

Sintesis Senyawa Heksapeptida Siklik Analog *Pipicolisporin* (Phe- β -Ala-Trp-Pip-Arg-Pro) Sebagai Kandidat Antimalari dengan Metode Kombinasi Fase Padat dan Fase Larutan

Siti Nurhalizah *

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

* sitinurhalizah11200@gmail.com

Abstract. Malaria is a parasitic disease that is still a major health problem in the world, especially in tropical and sub-tropical countries. Malaria is a health disorder that occurs when red blood cells (erythrocytes) are infected with a protozoan parasite of the genus *Plasmodium* which is inoculated into the host through the bite of female Anopheles mosquito. Based of previously study, one of the natural antioxidant peptides is cyclic hexapeptide (Phe- β -ala-Trp-Pip-Arg-Pro), which was isolated from fungus *Nigrospora oryzae* which has antimalarial activity. In this study, a cyclic hezapeptide analogue of pipicolisporin (Phe- β -ala-Trp-Pip-Arg-Pro) has been successfully synthesized using the combination methods of solid phase and liquid phase with strategy by using a protective group Fmoc, 2-chlorotriyl chloride resin as a buffer and coupling reagents including HATU, HOAt, and DIPEA. Cyclic hezapeptide analogue of pipicolisporin (Phe- β -ala-Trp-Pip-Arg-Pro) compound has been formed which is characterized by mass spectrophotometer with an m/z value of 794,18. The result of the RP-HPLC analysis showed that the cyclic hezapeptide analogue of pipicolisporin (Phe- β -ala-Trp-Pip-Arg-Pro) compound was not pure because there were still minor peaks.

Keywords: *Cyclic Hexapeptide, Antimalaria, Combination Method Of Solid Phase and Liquid Phase.*

Abstrak. Malaria merupakan salah satu penyakit parasit yang masih menjadi persoalan kesehatan yang utama di dunia terutama di Negara tropis dan sub tropis. Malaria merupakan suatu gangguan kesehatan yang terjadi pada saat sel darah merah (eritrosit) terinfeksi parasit protozoa dari genus *Plasmodium* yang diinokulasikan ke inang melalui gigitan nyamuk Anopheles betina. Salah satu peptida antimalaria alami yang ditemukan pada penelitian sebelumnya adalah heksapeptida siklik (Pro-Leu-Pip-Trp- β -ala-Iso) yang diisolasi dari jamur *Nigrospora oryzae* yang memiliki aktivitas antimalaria. Pada penelitian ini heksapeptida siklik analog *pipicolisporin* (Phe- β -ala-Trp-Pip-Arg-Pro) telah berhasil disintesis menggunakan metode kombinasi fase padat dan fase larutan dengan strategi pemakaian gugus pelindung Fmoc, penyangga yaitu resin 2-klorotril klorida dan reagen pengkopking diantaranya HATU, HOAt, dan DIPEA. Senyawa heksapeptida siklik analog *pipicolisporin* (Phe- β -ala-Trp-Pip-Arg-Pro) telah terbentuk dengan ditandai dengan hasil karakterisasi menggunakan spektrometer massa dengan nilai m/z 794,18. Pada hasil analisis RP-HPLC menunjukkan bahwa senyawa heksapeptida siklik analog *pipicolisporin* (Phe- β -ala-Trp-Pip-Arg-Pro) belum murni karena masih adanya puncak-puncak minor.

Kata Kunci: *Heksapeptida siklik, Antimalaria, Kombinasi fase padat dan fase larutan*

A. Pendahuluan

Malaria merupakan salah satu penyakit parasit yang masih menjadi persoalan kesehatan yang utama di dunia terutama di Negara tropis dan sub tropis. Malaria merupakan suatu gangguan kesehatan yang terjadi pada saat sel darah merah (eritrosit) terinfeksi parasit protozoa dari genus *Plasmodium* yang diinokulasikan ke inang melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina (WHO, 2019).

Penelitian mengenai pengembangan obat antimalaria telah banyak dilakukan selama puluhan tahun kebelakang guna mendapatkan obat antimalaria yang lebih efektif dan efisien. Hal ini diperlukan karena telah terjadi resistensi *Plasmodium vivax* terhadap klorokuin di Indonesia, Papua dan Papua Nugini, dan didapat data bahwa *Plasmodium falciparum* dapat berevolusi lebih cepat dibandingkan *Plasmodium vivax* (Nondo, et. al., 2017; Ratcliff, et. al., 2007). Oleh karena itu, diperlukan pengembangan obat antimalaria baru sebagai alternatif obat malaria

Salah satu penelitian mengenai kelompok peptida antimalaria dilaporkan oleh Fernandes-Pastor, et.al. (2021) baru-baru ini telah ditemukan senyawa heksapeptida siklik pipecolisporin yang diisolasi dari jamur *Nigrospora oryzae* dari akar *Triticum Sp.* yang terbukti memiliki aktivitas antimalaria yang cukup tinggi terhadap *Plasmodium falciparum* yaitu 3,21 μM dan *Trypanosoma cruzi* yaitu 8,46 μM .

Hingga saat ini belum diketahui adanya laporan sintesis senyawa pipecolisporin yang memiliki aktivitas antimalaria tersebut selain dari senyawa yang diisolasi dari jamur *Nigrospora oryzae* dari akar tumbuhan *Triticum Sp.* Oleh karena itu, sintesis senyawa tersebut sangat menarik untuk dilakukan sekaligus juga untuk mencari library 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. Peptida siklik diketahui memiliki aktivitas biologis yang sangat beragam, memiliki afinitas ikatan yang lebih baik karena enzim protease di dalam tubuh lebih lambat memutus ikatan amida dalam bentuk siklik. Selain itu peptida siklik juga efektif saat masuk ke membran sel dan stabil didalam sel serta resisten terhadap degradasi proteolitik. Peptida siklik dapat bertahan selama di dalam sistem pencernaan manusia hingga mencapai sasaran dan cenderung lebih aktif dibandingkan peptida linear (Craik, 2013).

Sintesis peptida umumnya dilakukan pada fasa larutan yang melibatkan reaksi proteksi dan deproteksi gugus pelindung serta tahapan pemurnian sehingga waktu sintesis lebih lama dan menyebabkan hasil rendemen yang didapat cenderung rendah (Llobet *et al.*, 2019). Sintesis peptida mulai berkembang ketika Merrifield menemukan metode sintesis peptida fasa padat (Molica *et al.*, 20130). Sintesis peptida fasa padat dapat dilakukan dalam waktu yang lebih cepat dengan reagen yang lebih sedikit dan proses pemurniannya dapat dilakukan hanya pada tahap akhir (Maharani, 2018). Beberapa penelitian lain menyatakan bahwa peptida siklik juga dapat disintesis menggunakan kombinasi metode fasa padat dan fasa larutan. Metode fasa padat digunakan untuk mensintesis peptida linear, sedangkan fasa larutan digunakan pada tahap siklisasi peptida. Kombinasi kedua metode ini juga akan digunakan pada studi sintesis pipecolisporin ini dan juga akan dikembangkan strategi sintesis heksapeptida linear meliputi pemilihan resin, pemakaian reagen, penentuan waktu kopling, deproteksi, pemutusan resin serta strategi siklisasi yang mengarah pada kesuksesan sintesis heksapeptida siklik pipecolisporin ini untuk mendapatkan rendemen yang baik.

Pemilihan analog pipecolisporin didasarkan pada pendekatan terhadap kelompok antimicrobial peptide (AMP). AMP merupakan oligopeptida alami yang tersusun atas asam amino dengan spektrum antibiotik yang luas serta berpotensi sebagai agen terapeutik baru (Ambrosio *et al.*, 2020), termasuk juga didalamnya adalah peptida antiparasit yang berspektrum luas dan memiliki selektivitas tinggi, toksisitas rendah dan tingkat resistensi yang rendah (Torres *et al.*, 2018). Hingga saat ini telah ditemukan lebih dari 5000 AMP yang diantaranya merupakan antiparasit dengan variasi residu dan variasi urutan asam amino. Salah satu senyawa antimalaria yang termasuk dalam golongan AMP yang sudah diproduksi adalah magainin II (Bahar & Ren, 2013).

Berdasarkan latar belakang, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah apakah heksapeptida Phe- β -ala-Trp-Pip-Arg-Pro bisa disintesis dengan metode kombinasi fase padat dan fase larutan. Tujuan pada penelitian ini yaitu, untuk mensintesis senyawa heksapeptida Phe- β -ala-Trp-Pip-Arg-Pro dengan metode kombinasi fase padat dan fase larutan dengan dideteksi oleh instrument HPLC. Pada penelitian ini memiliki manfaat yaitu untuk menambah ilmu pengetahuan mengenai pengembangan metode sintesis heksapeptida siklik.

B. Metodologi Penelitian

Penelitian sintesis heksapeptida siklik dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjajaran, Bandung. Pada penelitian ini akan menggunakan asam amino dengan urutan Fmoc-Phe-OH, Fmoc- β -ala -OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Pip-OH, Fmoc-Arg-OH, dan Fmoc-Pro-OH. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS) yang memiliki beberapa tahapan operasional yaitu pengkondisian tabung reaksi, pengembangan resin, kemudian pengikatan asam amino pertama ke resin dengan buffer fase padat, kemudian akan dilakukan *loading* resin, dan setelah itu akan dilakukan *capping* resin yang bertujuan untuk menutup gugus aktif resin.

Selanjutnya akan dilakukan pengkoplingan asam amino pada ujung C pertama pada resin tujuannya yaitu untuk menyangga fase padat. Setelah itu dilakukan uji kloranil yang bertujuan untuk mengetahui keberhasilan proses kopling yang ditandai dengan perubahan warna. Kemudian setelah itu akan dilakukan proses *capping* resin, tujuannya adalah untuk menutupi gugus aktif pada resin agar tidak berikatan dengan asam amino yang lain.

Setelah itu dilakukan pelepasan gugus Fmoc, tujuannya yaitu untuk menyediakan sisi aktif dari asam amino sehingga nanti asam amino akan mengikat dengan asam amino yang lain. Proses pelepasan gugus Fmoc dapat dilakukan dengan melakukan uji kloranil yang akan ditandai dengan perubahan warna pada butiran resin.

Pada proses pengkoplingan asam amino lainnya dilakukan prosedur yang sama dan uji kloranil untuk asam amino Fmoc-Phe-OH, Fmoc- β -ala -OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Pip-OH, Fmoc-Arg-OH, dan Fmoc-Pro-OH hingga dihasilkan heksapeptida.

Setelah terbentuk fragmen heksapeptida yang diinginkan, selanjutnya dilakukan pelepasan heksapeptida dari resin. Kemudian setelah dilepaskan, dilakukan proses pemekatan dan pengeringan dengan *rotary evaporator* yang bertujuan untuk menghilangkan pelarut yang terikat pada heksapeptida, setelah itu dilakukan akan didinginkan dalam desikator.

Kemudian dilakukan proses karakteristik menggunakan spektrometer massa bertujuan untuk mengidentifikasi dan memastikan apakah senyawa heksapeptida hasil sintesis sudah terbentuk, yaitu dengan melihat nilai m/z. Setelah itu dilakukan uji kemurnian dengan RP-HPLC (*Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*) dan spektrometer massa yang bertujuan untuk memastikan kemurnian dari senyawa dengan melihat waktu retensi puncak pada senyawa, selain itu dapat melihat kemurnian puncak yang dilihat pada kromatogram.

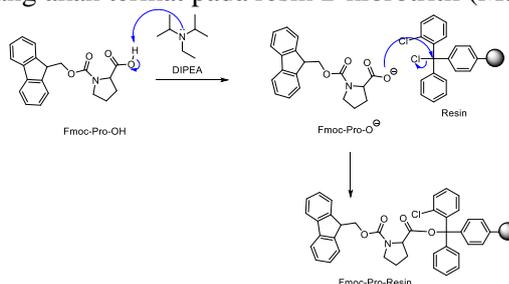
C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Pengkoplingan Asam Amino

Heksapeptida linier dengan urutan (Phe- β -ala-Trp-Pip-Arg-Pro) disintesis melalui metode sintesis fase padat, dengan prolin sebagai C-terminal dan Phenilalanin sebagai N-terminal. Dilakukan pengkondisian tabung reaktor menggunakan larutan DCM, untuk memastikan tabung reaktor yang dipakai sudah terbebas dari pengotor yang dapat mempengaruhi hasil sintesis (Pratiwi *et al.*, 2021). Setelah itu dilakukan pengembangan resin 2-klorotritil klorida menggunakan DCM dengan tujuan untuk membuka sisi aktif resin dan dapat berikatan dengan gugus karboksil atau ujung C pada asam amino pertama (Chan and White, 2000).

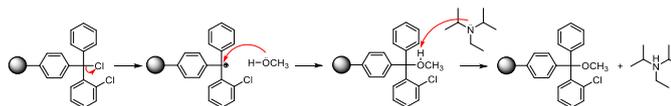
Selanjutnya dilakukan sintesis asam amino pertama yaitu prolin. Prolin yang digunakan telah dilindungi oleh gugus samping yaitu Fmoc. Ditimbang asam amino prolin sesuai perhitungan, kemudian dimasukkan ke dalam vial dan ditambahkan DCM serta DIPEA. Terjadi reaksi asam basa dan membentuk nukleofil. Terbentuknya nukleofil akan

mensubstitusi atom klorida yang akan terikat pada resin 2-klorotritil (Maharani, 2019).



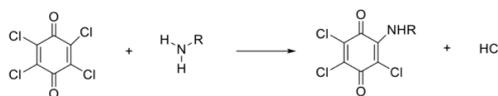
Reaksi pengikatan asam amino pertama (Fmoc Pro-OH) dengan resin 2-klorotritil klorida
Sumber: (Chan and White, 2000)

Selanjutnya dilakukan perhitungan *Loading Resin* untuk mengetahui berapa banyak asam amino pertama dengan cara mereaksikan 0,5 mg dengan piperidin 20% sebanyak 1 mL dalam DMF sebanyak 4 mL. Selanjutnya diabsorbansi pada panjang gelombang 290 nm yang merupakan serapan dari dibenzofulvena (DBF) menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai *Loading Resin* yang diperoleh yaitu 0,17 mmol/mg. Pada hasil tersebut dapat dibuktikan bahwa asam amino yang terikat belum maksimal. Selanjutnya dilakukan *capping resin* dengan cara mereaksikan campuran methanol:DCM:DIPEA (1,5:8:0,5) dengan tujuan untuk menghindari terbentuknya produk samping antara N-terminal dengan gugus Fmoc yang sudah terlepas.



Mekanisme *Capping Resin*
Sumber: (Chan and White, 2000)

Setelah itu dilakukan deproteksi gugus Fmoc dengan tujuan untuk menutup sisi aktif (-NH/NH₂) pada asam amino agar dapat bereaksi dengan gugus (-COOH) asam amino selanjutnya. Digunakan larutan piperidin 20% dalam DMF 8 mL dan dilakukan secara duplo. Dipilihnya piperidin karena piperidin memiliki sifat basa yang akan membentuk intermediet aromatik siklopetanadiena yang akan membentuk senyawa dibenzosulvena dan karbondioksida yang akan menghasilkan gugus amino bebas (Chan & White, 2000). Kemudian dilakukan uji kloranil dengan tujuan untuk memastikan keberadaan keberhasilan proses kopling dan proses deproteksi dengan menggunakan pelarut asetildehida dan pelarut kloranil. Dimana kedua pelarut tersebut akan berikatan dengan -NH₂ bebas. Keberhasilan uji kloranil dilihat dengan perubahan warna pada butir resin menjadi warna hitam.



Mekanisme uji kloranil
Sumber: (Jensen *et al.*, 2013)

Penyusunan Heksapeptida Linear

Dilakukan dengan cara melarutkan asam amino kedua dengan pelarut DIPEA dan DMF serta ditambahkan reagen kopling HATU dan HOAt. Dipilihnya reagen HATU karena memiliki performa yang baik dan dapat bereaksi dengan gugus karboksil pada asam amino yang akan membentuk ester aktif, serta dipilihnya reagen HOAt karena merupakan reagen aditif yang diketahui dapat mempercepat dan mempermudah reaksi kopling serta meminimalisir terjadi epimerisasi (Valeur & Bradley, 2008). Campuran reaksi tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaktor SPPS kemudian diputar dalam kurun waktu 24 jam (*overnight*). Setelah itu dilakukan pengeringan menggunakan DCM dan DMF masing-masing dilakukan secara duplo. Selanjutnya dilakukan monitoring dengan cara uji kloranil. Hasil uji kloranil pada pengkoplingan asam amino kedua ini menunjukkan butir resin tidak berubah

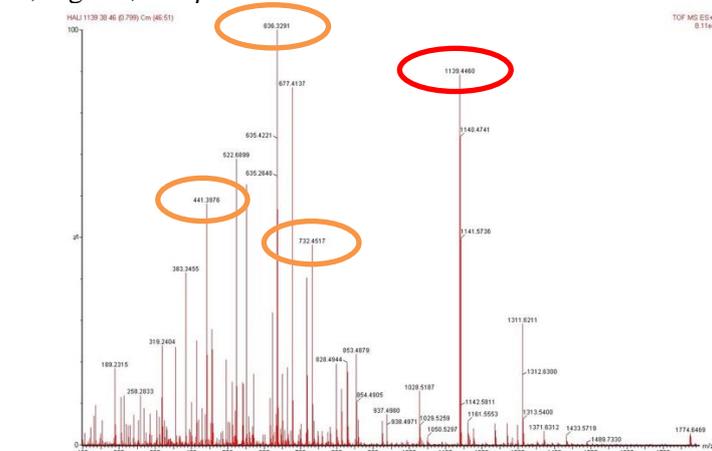
warna karena masih terdapat gugus pelindung (Fmoc) yang membuat gugus amina ($-\text{NH}_2$) belum bebas sehingga asam amino tidak dapat berikatan dengan larutan kloranil dan uji kloranil tersebut dinyatakan telah berhasil. Kemudian dilakukan deproteksi gugus Fmoc menggunakan piperidin 20% dalam DMF 10 mL yang nantinya akan dimasukkan ke dalam tabung reaktor SPPS dan dilakukan secara duplo (2x5 menit), dengan tujuan agar gugus pelindung dapat lepas dari asam amino. Selanjutnya dilakukan moniroting kembali dengan uji kloranil, apabila warna resin berubah maka tahap deproteksi telah berhasil dilakukan dan dilanjutkan pengkoplingan asam amino selanjutnya hingga terbentuk heksapeptida linier.

Pemutusan Resin

Setelah terbentuknya heksapeptida linier. Selanjutnya dilakukan pelepasan resin (*cleavage*) dengan menggunakan TFA 20% dalam DCM, dilakukan secara duplo (2x1 jam). Dipilihnya TFA karena memiliki sifat asam dan resin 2-klorotritil klorida memiliki sifat labil terhadap basa. Pada reaksi ini digunakan bantuan pelarut yaitu air sebagai *scavenger* karbokation yang terbentuk setelah pelepasan peptida dari resin (Sumiarsa *et al.*, 2019). Dihasilkan filtrat pada proses *cleavage* ini yang akan dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan bantuan pelarut DCM, asetaldehid, dan n-heksan untuk menghilangkan bau asam. Hasil filtrat yang sudah dipekatkan selanjutnya dimasukkan ke dalam deksikator. Krud heksapeptida yang dihasilkan sebesar 24,5 mg dimana hasil krud tersebut masih sedikit, dikarenakan terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi hasil krud tersebut diantaranya pada saat pengambilan butir resin pada uji kloranil terlalu banyak, selain itu pada saat proses *cleavage* masih belum maksimal sehingga senyawa peptida belum terlepas secara maksimal.

Karakterisasi Menggunakan Spektrometer Massa

Dilakukan karakterisasi heksapeptida linear dengan bantuan alat spektrometer massa yang bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa hasil sintesis berupa heksapeptida linear dengan mengetahui nilai m/z. alat yang digunakan yaitu *Mass Spectrofotometer* HR TOF-MS. Prinsip dari spektrometer massa yaitu suatu zat uji menghasilkan berkas ion yang dimana ion tersebut akan diubah menjadi spektrum yang sesuai dengan perbandingan massa terhadap muatan. Pada penelitian ini hasil spektrometer massa menunjukkan adanya puncak ion molekul [M] 1139,4460 dan memiliki rumus molekul $\text{C}_{58}\text{H}_{78}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{S}$ nilai tersebut menunjukkan bobot molekul dari senyawa yang dianalisis. Hasil tersebut dapat dilihat hasil simulasi menggunakan *chemdraw* dan didapat bobot molekul senyawa heksapeptida linear sebesar 1139,38. Maka dapat disimpulkan bahwa sintesis dengan metode SPPS menggunakan strategi Fmoc, dengan bantuan reagen kopling HATU, resin 2-klorotritil klorida, dan larutan TFA untuk heksapeptida dengan urutan Phe- β -ala-Trp-Pip-Arg-Pro telah berhasil dilakukan. Akan tetapi masih terdapat 3 produk delesi dari residu yaitu terjadinya pembentukan puncak ion molekul triptofan, arginin, dan β -alanin.



Spektrogram senyawa heksapeptida linier menggunakan spektrometer massa

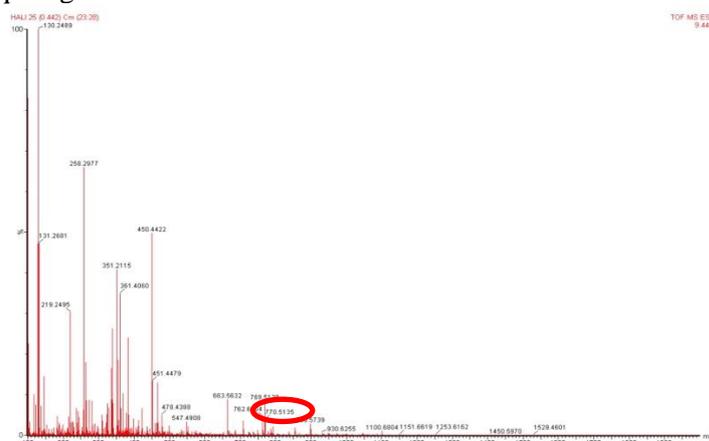
Pemurnian Heksapeptida Linear Menggunakan RP-HPLC

Peptida linier dimurnikan dengan RP-HPLC semi-preparatif (C-18). Fase gerak yang digunakan yaitu asetonitril:air selama 40 menit dengan lajut air 2 mL/menit. Hasil pemurnian

linear analisis dengan RP-HPLC analitik (C-18) detektor PDA. Prinsip dari HPLC ini yaitu didasarkan pada absorpsi komponen-komponen campuran dengan afinitas berbeda terhadap permukaan fase diam. Yang membedakan HPLC dan RP-HPLC ini yaitu sifat dari fase diam dan gerakannya, dimana pada RP-HPLC ini fase gerak yang digunakan bersifat polar dan fase diam yang digunakan bersifat non polar.

Siklisasi Heksapeptida

Siklisasi heksapeptida linier dilakukan dengan metode fase larutan, metode siklisasi antara Phe-milalanin (C-terminal) dan Prolin (N-terminal) dilakukan menggunakan reagen HATU, DIPEA dalam campuran pelarut DCM. Reaksi siklisasi ini dioptimalkan dengan mengatur konsentrasi larutan encer untuk meminimalisir terbentuknya oligomer peptida. Proses siklisasi ini dilakukan dengan cara menambahkan reagen HOAt dan dilakukan pada suhu ruang selama 3x24 jam karena peptida yang digunakan memiliki tingkat kesulitan yang tinggi. Setelah heksapeptida siklik terbentuk, selanjutnya dilakukan proses pelepasan gugus samping yaitu Boc dan Pbf menggunakan campuran pelarut TFA dan air. Pada proses pelepasan gugus samping ini terjadi perubahan warna dari orange menjadi ungu kecoklatan karena gugus samping Boc dan Pbf telah berhasil lepas (Chan and White, 2000). Setelah itu dilakukan pemekatan kembali dengan *rotary evaporator* serta dilakukan karakterisasi menggunakan spektrometer massa. Pada penelitian ini hasil spektrometer massa heksapeptida siklik menunjukkan adanya puncak ion pada m/z 770,5135, nilai tersebut menunjukkan bobot molekul dari senyawa yang dianalisis telah dikurangi bobot molekul gugus samping yaitu Boc dan Pbf serta bobot molekul air. Hal tersebut dilihat dari hasil simulasi menggunakan *chemdraw* dan didapat bobot molekul senyawa heksapeptida siklik sebesar 794,18. Maka dapat disimpulkan bahwa sintesis dengan metode SPPS menggunakan strategi Fmoc, dengan bantuan reagen kopling HATU, resin 2-klorotritil klorida, dan larutan TFA untuk heksapeptida dengan urutan Phe- β -ala-Trp-Pip-Arg-Pro telah berhasil dilakukan.



Dapat diamati pada gambar spectrogram hasil siklisasi analog senyawa *pipecolisporin* ini masih tidak murni, sehingga tidak bisa dilakukan uji aktivitas antimalaria.

D. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa heksapeptida linear Phe- β -ala-Trp-Pip-Arg-Pro telah berhasil disintesis dengan menggunakan metode *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS) yang diketahui memiliki hasil karakterisasi menggunakan spektrometer massa dengan puncak ion molekul [M] pada m/z 1139,38 untuk heksapeptida linear Phe- β -ala-Trp-Pip-Arg-Pro yang masih memiliki gugus pelindung samping dan puncak ion molekul pada m/z 794,18 untuk heksapeptida siklik Phe- β -ala-Trp-Pip-Arg-Pro tanpa gugus pelindung samping.

Acknowledge

Penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada Universitas Islam Bandung, Lab Sentral Universitas Padjajaran dan Keluarga serta rekan-rekan yang telah membantu penulis dalam penelitian tugas akhir ini.

Daftar Pustaka

- [1] Ambrosio, P.S., Tronnet, A., Verhaeghe, P., & Bonduelle, C. 2020. Synthetic polypeptide polymers as simplified analogues of antimicrobial peptides. *Biomacromolecules*. 22(1), 57-75
- [2] Bahar, A. & Ren, D. 2013. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*. 6. 1543-1575
- [3] Craik, D.J., Fairly, D. P., Liras, S., & Price, D. 2013. The future of peptide-based drugs. *Chem. Biol. Drug Des.* 81. 136-147
- [4] Chan, W. C. 2000. *Fmoc Solide Phase Peptide Synthesis A Practical Approach*. NewYork: Oxford University press.
- [5] Llobet, A.I., Kenworthy, M.N., Mukherjee, S., Kopach, M.E., Wegner, K., Gallou, F., Smith, A.G., & Roschangar, F. 2019. Sustainability challenges in peptide synthesis and purification: From R&D to production. *J. Org. Chem.* 84(8), 4615- 4628
- [6] Maharani, R. 2018. *Konstruksi Peptida Secara Kimia*. Bitread Publishing. Bandung.
- [7] Mollica, A., Pinnen, F., Azzura, S., & Costante, R. 2013. The evolution of peptide synthesis: From early days to small molecular machines. *Curr. Bioact.Comp.* 9(3), 1-19
- [8] Nondo, R. S. O., Moshi, M. J., Erasto, P., Masimna, P. J., MAchumi, F., Kidukuli, A. W., Heydenreich, M., & Zofou, D. 2017. *BMC Complementary Alternative Medicine*. 17. 167
- [9] Ratcliff, A., Siswanto, H., Kenangalem, E., Maristela, R., Wuwung, R. M., Laihad, F., Ebsworth, E.P., Anstey, N. M., Tjitra, E., & Price, R. N. 2007. Two fixed-dose artemisinin combinations for drug-resitant falciparum and vivax malaria in Papua, Indonesia: an open-label randomised comparison. www.thelancet.com. 369. 757-765
- [10] Torres, M.D.T., Sothiselvam, S., Lu, T.K., & Fuente-Nunez, C.d.l. 2019. Peptide design principles for antimicrobial applications. *J. Mol. Biol.* 431(18), 3547-3567
- [11] World Health Organization (WHO). 2019. *World Health Malaria Report 2019*.