

# Sintesis Tetrapeptida FmeLAP (Phe-meLeu-Ala-Pro) sebagai Kandidat Antioksidan dengan Metode *Solid Phase Peptide Synthesis*

Amia Sovitami, Nety Kurniaty, Bertha Rusdi, Rani Maharani

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

*email: amiastmi@gmail.com, netykurniaty@yahoo.com, bertha.rusdi78@gmail.com, r.maharani@unpad.ac.id*

**ABSTRACT:** Antioxidant peptides are a group of peptides that can capture free radicals, so as to prevent premature aging and degenerative diseases, one of the natural antioxidant peptide compounds that has been found by previous researchers is the linear tetrapeptide compound FLAP (Phe-Leu-Ala-Pro) isolated from the sea cucumber *Acaudina Molpadiodes* found in Zhejiang China and reported to have poor antioxidant activity. In this study, tetrapeptide FmeLAP (Phe-meLeu-Ala-Pro) has been synthesized using the Solid phase peptide synthesis method on 2-chlorotriethyl chloride resin. Fmoc was used as a protective amino acid group. In the preparation of the peptide fragment, a combination of HOBt and HBTU was used as a coupling reagent in the synthesis of FmeLAP. After the peptide fragments were arranged on the resin, the combination of trifluoroacetic acid in dichloromethane was added for the process of releasing the peptides from the resin. Concentration was carried out using a rotary evaporator. Then the characterization was carried out using a mass spectrophotometer, the peak of the fragment was obtained at m/z 461 and a purity test was carried out using RP-HPLC the results were obtained at 11.035 minutes. In testing the antioxidant activity using the DPPH method, the results obtained from the tetrapeptide compound (Phe-meLeu-Ala-Pro) is an inhibition value of 47% which indicates that substitution of leucine to methyl leucine did not improve the antioxidant activity of the compound.

**Keywords:** Antioxidant, FmeLAP tetrapeptide, Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)

**ABSTRAK:** Peptide antioksidan merupakan kelompok peptide yang dapat menangkap radikal bebas, sehingga dapat mencegah penuaan dini dan penyakit degenerative, salah satu senyawa peptide antioksidan alami yang telah ditemukan peneliti sebelumnya yaitu senyawa tetrapeptida linier FLAP (Phe-Leu-Ala-Pro) yang diisolasi dari teripang *Acaudina Molpadiodes* yang di temukan di Zhejiang China dan dilaporkan memiliki aktifitas antioksidan yang kurang baik. Telah dilakukan sintesis Tetrapeptida FmeLAP (Phe-meLeu-Ala-Pro) dengan menggunakan metode Solid phase peptide synthesis pada resin 2-klorotrietil klorida. Pada penelitian ini digunakannya Fmoc sebagai gugus pelindung asam amino. Pada penyusunan fragmen peptida digunakan kombinasi HOBt dan HBTU sebagai reagen pengkopling dalam sintesis FmeLAP. Setelah fragmen peptida tersusun pada resin, ditambahkan kombinasi asam trifluoroasetat dalam diklorometana untuk proses pelepasan peptida dari resin. Dilakukan pemekatan menggunakan rotary evaporator. Kemudian dilakukan karakterisasi menggunakan spektrofotometer massa didapat puncak fragmennya pada m/z 461 dan dilakukan uji kemurnian menggunakan RP-HPLC hasil yang didapat pada menit ke 11,035. Pada pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH, hasil yang didapat dari senyawa tetrapeptida (Phe-meLeu-Ala-Pro) yaitu nilai inhibisi sebesar 47% yang menunjukkan bahwa pergantian asam amino leusin menjadi metil leusin tidak meningkatkan aktivitas antioksidan dari senyawa tetrapeptida.

**Kata Kunci:** Antioksidan, tetrapeptida FmeLAP, Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)

## 1 PENDAHULUAN

Peptida tersusun atas 20 asam amino, beberapa senyawa ini diketahui memiliki bioaktivitas sehingga disebut peptida bioaktif. Peptida bioaktif diantaranya diketahui memiliki aktivitas sebagai antihipertensi (Minervini, et. al., 2003), meningkatkan kekebalan tubuh, anti kanker (Kim, et. al., 2009), antimikroba dan antioksidan (Jeong, et. al., 2007).

Peptida berpotensi sebagai antioksidan karena diketahui dapat mereduksi radikal hidroperoksida dan menstabilkan radikal secara enzimatis. Peptida antioksidan dapat digunakan dalam obat-obatan

ataupun makanan karena memiliki efek samping yang rendah dan dapat dicerna dalam tubuh (Byun, et. al., 2009; Elias, et. al., 2008). Peptida dengan beberapa urutan asam amino memiliki aktivitas sebagai antioksidan melalui hidrolisis enzimatis (Bougatef, et. al., 2010).

Menurut Jin, et. al., (2009), telah ditemukan urutan asam amino FLAP (Phe-Leu-Ala-Pro) dari Teripang *Acaudina Molpadiodes* di Zhejiang di Cina yang telah berhasil di isolasi, dari hasil penelitian tersebut menunjukkan hasil uji antioksidan yang kurang baik. Pada penelitian ini akan dilakukan sintesis peptide dengan urutan asam amino FLAP dengan mengganti salah satu

analognya yaitu Leu menjadi meLeu. Terdapatnya metil pada asam amino karena dapat mengurangi terjadinya hidrolisis senyawa sehingga tidak mudah rusak.

Salah satu metode yang digunakan untuk sintesis yaitu metode Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) selain diperoleh dengan cara isolasi dari bahan alam, karena metode SPPS ini bersifat otomatis dan menghasilkan peptida sintetik yang panjang dalam periode waktu yang singkat (Murray, 2003). Selain itu proses pengerjaannya cepat dan sederhana sehingga tidak memerlukan pelarut yang banyak.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka pada penelitian ini akan dilakukan sintesis tetrapeptida linier FmeLAP sebagai kandidat antioksidan dengan metode SPPS. Sedangkan rumusan masalah dalam penelitian ini adalah apakah senyawa tetrapeptida FmeLAP dapat disintesis menggunakan metode SPPS, serta apakah senyawa hasil sintesis tetrapeptida FmeLAP memiliki aktivitas sebagai antioksidan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mensintesis senyawa tetrapeptida linier FmeLAP menggunakan metode SPPS, serta menguji aktivitas antioksidan tetrapeptida FmeLAP dari hasil sintesis menggunakan metode DPPH.

Jika pada penelitian ini tetrapeptida FmeLAP yang mempunyai efek antioksidan berhasil disintesa, maka dapat dimanfaatkan menjadi senyawa antioksidan baru yang dapat digunakan sebagai suplemen, bahan tambahan makanan atau kosmetik.

## 2 METODE

Pada penelitian ini dilakukan sintesis tetrapeptida linier di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran Bandung. Pada penelitian ini, peptida Phe-meLeu-Ala-Pro disintesis dengan menggunakan SPPS. Proses sintesa terdiri dari beberapa tahap diantaranya pengkondisian tabung, pengembangan resin, pengklopingan asam amino pertama amino pertama pada resin yang bertujuan sebagai penyangga fase padat, uji kloranil, capping resin dengan senyawa Fmoc bertujuan untuk menutupi gugus aktif pada resin agar tidak berkaitan dengan asam amino lain, pelepasan gugus pelindung Fmoc agar terjadi pengikatan antara asam amino satu dengan asam amino berikutnya, uji kloranil, pelepasan tetrapeptida dari resin, pemekatan dan pengeringan tetrapeptida

yang bertujuan untuk menghilangkan pelarut dalam sampel, selanjutnya dilakukan uji kemurnian dengan melihat kromatogram pada RP-HPLC kemudian dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer massa dan uji aktivitas antioksidan.

## 3 PEMBAHASAN DAN DISKUSI

Pada penelitian ini dilakukan sintesis tetrapeptida Fmoc-Phe-OH, Fmoc-meLeu-OH, Fmoc-Ala, Fmoc-Pro (FmeLAP) dengan menggunakan metode solid peptide synthesis (SPPS) dimana metode ini merupakan metode yang mempunyai beberapa keuntungan diantaranya yaitu lebih sederhana serta dapat memproduksi senyawa yang diinginkan dengan cepat. Sintesis ini dilakukan dengan perpanjangan rantai dari C-terminal ke N-terminal dikarenakan adanya pemutusan gugus pelindung sementara pada atom N lebih mudah dilakukan dibandingkan dengan pemutusan gugus pelindung sementara pada atom C (Chan dan White, 2000).

### **Pengklopingan Asam Amino Pertama**

Pada sintesis kali ini dilakukan pengklopingan asam amino pertama dari ujung-C terminal ke ujung-N terminal asam amino selanjutnya sampai terbentuk tetrapeptida. Pada proses sintesis tetrapeptida ini menggunakan asam amino pertama yaitu Fmoc-Pro-OH dengan resin 2-klorotritil klorida. Pengikatan asam amino prolin pada resin 2-klorotritil klorida diawali dengan melarutkan asam amino prolin dengan DCM dan ditambahkan larutan DIPEA.

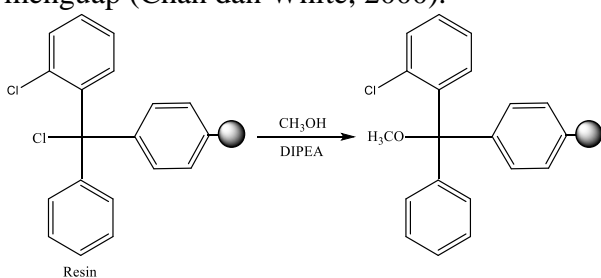
Reaksi pengikatan asam amino pertama Fmoc-Pro-OH ke resin 2-klorotritil klorida tidak melibatkan aktivasi gugus karboksil sehingga dapat mencegah terjadinya reaksi rasemisasi yang tidak diinginkan. Proses reaksi yang terjadi yaitu pada asam amino pertama Fmoc-Pro-OH dengan DIPEA yang bersifat basa sebagai reagenya.

Reaksi yang terjadinya yaitu reaksi asam basa hanya mengambil hidrogen dari gugus karboksil pada Fmoc-Pro-OH membentuk nukleofil, nukleofil yang terbentuk tersebut akan menyerang dan menggantikan atom klorida pada atom karbon kuarternar yang terdapat pada resin 2-klorotritil klorida, sehingga atom klorida dapat disubstitusikan dan akan membentuk ikatan dengan resin (Maharani, *et. al.*, 2016).

Selanjutnya dilakukan *loading resin* bertujuan untuk menentukan jumlah asam amino yang akan

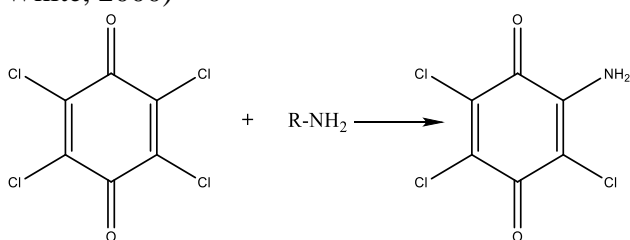
ditimbang pada proses selanjutnya. Sampel resin yang telah kering ditimbang sebanyak dan ditambahkan piperidin 20 % dalam DMF lalu didiamkan selama 30 menit. Sampel yang ditimbang rentangnya 0,4 - 0,8 mg tidak boleh terlalu besar karena dapat menyebabkan penumpukan sampel dan dapat mempengaruhi nilai absorbansi ketika dilakukan spektrofotometer. Hasil *loading resin* yang diperoleh yaitu 0,4 mmol/mg, dari nilai ini menandakan bahwa peptide yang terikat pada resin baik.

Dilakukannya Capping resin bertujuan untuk menutupi gugus aktif pada resin 2-klorotritil klorida yang tidak bereaksi dengan asam amino pertama, reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 1. Sampel yang mengandung Fmoc-Pro-OH dan resin ditambahkan metanol : DCM : DIPEA (2:7:1). Hal ini dilakukan untuk menutupi sisi aktif asam amino yang tidak berikatan dengan resin pada asam amino pertama dengan menggunakan gugus metoksi dari metanol sehingga dapat mencegah asam amino selanjutnya dapat berikatan dengan sisi aktif resin. Dipilihnya DCM karena sifatnya volatil sehingga lebih mudah menguap (Chan dan White, 2000).



**Gambar 1.** Reaksi Capping Resin

Setelah proses pengklopingan lalu dilakukan uji kloranil untuk melihat keberhasilan proses pengklopingan, beberapa butir asam amino yang telah dikloping kemudian dilarutkan dengan larutan kloranil dan larutan asetaldehid, reaksi yang terjadi dapat dilihat pada gambar 2. Pada proses ini dikatakan berhasil dengan tidak adanya perubahan warna pada butiran resin (Chan & White, 2000)



**Gambar 2.** Reaksi pengujian asam amino dengan kloranil

Selanjutnya dilakukan deproteksi Fmoc

pelindung bertujuan untuk menyediakan sisi aktif gugus amina (NH<sub>2</sub>) pada asam amino sehingga sifatnya lebih reaktif pada saat direaksikan dengan asam amino selanjutnya. Gugus pelindung Fmoc merupakan gugus pelindung yang stabil pada kondisi asam namun tidak stabil dalam kondisi basa. Proses deproteksi asam amino tetrapeptida yang mengandung gugus pelindung Fmoc dilakukan dengan menambahkan piperidin 20 % dibuat dalam DMF lalu dimasukkan kedalam tabung reaktor. Dipilih DMF sebagai pelarut karena sifatnya yang tidak volatile. Senyawa ini dengan mudah terurai menjadi senyawa karbondioksida dan dibenzofulven. Pada tahap ini juga akan terbentuk dibenzofulven yang akan berikatan dengan piperidin, senyawa yang dihasilkan dari reaksi ini dapat menyerap sinar ultraviolet, sehingga dapat digunakan untuk monitoring reaksi (Chan dan White, 2000).

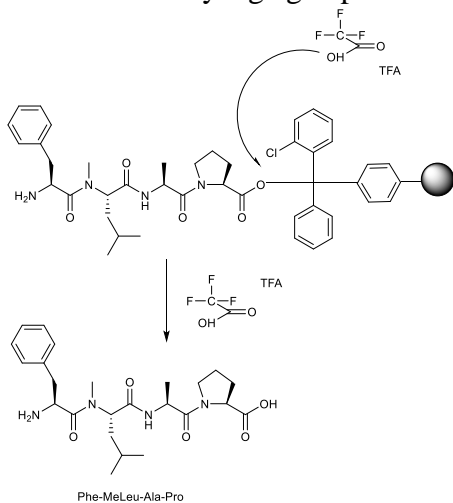
### Penyusunan Peptida Linier

Setelah dihasilkan gugus NH<sub>2</sub> bebas pada asam amino pertama, tahap selanjutnya dilakukan kopling dengan asam amino kedua, ketiga, dan keempat menggunakan reagen kopling kombinasi HOBt dan HBTU dimana keduanya merupakan reagen kopling kelompok benzotriazol. HOBt dapat meningkatkan rendemen, sedangkan HBTU dianggap sebagai reagen kopling yang biasanya dapat menunjukkan performa yang sangat baik (Valeur dan Bradley, 2009).

Pengklopingan pertama mereaksikan Fmoc-Pro-OH dengan Fmoc-Ala-OH kemudian Fmoc-meLeu-OH dan yang terakhir di reaksikan dengan Fmoc-Phe-OH. Dengan menimbang asam amino, HBTU, dan HOBt dalam vial lalu dilarutkan DIPEA kemudian ditambahkan DMF sebanyak 4 ml setelah itu di masukkan kedalam tabung reaktor. Pengklopingan ini dilakukan selama 15 jam diharapkan agar senyawa peptide yang terikat lebih banyak. Penggunaan DIPEA dan HOBt disini berfungsi sebagai pemberi suasana basa pada reaksi dan reagen. Dimana ketiga reagen tersebut akan mengganggu kestabilan dari asam amino sehingga akan mengaktifasi gugus karboksilat dan mendesak ion H untuk lepas. Sehingga gugus amina yang ada pada asam amino lain akan bereaksi dengan gugus karboksilat. Gugus karboksilat dibuat lebih negatif sedangkan gugus amina dibuat lebih positif sehingga akan lebih mudah untuk bereaksi satu sama lain dan mempermudah proses penyatuan asam amino.

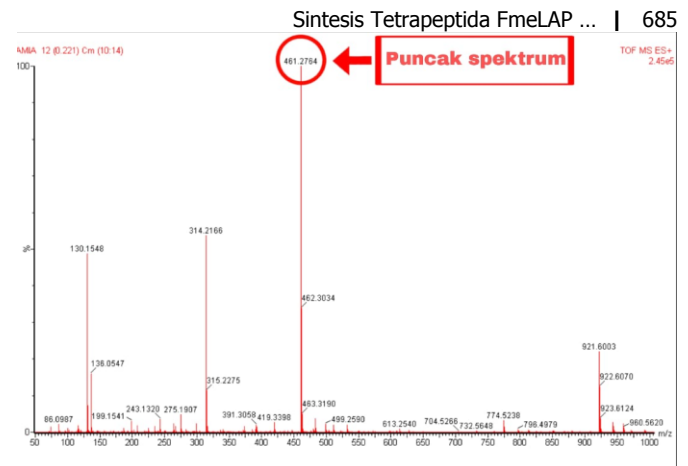
### Pemutusan resin pada asam amino

Pelepasan tetrapeptida ini bertujuan untuk melepaskan senyawa target tetrapeptida dari resin 2-klorotritil klorida dengan menggunakan penambahan TFA 95 % dalam aquadest. Penggunaan TFA dengan konsentrasi tinggi ini bertujuan untuk melepaskan resin dari senyawa target tetrapeptida dan dapat melepaskan gugus pelindung pada rantai samping seperti tBu yang terdapat pada gugus pelindung rantai samping pada asam aminofenilalanin dan prolin, serta gugus pelindung rantai samping Boc yang terdapat pada asam amino alanin. Resin 2-klorotritil sifatnya labil terhadap penambahan asam dan stabil pada kondisi basa maka dari itu TFA dengan konsentrasi tinggi dipilih untuk melepaskan senyawa target asam amino tetrapeptida dari resin sedangkan TFA merupakan asam kuat, reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 3. Hasil dari pelepasan resin ini kemudian dipekatkan menggunakan evaporator dan dihasilkan ekstrak yang agak pekat.



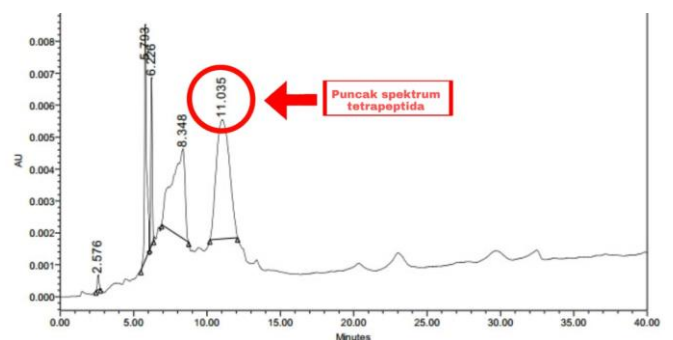
**Gambar 3.** Reaksi pelepasan resin

Selanjutnya senyawa tetrapeptide FmeLAP dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer massa, untuk melihat puncak fragmentasi dan memastikan senyawa tetrapeptide dengan melihat bobot molekulnya  $m/z$ , dalam sintesis tetrapeptida FmeLAP urutan asam amino yang terdapat dalam peptide sudah diketahui, sehingga untuk karakterisasi dapat digunakan metode spektroskopi massa untuk mengetahui bobot molekul dari produk sintesis. Dari puncak tersebut menunjukkan bahwa senyawa tetrapeptida berhasil disintesis, dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Hasil Spektrofotometer Massa Tetrapeptida

Setelah dilakukan pengujian spektrofotometer massa dilanjutkan dengan pengujian RP-HPLC yang bertujuan untuk memastikan kemurnian dari senyawa yang dihasilkan dengan melihat waktu retensi puncak senyawa. Proses ini dilakukan dengan menggunakan fase balik C18, dengan fase gerak bergradien asetinitril : air (1:1) dengan buffer TFA 0,1% selama 40 menit, laju alir 1 mL/menit dan menggunakan detektor PDA dengan deteksi pada panjang gelombang 210 dan 240 nm. Hasil kromatogram tetrapeptida yang didapat waktu retensi pada menit ke 11,035 dan membentuk beberapa puncak, dapat dilihat pada gambar 5. Hal tersebut menandakan bahwa peptide belum murni sehingga memerlukan pemurnian lagi.



**Gambar 5.** Hasil Kromatogram RP-HPLC Tetrapeptida

### Uji Antioksidan Metode DPPH

Pada uji aktivitas antioksidan menunjukkan senyawa tetrapeptida FmeLAP memiliki  $IC_{50}$  sebesar 8253,38 ppm, dapat dilihat pada table 1. Dari hasil tersebut dapat dikatakan bahwa senyawa FmeLAP memiliki aktivitas antioksidan yang lemah, tingkat dari kekuatan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan terhadap DPPH dikatakan aktivitasnya lemah yaitu jika nilai  $IC_{50} > 150 \mu\text{g/mL}$ .

**Tabel 1.** Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Sampel Tetrapeptida

Konsentrasi (ppm)	Tetrapeptida		IC 50 (ppm)
	ABS	%INH	
0	1,648	0	
1600	1,416	14,063	8253,38
8000	0,858	47,946	

#### 4 KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa senyawa tetrapeptida linier FmeLAP dapat disintesis dengan metode *Solid Phase Peptide Synthesis*. Hasil karakterisasi menggunakan spektrofotometer massa menunjukkan puncak ion molekul untuk senyawa tetrapeptida FmeLAP linier dan puncak ion molekul  $[M-H]^+$  pada  $m/z$  461,2764. Hasil analisis RP- HPLC senyawa tetrapeptida FMeLAP memiliki waktu retensi pada menit ke 11 dan terlihat adanya puncak lain yang menunjukkan bahwa hasil sintesis belum murni. Hasil yang diperoleh dari uji aktivitas antioksidan pada tetrapeptida FmeLAP didapatkan nilai  $IC_{50}$  sebesar 8253,38 ppm sehingga aktivitas antioksidan dari senyawa tersebut lemah, karena jika suatu senyawa memiliki antioksidan sangat kuat memiliki nilai  $IC_{50}$  kurang dari 50. Sehingga semakin kecil nilai  $IC_{50}$  maka semakin tinggi aktivitas antioksidan.

#### DAFTAR PUSTAKA

Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., dkk. (2010). Pemurnian dan identifikasi peptida antioksidan baru dari hidrolisat enzimatik dari protein produk samping sardinelle (*Sardinella aurita*). *Kimia Pangan*. 118, 559–565.

Byun, H.G., Lee, J.K., Park, H.G., Jeon, J. K. & Kim, S.K. (2009). Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer, *brachionus rotundiformis*. *Process Biochemistry*. 44: 842846.

Chan, W.C. & White, P.D. (2000). *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford University Press. New York.

Dehpour AA, Ebrahimzadeh MA, Fazel NS dan Mohammad NS. (2009). Antioxidant Activity of methanol extract of ferula assafoetida and it's essential oil composition. *Grasas Aceites*. 60: (4). 405-412.

Elias, R.J., Kellerby, S.S., & Decker, E.A. (2008). Antioxidant Activity Of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48(5): 430441.

Goldberg, G. (2003). *Diet and Health*. I Owa State Press. Blackwell Publishing Company, 2121 State Avenue, Ames. USA.

Hernani dan Rahardjo, M. (2005). Tanaman Berkhasiat Antioksidan. Penebar Swadaya. Jakarta; hal 1-20; 62-63.

Jeong, J. B., Jeong, H. J., Park, J. H., Lee, S. H., Lee, J. R., Lee, H. K., et al. (2007). Cancer-preventive peptide lunasin from *Solanum nigrum* L. inhibits acetylation of core histones H3 and H4 and phosphorylation of retinoblastoma protein (Rb). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55, 10707–10713.

Jin, H. X., Xu, H. P., Li, Y., Zhang, Q. W., & Xie, H. (2009). Preparation and evaluation of peptides with potential antiokxidant activity by microwave assisted enzymatic hydrolysis of collagen from sea cucumber *acaudina molpadioides* obtained from Zhejiang Province in China. *Marine drugs*, 17(3), 169.

Kim, E., Lee, S., Jeon, B., Moon, S., Kim, B., Park, T., Park, P. (2009). Purification and characterisation of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of venison protein. *Food Chemistry*, 114 (4), 1365–1370.

Maharani, R., Sumiarsa, D., Marpaung, C., Zainuddin, A., Hidayat, A. T., Harneti, D., Nurlelari, 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

Minervini, F. F. A., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V., & Gobbetti, M. (2003). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5297-5305.

- Molyneux, P. (2004). The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 26 (2): 211-219.
- Murray, R.K. (2003). *Biokimia Haper*. Dalam: Anna P. Bani. Edisi ke-25. Jakarta, EGC.
- Sitompul, S. (2004). Analisis Asam Amino dalam Tepung Ikan dan Bungkil. Kedela. *Buletin Teknik Pertanian*. Vol 9. Nomor 1.
- Sloane, Ethel. (2004). *Anatomi dan Fisiologi Untuk Pemula*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Wildman, R.E.C. (2001). *Handbook of Nutraceutical and Founctional Foods*. CRC Press. USA.
- 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.