

# Sintesis Tetrapeptida TSKY (Thr-Ser-Lys-Tyr) Sebagai Kandidat Antibakteri dengan Metode *Solid Phase Peptide Synthesis*

Najib Agung Kurniawan, Nety Kurniaty, Rusnadi

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

*email:najibagungk@gmail.com, netykurniaty@yahoo.com, Rusnadi@chem.itb.ac.id*

**ABSTRACT.** Antibacterial is a compound that is used to inhibit or even kill the growth of harmful bacteria, this antibacterial can prevent the spread of disease and infection, and prevent spoilage. Tetrapeptide synthesis. Thr-Ser-Lys-Tyr (TSKY) tetrapeptide synthesis has been successfully carried out using solid phase peptide synthesis (SPPS) method, in this method used 2-chlorotriyl chloride resin used and used as a buffer for use of amino acid fragments can be used as tetrapeptides. In this manufacturing process the loading of resin, capping resin, chloroilide test, deprotection of Fmoc. Tetrapeptide synthesis that has been formed is characterized using a mass spectrometer using a spectrometer molecule at  $m/z$  498.25 for the manufacture of TSKY tetrapeptides and their purity is also used as a High Reverse Phase Liquid Chromatography Performance (RP-HPLC). Then the activity of antibacterial activity was tested *in vitro* using agar diffusion method. According to the literature, this TSKY tetrapeptide sequence has potential as an antibacterial and has broad spectrum.

**Keywords:** TSKY Tetrapeptide, Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS),

**ABSTRAK.** Antibakteri adalah suatu senyawa yang digunakan untuk menghambat bahkan mematikan pertumbuhan bakteri yang merugikan, dimana antibakteri ini dapat mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, dan mencegah pembusukan. Sintesis tetrapeptida. Thr-Ser-Lys-Tyr (TSKY) telah berhasil dilakukan dengan menggunakan metode *Solid phase peptide synthesis* (SPPS), pada metode ini digunakan resin 2-klorotriyl klorida yang dikembangkan dan digunakan sebagai penyangga untuk melakukan penyusunan fragmen asam amino hingga dapat terbentuk menjadi tetrapeptida. Pada proses penyusunan ini dilakukan loading resin, capping resin, uji kloranil, deproteksi Fmoc. Sintesis tetrapeptida yang telah terbentuk dikarakterisasi menggunakan spektrometer massa yang menunjukkan munculnya puncak ion molekul pada  $m/z$  498,25 untuk senyawa tetrapeptida TSKY serta kemurniannya juga dianalisis menggunakan *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC). Selanjutnya dilakukan uji aktifitas terhadap antibakteri secara *in vitro* dengan metode difusi agar. Menurut literatur, urutan tetrapeptida TSKY ini memiliki potensi sebagai antibakteri dan memiliki sifat spektrum yang luas.

**Kata kunci:** Tetrapeptida TSKY, *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS),

## 1 PENDAHULUAN

Antibakteri adalah senyawa yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat merugikan. Pengendalian pertumbuhan mikroorganisme bertujuan untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi mikroorganisme pada inang yang terinfeksi, dan mencegah pembusukan serta perusakan bahan oleh mikroorganisme (Sulistyo, 1971).

Di bidang farmasi, bahan antibakteri dikenal dengan nama antibiotik, yaitu suatu substansi kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain. Senyawa antibakteri dapat bekerja secara bakteriostatik,

bakteriosidal, dan bakteriolitik (Pelczar dan Chan, 1988).

Menurut jurnal penelitian Sanchez dan Vazquez, (2017) urutan ikatan peptida Thr-Ser-Lys-Tyr yang didapat dari isolasi alam tersebut memiliki khasiat farmakologi yaitu sebagai antibakteri.

Pada penelitian ini dilakukan sintesis peptida antibakteri dengan cara sintesis secara kimia dimana ikatan peptida yang akan disintesis adalah Thr-Ser-Lys-Tyr yang kemudian selanjutnya akan diuji terhadap bakteri. Sintesis dilakukan karena apabila melakukan isolasi langsung dari bahan alam memiliki banyak kekurangan seperti

mebutuhkan waktu yang lama serta jumlah senyawa yang terbatas, oleh karena itu penelitian ini dilakukan dengan cara sintesis secara kimia yang dapat meningkatkan biodegradabilitasnya.

Berdasarkan uraian tersebut maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah senyawa tetrapeptida TSKY dapat disintesis menggunakan metode *Solid Phase Peptide synthesis* (SPPS).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk sintesis tetrapeptida Thr-Ser-Lys-Tyr dengan metode sintesis peptida fase-padat.

Manfaat dari penelitian ini yaitu memberikan informasi dan mengembangkan metode alternatif sintesis tetrapeptida dengan urutan asam amino Thr-Ser-Lys-Tyr dengan metode sintesis peptida fase padat yang akan menghasilkan tetrapeptida dengan susunan asam amino yang serupa dengan hasil isolasi bahan alamnya.

## 2 LANDASAN TEORI

Asam amino merupakan suatu asam karboksilat yang mempunyai gugus amino. Asam amino sebagai komponen protein mempunyai gugus  $-NH_2$  pada atom karbon dari posisi gugus  $-COOH$  (Poedjiadi, 1994).

Peptida adalah amida yang terbentuk dari dua asam amino ataupun lebih. Sedangkan ikatan peptida adalah ikatan amida antara suatu gugus asam amino dari satu asam amino lainnya dan gugus karboksil dari asam amino lain. Contoh dari ikatan peptida yaitu *alanilglisina* yang terbentuk dari alanin dan glisin (Fessenden, 1999).

Ikatan peptida dibentuk dengan cara menarik unsur  $H_2O$  dari gugus karboksil suatu asam amino dan gugus  $-amino$  dari molekul lain dengan menggunakan reaksi kondensasi yang kuat. Empat asam amino dapat disatukan oleh tiga ikatan peptida dengan cara yang sama untuk membentuk suatu tripeptida, tetrapeptida dan pentapeptida. Jika terdapat banyak asam amino yang bergabung oleh cara tersebut, maka struktur yang dihasilkan merupakan polipeptida (Lehninger, 1995).

Gagasan untuk melakukan sintesis peptida fase padat (*Solid Phase Peptide Synthesis*) pertama kali dikemukakan oleh Merrifield pada 1963 (White, et. al., 2000). Sintesis peptida fase padat dilakukan berdasarkan penambahan asam amino yang terproteksi gugus amino dan rantai sampingnya secara berurutan pada suatu support polimer yang tidak larut. Gugus yang labil

terhadap asam yaitu Boc dan gugus yang labil terhadap basa, Fmoc digunakan sebagai gugus pelindung. Setelah gugus pelindung ini dihilangkan, asam amino terproteksi berikutnya ditambahkan ke dalam reaksi dengan menggunakan suatu reagen pengaktif (kopling reagent). Pada sintesis peptida fase padat, gugus pelindung rantai samping peptida dipilih sedemikian rupa sehingga saat deproteksi gugus samping dilakukan, peptida juga akan terlepas dari resin (Irwansyah, 2010).

Bakteri adalah organisme yang paling banyak jumlahnya dan tersebar luas dibandingkan makhluk hidup lainnya. Bakteri memiliki ratusan ribu spesies yang hidup di gurun pasir, salju atau es, hingga lautan (Maryati, 2007). Bakteri yang keberadaannya banyak sekali ini, memungkinkan untuk menjadi salah satu penyebab penyakit pada manusia (Radji, 2011).

Menurut Madigan dkk. (2000), berdasarkan sifat toksisitas selektifnya, senyawa antimikrobia mempunyai 3 macam efek terhadap pertumbuhan mikrobia yaitu:

1. Bakteriostatik memberikan efek dengan cara menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh.
2. Bakteriosidal memberikan efek dengan cara membunuh sel tetapi tidak terjadi lisis sel atau pecah sel.
3. Bakteriolitik menyebabkan sel menjadi lisis atau pecah sel sehingga jumlah sel berkurang atau terjadi kekeruhan setelah penambahan antimikrobia.

Prinsip kerja RP-HPLC adalah pemisahan komponen dengan bantuan pompa fase gerak cair dialirkan melalui kolom ke detektor. Cuplikan dimasukkan ke dalam aliran fase gerak dengan cara penyuntikan. Di dalam kolom terjadi pemisahan komponen-komponen campuran. Karena perbedaan kekuatan interaksi antara solut-solut terhadap fase diam. Solut-solut yang kurang kuat interaksinya dengan fase diam akan keluar dari kolom lebih dulu. Sebaliknya, solut-solut yang kuat berinteraksi dengan fase diam maka solut-solut tersebut akan keluar dari kolom lebih lama. Setiap komponen campuran yang keluar kolom dideteksi oleh detektor kemudian direkan dalam bentuk kromatogram (Hendrayana, 2006).

Pengukuran dari spektrometer massa akan menghasilkan sesuatu yang berupa spektrum

massa yang merupakan alur kelimpahan relatif dari fragmen yang memiliki muatan positif terhadap massa per muatan ion ( $m/z$ ) dari fragmen sendiri tersebut. Muatan ion dari kebanyakan partikel yang terdeteksi adalah +1, sehingga nilai  $m/z$  sama dengan massa molekulnya (Fessenden, 1999).

### 3 METODELOGI

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran Bandung. Asam amino yang digunakan yaitu Fmoc-Treonin-OH, Fmoc-Serin-OH, Fmoc-Lysin-OH dan Fmoc-tyrosin-OH. Pada penelitian ini menggunakan metode *solid phase peptide synthesis*. Metode ini terdiri dari beberapa tahap, yaitu pengkondisian tabung reaktor, pengembangan resin, pengkoplingan asam amino yang pertama pada resin bertujuan sebagai penyangga fase padat. Kemudian dilakukan uji kloranil untuk mengetahui keberhasilan pengkoplingan. Selanjutnya *capping* resin yang bertujuan untuk menutupi gugus aktif pada resin agar tidak berikatan dengan asam amino lain, kemudian pelepasan gugus pelindung Fmoc agar terjadi pengikatan antara asam amino satu dan asam amino berikutnya, selanjutnya dilakukan uji kloranil untuk mengetahui keberhasilan proses deproteksi Fmoc. Kemudian dilakukan penyusunan asam amino pada fragmen peptida. Penyusunan fragmen peptida ini dibutuhkan untuk menggabungkan asam amino yang diinginkan, lalu dilakukan pelepasan tetrapeptida dari resin dan Fmoc, setelah resin dan Fmoc terlepas dari tetrapeptida, lalu lakukan proses pengeringan peptida menggunakan *rotary evaporator*, kemudian didinginkan didalam disekator lalu setelah itu dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer massa yang dilihat nilai bobot molekul  $m/z$ , kemudian dilakukan uji kemurnian tetrapeptida linier dengan melihat kromatogram tetrapeptida pada RP-HLPC unruk melihat waktu retensinya.

### 4 HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Sintesis peptida dengan urutan peptida Threonine-Serin-Lysin-Tyrosin (TSKY) telah berhasil dilakukan dengan metode *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS). Penggunaan metode *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS) ini digunakan karena metode ini dinilai memiliki prosedur pengerjaan yang lebih cepat lebih mudah

dan juga lebih efisien. Sintesis dilakukan dengan arah perpanjangan rantai dari C-terminal ke N-terminal. Strategi ini dipilih karena pemutusan gugus pelindung sementara pada atom N lebih mudah dilakukan dibandingkan dengan pemutusan gugus pelindung sementara pada atom C (Chan dan White, 2000). Di penelitian ini juga digunakan kombinasi antara Senyawa *O*-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 tetrametiluronium heksafluorofosfat (HBTU) dan senyawa 1-hidroksibenzotriazol (HOBt), HBTU dan HOBt ini merupakan reagen kopling yang digunakan dalam penelitian ini. Kombinasi dari reagen kopling ini termasuk dalam golongan garam uranium/aminium, dimana *O*-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronium heksafluorofosfat (HBTU) ini merupakan reagen kopling yang telah menunjukkan performa kopling yang sangat baik, sedangkan 1-hidroksibenzotriazol (HOBt) diketahui dapat meningkatkan rendemen. 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 pada rantai samping yang labil dalam asam (Chan dan White, 2000).

#### 1. Spektrometer Massa

Spektrometer Massa ini memiliki tujuan untuk mengidentifikasi senyawa yang diuji dari hasil sintesis dengan cara mengetahui bobot molekul dari suatu senyawa yang diuji. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa senyawa yang diinginkan telah terbentuk. Hasil karakterisasi menggunakan Spektrometer Massa menunjukkan hasil adanya puncak ion molekul pada  $m/z$  498,25 seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.1. Puncak ini mengindikasikan munculnya puncak ion molekul.



Gambar 1. Hasil karakterisasi menggunakan spektrofotometer massa untuk senyawa tetrapeptida TSKY linier pada  $m/z$  497,25

## 2. RP-HPLC

Pemurniann selanjutnya dengan menggunakan alat RP-HPLC (*Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*), digunakan kolom fase terbalik *LiChrospher* RP-18, dengan fase gerak bergradien asetonitril : air (1:1) dengan buffer TFA 0,1% selama 35 menit, laju alir 1 mL/menit, dan menggunakan detektor PDA dengan deteksi pada 4 panjang gelombang yaitu 210 dan 240 nm. Fase terbalik ini digunakan dengan alasan bahwa pada fakta bahwa peptida memiliki banyak gugus polar yang berpotensi untuk membentuk ikatan hidrogen dengan gugus silanol dari silica gel, sehingga profil pemisahannya akan membentuk ekor yang sangat lebar. Hal ini menyebabkan, peptida tidak akan terpisahkan dari pengotornya dengan baik. Pada pemurnian ini fase gerak yang digunakan adalah asetonitril : air (1:1). Asetonitril dinilai karena efisien, tidak menyerap sinar UV sampai serendah 190 nm, dan juga apabila asetonitril ini dicampur dengan air maka tidak akan banyak membentuk gelembung (Bahti, 2011).

Hasil yang didapat dari RP-HPLC yang telah dilakukan menunjukkan hasil bahwa senyawa yang saya uji ini belum murni yaitu ditandai dengan adanya banyak puncak-puncak minor Maka dari itu senyawa yang diuji ini perlu dilakukan pemurnian.



Gambar 2. Hasil RP-HPLC tetrapeptida TSKY sebelum pemurnian pada panjang gelombang 240 nm

Menurut literatur urutan tetrapeptida TSKY ini memiliki aktivitas antibakteri dimana tetrapeptida ini dapat mengurangi oksidasi lipid sekitar 60% untuk menunda ketengikan pada daging. Dan peptide ini juga menghambat pertumbuhan mikroba di bawah pendinginan selama 14 hari. Jadi ikatan peptida antimikroba yang paling berpengaruh pada peptide ini adalah theonin dan lisin, dimana peptida itu dapat menghambat membran sel pada bakteri sehingga dapat menghambat perkembangan pertumbuhan total koloni, ragi, dan kapang, tetapi efek yang paling mencolok adalah pada proliferasi bakteri coliform. Tetrapeptida ini juga memiliki spektrum antibakteri yang besar, terutama terhadap bakteri patogen yang umumnya bertanggung jawab atas perubahan makanan, seperti *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* atau *Staphylococcus aureus*.

## 5 KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan ini dapat disimpulkan bahwa senyawa tetrapeptida Threonin-Serin-Lysin-Tyrosin (TSKY) dapat disintesis dengan metode *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS) yang ditunjukkan dengan hasil karakterisasi menggunakan Spektrometer Massa yang ditandai dengan munculnya puncak ion molekul  $[M^H]^+$  pada  $m/z$  498,25 untuk senyawa tetrapeptida Threonin-Serin-Lysin-Tyrosin (TSKY).

## SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan pemurnian dan siklisasi tetrapeptida Threonin-Serin-Lysin-Tyrosin (TSKY) dan perlu dilakukan uji aktifitas terhadap antibakteri untuk

memastikan bahwa tetrapeptida Threonin-Serin-Lysin-Tyrosin (TSKY) ini memiliki aktifitas yang baik terhadap antibakteri.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Agoes, H.A. (2011). Penyakit Diusia Tua. Jakarta: EGC.
- Almatsier. (2006). Prinsip Dasar Ilmu Gizi. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Ardianingsih, R. (2010). Penggunaan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) dalam Proses Analisis Deteksi Ion. Bidang material Dirgantara: Pusterapan Lapan
- Bahti, H. (2011). *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi: Teori dan penggunaannya Untuk Biomolekul*. Bandung: Unpad press. Hal 78.
- Bustan, M.N. (2007). Epidemiologi Penyakit Tidak Menular. Cetakan 2 Rineka Cipta, . Jakarta.
- Chan, W. C. A. White, P.D. (2000). *Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach*. Oxford University press. New York.
- Day, R A., Underwood, A. L. (2002), Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Keenam, Erlangga, Jakarta
- Fessenden, R. J., Fessenden, J. S. (1999), Kimia Organik, Edisi Ketiga, Erlangga, Jakarta
- Gandjar, I.G., Rohman, A. (2013). Kimia Farmasi Analisis. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Ganiswara, T. (1995). Farmakologi dan Terapi. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI.
- Hendayana, S. (2006). *kimia pemisahan metode kromatografi dan elektroforesis modern*. Bandung: Remaja Rosdakarya
- Irwansyah. (2010). Studi Struktur Self-Assembly Peptida Ampifil, Prodi Magister Ilmu Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok.
- Lehninger, A.L. (1995). Dasar-dasar Biokimia. Alih bahasa : Maggy Thewijaya. Jakarta : Penerbit Erlangga.
- Lestari, W. Sri. (2014). Validasi Metode Penetapan Kadar Aliskiren dalam Plasma darah secara In Vitro Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). UIN Syarif Hidayatullah: Jakarta
- Maharani, R., Yanti, EkaFitri. (2016). *Sintesis Heptapeptida Linear (H-TYR-ASP-PRO-ALA-PRO-PRO-PRO-OH) Dengan Menggunakan DIC/OKSIMA Sebagai Reagen pengkoplingan*. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Muchtadi, T.R., Sugiyono. (1992). Ilmu Pengetahuan Bahan Pangan. Bogor.
- Pelczar, M. (1988). Dasar - dasar Mikrobiologi 2. UI Press, Jakarta.
- Poedjiadi, A. (1994). *Dasar-dasar Biokimia*, Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Priyanto. (2009). Farmakoterapi & Terminology Medis, 195-196, Lembaga Studi
- Sanchez, A., Vasquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. Food Quality and Safety. 1: 29-46.
- Supratman, U. (2010). Elusidasi Struktur Senyawa Organik (Metode Spektroskopi untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik), Widya Pajajaran, Bandung
- Syarief, R. & H. Hariyadi. (1991). Teknologi Penyimpanan Pangan. Arcon. Jakarta.