

SINTESIS PEPTIDA P25₁₋₉ BERGUGUS PELINDUNG DENGAN METODE SINTESIS PEPTIDA FASA PADAT FMOC/TBU MENGGUNAKAN ADITIF OKSIMA

Synthesis of Peptide P25₁₋₉ with Protecting Groups through Synthesis of Solid Phase Peptide FMOC/TBU using Oxyma Additive

Ari Hardianto*, Toto Subroto, Unang Supratman

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Bandung-Sumedang KM. 21 Jatinangor-Sumedang 45363

Telp./fax: 022-2507874/022-2507874

*Email: ari.hardianto@unpad.ac.id

ABSTRAK

Peptida P25 merupakan epitop yang dapat dengan mudah mengaktivasi sel T penolong. Sel T penolong teraktivasi berperan dalam aktivasi sel B untuk membentuk antibodi. Peptida bahkan protein dapat dibuat dengan metode sintesis peptida fasa padat Fmoc/tBu menggunakan aditif HOBt. Namun sayangnya HOBt memiliki karakter yang mudah meledak. Pada penelitian ini telah berhasil disintesis bagian epitop P25 (peptida P25₁₋₉ bergugus pelindung) yang memiliki tingkat kemurnian tinggi dan perolehan 36,4% dengan metode sintesis peptida fasa padat Fmoc/tBu menggunakan aditif oksima pengganti HOBt.

Kata kunci: Epitop, P25₁₋₉, sintesis peptida fasa padat Fmoc/tBu, oksima.

ABSTRACT

P25 peptide is an epitope which can easily activate T helper cell. Activated T helper cell plays important role for activating B cell that produce antibody. Peptide, and even protein, can be produced by solid phase peptide synthesis (SPPS) Fmoc/tBu method using HOBt as additive. Unfortunately, HOBt has explosive character. The present work has successfully synthesized a part of P25 epitope (P25₁₋₉ protected peptide) with high purity and 36.4% in yield by SPPS Fmoc/tBu method using oxyme that replace HOBt.

Keywords: P25₁₋₉, epitope, solid phase peptide synthesis Fmoc/tBu, oxyme.

Daftar Singkatan: 6-Cl-HOBt, 6-kloro-1-hidroksibenzotriazol; A, alanin; Boc, *tert*-butoksikarbonil; C, sistein; DCM, diklorometana; DIC, diisopropil karbodiimida; DIPEA, *N,N*-diisopropiletil amin; DMF, *N,N*-dimetilformamida; E, asam glutamat; Fmoc, 9-fluorenilmetoksikarbonil; HOAt, 1-hidroksi-7-azabenzotriazol; HOBt, 1-hidroksibenzotriazol; I, isoleusin; L, leusin; N, asparagin; P, prolin; S, serin; *t*Bu, *tert*-butil; TFE, trifluoroetanol; Trt, tritol.

PENDAHULUAN

Peptida dengan urutan residu asam amino KLIPNASLI (selanjutnya disebut P25₁₋₉) merupakan bagian epitop P25 (KLIPNASLIENCTKAEL). Epitop P25 berasal dari protein fusi virus distemper anjing, merupakan epitop yang mudah dikenali oleh sel T penolong. Jika sel T penolong telah mengenali epitop sel T yang sesuai, maka akan teraktivasi dan selanjutnya membantu mengaktivasi sel B dalam memproduksi antibodi (Ghosh *et al.*, 2001).

Sintesis peptida fasa padat merupakan metode yang digunakan secara luas untuk menghasilkan peptida bahkan protein (Chan & White, 2000). Penggunaan aditif untuk mendukung berbagai metode reaksi kopling lazim digunakan dalam penelitian sintesis peptida fasa padat. Aditif yang sering digunakan adalah senyawa dengan kerangka utama benzotriazol seperti 1-hidroksibenzotriazol (HOBt), 6-hidroksi-7-azabenzotriazol (HOAt), dan, 6-kloro-1-hidroksibenzotriazol (6-Cl-HOBt) (Subiros-Funosas *et al.*, 2009).

Namun, HOBt dan aditif sejenisnya memiliki karakter mudah meledak sehingga diklasifikasikan pada kategori zat eksplosif tingkat 1 (Merck, 2009). Oksima [etil 2-siano-2-(hidroksiimino)asetat] merupakan aditif alternatif yang dapat menggantikan HOBt. Oksima diuji pada metode pembentukan ikatan peptida dengan

metode karbodiimida. Oksima menunjukkan kemampuan menghambat rasemisasi, efisiensi kopling yang amat baik, tidak menunjukkan resiko penutupan gugus reaktif resin pada kondisi reaksi kopling standar, dan resiko meledak yang amat rendah (Subiros-Funosas *et al.*, 2009).

Pada penelitian ini telah berhasil disintesis peptida P25₁₋₉ bergugus pelindung (Fmoc-K(Boc)-L-I-P-N(Trt)-A-S(tBu)-L-I-OH). Peptida P25₁₋₉ bergugus pelindung disintesis pada fasa pendukung padat 2-klorotritil klorida dengan pendekatan kopling karbodiimida menggunakan aditif oksima. Produk yang diperoleh memiliki tingkat kemurnian tinggi.

METODOLOGI (Adaptasi dari Chan & White, 2000)

Pengikatan asam amino pertama

Sebanyak 0,25 g resin 2-klorotritil klorida (1,0-2,0 mmol klorida/g resin) disuspensikan dalam 2 mL DCM. Resin diaduk selama 5 menit lalu disaring. Larutan 2 mmol Fmoc-Ile-OH dan 5 mmol DIEA dalam 2 mL DCM ditambahkan ke resin lalu agitasi selama 30 menit pada suhu ruang. Resin disaring lalu dicuci dengan DMF (2 x 2 menit). Sebanyak 2,5 mL campuran DCM/metanol/DIPEA (80:15:5) ditambahkan ke resin lalu diagitasi selama 10 menit. Resin kemudian disaring dan perlakuan diulang sekali

lagi. Resin dicuci dengan 3 x 2,5 mL DMF lalu disaring. Sebanyak 2,5 mL piperidin 20% dalam DMF lalu ditambahkan ke resin. Agitasi dilakukan selama tiga menit, kemudian disaring. Prosedur diulangi selama 6 x 3 menit. Resin dicuci dengan 10 mL DMF (6 x 2 menit), 1,5 mL isopropanol (3 x 5 menit), dan 4 x 1,5 mL *n*-heksana. Resin disaring dan dikeringkan selama 15 menit *in vacuo*.

Penyusunan asam amino

Asam amino kedua, Fmoc-L-OH (3 ekuivalen) dan oksima (3 ekuivalen) ditimbang dalam vial kering. DMF ditambahkan seminimum mungkin sampai reagen larut. DIC (3 ekuivalen) ditambahkan dan diaduk menyeruluh selama 1,5 menit (larutan berubah menjadi kuning). Larutan dicampurkan dengan resin dalam reaktor sintesis dan diaduk perlahan selama 30 menit. Sedikit resin dipindahkan ke saringan pasir, dicuci dengan DMF sebanyak 4 kali, kemudian dilakukan uji Kaiser dan KLT. Jika positif, prosedur campuran reaksi diagitasi kembali selama 30 menit. Jika resin masih menunjukkan hasil positif setelah 4 jam, resin dicuci dengan DMF (5 kali) dan reaksi koping diulangi dengan reagen segar.

Resin dicuci dengan DMF (5 kali). Reagen pelepas gugus pelindung Fmoc (20% piperidin dalam DMF (v/v)) ditambahkan hingga resin terendam. Resin diagitasi selama 2 menit,

kemudian reagen pelepas gugus pelindung Fmoc dikeluarkan. Penambahan reagen pelepas gugus pelindung dan agitasi diulangi sebanyak 4-5 kali. Resin setelah itu dicuci dengan DMF 5 kali.

Urutan asam amino yang selanjutnya disusun menggunakan prosedur koping dan pelepasan gugus pelindung Fmoc yang sama sampai tersusun peptida dengan urutan residu asam amino Fmoc-K(Boc)-L-I-P-N(Trt)-A-S(*t*Bu)-L-I-resin.

Pelepasan peptida dari resin

Peptida yang telah disusun kemudian dilepaskan dari resin. Peptida-resin ditempatkan dalam labu dasar bulat, kemudian 15 mL larutan TFE/DCM (2:8) ditambahkan dan diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 45 menit pada suhu ruang. Resin disaring dan dicuci dua kali dengan 10 mL larutan TFE/DCM (2:8). Filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Eter dan *n*-heksana dingin masing-masing 20 dan 10 mL ditambahkan ke residu. Residu lalu disentrifugasi dan dicuci dengan eter (4 x 40 mL) sehingga diperoleh padatan. Fragmen peptida bergugus pelindung dikeringkan selama 6 jam *in vacuo* dan disimpan pada suhu -20°C. Peptida kemudian dianalisis dengan spektroskopi MS ESI-*Ion Trap*.

Uji kualitatif sintesis peptida fase padat

Uji kaiser

Sedikit butiran resin disampling dan

dicuci beberapa kali dengan etanol. Resin kemudian dipindahkan ke tabung reaksi kecil, kemudian ninhidrin 5% dalam etanol (w/v), fenol 80% dalam etanol (w/v), dan kalium sianat dalam piridin (2 mL kalium sianat 0,001 M dalam 98 mL piridin) ditambahkan masing-masing dua tetes. Campuran kemudian dipanaskan sampai 120°C selama 4-6 menit.

Kromatografi lapis tipis (KLT)

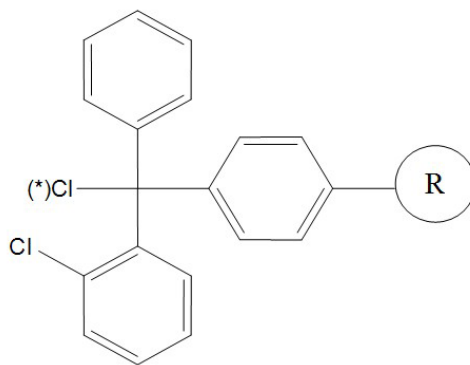
Sebanyak 1-2 mg atau 10-20 partikel resin yang telah tercuci ditempatkan dalam tabung reaksi kecil, lalu ditambahkan dengan 5 tetes TFE/DCM (2:8) dan dikocok selama 5 menit. Kemudian campuran reaksi ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dengan menggunakan campuran kloroform/metanol/asam asetat (90:8:2). Selanjutnya plat hasil KLT diamati pada panjang gelombang 254 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengikatan asam amino pertama

Sintesis peptida bergugus pelindung dengan urutan Fmoc-K(boc)-L-I-P-N(Trt)-A-S(tBu)-L-I-OH dilakukan pada fasa pendukung padat 2-klorotritil klorida. Sintesis peptida dilakukan dengan arah perpanjangan dari ujung C ke ujung N. Hal ini karena perpanjangan dengan arah sebaliknya, yaitu dari ujung N ke ujung C, amatlah rentan terhadap reaksi samping rasemisasi. Rasemisasi menyebabkan perubahan konfigurasi absolut asam amino yang digabungkan (Chan & White, 2000).

Terikatnya asam amino pertama Fmoc-I-OH pada resin 2-klorotritil klorida dicapai dengan menambahkan campuran reaksi Fmoc-I-OH dan DIPEA dalam DCM ke resin yang sebelumnya telah dikembangkan dalam DCM.



Gambar 1 Gugus aktif resin 2-klorotritil klorida. Atom klorida dengan tanda (*) merupakan gugus pergi yang sangat baik, karena dipengaruhi tiga gugus penarik elektron (benzen). Sehingga atom klorida dapat disingkirkan oleh nukleofil lemah karboksil sekalipun (Chan & White, 2000).

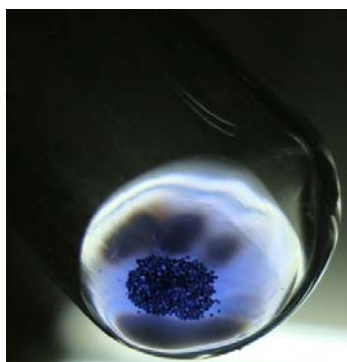
Reaksi pengikatan asam amino pertama Fmoc-I-OH ke resin 2-klorotritil klorida tidak melibatkan aktivasi gugus karboksil sehingga mencegah reaksi rasemisasi seminimal mungkin. Reaksi yang terjadi hanyalah pengambilan hidrogen gugus karboksil Fmoc-I-OH. Selanjutnya, nukleofil yang terbentuk menggantikan atom klorida (*) pada atom karbon kuartener resin 2-klorotritil klorida (Gambar 1).

Dengan demikian, asam amino pertama Fmoc-I-OH terikat pada resin. Selain itu, penggunaan resin 2-klorotritil klorida dapat pula mencegah reaksi samping pembentukan diketopiperazin karena meruahnya gugus aktif 2-klorotritil klorida. Namun yang perlu diingat, resin 2-klorotritil klorida sangat sensitif terhadap air sehingga pada pelaksanaannya resin harus benar-benar

dijaga dari air dan udara lembab (Chan & White, 2000).

Campuran reaksi kemudian dikeluarkan dari resin. Resin dicuci dengan 2 x 2 mL DMF. Selanjutnya, resin direaksikan dengan 2,5 mL campuran DCM/Metanol/DIPEA (80:15:5). Tujuannya adalah menutup gugus aktif resin 2-klorotritil klorida dengan gugus metoksi untuk mencegah asam amino selanjutnya terikat pada gugus aktif resin yang masih tersisa.

Gugus pelindung Fmoc kemudian dilepaskan dari α -amino dengan menambahkan 2,5 mL piperidin 20% dalam DMF (7 X 3 menit). Kesempurnaan reaksi ditandai dengan hasil positif uji Kaiser (Gambar 2(a)). Gugus α -amino yang bebas siap untuk digabungkan dengan residu asam amino bergugus pelindung berikutnya.

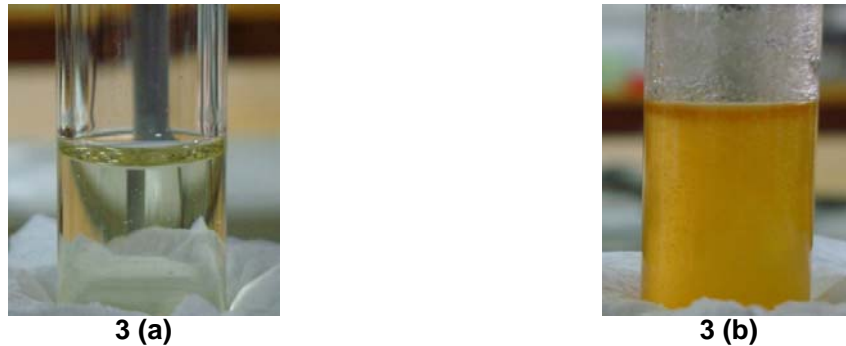


2 (a)



2 (b)

Gambar 2 Uji Kaiser. (a) Hasil positif uji Kaiser ditandai dengan berubahnya warna semua resin yang dicuplik menjadi biru tua. (b) Hasil negatif uji Kaiser ditandai dengan tidak berubahnya warna resin.



Gambar 3 Aktivasi asam amino dengan oksima dan DIC. (a) Campuran asam amino bergugus pelindung dan oksima sebelum penambahan DIC dan (b) setelah 7 menit penambahan DIC.

Penyusunan asam amino

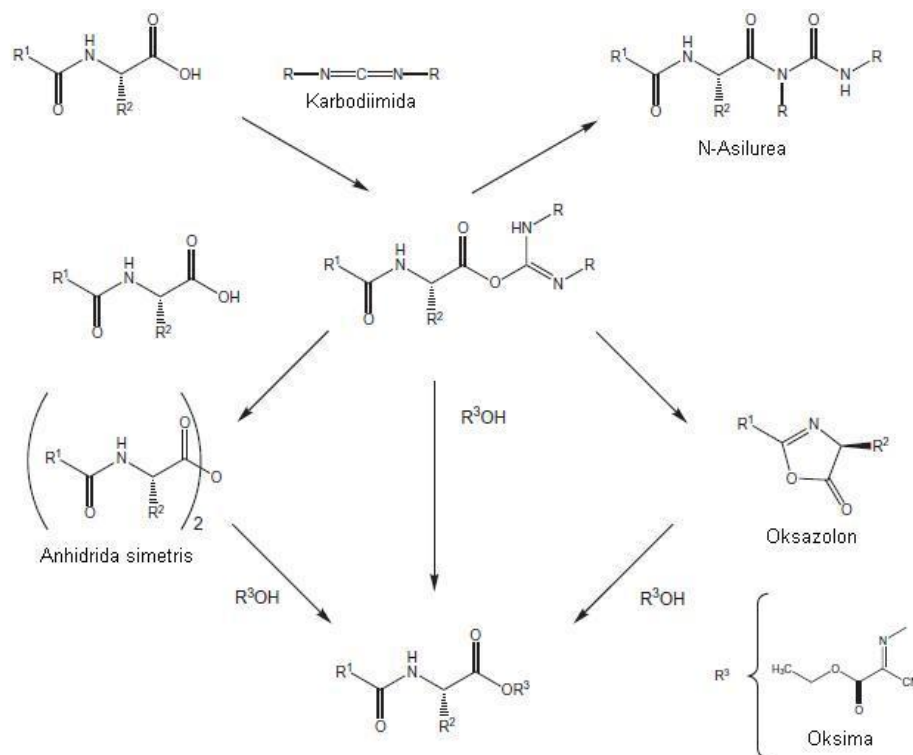
Oksima, yang diproduksi Merck Novabiochem[®], merupakan aditif baru dalam reaksi kopling sintesis peptida. Oksima menunjukkan dapat menekan rasemisasi dan memiliki efisiensi kopling lebih tinggi dari HOBt (Merck, 2009).

Campuran reaksi kopling dibuat dengan cara melarutkan campuran asam amino kedua Fmoc-L-OH dan oksima kemudian dalam seminimal mungkin DMF sampai terbentuk larutan bening kekuningan yang homogen (Gambar 3(a)). DIC selanjutnya ditambahkan dan didiamkan sampai 10 menit. Setelah DIC ditambahkan terjadi perubahan warna dan larutan mengental (Gambar 3(b) dan 3(c)). Ini menunjukkan bahwa terbentuk ester aktif oksima asam amino Fmoc-L-OH menurut reaksi pada Gambar 4.

Sempurnanya reaksi kopling asam amino Fmoc-L-OH ke asam amino pertama dengan metode karbodiimida dan aditif oksima ini memakan waktu selama 3 jam. Selang waktu 30 menit, resin dicuplik, dicuci dengan DMF, lalu

diuji Kaiser dan KLT. Reaksi kopling yang telah sempurna ditunjukkan dengan tidak berubahnya warna resin pada uji Kaiser (Gambar 2(b)), karena tidak terdapat lagi gugus amino bebas yang akan bereaksi dengan ninhidrin dalam reagen Kaiser. Sedangkan pada uji KLT kesempurnaan reaksi ditandai dengan munculnya noda pada panjang gelombang 254 nm (Gambar 5) yang berasal dari gugus pelindung Fmoc pada asam amino kedua. Hasil identifikasi uji Kaiser dan KLT saling mendukung untuk menentukan reaksi kopling sudah sempurna atau belum.

Lama reaksi kopling setiap asam amino bervariasi tergantung pada sifat alami struktur asam amino dan panjang peptida yang terikat pada resin (Chan & White, 2000). Reaksi kopling asam amino keenam sampai kesembilan (Fmoc-P-OH, Fmoc-I-OH, Fmoc-L-OH, dan Fmoc-K(Boc)-OH) pada penelitian ini membutuhkan waktu hingga 4 jam agar sempurna.



Gambar 4 Mekanisme terbentuknya ester aktif oksima asam amino pada metode kopling karbodiimida (Merck, 2009).

Pelepasan gugus pelindung Fmoc pada tahap ini memerlukan 24 kali pengulangan perlakuan dengan 2,5 mL piperidin 20% sampai gugus Fmoc benar-benar terlepas. Kesempurnaan reaksi pelepasan gugus Fmoc ditandai dengan hasil positif uji Kaiser (Gambar 2(a)) dan tidak munculnya noda pada uji KLT (Gambar 5).

Pada pelepasan gugus pelindung Fmoc asam amino ketiga sampai kedelapan, perlakuan dengan piperidin 20% tidak mampu melepaskan gugus pelindung Fmoc secara sempurna. Sehingga digunakan perlakuan menggunakan DBU/piperidin/DMF (1:1:2). DBU merupakan basa meruah

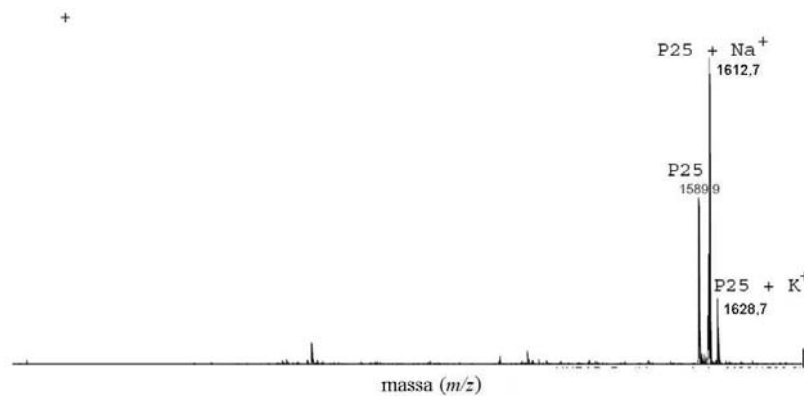
yang lebih kuat dari piperidin. Gugus Fmoc pada asam amino terakhir tetap dipertahankan sehingga prosedur pelepasan gugus pelindung tidak dilakukan.

Pelepasan peptida bergugus pelindung P25₁₋₉

Resin 2-klorotritil klorida merupakan resin yang labil terhadap asam. Pelepasan peptida bergugus pelindung P25₁₋₉ dilakukan dengan TFE/DCM (2:8). Perlakuan dengan TFE/DCM (2:8) hanya memutuskan ikatan antara peptida dan resin tanpa melepaskan gugus pelindung rantai samping dan gugus Fmoc



Gambar 5



Gambar 6



Gambar 7

Gambar 5 Hasil uji KLT dengan eluen kloroform/metanol/asam asetat, (a) setelah reaksi kopling dan (b) setelah reaksi pelepasan gugus pelindung Fmoc yang ditampakkan pada UV 254 nm. (B) adalah blanko, tidak ditotol sampel.

Gambar 6 Spektrum spektroskopi massa peptida P25₁₋₉ bergugus pelindung (ESI-*ion trap*). Puncak pada m/z 1589,9 merupakan ion molekul peptida P25₁₋₉ bergugus pelindung; m/z 1612,7, ion molekul peptida dengan ion natrium; dan m/z 1628,7, ion molekul peptida dengan ion kalium.

Gambar 7 Kromatogram uji kemurnian peptida P25₁₋₉ bergugus pelindung menggunakan metode KLT(eluen kloroform/metanol/asam asetat, UV 254 nm). (B) adalah blanko yang tidak totol sampel, sedangkan (K) adalah peptida P25₁₋₉ bergugus pelindung.

Larutan peptida dipekatan, diendapkan dengan eter dingin lalu dikeringkan *in vacuo*, sehingga diperoleh padatan putih sebanyak 187,8 mg (36,4%). Peptida yang diperoleh adalah benar peptida P25₁₋₉ bergugus pelindung (Fmoc-K(Boc)-L-I-P-N(Trt)-A-S(*t*Bu)-L-I-OH) berdasarkan hasil pengukuran spektroskopi massa dengan ESI-*Ion Trap* (Gambar 6). Puncak pada m/z 1589,9 adalah ion molekul peptida P25₁₋₉ bergugus pelindung. Puncak pada m/z 1612,7 dan 1628,7 menegaskan keberadaan puncak ion molekul m/z 1589,9. Puncak m/z 1612,7 merupakan ion molekul peptida dengan ion natrium,

sedangkan puncak m/z 1628,7 merupakan ion molekul peptida dengan ion kalium. Dominannya puncak peptida bergugus pelindung menunjukkan bahwa peptida yang diperoleh memiliki kemurnian yang tinggi. Hal ini juga didukung dengan uji KLT (Gambar 7).

KESIMPULAN

Peptida P25₁₋₉ bergugus pelindung telah berhasil disintesis dengan kemurnian tinggi dan perolehan 36,4% menggunakan metode sintesis peptida fasa padat Fmoc/*t*Bu pendekatan karbodiimida dengan aditif oksima.

PERSANTUNAN/SANWACANA

Terima kasih kepada Laboratorium Kimia Bahan Alam Program Studi Kimia Institut Teknologi Bandung untuk pengukuran ion molekul peptida dengan spektroskopi massa ESI-*Ion Trap*.

DAFTAR PUSTAKA

Chan, W.C. & White, P.D. 2000. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford University Press. New York.

Ghosh, S., Walker, J. & Jackson, D.C. 2001. Identification of canine helper T-cell epitopes from the fusion protein of canine distemper virus. *Immunology*.104(1), 58-66.

Merck. 2009. *Non-explosive Replacement for HOBt*. Merck KgaA, Darmstadt, Jerman.

Subiros-Funosas, R., Prohens, R., Barbas, R., El-Faham, A., & Albericio, F. 2009. Oxyma: an efficient additive for peptide synthesis to replace benzotriazol-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion. *Chem. Euro. J.* 15, 9394-9403.