

Sintesis Tetrapeptida Linier FKAP (Phe-Lys-Ala-Pro) sebagai Kandidat Antioksidan dengan Metode *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS)

Desyanita Agni Pratiwi & Nety Kurniaty & Anggi Arumsari & Rani Maharani
Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Bandung, Indonesia
email: desyanitaagni984@gmail.com, netykurniaty@yahoo.com, anggiarumsari@gmail.com, r.maharani@unpad.ac.id

ABSTRACT: In a previous study, the antioxidant tetrapeptide FLAP (Phe-Leu-Ala-Pro) was isolated from Sea Cucumber collagen (*Acaudina molpadioides*) located in the Zhejiang Province in China. To explore FLAP compounds and to obtain new and more effective antioxidant peptides, FKAP (Phe-Lys-Ala-Pro) analogs were made. In this study, tetrapeptide FKAP has been successfully synthesized using the solid phase peptide synthesis method (SPPS) using the Fmoc-amino acid strategy, 2-chlorotriethyl chloride as a buffer resin and coupled with a coupling reagent including HBTU, HOBt and DIPEA. The sample weight resulted was 196,5 mg. The characterization process was carried out using a mass spectrometer and the peak fragment was obtained at m/z 462,273. To ensure the purity of the tetrapeptide compound, the RP-HPLC process was carried out and the retention time was obtained at 1,699 minutes. In the antioxidant test using the DPPH method, the result obtained from the tetrapeptide compound FKAP were an inhibition value of 30,83% which indicated that the antioxidant of the tetrapeptide compound was weak and its antioxidant activity was not better than that of FLAP.

Keywords: Antioxidant, Tetrapeptide, Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS).

ABSTRAK: Pada penelitian sebelumnya, senyawa tetrapeptida antioksidan FLAP (Phe-Leu-Ala-Pro) telah berhasil diisolasi dari kolagen Teripang (*Acaudina Molpadioides*) yang berada di Provinsi Zhejiang Cina. Untuk mengeksplorasi senyawa FLAP dan untuk mendapatkan peptida antioksidan yang baru dan lebih efektif, maka dibuat analog FKAP (Phe-Lys-Ala-Pro). Pada penelitian ini telah berhasil disintesis tetrapeptida FKAP dengan menggunakan metode sintesis peptida fase padat (SPPS) menggunakan strategi Fmoc-asam amino, resin penyangga 2-klorotrietil klorida dan dikopling menggunakan reagen kopling diantaranya HBTU, HOBt dan DIPEA. Didapat bobot sampel sebesar 196,5 mg kemudian dilakukan proses karakterisasi menggunakan spektrometer massa dan didapat puncak fragmennya pada m/z 462,273. Dan untuk memastikan kemurnian dari senyawa tetrapeptida dilakukan proses RP-HPLC dan didapat waktu retensi pada menit ke 1,699. Pada pengujian antioksidan dengan menggunakan metode DPPH, hasil yang didapat dari senyawa tetrapeptida FKAP yaitu nilai inhibisi sebesar 30,83% yang menunjukkan bahwa antioksidan dari senyawa tetrapeptida tersebut lemah dan aktivitas antioksidannya tidak lebih baik dari FLAP.

Kata Kunci: Antioksidan, Tetrapeptida, Sintesis Peptida Fase Padat.

1 PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan penyebab dari banyak penyakit karena ia menyerang berbagai molekul biologis termasuk protein, enzim, DNA, dan lain-lain yang menimbulkan sejumlah gangguan inflamasi dan metabolisme penuaan sel, kerusakan jaringan, dan kanker. Perlindungan terhadap radikal bebas ini dapat dicegah dengan senyawa yang bersifat sebagai antioksidan (Alam *et al.*, 2012). Radikal bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang berdiri sendiri dan memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas terjadi ketika suatu radikal bebas menyumbangkan satu elektronnya dan mengambil satu elektron dari molekul yang stabil dan menyebabkan terjadinya reaksi berantai dan

membentuk radikal bebas baru yang dapat menyebabkan kerusakan sel dalam tubuh (Yuslianti, 2018).

Antioksidan merupakan suatu senyawa yang memiliki kemampuan dalam menghambat terjadinya radikal bebas dan mencegah terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif ini merupakan suatu kondisi ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas yang ada dengan jumlah antioksidan di dalam tubuh (Werdhasari, 2014).

Senyawa antioksidan alami yang diisolasi dari bahan alam salah satunya yaitu diisolasi dari senyawa fenolik. Tetapi dibutuhkan waktu yang cukup lama dan ketelitian untuk mendapatkan senyawa murni dari suatu tanaman karena kandungan senyawa dalam tanaman tersebut yang

sangat beragam. Dan saat ini telah banyak dikembangkan cara lain untuk memperoleh senyawa kimia yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri selain dari hasil isolasi tumbuhan melainkan dengan melakukan sintesis secara kimia (Budimarwanti, 2009).

Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Huo-Xi Jin, Hong-Ping Xu, Yan Li, Qian-Wei Zhang dan Hui Xie (2019), telah dilakukan isolasi dari kolagen Teripang *Acaudina Molpadiodes* yang berada di Provinsi Zhejiang Cina dan tersusun dari beberapa asam amino membentuk suatu peptida. Peptida tersebut tersusun dari beberapa asam amino dengan urutan Phe-Leu-Ala-Pro (FLAP). Kemudian ditemukan adanya aktivitas antioksidan dengan uji DPPH dan diperoleh nilai IC₅₀ 0,385 mg/mL.

Dalam rangka untuk mengeksplorasi senyawa FLAP dan untuk mendapatkan peptida antioksidan yang baru dan lebih efektif, maka FLAP akan dibuat analog dan dievaluasi aktivitas antioksidannya. Menurut Zou *et al.*, (2016) diketahui bahwa lysin dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dalam menangkap radikal bebas. Sehingga pada penelitian ini dilakukan modifikasi tetrapeptida antioksidan yang baru dilakukan pada asam amino kedua dari FLAP yaitu leusin (L) menjadi lysin (K) menghasilkan analog FKAP. Pada penelitian ini juga akan dilakukan sintesis tetrapeptida yang dilakukan menggunakan metode sintesis peptida fasa padat (SPPS) dengan urutan asam amino berupa Phe-Lys-Ala-Pro (FKAP). Metode SPPS ini dipilih karena waktu sintesisnya yang lebih singkat dan pemurnian hanya dilakukan di tahap akhir sehingga sintesis peptida dengan metode SPPS ini dinilai lebih sederhana dan cepat. Strategi dalam metode SPPS yang digunakan ini adalah menggunakan Fmoc yang labil terhadap basa sebagai gugus pelindung dan menggunakan resin 2-klorotritilklorida yang labil terhadap asam sebagai perlindungan gugus pelindung pada rantai samping (Chan dan White, 2000).

Berdasarkan uraian di atas, didapat rumusan permasalahan yaitu bagaimana cara mensintesis ikatan tetrapeptida linier dengan urutan asam amino Phe-Lys-Ala-Pro (FKAP) dengan menggunakan metode Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) kemudian dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan apakah penggantian asam amino leusin (L)

menjadi lysin (Lys) mempengaruhi aktivitas antioksidannya.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan sintesis tetrapeptida linier FKAP dengan menggunakan metode SPPS serta melakukan pengujian aktivitas antioksidan tetrapeptida linier FKAP hasil sintesis terhadap radikal DPPH. Kemudian dibandingkan aktivitas antioksidan pada tetrapeptida linier FLAP yang disintesis menggunakan metode SPPS.

2 METODOLOGI

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah melakukan sintesis peptida menggunakan metode sintesis peptida fase padat yang terdiri dari beberapa tahap yaitu, pengkondisian tabung reaktor, pengembangan resin, dan pengikatan asam amino pada resin. Kemudian dilakukan capping resin untuk menutupi gugus aktif pada resin sehingga tidak akan berikatan dengan asam amino lain. Selanjutnya dilakukan pelepasan gugus pelindung Fmoc (deproteksi) yang bertujuan untuk menyediakan sisi aktif asam amino pertama yang akan bereaksi dengan asam amino selanjutnya. Proses ini dikontrol dengan uji kloranil untuk mengetahui keberhasilan proses deproteksi. Pada asam amino kedua dilakukan pengikatan asam amino kedua menggunakan reagen kopling heksafluorofosfat benzotriazol tetrametil uronium (HBTU) dan hidroksi benzotriazol (HOBt). Proses ini dikontrol dengan uji kloranil untuk mengetahui keberhasilan proses kopling. Tahap ini diulang sampai terbentuk tetrapeptida, kemudian dilakukan pemutusan resin dan gugus samping dari tetrapeptida menggunakan TFA 95% dalam aquadest. Setelah resin dan gugus samping terlepas dari tetrapeptida, kemudian dilakukan proses pemekatan peptida menggunakan alat rotary evaporator untuk menghilangkan pelarut dan disimpan di desikator. Selanjutnya dilakukan karakterisasi menggunakan Spektrometer Massa untuk melihat nilai m/z dan uji kemurnian menggunakan RP-HPLC. Kemudian dilakukan pengujian antioksidan menggunakan metode DPPH untuk mendapatkan nilai %inhibisi.

3 PEMBAHASAN DAN DISKUSI

Pada penelitian ini dilakukan sintesis tetrapeptida dengan menggunakan metode sintesis fase padat

(SPPS). Metode SPPS ini dipilih karena waktu sintesisnya lebih singkat dan pemurnian hanya dilakukan di tahap akhir sehingga sintesis peptida dengan metode SPPS ini dinilai lebih sederhana dan cepat. Strategi dalam metode SPPS yang digunakan adalah menggunakan Fmoc yang labil terhadap basa sebagai gugus pelindung dan menggunakan resin 2-klorotritil klorida yang labil terhadap asam sebagai perlindungan gugus pelindung pada rantai samping (Chan dan White, 2000).

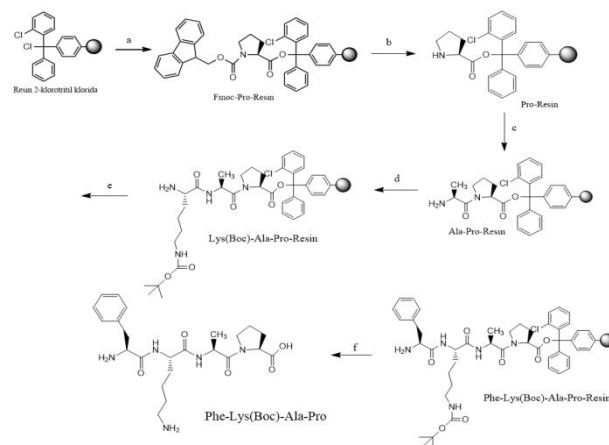
Dalam proses sintesis peptida dibutuhkan pemilihan kopleng yang baik agar ikatan peptida dapat terbentuk secara sempurna. Pada penelitian ini digunakan reagen kopleng kombinasi HBTU/HOBt. Reagen HBTU dan HOBt merupakan reagen kopleng yang termasuk ke dalam golongan garam aminium/uronium. Reagen HBTU biasa digunakan untuk sintesis peptida berbasis Fmoc. Selain itu HBTU merupakan reagen yang efisien dan menghasilkan sedikit rasemisasi tetapi reagen ini dapat membentuk N yang kurang efektif pada proses reaksinya. Sedangkan reagen HOBt dapat mencegah terjadinya rasemisasi dan menjadikan gugus-N lebih reaktif sehingga dapat mempercepat jalannya reaksi (Made *et al.*, 2014).

Resin yang digunakan pada penelitian ini adalah resin 2-klorotritil klorida yang digunakan sebagai penyangga pada proses sintesis. Resin ini dipilih karena dapat menekan terjadinya rasemisasi pada setiap proses sintesis dan merupakan resin dengan linker yang memiliki struktur yang meruah sehingga harus dilakukan pengembangan terlebih dahulu agar sisi aktif pada resin tersebut dapat terbuka dan asam amino pertama yang diikat pada resin akan lebih mudah terikat pada sisi aktif resin. Namun resin ini sangat sensitif terhadap air, sehingga pada pelaksanaannya kondisi resin harus benar-benar terjaga dari air serta udara lembab misalnya semua alat-alat yang digunakan pada saat sintesis berlangsung harus dikeringkan sebelum digunakan (Chan dan White, 2000).

Proses sintesis peptida ini dilakukan dengan arah perpanjangan dari ujung C-terminal ke ujung N-terminal. Jika dilakukan perpanjangan dengan arah sebaliknya yaitu dari ujung N-terminal ke ujung C-terminal akan sangat rentan terhadap reaksi samping rasemisasi. Rasemisasi ini akan menyebabkan terjadinya konfigurasi yang absolut

pada asam amino yang digabungkan. Asam amino yang digunakan pada penelitian ini adalah Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, dan Fmoc-Phe-OH yang gugus aminonya telah dilindungi oleh gugus Fmoc agar tidak mengganggu reaksi. Penggunaan asam amino yang telah memiliki gugus pelindung dapat mempercepat proses sintesis, efisien dan biaya yang lebih ekonomis karena tidak perlu lagi mereaksikan pemasangan gugus pelindung seperti Fmoc, Boc, dan tBu pada asam amino yang akan digunakan (Benitez, 2013).

Senyawa tetrapeptida FKAP berhasil disintesis menggunakan metode sintesis peptida fase padat dengan menggunakan strategi Fmoc dan reagen kopleng HBTU/HOBt. Proses sintesis ini dimulai dengan melakukan pengkondisian tabung reaktor menggunakan pelarut DCM yang bertujuan untuk menyesuaikan suasana tabung reaktor pada saat proses sintesis sehingga dihasilkan proses yang optimum dan stabil. Sebelum dilakukan proses sintesis, resin dikembangkan dengan pelarut DCM yang bertujuan agar gugus resin dapat meruah sehingga sisi aktif pada resin dapat lebih terbuka dan mengoptimalkan pengikatan sisi aktif antara resin dengan asam amino yang akan direaksikan pada tahapan selanjutnya.

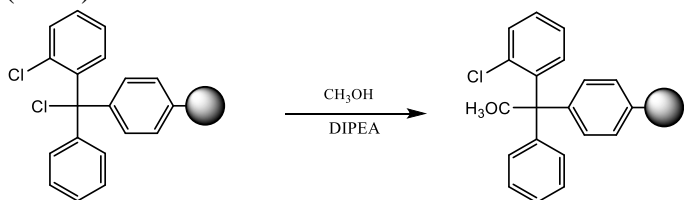


Gambar 1. Skema Sintesis FKAP dengan metode fase padat. a. (1) Fmoc-Pro-OH, DIPEA, DCM. (2) metanol:DCM:DIPEA. b. Piperidin 20% dalam DMF. c. (1) Fmoc-Ala-OH, HBTU/HOBt, DIPEA (2) Piperidin 20% dalam DMF. d. (1) Fmoc-Lys(Boc)-OH, HBTU/HOBt, DIPEA (2) Piperidin 20% dalam DMF. e. (1) Fmoc-Phe-OH, HBTU/HOBt, DIPEA (2) Piperidin 20% dalam DMF. f. TFA 95% dalam air.

Pada sintesis tetrapeptida FKAP asam amino pertama yang diikatkan pada resin 2-klorotritil klorida yaitu asam amino prolin. Asam amino prolin ini pada gugus amino N-terminal dilindungi oleh gugus pelindung Fmoc. Dan perpanjangan rantai peptida dilakukan dari arah C-terminal menuju N-terminal. Hidrogen asam pada gugus karboksil asam amino prolin akan diikat oleh basa *N,N*-diisopropiletilamin (DIPEA) melalui reaksi asam basa sehingga terbentuk nukleofil. Nukleofil ini akan menyerang karbon kuarterner pada resin 2-klorotritil klorida dan mensubstitusi atom klorida dan membentuk ikatan dengan resin melalui reaksi substitusi nukleofilik unimolekuler (S_N1) dan terbentuk senyawa Fmoc-Pro-resin (Gambar 1) (Maharani *et al.*, 2019).

Selanjutnya dilakukan pengukuran *loading resin* untuk mengukur jumlah asam amino pertama yang dapat terikat pada resin. Penentuan nilai *loading resin* dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai *loading resin* yang didapat pada sintesis FKAP ini adalah 0,357 mmol/g.

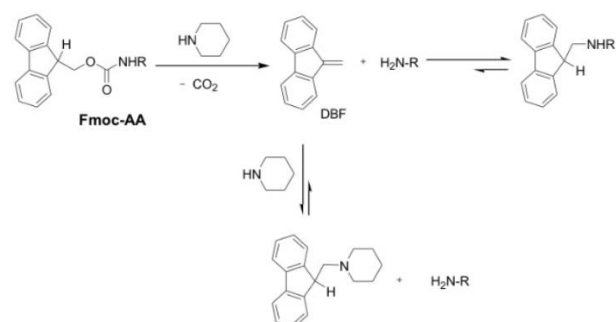
Melalui nilai *loading resin*, dapat kita ketahui bahwa tidak semua resin dapat mengikat asam amino. Untuk itu dilakukan capping resin untuk menutupi gugus aktif pada resin 2-klorotritil klorida yang tidak bereaksi dengan asam amino pertama dan mencegah asam amino selanjutnya agar tidak bereaksi dengan sisi aktif resin yang tidak berikatan dengan asam amino dan hanya akan bereaksi dengan sisi aktif asam amino pertama yang terikat pada resin (Maharani *et al.*, 2019). Capping resin dilakukan dengan menambahkan campuran Metanol:DCM:DIPEA (2:7:1).



Gambar 2. Reaksi capping resin menggunakan metanol dan DIPEA.

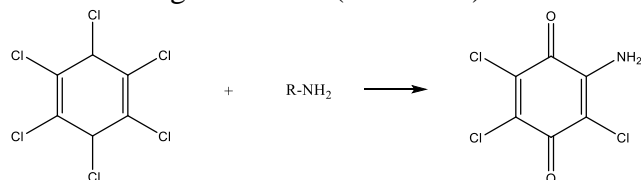
Setelah dilakukan capping resin, kemudian dilakukan pelepasan gugus pelindung Fmoc. Pelepasan ini bertujuan untuk menyediakan sisi aktif pada asam amino agar siap bereaksi dengan asam amino selanjutnya melalui reaksi kopling (Gambar 1). Gugus pelindung Fmoc merupakan gugus pelindung yang tidak stabil dalam kondisi

basa tetapi stabil pada kondisi asam, tetapi dapat dilepaskan dalam kondisi basa. Gugus pelindung Fmoc ini bersifat sementara dan dilepaskan oleh basa piperidin.



Gambar 3. Reaksi pelepasan gugus pelindung Fmoc dari asam amino (Maharani, 2018).

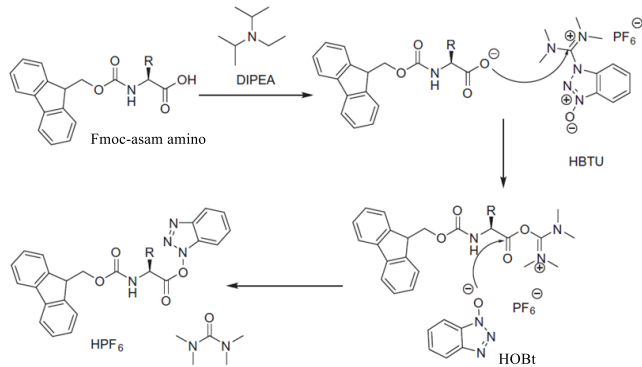
Kunci keberhasilan pada tahap deproteksi ini adalah deprotonasi cincin fluorena yang kemudian dihasilkan intermediet aromatik siklopentadiena (Gambar 3). Pada tahap ini juga akan terbentuk dibenzofulvena (DBF) yang kemudian akan berikatan dengan piperidin saat terlepas bersamaan dengan amina. Pelepasan menggunakan piperidin/DMF ini lebih cocok karena pada sintesis fase padat pelarut yang digunakan cukup volatil (Maharani, 2018). Keberhasilan deproteksi dibuktikan dengan melakukan uji kloranil dengan mengambil beberapa butir resin yang sudah kering dan direaksikan dengan larutan asetaldehida 2% dan larutan kloranil 2% kemudian diamati perubahan warnanya. Warna yang terbentuk pada saat setelah proses deproteksi adalah berubahnya warna resin dari kuning menjadi kehitaman. Hal ini disebabkan karena pada proses deproteksi menghasilkan gugus NH_2 bebas yang akan bereaksi dengan kloranil (Gambar 4).



Gambar 4. Reaksi pengujian gugus amino dengan kloranil.

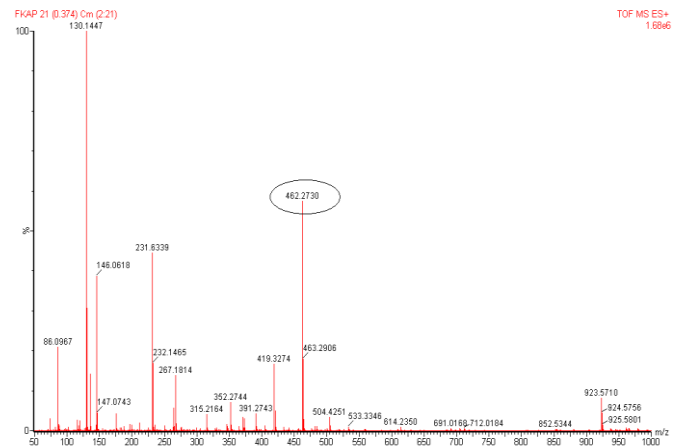
Setelah terbentuk gugus amino bebas, kemudian dilakukan pengikatan asam amino kedua dengan cara menambahkan asam amino berikutnya pada resin dengan bantuan reagen kopling. Aktivasi pengikatan asam amino dimulai dengan pengikatan atom hidrogen asam pada gugus karboksil asam amino oleh basa DIPEA sehingga terbentuk ion karboksil. Ion karboksil

yang terbentuk bersifat nukleofil dan akan menyerang karbokation pada reagen kopling HBTU dan atom karbon pada gugus karboksil akan diserang oleh atom oksigen gugus benzotriazol pada reagen HOBt dan membentuk ikatan peptida (Gambar 5) (Maharani, 2018).



Gambar 5. Mekanisme aktivasi pengikatan asam amino menggunakan HBTU dan HOBt (Petrou dan Sarigiannis, 2018).

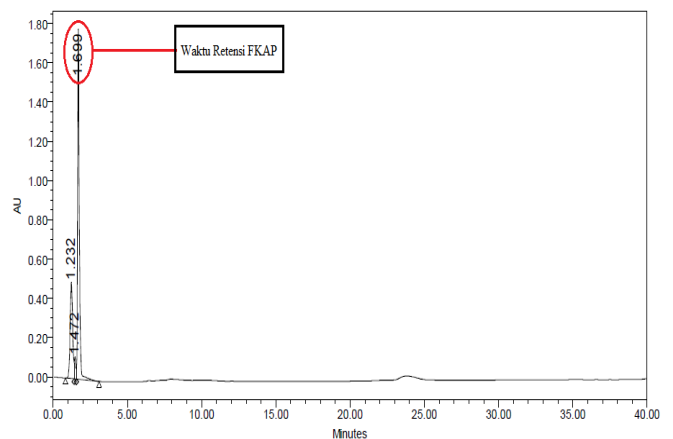
Kopling asam amino dilakukan selama 4-18 jam dan keberhasilan kopling asam amino dibuktikan dengan uji kloranil yang ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna resin. Setelah dilakukan kopling asam amino kemudian dilakukan deproteksi atau pemutusan gugus Fmoc menggunakan larutan basa piperidin 20% dalam DMF (Gambar 1). Pada asam amino ketiga dan keempat dilakukan proses yang sama sampai terbentuk tetrapeptida linier. Setelah terbentuk tetrapeptida FKAP, kemudian dilakukan pemutusan resin dan gugus rantai samping dari tetrapeptida menggunakan campuran TFA 95% dalam aquadest 10 mL. TFA yang digunakan berkonsentrasi tinggi agar dapat melepas resin dari senyawa target tetrapeptida sekaligus melepaskan gugus pelindung rantai samping Boc. Aquadest digunakan sebagai *scavenger* karbokation yang akan terbentuk setelah terjadinya pelepasan tetrapeptida dari resin. Pada proses pemutusan ini resin berubah menjadi kehitaman dengan filtrat coklat kemerahan dan ditampung untuk selanjutnya dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Sampel tetrapeptida yang didapat sebesar 196,5 mg.



Gambar 6. Spektrum massa senyawa tetrapeptida FKAP

Filtrat tetrapeptida FKAP yang sudah pekat kemudian dikarakterisasi menggunakan Spektrometri Massa. Hasil karakterisasi menunjukkan adanya ion puncak dari molekul FKAP pada m/z $[M+H]$ 462,273 (Gambar 6).

Selanjutnya dilakukan uji kemurnian menggunakan *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) analitik menggunakan kolom fase terbalik menggunakan kolom C18 berukuran 250 nm x 4,6 nm yang dielusi menggunakan eluen bergradien air:asetonitril (100:0 – 95:5 – 60:40). Dengan buffer TFA 0,1% selama 40 menit, laju alir 1 mL/menit dan dideteksi dengan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 210 nm dan 240 nm. Puncak FKAP muncul pada waktu retensi 1,699 menit (Gambar 7). Dan sampel belum murni karena terdapat puncak lain yang berdekatan. Tetapi tidak dilakukan pemurnian karena keterbatasan alat.



Gambar 7. Kromatogram RP-HPLC senyawa tetrapeptida FKAP pada panjang gelombang 210 nm.

Senyawa tetrapeptida FKAP dilakukan uji antioksidan menggunakan metode DPPH. Metode DPPH merupakan kolorimetri standar yang bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya suatu senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dalam menangkal radikal bebas. Prinsip dari pengujian antioksidan menggunakan metode DPPH adalah atom hidrogen berikatan dengan elektron bebas pada senyawa radikal, sehingga senyawa radikal bebas akan menyebabkan perubahan menjadi nonradikal yang ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi kuning (Zamani *et al.*, 2018). Pengujian dilakukan dengan membuat larutan DPPH dan diukur absorbansinya pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 517 nm. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm karena adanya elektron yang tidak berpasangan sehingga DPPH dapat memberikan serapan kuat pada panjang gelombang tersebut. Dan didapat absorbansi sebesar 0,9809. Selanjutnya dibuat pengenceran sampel tetrapeptida dan dibuat trial DPPH dengan membuat kombinasi larutan antara larutan dpph, sampel tetrapeptida dan metanol. Pengujian trial DPPH dilakukan pada konsentrasi 0, 1600, dan 8000 ppm. Tujuan dilakukan trial DPPH adalah untuk memberi gambaran mengenai aktivitas antioksidan dari senyawa uji dengan perbandingan pada 0 ppm.

Pengujian aktivitas antioksidan hanya sampai trial konsentrasi DPPH pada 0 ppm, 1600 ppm, dan 8000 ppm dan tidak dilakukan perbandingan menggunakan vitamin C karena keterbatasan waktu penelitian. Dari hasil uji antioksidan didapatkan nilai %inhibisi paling besar pada konsentrasi 8000 ppm yaitu 30,83%. Hasil uji antioksidan menunjukkan lebih rendah dari FLAP dengan nilai %inhibisi pada konsentrasi 8000 ppm yaitu 63,092%. Dapat disimpulkan bahwa penggantian lysin tidak dapat meningkatkan aktivitas penghambatan radikal DPPH karena walau Lysin sendiri dapat meningkatkan aktivitas antioksidan, tetapi belum tentu jika digabungkan dengan asam amino yang lain atau dalam hal ini dibentuk menjadi tetrapeptida dapat berperan dalam meningkatkan aktivitas antioksidan.

4 KESIMPULAN

Berdasarkan pembahasan dalam penelitian ini,

peneliti menyimpulkan bahwa senyawa tetrapeptida FKAP telah berhasil disintesis menggunakan metode SPPS dengan sampel tetrapeptida yang didapat sebanyak 196,5 mg. Senyawa tetrapeptida FKAP telah dilakukan pengujian antioksidan dengan metode DPPH dan didapat nilai %inhibisi pada konsentrasi 8000 ppm yaitu 30,83%. Penggantian lysin tidak dapat meningkatkan penghambatan radikal DPPH tetrapeptida FLAP.

ACKNOWLEDGE

Penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada Universitas Islam Bandung dan Lab Sentral Universitas Padjadjaran yang telah membantu penulis dalam penelitian tugas akhir ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, M. S., Choi, J. H., & Lee, D. U. (2012). Synthesis of novel Schiff base analogues of 4-amino-1, 5-dimethyl-2-phenylpyrazol-3-one and their evaluation for antioxidant and anti-inflammatory activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(13), 4103-4108.
- Benítez, M. G., Tulla-Puche, J., & Albericio, F. (2013). Handles for Fmoc solid-phase synthesis of protected peptides. *ACS combinatorial science*, 15(5), 217-228.
- Budimarwanti, C. (2009). Sintesis senyawa 4-hidroksi-5-dimetilaminometil-3-metoksibenzil alkohol dengan bahan dasar vanilin melalui reaksi Mannich. In Makalah dalam Seminar Nasional Jurusan Pendidikan 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.
- Jin, H. X., Xu, H. P., Li, Y., Zhang, Q. W., & Xie, H. (2019). Preparation and evaluation of peptides with potential antioxidant activity by microwave assisted enzymatic hydrolysis of collagen from sea cucumber *acaudina molpadioides* obtained from Zhejiang Province in China. *Marine drugs*, 17(3), 169.
- Mäde, V., Els-Heindl, S., & Beck-Sickinger, A. G.

- (2014). Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides. *Beilstein journal of organic chemistry*, 10(1), 1197-1212.
- Maharani, R. (2018). *Konstruksi Peptida Secara Kimia Sintesis Peptida Fasa Padat*. Bandung: BITREAD Publishing.
- Maharani, R., Sumiarsa, D., Marpaung, C., Zainuddin, A., Hidayat, A. T., Harneti, D., Nurlelasi, 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.
- Petrou, C., & Sarigiannis, Y. (2018). Peptide synthesis: Methods, trends, and challenges. In *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering* (pp. 1-21). Woodhead Publishing.
- Werdhasari, A. (2014). Peran antioksidan bagi kesehatan. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*. Vol, 59, 68.
- 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 proteins. *Molecules*, 21(1), 7.
- Yuslianti, R. E. (2018). *Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan*. Yogyakarta: CV Budi Utama.
- Zamani, M., Delfani, A. M., & Jabbari, M. (2018). Scavenging performance and antioxidant activity of γ -alumina nanoparticles towards DPPH free radical: Spectroscopic and DFT-D studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 201, 288-299.
- Fauzi, Nur Muhammad. (2021). *Uji Kualitatif dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Buah Maja (Aegle Marmelos (L.)Correa) dengan Metode DPPH*. *Jurnal Riset Farmasi*, 1(1), 1-8.