

Sintesis Senyawa Heksapeptida Siklik Analog Pipecolisporin (Pro-Lys-Pip-Trp- β -Ala-Phe) Menggunakan Reagen Kopling Dic/Oxyrna Serta Metode Kombinasi Fase Padat Dan Fase Larutan

Dwi Maulidani Fadhlani*, Nety Kurniaty, Rani Maharani

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

*maulidani2001@gmail.com, nety.kurniaty@gmail.com, r.maharani@unpad.ac.id

Abstract. Pipecolisporin compounds isolated from the fungus *Nigrospora oryzae* from the roots of *Triticum sp.* is one of the compounds that has potential as an antimalarial with its activity against *Plasmodium falciparum* of 3.21 μ M. The modification of the amino acid sequence to Pro-Lys-Pip-Trp- β -Ala-Phe aims to determine the best arrangement of pipecolisporin analogues as antimalarials. Analogues of pipecolisporin linear hexapeptide compounds were synthesized using the solid phase peptide synthesis (SPPS) method with the use of buffers in the form of 2-chlorotriyl chloride resins, Fmoc and Boc protective groups, and DIC, Oxyrna, DiPEA coupling reagent solutions. The synthesis results were obtained as much as 9 mg and then characterized using mass spectroscopy with a peak m/z of 959.5246 [M]. Analogues of linear pipecolisporin hexapeptide compounds were successfully cyclized using the solution phase peptide synthesis (LPPS) method with the use of DIPEA, HATU, DCM reagent solutions. The synthesis results were characterized using mass spectroscopy with an m/z peak of 743.78 [M+H]⁺.

Keywords: *peptide, pipecolisporin, DIC/Oxyrna, SPPS, LPPS*

Abstrak. Senyawa pipecolisporin hasil isolasi jamur *Nigrospora oryzae* dari akar *Triticum sp.* merupakan salah satu senyawa yang berpotensi sebagai antimalaria dengan aktivitasnya terhadap *Plasmodium falciparum* sebesar 3,21 μ M. Modifikasi urutan asam amino menjadi Pro-Lys-Pip-Trp- β -Ala-Phe bertujuan untuk mengetahui susunan terbaik analog pipecolisporin sebagai antimalaria. Analog senyawa heksapeptida linear pipecolisporin disintesis menggunakan metode sintesis peptida fase padat (SPPS) dengan pemakaian penyangga berupa resin 2-klorotriyl klorida, gugus pelindung Fmoc dan Boc, dan larutan reagen kopling DIC, Oxyrna, DIPEA. Hasil sintesis didapatkan sebanyak 9 mg lalu dikarakterisasi menggunakan spektroskopi massa dengan puncak m/z sebesar 959,5246 [M]. Analog senyawa heksapeptida pipecolisporin linear berhasil disiklisisasi menggunakan metode sintesis peptida fase larutan (LPPS) dengan pemakaian larutan reagen DIPEA, HATU, DCM. Hasil sintesis dikarakterisasi menggunakan spektroskopi massa dengan puncak m/z sebesar 743,78 [M+H]⁺.

Kata Kunci: *peptida, pipecolisporin, DIC/Oxyrna, SPPS, LPPS.*

A. Pendahuluan

Malaria merupakan penyakit mengerikan yang menular dan disebabkan oleh parasite protozoa dari *Plasmodium* yang disebarkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* kepada manusia [1]. Beberapa kelas obat antimalaria yang berbeda telah digunakan untuk mengobati infeksi dan mengurangi kejadian penyakit. Namun karena terjadi evolusi parasit malaria berakibat resistensi obat malaria saat ini sehingga tidak cukup untuk mengendalikan penyakit di masa depan, yang memerlukan penemuan obat dengan mekanisme kerja baru [2].

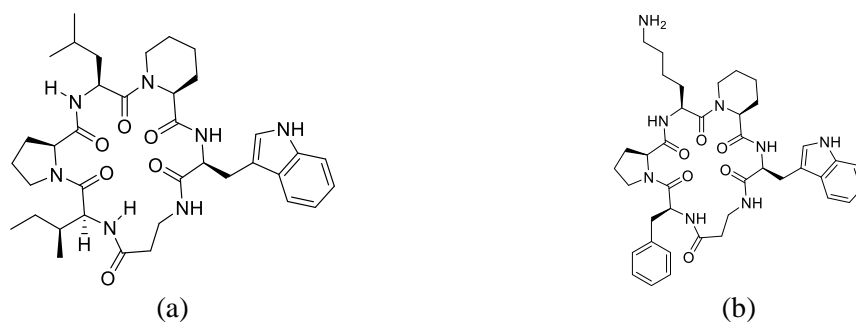
Pada tahun 2021 telah dilakukan sebuah studi tentang kelompok peptida antimalaria dengan penemuan identifikasi pipecolisporin (senyawa siklik heksapeptida) yang merupakan hasil isolasi dari jamur *Nigrospora oryzae* dari akar *Triticum sp.* dimana hasilnya menunjukkan adanya aktivitas antimalaria yang tinggi terhadap *Plasmodium falciparum* pada 3,21 μM [3] Akan tetapi hingga saat ini belum ditemukan adanya laporan yang optimal mengenai sintesis senyawa siklik heksapeptida pipecolisporin sebagai antimalaria selain dari isolasi jamur *Nigrospora oryzae* dari akar *Triticum sp.* oleh karenanya sintesis senyawa perlu dilakukan untuk mencari analognya sehingga didapat senyawa antimalaria baru yang memiliki aktivitas antimalaria yang lebih baik dari hasil isolasinya. Pengembangan pipecolisporin juga didasarkan pada struktur sikliknya yang diketahui lebih efektif untuk dijadikan sebagai obat. Selain itu peptida merupakan bahan yang tersusun dari asam amino sehingga lebih selektif sekaligus relatif lebih aman ditoleransi oleh tubuh [4]

Pada penelitian ini akan dilakukan sintesis heksapeptida siklik dari analog senyawa pipecolisporin, dengan urutan Pro-Lys-Pip-Trp- β -ala-Phe dengan perubahan residu Leu menjadi Lys dan Ile menjadi Phe. Dengan tujuan pergantian analog ini untuk mengetahui susunan yang memiliki aktivitas antimalaria terbaik. Dimana sintesis secara kimia merupakan metode alternatif dari ekstraksi bahan alam yang membutuhkan waktu cukup lama untuk mendapatkan senyawa target, maka dilakukan sintesis peptida agar memudahkan mendapatkan senyawa target yang memiliki aktivitas farmakologi yang sama. Metode sintesis asam amino dapat menggunakan metode sintesis peptida fase padat (SPPS), dimana metode SPPS merupakan suatu metode sintesis peptida yang efektif dan sederhana [3]

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah apakah heksapeptida siklik analog senyawa pipecolisporin dapat disintesis menggunakan metode Kombinasi Sintesis Fase padat dan Fasa Larutan. Tujuan pada penelitian ini adalah untuk mensintesis analog senyawa heksapeptida siklik menggunakan metode Kombinasi Fasa padat dan Fasa larutan. Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai ilmu pengetahuan yang baru dari sintesis heksapeptida pipecolisporin dan pengembangan metode sintesis heksapeptida siklik pipecolisporin.

B. Metodologi Penelitian

Penelitian sintesis Heksapeptida siklik analog pipecolisporin yang dilaksanakan di Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran Bandung. Pada penelitian ini menggunakan beberapa asam amino yaitu Pro-Lys-Pipe-Trp- β -Ala-Phe dengan menggunakan metode solid phase peptida synthesis (SPPS).



Gambar 1. (a) Pipecolisporin, (b) Analog Pipecolisporin

Metode ini memiliki beberapa tahap pengerjaan, yaitu pengkondisian tabung reaktor, kemudian membuka sisi aktif resin dengan pengembangan resin, selanjutnya dilakukannya pengikatan asam amino pertama pada resin sebagai penyangga fase padat lalu dilakukan *Loading resin* untuk melihat hasil dari *Loading resin* yang dapat mengikat asam amino, setelah itu dilakukan *Capping resin* yang bertujuan untuk menutup gugus aktif resin agar tidak dapat berikatan lagi dengan asam amino lainnya. Selanjutnya dilakukan pelepasan gugus Fmoc di asam amino pertama yang bertujuan agar dapat berikatan dengan asam amino berikutnya. Setelah pelepasan Fmoc dilakukan kemudian dilanjut dengan uji kloranil untuk memastikan Fmoc telah terlepas yang mana ditandai dengan terbentuknya warna pada butir resin. Lalu dilakukan penyusunan fragmen peptida serta dilakukan uji kloranil kembali untuk memverifikasi adanya ikatan peptida antar asam amino dengan melihat tidak terbentuknya warna pada butir resin. Kemudian dilakukan pelepasan resin di heksapeptida linier dan dilakukan pembentukan heksapeptida siklik. Lalu dilanjutkan dengan pemekatan dengan menggunakan *rotary evaporator* yang bertujuan untuk menghilangkan pelarut. Selanjutnya hasil pemekatan dianalisis menggunakan spektrometer massa dengan melihat nilai *m/z*. kemudian dilanjutkan dengan analisis menggunakan RP-HPLC untuk proses pemurnian.

C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

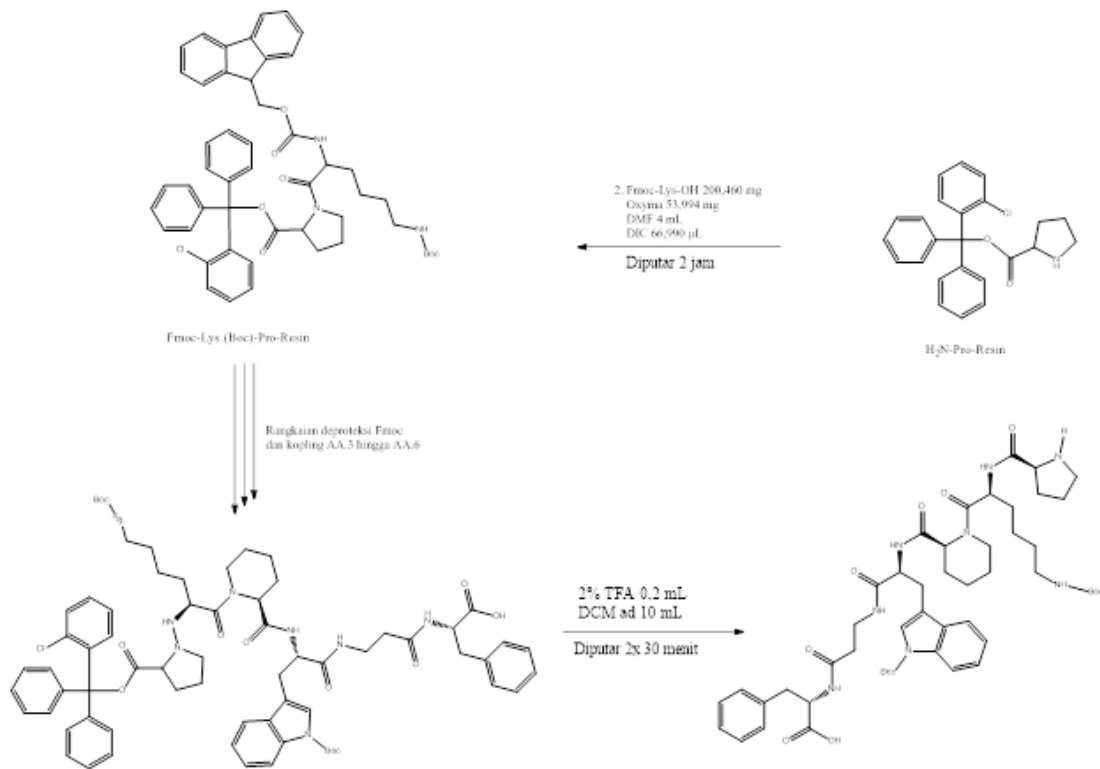
Pada penelitian ini dilakukan sintesis senyawa heksapeptida siklik analog pipecolisporin dengan urutan asam amino Pro-Lys-Pip-Trp- β -Ala-Phe dari senyawa pipecolisporin berupa Pro-Leu-Pip-Trp- β -Ala-Ile dengan metode Solid Phase Peptida Synthesis (SPPS), metode yang telah banyak digunakan dalam melakukan sintesis peptida dengan kelebihan metode ini yaitu berupa prosesnya lebih mudah dan cepat sehingga pada proses pengerjaannya membutuhkan waktu yang relatif singkat [7].

Sintesis Heksapeptida Linear Dengan Sintesis Fase Padat

Pertama dilakukan pengkondisian tabung reactor agar tabung reaktor yang digunakan dalam keadaan bersih dari zat asing atau pengotor yang dapat mengganggu proses sintesis. Lalu dilakukan pengembangan resin 2-CTC menggunakan pelarut DCM yang merupakan pelarut non polar sehingga sisi aktif pada resin akan terbuka dan resin akan mengembang dalam rentang 2,5 hingga 6,2 kali lipat dari volume awal yang berdiameter rata-rata 50 μm [8]. Selanjutnya dilakukan pengkoplingan asam amino pertama berisi Fmoc-Pro-OH yang dilarutkan dalam DCM dan DIPEA. Mekanisme pengkoplingan diawali dengan pengikatan hidrogen asam pada gugus karboksil Fmoc-Pro-OH oleh basa nitrogen DIPEA melalui reaksi asam basa yang membentuk nukleofil, kemudian nukleofil yang terbentuk akan menyerang gugus klorida pada resin sehingga terjadi pengikatan antar ikatan resin dan asam amino Fmoc-Pro-OH [5]. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai *loading resin* menggunakan instrument spektrofotometer massa dan Panjang gelombang 290 nm. Mekanisme Penentuan nilai *Loading resin* berdasarkan banyaknya Fmoc yang terdeproteksi dari asam amino prolin yang kemudian

diukur absorbansinya. Hasil nilai *Loading resin* yang diperoleh adalah sebesar 0,267. Nilai *Loading resin* ini dikatakan baik karena berada diantara nilai 0,2-1,2 mmol/g resin [5]. Selanjutnya dilakukan *capping resin* menggunakan Metanol yang akan menutupi sisi aktif pada gugus klorida, DCM sebagai pelarut yang bersifat volatil dan DIPEA sebagai basa yang menarik OH dari metanol, sehingga metanol dapat berikatan dengan resin dan sisi aktif pada resin akan tertutup [9]. Selanjutnya dilakukan deproteksi asam amino dengan larutan piperidin sebanyak 20% dalam DMF, bertujuan untuk menyediakan sisi aktif asam amino pertama yang akan bereaksi dengan asam amino selanjutnya, dengan cara menutup sisi aktif (-NH/NH₂) pada asam amino agar dapat bereaksi dengan gugus (-COOH) asam amino yang selanjutnya. Setelah itu dilakukan uji kloranil menggunakan 40 µL asetaldehid dan 40 µL kloranil, bertujuan untuk memastikan bahwa gugus pelindung Fmoc telah terlepas dari asam amino sehingga asam amino memiliki sisi aktif yang akan berikatan dengan asam amino selanjutnya. Hal ini terjadi karena terdapat gugus amina (-NH₂) bebas yang berikatan dengan larutan kloranil sehingga jika sudah berubah warna menandakan bahwa pelepasan gugus pelindung Fmoc telah berhasil [4].

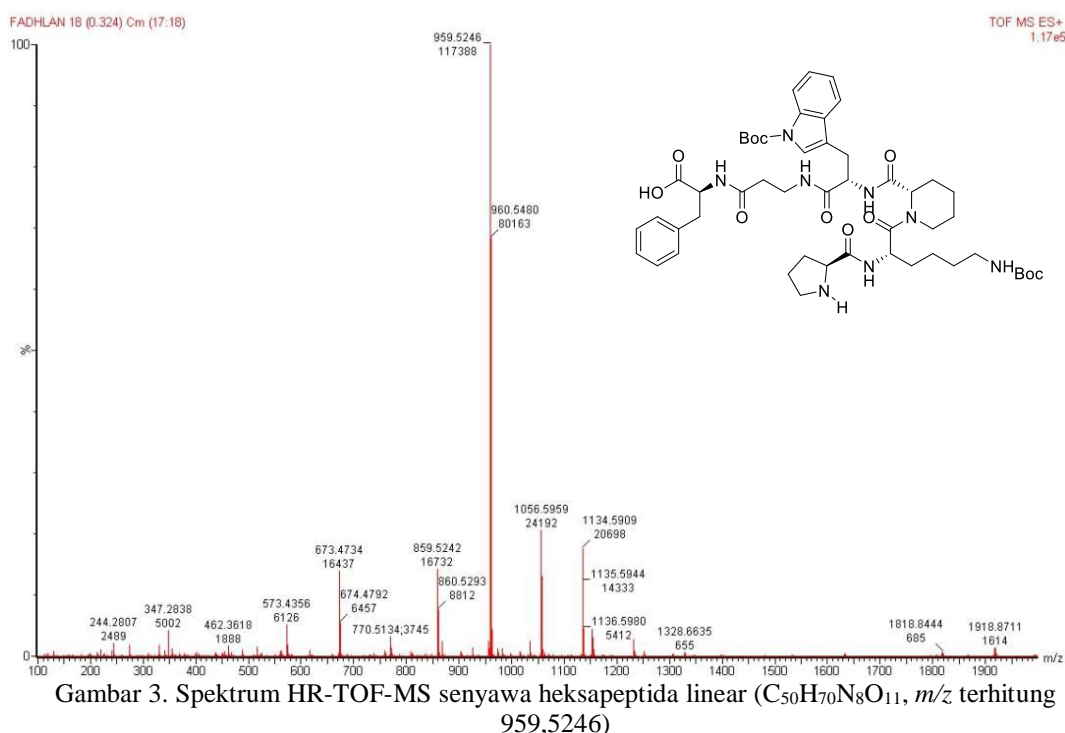
Selanjutnya dilakukan pengkoplingan asam amino kedua hingga keenam. Dengan dilakukan secara bertahap mengikuti struktur asam amino (Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pip-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-β-Ala-OH, Fmoc-Phe-OH) dengan menggunakan reagen kopling DIC, Oxyma dan DMF sebagai pelarut. Reaksi kopling pada SPPS cenderung sulit terjadi karena reaksi berlangsung secara heterogen antara fase padat dan fase cair, sehingga untuk meningkatkan reaksi kopling yang terjadi diperlukan nilai 4 ekivalen asam amino yang besar untuk memperbesar konsentrasi asam amino yang akan dikopling. Penggunaan reagen kopling DIC dan oksima dimaksudkan untuk menekan rasemisasi dan untuk efisiensi kopling yang lebih tinggi dari HOBt. Setelah pengkoplingan asam amino ke-2 selesai selanjutnya dilakukan monitoring menggunakan uji kloranil; deproteksi gugus pelindung; uji kloranil. Penambahan empat asam amino berikutnya dilakukan dengan tahapan protokol yang sama dan berulang dengan sebelumnya (kopling dan deproteksi Fmoc) hingga membentuk heksapeptida linear yang masih terikat pada resin [5], [9]. Selanjutnya dilakukan pemutusan resin menggunakan TFA dan DCM tahap ini ditandai dengan warna resin yang berubah dari kuning menjadi kehitaman menandakan bahwa proses pelepasan peptida dari resin sedang berlangsung, larutan TFA dan DCM dapat menjadikan pemutusan resin berlangsung secara selektif dan cepat. Lalu dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* hingga mendapatkan serbuk berwarna putih. Crude heksapeptida linear yang dihasilkan sebesar 132 mg adalah kecil. Terdapat kemungkinan yang dapat menyebabkan hasil crude kecil yaitu kurang optimalnya proses pemutusan heksapeptida linear dari resin sehingga perolehan filtrat yang tertampung hanya sedikit.



Gambar 2. Skema sintesis peptida asam amino kedua hingga keenam

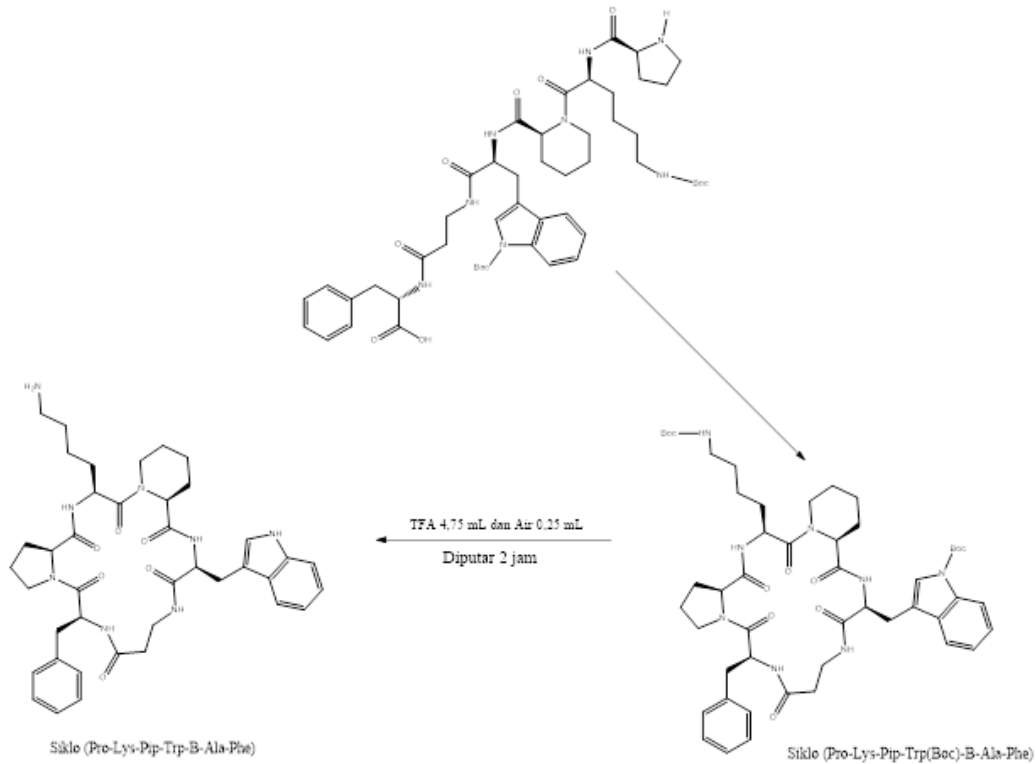
Karakterisasi Heksapeptida Linier

Pada penelitian ini hasil spektrometer massa menunjukkan adanya puncak ion molekul [M] sebesar 959,5246 nilai tersebut menunjukkan bobot molekul dari senyawa yang dianalisis Hal tersebut dilihat dari hasil simulasi menggunakan chemdraw yang memiliki rumus molekul $C_{50}H_{70}N_8O_{11}$ dengan didapat bobot molekul senyawa heksapeptida linier sebesar 959,16. Oleh karena itu sintesis dengan metode SPPS pada senyawa heksapeptida linear (Pro-Lys-Pip-Trp-β-Ala-Phe) berhasil dilakukan. Setelah itu dipilih vial mana yang berisi fraksi yang lebih banyak mengandung senyawa. Lalu fraksi tersebut dilarutkan dengan menggunakan metanol kemudian diambil 1 mL. Kemudian sisa larutan dievaporasi sehingga didapatkan fraksi terakhir sebesar 9,8 mg.



Siklisasi Heksapeptida Linear Dengan Fase Larutan

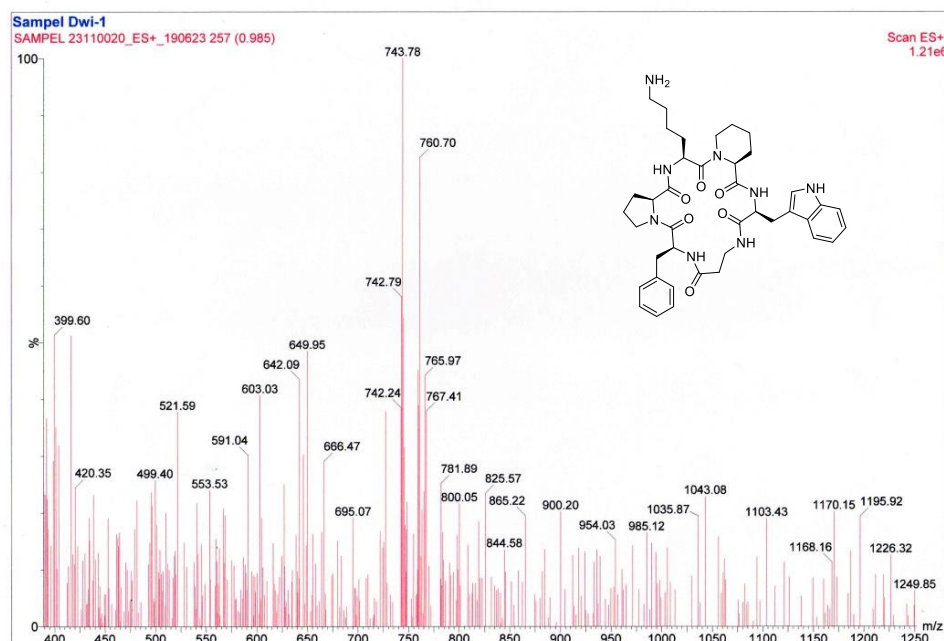
Setelah diperoleh crude heksapeptida linear sebanyak 9,8 mg, dilakukan proses siklisasi menggunakan metode fase larutan dengan penambahan reagen HATU, DIPEA, dan DCM. Reaksi siklisasi dijalankan dengan mengoptimalkan konsentrasi larutan yang encer untuk meminimalkan terbentuknya dimerisasi akibat kondensasi antar urutan molekul linear. Siklisasi ini dilakukan selama 7 x 24 jam pada suhu ruang. Peptida linear memiliki terminal-N dan terminal-C. Pada heksapeptida siklik ini, Prolin berperan sebagai C-terminal. Prolin memiliki kelebihan sebagai inducer β -turn atau konformasi sekunder yang dapat mendekatkan terminal-C dan terminal-N melalui ikatan hidrogen, sehingga mempermudah pembentukan heksapeptida siklik (Pro-Lys-Pip-Trp- β -Ala-Phe) yang telah disintesis. Selanjutnya dilakukan pelepasan gugus pelindung boc dengan menambahkan larutan TFA sebesar 95% dalam air. Konsentrasi TFA yang tinggi dapat menyebabkan gugus pelindung rantai samping asam amino, seperti Boc pada lisin dan Trp, ikut terlepas. Sementara itu, air berperan sebagai scavenger karbocation yang terbentuk selama reaksi deproteksi. Proses deproteksi ini bertujuan untuk menghilangkan gugus pelindung samping dan menghasilkan heksapeptida linear yang bebas dari gugus pelindung. Selama proses deproteksi, larutan dalam vial diaduk menggunakan magnetic stirrer selama 2 jam. Perubahan warna larutan dari ungu menjadi kehitaman dapat menjadi indikator bahwa proses deproteksi berlangsung dengan baik. Setelah deproteksi selesai, sampel selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator*.



Gambar 4. Skema reaksi siklisasi heksapeptida linear

Karakterisasi Heksapeptida Siklik

Pada penelitian ini hasil spektrometer massa menunjukkan adanya puncak ion molekul $[M+H]^+$ sebesar 743,78 nilai tersebut menunjukkan bobot molekul dari senyawa yang dianalisis. Hal tersebut dilihat dari hasil simulasi menggunakan chemdraw yang memiliki rumus molekul $C_{40}H_{52}N_8O_6$ dengan didapat bobot molekul senyawa heksapeptida siklik sebesar 740,91. Penambahan berat molekul ini dapat terjadi karena adanya tambahan atom H^+ yang mempengaruhi hasil analisis, sehingga senyawa yang didapatkan masih belum murni dan perlu dimurnikan terlebih dahulu agar bisa dilakukan pengujian anti malaria. Oleh karena itu sintesis dengan metode LPPS pada senyawa heksapeptida siklik (Pro-Lys-Pip-Trp- β -Ala-Phe) berhasil dilakukan.



Gambar 5. Spektrum HR-TOF-MS senyawa heksapeptida siklik ($C_{40}H_{52}N_8O_6$, m/z terhitung 743,78)

D. Kesimpulan

Berdasarkan pembahasan dalam penelitian ini, peneliti menyimpulkan beberapa hasil penelitian sebagai berikut:

1. heksapeptida linear senyawa analog pipecolisporin (Pro-Lys-Pip-Trp- β -Ala-Phe) dengan metode SPPS menggunakan strategi Fmoc, reagen kopling DIC/ Oxyma, resin 2-klorotritil klorida (2-CTC), serta larutan TFA:DCM (0,2:9,8) sebagai reagen Cleavage berhasil disintesis berdasarkan karakterisasi menggunakan spektrometri massa dengan nilai $[M]$ sebesar 959,5246. Massa crude yang diperoleh adalah 9,8 mg
2. siklisasi senyawa heksapeptida linear (Pro-Lys-Pip-Trp- β -Ala-Phe) dengan metode fase larutan menggunakan reagen HATU dan DIPEA dalam pelarut DCM telah berhasil dilakukan berdasarkan karakterisasi menggunakan spektrometri massa dengan nilai $[M+H]^+$ sebesar 743,78.

Acknowledge

Penulis mengucapkan terimakasih banyak kepada pembimbing utama dan serta yang telah membimbing penulis dan juga terimakasih untuk Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran yang telah memberikan fasilitas untuk melakukan penelitian.

Daftar Pustaka

- [1] D. I. Ugwuja, U. C. Okoro, S. S. Soman, R. Soni, S. N. Okafor, and D. I. Ugwu, "New peptide derived antimalaria and antimicrobial agents bearing sulphonamide moiety," *J Enzyme Inhib Med Chem*, vol. 34, no. 1, 2019, doi: 10.1080/14756366.2019.1651313.
- [2] N. Lawrence *et al.*, "Defense Peptides Engineered from Human Platelet Factor 4 Kill Plasmodium by Selective Membrane Disruption," *Cell Chem Biol*, vol. 25, no. 9, 2018, doi: 10.1016/j.chembiol.2018.06.009.
- [3] I. Fernández-Pastor *et al.*, "Pipecolisporin, a novel cyclic peptide with antimalarial and antitrypanosome activities from a wheat endophytic nigrospora oryzae," *Pharmaceuticals*, vol. 14, no. 3, 2021, doi: 10.3390/ph14030268.

- [4] R. Maharani, E. F. Yanti, M. D. I. Melati, and D. Sihotang, "Synthesis of Trypsin-modulating Oostatic Factor (TMOF) and its Analogues by Solid-phase Peptide Synthesis Using DIC/Oxyma as Coupling Reagent," *Procedia Chem*, vol. 17, pp. 125–131, 2015, doi: 10.1016/j.proche.2015.12.124.
- [5] E. F. Yanti and R. Maharani, "Sintesis Tetrapeptida Linear (DPAP) Menggunakan Metode Sintesis Peptida Fasa Padat (SPPS) Dan Aktivitas Insektisidanya Terhadap Ulat Krop Kubis," *Indo. J. Chem. Res.*, vol. 8, no. 1, 2020, doi: 10.30598/10.30598/ijcr.2020.8-eka.
- [6] G. Corkill and R. Rapley, "The manipulation of nucleic acids basic tools and techniques," in *Molecular Biomethods Handbook: Second Edition*, 2008. doi: 10.1007/978-1-60327-375-6_1.
- [7] Eka Nurjanah and Nety Kurniaty, "Sintesis Tetrapeptida Linear Phe-Leu-Ala-Pro (FLAP) sebagai Kandidat Antioksidan dengan Metode Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)," *Jurnal Riset Farmasi*, vol. 1, no. 2, 2021, doi: 10.29313/jrf.v1i2.452.
- [8] R. Maharani *et al.*, "Sintesis Tetrapeptida PSSY dengan Metode Fasa Padat," *Chimica et Natura Acta*, vol. 7, no. 2, 2019, doi: 10.24198/cna.v7.n2.26156.
- [9] Dita Utami and Nety Kurniaty, "Sintesis Senyawa Heksapeptida Siklik Analog Pipecolisporin (Lys-Bala-Trp-Pip-Leu-Pro) dengan Metode Kombinasi Sintesis Fase Padat dan Fase Larutan Sebagai Kandidat Antimalaria," *Bandung Conference Series: Pharmacy*, vol. 2, no. 2, 2022, doi: 10.29313/bcsp.v2i2.4395.