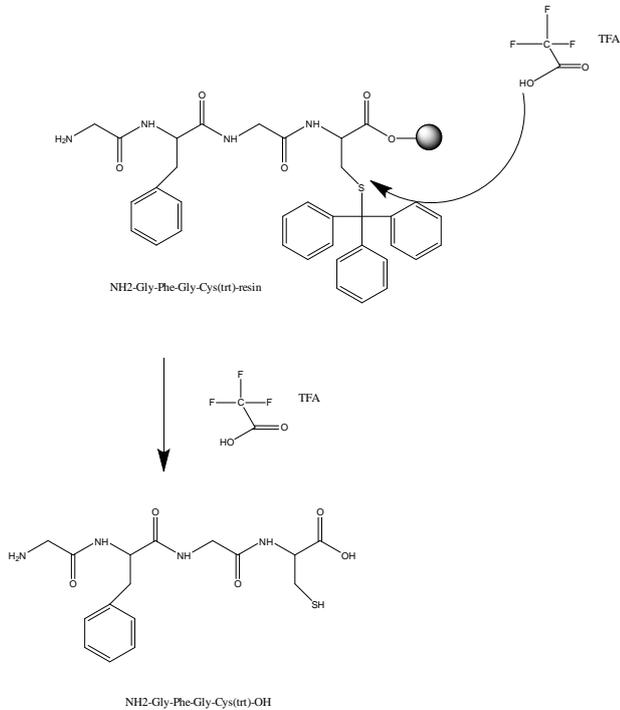
Gambar 4.1 Penyusunan fragmen tetrapeptida linier

Dalam melakukan penyusunan fragmen tetrapeptida, setiap setelah menambahkan satu asam amino maka harus selalu dilakukan uji kloranil untuk memastikan telah terbentuknya ikatan peptida dimana uji kloranil dilakukan dengan prosedur yang sama seperti pada saat deproteksi Fmoc namun kali ini keberhasilannya ditandai dengan tidak terbentuknya warna pada butir resin yang disebabkan karena tidak adanya gugus $-NH_2$ bebas sehingga tidak akan berikatan dengan larutan kloranil yang menyebabkan tidak menghasilkan perubahan warna.

Pelepasan Tetrapeptida Linier dari Resin

Pelepasan resin dilakukan untuk menghasilkan tetrapeptida yang murni tanpa adanya ikatan dengan yang lain. Dilakukan dengan menambahkan larutan TFA 95 % dalam aquadest dimana TFA diketahui bersifat asam sedangkan resin yang digunakan bersifat basa sehingga dengan ditambahkan asam maka akan membentuk reaksi asam basa yang membuat resin tersebut menjadi garam dan larut di dalam air. Selain dapat memutuskan resin dari tetrapeptida TFA juga dapat melepaskan gugus pelindung samping pada *Cystein* yaitu tritil (trt) yang melindungi gugus $-SH$ dari asam amino tersebut

dimana -SH termasuk ke dalam gugus reaktif apabila tidak dilindungi dikhawatirkan akan berikatan dengan senyawa lain yang akan mempengaruhi hasil sintesis dengan hal tersebut maka dalam satu kali pengerjaan akan memutuskan dua ikatan sekaligus sehingga akan meminimalisir waktu pengerjaan dan penggunaan bahan.



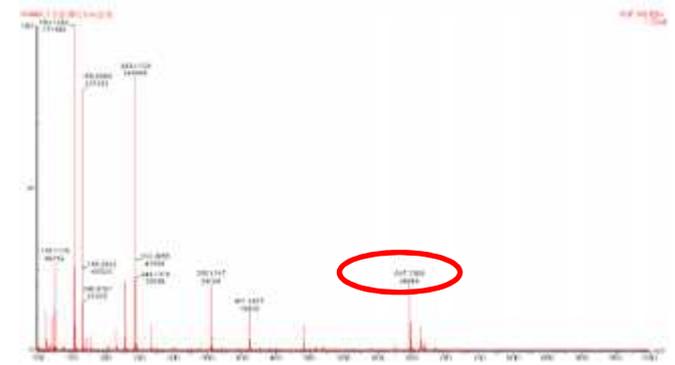
Gambar 4.2 Pelepasan resin dari tetrapeptida linier

Lepasnya resin dari tetrapeptida ditandai dengan adanya perubahan warna resin dari kuning menjadi merah gelap (Chan and White, 2000). Selanjutnya tabung reaktor yang berisi resin dan tetrapeptida dibilas menggunakan DCM dimana hasil bilasan tersebut ditampung menggunakan vial yang telah ditimbang sebelumnya dan dilakukan evaporasi menggunakan rotary evaporator hingga membentuk serbuk berwarna putih, selama proses evaporasi harus sering ditambahkan DCM ke dalam vial karena TFA agak sulit menguap sehingga dengan adanya DCM akan mempercepat proses penguapan.

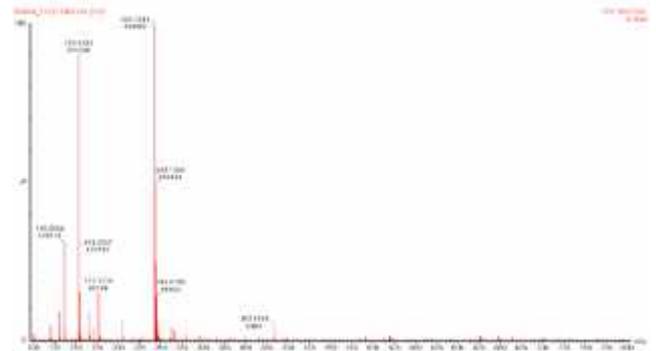
Pemurnian Tetrapeptida

Tetrapeptida hasil evaporasi yang telah terbentuk selanjutnya diambil sebanyak 1 mg dan dilarutkan dengan 1 mL metanol untuk dilakukan analisis menggunakan Spektrometer Massa dengan melihat nilai m/z dimana hasil analisis akan menunjukkan puncak-puncak kromatogram

seperti yang terlihat pada **Gambar 4.3** dan **Gambar 4.4**.



Gambar 4.3 Hasil karakterisasi tetrapeptida GFGC dengan gugus pelindung samping



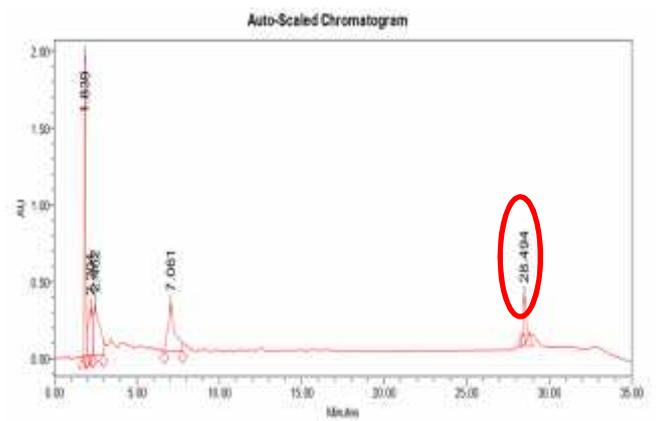
Gambar 4.4 Hasil karakterisasi tetrapeptida GFGC tanpa gugus pelindung samping

Berdasarkan dari hasil analisis Spektrometer Massa diketahui bahwa untuk tetrapeptida GFGC yang masih memiliki gugus pelindung samping memiliki nilai m/z 647,236 dimana hasil tersebut menunjukkan perlu dilakukan pelepasan resin kembali yang dilakukan dengan fasa larutan untuk melepaskan gugus pelindung samping yang masih menempel yaitu dengan menambahkan TFA 95 % kembali. Setelah dilakukan pelepasan resin dengan fasa larutan maka dilakukan analisis kembali dengan Spektrometer Massa dan diketahui nilai m/z dari tetrapeptida berkurang menjadi 383,151 yang menunjukkan bahwa gugus pelindung samping dari asam amino Cystein telah terlepas sehingga nilainya menjadi lebih kecil.

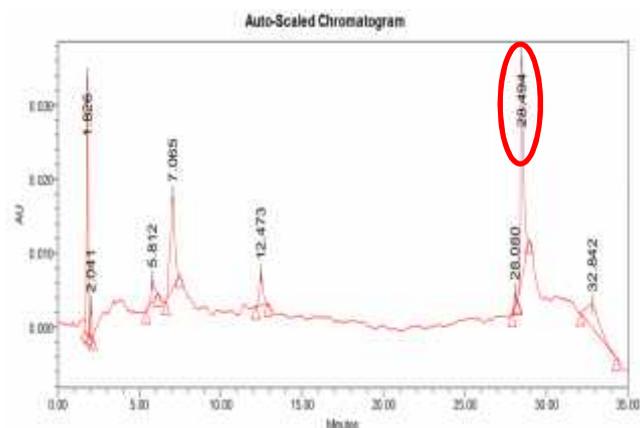
Selanjutnya analisis kembali dengan menggunakan RP-HPLC dengan menimbang 1 mg serbuk hasil evaporasi dan dilarutkan dengan 1 mL metanol yang bertujuan untuk melihat kemurnian dari terapeptida yang diperoleh.

Pemilihan fase balik disebabkan karena peptida memiliki banyak gugus polar yang dapat berikatan dengan gugus silanol dari *silica gel* pada kolom C-18 sehingga akan membentuk ikatan hidrogen yang akan mempengaruhi kromatogram yang dihasilkan dimana kromatogram tersebut akan membentuk ekor yang lebar dan mengakibatkan peptida tidak terpisah dengan baik dari pengotornya.

Fase gerak yang digunakan pada analisis RP-HPLC adalah asetonitril : air (1:1) (v/v) dengan buffer TFA 0,1 % selama 30 menit dengan detektor PDA pada panjang gelombang 210 dan 240 nm. Hasil yang diperoleh pada saat analisis dengan RP-HPLC menunjukkan bahwa tetrapeptida GFGC yang disintesis masih belum murni yang ditandai dengan masih terbentuknya puncak-puncak minor pada kromatogram sehingga perlu dilakukan pemurnian. Hasil analisis RP-HPLC dapat dilihat pada **Gambar 4.5** dan **Gambar 4.6**.



Gambar 4.6 Hasil analisis tetrapeptida GFGC pada panjang gelombang 210 nm



Gambar 4.6 Hasil analisis tetrapeptida GFGC pada

4 KESIMPULAN

Berdasarkan pembahasan dalam penelitian ini, peneliti menyimpulkan beberapa hasil penelitian sebagai berikut:

1. Tetrapeptida linier *Gly-Phe-Gly-Cys* (GFGC) telah berhasil di sintesis dengan menggunakan metode *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS).
2. Berdasarkan hasil karakterisasi menggunakan Spektrometer Massa dengan puncak ion molekul $[M-H]^+$ pada m/z 383,151 untuk tetrapeptida linier GFGC tanpa gugus pelindung samping dan puncak ion molekul $[M-H]^+$ pada m/z 647,236 untuk tetrapeptida linier GFGC yang masih memiliki gugus pelindung samping.
3. Berdasarkan hasil analisis menggunakan RP-HPLC dapat disimpulkan bahwa tetrapeptida linier GFGC yang dihasilkan belum murni yang ditandai dengan terbentuknya puncak-puncak minor pada kromatogram.

SARAN

1. Perlu dilakukan pemurnian pada tetrapeptida GFGC karena hasil yang diperoleh pada saat sintesis belum murni sehingga akan dihasilkan senyawa sintesis tanpa pengotor.
2. Dilakukan siklisasi pada tetrapeptida GFGC hasil sintesis karena tetrapeptida berbentuk siklik tidak mudah terdegradasi oleh enzim protease yang ada di saluran pencernaan.
3. Dilakukan uji aktivitas antibakteri untuk mengetahui seberapa besar aktivitas antibakterinya.

DAFTAR PUSTAKA

- Chan, W.C., White. P.D. (2000). *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York.
- Dawn B.M., Marks, A.D., Smith. C.M. (2000). *Biokimia Kedokteran Dasar*, Sebuah Pendekatan Klinis, 76-95.
- Lubert, Stryer. (2000). *Biochemistry Vol. 3, Edisi 4*. Penerbit Buku Kedokteran, EGC, Jakarta, hal. 17-37.

- Mandila, S.P. dan Hidajati. H. (2013). *Idemtifikasi Asam Amino pada Caicing Utra (Tubifex sp.) yang Diekstrak dengan Pelarut Asam Asetat dan Asam Laktat. UNESA J. of Chemistry*, 2(1): 103-109).
- Pelczar, Michael J., Chan, E.C.S. (1998). *Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid II*. Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Septiani, Eko, N.D., Ima, W. (2017). *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Lamun (Cymodecea rotundata) Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus dan Escherichia coli*, Vol. 13. Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro.
- Subiros-Funosas, R., Prohens, R., Barbas, R., El-Faham, A., Albericio, F. (2006). Oxyma: an efficient additive for peptide synthesis to replace benzotriazol-based HOBt dan HOAt with a lower risk of explosion. *Chem A European Journal*. 15, 9395-9403.
- Winarno, F.G. (2004). *Kimia Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Winarno, F.G. (2008). *Kimia Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, 112hlm.
- Wattimena. (1991). *Farmakodinamik dan Terapi Antibiotik*. Universitas Gajah Mada Press, Yogyakarta.