

Sintesis Tetrapeptida SLYA (Ser-Leu-Tyr-Ala) sebagai Kandidat Antioksidan dengan Metode *Solid Phase Peptide Synthesis*

Resi Yulianti, Nety Kurniaty*

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

ARTICLE INFO

Article history :

Received : 2/4/2021

Revised : 8/7/2021

Published : 9/7/2021



Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License.

Volume : 2

No. : 1

Halaman : 9-15

Terbitan : Juli 2022

ABSTRAK

Antioksidan merupakan suatu senyawa yang mampu mencegah atau menghambat oksidasi pada suatu sel yang disebabkan oleh radikal bebas. Pada penelitian sebelumnya telah ditemukan salah satu senyawa peptida alami yaitu senyawa tetrapeptida SLYA (Ser-Leu-Tyr-Ala) yang diisolasi dari aktomiosin daging babi yang memiliki aktivitas antioksidan. Pada penelitian ini tetrapeptida SLYA (Ser-Leu-Tyr-Ala) telah berhasil disintesis dengan menggunakan metode solid phase peptide synthesis (SPPS) menggunakan strategi pemakaian gugus pelindung Fmoc/t-Bu. Pada penyusunan tetrapeptida digunakan reagen pengkopling yaitu kombinasi HBTU dan HOBt. Tetrapeptida SLYA (Ser-Leu-Tyr-Ala) dianalisis kemurniannya menggunakan Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC), serta dilakukan karakterisasi menggunakan spectrometer massa yang ditandai dengan munculnya puncak ion molekul $[M+H]$ pada m/z 453,23. Pada pengujian aktivitas antioksidan menggunakan DPPH, IC50 yang diperoleh pada senyawa tetrapeptida SLYA (Ser-Leu-Tyr-Ala) sebesar 11130,04 $\mu\text{g/mL}$, hal ini menunjukkan bahwa senyawa tetrapeptida SLYA (Ser-Leu-Tyr-Ala) memiliki aktivitas antioksidan yang masih lemah.

Kata Kunci : Antioksidan; tetrapeptida SLYA (Ser-Leu-Tyr-Ala); solid phase peptide synthesis (SPPS).

ABSTRACT

Antioxidants are compounds that can prevent or inhibit oxidation in a cell caused by free radicals. Previous studies have found a natural peptide compound namely tetrapeptide compounds SLYA (Ser-Leu-Tyr-Ala) which are isolated from actomyosin of pork which have antioxidant activity. In this study, tetrapeptide SLYA (Ser-Leu-Tyr-Ala) has been successfully synthesized using the solid phase peptide synthesis (SPPS) method with the Fmoc / t-Bu protective group strategy. In the preparation of tetrapeptide, a coupling reagent is used, a combination of HBTU and HOBt. The purity of tetrapeptide SLYA (Ser-Leu-Tyr-Ala) was analyzed using Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC), as well as characterization using a mass spectrometer marked by the emergence of molecular ion peaks $[M + H]$ at m / z 453.23. In testing antioxidant activity using DPPH, IC50 obtained in tetrapeptide compounds SLYA (Ser-Leu-Tyr-Ala) amounted to 11130.04 $\mu\text{g} / \text{mL}$, this shows that tetrapeptide compounds SLYA (Ser-Leu-Tyr-Ala) have low antioxidant activity.

Keywords : Antioxidant; Tetrapeptide SLYA (Ser-Leu-Tyr-Ala); Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS).

@ 2022 Jurnal Riset Farmasi Unisba Press. All rights reserved.

A. Pendahuluan

Antioksidan merupakan suatu substansi yang pada konsentrasi kecil secara signifikan mampu menghambat atau mencegah oksidasi pada substrat yang disebabkan oleh radikal bebas [1]. Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat mencegah atau menghambat oksidasi pada suatu sel yang disebabkan oleh radikal bebas [2]. Keseimbangan antara oksidan dan senyawa antioksidan sangat penting dibutuhkan karena sangat berkaitan dengan fungsi sistem imun tubuh. Kondisi ini untuk menjaga integritas dan fungsi dari membran lipid, protein sel dan asam nukleat serta mengontrol transduksi sinyal dan ekspresi gen dalam sel imun. Komponen membran sel terbesar disusun oleh senyawa lemak tak jenuh, yang diketahui sangat sensitif terhadap perubahan oksidan dan antioksidan [3]. Salah satu fungsi antioksidan yaitu mampu menghambat atau mencegah radikal bebas dalam tubuh.

Radikal bebas merupakan molekul yang sangat reaktif karena memiliki elektron yang tidak berpasangan dalam orbital luarnya sehingga dapat bereaksi dengan molekul sel tubuh dengan cara mengikat elektron molekul sel tersebut [4]. Radikal bebas yang dihasilkan secara terus menerus selama proses metabolisme normal, dianggap sebagai penyebab terjadinya kerusakan fungsi sel-sel tubuh yang akhirnya menjadi pemicu timbulnya penyakit degeneratif [5]. [6], berpendapat bahwa serangan radikal bebas terhadap molekul sekelilingnya akan menyebabkan terjadinya reaksi berantai, yang kemudian menghasilkan senyawa radikal baru. Dampak reaktivitas senyawa radikal bebas mulai dari kerusakan sel atau jaringan, penyakit autoimun, penyakit degeneratif, hingga kanker. Resiko terjadinya penyakit tersebut dapat dikurangi dengan penggunaan senyawa antioksidan [7].

Marcuse pertama kali menemukan efek antioksidan pada peptida pada tahun 1960, kemudian berkembang hingga sekarang ditemukan ratusan peptida antioksidan yang dihasilkan dari berbagai sumber alami yang mengandung protein termasuk dari organisme laut [8]. Beberapa peptida bioaktif dari protein aktomiosin daging babi yang dapat melakukan aktivitas antioksidan adalah fragmen yang memiliki urutan asam amino Ser-Leu-Tyr-Ala yang menunjukkan aktivitas antioksidan yang paling tinggi [9].

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana cara mensintesis tetrapeptida SLYA menggunakan metode Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) agar didapat urutan seperti hasil isolasi, tapi terbebas dari bahan yang bersumber dari babi karena tidak halal bagi umat muslim. Selain itu apakah senyawa tetrapeptida SLYA hasil sintesis memiliki aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH seperti yang dimiliki oleh peptida hasil isolasi dari babi.

Tujuan dalam penelitian ini adalah untuk mensintesis senyawa tetrapeptida SLYA dengan menggunakan metode Solid Phase Peptide synthesis (SPPS), serta untuk menguji aktivitas antioksidan tetrapeptida SLYA hasil sintesis terhadap radikal DPPH.

B. Metode Penelitian

Peptida

Peptida merupakan senyawa alami yang tersusun dari beberapa monomer asam amino, yang tergabung dan saling berikatan melalui ikatan peptida atau amida. Suatu peptida memiliki gugus fungsi amida yang dibentuk dari dua asam amino atau lebih. Ikatan amida antara suatu gugus α -amino dari satu asam amino dan gugus karboksil dari asam amino lain disebut ikatan peptida [10]. Beberapa peptida yang merupakan bagian dari protein dengan urutan asam amino yang spesifik yang memiliki aktivitas biologi disebut sebagai peptida bioaktif [11].

Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif adalah radikal bebas, senyawa ini terbentuk di dalam tubuh dan dipicu oleh bermacam-macam. Antioksidan dapat mendonorkan elektronnya kepada molekul radikal bebas, sehingga dapat menstabilkan radikal bebas dan menghentikan reaksi berantai [12].

Pada uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode peraman DPPH sebagai radikal bebas. Prinsip kerja dari metode DPPH adalah adanya atom hidrogen dari senyawa antioksidan yang berikatan dengan elektron bebas pada senyawa radikal sehingga menyebabkan perubahan dari radikal bebas (diphenylpicrylhydrazyl) menjadi senyawa non-radikal (diphenylpicrylhydrazine). Hal ini ditandai dengan perubahan warna dari ungu menjadi kuning (senyawa radikal bebas tereduksi oleh adanya antioksidan) [13].

Solid Phase Peptida Synthesis (SPPS)

Sintesis fase padat merupakan teknik umum untuk sintesis peptida, pada umumnya peptida disintesis dari sisi gugus karbonil (terminus) ke sisi gugus amino (N-ujung) dari rantai asam amino. Dalam sintesis peptida, asam amino yang dilindungi amino terikat pada bahan fase padat membentuk ikatan kovalen antara gugus karbonil dan resin. Kemudian gugus amino dideproteksi dan direaksikan dengan gugus karbonil dari asam amino berikutnya yang dilindungi oleh amino, sehingga fase padat mengandung dipeptida. Siklus tersebut diulang sampai terbentuk tetrapeptida yang diinginkan [14].

Pada penelitian ini asam amino yang digunakan adalah Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH dan Fmoc-Ala-OH. Penelitian ini menggunakan metode Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS), yang terdiri dari beberapa tahap, yaitu pengkondisian tabung reaktor, pengembangan resin, dan pengikatan asam amino pertama pada resin, lalu dilakukan uji kloranil untuk memastikan keberhasilan pengkoplingan. Kemudian dilakukan capping resin yang bertujuan untuk menutupi gugus aktif pada resin agar tidak berikatan dengan asam amino lain. Selanjutnya dilakukan pelepasan gugus pelindung Fmoc (deproteksi). Lalu dilakukan uji kloranil untuk memastikan keberhasilan proses deproteksi.

Tahap selanjutnya pengkoplingan asam amino kedua sampai dilakukan pelepasan gugus pelindung Fmoc (deproteksi), tahap ini diulang sampai terbentuk tetrapeptida. Setelah terbentuk tetrapeptida, kemudian dilakukan pemutusan resin dan gugus samping dari tetrapeptida, kemudian dilakukan proses pemekatan peptida dengan menggunakan alat rotary evaporator untuk menghilangkan pelarut. Selanjutnya dilakukan karakterisasi pada senyawa tetrapeptida SLYA menggunakan Spektrofotometer massa, kemudian dilakukan uji kemurnian dengan menggunakan RP-HPLC. Tahap terakhir dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan uji DPPH.

C. Hasil dan Pembahasan

Senyawa tetrapeptida (Ser-Leu-Tyr-Ala) disintesis dengan menggunakan metode Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS), 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 menahan amino C-ujung pada gugus karboksilnya sementara peptidanya akan disintesis [10]. Resin yang dipilih pada metode SPPS ini adalah resin 2-klorotiril klorida yang labil terhadap asam, sehingga peptida dapat terlepas dari resin ketika dalam suasana asam. Selain itu, penggunaan resin 2-klorotiril klorida ini dapat mencegah reaksi samping pembentukan diketopiperazin karena meruahnya gugus aktif dari resin tersebut [14].

Pengkoplingan Asam Amino Pertama

Pengkoplingan asam amino ujung C yaitu Fmoc-Ala-OH, dilakukan dengan penambahan DIPEA dan dilarutkan dalam DCM, kemudian dilakukan pengembangan pada resin menggunakan pelarut DCM tujuannya supaya sisi aktif pada resin dapat terbuka sehingga asam amino yang pertama akan mudah terikat pada sisi aktif dari resin tersebut [15]. Selanjutnya dikocok menggunakan rotary suspension mixer selama 4 jam, tujuannya supaya memastikan bahwa asam amino pertama yang masuk kedalam resin (nilai loading resin) tidak terlalu banyak, karena jika nilai loading resin terlalu banyak akan menyebabkan padatnya peptida yang akan mempersulit asam amino bergugus pelindung menjangkau gugus α -amino bebas dan juga meningkatkan potensi agregasi [14]. Hasil nilai loading resin yang diperoleh adalah 0,1727 mmol/mg, nilai

yang diperoleh merupakan nilai yang baik karena nilai rata-rata loading resin yang baik berada pada 0,1-1,3 mmol/mg [16].

Selanjutnya dilakukan capping resin karena tidak semua resin dapat mengikat asam amino, sehingga harus dilakukan capping resin, dengan mencampurkan MeOH: DCM: DIPEA (2: 7: 1) mL pada resin yang bertujuan supaya menutup sisi aktif pada resin yang tidak terikat dengan asam amino. Kemudian dilakukan uji kloranil menggunakan larutan kloranil dan asetaldehid, tujuannya untuk memastikan keberhasilan pengkoplingan. Hasil uji kloranil pada tahap pengkoplingan tidak terjadi perubahan warna pada resin (resin tetap berwarna kuning) karena masih terdapat gugus pelindung Fmoc yang membuat gugus amina (-NH₂) masih belum bebas sehingga gugus amina tidak dapat berikatan dengan kloranil, hal ini menunjukkan bahwa pengkoplingan asam amino pertama telah berhasil.

Selanjutnya dilakukan tahap deproteksi Fmoc atau pelepasan gugus pelindung, tahap ini dilakukan untuk menyediakan sisi aktif pada asam amino pertama supaya dapat berikatan dengan asam amino kedua. Gugus pelindung Fmoc merupakan gugus pelindung yang tidak stabil terhadap basa, sehingga digunakan DBU yang bersifat basa supaya dapat melepaskan gugus pelindung yang labil terhadap basa. Selanjutnya dilakukan uji kloranil untuk memastikan keberhasilan deproteksi Fmoc, pengujian dilakukan dengan menggunakan larutan kloranil dan asetaldehid, digunakan larutan kloranil karena larutan kloranil mudah bereaksi dengan NH₂ bebas dan digunakan asetaldehid supaya reaksinya berlangsung dengan baik. Dimana hasil dari uji kloranil pada tahap ini adalah berubahnya warna pada resin menjadi warna biru karena gugus amina (-NH₂) bebas berikatan dengan larutan kloranil, hal ini menunjukkan bahwa deproteksi/pelepasan gugus pelindung Fmoc telah berhasil dilakukan.

Penyusunan Tetrapeptida Linier

Pada tahap ini dilakukan penyusunan tetrapeptida linier yaitu pada asam amino tirosin, leusin, dan serin. Tahap pertama dilakukan pengkoplingan asam amino tirosin dengan menambahkan HBTU, HOBt dan DIPEA, dimana HBTU yang berperan sebagai reagen kopling dapat menunjukkan perfoma yang sangat baik, dan HOBt disini berperan dapat meningkatkan rendemen [17]. Pengkoplingan dilakukan selama 24 jam tujuannya supaya peptide yang terikat dapat lebih banyak. Untuk memastikan keberhasilan pengkoplingan tersebut maka dilakukan uji kloranil dengan menambahkan larutan asetaldehid dan larutan kloranil kedalam resin yang kering, campuran ini didiamkan beberapa menit kemudian dilihat perubahan warnanya. Hasil uji kloranil pada pengkoplingan ini menunjukkan tidak terjadi perubahan warna pada resin karena masih terdapat gugus pelindung Fmoc yang membuat gugus amina (-NH₂) masih belum bebas sehingga gugus amina tidak dapat berikatan dengan kloranil, hal ini menunjukkan bahwa pengkoplingan telah berhasil. Kemudian dilakukan kembali tahap deproteksi (pelepasan gugus pelindung Fmoc) menggunakan DBU 10 % dalam DMF, deproteksi ini dilakukan secara duplo dengan dicuci menggunakan DCM dan DMF, dimana fungsi dari DCM dan DMF tersebut merupakan pelarut yang sangat baik untuk melindungi asam amino, selain itu karena pelarut ini merupakan sebagian besar pelarut yang digunakan sebagai reagen dalam sintesis peptida [14]. Setelah dilakukan deproteksi kemudian di uji kloranil kembali untuk mengetahui apakah masih terdapat gugus (-NH₂) yang masih bebas atau sudah tidak. Sehingga keberhasilan pada tahap deproteksi ini adalah pada uji kloranil, dimana terjadinya perubahan warna pada resin menjadi warna biru karena gugus amina (-NH₂) bebas berikatan dengan larutan kloranil. Penyusunan asam amino ketiga dan keempat dapat dilakukan dengan menggunakan prosedur yang sama, dimana tahap-tahap yang dilakukan seperti pengkoplingan asam amino, uji kloranil, deproteksi fmoc, dan uji kloranil. Tahap tersebut dilakukan sampai terbentuk tetrapeptida.

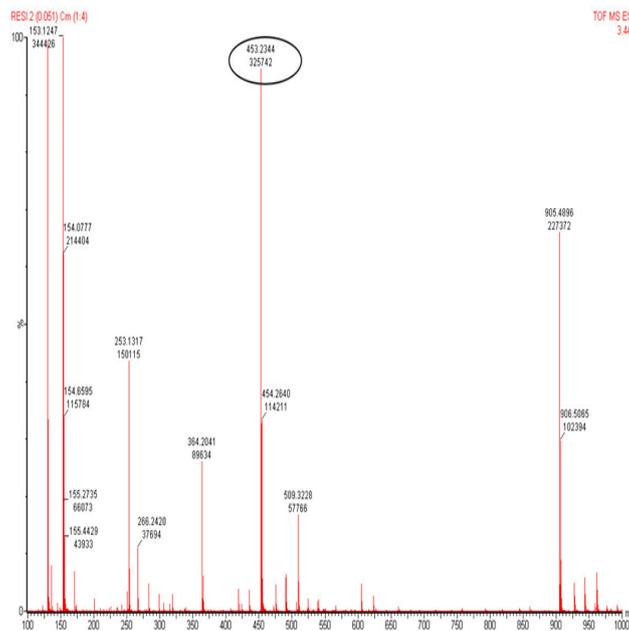
Pemutusan Resin dan Gugus Rantai Samping dari Tetrapeptida

Setelah terbentuk tetrapeptida, selanjutnya dilakukan pemutusan resin dan gugus rantai samping dari tetrapeptida dengan menggunakan larutan TFA 95 %, TFA yang digunakan adalah yang memiliki konsentrasi tinggi tujuannya supaya dapat melepaskan resin sekaligus gugus pelindung rantai samping tBu pada asam amino tirosin dan serin. Sampel yang dihasilkan dari tahap ini kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator, hasil yang diperoleh adalah serbuk putih kecoklatan yang masih sedikit lengket. Sehingga tahap selanjutnya sampel tersebut dimasukan kedalam desikator karena desikator

mengandung desikan yang berfungsi menghilangkan air. Sampel tetrapeptida yang telah didesikator kemudian ditimbang, didapatkan bobot sebesar 153,1 mg.

Karakterisasi Dengan Spektrometer Massa

Tujuan dilakukan karakterisasi ini adalah untuk mengidentifikasi senyawa tetrapeptida SLYA linier yang telah di sintesis dengan cara mengetahui nilai massa/muatan (m/z) dari suatu senyawa tetrapeptida SLYA linier. Hasil spektrometer massa menunjukkan adanya puncak ion molekul $[M+H]$ pada m/z 453,23 dan $[2M+H]$ 905,49. Puncak ion tersebut menunjukkan adanya puncak SLYA sebesar 452,51, hal ini menunjukkan bahwa senyawa tetrapeptida telah berhasil disintesis.

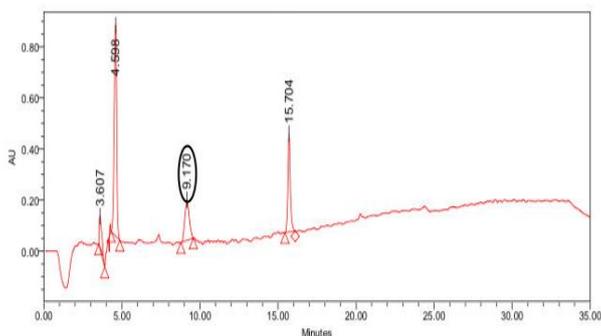


Gambar 1. Hasil spektrofotometer masa

Pengujian RP-HPLC

Pemilihan RP-HPLC ini didasarkan karena peptida memiliki banyak gugus polar yang dapat berpotensi membentuk ikatan hydrogen dengan gugus silanol dari silica gel, maka pemisahannya akan membentuk ekor yang sangat lebar. Hal tersebut akan menyebabkan peptida tidak akan terpisah dengan baik dari pengotornya. Sehingga dipilih gugus non polar C18 dari ODS. Kolom C18 tersebut dapat mempertahankan gugus-gugus hidrofob, sehingga senyawa hidrofili akan terelusi lebih cepat dan dengan adanya struktur ODS (silan terasilasi) yang masih memiliki gugus SiO (silanol) akan tetap berpotensi melakukan interaksi sekunder (ikatan hidrogen). Pada proses ini digunakan penambahan TFA yang berfungsi sebagai buffer pada saat menggunakan pelarut asetonitril: air. TFA akan memprotonasi gugus silan, sehingga dapat menekan potensi terbentuknya ikatan hidrogen yang akan membuat hasil kromatogram tidak melebar dan berekor [14]. detektor yang digunakan adalah PDA, karena detektor PDA dapat meningkatkan kemampuan deteksi secara langsung, akumulasi spectrum zat terlarut lengkap sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi puncak-puncak khusus berdasarkan karakteristiknya, selain itu juga dapat digunakan untuk menilai kemurnian dari puncak yang didapat. Deteksi pada analisis ini yaitu pada panjang gelombang 210 dan 240, hal ini karena menurut [18], pada panjang gelombang 210 sampai 254 merupakan panjang gelombang yang spesifik untuk ikatan peptida. Hasil dari analisis menggunakan RP-HPLC yang pertama menunjukkan bahwa senyawa tetrapeptida SLYA belum murni karena masih banyak gugus pelindung rantai samping yang belum terlepas yang ditunjukkan pada puncak-puncak minor. Hal ini dapat disebabkan karena kurang lamanya

waktu ketika proses pemutusan resin dari tetrapeptida, maka proses pelepasan resin dari tetrapeptida dilakukan ulang dengan menggunakan TFA 95 % dalam aquadest, namun dari hasil pengulangan tersebut masih menunjukkan senyawa tetrapeptida yang belum murni tetapi bukan disebabkan oleh pengotor/senyawa lain, tetapi hal ini disebabkan karena gugus pelindung rantai samping masih terikat yang artinya asam amino masih mengandung gugus rantai samping.



Gambar 2. Hasil RP-HPLC tetrapeptida SLYA

Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian antioksidan pada tetrapeptida SLYA dilakukan menggunakan metode peredaman DPPH, metode ini merupakan metode yang umum digunakan untuk uji aktivitas antioksidan. Metode peredaman DPPH merupakan metode yang mudah dan cepat untuk mengevaluasi senyawa antioksidan secara spektrofotometri, selain itu metode ini merupakan metode yang sensitif dan sederhana [13]. Dimana prinsip kerja dari metode peredaman DPPH ini adalah adanya atom hidrogen dari senyawa antioksidan yang berikatan dengan elektron bebas pada senyawa radikal sehingga menyebabkan perubahan dari radikal bebas (diphenylpicrylhydrazyl) menjadi senyawa non-radikal (diphenylpicrylhydrazine) [13].

Pengujian aktivitas antioksidan ini dibuat dalam 14500 ppm, dengan menggunakan konsentrasi yang bervariasi yaitu konsentrasi 0 ppm; 2300 ppm; 4600 ppm; 6900 ppm; 9200 ppm; dan 11500 ppm. Hasil yang diperoleh dari uji aktivitas antioksidan pada tetrapeptida SLYA, hanya didapatkan IC₅₀ adalah 11130,04 µg/mL. Dari hasil tersebut dapat dikatakan bahwa senyawa SLYA memiliki aktivitas antioksidan yang lemah, karena menurut [19], tingkat kekuatan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan terhadap DPPH yaitu dikatakan aktivitasnya lemah jika nilai IC₅₀ >150 µg/mL.

D. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini sintesis tetrapeptida Ser-Leu-Tyr-Ala telah berhasil dilakukan dengan menggunakan metode Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS). Hasil karakterisasi menggunakan spektrofotometer telah menunjukkan adanya puncak ion molekul [M+H] pada m/z 453,23 dan [2M+H] 905,49. Hasil dari analisis RP- HPLC senyawa tetrapeptida SLYA memiliki waktu retensi pada menit ke 9. Hasil yang diperoleh dari uji aktivitas antioksidan pada tetrapeptida SLYA, hanya didapatkan IC₅₀ adalah 11130,04 µg/mL sehingga dapat dikatakan bahwa senyawa tetrapeptida SLYA memiliki aktivitas antioksidan yang masih lemah.

Daftar Pustaka

- [1] S. W. Isnindar, S. Wahyuono, and E. P. Setyowati, "Isolasi dan identifikasi senyawa antioksidan daun kesemek (diospyros kaki Thunb.) dengan metode DPPH (2,2-Difenil-1 Pikrilhidrazil)," *Maj. Obat Tradis.*, vol. 16, no. 3, pp. 157–164, 2011.
- [2] Eka Nurjanah and Nety Kurniaty, "Sintesis Tetrapeptida Linear Phe-Leu-Ala-Pro (FLAP) sebagai Kandidat Antioksidan dengan Metode Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS)," *J. Ris. Farm.*, vol. 1, no. 2, pp. 89–96, Dec. 2021, doi: 10.29313/jrf.v1i2.452.

- [3] S. N. Meydani, D. Wu, M. Santos, S., and M. G. Hayek, "Antioxidant Andimmune Response In Age Persons. 'The American Journal Of Clinical nutrition,'" *J. Clin. Nutr.*, vol. 62, no. 6, pp. 1462S-1476S, 1995.
- [4] A. B. Utomo, A. Suprijono, and A. Risdianto, "Uji aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak sarang semut (*Myrmecodia pendans*) dan ekstrak teh hitam (*Camellia sinensis* O.K.var.assamica (mast.)) dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)".
- [5] O. Juniarti and Y. D., "Kandungan senyawa kimia, uji toksisitas (Brine shrimp lethality test) dan antioksidan (1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazil) dari ekstrak daun saga (*Abrus precatorius* L.). Makara Sains," *Makara Sains*, vol. 13, no. 1, pp. 50–54, 2009.
- [6] M. Sadikin, "Pelacakan Dampak Radikal Bebas terhadap Makromolekul. Kumpulan Makalah Pelatihan: Radikal Bebas dan Antioksidan dalam Kesehatan.," *Fak. Kedokt. UI. Jakarta.*, 2001.
- [7] M. A. Hidayat, U. Umiah, and E. U. Ulfa, "Uji aktivitas antioksidan ekstrak air dan ekstrak metanol beberapa varian buah kenit (Chrysophyllum cainito L.) dari daerah Jember," *J. Biol. Res.*, vol. 13, no. 1, pp. 45–50, 2007, doi: 10.23869/322.
- [8] L. Gu *et al.*, "Chemical and cellular antioxidant activity of two novel peptides designed based on glutathione structure," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 50, no. 11, pp. 4085–4091, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.028>.
- [9] A. I. Saiga, S. Tanabe, and T. Nishimura, "Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 12, pp. 3661–3667, 2003, doi: <https://doi.org/10.1021/jf021156g>.
- [10] R. J. Fessenden and J. S. Fessenden, *Kimia Organik. Edisi Ketiga. Jilid 2*, 2nd ed. Jakarta: Erlangga, 1986.
- [11] V. A. Sanchez A, "Bioactive peptides: A review," *Food Qual Saf*, vol. 1, pp. 29–46, 2017.
- [12] W. H. A. Alami and R. Bebas, *Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius, 2007.
- [13] P. Molyneux, "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity," *Songklanakarinn J. sci. technol*, vol. 26, no. 2, pp. 211–219, 2004.
- [14] W. C. W. P. D. Chan and P. (Eds. . White, "Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach," *OUP Oxford*, vol. 222, no. 1–3, pp. 11–72, 1999.
- [15] S. N and H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*. Jerman: WileyVCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 2002.
- [16] R. Maharani and E. F. Yanti, "Sintesis heptapeptida linear (H-TYR-ASP-PRO-ALA-PRO-PRO-PRO-OH) dengan menggunakan DIC/OKSIMA sebagai reagen pengkoplingan," *Al-Kimia*, vol. 4, no. 1, pp. 1–12, 2016, doi: <https://doi.org/10.24252/al-kimia.v4i1.1449>.
- [17] E. Valeur and M. Bradley, "Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 2, pp. 606–631, 2009, doi: <https://doi.org/10.1039/B701677H>.
- [18] A. Jzn, J. F., Braat and J. A. Duine, "Assessment of protein purity by chromatography and multiwavelength detection," *Anal. Biochem.*, vol. 162, no. 1, pp. 65–73, 1987, doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90010-8).
- [19] M. M. Armala, *Daya antioksidan fraksi air ekstrak herba kenikir (Cosmos caudatus HBK) dan Profil KLT*. 2009.