

Sintesis Senyawa Heksapeptida Siklik Analog Pipecolisporin (Lys-Bala-Trp-Pip-Leu-Pro) dengan Metode Kombinasi Sintesis Fase Padat dan Fase Larutan sebagai Kandidat Antimalaria

Dita Pratiwi Utami*, Nety Kurniaty, Rani Maharani

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

*ditau77@gmail.com, nety.kurniaty@gmail.com, r.maharani@unpad.ac.id.

Abstract. Pipecolisporin compound with amino acid sequence Ile- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro isolated from the fungus *Nigrospora oryzae* on the roots of *Triticum Sp.* has activity as antimalarial against *Plasmodium falciparum* of 3.21 μ M. On this research, modifications were made by changing the N-Terminal of Pipecolisporin that Ile to Lys (Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro/Pipecolisporin analogue). Pipecolisporin analogue linear hexapeptide (Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro) succeeded synthesized by solid phase peptide synthesis (SPPS) using 2-chlorotrityl chloride resin, Fmoc and Boc protect, using coupling reagents HATU, HOAt, and DIPEA. The analogue was successfully cyclized using the solution phase method using the HATU, DIPEA reagent in DCM. This research has three stages, that is stages of synthesis, cyclization and characterization. At the synthesis stage, it produces a crude mass of 9.5 mg with characterization using a mass spectrometer, the fragment peak is obtained at m/z 925.7979. In the cyclization stage which is characterized by mass spectrometer the fragment peak was obtained at m/z 707.5267 [M+H]⁺.

Keywords: *Peptide, hexapeptide, cyclic, solid phase peptide synthesis (SPPS), solution phase, antimalarial.*

Abstrak. Senyawa Pipecolisporin dengan urutan asam amino Ile- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro yang diisolasi dari jamur *Nigrospora oryzae* pada akar tumbuhan *Triticum Sp.* Telah diketahui memiliki aktivitas sebagai antimalaria terhadap *Plasmodium Falciparum* sebesar 3,21 μ M. Pada penelitian ini dilakukan modifikasi dengan penggantian N-Terminal pada Pipecolisporin yaitu Ile ke Lys menjadi Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro (Analog Pipecolisporin). Senyawa heksapeptida linear analog pipecolisporin dengan urutan asam amino Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro telah berhasil disintesis menggunakan metode sintesis peptida fase padat dengan penyangga fase padat berupa resin 2-klorotritil klorida dan gugus pelindung Fmoc serta Boc, dengan menggunakan reagen pengkopling HATU, HOAt, dan DIPEA. Senyawa tersebut juga telah berhasil disiklikan menggunakan metode fase larutan dengan menggunakan reagen HATU, DIPEA dalam pelarut DCM. Adapun tahapan yang dilakukan pada penelitian ini terdiri dari tiga tahapan yaitu tahapan sintesis, siklisasi serta karakterisasi. Pada tahapan sintesis menghasilkan krud sebesar 9,5 mg dengan karakterisasi menggunakan spektrometer massa menghasilkan puncak fragmen pada m/z 925,7979. Kemudian pada tahap siklisasi yang kemudian dikarakterisasi menggunakan spektrometer massa menghasilkan puncak fragmen pada m/z 707,5267 [M+H]⁺.

Kata Kunci: *Peptida, heksapeptida, siklik, sintesis peptida fase padat, fase larutan, antimalaria.*

A. Pendahuluan

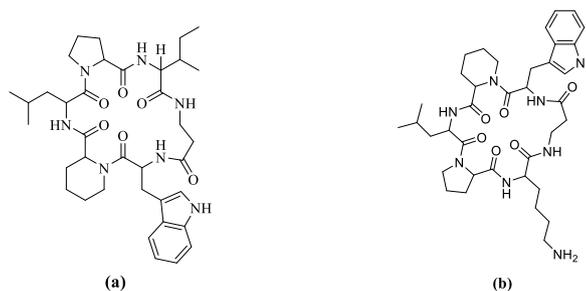
Peptida bioaktif telah banyak menarik perhatian para ilmiah karena potensinya untuk meningkatkan kesehatan dan mengurangi resiko penyakit dengan aktivitas antioksidan, antikanker dan antimikroba dengan selektivitas yang tinggi terhadap reseptor dan keamanan yang lebih baik mengingat degradasi peptida di dalam aliran darah akan menghasilkan asam amino yang relatif aman bagi tubuh [1]. Salah satu yang menjadi pusat perhatian para peneliti yaitu antimikrobia peptida (AMP) sebagai alternatif antimikroba yang sangat menjanjikan dan memiliki urutan yang hampir tidak terbatas dengan aktivitas spesifik terhadap mikroorganisme bakteri, jamur juga termasuk parasit. Salah satunya adalah pipecolisporin yang telah terbukti memiliki aktivitas antimalaria terhadap parasit dengan IC50 terukur sebesar 3,21 μM [2].

Malaria merupakan penyakit umum dan mengancam jiwa yang disebabkan oleh parasit yang ditularkan ke manusia melalui gigitan nyamuk *Anopheles betina* yang terinfeksi, malaria disebabkan oleh parasit protozoa *plasmodium* [3]. Obat malaria saat ini tidak memadai untuk pengendalian penyakit di masa depan karena adanya evolusi resistensi oleh parasit malaria, dengan demikian diperlukan antimalaria baru dengan mekanisme aksi obat baru (MAOB) [4;5;6;7]. Berdasarkan hal tersebut baik pipecolisporin maupun analognya dapat dijadikan alternatif sebagai antimalaria dimasa mendatang. Dengan demikian pada penelitian ini akan dilakukan sintesis heksapeptida siklik yang merupakan analog dari senyawa pipecolisporin dengan urutan asam amino Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro sebagai kandidat antimalaria. Adapun penggantian salah satu residu (analog pipecolisporin) ditujukan untuk memperoleh aktivitas antimalaria yang lebih baik berdasarkan amfipatisitas, kationik, dan hidrofobisitas. Asam amino pipecolisporin yang diganti adalah asam amino Ile menjadi Lys, dimana Lys merupakan residu penstabil heliks serta dapat meningkatkan kationisitas analog dan meningkatkan aktivitas antimikroba [8]. Sintesis heksapeptida siklik secara kimia ini dapat digunakan sebagai alternatif dari isolasi senyawa heksapeptida siklik (pipecolisporin) dari bahan alam, dimana terdapat beberapa keuntungan dari metode sintesis peptida ini yaitu waktu yang diperlukan pada metode ini lebih singkat daripada proses isolasi yang berasal dari bahan alam, kemudian bahan yang digunakan adalah lebih sedikit sehingga dapat dikatakan metode ini lebih ekonomis, efektif dan efisien baik digunakan dalam skala laboratorium maupun skala industri untuk memperoleh senyawa dengan aktivitas farmakologi yang sama atau lebih baik. Metode yang digunakan untuk mensintesis senyawa heksapeptida dengan urutan peptida (Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro) ini adalah metode kombinasi fasa padat dan fasa larutan. Metode SPPS ini dipilih karena reaksinya tidak memerlukan tahapan isolasi dan pemurnian pada setiap tahap sintesis, namun reaksinya berlangsung secara lambat dan untuk skala kecil. Kemudian pada proses siklisasi dilakukan dengan metode fasa larutan dengan reaksi yang lebih cepat dan dapat digunakan pada skala besar namun hasil reaksi memerlukan pemurnian [9;1].

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah apakah heksapeptida (Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro) dapat disintesis dengan menggunakan metode kombinasi fasa padat dan fasa larutan untuk menghasilkan produk sintesis yang optimal. Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mensintesis senyawa heksapeptida siklik menggunakan metode kombinasi fasa padat dengan fasa larutan. Kemudian manfaat yang diperoleh dari penelitian ini yaitu untuk menambah ilmu pengetahuan mengenai kandidat antimalaria serta pengembangan metode sintesis heksapeptida siklik yang memiliki aktivitas antimalaria.

B. Metodologi Penelitian

Penelitian sintesis senyawa heksapeptida siklik analog pipecolisporin (Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro) sebagai kandidat antimalaria ini dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran Bandung dengan menggunakan metode kombinasi yaitu metode fasa padat (SPPS) dan fasa larutan.



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

Adapun metode SPPS yang dilakukan terdiri dari beberapa tahapan yakni pengkondisian tabung reaktor dengan tujuan agar tabung reaktor bebas dari pengotor atau kontaminasi sehingga proses sintesis tidak terganggu dan hasil sintesis yang diperoleh optimum serta bebas dari kontaminan. Lalu dilakukan pengembangan resin dengan tujuan untuk membuka sisi aktif resin agar asam amino dapat dengan mudah masuk kedalam resin. Setelah itu, dilakukan pengikatan asam amino pertama pada resin sebagai penyangga fase padat yang kemudian dilakukan loading resin dengan tujuan untuk mengetahui jumlah asam amino yang selanjutnya akan ditambahkan.

Setelah itu, dilakukan penutupan gugus aktif resin (capping resin) agar tidak berikatan dengan asam amino lain, lalu dilakukan pelepasan gugus Fmoc dengan tujuan untuk menyediakan sisi aktif dari asam amino sehingga terjadi ikatan antar asam amino yang satu dengan yang lainnya. Setelah pelepasan gugus Fmoc, lalu dilakukan uji koranil untuk memastikan bahwa gugus Fmoc telah terlepas dari asam amino ditandai dengan hasil uji kloranil yaitu terjadinya perubahan warna pada butir resin. Kemudian dilakukan penyusunan fragmen peptida yang kemudian dilakukan pengujian kloranil kembali untuk memastikan adanya ikatan peptida antara asam amino yang ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna pada butir resin. Selanjutnya dilakukan pelepasan heksapeptida linear dari resin serta dilakukan pembentukan heksapeptida siklik, yang selanjutnya dipekatkan menggunakan rotary evaporator untuk menghilangkan pelarut yang digunakan untuk siklisasi. Hasil pemekatan selanjutnya dianalisis menggunakan spektrometri massa dengan melihat nilai m/z .

C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Pada penelitian ini telah dilakukan sintesis senyawa analog dari pipecolisporin dengan prinsip penggabungan dua atau lebih asam amino yang dihubungkan oleh ikatan peptida berdasarkan reaksi substitusi nukleofilik. Analog pipecolisporin linear (Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro) disintesis dengan menggunakan metode *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS), Perpanjangan rantai peptida dilakukan dari ujung-C ke ujung-N. Hal ini disebabkan perpanjangan dengan arah sebaliknya sangat rentan terhadap reaksi samping rasemisasi. Rasemisasi dapat menyebabkan perubahan konfigurasi absolut dari asam amino penyusun peptida [10].

Pengkoplingan dilakukan menggunakan strategi Fmoc dengan reagen pengkopling HATU/HOAt, DIPEA dan penyangga fase padat yaitu resin 2-klorotritil klorida (2-CTC) yang bersifat basa dan dapat melepaskan peptida pada kondisi asam lembut (1% TFA, TFE).

Pengkoplingan Asam Amino Pertama

Resin yang digunakan terlebih dahulu dikembangkan untuk membuka sisi aktif resin, pengembangan resin dapat dilakukan dalam pelarut dengan polaritas rendah hingga sedang seperti dalam DMF atau DCM, tetapi resin tidak dapat mengembang dengan baik dalam pelarut protik seperti alkohol atau air [11].

Pengkoplingan asam amino pertama (Fmoc-Pro-OH) dilakukan dengan reagen pengkopling berupa DIPEA dalam DCM dengan mekanisme reaksi substitusi nukleofilik. Setelah itu dilakukan loading resin untuk mengetahui seberapa banyak asam amino pertama yang terikat pada resin berdasarkan banyaknya gugus pelindung utama Fmoc yang

terdeproteksi dan membentuk senyawa DBF yang kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis. Nilai loading resin yang diperoleh adalah sebesar 0,27 mmol/g dan nilai loading resin dinyatakan baik jika berada pada rentang 0,2-1,2 mmol/g [10].

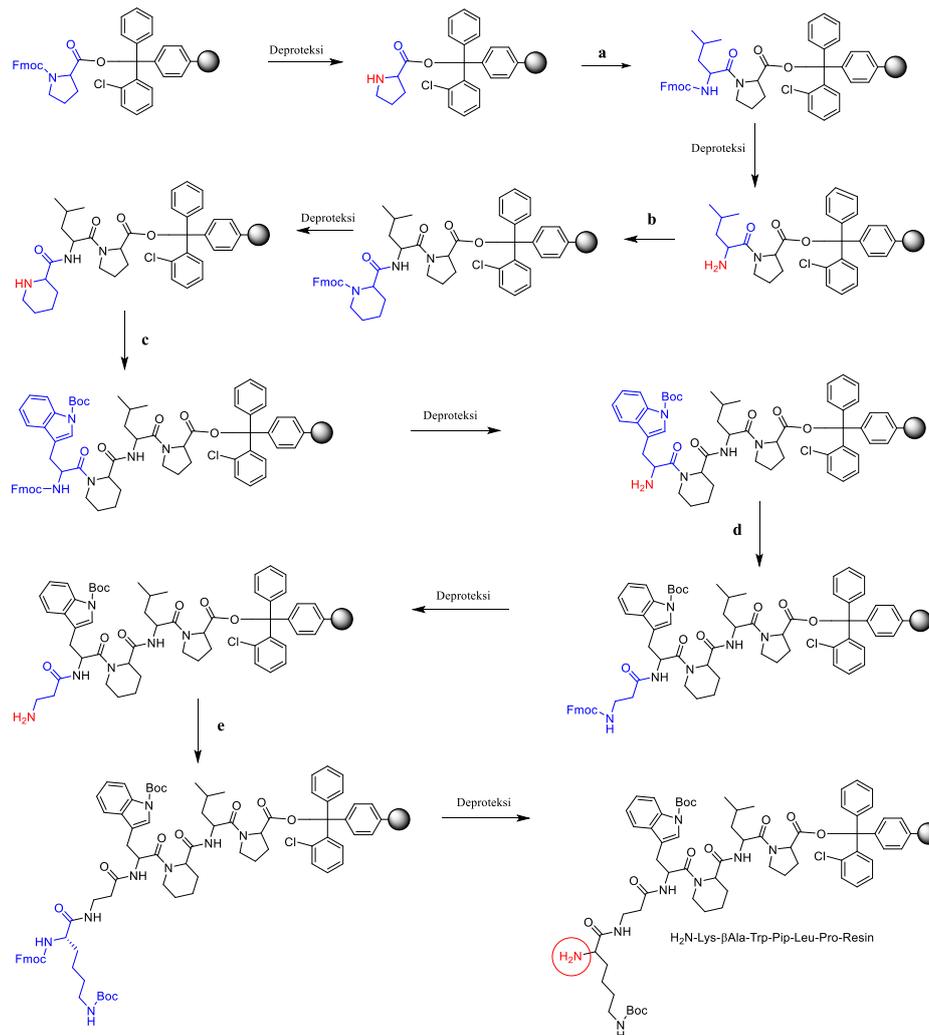
Setelah pengkoplingan asam amino pertama pada resin (Fmoc-Pro-OH) bagian resin yang tidak berikatan dengan asam amino pertama harus di-*Capping* dengan Metanol (MeOH): DIPEA: DCM, untuk memastikan pengkoplingan asam amino selanjutnya tidak mengikat sisi aktif resin dan hanya membentuk ikatan peptide dengan asam amino sebelumnya.

Sebelum dilakukan kopling asam amino ke-2 dan selanjutnya terlebih dahulu dilakukan deproteksi gugus pelindung Fmoc pada asam amino agar sisi aktif (-NH/NH₂) pada asam amino dapat bereaksi dengan (-COOH) asam amino selanjutnya. Proses deproteksi ini dilakukan pada setiap tahap pengkoplingan (sebelum pengkoplingan asam amino ke-2, ke-3, ke-4, ke-5, dan ke-6). Gugus pelindung Fmoc bersifat stabil dalam suasana asam tapi labil dalam suasana basa, sehingga deproteksi gugus Fmoc dilakukan dengan larutan basa piperidin 20% dalam DMF. Selanjutnya dilakukan monitoring dengan menggunakan uji kloranil pada butir resin yang telah di deproteksi dan dikeringkan hingga resin bisa diambil beberapa butir. Uji kloranil bertujuan untuk melihat keberhasilan proses kopling yang ditandai dengan tidak terjadinya perubahan warna pada resin dan keberhasilan proses deproteksi yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna resin menjadi warna merah hingga ungu kehitaman.

Penyusunan Asam Amino

Pengkoplingan asam amino ke-2 hingga ke-6 dilakukan dengan menggunakan reagen kopling HATU, HOAt, DIPEA 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 3 ekivalen asam amino yang besar untuk memperbesar konsentrasi asam amino yang akan dikopling. Jumlah HATU dan HOAt. yang ditambahkan sebanding dengan jumlah asam amino, yaitu 3 ek, agar satu mol asam amino diaktivasi dengan satu mol HATU dan HOAt [12].

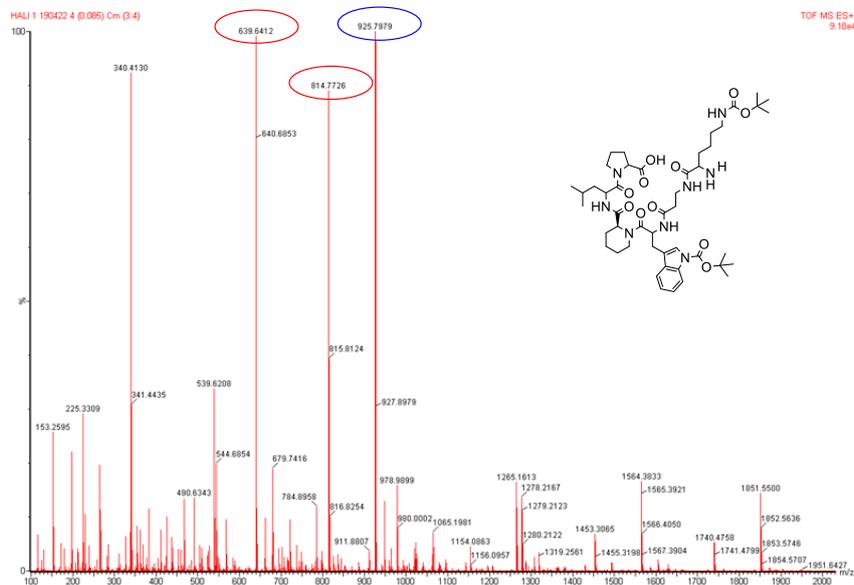
Adapun mekanisme pengkoplingan dengan reagen kopling HATU/HOAt dan DIPEA diawali dengan reaksi aktivasi yaitu pengikatan atom hidrogen asam pada gugus karboksil asam amino oleh basa DIPEA hingga terbentuk ion karboksil. Ion karboksil yang terbentuk (nukleofil) menyerang karbokation pada reagen kopling HATU menghasilkan senyawa garam karboksil uronium. Kemudian atom karbon pada gugus karbonil yang bermuatan parsial positif diserang oleh atom oksigen gugus benzotriazol pada reagen HOAt. Setelah itu, gugus uronium akan lepas sebagai gugus pergi, sehingga menghasilkan senyawa O-asil ester. Gugus amino pada asam amino dalam resin bertindak sebagai suatu nukleofil yang menyerang karbon karbonil yang bermuatan parsial positif pada senyawa O-asil ester, kemudian gugus benzotriazol akan lepas sebagai gugus pergi dan akan membentuk suatu ikatan peptida. Reaksi yang sama terjadi pada kopling asam amino ke-3 hingga ke-6 [12].



Gambar 2. skema sintesis peptida AA.2-AA.6. (a) Fmoc-Leu-OH, HATU, HOAt, DMF, DIPEA, 24 jam; (b) Fmoc-Pip-OH, HATU, HOAt, 4 mL DMF, DIPEA, 4 jam; (c) Fmoc-Trp(Boc)-OH, HATU, HOAt, 4 mL DMF, DIPEA, 24 jam; (d) Fmoc-βAla-OH, HATU, HOAt, 4 mL DMF, DIPEA, 4 jam; (e) Fmoc-Lys(Boc)-OH, HATU, HOAt, 4 mL DMF, DIPEA, 24 jam. Deproteksi (1,6 mL piperidin 20% dalam DMF ad 8 mL, 2 x 4 mL x 5 menit).

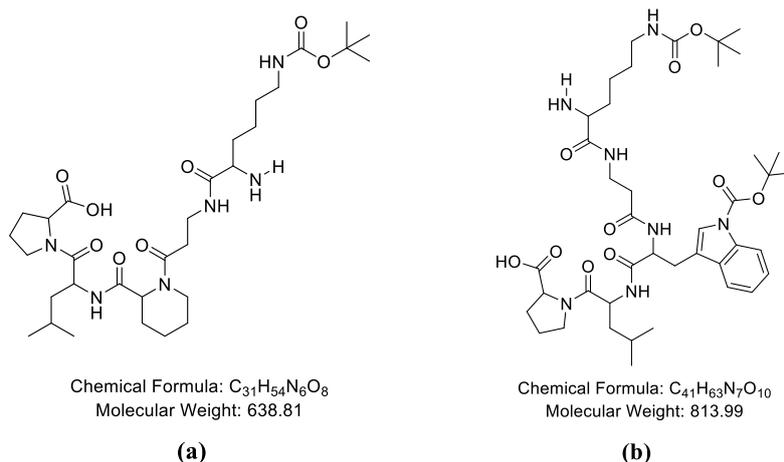
Setelah penyusunan rantai peptida selesai hingga membentuk heksapeptida yang masih terikat pada resin, selanjutnya dilakukan pemutusan heksapeptida Linear dari resin 2-klorotriptyl klorida dengan menggunakan larutan campuran TFE : Asam asetat glasial : DCM. Filtrat berwarna kuning bening ditampung dalam vial dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan bantuan penambahan DCM dan n-heksana kedalam filtrat yang akan dikeringkan hingga berbentuk serbuk. Crude heksapeptida linear yang dihasilkan sebesar 9,5 mg adalah kecil. Kemungkinan yang dapat menyebabkan hasil *crude* kecil adalah disebabkan oleh kurang optimalnya proses pemutusan heksapeptida linear dari resin sehingga perolehan filtrat yang tertampung hanya sedikit.

Karakterisasi heksapeptida linear



Gambar 3. Spektrum HR-TOF-MS senyawa heksapeptida linear ($C_{47}H_{72}N_8O_{11}$, m/z terhitung 925,7979)

Crude heksapeptida linear hasil sintesis selanjutnya dikarakterisasi menggunakan instrumen Mass Spectrometer untuk memastikan keberhasilan sintesis heksapeptida linear analog pipercolisporin (Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro). Heksapeptida linear (Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro) memiliki rumus molekul $C_{47}H_{72}N_8O_{11}$ sehingga seharusnya memiliki massa molekul sebesar 925,14. Pada hasil pengukuran terbukti terdapat puncak ion molekul dengan nilai $[M+H]^+$ sebesar 925,7979, dengan demikian heksapeptida linear analog pipercolisporin (Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro) telah berhasil disintesis dengan menggunakan metode SPPS.



Gambar 4. (a) pentapeptide (Lys- β Ala-Pip-Leu-Pro), (b) pentapeptida (Lys- β Ala-Trp-Leu-Pro)

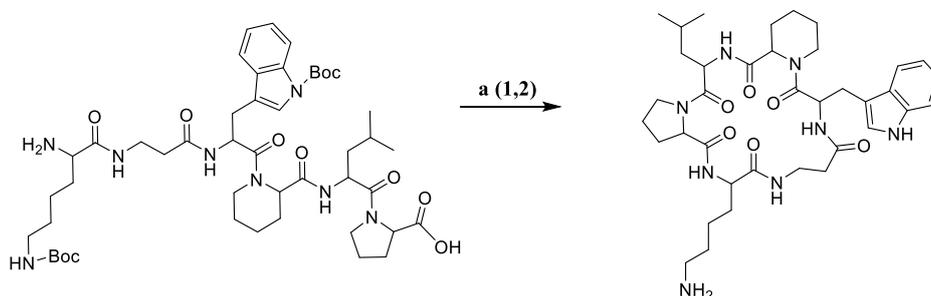
pada hasil pengukuran terdapat 2 puncak ion molekul dengan nilai 639,6412 yang diketahui merupakan puncak ion molekul $[M+H]^+$ untuk pentapeptida (Lys- β Ala-Pip-Leu-

Pro/tanpa Triptofan) yang memiliki massa molekul sebesar 638,81 g/mol. Kemudian puncak lainnya dengan nilai 814,99 7726 yang diketahui merupakan puncak ion molekul $[M+H]^+$ untuk pentapeptida (Lys- β Ala-Trp-Leu-Pro/tanpa Pipekolat) yang memiliki massa molekul sebesar 813,99 g/mol. Kedua pentapeptida tersebut terbentuk akibat terjadinya delesi atau penghapusan salah satu asam amino.

Siklisasi heksapeptida linear

Proses siklisasi dilakukan dengan menggunakan metode fase larutan dengan reagen pengkopling HATU, DIPEA dan DCM. Pada umumnya di alam banyak ditemukan polipeptida dalam bentuk siklik, dimana struktur siklik ini terkait dengan fungsi biologis dari polipeptida tersebut. Adapun tipe siklisasi yang digunakan pada penelitian ini adalah tipe siklisasi dari kepala ke ekor pada fase larutan karena proses siklisasi heksapeptida lebih efisien dilakukan dengan menggunakan metode fase larutan selama 3 x 24 jam pada suhu ruang. Pada heksapeptida linear ini yang berperan sebagai C-terminal adalah Prolin yang memiliki kelebihan sebagai β -turn inducer atau konformasi sekunder yang dapat mendekatkan terminal-C dan terminal-N melalui hidrogen hingga dapat mempermudah pembentukan heksapeptida siklik (Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro).

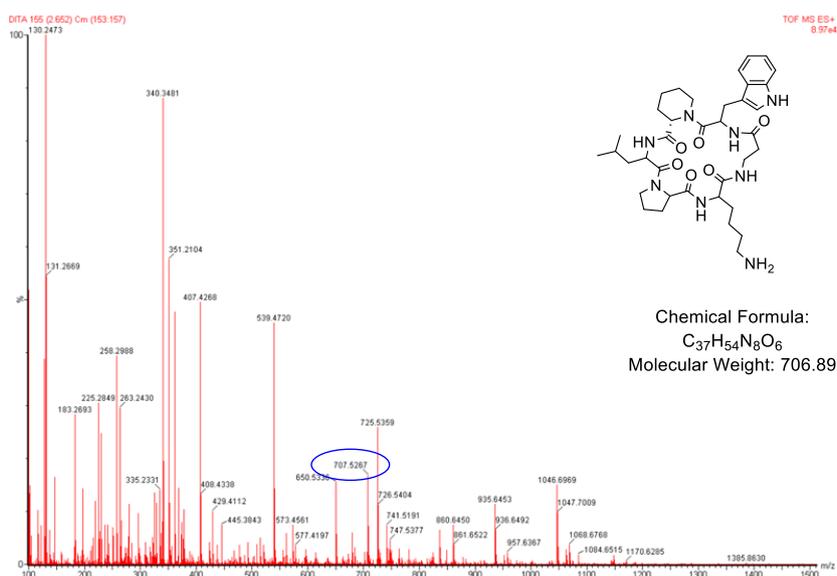
Peptida dalam bentuk siklik memiliki beberapa keunggulan yaitu dapat meningkatkan aktivitas biologisnya dengan meningkatkan sisi aktif pengikatan dengan molekul target, lalu menurunkan fleksibilitas struktur senyawa (struktur lebih kaku) sehingga dapat mengurangi perubahan entropi saat mengikat molekul target dibandingkan dengan bentuk linearnya, dan dapat meningkatkan permeabilitas membran dan transport molekul dari sitoplasma sehingga dapat memberika keuntungan dalam meningkatkan efek farmakologis dari senyawa peptida siklik tersebut [13].



Gambar 5. Skema reaksi siklisasi heksapeptida linear (a) (1) HATU 11,75 mg, DIPEA 20,98 μ L, DCM 97 mL, 3 x 24 jam. (2) 95% TFA, 5% air, 2 jam.

Lebih dari sebagian asam amino memiliki gugus samping yang bersifat reaktif, seperti asam amino Fmoc-Trp(Boc)-OH dan Fmoc-Lys(Boc)-OH yang digunakan sintesis heksapeptida pada penelitian ini. Dimana gugus samping yang reaktif ditutup/dilindungi oleh gugus pelindung samping contohnya adalah Boc, jika gugus samping yang reaktif ini tidak dilindungi dapat mengganggu reaksi pembentukan ikatan peptida antar asam amino (terjadi modifikasi gugus samping) hingga dapat menghasilkan produk samping. Gugus pelindung samping dapat dideproteksi dengan TFA [10].

Karakterisasi heksapeptida siklik



Gambar 5. 12 spektrum HR TOF-MS senyawa heksapeptida linear ($C_{47}H_{72}N_8O_{11}$, m/z terhitung 707,5267)

Crude hasil siklisasi selanjutnya dikarakterisasi menggunakan instrumen Mass Spectrometer untuk memastikan keberhasilan sintesis heksapeptida siklik analog pipecolisporin (Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro) memiliki rumus molekul $C_{37}H_{54}N_8O_{11}$ sehingga seharusnya memiliki massa molekul sebesar 706,89. Pada hasil pengukuran terbukti terdapat puncak ion molekul dengan nilai $[M+H]^+$ sebesar 707,5267, dengan demikian heksapeptida siklik analog pipecolisporin (Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro) telah berhasil disiklisasi dengan menggunakan metode fase larutan. Tetapi jika diamati pada spektrum, hasil yang diperoleh tidak murni sehingga tidak bisa dilakukan uji aktivitas antimalaria karena bisa saja campuran atau pengotor mempengaruhi aktivitas biologis dari heksapeptida siklik (Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro).

D. Kesimpulan

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

1. heksapeptida linear senyawa analog pipecolisporin (Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro) dengan metode SPPS menggunakan strategi Fmoc, reagen kopling HATU/ HOAt, resin 2-Klorotritil klorida, serta larutan TFE:AcOH:DCM (2:2:6) sebagai reagen *Cleavage* berhasil disintesis berdasarkan karakterisasi menggunakan spektrometri massa dengan nilai $[M+H]^+$ sebesar 925,7979 dengan massa *crude* yang diperoleh sebesar 9,5 mg.
2. siklisasi senyawa heksapeptida linear (Lys- β Ala-Trp-Pip-Leu-Pro) 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 707,5267.

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] Maharani, R., Octavia, S.M., Zainuddin, A., Hidayat, A.T., Sumiarsa, D., Harneti, D., Nurlelasari, N. & Supratman, U. (2019). *Sintesis tetrapeptida PSSY dengan metode fasa padat*. *Chimica et Natura Acta*. 7(2): 69-75.
- [2] Pastor I.F., Menéndez V.G., Annang F., Toro C., Mackenzie T.A., Navarrete C.B., Genilloud O. and Reyes F. (2021). *Pipicolisporin, a Novel Cyclic Peptida with Antimalarial and Antitrypanosome Activities from a Wheat Endophytic Nigrospora oryzae*. *Pharmaceuticals*. 14. 268.
- [3] Biruk H., Sentayehu B., Alebachew Y., Tamiru W., Ejigu A., Assefa S. (2020). *In vivo antimalarial activity of 80% methanol and aqueous bark extracts of terminalia brownii Fresen. (Combretaceae) against plasmodium berghei in mice*, *Biochem. Res. Int.* 1–7.
- [4] World Health Organization. (2019). *World Malaria Report*. Available online: <https://www.who.int/publicationsdetail/world-malaria-report-2019> (accessed on 16 januari 2022).
- [5] Tse, E.G.; Korsik, M.; Todd, M.H. (2019). *The past, present and future of anti-malarial medicines*. *Malar. J.* 18, 93.
- [6] Nzila A. (2006). *The past, present and future of antifolates in the treatment of Plasmodium falciparum infection*, *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 1043–1054.
- [7] Gregson A., Plowe C.V. (2005). *Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates*, *Pharmacol. Rev.* 57, 117–145.
- [8] Torres M.D., Sothiselvam S., Lu T.K., and de la Fuente-Nunez C. (2018). *Peptida Design Principles for Antimicrobial Applications*. *Jmb.* 3548–3567.
- [9] Maharani, R., yanti, E. F., M., Devia I. M., & Sihotang, D. (2015). *Synthesis of trypsin-modulating oostatic factor (TMOF) and its analogues by solid-phase peptida synthesis using DIC/oxyma as coupling reagent*. *Procedia Chemistry*. 17, 125-131.
- [10] Chan, W.C. and White, P.D. (2000). *Fmoc Solid Phase Peptida Synthesis A Practical Approach*. New York: Oxford University press. Djaslim S. *Intisari Pemasaran dan Unsur-unsur Pemasaran*. Bandung: Linda Karya; 2003.
- [11] Hoekstra WJ. (2001). *The 2-chlorotrityl resin: a worthy addition to the medicinal chemist's toolbox*. *Curr Med Chem* 8: 715-719.
- [12] Maharani, R., Kurnia, Y.D., Hidayat, T.A., Al-annshari, J., Sumiarsa, D., Harneti, D., Nurlelasari, Supratman, U. (2020). *Upaya Optimasi Sintesis Pentapeptida Leu-Ala-Asn-Ala-Lys dengan pengurangan Nilai loading Resin*. *Chemica et Natura Acta* Vol.8 No.1:26-35.
- [13] Hayes C. H., Luk P. Y. L., Tsai H. Y. (2021). *Approaches for peptida and protein cyclisation*. *Org. Biomol. Chem.*, 2021, 19, 3983.