

Sintesis Senyawa Tripeptida (Nkw) sebagai Antioksidan dengan Metode Sintesis Fase Padat

Virida Akma Putry ^{*}, Nety Kurniaty, Rani Maharani

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

Viridaakmaputry@gmail.com, nety.kurniaty@gmail.com, r.maharani@unpad.ac.id

Abstract. Various chronic health problems can be caused by oxidative stress caused by free radicals. Because they help the body defend itself against damage caused by oxidative reactions, antioxidants are essential. The NKW tripeptide molecule has exceptional antioxidant qualities, according to previous research. A solid-phase peptide synthesis process was used in this study to prepare the molecule. The Fmoc/tBu and HATU/HOAt methods as coupling reagents were used in this procedure, which began with 2-chlorotriyl chloride resin. The resin preparation, addition of the first amino acid (Fmoc-Asn-OH), formation of the peptide chain by adding other amino acids one by one, and then using trifluoroacetic acid (TFA) to release the NKW tripeptide are the procedures involved. After compound preparation, RP-HPLC was used to verify its purity, and a mass spectrometer was used to examine its structure. The NKW tripeptide, with a molecular weight of 447.4373, was successfully produced, according to the results. The DPPH reduction method was used to test the compound's antioxidant capacity. A color change from purple to yellow indicates that the compound can reduce DPPH free radicals.

Keywords: *Antioxidants, Tripeptides, Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)*

Abstrak. Berbagai masalah kesehatan kronis dapat diakibatkan oleh stres oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas. Karena membantu pertahanan tubuh terhadap kerusakan akibat reaksi oksidatif, antioksidan sangat penting. Molekul tripeptida NKW memiliki kualitas antioksidan yang luar biasa, menurut penelitian sebelumnya. Proses sintesis peptida fase padat digunakan dalam penelitian ini untuk menyiapkan molekul tersebut. Metode Fmoc/tBu dan HATU/HOAt sebagai reagen penggandeng digunakan dalam prosedur ini, yang dimulai dengan resin 2-klorotritil klorida. Persiapan resin, penambahan asam amino pertama (Fmoc-Asn-OH), pembentukan rantai peptida dengan menambahkan asam amino lain satu per satu, dan kemudian menggunakan asam trifluoroasetat (TFA) untuk melepaskan tripeptida NKW merupakan prosedur yang terlibat. Setelah persiapan senyawa, RP-HPLC digunakan untuk memverifikasi kemurnian senyawa, dan spektrometer massa digunakan untuk memeriksa strukturnya. Tripeptida NKW, yang memiliki berat molekul 447,4373, berhasil diproduksi, menurut hasil. Metode reduksi DPPH digunakan untuk menguji kapasitas antioksidan senyawa. Perubahan warna dari ungu menjadi kuning menunjukkan bahwa senyawa tersebut dapat mereduksi radikal bebas DPPH.

Kata Kunci: *Antioksidan, Tripeptida, Sintesis Fasa Padat (SPPS)*

A. Pendahuluan

Suatu jenis senyawa oksigen aktif yang dikenal sebagai zat dengan elektron tak berpasangan terdiri dari atom, molekul, atau senyawa yang memiliki elektron tak berpasangan, sehingga sangat reaktif dan tidak stabil. Antioksidan diperlukan tubuh untuk melindungi diri dari bahaya radikal bebas. Antioksidan secara alami tidak ada dalam tubuh manusia. Oleh karena itu, tubuh perlu mendapatkan antioksidan tambahan dari sumber eksternal ketika terdapat terlalu banyak radikal bebas.

Untuk mengoksidasi molekul di sekitarnya seperti lipid, protein, DNA, dan karbohidrat, radikal bebas tidak stabil dan terus-menerus mencari elektron dari molekul lain. Dengan demikian, zat-zat di dalam sel dapat dirusak oleh radikal bebas. Hal ini menjelaskan mengapa biomolekul pada umumnya tidak mengandung radikal bebas. Molekul radikal baru terbentuk ketika radikal bebas bersentuhan dengan molekul normal. Radikal bebas dapat memengaruhi pembentukan DNA karena reaksi yang dimulai di mitokondria menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS). Lapisan lipid yang mengelilingi sel, pembuluh darah, pembentukan DNA, dan sintesis protein lain seperti prostaglandin dan enzim, semuanya dapat terdampak oleh ROS ini, yang dapat mengubah cara kerja gen dalam tubuh. Kerusakan jangka panjang dan kemungkinan kanker dapat diakibatkan oleh perubahan ini.

Tubuh membutuhkan antioksidan dari berbagai sumber, termasuk metabolisme, polusi udara, sinar matahari, dan lainnya, untuk melawan dan mencegah stres oksidatif. Antioksidan membantu dengan melepaskan atom hidrogen atau proton ke molekul yang tidak stabil, sehingga molekul tersebut kurang reaktif dan lebih stabil. Antioksidan terbagi dalam dua jenis utama: sintetis dan alami. Antioksidan sintetis diproduksi melalui proses kimia yang terjadi di luar tubuh. Antioksidan alami ditemukan di alam, seringkali diambil dari tumbuhan dan sumber alami lainnya, seperti yang ditemukan Saputra dan lainnya pada tahun 2013 (Rizky Hadyan, n.d.).

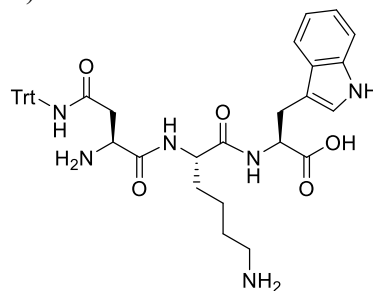
Tripeptida adalah molekul kecil yang terdiri dari tiga asam amino yang dihubungkan oleh ikatan peptida. Tripeptida ini dapat membantu melawan radikal bebas, zat berbahaya yang dapat merusak sel-sel tubuh dan menyebabkan stres oksidatif. Dua tripeptida spesifik dengan sifat antioksidan adalah NKW (Lys-Asn-Trp). Tripeptida ini telah diproduksi di laboratorium dan diteliti, serta terbukti mampu menghentikan kerusakan akibat radikal bebas dan memiliki efek antioksidan yang kuat (Nadila Fanny Shafira & Mentari Luthfika Dewi, 2023).

Sintesis peptida fase padat merupakan teknik tambahan untuk memperoleh urutan asam amino. Pendekatan ini mempercepat proses dengan memberikan manfaat, termasuk waktu sintesis yang lebih singkat dan produk akhir yang lebih sedikit. Komposisi asam amino tripeptida NKW menjadikannya salah satu peptida dengan kualitas antioksidan yang terbukti (Fitri Mellyna Cantika & Sani Ega Priani, 2023).

Berdasarkan rumusan masalah diatas, apakah pada penelitian ini dapat mengidentifikasi molekul tripeptida NKW yang optimal dengan metode sintesis fasa padat serta apakah senyawa tripeptida NKW dengan sifat antioksidan menggunakan sintesis peptida fase padat dapat disintesis dan bersifat antioksidan kuat. Penelitian ini menyempurnakan teknik sintesis peptida fase padat dan memberikan wawasan baru tentang produksi senyawa tripeptida NKW yang bersifat antioksidan.

B. Metode

Penelitian sintesis senyawa tripeptida NKW sebagai antioksidan dilaksanakan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran Bandung. Teknik yang digunakan dalam penelitian ini adalah sintesis peptida fase padat (SPPS).



Gambar 1. Struktur tripeptida NKW (Lys-Asn-Trp)

Pertama, membersihkan tabung reaksi untuk menghilangkan kotoran atau benda yang tidak diinginkan agar prosesnya dapat berjalan dengan baik. Kemudian, menyiapkan resin agar sisi aktifnya tersedia sehingga asam amino dapat masuk dengan mudah. Resin diisi setelah asam amino pertama terikat padanya sebagai titik awal. Menentukan berapa banyak asam amino yang akan ditambahkan merupakan tujuan utama. Gugus aktif dalam resin mencegah asam amino lain berikatan. Untuk menghasilkan situs aktif tempat ikatan antar asam amino NKW dapat terjadi, gugus Fmoc pada setiap asam amino kemudian dihilangkan.

Uji ko-ranil digunakan untuk memastikan bahwa gugus Fmoc telah dihilangkan dari asam amino setelah dihilangkan. Uji ko-ranil lainnya dilakukan untuk memverifikasi keberadaan ikatan antar asam amino setelah bagian peptida disiapkan. Resin tersebut kemudian digunakan untuk membuat senyawa tripeptida NKW. Alat yang digunakan adalah rotary evaporator untuk menghilangkan pelarut dan mengonsentrasikan senyawa tersebut. Hasilnya diukur menggunakan spektrofotometer massa dalam satuan m/z . Kemudian, melakukan analisis RP-HPLC untuk memurnikan senyawa tersebut. Setelah mendapatkan tripeptida yang telah dimurnikan, mereka menggunakan metode DPPH untuk menguji aktivitas antioksidannya.

C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Penelitian sintesis senyawa tripeptida NKW sebagai antioksidan dilaksanakan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran Bandung.. Tujuan dari penelitian ini yaitu apakah pada penelitian ini dapat mengidentifikasi molekul tripeptida NKW yang optimal dengan metode sintesis fasa padat serta apakah senyawa tripeptida NKW dengan sifat antioksidan menggunakan sintesis peptida fase padat dapat disintesis dan bersifat antioksidan kuat. Teknik yang digunakan dalam penelitian ini adalah sintesis peptida fase padat (SPPS)

Langkah pertama adalah menyiapkan tabung pengembangan resin. Resin, yang berfungsi sebagai penopang kokoh, kemudian disambungkan ke asam amino pertama. Setelah itu, resin disegel untuk menyembunyikan gugus aktifnya dan mencegahnya menempel pada asam amino lain. Langkah selanjutnya melibatkan penghilangan gugus pelindung Fmoc, yang membantu menghubungkan satu asam amino dengan asam amino berikutnya. Setelah itu, fragmen peptida diproduksi. Fragmen peptida ini harus terbentuk agar asam amino dapat terhubung dengan benar. Setelah itu, resin melepaskan tetrapeptida. Rotary evaporator digunakan untuk mengeringkan tetrapeptida saat resin melepaskannya. Kromatogram RP-HPLC dianalisis untuk memverifikasi kemurniannya. Spektrometer massa kemudian digunakan untuk memeriksa peptida [8].

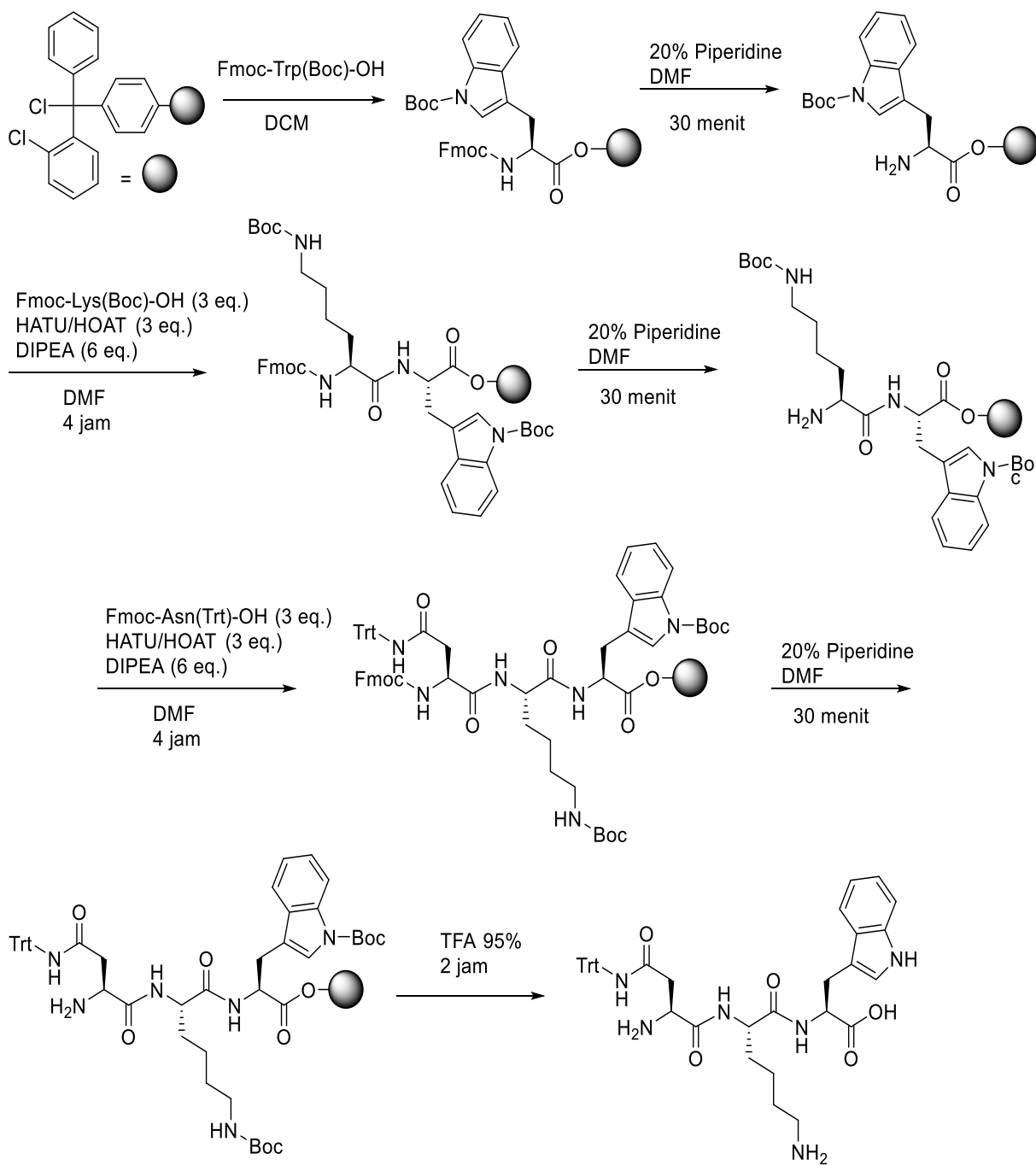
Sebelum menambahkan asam amino pertama, tabung reaksi telah disiapkan. Terutama setelah menggunakan DCM, langkah ini membantu membersihkan tabung dan menyiapkan kondisi yang tepat untuk proses sintesis [9]. Resin akan membengkak dan berubah menjadi asam setelah 15 menit bereaksi dengan klorin. Asam amino pertama kemudian dibuat menggunakan kombinasi DIPEA, agen penggandeng asam-basa, dan DCM. Atom klorin yang terikat pada resin 2-klorotritil klorida digantikan oleh nukleofil. Dalam proses substitusi nukleofilik unimolekular, nukleofil menggantikan atom klorin dan bergabung dengan resin [8]. Evaporator putar digunakan untuk mengeringkan asam amino pertama setelah dibiarkan bereaksi selama empat jam. Jumlah asam amino kedua hingga keempat yang ditambahkan kemudian dihitung dengan mengukur nilai muatan resin [10]

Langkah selanjutnya adalah resin capping, yang menutupi situs aktif resin untuk mencegah lebih banyak asam amino berikatan dengan resin yang telah mengikat asam amino awal. Karena membantu menutupi situs aktif gugus klorida dan mencegah asam amino selanjutnya berinteraksi dengan situs aktif resin, metanol digunakan. Melalui proses substitusi nukleofilik, DIPEA digunakan sebagai agen penggandeng dalam DCM untuk mengikat asam amino pertama (Fmoc-Asn-OH). Spektrofotometer UV-Vis kemudian digunakan untuk mengevaluasi warna resin dan menentukan berapa banyak asam amino asli yang telah dihilangkan untuk membuat senyawa DBF. 0,17 mmol/g adalah nilai muatan resin, yang baik jika berada di antara 0,2 dan 1,2 mmol/g.

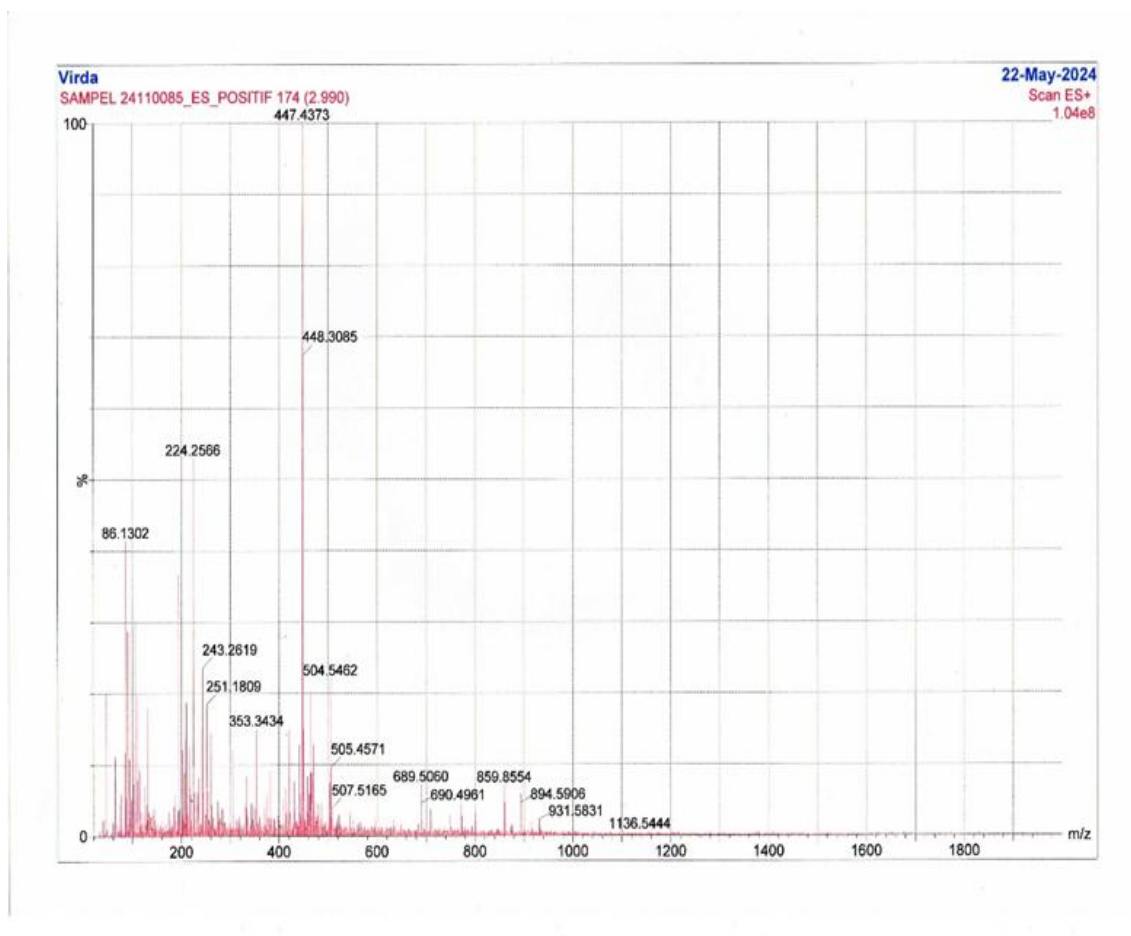
Agar muatan aktif (-NH/NH₂) dapat bereaksi dengan asam amino berikutnya (-COOH), gugus pelindung Fmoc pada asam amino pertama dihilangkan sebelum asam amino kedua ditambahkan. Hal ini memudahkan ikatan antara asam amino pertama dan kedua. Gugus Fmoc terurai dalam lingkungan basa tetapi tetap kuat dalam lingkungan asam. Kami menguji partikel resin kering yang tidak terlindungi dengan kloranil dan terus menguji hingga banyak partikel resin dapat terkumpul. Uji kloranil digunakan untuk menentukan apakah ikatan berhasil, yang ditunjukkan dengan warna resin yang tetap biru, dan untuk memastikan bahwa deproteksi telah dilakukan dengan tepat, yang ditunjukkan dengan perubahan warna resin dari biru menjadi ungu kehitaman.

Setelah resin disegel, gugus pelindung Fmoc dilepaskan. Asam amino pertama dapat membentuk ikatan dengan asam amino berikutnya di situs aktif yang terbentuk akibat pelepasan ini. Basa digunakan untuk melepaskan gugus Fmoc karena tidak stabil dalam kondisi basa. Piperidin dan DMF digabungkan dalam larutan 20%; DMF digunakan karena sifatnya yang non-volatil. Gugus asam amino bebas terbentuk ketika piperidin bergabung dengan hidrogen pada cincin fluorena gugus Fmoc [11]. Efektivitas deproteksi Fmoc dinilai menggunakan uji kloranil. Hal ini ditunjukkan dengan perubahan warna granula resin yang disebabkan oleh gugus NH₂ bebas yang mengikat kloranil [12]; . Larutan asam amino berikutnya (Fmoc-Lys (Boc)-OH) dan resin yang mengikat asam amino pertama (Resin-Trp (Boc)-NH₂) dicampur dengan agen penggandeng DIPEA dengan rasio setara 3:3:6. Pada suhu ruang, campuran dikocok selama empat jam. Setelah reaksi selesai, DMF dan DCM digunakan untuk menyaring dan mencuci resin. Kloranil kemudian digunakan untuk memeriksa resin setelah kering.

Resin-Trp-Boc-Lys-Boc-NH₂ merupakan hasil dari perlakuan ulang resin kering (Resin-Trp-Boc-Lys-Boc-Fmoc) dengan Fmoc untuk menghilangkan gugus pelindung. Agen penggandeng HATU dan HOAt digunakan untuk penambahan asam amino berikutnya (Fmoc-Ans-OH). Asam amino terakhir (Fmoc-L-Ans-OH) diikat menggunakan langkah 4.1.1 dan 4.1.2, menghasilkan resin dengan tiga asam amino (Resin-L-Trp-Boc-L-Lys-Boc-L-Ans-NH₂). Resin kemudian direndam dalam larutan TFA 95% di udara setelah 5 mL larutan ditambahkan. Setelah dua jam pengocokan, campuran disaring, dan cairan yang mengendap dikumpulkan. Rotary evaporator kemudian digunakan untuk menguapkan cairan ini. HR-TOF-MS digunakan untuk memperoleh peptida kasar.

**Gambar 2.** Skema Sintesis Tripeptida NKW

Karakterisasi Tripeptida Linier



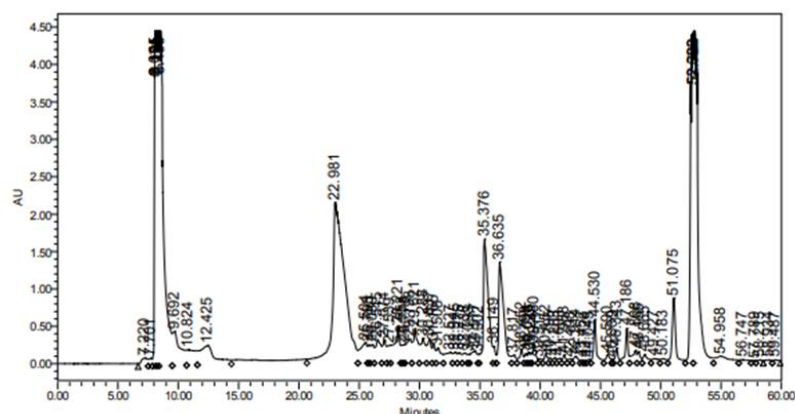
Gambar 3. Spektrum HR-TOF-MS senyawa tripeptida linear NKW

(C₂₁H₃₄N₆O₇ m/z terhitung 447,4373)

Dilakukan pemeriksaan nilai m/z untuk menentukan apakah molekul tripeptida telah terbentuk. Dalam tabung Eppendorf, 1 mL metanol ditambahkan setelah 1 mg tripeptida yang diuapkan. Puncak fragmen kemudian terlihat setelah material disuntikkan ke dalam spektrofotometer massa.

Berdasarkan Gambar diatas hasil fragmen kromatogram tripeptida pada spektrometer massa menunjukkan adanya puncak ion molekul [M+H] pada m/z 447,4373 g/mol yang menunjukkan bobot molekul dari senyawa yang dianalisis. Karena urutan asam amino peptida ditentukan secara presisi dalam sintesis NKW yang menunjukkan bahwa nilai puncak ion yang dihasilkan menggunakan karakteristik spektrometer massa adalah senyawa tripeptida linear NKW. Dari puncak tersebut menunjukkan bahwa senyawa tripeptida target berhasil di sintesis

Pengujian RP-HPLC (High Performance Liquid Chromatography)



Gambar 4. Hasil Kromatogram RP-HPLC

Berdasarkan gambar diatas hasil kromatogram tripeptida didapatkan waktu retensi pada menit ke 52,722, puncak-puncak yang terlihat menunjukkan konsentrasi masing-masing komponen yang terpisah. Waktu retensi yang diperlukan oleh analit untuk sampai ke detektor menunjukkan tingkat kepolaran dan sifat fisik masing-masing komponen. Spektrum ini menunjukkan bahwa analisis HPLC telah berhasil memisahkan dan mengidentifikasi komponen-komponen dalam campuran larutan dengan tingkat akurasi yang tinggi.

Pengujian Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH

Dilakukannya Metode pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH digunakan untuk menguji kemampuan tripeptida NKW dalam menetralkan radikal bebas. Kemampuan tripeptida untuk meredam radikal bebas DPPH dalam pengujian menunjukkan bahwa tripeptida tersebut mungkin memiliki sifat antioksidan yang kuat.

Tabel 1 Data Hasil IC₅₀ Aktivitas Antioksidan

konsentrasi	Aktivitas Peredaman	IC ₅₀
8	12.33	106.5
16	15.26	
32	21.53	

Tabel di atas menunjukkan bahwa pengujian aktivitas antioksidan dari senyawa tripeptida NKW dilakukan dengan menggunakan larutan pada berbagai konsentrasi, dan pengujian tersebut dilakukan secara duplo. Hasil menunjukkan nilai IC₅₀ sebesar 106,15 µg/mL. Dimana dari hasil IC₅₀ yang didapat menunjukkan bahwa senyawa tripeptida NKW memiliki aktivitas antioksidan yang sedang

D. Kesimpulan

Tripeptida NKW berhasil dibuat menggunakan metode Sintesis Peptida Fase Terbalik (SPPS). Proses ini efektif dan berkontribusi pada produksi peptida yang sangat murni. Spektrometer massa kemudian digunakan untuk menganalisis tripeptida NKW. Preparasi dan analisis molekuler senyawa yang akurat ditunjukkan oleh temuan tersebut, yang menunjukkan puncak ion dengan m/z 447,4373. Hasil analisis RP- HPLC untuk melihat kemurnian dari senyawa tripeptida didapatkan waktu retensi pada menit ke 52,722, puncak-puncak yang terlihat menunjukkan konsentrasi masing-masing komponen yang terpisah. Uji aktivitas antioksidan menunjukkan nilai IC₅₀ sebesar 106,15 µg/mL. Dimana dari hasil IC₅₀ yang didapat menunjukkan bahwa senyawa tripeptida NKW memiliki aktivitas antioksidan yang sedang.

Ucapan Terimakasih

Alhamdulillah, dengan mengagungkan dan mensyukuri kehadiran Allah SWT yang telah memberikan taufik dan hidayah-Nya, penulis berhasil menyelesaikan penelitian ini. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada pembimbing utama dan juga kepada pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan kepada penulis. Penulis juga ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas kontribusi mereka dalam menyelesaikan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Fitri Mellyna Cantika, & Sani Ega Priani, S. E. P. (2023). Uji Aktivitas Antioksidan Dan Inhibitor Tirosinase Ekstrak Etanol Daun Teh Hijau. *Jurnal Riset Farmasi*, 113–120. <https://doi.org/10.29313/jrf.v3i2.3262>
- Nadila Fanny Shafira, N. F. S., & Mentari Luthfika Dewi. (2023). Formulasi Masker Bioselulosa dengan Essence Kombucha Bunga Telang (*Clitoria Ternatea L.*) Sebagai Antioksidan. *Jurnal Riset Farmasi*, 37–42. <https://doi.org/10.29313/jrf.v3i1.3162>
- Rizky Hadyan, M. (n.d.). *Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Sirsak (Annona Muricata L.) yang Tumbuh di Daerah Cianjur Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*. <https://journals.sangkuriangpublisher.com/pharmacomedic>
- Sayuti, N. A. (2015). Formulasi dan Uji Stabilitas Fisik Sediaan Gel Ekstrak Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata l.*). *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 5(2), 74–82.
- Rahmi, H. (2017). Aktivitas Antioksidan dari Berbagai Sumber Buah-buahan di Indonesia. *Jurnal Agrotek Indonesia (Indonesian Journal of Agrotech)*, 2(1).
- Werdhasari, A. (2014). Peran antioksidan bagi kesehatan. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*, 3(2), 59-68
- Sari, A. N. (2015). Antioksidan Alternatif untuk Menangkal Bahaya Radikal Bebas pada Kulit. *Elkawanie: Journal of Islamic Science and Technology*, 1(1), 63–68.
- Saputra, I., Prihandini, G., Zullaikah, S., & Rachimoellah, M. (2013). Ekstraksi Senyawa Bioaktiv dari Daun Moringa Oleifera. *Jurnal Teknik POMITS*, 2(1), 1–5
- Maharani, R., Sumiarsa, D., Zainuddin, A., Ammatillah, N., Hidayat, A. T., Harneti, D., & Supratman, U. (2019). Synthesis of Tetrapeptides and Screening of their Antioxidant Properties. *Current Bioactive Compounds*, 15(6), 680–685.
- Kurnia, Anishetty, S., Pennathur, G., & Anishetty, R. (2015). Tripeptide Analysis of Protein Structures. *BMC Structural Biology*, 2, 1–8.
- R. Maharani, S.M Octavia, A. Zainuddin, Ace T. Hidayat, D. Sumiarsa, D. Harneti, Nurlelasari, Unang Supratman. (2020) Sintesis Tetrapeptida PSWY dan PSKY Fase Padat dan Evaluasi Aktivitas Antioksidannya. *Chimica et Natura Acta* 8(3):109.
- Yulianti, N., D. S. C. Utomo, dan B. Putri. 2020. Uji Komparatif Hormon Human Chorionic Gonadotrophin (Hcg), Ovaprim, Dan Spawnprim Pada Pemijahan Ikan Lele Sangkuriang (*Clarias sp.*). *Journal of Aquatropica Asia*, 5(2): 1-7.
- Aeni, Kurniaty dan Maharani. Sintesis Tetrapeptida Linear Phe-Tyr-Ala-Pro (FYAP) sebagai Kandidat Antioksidan dengan Metode Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS). Seminar Penelitian Sivitas