

Sintesis Heksapeptida Linear Prolin-Leusin-Lisin-Leusin-Fenilalanin-Fenilalanin (PLKLFF) dan Aktivitas Antimikrobanya

Indriana Tasya¹, Regina Purwita Sari¹, Agosto Jeremia Giawa¹, Wirhanuddin¹, Gymnastiyar Kama Tasawa², Hanggara Arifian^{2,3}, Laode Rijai^{2,3}, Agung Rahmadani^{1*}

¹Program Studi Sarjana Pendidikan Kimia, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Mulawarman

²Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman

³Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Farmaka Tropis, Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman

Sitasi: Tasya, I., Sari, R. P., Giawa, A. J., Wirhanuddin, Tasawa, G. K., Arifian, H., Rijai, L., & Rahmadani, A. (2024). Sintesis Heksapeptida Linear Prolin-Leusin-Lisin-Leusin-Fenilalanin-Fenilalanin (PLKLFF) dan Aktivitas Antimikrobanya. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 10(1), 89-97. <https://doi.org/10.35311/jmpi.v10i1.478>

Submitted: 22 Februari 2024

Accepted: 13 Mei 2024

Published: 26 Juni 2024

*Penulis Korespondensi:

Agung Rahmadani

Email:

agungrahmadani@fkip.unmul.ac.id



Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

ABSTRAK

Resistensi terhadap antibiotik konvensional memiliki tingkat kejadian yang cukup tinggi. Dibutuhkan pengembangan antibiotik baru salah satunya golongan senyawa peptida yang merupakan kandidat yang potensial sebagai agen antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis peptida baru dan mengevaluasi aktivitas antimikrobanya. Peptida antimikroba dapat didesain menggunakan *machine learning* iAMPpred dengan menganalisis nilai tertinggi probabilitas antibakteri dan antijamur. Peptida disintesis secara kimia di laboratorium menggunakan metode sintesis peptida fase padat dan diuji aktivitas antimikrobanya dengan menggunakan metode dilusi untuk menghitung nilai *Minimum Inhibitory concentration* (MIC). Hasil penelitian menunjukkan desain heksapeptida linear Prolin-Leusin-Lisin-Leusin-Fenilalanin-Fenilalanin (PLKLFF) memiliki nilai probabilitas tertinggi dengan nilai probabilitas antibakteri 0,87 dan probabilitas antijamur 0,91. Heksapeptida linear ini berhasil disintesis menggunakan metode sintesis peptida fase padat dengan rendemen sebesar 93,32%. Keberhasilan sintesis dikonfirmasi menggunakan spektrofotometer infra merah dan spektroskopi massa. Senyawa heksapeptida linear PLKLFF memiliki aktivitas antijamur/fungistatik sedang terhadap jamur *C. albicans* ATCC 10231 dengan nilai MIC 312,5 µg/mL dan tidak aktif terhadap bakteri *E. coli* ATCC 11229 dan *S. aureus* ATCC 6538.

Kata Kunci : Antimikroba, Heksapeptida, iAMPpred, PLKLFF, Sintesis Peptida

ABSTRACT

Resistance to conventional antibiotics has a fairly high incidence rate. It is necessary to develop new antibiotics, one of which is the peptide compound class which is a potential candidate as an antimicrobial agent. Antimicrobial peptides can be designed using iAMPpred machine learning by analyzing the highest antibacterial and antifungal probability values. Peptides are chemically synthesized in the laboratory using the solid phase peptide synthesis method and tested for antimicrobial activity using the dilution method to calculate the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) value. The results showed that the linear hexapeptide Proline-Leucine-Lysine-Leucine-Phenylalanine-Phenylalanine (PLKLFF) design had the highest probability value with an antibacterial probability value of 0.87 and an antifungal probability of 0.91. This linear hexapeptide was successfully synthesized using the solid phase peptide synthesis method with a yield of 93.32%. The success of the synthesis was confirmed using infrared spectrophotometer and mass spectroscopy. The linear hexapeptide PLKLFF has moderate antifungal/fungistatic activity against the fungus *C. albicans* ATCC 10231 with an MIC value of 312.5 µg/mL and is not active against the bacteria *E. coli* ATCC 11229 and *S. aureus* ATCC 6538.

Keywords : Antimicrobial, Hexapeptide, iAMPpred, PLKLFF, Peptide Synthesis

PENDAHULUAN

Sejalan dengan perkembangan dan penggunaan antibiotik, munculnya resistensi terjadi dikarenakan penggunaan obat antibiotik yang tidak prosedural dan tidak terkontrol sehingga mikroba patogen menjadi resisten (Rahman, 2019; Uddin *et al.*, 2021). Tingginya kejadian resistensi terhadap antibiotik konvensional menyebabkan dibutuhkan pengembangan golongan antibiotik baru. Peptida antimikroba (PAM) merupakan salah satu kandidat antibiotik yang ideal (Huan *et al.*, 2020; Luong *et al.*, 2020).

Sebagian besar PAM bekerja langsung pada membran bakteri, sehingga bakteri sulit mengembangkan kekebalan terhadap peptida antimikroba (Kumar *et al.*, 2018). Tidak seperti kebanyakan antibiotik konvensional, peptida antimikroba dapat meningkatkan kekebalan dengan bertindak sebagai imunomodulator (Viruly, 2022). Kekuatan terapeutik PAM yang utama adalah karena sifat litiknya. PAM dapat menyebabkan pembentukan pori-pori atau pecahnya membran sel pada sel patogen. PAM telah terbukti membunuh berbagai macam mikroba, termasuk bakteri, jamur, dan bakteri yang resisten terhadap obat. PAM bekerja dengan pembentukan pori-pori multimerik dalam membran sel yang menyebabkan lisis (Kumar *et al.*, 2018; Luong *et al.*, 2020).

Desain dan perancangan PAM sintetik dapat dilakukan melalui *machine learning*. Sebuah aplikasi *machine learning* CAMP_{R4} dan iAMPpred dapat melakukan prediksi peptida yang bersifat antimikroba berdasarkan database peptida alami dan sintetik yang diketahui memiliki sifat antimikroba (Gawde *et al.*, 2023; Meher *et al.*, 2017). Adanya *machine learning* ini dapat membantu dalam perancangan/desain peptida sintetik yang memiliki aktivitas antimikroba sebagai dasar sintesis peptida secara kimia di laboratorium.

Salah satu metode sintesis peptida, yaitu sintesis peptida fase padat (Maharani, 2018). Keuntungan umum dari sintesis fase padat adalah pemurnian yang mudah dan pembentukan intermediat peptida linear yang cepat (Ferrazzano *et al.*, 2022; Isidro-Llobet *et al.*,

2019). Rahmadani *et al.* (2021) berhasil mensintesis heksapeptida linear Prolin-Leusin-Prolin-Leusin-Fenilalanin-Fenilalanin (PLPLFF) sebagai prekursor peptida siklik antimikroba eksperimental B menggunakan metode sintesis peptida fase padat. Heksapeptida linear ini dapat dijadikan dasar perancangan heksapeptida linear yang memiliki aktivitas antimikroba.

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, maka perlu dikembangkan senyawa heksapeptida linear baru dan mengevaluasi aktivitas antimikrobanya. Dalam penelitian ini, perancangan/desain heksapeptida linear menggunakan *machine learning* iAMPpred dan sintesis senyawa heksapeptida linear sebagai kandidat peptida antimikroba menggunakan metode sintesis peptida fase padat serta menguji aktivitas antimikroba (MIC) dari heksapeptida linear tersebut. Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh senyawa heksapeptida linear hasil sintesis yang memiliki aktivitas antimikroba.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah tabung sintesis (reaktor) peptida fase padat (tabung SPPS), *rotary evaporator*, *rotary suspension mixer*, *magnetic stirrer*, *Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) merk Waters 1500 series, detektor *Photo Diode Array* (PDA), Spektrofotometer inframerah (FTIR) (Nicolet Summit Thermoscientific), Spektroskopi massa (HR-TOF-MS) Lockspray Waters, Spektrofotometer UV-Vis Genesys 10, labu filtrasi, *laminar air flow*, cawan petri dan alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

Bahan

Bahan yang digunakan adalah resin 2-klorotritilklorida (2-CTC), Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, HATU, HOAt, *N,N*-dimethylformamide (DMF), Diisopropiletilamina (DIPEA), 4-metilpiperidin, larutan kloranil, asam trifluoroasetat (TFA), asetonitril (MeCN), metanol, diklorometana (DCM),

dimetilsulfoksida (DMSO), *nutrien broth*, biakan bakteri *E. coli* ATCC 11229, *S. aureus* ATCC 6538 dan jamur *C. albicans* ATCC 10231.

Perancangan Heksapeptida Linear

Desain atau perancangan heksapeptida linear dengan dasar sekuens Prolin-Leusin-Prolin-Leusin-Fenilalanin-Fenilalanin (PLPLFF). Selanjutnya dilakukan variasi penggantian salah satu sekuens dengan asam amino lisin. Desain sekuens yang dirancang disimulasikan menggunakan *machine learning* iAMPpred

(<http://cabgrid.res.in:8080/amppred/>). *Machine learning* akan melakukan prediksi sekuens yang berpotensi sebagai peptida antimikroba dengan melihat nilai probabilitas PAM. Semakin mendekati nilai 1, maka sekuens peptida memiliki probabilitas terbaik sebagai peptida antimikroba. Peptida terpilih sebagai dasar untuk dilakukan sintesis menggunakan metode sintesis peptida fase padat.

Sintesis Heksapeptida Linear Prolin-Leusin-Lisin-Leusin-Fenilalanin-Fenilalanin (PLKLFF)

Sebanyak 0,3 g resin 2-klorotritil klorida (0,99 mmol/g) disuspensikan dalam DCM pada reaktor SPPS, kemudian dikocok selama 5 menit dan disaring. Larutan 0,6 mmol Fmoc-AA1-OH dan 1,2 mmol DIPEA dilarutkan dalam 4 mL DCM dan ditambahkan ke resin yang kemudian dikocok selama 4 jam pada suhu ruang. Resin disaring, kemudian dicuci dengan DMF dan DCM. Sebanyak 5 mL campuran larutan DCM/metanol/DIPEA (7:2:1) ditambahkan ke resin yang kemudian dikocok selama 2x10 menit. Resin dicuci dengan DMF dan DCM lalu disaring. Reagen pelepas gugus pelindung Fmoc (20% 4-metilpiperidin dalam DMF) ditambahkan hingga resin terendam dan campuran reaksi dikocok selama 2x5 menit yang kemudian reagen pelepas gugus pelindung dikeluarkan dengan cara filtrasi. Dilakukan pengujian kloranil terhadap sedikit resin untuk mengetahui lepasnya gugus Fmoc. Kloranil akan menghasilkan warna resin biru kehitaman. Setelah itu resin dicuci dengan DMF dan DCM.

Sebanyak Fmoc-Phe-OH (3 ek.), HATU (3 ek.), HOAt (3 ek.), DIPEA (6 ek.) ditambahkan 4 mL DMF dan dikocok hingga larut. Larutan direaksikan selama 4 jam. Keberhasilan sintesis ditunjukkan dengan uji kloranil. Hasil uji negatif (reaksi kopling sempurna) ditunjukkan dengan larutan tidak berwarna dengan butiran resin berwarna kekuning-kuningan. Selanjutnya resin dicuci menggunakan DMF dan DCM. Lalu dilanjutkan ke tahap pelepasan gugus Fmoc. Asam amino selanjutnya AA3 hingga AA6 disusun menggunakan prosedur kopling dan pelepasan gugus pelindung Fmoc hingga didapatkan rantai peptida yang sesuai. Peptida yang telah disusun kemudian dilepas dari resin menggunakan 10 mL campuran TFA: aquades (95:5) dan diaduk selama 2x60 menit pada suhu ruang. Lepasnya peptida dari resin ditandai dengan berubahnya warna resin menjadi hitam. Resin disaring dan dicuci menggunakan diklorometana. Filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Padatan peptida yang diperoleh kemudian dianalisis dengan RP-HPLC analitik dan dikarakterisasi menggunakan spektroskopi massa dan spektrofotometer infra merah (FTIR).

Pengujian Aktivitas Antimikroba

Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan menggunakan metode mikrodilusi untuk menentukan konsentrasi terendah dari senyawa uji yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Bakteri *E. coli* ATCC 11229, *S. aureus* ATCC 6538 dan jamur *C. albicans* ATCC 10231 yang telah diinokulasikan ke dalam media pertumbuhan dimasukkan ke dalam media *nutrient broth* (NB) dengan standar McFarland 0,5. *Loading* sampel heksapeptida linear PLKLFF dilarutkan dalam DMSO 2% dengan konsentrasi 5 mg/mL (5000 ppm) dan diencerkan secara bertingkat. Selanjutnya sampel diinkubasi pada 96-well microplates pada suhu 37°C selama 24 jam. Pembacaan data diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) diukur dengan menghitung presentasi penghambatan

(pertumbuhan) mikroba pada 96-well microplates (Maharani *et al.*, 2021).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada tahap awal penelitian dilakukan perancangan/desain heksapeptida linear menggunakan *machine learning* iAMPpred dengan dasar sekuens Prolin-Leusin-Prolin-Leusin-Fenilalanin-Fenilalanin (PLPLFF), dimana dari sekuens dasar tersebut dilakukan variasi penggantian salah satu sekuens dengan asam amino lisin. Penggantian dengan asam amino lisin bertujuan untuk mendapatkan desain peptida yang memiliki aktivitas antimikroba yang lebih baik. Lisin merupakan asam amino kationik yang dapat meningkatkan

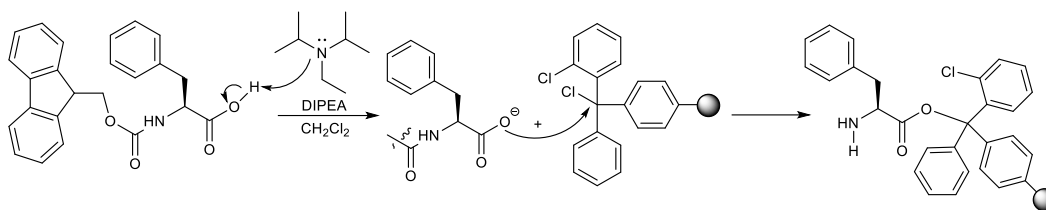
aktivitas antimikroba dari peptida (Luong *et al.*, 2018; Luong *et al.*, 2020). *Machine learning* akan melakukan prediksi sekuens yang berpotensi sebagai peptida antimikroba dengan melihat nilai probabilitas PAM (antibakteri dan antijamur). Semakin mendekati nilai 1, maka sekuens peptida memiliki probabilitas terbaik sebagai peptida antimikroba (PAM). Hasil iAMPpred menunjukkan desain heksapeptida linear (PLKLFF) memiliki nilai probabilitas antimikroba yang paling tinggi yaitu antibakteri (0,87) dan antijamur (0,91), sehingga desain ini yang dipilih untuk disintesis. Hasil perancangan/desain heksapeptida linear pada *machine learning* iAMPpred dapat dilihat di Tabel 1.

Tabel 1. Hasil perancangan heksapeptida linear dengan *machine learning* iAMPpred

No.	Sekuens	Antibakteri	Antijamur
1	PLPLFF (dasar)	0,77	0,74
2	PLPLFK	0,86	0,78
3	PLPLKF	0,86	0,78
4	PLPKFF	0,77	0,82
5	PLKLFF	0,87	0,91
6	PKPLFF	0,77	0,81
7	KLPLFF	0,86	0,90

Sintesis senyawa target heksapeptida linear PLKLFF dilakukan menggunakan metode sintesis peptida fase padat dengan strategi penggunaan gugus pelindung Fmoc/Boc dan resin 2-klorotritil klorida (CTC). Fmoc-Phe-OH sebagai asam amino C-terminal direaksikan dengan resin 2-CTC yang telah dilakukan pengembangan terlebih dahulu menggunakan diklorometana (DCM). Reaksi ini berlangsung selama 4 jam dalam kondisi basa DIPEA dan pelarut DCM. Reaksi pengikatan asam amino Fmoc-Phe-OH pada resin merupakan reaksi SN_1 yang melibatkan atom O pada gugus karboksil asam amino sebagai nukleofil dan C tersier pada gugus tritil pada resin sebagai karbokation (elektrofil) untuk membentuk ikatan ester. Hidrogen dari karboksilat asam amino

dideprotonasi/diabstraksi oleh basa DIPEA membentuk nukleofilik. Selanjutnya, nukleofil menyerang C tersier gugus tritil klorida resin dan atom Cl menjadi gugus pergi. Fmoc-Phe-OH yang terikat pada resin 2-CTC dikuantifikasi dengan mengukur absorbansi resin yang telah dilarutkan pada 20% 4-metilpiperidin dalam DMF pada panjang gelombang 290 nm (Maharani, 2018). Pada pengikatan asam amino pertama didapatkan nilai *Loading Resin* sebesar 0,65 mmol/g. Nilai *Loading Resin* yang baik berkisar pada rentang 0,20-1,30 mmol/g (Maharani *et al.*, 2021). Hal tersebut menunjukkan bahwa reaksi pengikatan asam amino pertama (Fmoc-Phe-OH) terhadap resin berlangsung dengan baik (Gambar 1).

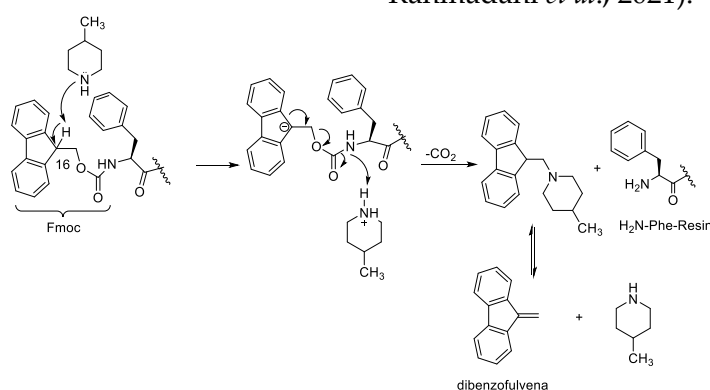


Gambar 1. Pengikatan asam amino pertama (Fmoc-Phe-OH) pada resin 2-klorotritil klorida dengan bantuan basa DIPEA

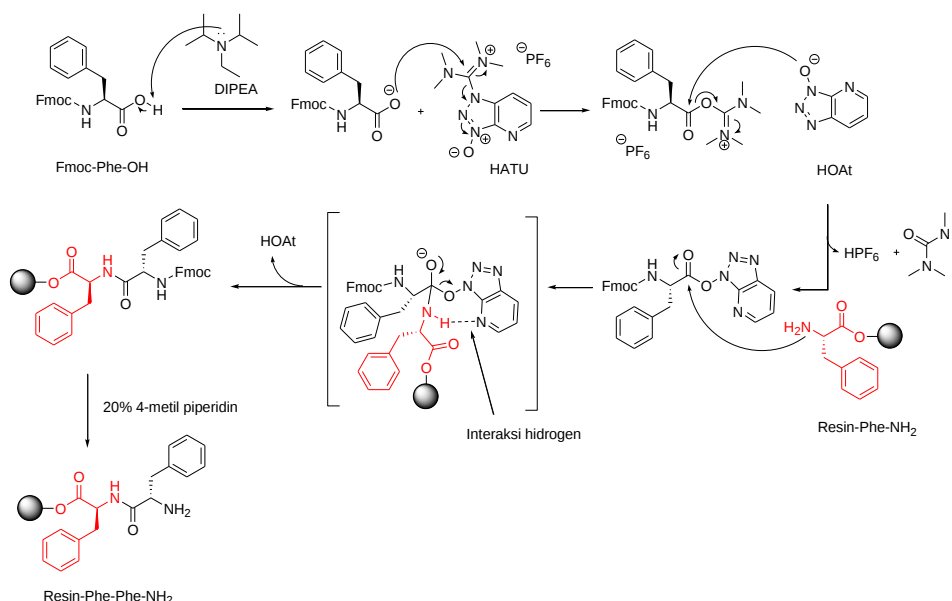
Tahap selanjutnya adalah *capping* resin untuk menonaktifkan gugus aktif resin yang tidak bereaksi dengan asam amino pertama. Pada tahap ini, ditambahkan metanol, DIPEA, dan DCM dengan rasio 2 : 1 : 7 ke dalam resin. Campuran resin kemudian di *shaker* selama 2x15 menit. Gugus Fmoc pada fenilalanin dideproteksi dengan menggunakan 20% 4-metilpiperidin dalam DMF selama 2x5 menit. Selanjutnya, resin dicuci dengan DCM dan DMF secara bergantian, dan dikeringkan. Reaksi deproteksi berlangsung melalui mekanisme beta eliminasi karbanion (Gambar 2). Atom hidrogen C-16 teraktivasi oleh aromatisitas kedua cincin benzena, anion karboksilat sebagai gugus pergi. Abstraksi proton C-16 oleh basa 4-metilpiperidin (sebagai nukleofilik) menyebabkan delokalisasi elektron. Delokalisasi elektron menyebabkan lepasnya gas karbondioksida (dekarboksilasi) dan Fmoc-4-metilpiperidin yang membentuk kesetimbangan menjadi dibenzofulvena (Maharani, 2018). Keberhasilan tahap ini dapat dimonitoring dengan uji kloranil untuk mendeteksi adanya gugus amina sekunder bebas. Sedikit resin direaksikan dengan larutan kloranil, dan deproteksi Fmoc berhasil,

dikarenakan resin berubah dari warna kuning menjadi hitam.

Gugus amino bebas hasil deproteksi pada fenilalanin-resin ($\text{NH}_2\text{-Phe-resin}$) di *coupling* dengan asam amino kedua (Gambar 3), yaitu Fmoc-Phe-OH. Sebanyak Fmoc-Phe-OH (6 ek.), HATU (6 ek.), HOAt (6 ek.), DIPEA (12 ek.), ditambahkan DMF:DCM (1 : 1) dan dikocok hingga larut, selanjutnya direaksikan dengan $\text{NH}_2\text{-Phe-resin}$ selama 4 jam pada suhu ruang. Reagen HATU diketahui dapat mengaktivasi gugus karboksilat pada asam amino dengan membentuk intermediat ester yang lebih aktif. Gugus ester yang terbentuk akan memiliki sifat sebagai gugus pergi yang baik dalam kondisi basa, sehingga dapat memicu nukleofil amino dari $\text{NH}_2\text{-Phe-resin}$ untuk menyerang gugus karboksilat yang teraktivasi dan membentuk ikatan peptida/amida. Selain itu, reagen kopling aditif HOAt berfungsi agar reaksi pembentukan peptida lebih terbatas oleh ruang, dengan cara membentuk interaksi hidrogen intramolekular dengan gugus $\text{N}\alpha\text{-amino}$ dari asam amino kedua sehingga laju rasemisasi dapat ditekan. Asam amino lisin memerlukan waktu reaksi *coupling* yang lebih lama (Maharani, 2018; Rahmadani *et al.*, 2021).



Gambar 2. Reaksi deproteksi gugus Fmoc menggunakan 4-metilpiperidin



Gambar 3. Mekanisme kopling pembentukan ikatan amida pada sintesis peptida fase padat menggunakan kombinasi reagen kopling HATU/HOAt dan basa DIPEA serta reaksi deproteksi menggunakan 20% 4-metil piperidin dalam DMF (Maharani, 2018; Rahmadani *et al.*, 2021)

Keberhasilan reaksi *coupling* amida dengan metode sintesis peptida fase padat dapat ditingkatkan dengan penambahan jumlah ekuivalen (ek.) asam amino, reagen pengkopling dan basa DIPEA karena reaksi berlangsung pada dua fase yang berbeda. Keberhasilan *coupling* asam amino dalam sintesis peptida dapat dimonitoring dengan uji kloranil yang menunjukkan hasil uji negatif dengan resin tetap berwarna kuning. Tahap selanjutnya adalah deproteksi gugus pelindung Fmoc menggunakan 20% 4-metilpiperidin dalam DMF selama 2x5 menit. Setelah itu, *coupling* asam amino ketiga yang dilakukan berulang hingga asam amino keenam sampai diperoleh heksapeptida linear pada resin. Tahap terakhir, yaitu pelepasan semua heksapeptida linear (*cleavage*) dilakukan dalam kondisi reaksi TFA:aquades (95 : 5) selama 2x60 menit. Larutan dari hasil reaksi kemudian ditampung pada wadah dan dilakukan evaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga dihasilkan padatan heksapeptida linear PLKLFF. Skema dan reagen dalam sintesis heksapeptida linear PLKLFF dapat dilihat pada Gambar 4.

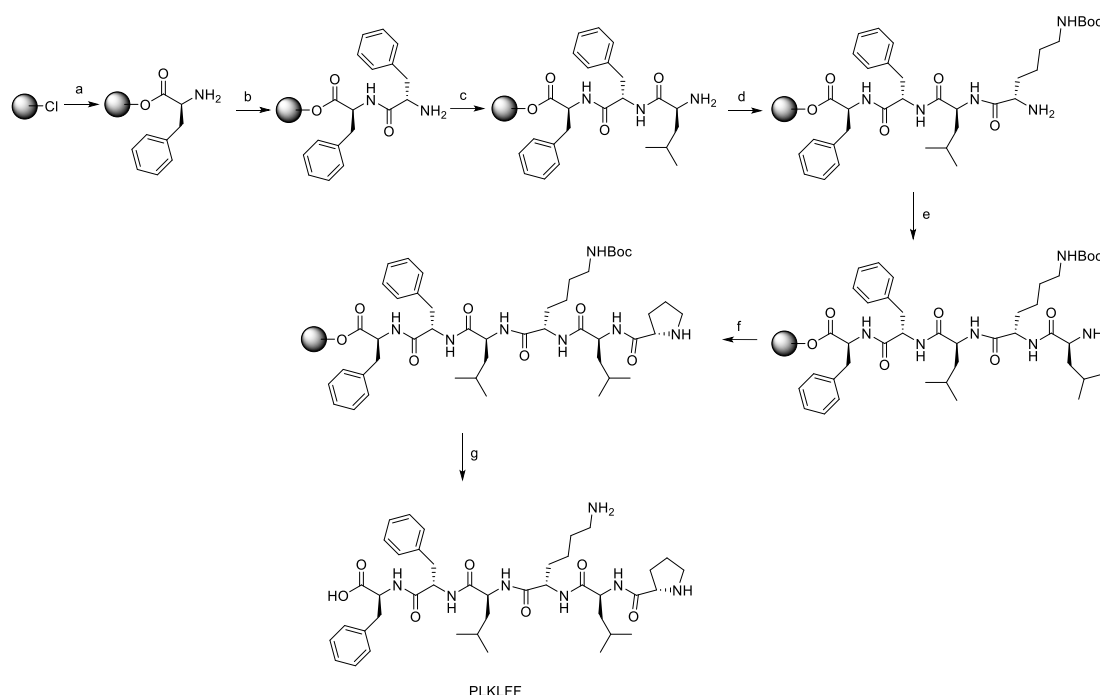
Hasil sintesis kemudian dianalisis kemurniannya dengan RP-HPLC analitik. Kromatogram RP-HPLC analitik pada Gambar

5 menunjukkan senyawa heksapeptida linear PLKLFF berada pada waktu retensi 24,8 menit dengan kemurnian senyawa sebesar 90,85%. Nilai kemurnian diatas 90% menunjukkan senyawa ini memiliki kemurnian yang cukup tinggi. Dari hasil sintesis dihasilkan padatan putih heksapeptida linear PLKLFF sebanyak 139 mg. Rendemen sintesis heksapeptida linear PLKLFF sebesar 93,32%.

Karakterisasi senyawa heksapeptida linear PLKLFF dilakukan menggunakan spektrofotometer inframerah (FTIR) dan spektroskopi massa. Spektrum FTIR (Gambar 6) menunjukkan stretching NH (amina sekunder) pada bilangan gelombang 3279 cm⁻¹ dan stretching C=O (karbonil amida) pada bilangan gelombang 1628 cm⁻¹. Diperkuat dengan adanya bending NH (amida) pada bilangan gelombang 1530 cm⁻¹ dan stretching C-N pada bilangan gelombang 1130 dan 1180 cm⁻¹ (Nandiyanto *et al.*, 2023). Bilangan gelombang ini merupakan penciri adanya ikatan peptida dalam struktur senyawa PLKLFF. Begitu pula adanya bilangan gelombang 1393 cm⁻¹ yang menandakan keberadaan isopropil dari leusin serta bilangan gelombang 2954 dan 3067 cm⁻¹ yang menandakan adanya stretching CH sp³. Sedangkan hasil analisis spektroskopi massa (Gambar 7) menunjukkan nilai m/z 764,8555

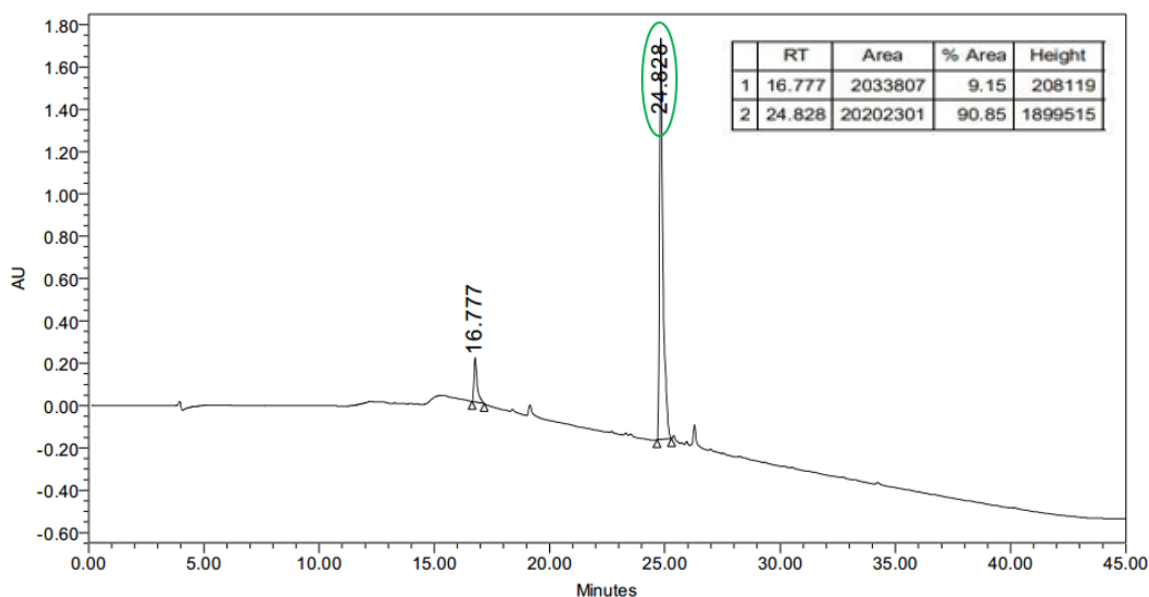
sebagai $[M+H]^+$ dengan rumus molekul $C_{41}H_{61}N_7O_7^+$. Nilai ini sesuai dengan massa molekul senyawa PLKLFF, sehingga

berdasarkan analisis FTIR dan spektroskopi massa maka dapat dibuktikan senyawa PLKLFF telah berhasil disintesis.

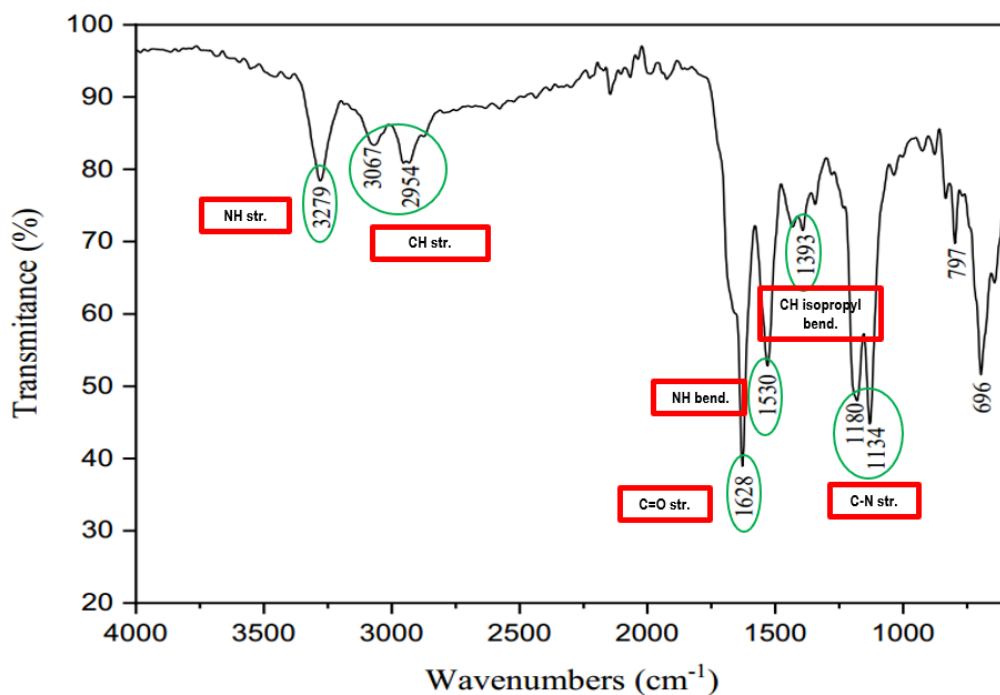


Gambar 4. Skema dan reagen sintesis heksapeptida linear PLKLFF.

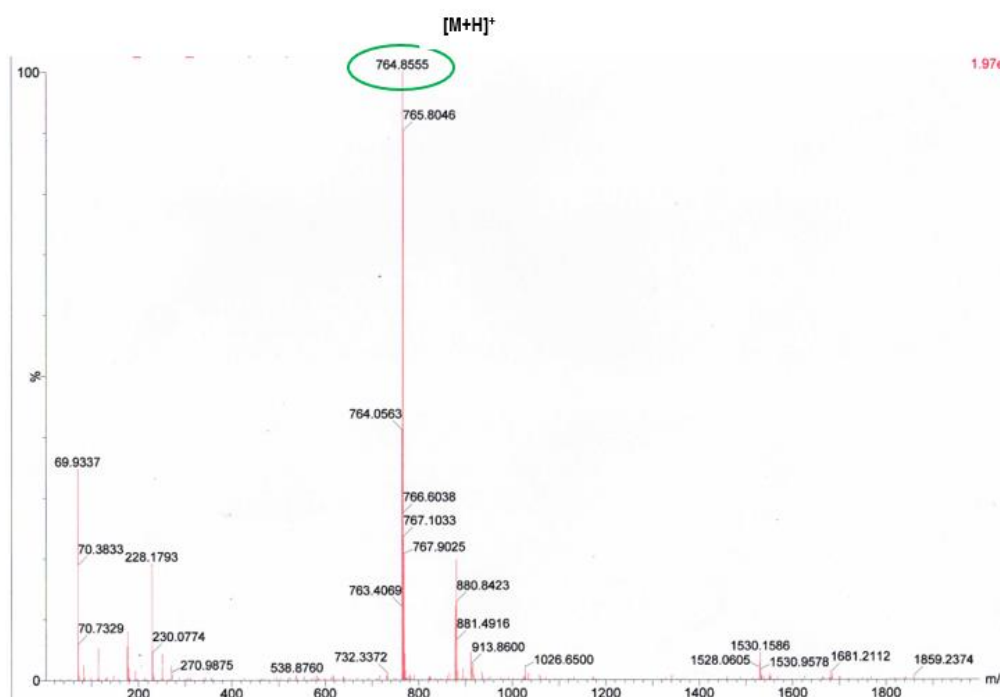
Keterangan reagen dan kondisi: (a) (1) Fmoc-Phe-OH, DIPEA, DCM, 4 jam, suhu kamar; (2) MeOH/DCM/DIPEA (2:7:1), (3) 20% 4-metilpiperidin dalam DMF, (b) Fmoc-Phe-OH, HATU, HOAt, DIPEA, DMF, 4 jam, suhu kamar (2) 20% 4-metilpiperidin dalam DMF, (c) Fmoc-Leu-OH, HATU, HOAt, DIPEA, DMF, 4 jam, suhu kamar, (2) 20% 4-metilpiperidin dalam DMF, (d) Fmoc-Lys(Boc)-OH, HATU, HOAt, DIPEA, DMF, 2x4 jam, suhu kamar, (2) 20% 4-metilpiperidin dalam DMF, (e) (1) Fmoc-Leu-OH, HATU, HOAt, DIPEA, DMF, 4 jam, suhu kamar (2) 20% 4-metilpiperidin dalam DMF (f) Fmoc-Pro-OH, HATU, HOAt, DIPEA, DMF, 4 jam, suhu kamar (2) 20% 4-metilpiperidin dalam DMF (g) TFA: aquades (95:5), 2x60 menit, suhu kamar.



Gambar 5. Kromatogram RP-HPLC analitik heksapeptida linear PLKLFF ($R_t = 24,8$ menit). Metode elusi gradien dengan fase gerak 0% B (0-5 menit), 5% (5-10 menit), 95% (10-40 menit), 95% (40-45 menit). A= 0,1% TFA/H₂O; B = MeCN. Laju alir 1 mL/menit, detektor PDA λ 210 nm



Gambar 6. Spektrum FTIR senyawa heksapeptida linear PLKLFF



Gambar 7. Spektrum massa senyawa heksapeptida linear PLKLFF

Senyawa heksapeptida linear PLKLFF yang telah dikarakterisasi selanjutnya diuji aktivitas antimikrobanya terhadap bakteri *E. coli* ATCC 11229, *S. aureus* ATCC 6538 dan jamur *C. albicans* ATCC 10231 menggunakan metode dilusi. Aktivitas antimikroba heksapeptida linear PLKLFF ditunjukkan pada Tabel 2. Dari nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) yang dihasilkan

menunjukkan heksapeptida linear PLKLFF memiliki aktivitas antijamur/fungistatik sedang terhadap jamur *C. albicans* ATCC 10231 sedangkan terhadap bakteri *E. coli* ATCC 11229 dan *S. aureus* ATCC 6538 tidak aktif sebagai antibakteri. Kategori berdasarkan nilai MIC > 1000 µg/mL (tidak aktif), MIC 512-1000 µg/mL (aktivitas rendah), MIC 128-512 µg/mL (aktivitas sedang), MIC 32-128 µg/mL (aktivitas

baik), MIC 10-32 µg/mL (aktivitas kuat), MIC < 10 µg/mL (aktivitas sangat kuat) (Ramic *et al.*, 2021). Aktivitas antijamur dimungkinkan keberadaan asam amino lisin yang ada pada sekuens PLKLFF. Keberadaan asam amino lisin memberikan muatan kationik pada peptida.

Akibatnya peptida akan lebih selektif pada membran fosfolipid yang bermuatan negatif dan memberi jalan dalam kerusakan membran sehingga akan mengalami lisis dan kematian (Luong *et al.*, 2020).

Tabel 2. Nilai MIC (µg/mL) senyawa PLKLFF

Senyawa	<i>E. coli</i> ATCC 11229	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
PLKLFF	2500	1250	312,5

KESIMPULAN

Senyawa heksapeptida linear Prolin-Leusin-Lisin-Leusin-Fenilalanin-Fenilalanin (PLKLFF) berhasil disintesis menggunakan metode sintesis peptida fase padat dengan rendemen sintesis sebesar 93,32%. Keberhasilan sintesis PLKLFF ditandai pembentukan ikatan peptida dengan adanya spektrum FTIR yang menunjukkan *stretching* NH sekunder pada 3279 cm⁻¹ dan *stretching* C=O (karbonil amida) pada 1628 cm⁻¹, diperkuat dengan adanya *bending* NH (amida) pada 1530 cm⁻¹ dan *stretching* C-N pada 1130 dan 1180 cm⁻¹ serta spektrum massa dengan nilai m/z 764,8555. Senyawa PLKLFF memiliki aktivitas antijamur/fungistatik sedang terhadap jamur *C. albicans* ATCC 10231 dengan MIC sebesar 312,5 µg/mL dan tidak aktif terhadap bakteri *E. coli* ATCC 11229 dan *S. aureus* ATCC 6538.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas Hibah Pendanaan Program Kreativitas Mahasiswa Riset Eksakta (PKM-RE) tahun 2023 dari Direktorat Pembelajaran dan Kemahasiswaan Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada Laboratorium Sentral Universitas Padjadjaran atas pengukuran FTIR dan RP-HPLC analitik serta Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran atas pengukuran spektroskopi massa.

DAFTAR PUSTAKA

Ferrazzano, L., Catani, M., Cavazzini, A., Martelli, G., Corbisiero, D., Cantelmi, P., Fantoni, T., Mattellone, A., De Luca, C.,

Felletti, S., Cabri, W., & Tolomelli, A. (2022). Sustainability in Peptide Chemistry: Current Synthesis and Purification Technologies and Future Challenges. *Green Chemistry*, 24(3), 975–1020. <https://doi.org/10.1039/d1gc04387k>

Gawde, U., Chakraborty, S., Wagh, F. H., Barai, R. S., Khanderkar, A., Indraguru, R., Shirsat, T., & Idicula-Thomas, S. (2023). CAMPR4: a Database of Natural and Synthetic Antimicrobial Peptides. *Nucleic Acids Research*, 51(1), 377–383. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac933>

Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front. Microbiol.*, 582779. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>

Isidro-Llobet, A., 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. *Journal of Organic Chemistry*, 84(8), 4615–4628. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b03001>

Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility in Vivo. *Biomolecules*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/biom8010004>

Luong, H. X., Kim, D. H., Lee, B. J., & Kim, Y. W. (2018). Effects of Lysine-To-Arginine Substitution on Antimicrobial Activity of

- Cationic Stapled Heptapeptides. *Archives of Pharmacol Research*, 41(11), 1092–1097. <https://doi.org/10.1007/s12272-018-1084-5>
- Luong, H. X., Thanh, T. T., & Tran, T. H. (2020). Antimicrobial Peptides – Advances in Development of Therapeutic Applications. *Life Sciences*, 260, 118407. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118407>
- Maharani. (2018). *Konstruksi Peptida Secara Kimia*. Bitread Publishing. Bandung
- Maharani, R., Amrullah, M. H., Kurnia, D. Y., Hidayat, A. T., Nurlelarsari, Harneti, D., & Supratman, U. (2021). An Improved Synthesis of Pentapeptide (SCAP1e) Using Solid-Phase Method with Reduced Resin Loading Time. *Egyptian Journal of Chemistry*, 64(9), 4797–4801. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2021.52601.3085>
- Maharani, R., Napitupulu, O. I., Dirgantara, J. M., Hidayat, A. T., Sumiarsa, D., Harneti, D., Nurlelarsari, Supratman, U., & Fukase, K. (2021). Synthesis of Cyclotetrapeptide Analogues of C-PLAI and Evaluation of Their Antimicrobial Properties. *Royal Society Open Science*, 8(3), 201822. <https://doi.org/10.1098/rsos.201822>
- Meher, P. K., Sahu, T. K., Saini, V., & Rao, A. R. (2017). Predicting Antimicrobial Peptides with Improved Accuracy by Incorporating the Compositional, Physico-Chemical and Structural Features into Chou's General PseAAC. *Scientific Reports*, 7, 42362. <https://doi.org/10.1038/srep42362>
- Nandiyanto, A. B. D., Ragadhita, R., & Fiandini, M. (2023). Interpretation of Fourier Transform Infrared Spectra (FTIR): A Practical Approach in the Polymer/Plastic Thermal Decomposition. *Indonesian Journal of Science and Technology*, 8(1), 113–126. <https://doi.org/10.17509/ijost.v8i1.53297>
- Rahmadani, A., Masruhim, M. A., Rijai, L., Hidayat, A. T., Supratman, U., & Maharani, R. (2021). Total Synthesis of Cyclohexadepsipeptides Exumolides A and B. *Tetrahedron*, 83, 131987 <https://doi.org/10.1016/j.tet.2021.131987>
- Rahman, I. (2019). Resistensi Antibiotik Terhadap Salmonella Typhi pada Penyakit Demam Tifoid di Kota Makassar. *Kieraha Medical Journal*, 1(2), 1–5. <https://ejournal.unkhair.ac.id/index.php/kmj>
- Ramic, A., Skocibušić, M., Odžak, R., Gašparovic, A. C., Milkovic, L., Mikelic, A., Sovic, K., Primožic, I., & Hrenar, T. (2021). Antimicrobial Activity of Quasi-Enantiomeric Cinchona Alkaloid Derivatives and Prediction Model Developed by Machine Learning. *Antibiotics*, 10(6), 659. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060659>
- Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. Bin, Dhama, K., Ripon, M. K. H., Gajdács, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, M. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic Resistance in Microbes: History, Mechanisms, Therapeutic Strategies and Future Prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
- Viruly, L. 2022. *Peptida dari Biota Laut*. Edisi ke-1. Umrah Press: Tanjungpinang.