

Sintesis Tetrapeptida PSSY dengan Metode Fasa Padat

Rani Maharani*, Siska Mulya Octavia, Achmad Zainuddin, Ace Tatang Hidayat, Dadan Sumiarsa, Desi Harneti, Nurlelasari, Unang Supratman

Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran Jalan Raya Bandung-Sumedang km. 21, Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat, 45363

*Penulis korespondensi: r.maharani@unpad.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v7.n2.26156>

Abstrak: Senyawa tetrapeptida antioksidan PAGY telah berhasil diisolasi dari kulit ikan amur sturgeon dan telah berhasil disintesis berserta analog PSGY, PFFY, PAFY dan PAIY menggunakan metode SPPS. Uji antioksidan menunjukkan senyawa PSGY lebih aktif dari senyawa PAGY dan senyawa analog lainnya. Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis senyawa tetrapeptida PSSY dengan metode SPPS, dan mengetahui aktivitas antioksidan senyawa tetrapeptida hasil sintesis dengan uji DPPH. ibuat dalam dua versi; bahasa Indonesia dan Inggris. Tetrapeptida PSSY telah berhasil disintesis menggunakan strategi SPPS dengan resin 2-klorotritilorida sebagai padatan penyangga, gugus pelindung Fmoc, dan reagen kopling HATU/HOAt. Padatan PSSY berhasil dimurnikan menghasilkan PSSY 17 mg (13,88%). Setelah dimurnikan, PSSY dikarakterisasi dengan HR-TOF-MS yang memberikan nilai m/z [M+H] 453,2711 yang sesuai untuk PSSY. Uji aktivitas antioksidan dilakukan pada PSSY dengan nilai IC_{50} sebesar 7,513 mg/mL.

Kata kunci: antioksidan, tetrapeptida, sintesis peptida fase padat

Abstract: PAGY had been successfully isolated from the skin of amur sturgeon fish and has been synthesized alongside of PSGY, PFFY, PAFY, PAIY analogs using SPPS method. The antioxidant test of PSGY showed a higher activity than PAGY and the other analogs. This research aims is to synthesize of tetrapeptide PSSY using SPPS method, and to find out about the antioxidant activity of the synthesized tetrapeptide using DPPH test. PSSY has been synthesized and purified, resulting in PSSY 17 mg (13.88%). The peptie was characterized using HR-TOF-MS with m/z is [M+H] 453.2711 for PSSY. The antioxidant activity of PSSY was obtained with IC_{50} value of 7.513 mg/mL.

Keywords: antioxidant, tetrapeptide, solid phase peptide synthesis

PENDAHULUAN

Peptida bahan alam dengan potensi antioksidan telah menarik banyak perhatian karena diketahui dapat menstabilkan radikal secara enzimatik, mengkhelat logam, dan mereduksi radikal hidroperoksida. Peptida antioksidan dapat dicerna dalam tubuh dan memberikan efek samping yang rendah, sehingga aman untuk digunakan dalam industri makanan atau obat-obatan (Byun *et al.* 2009; Elias *et al.* 2008). Peptida antioksidan dihasilkan dari berbagai protein dengan struktur yang bervariasi (Yan *et al.* 2015). Peptida Pro-Ala-Gly-Tyr (PAGY) merupakan salah satu peptida dengan potensi antioksidan yang diisolasi dari kulit ikan *Amur sturgeon* dan diuji aktivitas antioksidannya oleh Nikoo *et al.* (2014) dengan nilai IC_{50} 5,38 mg/mL (DPPH) dan 0,008 mg/mL (ABTS).

Senyawa PAGY dan analognya yaitu PSGY, PAFY, PFFY, dan PAIY telah berhasil disintesis dan menunjukkan aktivitas antioksidan yang baik. Sintesis analog PAGY dilakukan untuk menentukan

senyawa tetrapeptida baru dengan potensi antioksidan. Dari hasil sintesis dan uji aktivitas, dilaporkan bahwa peptida PSGY merupakan analog yang mempunyai aktivitas yang lebih baik dari peptida PAGY dengan nilai IC_{50} 1,116 mg/mL (Maharani *et al.* 2019). Oleh karena itu upaya untuk menemukan senyawa tetrapeptida baru yang mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih baik terus dilakukan dengan cara memodifikasi asam amino penyusunnya.

Aktivitas antioksidan dari peptida ditentukan oleh asam amino penyusunnya. Telah dilaporkan bahwa hidrofobisitas, keunikan struktur dan berat molekul asam amino penyusun yang digunakan dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan dari peptida (Zou *et al.* 2016). Modifikasi tetrapeptida antioksidan yang baru dilakukan pada asam amino ketiga dari PSGY yaitu glysine (G) menjadi serin (S) menghasilkan analog PSSY. Kehadiran serin pada PSSY dimaksudkan untuk melihat apakah kehadiran dua buah serin dapat semakin meningkatkan aktivitas

antioksidan jika dibandingkan PSGY (Maharani *et al.* 2019). Asam amino prolin (P), serin (S), dan tirosin (Y) tetap dipertahankan karena mempunyai peranan tinggi terhadap aktivitas antioksidan dari senyawa tetrapeptida (Zou *et al.* 2016; Maharani *et al.* 2019).

Sintesis tetrapeptida PSSY dilakukan menggunakan metode sintesis peptida fasa padat (SPPS). Metode SPPS lebih dipilih daripada metode sintesis peptida fasa larutan karena waktu sintesis yang lebih singkat dan pemurnian yang hanya dilakukan di tahap akhir, sehingga sintesis peptida menggunakan metode SPPS dinilai lebih mudah dan cepat (Merrifield 1963).

Strategi SPPS yang digunakan adalah strategi Fmoc yang berdasarkan penggunaan gugus pelindung Fmoc pada gugus amino yang labil dalam basa, dan strategi perlindungan gugus pelindung pada rantai samping dan resin 2-klorotritilklorida yang labil terhadap asam (Chan & White 2000).

Sintesis peptida membutuhkan pemilihan kopling yang baik agar ikatan peptida dapat terbentuk secara sempurna. Reagen kopling yang digunakan pada penelitian ini adalah kombinasi HATU/HOAt. Reagen kopling HATU/HOAt merupakan reagen kopling yang termasuk ke dalam golongan garam uronium/aminium. Reagen kopling HATU akan menunjukkan performa yang baik dengan bereaksi dengan gugus karboksilat pada asam amino membentuk ester aktif. HOAt merupakan reagen aditif yang diketahui dapat mempercepat dan mempermudah reaksi kopling serta meminimalisir terjadinya epimerisasi (Valeur & Bradley 2008).

Produk hasil sintesis kemudian dimurnikan menggunakan RP-MPLC atau RP-HPLC, dikarakterisasi menggunakan spektrometer massa dan NMR serta diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH. Sintesis senyawa tetrapeptida PSSY merupakan suatu hal yang baru dan belum pernah dilakukan. Penelitian ini diharapkan memberikan informasi mengenai senyawa tetrapeptida baru dengan potensi antioksidan serta mengetahui peran asam amino terhadap aktivitas antioksidan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah resin 2-klorotritilklorida, diklorometana, DMF, HOAt, HATU, DIPEA, DPPH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, TFA, metanol, piperidin, asetaldehida, dan *p*-kloranil. Semua bahan yang digunakan adalah bahan proanalisis.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah tabung sintesis peptida fasa padat (tabung SPPS), freeze dryer, rotary evaporator, rotary suspension, RP-HPLC analitik, RP-MPLC, RP-HPLC preparatif, spektrofotometer massa, spektrofotometer UV-Vis,

NMR, dan alat gelas yang umum digunakan di laboratorium

Prosedur Sintesis

Pengikatan asam amino pertama (Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH) ujung C

Sebanyak 0,4 g resin 2-klorotritilklorida ditempatkan dalam reaktor, kemudian ditambahkan 5 mL diklorometana, dikocok selama 5 menit dan dikeringkan. Pada labu dasar bundar, disiapkan larutan Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH (257,348 mg; 0,56 mmol), diklorometana (5 mL) dan DIPEA (388,5 μ L; 2,23 mmol) kemudian disonikasi selama 5 menit. Larutan ditambahkan ke dalam resin dan dikocok semalaman pada suhu ruang. Resin disaring, kemudian dicuci dengan DMF dan diklorometana, lalu dikeringkan.

Sebanyak 5 mL campuran metanol: diklorometana:DIPEA (15:80:5) ditambahkan pada resin lalu dikocok selama 10 menit dan prosedur ini dilakukan dua kali. Resin disaring dan dicuci dengan DMF dan diklorometana. Resin dikeringkan sehingga didapatkan Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-resin yang sudah kering. Kontrol pengikatan asam amino ujung C dilakukan dengan menggunakan uji kloranil.

Untuk menghitung loading resin, 0,5 mg Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-resin yang sudah kering ditimbang dalam botol vial kecil dan ditambahkan 0,3 mL piperidin 25%, didiamkan selama 1 jam, kemudian ditambahkan 2,7 mL piperidin 25%, lalu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 290 nm.

Pelepasan gugus pelindung Fmoc menggunakan 20% piperidin dalam DMF (3 mL), campuran dikocok selama 30 menit. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DMF dan diklorometana. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc dilakukan dengan menggunakan uji kloranil. NH₂-Tyr(*t*-Bu)-resin dihasilkan dan siap untuk tahap kopling kedua.

Kopling asam amino kedua (Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH)

Pada labu dasar bundar disiapkan Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH (2 ekuivalen) yang ditambahkan dengan HATU (2 ekuivalen), HOAt (2 ekuivalen), DIPEA (8 ekuivalen) yang dilarutkan dalam 4 mL diklorometana:DMF (1:1), larutan kemudian disonikasi selama 5 menit. Larutan kuning ditambahkan ke dalam peptida resin (NH₂-Tyr(*t*-Bu)-resin) kering dan dikocok semalaman untuk menghasilkan Fmoc-Ser(*t*-Bu)-Tyr(*t*-Bu)-resin. Resin disaring dan dicuci dengan DMF dan diklorometana kemudian dikeringkan. Kontrol kopling asam amino kedua dilakukan dengan menggunakan uji kloranil.

Pelepasan gugus pelindung Fmoc menggunakan 20% piperidin dalam DMF (3 mL), larutan dikocok selama 30 menit. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DMF dan diklorometana. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc dilakukan dengan menggunakan uji kloranil. NH₂-Ser(*t*-Bu)-

Tyr(*t*-Bu)-resin dihasilkan dan siap untuk tahap kopling kedua.

Kopling asam amino ketiga (Fmoc- Ser(*t*-Bu)-OH)

Pada labu dasar bundar disiapkan Fmoc- Ser(*t*-Bu)-OH (2 ekuivalen) yang ditambahkan dengan HATU (2 ekuivalen), HOAt (2 ekuivalen.), DIPEA (8 ekuivalen) yang dilarutkan dalam 4 mL diklorometana:DMF (1:1), larutan kemudian disonikasi selama 5 menit. Larutan kuning ditambahkan ke dalam peptida resin (NH₂-Ser(*t*-Bu)-Tyr(*t*-Bu)-resin) kering dan dikocok semalaman untuk menghasilkan Fmoc- Ser(*t*-Bu)-Ser(*t*-Bu)-Tyr(*t*-Bu)-resin. Resin disaring dan dicuci dengan DMF dan diklorometana kemudian dikeringkan. Kontrol kopling asam amino kedua dilakukan dengan menggunakan uji kloranil.

Pelepasan gugus pelindung Fmoc menggunakan 20% piperidin dalam DMF (3 mL), larutan dikocok selama 30 menit. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DMF dan diklorometana. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc dilakukan dengan menggunakan uji kloranil. NH₂-Ser(*t*-Bu)-Ser(*t*-Bu)-Tyr(*t*-Bu)-resin dihasilkan dan siap untuk tahap kopling kedua.

Kopling asam amino keempat (Fmoc-Pro-OH)

Pada labu dasar bundar disiapkan Fmoc-Pro-OH (2 ekuivalen) yang ditambahkan dengan HATU (2 ekuivalen), HOAt (2 ekuivalen.), DIPEA (8 ekuivalen) yang dilarutkan dalam 4 mL diklorometana:DMF (1:1), larutan kemudian disonikasi selama 5 menit. Larutan kuning ditambahkan ke dalam peptida resin (NH₂-Ser(*t*-Bu)-Ser(*t*-Bu)-Tyr(*t*-Bu)-resin) kering dan dikocok semalaman untuk menghasilkan Fmoc-Pro-Ser(*t*-Bu)-Ser(*t*-Bu)-Tyr(*t*-Bu)-resin. Resin disaring dan dicuci dengan DMF dan diklorometana kemudian dikeringkan. Kontrol kopling asam amino kedua dilakukan dengan menggunakan uji kloranil.

Pelepasan gugus pelindung Fmoc menggunakan 20% piperidin dalam DMF (3 mL), larutan dikocok selama 30 menit. Selanjutnya resin disaring dan dicuci menggunakan DMF dan diklorometana. Kontrol pelepasan gugus pelindung Fmoc dilakukan dengan menggunakan uji kloranil. NH₂-Pro-Ser(*t*-Bu)-Ser(*t*-Bu)-Tyr(*t*-Bu)-resin dihasilkan dan siap untuk tahap kopling kedua.

Pelepasan Peptida dari Resin

Resin peptida (NH₂-Pro-Ser(*t*-Bu)-Ser(*t*-Bu)-Tyr(*t*-Bu)-OH) ditambahkan dengan 5 mL larutan 95% TFA dalam air. Campuran dikocok selama 10 menit pada suhu ruang. Lepasnya peptida dari resin ditandai dengan berubahnya warna resin menjadi merah. Tahap ini dilakukan dua kali. Resin disaring dan dicuci dengan (2 × 5 mL) 95% TFA dalam air. Filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Linear tetrapeptida yang telah disintesis selanjutnya dianalisis menggunakan RP-HPLC analitik,

dimurnikan dengan RP-MPLC dan dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer massa.

Uji Kloranil

Larutan stok disimpan dalam lemari es selama maksimal satu bulan.

Larutan 1: 2% asetaldehida dalam DMF

Larutan 2: 2% p-kloranil dalam DMF

Beberapa butir resin ditempatkan dalam tabung reaksi kecil dan 2-5 tetes larutan 1 dan larutan 2 ditambahkan. Campuran dicampur untuk waktu yang singkat dan dibiarkan pada suhu kamar selama 5 menit dan warna butiran resin diamati.

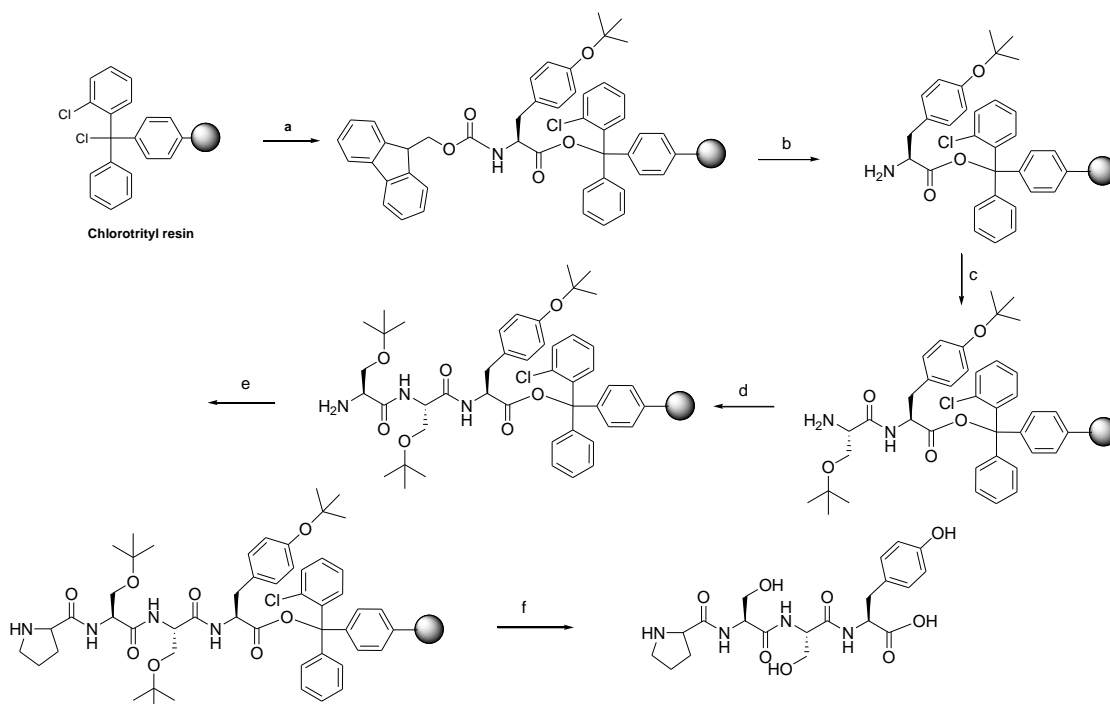
Uji DPPH

Peptida murni dibuat menjadi konsentrasi 2000 ppm dalam metanol. Kemudian dibuat peptida dengan beberapa macam konsentrasi yang berbeda sebanyak 200 µL (sudah termasuk 40 µL DPPH di dalamnya), kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit di ruangan terhindar cahaya. Absorbansi campuran diukur pada 517 nm. Blanko (pelarut) disiapkan dengan perlakuan yang sama. Kemudian dihitung nilai % inhibisi DPPH.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Senyawa tetrapeptida PSSY telah berhasil disintesis menggunakan metode sintesis fase padat menggunakan resin 2-klorotritilklorida dengan strategi Fmoc dan reagen kopling HATU/HOAt. Pada sintesis senyawa tetrapeptida PSSY asam amino pertama yang diikatkan pada resin adalah asam amino tirosin. Asam amino tirosin mempunyai gugus samping OH yang dilindungi oleh gugus pelindung *t*-Bu serta gugus amino pada N-terminal yang dilindungi oleh gugus pelindung sementara Fmoc. Perpanjangan rantai peptida dilakukan dari arah C-terminal menuju N-terminal. Hidrogen asam yang terdapat pada gugus karboksilat asam amino tirosin akan diserang oleh basa *N,N*-diisopropiletilamin (DIPEA) melalui reaksi asam basa hingga terbentuk nukleofil. Nukleofil yang terbentuk akan mensubstitusi atom klorida yang terikat pada atom karbon kuartener resin 2-klorotritil klorida melalui reaksi substitusi unimolekuler (S_N1), sehingga terbentuk senyawa Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-resin (Gambar 1). Reaksi pengikatan asam amino pertama pada resin pada umumnya dilakukan selama 18-24 jam agar residu asam amino dapat terikat pada resin secara optimal.

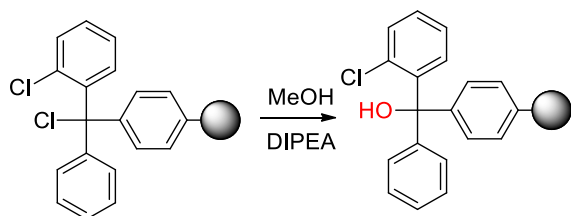
Selanjutnya, dilakukan pengukuran nilai *loading resin* atau jumlah asam amino pertama yang terikat pada resin. Nilai *loading resin* dapat menentukan jumlah asam amino yang ditambahkan pada tahap selanjutnya (Chan & White 2000). Nilai *loading resin* sebaiknya tidak terlalu besar karena semakin besar jumlah asam amino yang terikat pada resin menyebabkan interaksi antara asam amino pertama dengan asam amino selanjutnya menjadi lebih sulit. Penentuan nilai *loading resin* dilakukan



Gambar 1. Skema sintesis PSSY dengan metode fase padat. a. 1. Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH, DIPEA, diklorometana. b. 20% piperidina dalam DMF. 2. diklorometana:metanol:DIPEA, c. 1. Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH, HATU, HOAt, DIPEA, diklorometana:DMF. 2. 20% piperidina dalam DMF, d. 1. Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH, HATU, HOAt, DIPEA, diklorometana:DMF. 2. 20% piperidina dalam DMF, e. 1. Fmoc-Pro-OH, HATU, HOAt, DIPEA, diklorometana:DMF. 2. 20% piperidina dalam DMF, f. 95% TFA dalam air.

menggunakan spektrofotometer UV. Nilai *loading resin* yang didapat pada sintesis PSSY adalah sebesar 0,7 mmol/g.

Setelah dilakukan pengikatan asam amino pertama pada resin, perlu dilakukan *capping resin*. Tujuan dilakukannya *capping resin* adalah untuk menutup sisi aktif resin 2-klorotritil klorida sehingga asam amino selanjutnya tidak berikatan dengan sisi aktif resin yang tidak berikatan dengan asam amino pertama (Gambar 2). *Capping resin* dilakukan dengan cara menambahkan campuran diklorometana:metanol:DIPEA dengan perbandingan 80:15:5 pada resin.



Gambar 2. Reaksi *capping resin* menggunakan metanol (Chan & White, 2000)

Setelah dilakukan *capping resin*, dilakukan pelepasan gugus pelindung sementara (deproteksi). Pelepasan gugus pelindung Fmoc bertujuan untuk membebaskan sisi aktif asam amino pertama

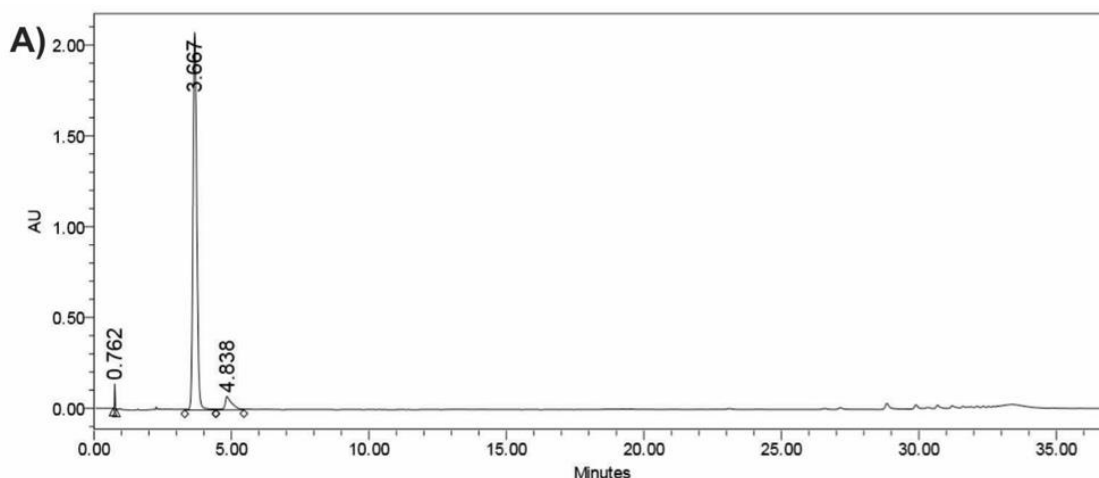
sehingga dapat berinteraksi dengan asam amino selanjutnya melalui reaksi kopling (Gambar 1). Gugus pelindung Fmoc merupakan gugus pelindung yang labil terhadap basa, sehingga pada saat deproteksi digunakan larutan basa, dalam penelitian ini digunakan larutan piperidin 20% dalam DMF. Pelepasan gugus pelindung Fmoc diawali dengan penyerangan atom hidrogen pada gugus fluorena yang terdapat pada Fmoc oleh piperidin sehingga membentuk senyawa intermediet siklopentadiena (Chan & White 2000). Keberhasilan deproteksi dapat dibuktikan melalui uji kloranil. Uji positif keberhasilan deproteksi ditandai dengan perubahan warna resin dari kuning menjadi hijau.

Setelah gugus amino bebas tersedia, dilakukan kopling dengan asam amino kedua. Penyusunan fragmen peptida linear dilakukan dengan cara menambahkan asam amino berikutnya pada resin. Asam amino akan membentuk ikatan peptida melalui ikatan kondensasi antara gugus amino dengan gugus karboksilat yang diaktivasi oleh reagen kopling. Sintesis peptida fase padat merupakan reaksi heterogen sehingga interaksi antar molekul pada fase padat dan fase larutan menjadi terbatas. Oleh karena itu, penambahan jumlah asam amino dilakukan 2 kali lipat dari seharusnya untuk meningkatkan konsentrasi dan laju reaksi. Pada umumnya asam amino yang ditambahkan sebanyak 2 ekuivalen dari nilai *loading resin*.

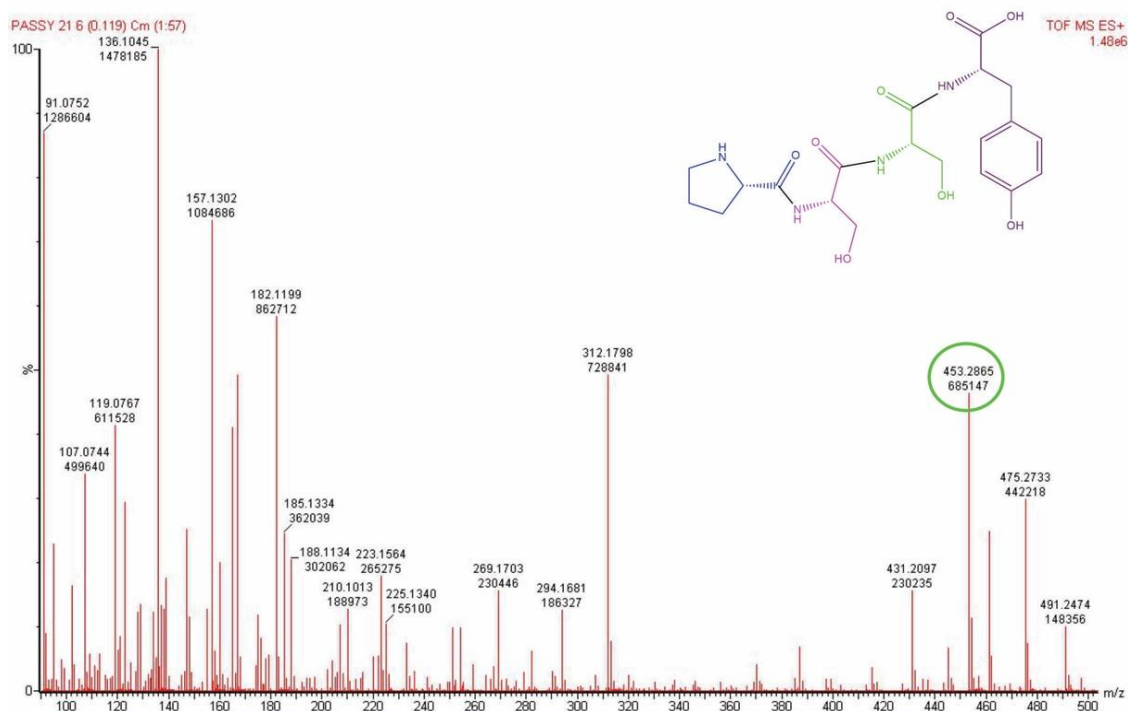
Kopling asam amino kedua, Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH dilakukan menggunakan kombinasi reagen kopling HATU/HOAt dengan perbandingan 1:1. Kopling asam amino kedua dilakukan dengan melarutkan 2 ekuivalen Fmoc-asam amino, 2 ekuivalen HATU, 2 ekuivalen HOAt dan 8 ekuivalen basa DIPEA dalam pelarut diklorometana:DMF (1:1). Asam amino serin ditambahkan dengan gugus OH pada rantai samping dilindungi dengan *t*-Bu. Reagen kopling disonikasi selama 5 menit agar reagen larut sempurna serta dapat meningkatkan kinetika reaksi. Kopling asam amino kedua dilakukan selama 18-24 jam agar reaksi kopling dapat berlangsung secara maksimal sehingga dapat meningkatkan rendemen hasil sintesis. Keberhasilan kopling asam amino kedua dibuktikan dengan uji kloranil yang ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna resin. Setelah dilakukan kopling asam amino kedua dilakukan deproteksi gugus Fmoc menggunakan larutan basa piperidin 20% dalam DMF selama 30 menit (Gambar 1). Tahap selanjutnya adalah tahapan kopling asam amino ketiga dan keempat yang diawali dengan kopling asam amino ketiga dengan urutan kopling dan deproteksi Fmoc yang dilanjutkan dengan kopling asam amino keempat dengan tahapan yang sama hingga tetrapeptida tersusun pada resin. Setelah terbentuk tetrapeptida target (PSSY), dilakukan pelepasan peptida target dari resin. Pelepasan peptida target dari resin dilakukan menggunakan larutan asam TFA 95% dalam air. TFA 95% digunakan karena selain untuk melepaskan peptida target dari resin, konsentrasi yang tinggi dari reagen TFA juga dimaksudkan untuk melepaskan gugus pelindung rantai samping *t*-Bu. Air bertindak sebagai *scavenger* kation yang terbentuk selama reaksi pelepasan peptida terjadi. Filtrat merah kecoklatan yang terbentuk setelah pelepasan peptida dari resin ditampung dalam vial lalu dipekatkan menggunakan rotary evaporator.

Filtrat peptida yang telah dipekatkan menggunakan rotary evaporator dan menghasilkan selai kuning kecoklatan sebanyak PSSY 381,8 mg. Krud PSSY kemudian dianalisis kemurniannya menggunakan *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) analitik menggunakan kolom fase terbalik yang dielusi menggunakan eluen bergradien asetonitril:air (10:90-100:0) dengan buffer TFA 1% selama 30 menit, laju alir 1mL/menit menggunakan detektor PDA dengan deteksi panjang gelombang 254 nm. Panjang gelombang yang digunakan merupakan panjang gelombang yang umum digunakan untuk analisis peptida yaitu 210, 220 dan 254 nm. Hasil analisis HPLC menunjukkan bahwa peptida target perlu dimurnikan karena menunjukkan beberapa puncak. Krud peptida juga dianalisis dengan HR-TOF-ESMS yang menunjukkan bahwa selain peptida target, peptida dengan satu gugus *t*-Bu maupun dua gugus *t*-Bu masih ada di dalam campuran. Penggunaan 95% TFA dalam air selama 10 menit tidak cukup untuk dapat melepas peptida dari resin sekaligus melepas dua buah gugus *t*-Bu pada rantai samping. Reaksi dalam waktu yang lebih lama seharusnya dapat dilakukan.

Senyawa peptida target PSSY dimurnikan menggunakan RP-HPLC preparatif dengan kolom C-18 yang dielusi menggunakan eluen bergradien asetonitril:air (0:100-100:0) selama 45 menit dengan laju alir 7 mL/menit. Hasil pemisahan ditampung berdasarkan serapan UV dengan panjang gelombang 254 nm. Setelah dimurnikan, fraksi hasil dari RP-HPLC dikeringkan menggunakan *freeze dryer*. Padatan putih hasil pemurnian kemudian dianalisis kemurniannya menggunakan RP-HPLC analitik. Hasil analisis menunjukkan bahwa senyawa tetrapeptida PSSY telah murni (Gambar 3), dimana puncak PSSY muncul pada waktu retensi 3,667 menit dengan elusi menggunakan asetonitril:air (0:100-100:0) selama 35 menit.



Gambar 3. Kromatogram RP-HPLC analitik untuk PSSY dilarutkan dalam ACN:Air (1:4) dengan elusi menggunakan asetonitril:air (0:100-100:0) selama 35 menit dengan laju alir 1 mL/menit.



Gambar 4. Spektrum massa TOF-HR-ESMS [M+H] senyawa PSSY.

Setelah dimurnikan, dilakukan karakterisasi PSSY dengan menggunakan TOF-HR-ESMS. Hasil karakterisasi menggunakan spektroskopi massa menunjukkan adanya ion puncak dari molekul PSSY pada m/z [M+H] 453,2865 (Gambar 4).

Senyawa tetrapeptida PSSY yang telah dimurnikan dan dikarakterisasi kemudian diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH. Uji antioksidan dilakukan menggunakan skala mikro dengan variasi konsentrasi 400, 600, 800, 1000, 1200, dan 1400 ppm. Uji antioksidan senyawa tetrapeptida PSSY dilakukan sekali di waktu yang sama untuk menghindari perbedaan absorbansi yang signifikan yang disebabkan oleh perubahan radikal DPPH. Optimisasi uji antioksidan menggunakan metode DPPH dapat dilakukan dengan penggunaan banyak variasi konsentrasi sampel yang akan diuji.

Dari hasil uji aktivitas antioksidan didapatkan nilai IC_{50} dari PSSY adalah 7,513 mg/mL. Hasil uji antioksidan senyawa PSSY menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih rendah dari aktivitas senyawa tetrapeptida PAGY dan PSGY hasil sintesis dengan nilai IC_{50} sebesar 1,750 mg/mL dan 1,116 mg/mL, berturut-turut.

KESIMPULAN

Senyawa tetrapeptida PSSY telah berhasil disintesis menggunakan metode SPPS dengan rendemen sebesar 13,8%. Senyawa tetrapeptida PSSY telah diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH dengan nilai IC_{50} sebesar 7,513 mg/mL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin mengucapkan terima kasih pada hibah RKDU-HIU Universitas Padjadjaran 2018 untuk pendanaan riset.

DAFTAR PUSTAKA

- 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: 842-846.
- 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): 430-441.
- Yan, Q.J., Huang, L.H., Sun, Q., Jiang, Z.Q. & Wu, X. (2015). Isolation, identification and synthesis of four novel antioxidant peptides from rice residue protein hydrolyzed by multiple proteases. *Food Chemistry*. 179: 290-295.
- Nikoo, M., Benjakul, S., Ehsani, A., Li, J., Wu, F., Yang, N., Xu, Baocai, X., Jin, Z. & Xu, X. (2014). Antioxidant and cyroprotective effects of a tetrapeptide isolated from *Amur sturgeon* skin gelatin. *Journal of Functional Foods*. 7: 609-620.
- Maharani, R., Ammatillah, N., Sumiarsa, D., Zainuddin, A., Harneti, D., Nurlelasari, & Supratman, U. (2019). Synthesis of tetrapeptides and screening of their antioxidant properties. *Current Bioactive Compounds*. 15: 680-685.

-
- 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: 72.
- Merrifield, R.B., 1963. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*. 85(14): 2149-2154.
- Chan, W. C. & White, P. D. (2000). *Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach*. Oxford University Press. New York.
- Valeur, E. & Bradley, M. (2009). Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews*. 38(2): 606-631.
-