

PEMBLOKIRAN GUGUS AMINO DALAM L-SISTEIN DAN L-VALIN MELALUI PEMBENTUKAN FORMAMIDA^(*)

P J Wibawa, Ismiyarto

Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang 50275

ABSTRAK

Dalam penelitian ini telah dilakukan reaksi pemblokiran gugus amina pada L-valin dan pada L-sistein menggunakan asam format untuk membentuk, secara berurutan, formamida L-valin dan formamida L-sistein. Kedua formamida asam amino ini akan digunakan lebih lanjut untuk mensintesis asam 6-amino penisilinat (6-APA), suatu zat antara kunci untuk membuat antibiotik baru turunan β -laktam. Reaksi dilaksanakan dengan alat refluks pada suhu sekitar 50-60°C selama 60-90 menit. Pada akhir reaksi dilakukan pemisahan pelarut menggunakan penguap berputar Buchii dan dilakukan pemurnian dengan metoda rekristalisasi menggunakan etanol. Kristal hasil pemblokiran gugus amina pada L-valin mempunyai titik leleh 153-154°C, sedangkan hasil pemblokiran gugus amina pada L-sistein titik lelehnya 129-131°C. Kedua kristal ini masing-masing memberikan noda tunggal pada plat KLT silika gel 60F₂₅₄. Hasil analisis spektra IR dari masing-masing kristal ini menunjukkan bahwa reaksi pemblokiran berhasil dilakukan dan senyawa yang terbentuk merupakan formamida L-valin dan formamida L-sistein.

Kata kunci : agen pemblokir, formamida L-valin, formamida L-sistein.

THE AMINE GROUP PROTECTION OF L-CYSTEINE AND L-VALINE THROUGH THE FORMATION OF FORMAMIDE^(*)

ABSTRACT

The reactions of amine group protection of L-valine and L-cysteine have been accomplished in this research with formic acid protecting agent to form formamide L-valine and formamide L-cysteine respectively. This two formamides of the amino acid would be used to synthesize 6-amino penicillanic acid (6-APA), a very important key intermediate for a new β -lactame antibiotic. The reaction was carried out in a round bottom flask of a refluks set at 50-60°C for 60-90 minutes. After the time was over, the liquid excess was separated employing Buchii rotary evaporator and then it was recrystallized with ethanol for pure crystal. The crystal produced from L-valine treatments melted at 153-154°C, and those from L-cysteine melted at 129-131°C. The crystals each gave one mark on a 60F₂₅₄ silica gel TLC plate and their IR spectrum each indicated that the reactions of those was successfull to be done, and each formed formamide L-valine and formamide L-cysteine respectively.

Keywords : protecting agent (blocking agent); formamide L-valine; formamide L-cysteine

PENDAHULUAN

Senyawa asam 6-amino penisilinat (6-APA) merupakan senyawa antara kunci (*key intermediate*) yang banyak digunakan untuk membuat antibiotik turunan β -laktam secara semisintesis (Kang *et al*, 1991., Meevootisom *et al*, 1983). Metoda pembuatan senyawa 6-APA yang telah dikenal adalah cara biosintesis, hidrolisis kimia dan hidrolisis enzimatik, namun dua cara pertama dipandang tidak ekonomis dan tingkat kesulitannya tinggi (Carrington, 1971). Cara yang dipandang cukup ekonomis adalah hidrolisis enzimatik dari penisilin-G atau penisilin-V menggunakan enzim penisilin asilase (PA) (Illanes *et al*, 1994). Sehingga perburuan mikroorganisme penghasil enzim ini dan meningkatkan unjuk kerjanya dengan cara-cara rekayasa genetik banyak dilakukan oleh para peneliti di seluruh dunia. Cara ini, di-

samping memiliki banyak keunggulan namun tidak sedikit kelemahannya. Kelemahan terbesar metoda rekayasa genetik terletak pada sulitnya pemeliharaan mikroorganisme mutan. Oleh karena itu perlu dipelajari cara alternatif yang selama ini belum pernah dilakukan, yaitu dengan cara kimia biasa.

Sintesis 6-APA dengan cara kimia dapat dilakukan berdasarkan analisis retrosintetik. Berdasarkan analisis ini, senyawa 6-APA dapat disintesis dari L-valin dan L-sistein (alternatif 1), atau D-serin dan 3-merkaptod-valin (alternatif 2). Dalam penelitian ini dipilih alternatif 1 sebagai jalur untuk memperoleh 6-APA secara kimia. Prinsip dari jalur alternatif 1 ini adalah gugus amina, -NH₂ dari L-valin terlebih dahulu harus dapat bereaksi dengan gugus karboksilat, -COOH dari L-sistein membentuk ikatan amida alifatis yang meru-

pakan embrio terbentuknya cincin β -laktam. Untuk menghindari terjadinya reaksi antar asam amino yang sama jenis, maka gugus $-\text{COOH}$ dari *L*-valin dan gugus $-\text{NH}_2$ dari *L*-sistein harus diblokir terlebih dahulu. Oleh karena itu ingin dipelajari terlebih dahulu cara pemblokiran gugus $-\text{NH}_2$ pada kedua asam amino itu menggunakan asam format sebagai agen pemblokir. Dengan demikian, tujuan utama penelitian ini adalah mempelajari cara pemblokiran atau perlindungan gugus amina, $-\text{NH}_2$ pada *L*-valin dan *L*-sistein menggunakan asam format. Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah produk reaksi pemblokiran ini, yaitu formamida *L*-valin dan formamida *L*-sistein dapat digunakan untuk bahan penelitian lebih lanjut dalam rangka mendapatkan 6-APA.

METODA PENELITIAN

Bahan dan alat

Bahan-bahan untuk reaksi pembentukan formamida: *L*-valin, *L*-sistein, asam format, asetat anhidrid dan asam asetat.

Bahan-bahan untuk ekstraksi, rekristalisasi dan KLT: Etanol, metanol, etil asetat, diklormetana, akuades, aseton, *n*-butanol, eter dan kloroform. Semua bahan tersebut dalam keadaan p.a yang diproduksi oleh Merck, Jerman.

Alat-alat penelitian

Satu set alat refluks untuk melakukan reaksi pembentukan formamida; Satu set alat penguap berputar *Buchii* untuk memisahkan pelarut dari produk yang diinginkan; Satu set penyaring vakum untuk memisahkan pelarut dari kristal produk; Satu set alat penentu titik leleh merk Fisher-John; Plat KLT silika gel 60F₂₅₄ dan *chamber*-nya; Pengaduk magnet; Oven untuk mengeringkan kristal; Spektrometer FTIR merk Shimadzu buatan Jepang dan alat-alat gelas lainnya yang diperlukan.

Pemblokiran gugus amina pada *L*-valin

Sebanyak 0,01 mol (~1,45 gram) kristal *L*-valin p.a dilarutkan ke dalam 25 mL asam format 90% (v/v) di dalam labu refluks yang volumenya 150 mL, sambil diaduk selama 30 menit. Selanjutnya, ke dalam larutan ini dimasukkan 8 mL asetat anhidrid melalui corong pisah tetes demi tetes. Pada kondisi ini suhu campuran akan meningkat hingga 50-60°C. Setelah itu, campuran diaduk pada suhu kamar selama 1 jam, kemudian di-

inginkan menggunakan 10 mL air es. Langkah berikutnya, campuran ini dievaporasi menggunakan penguap berputar *Buchii* hingga seluruh pelarutnya terpisah. Kristal yang diperoleh kemudian dilakukan rekristalisasi menggunakan etanol. Kristal hasil rekristalisasi ini selanjutnya ditentukan titik lelehnya menggunakan Fisher-John *meltingpointer*, dianalisis kemurniannya menggunakan KLT silka gel 60F₂₅₄ dengan larutan pengembang etanol:etil asetat:air (6:6:1) dan reaksi warna ninhidrin. Setelah itu dilakukan analisis keberhasilan reaksi pemblokiran menggunakan spektrometer FTIR Shimadzu 8201 PC buatan Jepang. Pola spectra IR dari produk dibandingkan dengan pola spektra IR dari *L*-valin untuk mengetahui keberhasilan reaksi pemblokiran.

Pemblokiran gugus amina pada *L*-sistein

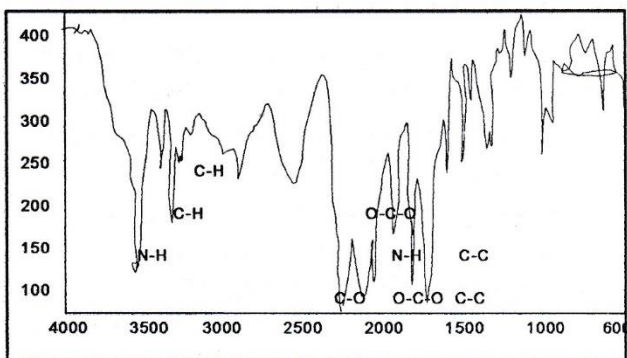
Sebanyak 0,01 mol (~1,21 gram) kristal *L*-sistein p.a dilarutkan ke dalam 25 mL asam format 90% (v/v) di dalam labu refluks yang volumenya 150 mL. Campuran ini dipanaskan hingga suhu 40°C kemudian ditambahkan sekitar 10 mL asetat anhidrid tetes demi tetes melalui corong pisah. Pada kondisi ini suhu campuran akan meningkat hingga 50-60°C. Setelah itu, campuran diaduk pada suhu kamar selama 90 menit, kemudian didinginkan menggunakan 10 mL air es. Langkah berikutnya, campuran ini dievaporasi menggunakan penguap berputar *Buchii* hingga seluruh pelarutnya terpisah. Kristal yang diperoleh kemudian dilakukan rekristalisasi menggunakan etanol. Kristal hasil rekristalisasi ini selanjutnya ditentukan titik lelehnya menggunakan Fisher-John *meltingpointer*, dianalisis kemurniannya menggunakan KLT silka gel 60F₂₅₄ dengan larutan pengembang etanol:etil asetat:air (2:3:3) dan reaksi warna ninhidrin. Setelah itu dilakukan analisis keberhasilan reaksi pemblokiran menggunakan spektrometer FTIR Shimadzu 8201 PC buatan Jepang. Pola spektra IR dari produk dibandingkan dengan pola spektra IR dari *L*-sistein untuk mengetahui keberhasilan reaksi pemblokiran.

HASIL DAN PEMBAHASAN

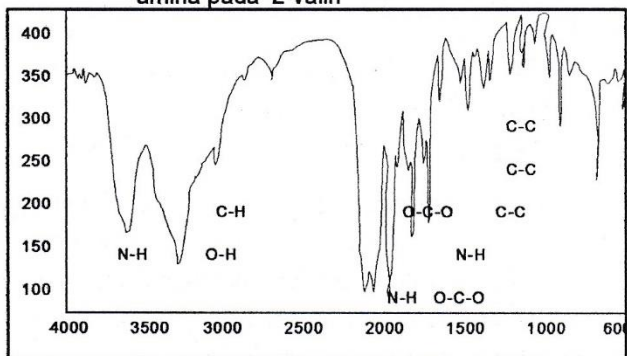
Pemblokiran gugus amina pada *L*-valin

Setelah dilakukan percobaan sesuai prosedur, diperoleh produk yang berupa kristal putih menyerupai jamur sebanyak 1,34 gram dengan titik leleh 153-154°C (Titik leleh *L*-valin sekitar 235°C). Setelah dilakukan

rekristalisasi kemudian uji kemurnian menggunakan KLT teramati adanya satu noda yang berwarna ungu terang (ungu muda) pada plat KLT dengan Rf:0,77. Sementara hasil KLT terhadap senyawa awal, yaitu *L*-valin diperoleh noda tunggal yang berwarna ungu gelap (ungu tua). Spektra IR kristal produk reaksi pemblokiran *L*-valin ini ditampilkan pada gambar 1. Sedangkan spektra IR kristal *L*-valin ditampilkan pada gambar 2.



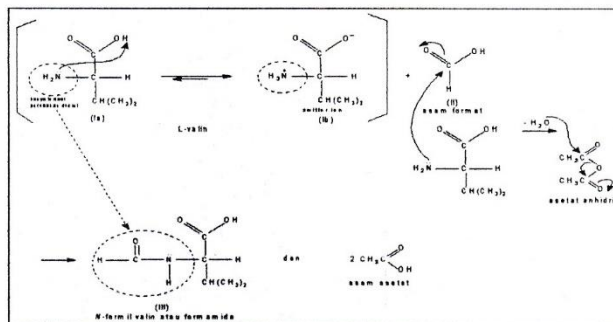
Gambar 1. Spektra IR produk reaksi pemblokiran gugus amina pada *L*-valin



Gambar 2. Spektra IR *L*-valin sebelum dilakukan reaksi pemblokiran gugus aminanya.

Berdasarkan data titik leleh maupun KLT dapat difahami bahwa produk yang diperoleh telah berhasil dimurnikan. Karena rentang titik leleh produk tidak lebih dari 1°C yang merupakan prasyarat statistik untuk menerima kebenaran suatu pengukuran. Secara logis seandainya terdapat pengotor, maka pengotor itu tidak lain adalah kristal *L*-valin sisa, dan jika ini terdapat di dalam produk sebagai pengotor maka tentunya akan diperoleh rentang titik leleh produk lebih dari 10°C atau bahkan lebih dari itu. Dalam hal ini jika terdapat pengotor *L*-valin mestinya akan teramati titik leleh produk sekitar 153-235°C karena zat yang titik lelehnya lebih rendah akan meleleh terlebih dahulu selanjutnya zat yang titik lelehnya lebih tinggi. Kecuali data titik leleh, data KLT juga menunjukkan bahwa kristal produk yang diperoleh telah berhasil dimurnikan. Ada-

nya noda tunggal yang berbeda dengan noda tunggal *L*-valin pada plat KLT yang dikembangkan dengan variasi pelarut, sebelum akhirnya menggunakan pelarut campuran etanol:etil asetat:air (6:6:1). Meskipun nilai Rf kedua kristal itu sama, namun reaksinya masing-masing terhadap ninhidrin dapat secara signifikan mengetahui apakah kedua jenis kristal itu, yakni kristal produk dan *L*-valin, merupakan senyawa kimia yang sama atau berbeda. Oleh karena memang reaksinya terhadap ninhidrin memberikan warna yang berbeda, maka dapat difahami bahwa kedua kristal itu merupakan senyawa kimia yang berbeda. Selanjutnya dengan membandingkan pola spektra IR pada gambar 1 dan gambar 2 terlihat adanya perbedaan pola di daerah bilangan gelombang 2800-3800 cm⁻¹ dan 1600-1700 cm⁻¹. Rentangan bilangan gelombang 2800-3800 cm⁻¹ merupakan manifestasi dari vibrasi ulur O-H dan N-H dari suatu ikatan hidrogen dari suatu molekul. Sementara itu rentangan bilangan gelombang 1600-1700 cm⁻¹ merupakan manifestasi dari vibrasi ulur C=O dari suatu gugus karbonil bebas yang terdapat di dalam suatu molekul. Ikatan hidrogen dari *L*-valin tidak lain dihasilkan oleh gugus amina, -NH₂ atau -NH₃⁺ sedangkan uluran -C=O nya dihasilkan tidak lain oleh gugus karboksilat, -COOH atau -COO⁻. Penjelasan ini akan lebih mudah difahami apabila sambil memperhatikan struktur kimia *L*-valin maupun struktur kimia *N*-formil valin pada reaksi pemblokiran gugus amina yang ditampilkan pada gambar 3. Sementara itu, mencermati pola spektra IR produk pemblokiran, gambar 1 dan kemudian membandingkannya dengan spektra IR *L*-valin gambar 2 dapat difahami bahwa ikatan hidrogen maupun ikatan karbonil dari produk pemblokiran berbeda dengan yang terjadi pada *L*-valin. Dari sini dapat diperkirakan reaksi pemblokiran berlangsung seperti yang dipaparkan pada gambar 3.

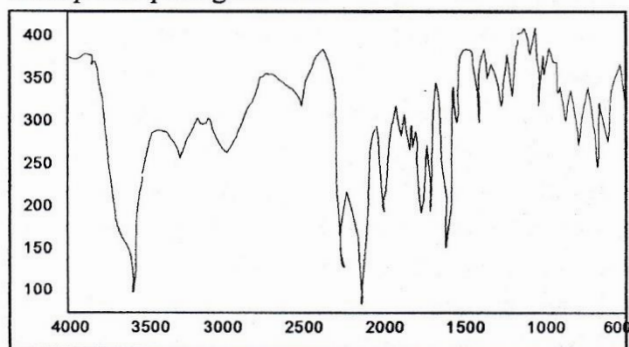


Gambar 3. Reaksi pemblokiran *L*-valin oleh asam format membentuk *N*-formil valin atau formamida valin

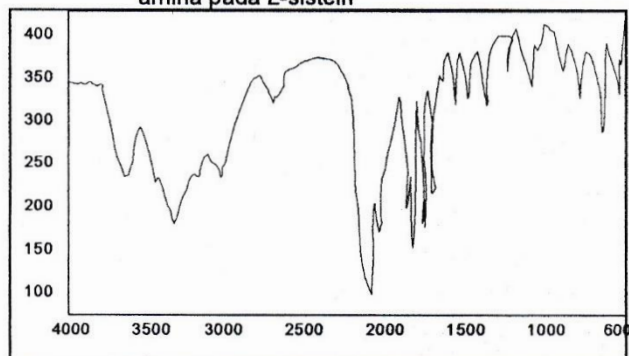
Dengan memperhatikan reaksi pemblokiran ini, jelas bahwa antara *L*-valin dan *N*-formil valin sebagai produk hanya berbeda pada gugus amina. Hal ini berarti gugus karbonil dari asam format yang telah memblokir gugus amina memberikan kontribusi spektra pada daerah ini. Dari sini juga dapat difahami bahwa produk pemblokiran merupakan senyawa yang cukup stabil. Hal ini disebabkan molekul air yang dibebaskan pada saat reaksi berlangsung, segera pada saat itu juga ditangkap oleh molekul asetat anhidrid sehingga tidak sempat mengganggu produk yang terjadi.

Pemblokiran gugus amina pada *L*-sistein

Tidak banyak berbeda dengan yang terjadi pada *L*-valin, reaksi pemblokiran *L*-sistein dengan asam format juga menghasilkan kristal putih menyerupai jarum, hanya saja jumlahnya sebanyak 1,17 gram dan titik lelehnya 129-131°C (titik leleh *L*-sistein: 258-261°C) dan efisiensi reaksinya mencapai 78,74 %. Setelah dilakukan rekristalisasi kemudian uji kemurnian menggunakan KLT teramati adanya satu noda yang berwarna ungu terang (ungu muda) pada plat KLT dengan Rf: 0,47. Spektra IR kristal produk reaksi pemblokiran *L*-sistein ini ditampilkan pada gambar 4, sedangkan spektra IR kristal *L*-sistein sebelum dilakukan pemblokiran ditampilkan pada gambar 5.



Gambar 4. Spektra IR produk reaksi pemblokiran gugus amina pada *L*-sistein



Gambar 5. Spektra IR *L*-sistein sebelum dilakukan reaksi pemblokiran gugus aminanya

Dengan melakukan analisis data titik leleh dan noda tunggal pada plat KLT, sebagaimana pada *L*-valin dan produk terblokirnya, di sini juga dapat difahami bahwa kristal produk reaksi pemblokiran *L*-sistein juga merupakan kristal yang sudah berhasil dimurnikan. Demikian pula dengan mengamati spektra IR pada gambar 4 dan gambar 5, terlihat dengan jelas terjadinya perbedaan pola spektra pada daerah bilangan gelombang 3000-3800 cm^{-1} dan 1500-1800 cm^{-1} . Hal ini menunjukkan pola vibrasi ulur ikatan hidrogen dan gugus karbonil sebelum dilakukan reaksi pemblokiran berbeda dengan setelah dilakukan reaksi pemblokiran. Penyebab perbedaan ini dapat dianalisis berdasarkan kajian reaksi kimia pemblokirannya, yang tidak lain adalah analog dengan yang terjadi pada *L*-valin, gambar 3. Hanya di sini rantai samping $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ *L*-valin diganti dengan rantai $-\text{CH}_2\text{SH}$. Dengan demikian, perbedaan pola spektra IR ini justru menegaskan bahwa reaksi pemblokiran gugus amina pada *L*-sistein menggunakan asam format telah berhasil dilakukan, dan produk yang terjadi tidak lain merupakan *N*-formil sistein atau formamida sistein.

KESIMPULAN

Berdasarkan analisis data penelitian, dapat disimpulkan bahwa pemblokiran gugus amina pada *L*-valin maupun *L*-sistein dapat dilakukan menggunakan asam format dan anhidrida asetat, yang masing-masing secara berurutan dapat membentuk formamida *L*-valin dan formamida *L*-sistein.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih yang tulus kami sampaikan kepada

1. Direktur Pembinaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Dirjen DIKTI Depdiknas RI yang telah memberikan dana untuk melakukan penelitian ini, berdasarkan kontrak Nomor: 018/LIT/BPPK-SDM/IV/2002, Tanggal 9 April 2002.
2. Dody Yuniarto dan sdr. Retno Sulistyorini, mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA UNDIP yang telah banyak membantu dalam penelitian ini.

PUSTAKA

1. Carrington, T. R., The development of commercial processes for the production of 6-aminopenicillanic acid (6-APA), *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 1971, 321-333.

2. Cole, M., Savidge, T., Vanderhaeghe, H., Penicillin Acylase Assay in *Methods in Enzymology XLIII(Antibiotics)* edited by John H. Hash, Academic Press, New York, 1975, 698-699.
3. Fessenden, R.J. and Fessenden, J.S., 1990, *Organic Chemistry*, 4th Ed. Brooks/Cole Publ. Company, p.971, California.
4. Gale, E.F.F.R.S., Cundliffe, E., Reynolds, P. E., Richmond, M.H.F.R.S., Waring, M. J., *The Molecular Basis of Antibiotic Action*, 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1981, 117-118, 120.
5. Illanes, A., Acevedo, F., Gentina, J. C., Reyes, I., Torres, R., Cartagena, O., Ruiz, A., Vasquez, M., Production of penicillin Acylase from *Bacillus megaterium* in Complex and Defined Media, *Process Biochemistry*, **29**, 1994, 263-270.
6. Morin, R. B., Gorman, M., *Chemistry and Biology of β -Lactam Antibiotics*, 1st, prt., vol. 3, Academic Press, New York, 1982, diterjemahkan ke dalam bahasa Indonesia oleh Dra. Sri Mulyani, Apt., SU., cetakan I, IKIP Semarang Press, Semarang, 1995, 32-41, 159, 173-175.
7. Meevootisom, V., Saunders, J. R., Cloning and expression of penicillin acylase genes from overproducing strain of *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium*, *J. Appl. Microbial and Biotechnol.*, **25**, 1987, 372-378.
8. Meevootisom, V., Samsuk, P., Prachaktam, R., Flegel, T. W., Simple Screening Methods for Isolation of Penicillinacylase-Producing Bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **46(5)**, 1983, 1227-1229.
9. Miller-Hamilton, J. M. T., Penicillinacylase, *Bacteriological Reviews*, **30(4)**, 1966, 761-777.
10. Sheehan, J.C and Yang, D.H., 1957, The Use of N-Formylamino Acids in Peptide Synthesis, *J. Am.Chem.Soc.*, **80**, 1154-1158
11. Wibawa, P.J., 1999, Tesis Magister Kimia, Institut Teknologi Bandung

