

## SINTESIS SENYAWA HEKSAPeptIDA SIKLIK ANALOG PIPECOLISPORIN (Pro-Lys-Pipe-Trp- $\beta$ -Ala-Phe) DENGAN METODE KOMBINASI FASA PADAT DAN FASA LARUTAN SEBAGAI KANDIDAT ANTIMALARIA

Asni Fitriana<sup>1</sup>, Nety Kurniaty<sup>2</sup>, Rani Maharani<sup>3</sup>

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

[\\*fitrianaasni7@gmail.com](mailto:fitrianaasni7@gmail.com) [\\*nety.kurniaty@gmail.com](mailto:nety.kurniaty@gmail.com)

**Abstract.** Malaria is an infectious disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium* and then transmitted to humans through the *Anopheles* mosquito. One of the natural peptides found in previous studies is cyclic hexapeptide (Pro-Leu-Pipe-Trp- $\beta$ -Ala-Ile) from endophytic fungi isolated from the roots of *Triticum sp* and produced pipecolisporin isolation which has been proven to have antimalarial activity. In this study the cyclic hexapeptide analogue pipecolisporin (Pro-Lys-Pipe-Trp- $\beta$ -Ala-Phe) has been successfully synthesized using a solid phase combination method (Solid Phase Peptide Synthesis) and a solution phase with a strategy of using Fmoc protective groups, solid phase buffers namely 2-chlorotriyl chloride resin and coupling reagents namely HATU, HOAt, and DIPEA. A linear hexapeptide compound has been formed which is indicated by the results of characterization using a mass spectrophotometer with an m/z value of 959.4612 at the ion peak and also a cyclic hexapeptide compound has been formed which is indicated by an m/z value of 741.4842 at the peak of the molecular ion [M+H].

**Keywords:** *Pipecolisporin analogue cyclic hexapeptide, Antimalarial, Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) and solution phase.*

**Abstrak.** Malaria merupakan penyakit menular yang disebabkan oleh protozoa dari genus *Plasmodium* dan kemudian ditularkan ke manusia melalui nyamuk *anopheles*. salah satu peptida alami yang ditemukan pada penelitian sebelumnya adalah heksapeptida siklik (Pro-Leu-Pipe-Trp- $\beta$ -Ala-Ile) dari jamur endofit yang diisolasi dari akar *Triticum sp* dan menghasilkan isolasi pipecolisporin yang sudah terbukti memiliki aktivitas antimalaria. Pada penelitian ini heksapeptida siklik analog pipecolisporin (Pro-Lys-Pipe-Trp- $\beta$ -Ala-Phe) telah berhasil disintesis dengan menggunakan metode kombinasi fasa padat (*Solid Phase Peptide Synthesis*) dan fasa larutan dengan strategi penggunaan gugus pelindung Fmoc, penyangga fasa padat yaitu resin 2-klorotriyl klorida serta reagen pengkopling yaitu HATU, HOAt, dan DIPEA. Senyawa heksapeptida linear telah terbentuk yang ditandai dengan hasil karakterisasi menggunakan spektrofotometer massa dengan nilai m/z 959,4612 pada puncak ion dan juga Senyawa heksapeptida siklik telah terbentuk yang ditandai dengan nilai m/z 741,4842 pada puncak ion molekul [M+H].

**Kata Kunci:** *Heksapeptida siklik analog Pipecolisporin, Antimalaria, Sintesis peptida fase padat (SPPS) dan fasa larutan.*

## A. Pendahuluan

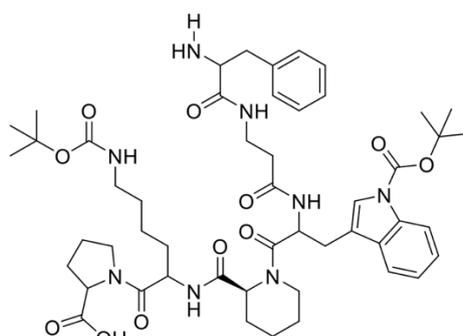
Malaria merupakan penyakit menular yang disebabkan oleh protozoa dari genus *Plasmodium* dan kemudian ditularkan ke manusia melalui nyamuk *anopheles* (World Malaria Report, 2011). Pada tahun 2015 terdapat kasus malaria yang diperkirakan mencapai 214 juta di dunia yang sebagian besarnya terjadi di Afrika (88%), Malaria ini sudah menyebabkan kematian pada 438.000 jiwa dimana 306.000 merupakan anak-anak yang usianya <5 tahun (WHO, 2015). Di Indonesia sudah terdapat kasus malaria setiap tahunnya sebanyak 13 juta kasus dan 30.000 diantaranya menginggal dunia. Daerah-daerah yang kasus klinis tertinggi yaitu pada propinsi Papua, Nusa Tenggara Timur (NTT), Papua Barat, Sulawesi Tengah dan Maluku (Kemenkes RI, 2013). Malaria juga merupakan penyakit parasit tropis disebabkan oleh resistensi *Plasmodium* yang meningkat terhadap obat-obat malaria yang sudah ada dan sudah digunakan sebelumnya (Hastrina, 2019). Berikut ini beberapa antimalaria yang diketahui telah mengalami resistensi terhadap *Plasmodium* yaitu klorokuin, primaquin, amodiakuin (Menze BD *et al.*, 2016).

Peptida digunakan untuk berbagai aktivitas biologis karena ukurannya yang relatif kecil, sehingga mudah untuk dilakukan sintesis menggunakan strategi kimia (Veronika, 2014). Beberapa penelitian sebelumnya menemukan jenis peptida rantai pendek yang memiliki aktivitas sebagai antimalaria (Bell, 2011) dan antiparasit (Pretzel, 2013). Fernandez Pastor *et al.*, (2021) telah menemukan salah satu peptida siklik antimalaria dari jamur endofit yang diisolasi dari akar *Triticum sp* dan menghasilkan isolasi pipecolisporin dengan urutan asam amino Pro-Leu-Pipe-Trp- $\beta$ -Ala-Ile yang sudah terbukti memiliki aktivitas antiparasit dalam kisaran mikromolar dengan  $IC_{50}$  terukur sebesar 3,21  $\mu M$ . Untuk memperoleh senyawa heksapeptida dengan aktivitas antimalaria yang lebih tinggi, dilakukan sintesis senyawa heksapeptida analog pipecolisporin lainnya dengan mengganti residu asam amino leusin menjadi lisin, serta isoleusin diganti menjadi fenilalanin menjadi Pro-Lys-Pipe-Trp- $\beta$ -Ala-Phe. Hal ini dilakukan untuk meningkatkan kationisitas dan hidrofobitasnya karena lisin memiliki sifat kationik yang dapat meningkatkan aktivitas antimikroba dan isoleusin memiliki sifat hidrofobik yang juga dapat meningkatkan aktivitas antimikroba (Torres *et al.*, 2019). AMP (*Antimicrobial Peptide*) memiliki berbagai efek penghambatan terhadap bakteri, jamur, virus dan parasit, sehingga terdapat korelasi dengan antimalaria dimana jika suatu peptida dapat memberikan efek antiparasit, maka peptida tersebut memungkinkan dapat digunakan sebagai peptida antimalaria (Huan Y, 2020). Pada penelitian ini dilakukan dengan sintesis heksapeptida siklik dengan urutan asam amino (Pro-Lys-Pipe-Trp- $\beta$ -Ala-Phe) sebagai kandidat antimalaria. Sintesis heksapeptida siklik secara kimia ini digunakan sebagai alternatif dari bahan alam karena prosesnya lebih cepat dan mempermudah dalam menghasilkan suatu senyawa yang aktivitas farmakologinya sama. Metode yang digunakan adalah kombinasi metode Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) dan fasa larutan, metode fasa padat yang digunakan untuk sintesis heksapeptida linear ini dipilih karena waktu pada proses sintesis yang lebih singkat serta pemurniannya dapat dilakukan pada tahap akhir saja (Maharani *et al.*, 2019) sedangkan fasa larutan digunakan pada siklisasi heksapeptida dengan menggunakan HATU dan DIPEA (Lear S., 2016). Peptida siklik dipilih karena lebih stabil dibandingkan dengan peptide linear (Manna *et al.*, 2017).

Berdasarkan latar belakang diatas maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana cara mensintesis ikatan heksapeptida dengan urutan asam amino (Pro-Lys-Pipe-Trp- $\beta$ -Ala-Phe) yang dilakukan dengan metode kombinasi fasa padat (SPPS) dan fasa larutan. Tujuan dari penelitian ini yaitu mensintesis senyawa heksapeptida siklik dengan metode fasa padat dan fasa larutan.

## B. Metodologi Penelitian

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



**Gambar 1.1** Struktur asam amino (Pro-Lys-Pipe-Trp- $\beta$ -Ala-Phe)

Metode ini memiliki beberapa tahap pengerjaan, yaitu pengkondisian tabung reaktor, kemudian membuka sisi aktif resin dengan pengembangan resin, selanjutnya dilakukannya pengikatan asam amino pertama pada resin sebagai penyangga fase padat lalu dilakukan *loading resin* untuk melihat hasil dari loading resin yang dapat mengikat asam amino dengan baik yaitu pada rentang rata-rata loading resin yaitu 0,1-1,3 mmol/mg, setelah itu dilakukan *capping resin* yang bertujuan untuk menutup gugus aktif resin agar tidak dapat berikatan lagi dengan asam amino lainnya. Selanjutnya dilakukan pelepasan gugus Fmoc di asam amino pertama yang bertujuan agar dapat berikatan dengan asam amino berikutnya. Setelah pelepasan Fmoc dilakukan kemudian dilanjut dengan uji kloranil untuk memastikan Fmoc telah terlepas yang mana ditandai dengan terbentuknya warna ungu pada butir resin. Lalu dilakukan penyusunan fragmen peptida serta dilakukan uji kloranil kembali untuk memverifikasi adanya ikatan peptida antar asam amino dengan melihat tidak terbentuknya warna pada butir resin. Kemudian dilakukan pelepasan resin di heksapeptida linier dan dilakukan pembentukan heksapeptida siklik. Lalu dilanjutkan dengan pemekatan dengan menggunakan *rotary evaporator* yang bertujuan untuk menghilangkan pelarut. Selanjutnya dianalisis menggunakan spektrometer massa dengan melihat nilai *m/z*.

## C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

### 1. Sintesis Heksapeptida linear dengan fase padat

Pada penelitian ini dilakukan sintesis heksapeptida siklik analog pipecolisporin Pro-Lys-Pipe-Trp- $\beta$ -Ala-Phe menggunakan metode kombinasi fasa larutan dan fasa padat *Solid Phase Peptide Synthesis* (SPPS) dengan Prolin pada C-terminal dan Ile pada N-terminal. Metode fasa padat ini dipilih karena prosesnya lebih singkat sehingga dapat mengefisienkan waktu pada saat sintesisnya serta pemurniannya dapat dilakukan pada tahap akhir saja (Maharani *et al.*, 2019). Strategi SPPS ini menggunakan strategi Fmoc yang mana berdasarkan pada penggunaan gugus pelindung Fmoc pada gugus amino yang labil terhadap basa serta strategi pelindung rantai samping yang labil terhadap asam (Chan dan White, 2000).

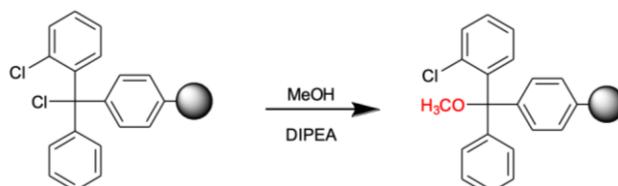
Pada metode SPPS penyangga fase padat yang digunakan adalah resin 2-klorotitridil klorida, resin ini dipilih karena bersifat labil terhadap asam sehingga nantinya dapat meminimalisir terbentuknya produk samping *diketopiperazine* seiring dengan meruahnya gugus aktif pada resin tersebut (Chan dan White, 2000). Sedangkan asam amino yang digunakan adalah asam amino yang terproteksi Fmoc yang labil terhadap basa, hal ini dilakukan agar pada saat pelepasan Fmoc nantinya resin tidak ikut terlepas karena resin yang

digunakan bersifat labil terhadap asam sehingga ikatan asam amino dan resin tidak terganggu nantinya. Tahapan sintesis yang dilakukan meliputi pengembangan resin (*Swelling*), pengkoplingan, loading resin, capping resin, deproteksi gugus pelindung, pelepasan peptida dari resin (*Cleavege*), karakterisasi dengan spektrofotometer massa, dan siklisasi.

Pengkondisian tabung reaktor dilakukan dengan menggunakan pelarut DCM bertujuan untuk menyesuaikan suasana pada tabung reaktor pada saat preses dintesis sehingga nantinya proses berlangsung stabil dan lebih optimum (Pratiwi, *et al.*, 2021). Selanjutnya dilakukan pengembangan resin 2-klorotritil klorida tujuannya agar sisi aktif pada resin akan lebih terbuka sehingga nantinya pada saat pengikatan asam amino pertama akan lebih mudah terikat asam amino pada sisi aktif resin (Sewald *et al.*, 2002). Pengembangan resin ini dilakukan dengan cara resin ditambahkan diklorometana (DCM) sebanyak 8 mL lalu diputar selama 30 menit dengan rotary mixer campuran resin dan diklorometana dibuang dan resin dikeringkan dengan Air Compressor. DCM digunakan pada pengembangan resin karena pelarut ini dapat mengembangkan resin (Walker dan Rapley, 2008), selain itu resin sangat sensitif oleh air maka dari itu selama proses sintesis ini tidak menggunakan air. Setelah resin dikembangkan, selanjutnya dilakukan pengikatan asam amino pertama yaitu Prolin (*Pro*) pada resin dengan menambahkan Fmoc-Pro-OH dan DIPEA dalam DCM (diklorometana), DIPEA berperan sebagai basa organik dan juga sebagai reagen untuk mengikat resin dengan asam amino (Chan dan White, 2000). Campuran Fmoc-Pro-OH dan DIPEA dan DCM dimasukkan ke dalam tabung reaktor yang berisi resin 2-klorotritil klorida dan diputar menggunakan rotary suspension mixer selama 4 jam. Pengadukan dengan menggunakan rotary suspension mixer dilakukan untuk memperbesar kontak antar molekul asam amino dan reagen sedangkan dilakukannya proses pengkoplingan selama 4 jam bertujuan agar pengikatan asam amino pada resin terjadi lebih optimal. Reaksi yang terjadi antara DIPEA dan Fmoc-Pro-OH yaitu reaksi asam basa dimana adanya proses pengambilan hidrogen dari gugus karboksil pada asam amino Fmoc-Pro-OH sehingga membentuk nukleofil, lalu nukleofil yang terbentuk ini akan menggantikan atom klorida pada karbon kuartener yang ada pada resin 2-klorotritil klorida sehingga asam amino pertama Fmoc-Pro-OH dapat berikatan dengan resin (Maharani, 2016). Selanjutnya reaksi di stop dan dilakukan pencucian menggunakan DMF sebanyak sekali lalu DCM sebanyak dua kali dan dikeringkan menggunakan *air compressor*. Pencucian dengan DMF dan DCM digunakan untuk menghilangkan pereaksi yang berlebih dimana nantinya dapat mengganggu proses sintesis asam amino selanjutnya. Setelah dilakukan pengikatan asam amino pertama pada resin selanjutnya dilakukan *Loading* resin untuk melihat seberapa banyak asam amino pertama yang terikat pada resin sehingga nantinya dapat digunakan untuk menghitung berapa banyak asam amino yang diperlukan untuk berikatan dengan asam amino pertama. Sampel resin yang sebelumnya sudah dikeringkan diambil sebanyak 0,5 mg lalu ditambahkan dengan campuran piperidin : DMF (1 : 4 ml) dan didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 290 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis Tecan metro 200, hal ini dikarena pada panjang gelombang ini merupakan serapan dibenzofulvena (DBF) dimana nilai absorbansi yang nantinya terukur merupakan absorbansi dari gugus Fmoc yang terlepas dari asam amino dan membentuk DBF. Pada penelitian ini diperoleh nilai loading resin sebesar 0,2. Nilai loading resin tersebut menunjukkan bahwa resin dapat mengikat asam amino dengan baik karena berada pada rentang rata-rata loading resin yaitu 0,1-1,3 mmol/mg (Maharani, *et. al.*, 2016).

Selanjutnya dilakukan *capping* resin untuk menutup gugus aktif pada resin agar asam amino kedua nantinya hanya berikatan dengan asam amino pertama dan tidak berikatan dengan resin. *Capping* resin dilakukan dengan mereaksikan metanol: DIPEA: DCM (1,5 mL: 0,5 mL: 8 mL) total 20 mL kedalam tabung reaktor yang berisi resin dan dikocok dengan menggunakan *Rotary Suspension mixer* selama 2 x 10 menit. Pada proses *capping* ini metanol berperan sebagai penutup sisi aktif pada gugus klorida, sedangkan DIPEA berperan sebagai basa organik yang dapat menarik OH dari metanol agar nukleofil dapat menyerang karbon tersier dari resin 2-CTC sehingga metanol dapat berikatan dengan resin dan sisi aktif resin akan tertutup. serta DCM berperan sebagai pelarut yang mempunyai sifat volatil dan lebih

mudah menguap.



**Gambar 1.2** Reaksi Capping resin menggunakan metanol dan DIPEA (Chan & White, 2000).

Sebelum dilakukannya kopling asam manino pertama dengan asam amino kedua, dilakukan uji kloranil sebagai kontrol keberhasilan pengkoplingan dengan cara diambil beberapa resin untuk direaksikan dengan 40  $\mu$ L asam asetat dan 40  $\mu$ L kloranil dan diamati perubahan warnanya, pada penelitian ini diperoleh hasil uji negatif dimana larutan tidak berwarna dan resin tetap berwarna kekuning-kuningan hal ini menunjukkan hasil kopling yang sempurna serta tidak terdapatnya amina bebas pada peptida (Maharani R. *et al*, 2020). Setelah dilakukan uji kloranil selanjutnya gugus pelindung Fmoc pada asam amino pertama harus dilepaskan atau disebut dengan deproteksi F-moc. Tahap deproteksi F-moc dilakukan dengan cara mereaksikan basa piperidin 20% dalam DMF total 10 mL terhadap resin dan diputar pada *Rotary Suspension mixer* selama 2x10 menit, hal ini dilakukan agar tidak terbentuk produk samping antara N-terminal dengan Fmoc yang sudah lepas. Pada tahap ini dimulai dengan atom hidrogen dari cincin fluoren diambil oleh piperidin dimana piperidin berperan sebagai basa sehingga terbentuknya intermediet aromatik siklopentadiena. Intermediet yang terbentuk ini sifatnya mudah terurai menjadi senyawa dibenzofulvena dan karbondioksida maka dari itu dihasilkan suatu gugus amino bebas (Chan and White, 2000). Setelah itu untuk melihat keberhasilan pada tahap deproteksi ini dilakukan uji kloranil kembali dengan melihat perubahan warna yang terjadi, keberhasilan kopling ditunjukkan dengan adanya perubahan warna pada resin, hal ini dikarenakan terdapatnya gugus  $\text{NH}_2$  bebas yang berikatan dengan kloranil sehingga akan menyebabkan perubahan warna pada resin tersebut (Sumiarsa, 2019). Pada penelitian terdapatnya perubahan warna pada resin dimana resin berubah warna menjadi hitam pekat pada setiap butir resin, hal ini menunjukkan bahwa asam amino pertama sudah berikatan baik dengan resin.

Selanjutnya proses pengkoplingan asam amino kedua dengan menggunakan reagen HATU/HOAt dan DIPEA. Asam amino kedua yaitu Fmoc-Lys-OH di reaksikan dengan HATU dan HOAt lalu dilarutkan dalam 4 mL DMF dan DIPEA, kemudian di masukkan ke tabung reaktor dan diputar dengan menggunakan *Rotary Suspension Mixer* selama 4 jam hal ini bertujuan agar pengikatan asam amino pada resin terjadi lebih maksimal. Digunakannya reagen kopling HATU dikarenakan gugus karboksil pada asam amino kedua dapat diaktivasi oleh reagen ini yaitu dengan membentuk intermediet ester yang lebih aktif dimana gugus ester yang terbentuk berperan sebagai gugus pergi yang baik, hal ini akan membuat gugus karbonil yang teraktivasi akan lebih mudah diserang oleh nukleofil dari asam amino pertama dan membentuk ikatan peptida. Sedangkan penambahan reagen HOAt berperan sebagai zat aditif yang mana dapat menekan laju rasemisasi yang dapat membentuk ikatan hidrogen intramolekular dengan asam amino. Digunakannya kombinasi reagen HATU dan HOAt ini karena jika hanya menggunakan HATU saja akan memungkinkan tingkat terjadinya rasemisasi semakin besar hal ini disebabkan oleh tidak adanya ikatan hidrogen antara asam amino dengan HOAt dimana ikatan ini dapat memberikan halangan sterik pada saat proses kopling berlangsung (Maharani R. *et al*, 2020) oleh karena itu penggunaan kombinasi HATU/HOAt sebagai reagen pengompling tidak dapat dipisahkan satu sama lain. Reagen DIPEA pada reaksi kopling ini berperan pada proses deprotonasi gugus proton di gugus karboksil, proses deprotonasi merupakan langkah awal dari aktivasi gugus karboksilat. Setelah proses deprotonasi ini berlangsung dihasilkanlah anion karboksilat yang memiliki sifat nukleofil, lalu nukleofil ini akan menyerang karbokation pada HATU dan membentuk garam uranium karboksilat. Pada HOAt, atom oksigen yang dimilikinya akan menyerang karbon pada karbonil yang bersifat elektrofil membentuk *O*-asil ester. gugus amino pada asam amino pertama yang mempunyai sifat nukleofil nantinya akan menyerang atom karbon dari karbonil

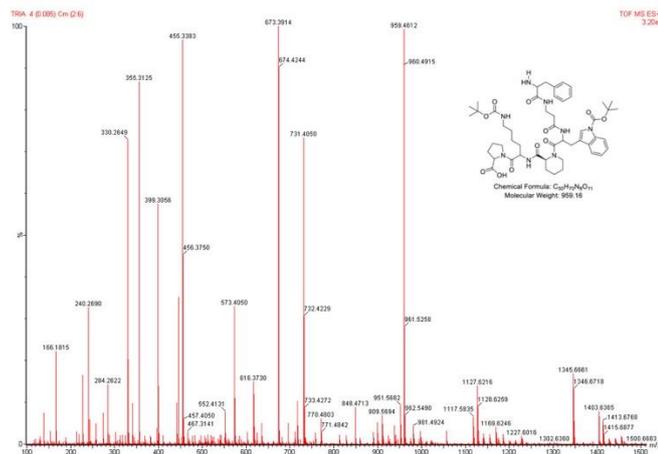
pada asam amino kedua sehingga membuat benzotriazol menjadi gugus pergi dan terbentuklah ikatan peptida (Maharani R. *et al.*, 2020). Setelah diputar dengan menggunakan *Rotary Suspension Mixer* selama 4 jam, selanjutnya resin dicuci dengan DCM dan DMF. Setiap dilakukan pengkoplingan, untuk melihat keberhasilannya maka dilakukan uji kloranil dan diperoleh hasil uji negatif dimana larutan tidak berwarna dan resin tetap berwarna kekuning-kuningan hal ini menunjukkan hasil kopling yang sempurna serta tidak terdapatnya amina bebas pada peptida.

Kemudian dilakukan pelepasan gugus Fmoc pada asam amino kedua atau disebut dengan deproteksi gugus Fmoc ini dilakukan dengan menggunakan basa piperidin 20% dalam DMF total 10 mL terhadap resin dan diputar pada *Rotary Suspension mixer* selama 2x10 menit, hal ini dilakukan agar tidak terbentuk produk samping antara N-terminal dengan Fmoc yang sudah lepas. Pada tahap ini dimulai dengan atom hidrogen dari cincin fluoren diambil oleh piperidin dimana piperidin berperan sebagai basa sehingga terbentuknya intermediet aromatik siklopentadiena. Intermediet yang terbentuk ini sifatnya mudah terurai menjadi senyawa dibenzofulvena dan karbondioksida maka dari itu dihasilkan suatu gugus amino bebas (Chan and White, 2000). Keberhasilan pada proses deproteksi gugus Fmoc ini dapat dilihat dari uji kloranil yang ditandai dengan terdapatnya perubahan warna pada setiap butir resin. Pada penelitian ini diperoleh hasil uji positif dimana pada setiap butir resin mengalami perubahan warna, hal ini menunjukkan bahwa adanya amina bebas yang siap untuk berikatan dengan asam amino selanjutnya.

Tahap berikutnya yaitu pengulangan kopling asam amino ketiga hingga keenam dan deproteksi Fmoc hingga dihasilkan heksapeptida linier yang masih terikat pada resin, yang mana hasil uji kloranil dari setiap pengkoplingan asam amino menunjukkan hasil yang negatif pada uji kloranil untuk pengkoplingan dan menunjukkan hasil positif pada uji kloranil untuk deproteksi gugus Fmoc. Setelah rantai peptida (Pro-Lys-Pipe-Trp- $\beta$ -Ala-Phe) terbentuk, selanjutnya dilakukan pelepasan peptida dari resin dengan mereaksikan TFE: Asam asetat glasial: DCM (2: 2: 6) total 10 mL selama 1 jam kemudian filtrat di tampung dan dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh crude. Crude yang didapatkan sebesar 58,8 mg, hasil yang diperoleh sedikit hal ini mungkin saja terjadi pada saat pengambilan sampel yang dilakukan di uji kloranil, terlalu banyak sehingga hasil crude yang diperoleh menjadi sedikit.

Setelah itu dilakukan karakterisasi dengan menggunakan spektrofotometer massa, tujuannya dilakukan karakterisasi ini adalah untuk melihat puncak fragmen dan untuk mengetahui bobot molekul dari produk sintesis serta memastikan bahwa senyawa heksapeptida linear sudah terbentuk dengan melihat bobot molekulnya pada puncak m/z (massa/muatan). Prinsip spektrofotometer massa ini yaitu sampel organik dalam keadaan gas dibombardir oleh energi elektron yang tinggi (energi potensial ionisasi rata-rata 185 – 300 kkal/mol), yang menyebabkan elektron dari molekul sampel organik lepas, menghasilkan ion organik. Ion molekul organik ini tidak stabil dan akan langsung terpecah menjadi fragmen-fragmen kecil, radikal bebas, atau ion lain; atau mengalami penataan ulang terlebih dahulu sebelum pecah. Pemecahan ion molekul ini bergantung pada kerangka karbon dan gugus fungsi molekul organik tersebut. Spektrometer massa dapat mendeteksi hasil pemecahan ion molekul tersebut dan dapat dibaca dalam bentuk spektrum massa yang merupakan aluran antara massa fragmen dalam m/z (z adalah besarnya muatan = 1, m = massa fragmen) dengan kelimpahan atau intensitas, hasilnya setiap fragmen akan muncul sebagai garis sesuai dengan massanya dan tinggi garis menunjukkan kelimpahannya. Dari massa fragmen dapat ditentukan struktur fragmen tersebut, serta dengan merangkaikan berbagai struktur fragmen yang terdapat dalam spektrum massa dan fragmen yang hilang sehingga struktur molekul induk dapat ditentukan (Suhartati, 2017).

*Crude* peptida yang diperoleh sebelumnya, selanjutnya dikarakterisasi menggunakan instrument Spektrofotometri massa waters dengan sistem ionisasi *electronspray ionization* (ESI) dan detector *time of flight* (TOF). Heksapeptida ini memiliki rumus molekul  $C_{50}H_{70}N_8O_{11}$  dengan berat molekul 959,16, pada spektrum massa diketahui adanya puncak ion molekul  $[M+H]^+$  pada m/z 959,461.

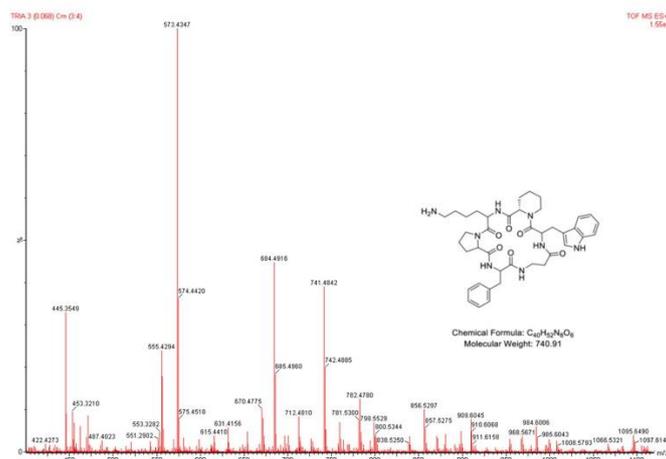


**Gambar 1.1** Spektrum HR-TOF-MS senyawa heksapeptida linear (C<sub>50</sub>H<sub>70</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub> m/z terhitung 959,461)

Dapat dilihat pada **Gambar 1.3** hasilnya menunjukkan bahwa heksapeptida linear telah terbentuk dimana hasil karakterisasi menunjukkan puncak dengan nilai m/z 959,46. Puncak ini memperlihatkan munculnya puncak ion molekul [M+H]<sup>+</sup> heksapeptida. Maka dapat disimpulkan bahwa sintesis dengan metode SPPS menggunakan strategi Fmoc/t-Bu, reagen kopling HATU/HOAt, resin 2-CTC serta larutan TFE, asam asetat glasial, DCM sebagai reagen clavage (pelepasan resin) pada peptida (Pro-Lys-Pipe-Trp-β-Ala-Phe) berhasil karena berdasarkan teoritis yang dihasilkan untuk asam amino phenilalanin, β-Alanin, Triptofan, Pipekolat, lisin dan prolin menggunakan software *Chemdraw* dengan rumus kimia C<sub>50</sub>H<sub>70</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub> dengan bobot molekul m/z yaitu 959,16.

## 2. Siklisasi Heksapeptida Linear

Siklisasi heksapeptida linear dilakukan dengan menggunakan metode fasa larutan. Metode siklisasi antara Prolin (C-terminal) dan Phenilalanin (N-terminal) dilakukan dengan penambahan reagen pengopling HATU, DIPEA dalam pelarut DCM dan dilakukan penyiklikan menggunakan *magnetic stirrer* selama 3 x 24 jam. Prinsip kerja dari *magnetic stirrer* ini yaitu plate yang dapat dipanaskan dan hubungan antara 2 magnet yaitu magnet yang berhubungan pada motor dan magnet (stir bar) yang dimasukkan ke dalam wadah yang berisi larutan kimia dimana wadah yang berisi larutan ini ditempatkan diatas plate, dengan menggunakan hot plate *magnetic stirrer* pencampuran larutan kimia dapat dilakukan dengan cepat (Alfita R. *et al*, 2021). Setelah itu heksapeptida linear yang sudah menjadi heksapeptida siklik dilakukan evaporasi menggunakan *rotary evaporator* kemudian dilakukan pelepasan gugus samping (Boc) dengan menggunakan *magnetic stirrer* dengan mereaksikan TFA : air (1,9: 0,1). Pada proses ini terjadi perubahan warna pada sampel dari warna coklat bening menjadi coklat kehitaman, hal ini terjadi karena gugus samping berupa Boc tersebut sudah terlepas dari heksapeptida siklik. Setelah itu dilakukan evaporasi hingga larutan menjadi oil lalu dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer massa untuk melihat dan memastikan bahwa senyawa heksapeptida siklik sudah terbentuk dengan melihat bobot molekulnya pada puncak m/z (massa/muatan). Heksapeptida siklik ini memiliki rumus molekul C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub> dengan berat molekul 740,91 dan pada spektrum massa diketahui adanya puncak ion molekul [M+H]<sup>+</sup> pada m/z 741,4842.



**Gambar 1.2** Spektrum HR-TOF-MS senyawa heksapeptida siklik ( $C_{40}H_{52}N_8O_6$  m/z terhitung 741,4842)

Dapat dilihat pada **Gambar 1.4** hasilnya menunjukkan bahwa heksapeptida siklik telah terbentuk dimana hasil karakterisasi menunjukkan puncak dengan nilai m/z 741,4842. Puncak ini memperlihatkan munculnya puncak ion molekul  $[M+H]^+$  heksapeptida siklik. Maka dapat disimpulkan bahwa proses siklikisasi pada heksapeptida sudah terbentuk, berdasarkan teoritis yang dihasilkan pada heksapeptida siklik untuk asam amino phenilalanin,  $\beta$ -Alanin, Triptofan, Pipekolat, lisin dan prolin menggunakan software *Chemdraw* dengan rumus kimia  $C_{40}H_{52}N_8O_6$  dengan bobot molekul m/z yaitu 740,91.

#### D. Kesimpulan

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

1. Berdasarkan penelitian ini sintesis heksapeptida Pro-Lys-Pipe-Trp-\beta-Ala-Phe berhasil dilakukan dengan metode kombinasi fasa padat (Solid Phase Peptide Synthesis) dan fasa larutan.
2. Hasil pada karakterisasi menggunakan spektrofotometri menunjukkan adanya puncak ion molekul pada m/z 959,4612 untuk heksapeptida linier tanpa gugus pelindung samping serta puncak ion molekul  $[M+H]^+$  pada m/z 741,4842 untuk heksapeptida siklik tanpa gugus pelindung samping.

#### Acknowledge

Penulis berterima kasih kepada Universitas Islam Bandung dan juga Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran serta rekan-rekan yang telah banyak membantu penulis pada penelitian ini.

#### Daftar Pustaka

- [1] Alfita R., Achmad F. I., Zaifuddin, Deni Tri L. 2021. "Hotplace Magnetic Stirrer Automatic Heat Control and Water Velocity Based on PID (Proportional Integral Derivative)" *Procedia of Engineering and Life Science* Vol.1 No. 1. Madura: Program Studi Teknik Elektro, Fakultas Teknik, Universitas Trunojoyo Madura.
- [2] Chan, W. C. (2000). *Fmoc Solide Phase Peptide Synthesis A Practical Approach*. New York: Oxford University press.
- [3] Fernández-Pastor, I.; González-Menéndez, V.; Annang, F.; Toro, C.; Mackenzie, T.A.; Bosch-Navarrete, C.; Genilloud, O.; Reyes, F.i. Pipecolisporin, a Novel Cyclic Peptide with Antimalarial and Antitrypanosome Activities from a Wheat Endophytic *Nigrospora oryzae*. *Pharmaceuticals* 2021.
- [4] Hastrina Nova Sari. 2019. Tesis Aktivitas Antimalaria Ekstrak N-Heksan, Etil Asetat Dan Etanol Daun Sirsak (*Annona Muricata* L) Terhadap Mencit (*Mus Musculus*)

- Yang Diinfeksi Dengan Plasmodium Berghei. Medan: Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara.
- [5] Huan Y., Kong Q., Mou H., Yi Huaxi. (2020). Huan Y, Kong Q, Mou H and Yi H (2020). *Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields*. Front. Microbiol. 11:582779.
- [6] Kemenkes RI. (2013). *Riset Kesehatan Dasar ; RISKESDAS*. Jakarta: Balitbang Kemenkes RI.
- [7] Maharani R., Kurnia Y. D., Hidayat T. A., AL-Anshari J., Sumiarsa D., Harneti D., Nurlelasari, Supratman U. 2020. *Upaya Optimasi Sintesis Pentapeptida Leu Ala-Asn-Ala-Lys dengan Pengurangan Nilai Loading Resin*. *Chimica et Natura Acta* Vol. 8 No. 1: 2635.
- [8] Maharani, R. Yanti. E. F. (2016). *Sintesis Heptapeptida Linear (H-Tyr-Asp-Pro AlaProPro-Pro-OH) dengan menggunakan Dic/Oksima sebagai reagen pengkopling*. Bandung: Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjadjaran Bandung.
- [9] 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.
- [10] Manna Atiatul, Laksitorini M. D., Hudyanti D., Siahaan P. (2017). Molecular Docking of Interaction between E-Cadherin Protein and Conformational Structure of Cyclic Peptide ADTC3 (Ac-CADTPCNH2) Simulated on 20 ns, *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, Vol. 20, No. 1: 30-36.
- [11] Menze BD, Riveron JM, Ibrahim SS, Irving H, Antonio-Nkondjio C, Awono-Ambene PH, et al. Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Vector *Anopheles funestus* from Northern Cameroon Is Mediated by Metabolic Resistance Alongside Potential Target Site Insensitivity Mutations. *PloS One*. 2016;11(10):e0163261.
- [12] Pratiwi D.A, Kurniaty N., Arumsari A., Maharani R. 2021. Sintesis Tetrapeptida Linier FKAP (Phe-Lys-Ala-Pro) sebagai Kandidat Antioksidan dengan Metode Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS). Vol. 7 No. 2.
- [13] Pretzel J, Mohring F, Rahlfs S, Becker K. Antiparasitic peptides. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2013;135:157–92.
- [14] S. Lear, T. Munshi, AS Hudson, C. Hatton, J. Clardy, JA Mosely, TJ Bull, CS Sit, SL Cobb, *Org. Biomol. Kimia* 14 (2016) 4534.
- [15] Sewald N, Jakubke, Hans-Dieter. 2002. *Peptides: Chemistry and Biology*. Jerman: WileyVCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [16] Suhartati, T. 2017. Dasar-Dasar spektrofotometri UV-Vis dan spektrofotometri massa untuk penentuan struktur senyawa organik. Bandar Lampung: AURA CV. Anugrah Utama Raharja.
- [17] Sumiarsa, D. Marpaung. C., Zainuddin. A., Hidayat. T.A., Harneti. Maharani., R. (2019). *Sintesis Tetrapeptida PADY menggunakan Metode Fasa Padat dan Aktivitas Antioksidannya*. Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjadjaran Bandung: Jurnal Kimia Valensi.
- [18] 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.
- [19] Veronika Made, Sylvia Els-Heindl and Annette G, Beck-Sickinger. (2014). Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides. *Germany: Institute of Biochemistry, Faculty of Biosciences, Pharmacy and Psychology, Universität Leipzig, Brüderstraße 34*.
- [20] Walker, J. M., and Rapley, R., 2008. *Molecular Biomethods Handbook, 2nd Edition*. Humana Press. Totowa.
- [21] World Health Organization, *Global Malaria Programme, World Health Organization*.

World Malaria Report 2015.

[22] World Malaria Report. 2011. World Health Organization: Geneva. 13/12/2011