

## SINTESIS PREKURSOR SENYAWA BEAUVERICIN, ASAM (2R)- ASETILOKSIISOVALERAT

Rani Maharani\*, Taufiqqurahman & Dina Puspitasari

Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjadjaran  
Jalan Raya Bandung-Sumedang km 21 Jatinangor Kabupaten Sumedang 45363

\*Alamat Korespondensi: r.maharani@unpad.ac.id

---

**Abstrak:** Beauvericin merupakan heksadepsipeptida siklik yang diproduksi oleh berbagai jamur seperti *Beauveria bassiana* dan *Fusarium spp*. Penelitian mengenai sintesis senyawa beauvericin telah dilakukan melalui media mikrobiologi, namun sintesis dengan metode sintesis peptida masih belum banyak dilaporkan. Sedikitnya laporan mengenai sintesis senyawa beauvericin disebabkan sulitnya akses terhadap pengadaan material sintesis atau prekursor senyawa yang bersangkutan. Prekursor dari senyawa beauvericin adalah asam amino N-metilfenilalanin dan asam hidroksi isovalerat. Dalam kaitannya dengan sintesis total peptida dalam fase padat yang akan dilakukan, asam hidroksi isovalerat (Hiv) akan sulit ditambahkan ke dalam resin, sehingga senyawa ini harus ditambahkan kedalam resin dalam bentuk depsidipeptida, Fmoc-MePhe-Hiv. Sintesis depsidipeptida ini merupakan rangkaian 4 tahap reaksi, yakni, diazotisasi-perlindungan t-Bu-pelepasan asetiloksi-kopling. Dalam penelitian ini, tahap diazotisasi akan dilaporkan. Asam (2R)-asetiloksiisovalerat disintesis dari D-valin melalui reaksi pembentukan garam diazonium dengan penambahan NaNO<sub>2</sub> dan asam asetat. Proses sintesis dikontrol dengan kromatografi lapis dan dimurnikan dengan metode kromatografi kolom terbuka. Produk sintesis dikarakterisasi dengan berbagai teknik spektroskopi meliputi spektrofotometer inframerah, spektroskopi massa (LC-MS), <sup>1</sup>H-NMR dan <sup>13</sup>C-NMR. Senyawa asam (2R)-asetiloksiisovalerat diperoleh dengan rendemen 62,7%.

**Kata kunci:** Beauvericin, asam (2R)-asetiloksiisovalerat, NaNO<sub>2</sub>, and asam asetat glasial.

**Abstract:** Beauvericin is a cyclic hexapeptide produced by various fungi such as *Beauveria bassiana* and *Fusarium spp*. Research on the synthesis of beauvericin has been carried out through microbiological media, but the synthesis using a chemical synthesis method has not been widely reported. The limited articles about the synthesis of beauvericin is due to the difficulty of access to the procurement of materials synthesis or precursor compound. Beauvericin contains of precursors of N-metilfenilalanin amino acids and D-hydroxyisovaleric acid. Since the synthesis of beauvericin will be undertaken using a solid phase method, it will be difficult to add D-hydroxyisovaleric acid onto resin as the hydroxy acid form. So the D-hydroxyisovaleric acid will be added to the resin as depsipeptide, Fmoc-MePhe-Hiv. Synthesis of depsidipeptide is a four-step reaction, diazotisation-t-Bu protection-acetyl deprotection-coupling. In this article, we reported the diazotisation step. (2R)-acetyloxyisovaleric acid was synthesised from NaNO<sub>2</sub> and acetic acid. The synthesis process was controlled by thin layer chromatography. Product of the synthesis was characterised by using a range of spectroscopic methods including, infrared, mass spectrometry, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR. The desired product, (2R)-acetyloxyisovaleric acid, was obtained with a yield of 62.7%.

**Keywords:** Beauvericin, (2R)-acetyloxyisovaleric acid, NaNO<sub>2</sub>, and glacial acetic acid.

---

### PENDAHULUAN

Minat baru dalam karakterisasi struktur dan farmakologi peptida siklik dan siklodepsipeptida bahan alam ini memiliki sifat biologis berbeda yang dapat berguna dalam perkembangan terapeutik (Ballard *et al.*, 2002; Jimeno *et al.*, 2004). Siklodepsipeptida didefinisikan sebagai senyawa yang mengandung satu atau lebih dari asam amino dimana salah satunya diganti dengan asam hidroksi, yang menghasilkan suatu ikatan ester dalam cincin utamanya. Senyawa ini menjadi metabolit sekunder dari sejumlah tumbuhan dan fungi atau makhluk hidup dari lingkungan perairan laut (Seger *et al.*, 2004; Sabareesh *et al.*, 2007; Krska *et al.*, 2008). Senyawa-senyawa siklodepsipeptida telah banyak dilaporkan memiliki aktivitas biologis seperti

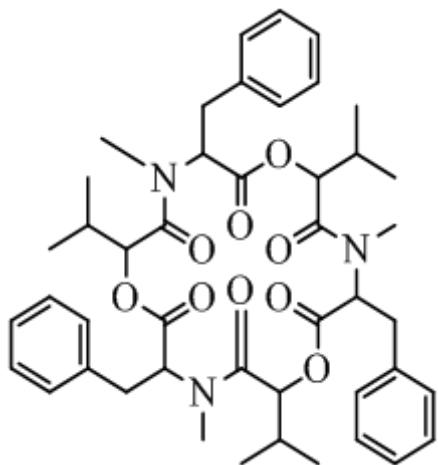
aktivitas antimikroba, anti tumor ataupun sebagai pestisida (Wang & Xu 2012; Maharani *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 1977).

Anggota dari kelompok senyawa siklodepsipeptida sangat berpotensi sebagai obat medik baru di dunia kedokteran. Aktivitas biologi yang sangat menarik ditunjukkan oleh senyawa-senyawa kelompok siklodepsipeptida seperti efek immunesupresan, antibiotik, antijamur, serta antikanker (Lemmens-Gruber *et al.*, 2009). Sejak ditemukannya didemnin, kelompok senyawa ini menjadi perhatian para peneliti dan menjadi fokus penelitian terutama dalam bidang sintesis.

Pada tahun 1969, senyawa beauvericin telah berhasil diisolasi untuk pertama kalinya oleh Hamill *et al.* (1969) dari jamur *Beauveria bassiana*.

---

Beauvericin adalah sebuah heksapeptida siklik (Gambar 1) yang memiliki kekerabatan dengan keluarga antibodi enniatin (Hamill *et al.*, 1969). Struktur dari beauvericin dibentuk dari tiga asam D-hidroksiisovalerat dan tiga asam *N*-metilfenilalanin.



**Gambar 2.** Struktur beauvericin

Wang & Xu (2012) telah melaporkan bahwa senyawa beauvericin memiliki aktivitas insektisida, antitumor, antivirus, antibakteri dan antijamur. Penelitian tentang sintesis dari senyawa beauvericin telah banyak dilakukan oleh para peneliti di berbagai penjuru dunia, seperti dengan menggunakan enzim-enzim spesifik (Peeters *et al.*, 1988) serta sintesis menggunakan asam amino terdehidrogenasi via pembentukan imidazol (Cizio, 2014). Namun perolehan yang relatif kecil menjadi tantangan tersendiri dalam mensintesis senyawa ini.

Tantangan besar dalam sintesis dari senyawa beauvericin disebabkan diantaranya adalah harga pereaksi dan bahan sintesis yang sangat mahal ataupun sulit didapatkan. Prekursor dari senyawa beauvericin terdiri dari asam hidroksi isovalerat dan asam amino *N*-metilfenilalanin. Asam hidroksi isovalerat diketahui memiliki harga yang fantastis dan dalam penelitian ini akan disintesis via intermediet garam diazonium. Produk yang dihasilkan dalam penelitian ini merupakan starting material untuk membentuk prekursor depsipeptida yang akan siap digunakan untuk sintesis total fasa padat kedepannya akan dikonjugasikan dengan Fmoc-*N*-metilfenilalanin untuk menghasilkan senyawa depsipeptida sebagai prekursor yang siap untuk digunakan untuk sintesis total senyawa beauvericin dengan metode sintesis peptida fase padat.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam asetat glasial, eter, natrium bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), asam klorida ( $\text{HCl}$ ) dan natrium nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ). Semua bahan yang digunakan adalah bahan yang pro analis.

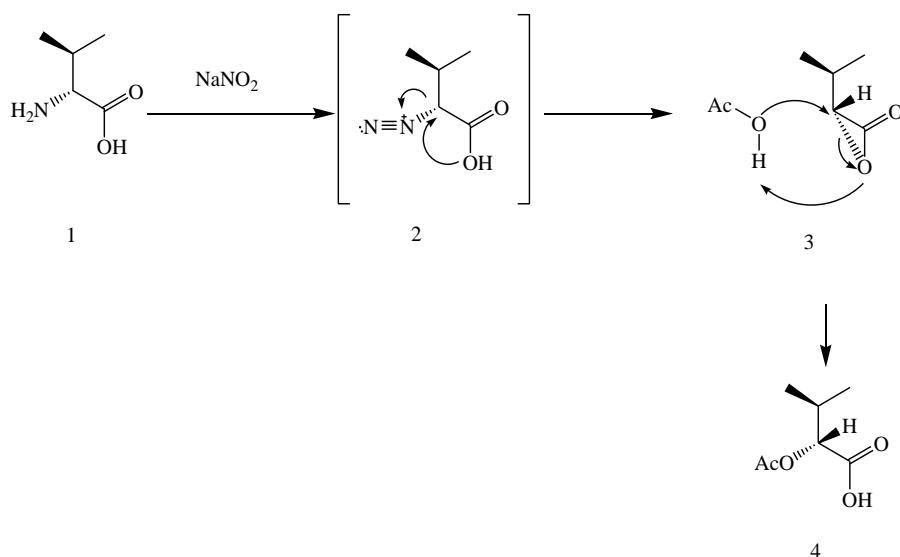
### Metode

D-valin (160 mmol) dilarutkan dalam asam asetat glasial (240 mmol) dan diaduk. Larutan yang dihasilkan, didinginkan perlahan hingga larutan mencapai suhu kamar. Larutan ini kemudian ditambahkan dengan natrium nitrit (320 mmol) dimana penambahan natrium nitrit dilakukan secara bertahap selama 1 jam. Setelah penambahan natrium nitrit selesai, larutan diaduk kembali selama 24 jam. Campuran reaksi kemudian diuapkan dan krud diekstraksi dengan larutan natrium bikarbonat. Larutan fase air yang sudah digunakan selanjutnya diturunkan pHnya dengan menambahkan asam klorida 2 N dan kemudian diekstraksi kembali dengan eter. Fase organik dikeringkan dan diuapkan untuk menghasilkan asam hidroksi yang memiliki gugus 2-hidroksi terlindungi oleh gugus asil.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Konversi asam D-valin dimulai dengan melarutkan sejumlah asam D valin dengan asam asetat. Pelarutan dilakukan dengan dua cara yaitu melarutkan dengan sonikator selama 30 menit serta melarutkan dengan *magnetic stirrer* selama 15 menit. Asam asetat berfungsi sebagai pelarut sekaligus nukleofil pada tahap ini. Setelah pengocokan selesai, dilakukan konversi gugus amino ( $\text{NH}_2$ ) menjadi gugus asetiloksi ( $\text{AcO}$ ) via pembentukan diazonium (Gambar 2). Campuran reaksi ini diaduk secara konstan dengan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 10°C dimana reaksi dilakukan dengan penggunaan *ice bath*. Pengadukan dilakukan selama 24 jam dan jalannya reaksi dipantau dengan KLT. Saat  $\text{NaNO}_2$  ditambahkan kedalam reaktor, terbentuk gas cokelat secara serta merta. Gas cokelat yang terbentuk disinyalir sebagai reaksi samping yang menghasilkan gas  $\text{NO}_2$ .

Metode pemantauan reaksi menggunakan KLT dipilih karena relatif mudah dan simpel. Pada pemantauan ini digunakan ninhidrin sebagai reagen penampak noda, dimana asam amino D-valin yang belum mengalami konversi akan bereaksi dengan ninhidrin menghasilkan senyawa kromofor berwarna ungu (Bottom *et al.*, 1978). Mekanisme reaksi ninhidrin dengan asam amino valin ini sesuai dengan reaksi basa Schiff dimana produk imina akan dihasilkan.



Gambar 2. Mekanisme konversi gugus amina menjadi gugus asetiloski.

Pelarut yang digunakan saat monitoring KLT tahap 1 ini adalah campuran pelarut antara metanol dan propanol 7:3. Penggunaan campuran pelarut memungkinkan noda produk akan berada tepat diatas *starting material* (Gambar 3). Reaksi dihentikan saat campuran reaksi tidak memberikan noda ungu pada pelat KLT setelah disemprot ninhidrin (setelah jam ke-24).

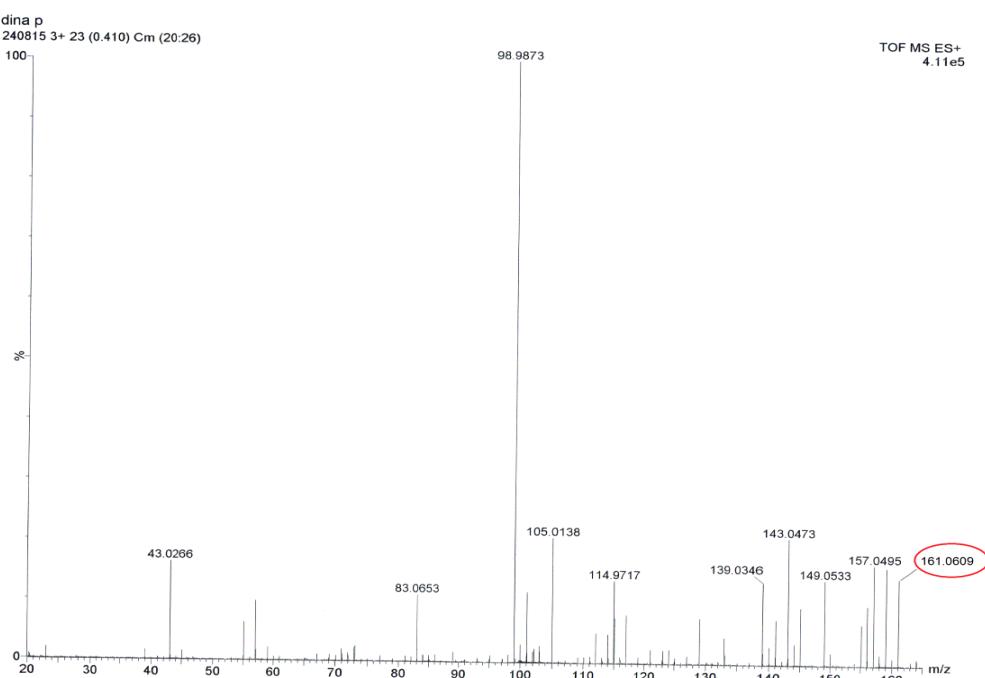


Gambar 3. Pemantauan reaksi dengan KLT silika GF<sub>254</sub> yang diebuli dengan propanol:metanol (7:3 v/v) serta menggunakan reagen penampak noda ninhidrin 10% dalam aseton yang diikuti pemanasan. Pada silika gel, totolan berturut-turut: starting material-starting material dan campuran reaksi-produk

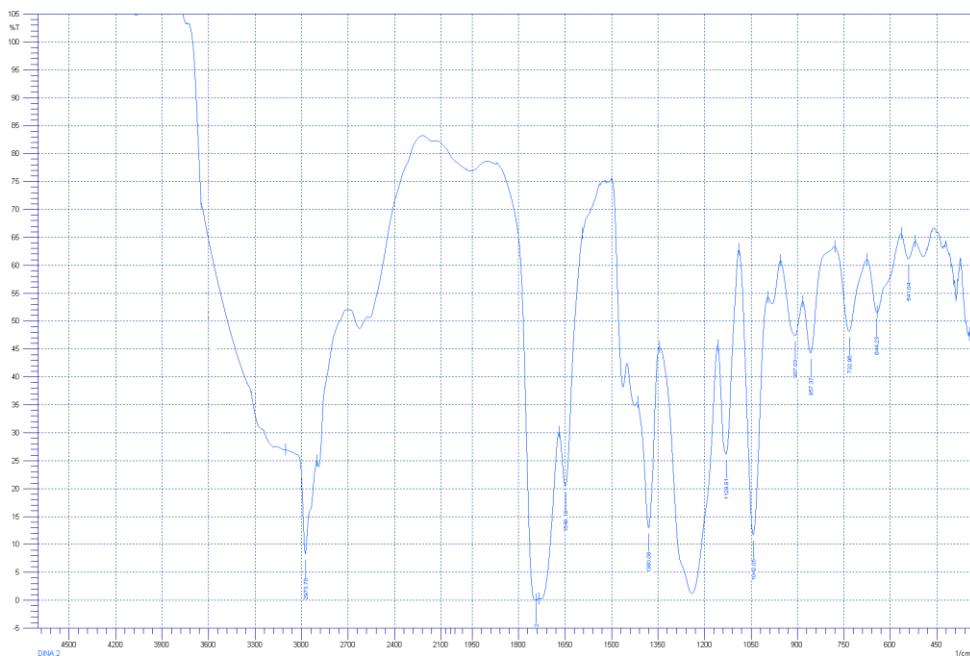
Setelah reaksi selesai, campuran reaksi diberi perlakuan untuk menghilangkan sisa-sisa *starting material* yang tidak bereaksi. Pelarut asam asetat yang tersisa dihilangkan dengan alat *rotatory evaporator* bervakum. Hasil evaporasi dari reaksi tahap 1 diekstraksi antara eter dan air dimana produk yang diharapkan berada pada fasa organik. Selanjutnya fraksi organik ini diekstraksi kembali dengan natrium bikarbonat. Produk tahap 1 akan bereaksi secara asam basa untuk membentuk garam natrium dan sehingga akan berada pada fasa air sedangkan sisa reaktan berlebih ataupun produk samping organik akan masuk ke fasa dietil eter. Fasa air selanjutnya ditambahkan asam (asam klorida 2N) hingga pH 2 untuk mengembalikan keasaman dari produk senyawa tahap 1. Satu spot noda pada KLT menunjukkan bahwa produk hasil reaksi tahap 1 siap untuk dikarakterisasi.

Setelah noda pada plat KLT menunjukkan satu spot, kemudian hasil reaksi ditimbang dan diperoleh sebanyak 1,7159g (*yield* 62,74%) dan dikarakterisasi dengan menggunakan *Quadrupole-Time of Flight-Mass Spectroscopy-Electron Spray* (Q-TOF-MS ES<sup>+</sup>). Spektrometri massa dengan Q-TOF-MS ES<sup>+</sup> merupakan salah satu metode spektroskopi untuk mengidentifikasi senyawa dengan cara mengetahui berat molekul dari suatu senyawa. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa produk yang diinginkan tersebut telah terbentuk.

Terbentuknya asam (2R)-asetiloskiisovalerat pada penelitian ini dibuktikan dengan munculnya puncak ion molekul [M+H]<sup>+</sup> dengan *m/z* = 161,0609 yang sesuai dengan massa terhitung dari asam (2R)-asetoksiisovalerat yaitu *m/z* = 160,0736 (Gambar 4).



**Gambar 4.** Spektrum Q-TOF-MS ES<sup>+</sup> senyawa asam (2R)-asetoksiisovalerat



**Gambar 5.** Spektrum IR asam (2R)-asetoksiisovalerat

Senyawa asam (2R)-asetoksiisovalerat (**4**) selanjutnya dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer inframerah (Gambar 5). Pengukuran serapan gelombang inframerah dalam suatu penentuan struktur bertujuan untuk menentukan gugus-gugus fungsi yang terdapat pada molekul tersebut.

Hasil pengukuran serapan inframerah pada senyawa **4** diperlihatkan pada Tabel 1 yang menunjukkan serapan dari beberapa gugus fungsi.

Spektrum IR menunjukkan adanya serapan dari gugus karboksilat yang khas dengan pita yang sangat lebar dari serapan pita O-H dan berimpit dengan serapan gugus COOH yaitu sekitar  $\nu_{\text{max}} 3310 \text{ cm}^{-1}$ , vibrasi regang C-H  $sp^3$  pada daerah  $\nu_{\text{max}} 2970 \text{ cm}^{-1}$ , vibrasi regang C=O (kuat, tajam) pada daerah  $\nu_{\text{max}} 1750 \text{ cm}^{-1}$  yang berasal dari ester dan pada daerah  $\nu_{\text{max}} 1730 \text{ cm}^{-1}$  yang berasal dari karboksilat, serta vibrasi regang C-O pada daerah  $\nu_{\text{max}} 1250 \text{ cm}^{-1}$  yang berasal dari ester.

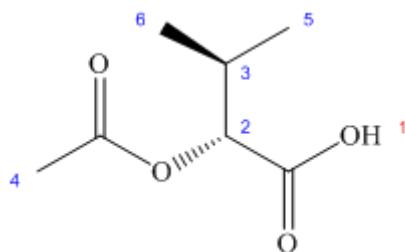
**Tabel 1.** Serapan pada spektrum IR dari asam (2R)-asetoksiisovalerat.

Gugus fungsi	$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Intensitas	Pita
O-H (karboksilat)	3310	Kuat	Lebar
C-H sp <sup>3</sup>	2970	Kuat	Tajam
C=O (ester)	1750	Kuat	Tajam
C=O (karboksilat)	1730	Kuat	Tajam
CH <sub>3</sub> -(C=O)	1380	Kuat	Tajam
C-O (ester)	1250	Kuat	Tajam

Analisis dilanjutkan dengan pengukuran NMR untuk memastikan bahwa produk yang terbentuk memiliki geseran kimia yang mendekati literatur.

Analisis NMR senyawa **4** meliputi analisis NMR proton serta NMR karbon. Hasil analisisnya dibandingkan dengan data pembanding dari Hughes & Sleebs (2005). Sinyal-sinyal proton menunjukkan nilai geseran kimia yang *overlap* dengan nilai geseran kimia pada senyawa literatur (Tabel 2), walaupun geseran kimia untuk proton OH tidak muncul pada hasil percobaan. Hal ini disebabkan pengukuran NMR tidak memberikan distribusi geseran kimia yang lebih lebar, sehingga kalau memang diperlukan, pengukuran proton NMR untuk senyawa **4** harus diulang. Nilai geseran yang mendekati dengan nilai geseran kimia pada literatur menunjukkan bahwa struktur **4** memiliki struktur dan stereokimia yang sama dengan produk hasil literatur (Tabel 2).

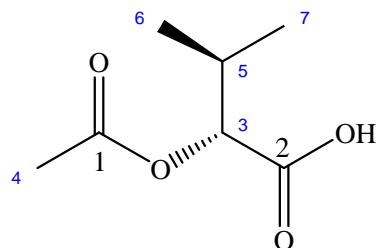
**Tabel 2.** Data hasil analisis proton NMR senyawa **4** dengan literatur pembanding hasil penelitian Hughes & Sleebs (2005)



Proton	$\delta$ H literatur	$\delta$ H percobaan	q
1	9,20,	-	br s
2	4,80	4,86	d
3	2,22-2,16	2,27	m
4	2,07	2,15	s
5	0,95	1,04	d
6	0,93	1,01	d

Selain nilai geseran pada NMR proton yang mendekati dengan nilai literatur, data nilai geseran NMR karbon juga memberikan kemiripan geseran kimia yang tinggi dengan literatur. Dengan demikian pada produk tahap 1 yaitu senyawa **4** telah terbukti terbentuk.

**Tabel 3.** Data hasil analisis karbon NMR senyawa **4** dengan literatur pembanding hasil penelitian Hughes & Sleebs (2005)



$\delta$ C literatur	$\delta$ C percobaan	Karbon
174,5	174,7	1
171,2	171,4	2
76,3	76,7	3
29,7	29,5	4
20,3	20,6	5
18,5	18,9	6
17,0	17,2	7

## KESIMPULAN

Senyawa prekursor asam (2R)-asetoksiisovalerat telah berhasil disintesis dari D-valin melalui reaksi diazotisasi dengan natrium nitrit dan asam asetat glasial dengan rendemen sebesar 62,74%.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada Hibah KLN-DIKTI untuk pendanaan penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ballard, C.E., Yu, H., & Wang, B. (2002). Recent developments in depsipeptide research. *Curr. Med. Chem.* 9, 471–98.  
 Bottom, C.B., Hanna, S.S., & Siehr, D.J. (1978). Mechanism of the ninhydrin reaction. *Biochem. Educ.* 6, 4–5.  
 Cizio, G.T., (2014). *Total synthesis of beauvericin using dehydroamino acid residues to facilitate cyclization.* PhD Thesis, University of California, Irvine.  
 Hamill, R.L., Higgens, C.E., Boaz, H.E. & Gorman, M. (1969). The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Lett.* 10, 4255–4258.  
 Hughes, A.B. & Sleebs, M.M. (2005). Total synthesis of bassiatin and its stereoisomers: novel divergent behavior of substrats in Mitsunobu cyclization. *J. Org. Chem.*, 70(8), 3079-3088  
 Jimeno, J., Faircloth, G., Sousa-Faro, J.F., Scheuer, P. & Rinehart, K. (2004). New marine derived anticancer therapeutics — a journey from the sea to clinical trials. *Mar. Drugs* 2, 14–29. doi:10.3390/md201014

- Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S. & Crews, C. (2008). Mycotoxin analysis: An update. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo Risk Assess.*, 25(2), 152-163.
- Lemmens-Gruber, R., Kamyar, M.R. & Dornetshuber, R. (2009). Cyclodepsipeptides - potential drugs and lead compounds in the drug development process. *Curr. Med. Chem.* 16, 1122-1137.
- Maharani, R., Brownlee, R.T.C., Hughes, A.B., & Abbott, B.M. (2014). A total synthesis of a highly N-methylated cyclodepsipeptide [2S,3S-Hmp]-aureobasidin L using solid-phase methods. *Tetrahedron* 70, 2351-2358.
- Peeters, H., Zocher, R. & Kleinkauf, H. (1988). Synthesis of beauvericin by a multifunctional enzyme. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 41, 352-359. doi:10.7164/antibiotics.41.352
- Sabareesh, V., Ranganayaki, R.S., Raghothama, S., Bopanna, M.P., Balaram, H., Srinivasan, M.C. & Balaram, P. (2007). Identification and characterization of a library of microheterogeneous cyclohexadepsipeptides from the fungus *isaria*. *J. Nat. Prod.* 70, 715-729. doi:10.1021/np060532e
- Seger, C., Sturm, S., Stuppner, H., Butt, T.M. & Strasser, H. (2004). Combination of a new sample preparation strategy with an accelerated high-performance liquid chromatography assay with photodiode array and mass spectrometric detection for the determination of destruxins from *Metarrhizium anisopliae* culture broth. *J. Chromatogr. A* 1061, 35-43.
- Suzuki, A., Kanaoka, M., Isogai, A., Tamura, S., Murakoshi, S. & Ichinoe, M. (1977). Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Tetrahedron Lett.* 18, 2167-2170.
- Wang, Q. & Xu, L. (2012). Beauvericin, a Bioactive Compound Produced by Fungi: A Short Review. *Molecules*, 17(3), 2367-2377.