

Sintesis Tetrapeptida MeFYAP (mePhe-Try-Ala-Pro) dengan Metode *Solid Phase Peptide Synthesis* sebagai Kandidat Antioksidan

Fajriati Rohmah, Nety Kurniaty, Bertha Rusdi, Rani Maharani

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

email: fajriatirohmah@gmail.com, netykurniaty@yahoo.com, berthar.rusdi@unisba.ac.id, r.maharani@unpad.ac.id

ABSTRACT: Free radicals are molecules that are unpaired in their outer orbitals, free radical activity can be inhibited by antioxidants by binding and stabilizing the free radicals. Antioxidant peptides are able to ward off free radicals, one of the peptides derived from natural ingredients is the tetrapeptide FLAP (Phe-Leu-Ala-Pro) and one of its derivatives (mePhe-Try-Ala-Pro) which has been successfully modified from Sea Cucumber (*Acaudia Molpadiodes*) in Zhejiang China. So that the tetrapeptide has the potential to be developed as an antioxidant. Isolation of peptides from nature requires large amounts of raw materials so it is considered less efficient. Therefore, in this study, a more efficient and environmentally friendly tetrapeptide (mePhe-Try-Ala-Pro) was produced, namely the solid phase synthesis method or (SPPS) with the Fmoc amino acid strategy using 2-chlorotriyl chloride resin with the help of HOBt, HBTU and reagents. DIPEA. The results showed that the synthesis was successful with the resulting tetrapeptide weight of 143.7 mg. However, based on the results of the characterization using a mass spectrophotometer and RP-HPLC, it was found that there were still impurities that needed further purification. Furthermore, the results of the antioxidant activity test on the tetrapeptide compound showed that the compound had a percent IC₅₀ value of 17.677% indicating that the antioxidant activity of the compound was weak.

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

ABSTRAK: Radikal bebas adalah molekul yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya, aktivitas radikal bebas dapat dihambat dengan antioksidan dengan cara berikatan dan menstabilkan radikal bebas tersebut. Peptida antioksidan mampu menangkal radikal bebas, salah satu peptida yang berasal dari bahan alam adalah tetrapeptida FLAP (Phe-Leu-Ala-Pro) dan salah satu derivatnya yaitu (mePhe-Try-Ala-Pro) yang berhasil dimodifikasi dari Teripang (*Acaudia Molpadiodes*) di Zhejiang Cina. Sehingga tetrapeptida tersebut potensial untuk dikembangkan sebagai antioksidan. Isolasi peptida dari alam memerlukan bahan baku dalam jumlah besar sehingga dinilai kurang efisien. Maka pada penelitian ini dilakukan produksi tetrapeptida (mePhe-Try-Ala-Pro) yang lebih efisien dan ramah lingkungan yaitu dengan metode sintesis fase padat atau (SPPS) dengan strategi Fmoc asam amino menggunakan resin 2-klorotriyl klorida dengan bantuan reagen HOBt, HBTU dan DIPEA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sintesa berhasil dilakukan dengan berat tetrapeptida yang dihasilkan sebesar 143,7 mg. Namun berdasarkan hasil karakterisasi dengan spektrofotometer massa dan RP-HPLC ditemukan bahwa masih terdapat pengotor sehingga perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut. Selanjutnya hasil uji aktivitas antioksidan pada senyawa tetrapeptida menunjukkan bahwa senyawa memiliki nilai persen IC₅₀ sebesar 17,677 % menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan senyawa tersebut lemah.

Kata Kunci: Antioksidan, tetrapeptida, sintesis peptide fase padat

1 PENDAHULUAN

Radikal bebas adalah molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya, radikal bebas sangat reaktif dan tidak stabil, sebagai usaha untuk mencapai kestabilannya radikal bebas akan bereaksi dengan atom atau molekul di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron (Inggrid dan

Santoso, 2014). Penyakit degeneratif dapat disebabkan oleh radikal bebas, karena radikal bebas dapat mengoksidasi asam nukleat, protein, atau lipid yang ada dalam sel sehingga menimbulkan kerusakan sel (Inggrid dan Santoso, 2014). Dalam tubuh manusia, salah satu bentuk radikal bebas adalah senyawa oksigen reaktif. Senyawa oksigen reaktif dihasilkan dari reaksi proses metabolisme oksidatif dalam tubuh

(Langseth, 1995).

Aktivitas radikal bebas dapat dihambat oleh antioksidan dengan cara berikatan dengan menstabilkan radikal bebas tersebut (Winarsi, 2007). Sumber antioksidan banyak ditemukan dari bahan alami, salah satunya dari senyawa fenolik (Karadeniz et al., 2005). Senyawa fenolik dapat diisolasi dari bahan alam ataupun hasil sintesis peptida bioaktif (Budimaranti, 2009).

Peptida yang memiliki aktivitas antioksidan tersebut bisa berasal dari bahan alam. Jin, et al., (2019) berhasil mengisolasi tetrapeptida FLAP (Phe-Leu-Ala-Pro) dan salah satu derivatnya tetrapeptide (mePhe-Try-Ala-Pro) yang berhasil dimodifikasi dari Teripang *Acaudia Molpadiodes* di Zhejiang Cina. Pada penelitian tersebut ditemukan hasil uji antioksidan yang kurang baik, sehingga dilakukan sintesis peptida dengan urutan asam amino yang berbeda yaitu derivatnya MeFYAP (mePhe-Try-Ala-Pro).

Alternatif untuk mendapatkan tetrapeptida adalah melalui proses sintesa. Sintesis tetrapeptida dengan menggunakan metode Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) dapat memberikan keuntungan yaitu proses pengerjaan yang lebih sederhana, cepat, tidak memerlukan pelarut yang banyak sehingga metode ini cocok untuk mendukung go green (Scott, 2009). Dengan demikian pada penelitian ini akan dilakukan sintesis tetrapeptida (mePhe-Try-Ala-Pro) dengan metode SPPS yang diharapkan dapat menghasilkan senyawa yang lebih stabil dari pada yang diisolasi dari teripang.

Berdasarkan uraian di atas, dapat dirumuskan permasalahan yang didapat yaitu apakah tetrapeptida dengan urutan asam amino (mePhe-Try-Ala-Pro) dapat disintesis dengan menggunakan metode Solid Phase Peptide Synthesis? dan apakah tetrapeptida tersebut memiliki aktivitas antioksidan?

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan sintesis (mePhe-Try-Ala-Pro) tetrapeptida dengan menggunakan metode Solid Phase Peptide Synthesis, keberhasilan sintesis dipantau dengan instrumen HPLC dan dikarakterisasi dengan spektrometer massa. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan menguji aktivitas antioksidan tetrapeptida (mePhe-Try-Ala-Pro) dengan metode DPPH.

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai prosedur sintesa tetrapeptida (mePhe-Try-Ala-Pro)

menggunakan metode Solid Phase Peptide Synthesis. Kemudian jika tetrapeptida tersebut terbukti memiliki aktivitas antioksidan, maka dapat dikembangkan lebih lanjut menjadi bahan antioksidan untuk obat, makanan dan kosmetik.

2 METODOLOGI

Pada penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran. Beberapa asam amino yang digunakan yaitu Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH dan Fmoc-L-N-mePhe-OH. Dan sintesis tetrapeptida mePhe-Tyr-Ala-Pro dilakukan dengan memakai metode dari solid phase peptide synthesis (SPPS) yang juga terdiri dari 5 tahapan, diantaranya yaitu pertama dilakukan pengkondisian dari tabung reaktor, kemudian dilakukan pengembangan resin, dan pengkoplingan asam amino pertama pada resin yang memiliki tujuan sebagai penyangga. Lalu menentukan nilai dari loading resin yang fungsinya untuk menentukan berapa banyak jumlah asam amino berikutnya yang akan ditimbang, setelah itu dilakukan capping resin yang memiliki tujuan untuk menutupi gugus aktif dalam resin agar tidak terjadi ikatan dengan asam amino lain. Dan juga dilakukan uji kloranil yang memiliki tujuan untuk memastikan keberhasilan dari pengkoplingan dengan ditandai tidak terjadi perubahan warna pada sampel, serta dapat dilihat alir metodologi penelitian. Kemudian tahapan berikutnya dilakukan pelepasan pada gugus pelindung Fmoc atau (deproteksi) yang memiliki tujuan untuk mebgikat antara asam amino satu dan asam amino lainnya. Setelah itu dilakukan uji kloranil yang memiliki tujuan untuk mengetahui apakah pelepasan gugus pelindung Fmoc atau (deproteksi) sudah lepas dengan ditandai adanya perubahan warna pada sampel.

Tahapan selanjutnya yaitu dilakukan pengkoplingan yang asam amino kedua dan juga pelepasan dari gugus pelindung Fmoc atau (deproteksi), dimana pada tahap ini diulang hingga asam amino yang ke empat dan sampai terbentuk tetrapeptida.

Tahapan berikutnya dilakukan pelepasan tetrapeptida dari resinnya, setelah resin dapat terlepas dari tetrapeptida tersebut dilakukan proses pemekatan dan juga proses pengeringan tetrapeptida dengan menggunakan rotary

evaporator yang memiliki tujuan menghilangkan pelarut yang terdapat pada sampel tetrapeptida. Kemudian dilakukan pendinginan dengan menggunakan bantuan desikator.

Tahapan terakhir yaitu dilakukan karakterisasi dengan menggunakan Spektrofotometer massa agar dapat memastikan bentuk dari senyawanya dan juga melihat bobot molekul dari struktur tetrapeptida tersebut yang didasarkan pada pola fragmentasi yaitu masa per muatan ion atau (m/z). Dan melakukan uji kemurnian dengan menggunakan KCKT fasa terbalik untuk melihat puncak dari waktu retensinya. Setelah itu melakukan pengujian antioksidan dengan metode DPPH.

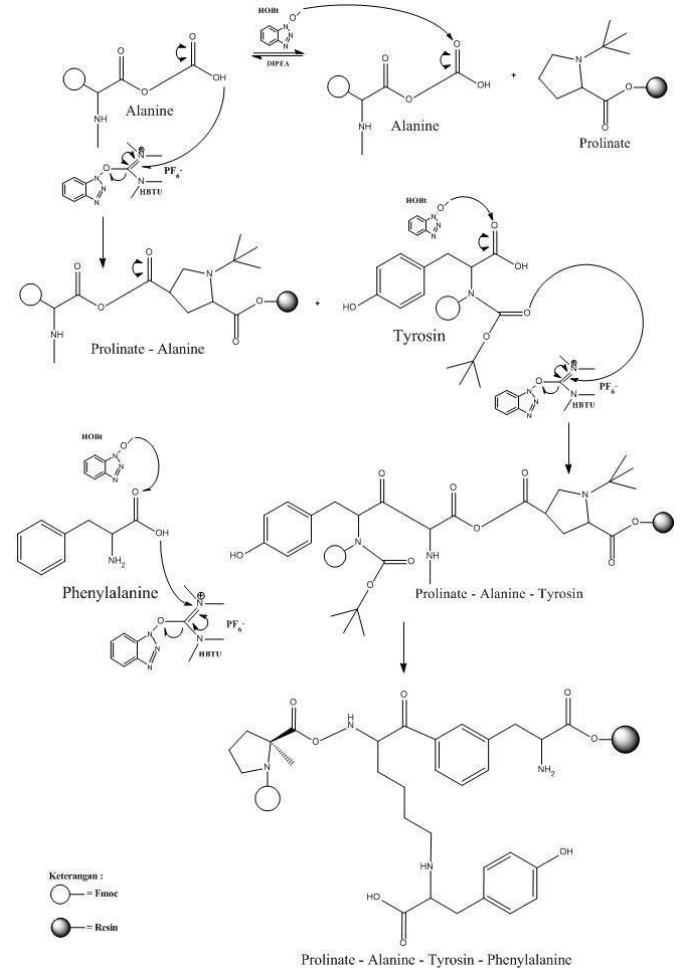
3 HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan sintesis tetrapeptida mePhe-Try-Ala-Pro dengan menggunakan metode *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS) metode ini digunakan karena efektif, cepat, sederhana dan sebagian pengotor dapat dicuci dari resin pada setiap tahapannya (Miriam, 2013). strategi yang digunakan pada metode SPPS adalah strategi Fmoc/t-Bu, dimana asam amino yang digunakan adalah asam amino yang memiliki gugus pelindung tujuannya supaya tidak mengganggu reaksi saat dilakukannya sintesis sehingga reaksi akan berjalan dengan baik. Dalam metode sintesis ini, resin akan mempertahankan gugus amino terminal-C dalam gugus karboksilnya sekaligus mensintesis peptida (Fessenden, 1986). Reagen yang digunakan yaitu reagen HBTU dan HOBT yang berperan sebagai reagen pengkopling pada saat penyusunan rangkaian asam amino.

Pengkoplingan Asam Amino Pertama

Pengikatan asam amino ujung-C pada Fmoc-L-Pro-OH terhadap resin 2-klorotritil klorida dilakukan dengan menambahkan campuran reaksi antara Fmoc-L-Pro-OH dan DIPEA dalam diklorometana pada resin yang telah dikembangkan dalam diklorometana. Reaksi pengikatan asam amino pertama Fmoc-L-Pro-OH ke resin 2-klorotritil klorida tidak melibatkan aktivasi gugus karboksil sehingga dapat mencegah terjadinya reaksi rasemisasi. Reaksi yang terjadi hanyalah pengambilan hidrogen gugus karboksil pada Fmoc-L-Pro-OH. Selanjutnya, nukleofil yang terbentuk menggantikan atom klorida pada atom karbon kuartener yang terdapat pada resin 2-klorotritil klorida. Dengan demikian, asam amino

pertama Fmoc-L-Pro-OH dapat terikat pada resin. Penggunaan resin 2-klorotritil klorida dapat pula mencegah reaksi samping berupa pembentukan diketopiperazin karena merubahnya gugus aktif 2-klorotritil klorida tersebut. Resin 2-klorotritil klorida ini sangat sensitif terhadap air sehingga pada pelaksanaannya resin harus benar-benar dijaga dari air dan udara lembab (Chan & White, 2000). Pengkoplingan asam amino dapat dilihat



pada gambar dibawah ini

Gambar 1 Skema Pengkoplingan Asam Amino

Tahapan selanjutnya yaitu Loading resin yang memiliki tujuan untuk menentukan suatu jumlah asam amino yang dapat ditimbang pada tahap berikutnya. Sampel ditimbang sebanyak 0,6 mg kemudian ditambahkan 1,6 ml piperidin 20% dalam DMF ad 10 mL didalam gelas ukur. Kemudian didiamkan selama 30 menit, selanjutnya absorbansinya diukur pada λ 290 nm. Setelah itu dihitung nilai loading resin yang diperoleh. Sampel yang ditimbang rentangnya 0,5 – 0,6 mg tidak boleh terlalu besar karena dapat menyebabkan penumpukan sampel dan ketika dilakukan spektrofotometer akan mempengaruhi nilai

absorbansinya. Loading resin atau pemuatan resin dalam mengikat asam amino kemudian dihitung. Absorbansi sebesar 0,3208 diperoleh dan dimasukkan dalam persamaan yang diperoleh hasil loading resin diperoleh sebesar 0,55 mmol/g yang menandakan bahwa resin mampu mengikat asam amino dengan baik. Rata-rata loading resin yang baik berada pada 0,1-1,3 mmol/mg.

Tahapan berikutnya yaitu Capping Resin, diketahui hanya sebagian resin yang berikatan dengan asam amino, sehingga diperlukan penutup ujung resin. Resin penutup ujung dimaksudkan untuk menutupi gugus reaktif pada resin 2-klorotritil klorida yang tidak bereaksi dengan asam amino pertama. Pada sampel yang mengandung resin dan Fmoc-L-Pro-OH, ditambahkan metanol:DCM:DIPEA (2:7:1).

Berikutnya dilakukan Tahap pelepasan gugus pelindung Fmoc atau (deproteksi) dapat dilakukan setelah proses capping resin, yaitu sebelum dilakukannya pengkoplingan asam amino yang kedua. Dimana pelepasan gugus pelindung Fmoc dilakukan agar dapat menyediakan sisi aktif asam amino pertama yang dan mampu bereaksi dengan asam yang amino kedua. Gugus pelindung Fmoc adalah suatu gugus pelindung yang bersifat labil dalam kondisi basa sehingga mampu dilepaskan dengan menggunakan suasana basa. Pelepasan gugus pelindung atau deproteksi memiliki tujuan penyedia sisi aktif gugus amina (NH₂) pada asam amino sehingga sifatnya lebih reaktif pada saat direaksikan dengan asam amino selanjutnya. Gugus pelindung Fmoc merupakan suatu gugus pelindung yang labil dalam kondisi basa dan stabil pada kondisi asam sehingga untuk melepaskannya perlu ditambahkan menggunakan basa.

Penyusunan Asam Amino

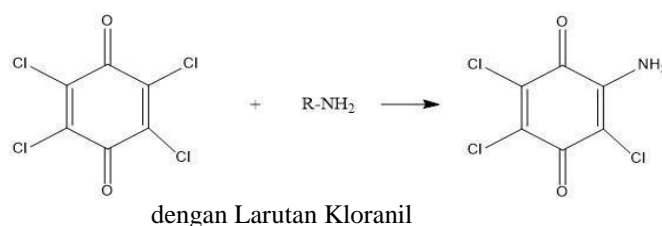
Susunan dari sintesis asam amino kali ini yaitu menggunakan asam amino Fmoc-Pro-(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Tyr(Boc)-OH dan terakhir Fmoc-mePhe(tBu)-OH. Asam amino kedua yaitu Fmoc-Ala-OH yaitu asam amino Alanina yang pada gugus hidroksil (-OH) pada rantai samping asam amino tersebut tidak dilindungi oleh gugus pelindung rantai samping dan gugus amina pada terminal-N asam amino telah dilindungi dengan suatu gugus Fmoc supaya tidak mengganggu pada suatu proses reaksi. Asam amino ketiga yaitu Fmoc-Tyr(Boc)-OH yaitu asam amino Tyrosin yang pada gugus hidroksil (-OH) pada rantai samping asam amino tersebut telah dilindungi

dengan tert-butiloksikarbonil (Boc) dan gugus amina pada terminal-N asam amino yang telah dilindungi dengan gugus Fmoc agar tidak mengganggu pada suatu proses reaksi. Asam amino Keempat yaitu Fmoc-mePhe(tBu)-OH yaitu asam amino Metil phenilalanin yang pada gugus hidroksil (-OH) pada rantai samping asam amino tersebut telah dilindungi oleh tersier butil (t-Bu) dan gugus amina pada terminal-N asam amino telah dilindungi oleh gugus Fmoc agar tidak mengganggu pada suatu proses reaksi.

Uji Kloranil

Uji kloranil dilakukan agar menjadi suatu kontrol pada deproteksi Fmoc. Dimana keberhasilan deproteksi dengan uji kloranil dapat ditandai dengan terjadinya perubahan warna resin menjadi warna hijau, karena didalamnya terdapat gugus amina (-NH₂). Berdasarkan hasil yang diperoleh pada saat proses pengkoplingan sampel tidak mengalami perubahan warna yang ditandai dengan warna resin tetap berwarna kekuningan, hal ini menunjukkan bahwa tidak ada gugus amina (NH₂) yang bebas. Pada saat proses deproteksi pelepasan gugus pelindung asam amino hasil yang diperoleh sampel mengalami perubahan warna yaitu yang asalnya warna resin kekuningan menjadi warna kehijauan hal tersebut disebabkan karena terdapat gugus amina (NH₂) yang bebas.

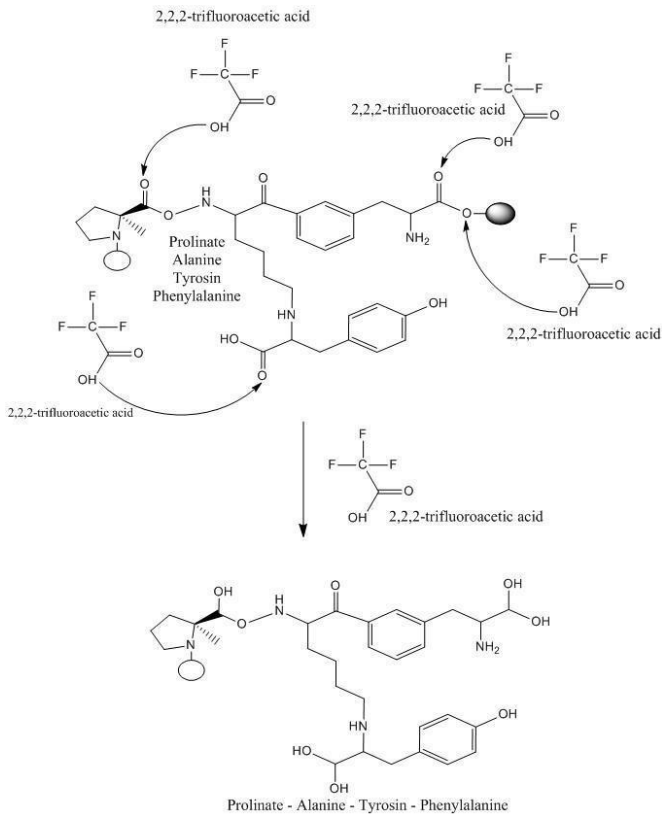
Gambar 2 Reaksi Pengujian Gugus Amino



Pelepasan Tetrapeptida Dari Resin

Tetrapeptida dari target yang telah dilakukan sintesis selanjutnya dilepaskan dari resin. Dimana pelepasan peptida dapat dilakukan dengan menambah reagen TFA 95% pada resin yang mengikat peptida yang kemudian dilakukan pengulangan sebanyak dua kali agar dapat memastikan seluruh senyawa peptitida tersebut benar-benar terlepas dari resin. Dan penggunaan konsentrasi yang tinggi dari reagen TFA memiliki tujuan untuk melepaskan gugus pelindung rantai samping t-Bu pada asam amino Pro dan mePhe. Air pada reaksi ini yaitu bertindak sebagai scavenger karbokation yang terbentuk setelah

Sintesis Tetrapeptida MeFYAP (mePhe-Try-Ala-Pro) Dengan Metode *Solid Phase Peptide Synthesis* Sebagai Kandidat Antioksidan | 553
 proses pelepasan peptida dari resin. Pada saat reaksi pelepasan peptide terjadi warna resin akan



berubah menjadi merah (Chan dan White, 2000).
Gambar 3 Pelepasan Resin dan Pelepasan Gugus Pelindung Rantai Sampung

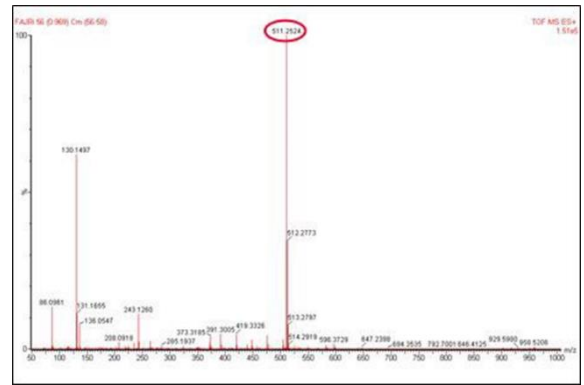
Evaporasi

Proses evaporasi ini bertujuan untuk memekatkan sampel dan meguapkan sisa-sisa pelarut yang terkandung dalam sampel tetrapeptida asam amino. Sampel larutan tetrapeptida kemudian dimasukan ke dalam vial sebagian lalu dievaporasi kemudian setelah kering ditambahkan kembali sampel lalu dievaporasi kembali. Setelah itu vial dicuci dengan DMF secara duplo kemudian dimasukan ke dalam vial lalu dievaporasi. Selanjutnya hasil evaporasi dimasukan ke dalam desikator dan diberi nama. Hasil evaporasi kemudian ditimbang menggunakan tabung eppendorf sebanyak 1 mg untuk pengujian spektrofotometer massa dan 1 mg untuk pengujian RP-HPLC lalu ditambahkan metanol 1 mL. Setelah proses pemekatan selesai lalu sampel tetrapeptida diperoleh seperti selai berwarna kecoklatan sebanyak 143,7 mg.

Pengujian dengan Spektrofotometer Massa

Tujuan dilakukan karakterisasi ini adalah untuk mengidentifikasi senyawa tetrapeptida MeFYAP linier yang telah di sintesis dengan cara

mengetahui nilai massa/muatan (m/z) dari suatu senyawa tetrapeptida MeFYAP linier.

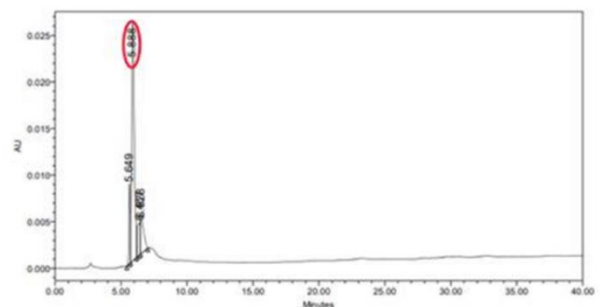


Gambar 4 Hasil Spektrogram Massa Tetrapeptida (mePhe-Try-Ala-Pro)

Berdasarkan hasil fragmen dari spektrofotometer massa, didapat puncak fragmen pada 511,2422 m/z puncak ini juga mengindikasikan puncak ion $[M+H]^+$ untuk tetrapeptida.

Pengujian RP-HPLC (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography)

Tujuan pengujian dengan RP-HPLC untuk melihat waktu retensi sampel tetrapeptida dan mengetahui kemurnian suatu sampel tetrapeptida. Pengujian dilakukan dengan RP-HPLC analitik untuk mengetahui bahwa tetrapeptida hasil sintesis sudah murni. RP-HPLC menggunakan kolom fase balik karena peptida memiliki gugus polar yang sangat berpotensi untuk membentuk ikatan hidrogen dengan gugus silanol dari silika gel, sehingga profil pemisahannya akan membentuk ekor.



Gambar 5 Hasil Kromatogram RP-HPLC Tetrapeptida (mePhe-Try-Ala-Pro)

Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Senyawa yang telah dimurnikan dan dikarakterisasi selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan uji DPPH. Peptida murni dapat dibuat menjadi konsentrasi 2000 ppm dalam metanol. Selanjutnya dapat dibuat peptida dengan beberapa macam konsentrasi yang berbeda (1600 dan 8000 ppm) sebanyak 200 μ L (yang sudah termasuk 40 μ L DPPH di dalamnya), lalu didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit di ruangan dan terhindar cahaya. Absorbansi campuran dapat diukur pada panjang gelombang 517 nm. Blanko atau (pelarut metanol) disiapkan dengan melakukan perlakuan yang sama. Kemudian dihitung nilai % inhibisi dari DPPH.

Uji antioksidan dengan menggunakan metode DPPH ini dipilih karena metode ini sederhana, mudah, cepat dan peka sehingga digunakan untuk menguji kemampuan senyawa yang berperan sebagai pendonor elektron atau hidrogen. Pengujian dengan metode DPPH bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya suatu senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dalam menangkalkan radikal bebas. Adapaun prinsip dari pengujian dengan metode DPPH yaitu atom hydrogen akan berikatan dengan elektron bebas pada senyawa radikal, sehingga radikal bebas akan menyebabkan perubahan menjadi nonradikal yang ditandai dengan perubahan warna dari warna ungu menjadi warna kuning (Molyneux, 2004).

Hasil nilai IC₅₀ yang diperoleh dari uji aktivitas antioksidan pada tetrapeptida mePheYAP adalah 17667 ppm. Dilihat pada Tabel 5.1 dapat dikatakan bahwa senyawa mePheYAP memiliki aktivitas antioksidan yang lemah karena menurut Armala (2009) tingkat dari kekuatan senyawa yang memiliki aktifitas antioksidan terhadap DPPH dikatakan aktivitasnya lemah jika nilai IC₅₀ >150 μ g/mL.

Tabel 1 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Sampel Tetrapeptida

Konsentrasi (ppm)	% INH	ABS
0	0	0,8119
1600	9,4716	0,735
8000	23,5127	0,621
IC 50	17,677	

Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin C sebagai Pembanding

Pembanding yang digunakan pada penelitian ini adalah vitamin C sebagai pembanding untuk senyawa tetrapeptida. Vitamin C merupakan antioksidan yang larut dalam air. Penggunaan pembanding ini bertujuan untuk mengetahui seberapa kuat potensi antioksidan yang ada pada sampel tetrapeptida jika dibandingkan dengan Vitamin C yang tergolong antioksidan sangat kuat.

Tabel 2 Hasil Uji Aktivitas Pembanding Vitamin C

Konsentrasi (ppm)	% INH	ABS
0	0	0,8119
1	8,4862	0,743
10	88,5207	0,0932
IC 50	5,6585	

Kekuatan aktivitas antioksidan suatu senyawa dapat dilihat dari Nilai IC₅₀, jika IC₅₀ < 50 ppm termasuk antioksidan yang sangat kuat, 50-100 ppm antioksidan yang tergolong kuat, 100-150 ppm antioksidan yang tergolong sedang, 150-200 ppm antioksidan yang tergolong lemah dan >200 ppm adalah antioksidan yang tergolong sangat lemah, maka semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin kuat sifat antioksidan yang terkandung dalam zat tersebut (Molyneux, 2004). Dari hasil uji aktivitas antioksidan dilaporkan bahwa vitamin C dapat dilihat pada Tabel 5.2 memiliki nilai IC₅₀ sebesar 5,6585 μ g/mL, yang menunjukkan bahwa antioksidan yang terkandung pada vitamin C sangat kuat karena < 50 μ g/mL.

4 KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Senyawa tetrapeptida mePhe-Try-Ala-Pro dapat disintesis menggunakan metode solid phase peptide synthesis dengan menggunakan reaktan DCM, DMF, HBTU, HOBt, DIEPA dan menghasilkan sebanyak 143,7 mg. Kemudian dilakukan karakterisasi dengan menggunakan metode spektrofotometer massa yang akan ditandai dengan munculnya puncak fragmen pada m/z 511 yang dapat menandakan puncak ion $[M+H]^+$. Selanjutnya dilakukan pengujian menggunakan metode RP-HPLC agar dapat melihat suatu kemurnian dari senyawa tetrapeptida dan didapat waktu retensinya pada menit ke 5,888 yang ditandai dengan adanya satu puncak.

Kemudian setelah didapat senyawa tetrapeptida dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH maka didapat IC50 sebesar 17677 ppm dan menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan dari senyawa tersebut lemah.

Saran

Penelitian ini hanya dilakukan sampai terbentuk tetrapeptida linier sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut agar sampai membentuk tetrapeptida yang siklik sebagai perbandingan kestabilannya. Dan pengujian aktivitas antioksidan pada senyawa tetrapeptida perlu dilakukan kembali dengan menambahkan konsentrasi yang lebih tinggi dan sebaiknya uji aktivitas senyawa antioksidan dilakukan dengan metode yang lebih sensitif seperti pada metode ABTS dan menggunakan pembanding yang disarankan atau senyawa yang memiliki mekanisme yang sama dengan antioksidan pada peptida.

DAFTAR PUSTAKA

Acun., Sodiyc. 2010, Kromatografi Gas, Jakarta.
 Armala, M. M. (2009). Daya Antioksidan Fraksi Air Ekstrak Herba Kenikir (*Cosmos caudatus* H. B. K.) dan Profil KLT. Skripsi, 39.

Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Islam Indonesia.

- Budimaranti 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.
- Dachriyanus. (2004). Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi. Padang: Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi dan Komunikasi (LPTIK) Universitas Andalas.
- Dehpour, A.A., Ebrahimzadeh, M.A., Fazel, N.S., and Mohammad, N.S., 2009, Antioxidant Activity of Methanol Extract of *Ferula Assafoetida* and Its Essential Oil Composition, *Grasas Aceites*, 60(4), 405-412
- Escudero, E., Mora, L., Fraser, P. D., Aristoy, M.-C., & Toldrá, F. (2013). Identification of novel antioxidant peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1282-8.
- Fessenden dan Fessenden, *Kimia Organik Edisi ketiga*, Jilid 1, Jakarta: Penerbit Erlangga, 1986.
- Hery Winarsi. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius. Hal. 189-90
- Kim, S. K., Ngo, D. H., Vo, T. S. (2012). Marine fish-derived bioactive peptides as potential antihypertensive agents. *Advances in Food and Nutrition Research*, 65, 249-260.
- Huang C et., al. 2005. Identification of an Antifungal Chitinase from a Potential Biocontrol Agent, *Bacillus cereus*. *Journal of Biochemistry and molecular Biology*, 38 : 82-88.
- Inggrid, M., Santoso, H., *Ekstraksi Antioksidan dan Senyawa Aktif dari Buah Kiwi (Actinidia deliciosa)*, Perjanjian No: III/LPPM/2014-03/10-P, Universitas Katolik Parahyangan, 2014.
- Karadeniz, F., Burdurlu, H.S., Koca, N., and Soyer, Y., 2005, Antioxidant Activity of Selected Fruits and Vegetables Grown in Turkey, *Turk. J. Agric. For.*, 29, 297-303.
- Khopkar, S.M., *Konsep Dasar Kimia Analitik*, Farmasi

- 1990, 275-286,389-400, UI Press, Jakarta.
- Kikuzaki, H. & Nobuji, N. (1993), Antioxidant effect of some ginger constituents, *Food Science*, 58, 1407- 1410
- Langseth, L., 1995, Oxidant, Antioxidant, and Disease Prevention, International Life Science Institute press, Belgium.
- Lestari, Wahyuni Sri, 2014, Validasi Metode Penetapan Kadar Aliskirendalam Plasma darah secara In Vitro Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). UIN Syarif Hidayatullah: Jakarta.
- Leong, L.P., dan Shui, G., 2002, An Investiigation of Antioxidant Capacity of Fruits in Singapore Markets, *Food Chemistry*. 76:69-75
- Lieberman, M., & Peet, A. (2018). *Marks' Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach 5th Edition*. Philadelphia: Wolters Kluwer.
- Lorio, E.L. (2007). The Measurement of Oxidative Stress. International Observatory of Oxidative Stress, Free Radicals and Antioxidant Systems. Special supplement to Bulletin 4 (1).
- Miriam, Gongora-Benitez., 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 Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *Songklanakarinn J. Sci. Technol*, 212-217.
- Prakash, A., 2001, Antioxidant Activity, *Medallion Laboratories Analytical Progress*, vol. 19, No.2.
- Predi Mubarok, 2020. Sintesis Tetrapeptida Ser-Pro-Lys-Thr Dengan Metode Solid Phase Peptide Synthesis. Skripsi. FMIPA, Farmasi, Universitas Islam Bandung, Bandung.
- Purnomo Suryohandono, 2000. Oksidan, Antioksidan, dan Radikal Bebas. Buku Naskah Lengkap Simposium Pengaruh Radikal Bebas Terhadap Penuaan dalam Rangka Lustrum IX FKUA 7 September 1955-2000.
- Sanchez A, Vasquez A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Qual Saf*. 1:29-46.
- Stawikowski, M., and Fields, G.B. (2013), *Introduction to Peptide Synthesis*, NIH Public Access. National Institutes of Health
- Scott, P. J. H.,2009. *Linker Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis*, Wiley&Sons Ltd.Chichester.
- Sudarmadji, S; B. Haryono dan Suhardi. (1989). *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Penerbit Liberty. Yogyakarta.
- Sugiyono. 2004. *Metode Penelitian*. Bandung: Alfabeta.
- Suharsono,1970. *Biokimia*. Erlangga, Jakarta. Hlm. 33-45
- Irwansyah. (2010). *Studi Struktur Self-Asembly Peptida Ampifil*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Khopkar, S.M. (1990). *Konsep Dasar Kimia Analitik* Jakarta: UI- Press.
- Sulistyowati Tuminah. 2000. Radikal bebas dan antioksidan - kaitannya dengan nutrisi dan penyakit kronis. *Cermin Dunia Kedokteran* no. 128: 49-51.
- Wardlaw, G.M., Hampl, J.S., Disilvestro, R.A.(2004). *Dietary Fiber*. In: Meyers, L.M., ed. *Perspectives in Nutrition*. 6th ed. New York: McGraw-Hill. 151-158.
- Zou TB, He TP, Li HB, Tang HW, Xia EQ. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*.
- Azhar Salma Fadhilah, Y Kiki Mulkiya, Kodir Reza Abdul. (2021). *Pengaruh Waktu Aging dan Metode Ekstraksi terhadap Aktivitas Antioksidan Black Garlic yang Dibandingkan dengan Bawang Putih (Allium sativum L.)*. *Jurnal Riset Farmasi*, 1(1), 16-23.