

Sintesis Tetrapeptida Gly-Ala-Trp-Leu (GAWL) sebagai Kandidat Antioksidan dengan Metode Solid Phase Peptide Synthesis

Wanda Meylinda Baharudin & Nety Kurniaty & Hilda Aprilia

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

email: wandameylinda@gmail.com, netykurniaty@yahoo.com, hilda.aprilialia@gmail.com

ABSTRACT: Antioxidant peptides are a group of peptides that can be used as free radical scavengers, can prevent degenerative diseases and prevent premature aging, one of a combination of natural antioxidant peptides that have been discovered previously is a discovery related to Gly-Ala-Trp-Ala tetrapeptide (GAWA) which can be used from sardinella aurita fish species of ray-finned fish in the genus sardinella that was found in the Atlantic Ocean and has antioxidant reserves. The synthesis of Gly-Ala-Tra-Leu (GAWL) tetrapeptide was carried out by using the solid phase peptide synthesis method (SPPS) in 2-chlorotrityl chloride resin. The strategy of using Fmoc as an amino acid protective group was chosen in this study. In the preparation of peptide fragments the combination of HBTU and HOBt is used as a coupling reagent in GAWL synthesis. After the peptide fragments are arranged in the resin, a trifluoroacetic acid (TFA) combination is added to the dichloromethane (DCM) to release the peptide from the resin then concentrations check using a rotary evaporator. The purity was analyzed using the Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) instrument and appeared at a retention time of 17.409 minutes and it was characterized using a mass spectrometer marked with [M-H] + ion molecules at m / z 44.23 for linear GAWL tetrapeptide compounds

Keywords: Tetrapeptida GAWL, Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)

ABSTRAK: Peptide antioksidan merupakan kelompok peptide yang berperan karena dapat menangkap radikal bebas, sehingga dapat mencegah penyakit degeneratif dan menjegah penuaan dini, salah satu senyawa peptide antioksidan alami yang telah ditemukan peneliti sebelum nya yaitu senyawa tetrapeptide Gly-Ala-Trp-Ala (GAWA) yang diisolasi dari ikan sardinella aurita spesies ikan bersirip sinar dalam genus sardinella yang di temukan di Samudra atlantik dan dilaporkan memiliki aktifitas antioksidan yang baik. Telah dilakukan sintesis Tetrapeptida Gly-Ala-Tra-Leu (GAWL) dengan menggunakan metode Solid phase peptide synthesis (SPPS) pada resin 2-klorotrityl klorida. Strategi pemakaian Fmoc sebagai gugus pelindung asam amino dipilih pada penelitian ini. Pada penyusunan fragmen peptida digunakan kombinasi HBTU dan HOBt sebagai reagen pengkopling dalam sintesis GAWL. Setelah fragmen peptida tersusun pada resin, ditambahkan kombinasi asam trifluoroasetat (TFA) dalam diklorometana (DCM) untuk proses pelepasan peptida dari resin. Dilakukan pemekatan menggunakan rotary evaporator. Dan dianalisis kemurniannya menggunakan instrumen Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) dan muncul pada waktu retensi 17,409 menit. Serta dikarakterisasi menggunakan spektrometer massa yang ditandai dengan dengan munculnya ion molekul [M-H]⁺ pada m/z 44,23 untuk senyawa tetrapeptide GAWL linier

Kata Kunci: Tetrapeptida GAWL, Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)

1 PENDAHULUAN

Peptida bioaktif banyak menarik perhatian dari kalangan ilmiah dikarenakan memiliki banyak potensi dalam bidang kesehatan. peptida dikenal sebagai bahan yang selektif dan efektif sekaligus relatif lebih aman dan dapat ditoleransi oleh tubuh (fosgerau & hoffmann 2015). Peptida bioaktif diketahui memiliki aktivitas antioksidan, antihipertensi, dan sifat antimikroba. peptida

bioaktif itu dapat dihasilkan secara invivo maupun invitro, seperti ekstraksi pelarut, hidrolisis enzimatik atau langkah-langkah pengolahan makanan, termasuk fermentasi dengan menggunakan mikroba (sumiarsa, dkk., 2019). salah satu bioaktif yang digunakan yaitu peptida antioksidan yang merupakan kelompok senyawa peptida dengan aktivitas antioksidan.

Antioksidan berfungsi sebagai penangkap radikal bebas yang penting untuk menjaga

kesehatan tubuh. dalam pengertian kimia, senyawa antioksidan yaitu senyawa yang memberikan electron. secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkal radikal bebas (winarsi, 2007). radikal bebas adalah atom atau gugus atom yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan. radikal bebas merupakan molekul yang sangat reaktif karena memiliki elektron yang tidak berpasangan dalam orbital luarnya sehingga dapat bereaksi dengan molekul sel tubuh dengan cara mengikat elektron sel tersebut (fessenden, 1986).

Menurut Bougatef Ali, et, al (2010) menyatakan bahwa urutan asam amino Gly-Ala-Trp-Ala (GAWA) yang memiliki efek antioksidan. Urutan asam amino ini merupakan tetrapeptida linier Gly-Ala-Trp-Ala (GAWA), yang diisolasi dari ikan *Sardinella aurita* spesies ikan bersirip sinar dalam genus *Sardinella* yang ditemukan di Samudra Atlantik. Pada penelitian ini dilakukan dimodifikasi yaitu dengan mengganti salah satu asam amino Ala dengan asam amino Leu menjadi tetrapeptida Gly-Ala-Trp-Leu (GAWL).

Berdasarkan latar belakang, maka rumusan masalah pada penelitian ini yaitu apakah senyawa tetrapeptida GAWL dapat disintesis dengan menggunakan metode SPPS.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mensintesis senyawa tetrapeptida GAWL dengan menggunakan metode SPPS

Manfaat dari penelitian ini adalah mengembangkan metode sintesis tetrapeptida GAWL dengan metode sintesis peptida fase padat.

2 LANDASAN TEORI

Asam amino adalah derivat dari asam karboksilat yang pada C- α nya berikatan dengan gugus amina, hidrogen, dan rantai samping R (Arsih,M.S, 2014). Asam amino merupakan komponen penyusun utama protein dan dibagi dalam dua komponen yaitu asam amino esensial dan asam amino non esensial. Asam amino esensial tidak dapat diproduksi oleh tubuh maka harus ditambahkan dalam bentuk makanan, sedangkan asam amino non esensial dapat diproduksi oleh tubuh. Asam amino yang digunakan dalam sintesis protein dilambangkan dengan menggunakan singkatan yang terdiri dari tiga huruf atau satu huruf seperti yang tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengelompokan Asam Amino Menurut sifat Kimia (Kuchel dan Ralston, 2006).

Sifat	Asam amino	Singkatan	
Non polar, Alifatik	Glisin	Gly	G
	Alanin	Ala	A
	Valin	Val	V
	Leusin	Leu	L
	Isoleusin	Ile	I
Polar, Alifatik	Serin	Ser	S
	Treonin	Thr	T
	Asparagin	Asn	N
	Glutamin	Gln	Q
Aromatik	Fenilalanin	Phe	F
	Tirosin	Tyr	Y
	Triptofan	Trp	W
mengandung sulfur	Sistein	Cys	C
	Metionin	Met	M
Dengan Gugus Amino sekunder	Prolin	Pro	P
Asam Amino Asam	Aspartat	Asp	D
	Glutamat	Glu	E
Asam Amino Basa	Lisin	Lys	K
	Arginin	Arg	R
	Histidin	His	H

Peptida bioaktif diketahui memiliki aktivitas antioksidan, antihipertensi, antikanker, dan sifat antimikroba. Peptida antioksidan yang berkontribusi meningkatkan kesehatan manusia melalui pencegahan dan pengobatan terhadap penyakit kronis kemampuannya sebagai antioksidan memberikan efek samping yang sangat sedikit terhadap tubuh manusia sehingga aman untuk digunakan (Zou, et, al., 2016).

Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang berifat oksidan sehingga senyawa oksidan tersebut dapat direndam (Winarsi, 2007). Antioksidan berfungsi sebagai senyawa yang dapat menghambat reaksi radikal bebas. Radikal bebas merupakan suatu senyawa yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital luarnya. Faktor eksternal pemicu radikal bebas antara lain sinar UV, polusi, asap rokok, emisi kendaraan, maupun alkohol (Pinnel, 2003).

Sintesis peptide fase padat (SPPS) merupakan teknik sintesis peptide pada penyanggah padat yaitu resin. resin menahan amino C-ujung pada gugus karboksilnya sementara peptidanya disintesis. Resin itu adalah suatu polistiren yang mengandung sekitar 1% satuan p-(kloro-metil)

stirena (Fessenden, 1986). Senyawa tetrapeptide GAWL hasil sintesis di uji kemurnian nya dengan menggunakan RP-HPLC dan kemudian di kaakterisasi menggunakan spektro massa.

3 METODOLOGI PENELITIAN

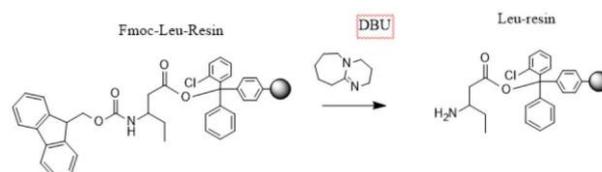
Penelitian ini menggunakan metode SPPS yang terdiri dari beberapa tahap, yaitu pengkondisian tabung, pengembangan resin, dan pengikatan asam amino pertama terhadap resin yang bertujuan sebagai penyangga fase padat. Selanjutnya capping resin bertujuan untuk menutupi gugus aktif pada resin agar tidak berikatan dengan asam amino lain. Kemudian pelepasan gugus pelindung Fmoc agar terjadi pengikatan antara asam amino satu dan asam amino berikutnya. Lalu dilakukan penyusunan fragmen peptida. Penyusunan fragmen peptida dibutuhkan untuk menggabungkan asam amino yang diinginkan. Kemudian dilakukan pelepasan tetrapeptida dari resin, setelah resin terlepas tetrapeptida dilakukan proses pengeringan menggunakan rotary evaporator, selanjutnya dilakukan uji kemurnian dengan melihat kromatogram pada RP-HPLC lalu dikarakterisasi menggunakan Spektrometer massa.

4 HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Senyawa GAWL disintesis menggunakan metode *solid phase peptide synthesis* (SPPS). penggunaan metode SPPS ini dikarenakan metode yang digunakan lebih sederhana pengerjaanya yang lebih cepat dan mudah sehingga lebih efisien (merrifield, 1963). Pada metode ini menggunakan fase padat yaitu resin 2-klorotritil klorida, resin ini harus dikembangkan terlebih dahulu agar sisi aktif pada resin terbuka sehingga asam amino pertama dapat lebih mudah terikat pada sisi aktif resin.

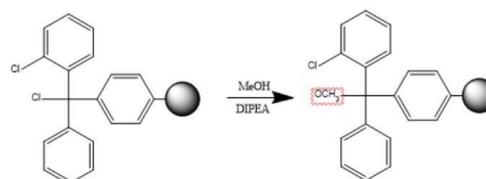
Pada sintesis asam amino pertama pada tetrapeptide gawl yaitu asam amino Leusin (Leu). asam amino pada terminal n telah dilindungi dengan gugus Fmoc agat tidak mengganggu reaksi. Melalui reaksi asam basa reaksi asam basa antara Fmoc-Leu-OH dengan DIPEA sebagai reagen yang membentuk ion karboksil. Ion karboksil kemudian menyerang ion klorida pada atom karbon kuartener resin 2-klorotritil klorida. Dengan demikian, asam amino pertama Fmoc-Leu-OH terikat pada resin. Atom klorida dengan tanda merupakan gugus pergi yang sangat baik,

karena dipengaruhi oleh tiga gugus benzena yang dapat menstabilkan intermediet. Atom klorida dapat disingkirkan oleh nukleofil lemah karboksil sekalipun (Maharani, *et al.*, 2016:5-6).



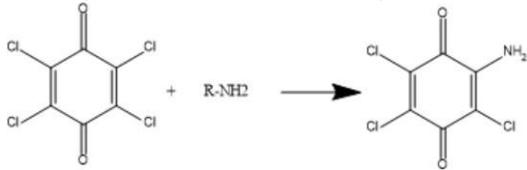
Gambar 1. reaksi pengikatan asam amino pertama pada resin (Fmoc-Leu-Resin)

Reaksi ini dilakukan selama 24 jam untuk sintesis peptida GAWL, untuk memastikan bahwa asam amino pertama yang masuk ke dalam resin telah maksimal. Nilai loading resin menentukan jumlah asam amino yang dapat ditambahkan selanjutnya. (Chan dan White, 2000). Penentuan nilai loading resin dilakukan dengan menggunakan spekktofotometer UV, dan telah diketahui nilai *loading resin* pada GAWL sebesar 0,4119 mmol/g. Melalui nilai loading resin diketahui bahwa tidak semua asam amino menempel pada resin, oleh karena itu diperlukan capping resin dengan penambahan campuran Metanol : DCM : DIPEA (2:7:1) yang bertujuan untuk mencegah asam amino yang akan dikoplingkan selanjutnya beraksi dengan gugus aktif dari resin yang masih tersisa (Gambar 4.2).

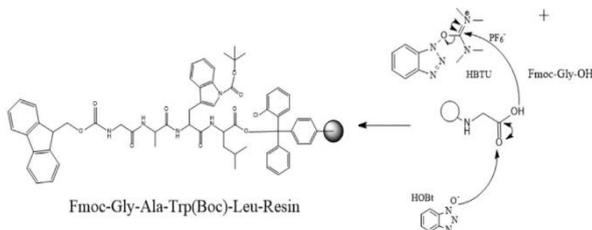


Gambar 2. Reaksi *capping resin* menggunakan methanol

Pelepasan gugus pelindung Fmoc dilakukan setelah *capping resin*, Tahap pelepasan gugus pelindung Fmoc sebelum mengikat asam amino selanjutnya. Pelepasan Fmoc ini bertujuan untuk menyediakan sisi aktif pada asam amino pertama untuk bereaksi dengan asam amino kedua. Gugus pelindung Fmoc merupakan gugus pelindung yang stabil pada kondisi asam namun tidak stabil dalam kondisi basa. Dengan menggunakan DBU 10 % dalam DMF, penggunaan DBU sebagai basa untuk Fmoc, dan penggunaan DMF sebagai pelarut sudah tepat karena DMF tidak bersifat terlalu



Gambar 3. Reaksi pelepasan Fmoc dengan asam amino pertama karena terdapat gugus amina (-NH₂).



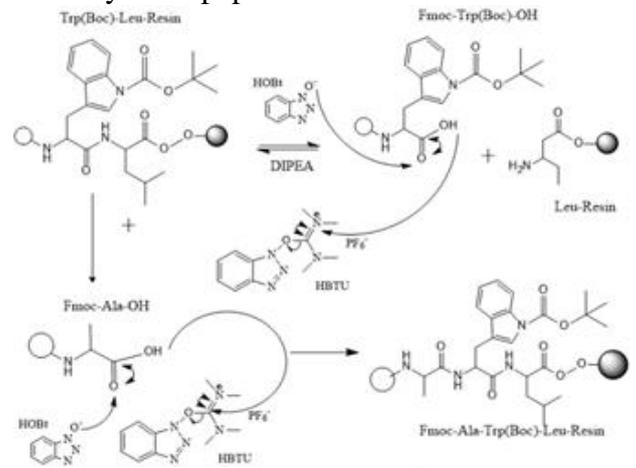
Gambar 4. Reaksi pengujian asam amino dengan kloranil

Setelah dilakukan uji kloranil, tahap selanjutnya adalah reaksi kopling dengan asam amino kedua, Fmoc-Trp(Boc)-OH dengan menggunakan reagen kopling yaitu HOBt dan HBTU dimana keduanya merupakan reagen kopling kelompok benzotriazol. HBTU dianggap sebagai reagen kopling yang biasanya dapat menunjukkan performa yang sangat baik, sedangkan HOBt dapat meningkatkan rendemen (Valeur dan Bradley, 2009)

Tahap deproteksi gugs Fmoc Kembali dilakukan dengan menambahkan DBU 10 % dalam DMF, selama 15 detik. Dan diuji keberhasilan kopling dengan uji kloranil. Jika reaksi kopling telah berhasil resin (kuning) tidak mengalami perubahan, hal ini disebabkan karena tidak adanya sisa-sisa gugus NH₂ bebas yang bereaksi dengan kloranil.

Tahap selanjutnya adalah tahap pengulangan

reaksi kopling dan deproteksi Fmoc untuk asam amino ketiga Fmoc-Ala-OH dan asam amino keempat Fmoc-Gly-OH secara berurutan hingga terbentuknya tetrapeptide linier



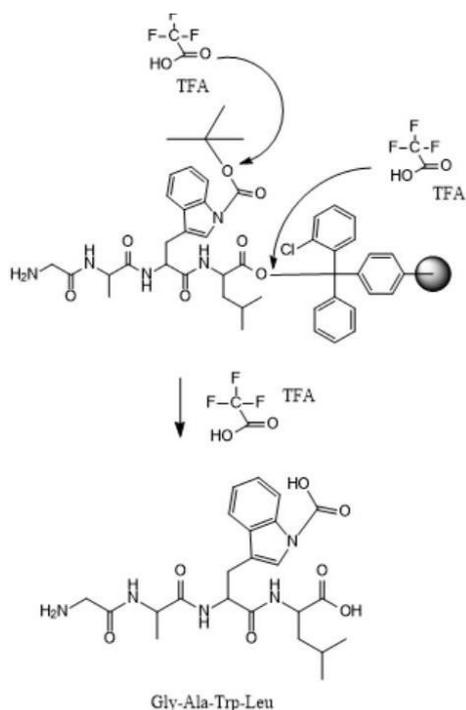
Gambar 5. reaksi pengikatan tetrapeptida Setelah dilakukan deproteksi menggunakan HBTU dan HOBT

Pemutusan Resin Pada Asam Amino

Selanjutnya pemutusan peptide dari resin dengan menggunakan TFA 95 % dalam air selama 10 menit Penggunaan konsentrasi yang tinggi dari TFA dimaksudkan untuk dapat juga melepaskan gugus pelindung rantai samping Boc pada asam amino Trp. Air dalam reaksi ini bertindak sebagai scavenger karbokation yang terbentuk setelah pelepasan peptida dari resin. Proses pelepasan linier peptida dari resin berhasil dilakukan ditandai dengan berubahnya warna resin yang awalnya kuning menjadi ungu gelap. Reaksi yang terjadi ketika pelepasan peptida dari resin dimulai dari protonasi atom oksigen pada rantai peptida oleh TFA, sehingga menghasilkan rantai peptida. Sedangkan warna resin yang awalnya kuning berubah menjadi ungu gelap yang menandakan bahwa proses pelepasan linier peptida dari resin telah berlangsung (Chan dan White, 2000).

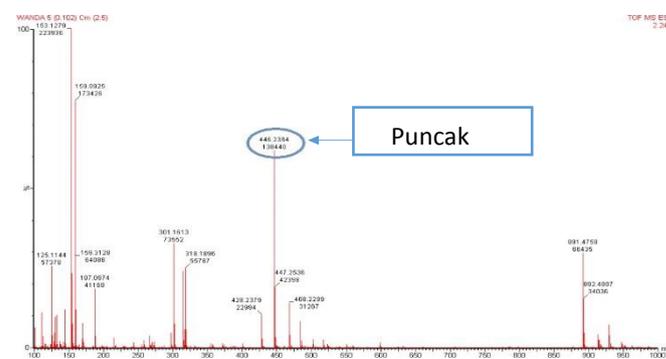
Sintesis Tetrapeptida Gly-Ala-Trp-Leu (GAWL) sebagai Kandidat Antioksidan... | 5 tetrapeptida yang diinginkan ada dan muncul pada waktu retensi 17,409 dan membentuk beberapa puncak. Hal menandakan bahwa peptida belum murni sehingga memerlukan pemurnian lagi.

Setelah dilakukan pengujian HPLC dilanjutkan dengan pengujian dengan spektrofotometer massa. Dalam sintesis tetrapeptida GAWL, 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. Hasil karakterisasi menggunakan spektroskopi massa menunjukkan adanya puncak ion molekul untuk senyawa GAWL pada m/z 446,2384.



Gambar 6. reaksi pemutusan resin

uji pemurnian dilakukan pemekatan terlebih dahulu menggunakan *rotary evaporator*. Peptide GAWL yang didapat yaitu 95,2 mg. peptide GAWL kemudian diambil sebanyak 1 mg dilarutkan dalam 1 ml larutan aquadest : asetonitril (1:1). Untuk pengujian dengan RP-HPLC (*Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*). proses RP-HPLC dilakukan dengan menggunakan fase balik *LiChrospher RP-18*, dengan fase gerak bergradien asetonitril : air (1:1) dengan buffer TFA 0,1% selama 30 menit, laju alir 1 mL/menit, dan menggunakan detektor PDA dengan deteksi pada 4 panjang gelombang yaitu 210, dan 240 nm. Deteksi peptida dalam RP-HPLC menggunakan deteksi antara panjang gelombang 210 sampai 254, hal ini karena pada panjang gelombang tersebut merupakan panjang gelombang yang spesifik untuk ikatan peptida (Frank, *et al.*, 1987).



Gambar 8. Spektrofotometer massa

5 KESIMPULAN

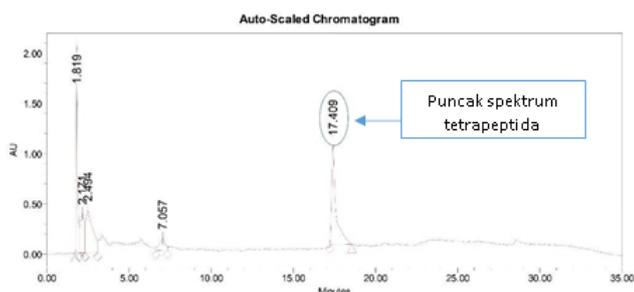
Berdasarkan penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa senyawa tetrapeptida linier gawl dapat disintesis dengan metode *solid phase peptide synthesis (spps)* dengan hasil karakterisasi menggunakan spektrofotometer massa dengan muncul pucak ion molekul untuk senyawa tetrapeptida gawl linier dan puncak ion molekul $[m-h]^+$ pada m/z 446,23

SARAN

Perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut untuk senyawa tetrapeptida GAWL. Dan perlu disiklisis sehingga tetrapeptida menjadi lebih stabil. Kemudian dilakukan uji aktifitas antioksidan dengan menggunakan uji DPPH pada senyawa tersebut untuk mengetahui aktifitas pada tetrapeptida tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

Arsi, M.S. (2014). Analisis profil protein dan asam



Gambar 7. spektrum RP-HPLC

Berdasarkan hasil kromatogram yang didapat,

- 6 | Wanda Meylinda Baharudin, *et al.*
amino Sarang Burung Walet Putih (Collocalia fuciphago) dengan menggunakan SDS-PAGE dan KCKT [Skripsi], Program Studi Farmasi, Fakultas kedokteran dan Ilmu Kesehatan, UIN Syarif Hidayatullah Jakarta, Jakarta.
- Bougatef, A., Arroume, N.N., Manni, L., Ravallec, R., Ahmed, B., Guillochon D., Nasri, M., (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry* 118: 559-565.
- 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.
- Fosgerau, K., Hoffmann, T. (2015). *Peptide therapeutics current status and future directions*. Denmark.
- Frank, J., Braat, A., Duine, J.A. (1987). Assessment Of Protein Purity By Chromatography And Multiwavelength Detection. *Anal. Biochem.* 162, 65– 73.
- Kuchel, P.W., Ralston, G.B. (2006). *Biokimia*, Erlangga, Jakarta.
- Pinnel, S.R. (2003). Cutaneous Photodamage, Oxidative Strees, and Topical Antioksidan Protection. *J Am Acad Dermatol.* Vol 48; 1-19.
- Sumiarsa, D., Marpaung, C., Zainuddin, A., Hidayat, A.T., Harneti, D., Nurlelasari, Supratman, U., Maharani, R. (2019), Sintesis Tetrapeptida PADY menggunakan Metode Fasa Padat dan Aktivitas Antioksidannya, Bandung; Universitas Padjadjaran *Jurnak Kimia Valensi* Vol 5(1); 87-96.
- Valeur E, Bradley M. 2009. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.* 38: 606–631
- Winasari, H. (2007). *Antioksidan Alami Dan Radikal Bebas Potensi Dan Aplikasi Dalam Kesehatan*, Yogyakarta: Kanisius. 77-79.
- Zou, T.B., He, T.P., Li, H.B., Tang, H.W., Xia, E.Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural protein, *Molecules*, XXI (72); 1-14.