



Peptida Bioaktif (*Food-Derived*) Kesehatan Mental: Mekanisme, Screening dan Strategi Validasi

Food-Derived Bioactive Peptides for Mental Health: Mechanisms, Screening, and Validation Strategies

Asadin Brilliantama^{1,2},

¹ Department of Food and Agricultural Product Technology, Faculty of Agricultural Technology, Universitas Gadjah Mada, Jalan Flora, Depok, Sleman, Yogyakarta 55281, Indonesia

² Department of Food Technology, Faculty of Engineering, Universitas Pembangunan Nasional Veteran Jawa Timur, Surabaya 60294, Indonesia

ABSTRAK

Pandemi COVID-19 telah meningkatkan prevalensi gangguan kesehatan mental, terutama depresi dan kecemasan. Terapi konvensional seperti psikoterapi dan farmakoterapi memiliki keterbatasan, termasuk biaya tinggi, efek samping, serta keterbatasan penerimaan pasien. Oleh karena itu, eksplorasi peptida bioaktif yang berasal dari pangan sebagai alternatif alami dalam regulasi suasana hati semakin diminati. Kajian ini membahas karakteristik, mekanisme, serta metodologi penelitian dalam mengidentifikasi peptida bioaktif yang berpotensi sebagai antidepresan dan antikecemasan. Mekanisme utama meliputi modulasi neurotransmitter, peningkatan faktor neurotropik, stimulasi neurogenesis, serta regulasi sumbu hipotalamus-pituitari-adrenal (HPA). Pendekatan terintegrasi melalui pendugaan *in silico*, sintesis peptida dengan metode Fmoc, serta uji *in vitro* pada transporter neurotransmitter dan reseptor, kemudian dilanjutkan dengan pembuktian *in vivo* pada model hewan, dapat mempercepat proses penemuan dan validasi peptida bioaktif. Strategi multidisipliner ini membuka peluang besar dalam pengembangan pangan fungsional sekaligus kandidat terapeutik untuk kesehatan mental.

KATA KUNCI

Peptida bioaktif;
antidepresan;
antikecemasan; *in silico*; *in vitro*; *in vivo*; pangan fungsional

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic has significantly increased the prevalence of mental health disorders, particularly depression and anxiety. Conventional treatments, such as psychotherapy and pharmacotherapy, face limitations including high costs, side effects, and limited patient acceptance. Consequently, the exploration of food-derived bioactive peptides as natural alternatives for mood regulation has gained growing interest. This paper reviews the characteristics, mechanisms, and research methodologies for identifying bioactive peptides with antidepressant and anxiolytic potential. Key mechanisms include modulation of neurotransmitters, enhancement of neurotrophic factors, promotion of neurogenesis, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. The study highlights the integrated use of *in silico* prediction, solid-phase peptide synthesis via the Fmoc strategy, and *in vitro* assays targeting neurotransmitter transporters and receptors, followed by *in vivo* behavioral testing in animal models. Such a multidisciplinary approach facilitates the efficient discovery, screening, and validation of bioactive peptides as promising candidates for functional food development and therapeutic applications in mental health.

KEYWORDS

Bioactive peptides;
antidepressant; anxiolytic;
in silico; *in vitro*; *in vivo*;
functional food

1. PENDAHULUAN

Pandemi COVID-19 telah memberikan dampak yang signifikan terhadap kesehatan mental masyarakat di seluruh dunia. Berdasarkan data WHO sebanyak 25% penduduk dunia mengalami peningkatan prevalensi kecemasan dan depresi (WHO, 2022). Pembatasan sosial, isolasi, dan ketidakpastian yang disebabkan oleh pandemi ini telah menyebabkan peningkatan kasus gangguan mental, terutama depresi di kalangan masyarakat terutama kelompok usia muda (anak-anak, remaja dan muda dewasa) (Purnawati et al., 2022). Kondisi kesehatan mental yang buruk dapat mengganggu kualitas hidup individu dan berdampak negatif pada kesejahteraan masyarakat secara keseluruhan.

Gangguan kecemasan dan depresi merupakan dua gangguan mental yang memiliki prevalensi yang tinggi di kalangan masyarakat dan memiliki gejala yang sama (Craske and Stein, 2016). Gangguan ini umumnya ditandai dengan munculnya rasa sedih yang terus menerus dan/atau ketidakmampuan untuk merasakan kebahagiaan sehingga mempengaruhi kehidupan sehari-hari (McCarron et al., 2021). Kondisi ini dapat menyebabkan hilangnya kemampuan untuk menikmati kesenangan, munculnya perasaan tidak berharga, kelelahan, sulit tidur, penurunan berat badan atau nafsu makan, kesulitan dalam berkonsentrasi, gerakan yang melambat atau berlebihan, serta gejala lainnya yang, dalam kasus yang parah, secara signifikan meningkatkan risiko bunuh diri dan penyakit (Malhi and Mann, 2018).

Psikoterapi dan farmakoterapi biasanya digunakan dalam terapi kecemasan dan depresi. Saat ini, masyarakat cenderung menjauhi obat-obatan sintesis karena selain harganya cukup mahal, juga adanya anggapan bahwa obat sintesis menyebabkan efek samping (Abubakar et al., 2021). Pangan fungsional berbasis alami yang memiliki manfaat kesehatan banyak diminati oleh masyarakat. Pola konsumsi masyarakat berubah seiring dengan meningkatnya gangguan kesehatan, dari pola konsumsi bebas menuju selektif, sehingga peluang pangan fungsional sangat besar (Suratno et al., 2014). Sehingga, penelitian untuk mengidentifikasi dan mengembangkan alternatif antidepresan dan antikecemasan dari komponen alami dalam bahan makanan alami menjadi topik yang digemari.

Salah satu sumber pangan yang diketahui memiliki fungsi sebagai antidepresan adalah bioaktif peptida (Li et al., 2024). Protein yang berukuran besar dihidrolisis dalam proses fermentasi, perkecambahan atau hidrolisis dengan enzim protease tertentu akan terpotong-potong menjadi fragmen yang lebih pendek terdiri dari 2-30 asam amino (Mora et al., 2019). Fragmen-fragmen yang terbentuk ini memiliki ukuran dan jenis asam amino penyusun yang beragam, tergantung sumber protein dan jenis enzim protease yang digunakan (Mótyán et al., 2013). Sehingga Peptida yang dihasilkan memiliki bioaktivitas yang berbeda-beda seperti antioksidan (Lorenzo et al., 2018), antidiabetes (Yan et al., 2019), anti hipertensi (Li et al., 2022) dan masih banyak lagi (Kang et al., 2022). Selain itu, dalam bidang neuromodulasi, peptida bioaktif terbukti memiliki peran penting dalam mengatasi gangguan mental seperti depresi dan kecemasan (Mizushige, 2021).

Akan tetapi, dalam proses penelitian tentang bioaktif peptida yang memiliki aktivitas sebagai antidepresan membutuhkan serangkaian proses panjang dan cukup rumit (Nong and Hsu, 2022). Secara konvensional, isolasi dan pemurnian sangat penting untuk mengidentifikasi komponen yang terlibat dalam hidrolisat enzimatis (Wardani et al., 2023). Yaitu, prosesnya melibatkan pemisahan hidrolisat enzimatis dengan alat seperti kolom, penyaringan menggunakan aktivitas fisiologis yang terkait dengan fungsi target sebagai indeks, dan mengidentifikasi molekul yang terkandung pada puncak aktivitas (Ewert et al., 2022). Meskipun metodologi ini praktis, aktivitas fisiologis sering hilang dalam prosesnya, atau jumlah sampel terlalu kecil untuk diidentifikasi.

Selain itu, dalam pembuktian aktivitas antidepresan dan antikecemasan perlu uji *in vivo* dengan uji perilaku pada hewan coba. Akan tetapi pengujian perilaku pada hewan coba memiliki beberapa kelemahan diantaranya adalah reproduktivitas yang buruk, data yang dihasilkan memiliki perbedaan yang besar terhadap ulangan, dan penanganan yang cukup rumit (Li et al., 2024). Sehingga, screening secara *in vitro* terhadap senyawa potensial antidepresan dan antikecemasan perlu dilakukan terlebih dahulu.

Oleh karena itu, dalam kajian ini akan membahas tentang tahapan-tahapan yang dapat membantu mempermudah dalam eksplorasi bioaktif peptide untuk antidepresan dan antikecemasan. Diantaranya pendugaan secara *insilico* dan Simulasi biopeptida dengan sintesis peptida dengan F-Moc. Selain itu, beberapa rekomendasi pengujian secara *invitro* dan *in vivo* untuk menguji potensi antidepresan dan antikecemasan akan diberikan.

2. Antidepresan dan antikecemasan dari peptida bioaktif

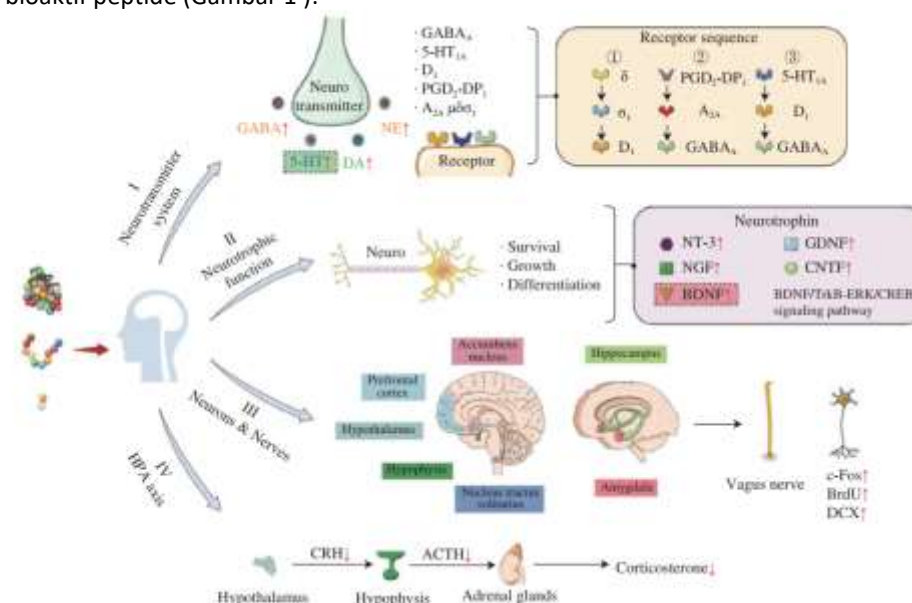
Sebelum pembahasan terkait tahap dan metode yang menjadi pokok bahasan ini. Terlebih dahulu perlu adanya paparan terkait ciri-ciri fisikokimia dan mekanisme antidepresan serta antikecemasan untuk pemahaman awal. Peptida bioaktif adalah fragmen protein yang memiliki efek biologis spesifik pada tubuh. Penelitian menunjukkan bahwa peptida bioaktif dapat mempengaruhi sistem saraf pusat dan berpotensi digunakan untuk mengobati gangguan mood dan kecemasan (Liu and Udenigwe, 2019).

Peptida bioaktif memiliki sifat fungsional yang berbeda-beda tergantung ukuran dan urutan fragmen yang terbentuk (Bhandari et al., 2020). Oleh karena itu ciri-ciri fisikokimia sangat menentukan sifat bioaktif dari peptida tersebut. Ciri-ciri sifat fisikokimia dari peptida yang memiliki sifat antidepresan dan antikecemasan dapat dilihat pada Tabel 1. Ciri-ciri fisikokimia ini dapat dijadikan acuan untuk mencari peptida-peptida dari sumber yang memiliki sifat mirip untuk menjadi sumber peptida bioaktif antidepresan dan antikecemasan yang baru.

Tabel 1 Ciri fisikokimia peptida bioaktif antidepresan dan antikecemasan

Ciri fisikokimia	Referensi
Memiliki bobot molekul yang kecil	(Li et al., 2024)
Hydrophobic dan stabil	(Mizushige, 2021)
Mengandung asam amino Leu, Tyr, Pro dan Trp	(Li et al., 2024)
Dipeptida dengan Sequence YL	(Kanegawa et al., 2010)
Dipeptida WL dan FL (dengan mengganti N-terminus tyrosin dengan asam amino aromatik)	(Mizushige et al., 2013)
Leucine pada C terminus apabila diganti dengan asam amino lain tidak menunjukan sifat antidepresan dan anti kecemasan	(Mizushige et al., 2020)

Peptida bioactive dapat menunjukan aktivitas antidepresan dan antikecemasan melalui beberapa mekanisme. Berdasarkan (Li et al., 2024) ada 4 mekanisme antidepresan dan antikecemasan yang dapat ditimbulkan oleh bioaktif peptide (Gambar 1):



Gambar 1 Mekanisme peptida bioaktif sebagai antidepresan dan antikecemasan (Li et al., 2024)

Mekanisme yang pertama adalah mekanisme neurotransmitter. Peptida bioaktif mempengaruhi sistem neurotransmitter dengan meningkatkan kadar neurotransmitter seperti GABA, serotonin (5-HT), dopamin (DA),

dan norepinefrin (NE). Neurotransmitter merupakan senyawa yang mempengaruhi perubahan suasana hati akibat rangsangan yang datang. Jumlah neurotransmitter yang dikeluarkan sangat mempengaruhi emosi, tingkat stress, kualitas tidur dan mood swing. Hal ini terjadi karena peptida bioaktif mampu berinteraksi dengan reseptor-reseptor seperti GABAA dapat dipengaruhi oleh Rubimetide (Met-Arg-Trp) (Zhao et al., 2016), 5-HT1A merupakan reseptor untuk serotonin dapat dipengaruhi fragmen YL (Mizushige et al., 2020), dan opioid reseptor (μ , δ , and κ reseptor) yang dapat berikat dengan bioaktif peptida dari kedelai yang disebut soymorphins (YPFVV, YPFVVN dan YPFVVNA) (Ohinata et al., 2007a).

Mekanisme kedua adalah fungsi neurotropik. Peptida bioaktif mendukung fungsi neurotropik, yang mencakup kelangsungan hidup, pertumbuhan, dan diferensiasi neuron, Peptida ini meningkatkan level neurotrophin seperti NT-3, NGF, BDNF, GDNF, dan CNTF. Aktivasi jalur sinyal BDNF/TrkB-ERK/CREB meningkatkan neuroplastisitas dan kesehatan neuron. Stress dapat secara langsung menurunkan kadar BDNF di hipotalamus dan mempercepat gejala depresi. Peptida EW, oligopeptida Trp yang berasal dari protein whey, GDCH, peptida polisakarida GLS, KFP, dan dipeptida PO dapat meningkatkan ekspresi BDNF dan dengan demikian mengurangi gejala kecemasan dan depresi (Chen et al., 2021).

Mekanisme yang ketiga adalah neurogenesis dan nerves. Kecemasan dan depresi menyebabkan aktivasi sel saraf di berbagai wilayah otak. Namun, hidrolisat protein dan peptida dapat mengatur ekspresi neuron dengan berbagai cara untuk mengurangi gejala kecemasan dan depresi. Peptida bioaktif mendorong neurogenesis (pembentukan neuron baru) dan fungsi saraf. Peningkatan ekspresi c-Fos, BrdU, dan DCX menunjukkan peningkatan aktivitas neurogenesis, yang membantu dalam pemulihan fungsi otak yang terganggu oleh stres atau gangguan mood. Selain itu, hidrolisat protein saraf dan peptida, dengan hanya dua studi yang menemukan efek melalui saraf vagus. Peptida dari kedelai seperti β CG α (323–333) dan soy-deprestatin menunjukkan efek anxiolytic dan antidepresan pada tikus. Kedua peptida ini meningkatkan ekspresi c-Fos di nucleus tractus solitarius (NTS), menunjukkan bahwa efeknya dimediasi melalui saraf vagus (Ota et al., 2017).

Mekanisme terakhir adalah poros HPA (Hipotalamus-Pituitari-Adrenal). Sumbu HPA adalah sistem stres penting dalam tubuh, yang mekanismenya utamanya melibatkan pelepasan CRH (corticotropin-releasing hormone) dari hipotalamus, yang kemudian merangsang pelepasan ACTH (adrenocorticotrophic hormone) dari kelenjar pituitari. ACTH kemudian merangsang kelenjar adrenal untuk mengeluarkan corticosterone. Ada juga fenomena umpan balik negatif dimana pelepasan CORT menghambat hipotalamus dan kelenjar pituitari. Penelitian menunjukkan bahwa hiperaktivitas sumbu HPA dan pelepasan kortisol terkait dengan kecemasan dan depresi. Penelitian juga menemukan bahwa oligopeptida Trp, Peptidyss, dipeptida YL, dan polisakarida peptida GLS dapat mengurangi kadar corticosterone pada mencit dalam situasi stres, yang mengatur sumbu HPA untuk mengurangi kecemasan dan depresi (Ota et al., 2017; Zhao et al., 2021).

3. Bioaktif In Silico sifat Antidepresan dan antikecemasan

Setelah mengetahui ciri-ciri fisikokimia yang memiliki sifat antidepresan dan antikecemasan, tahap selanjutnya adalah melakukan pendugaan terhadap sumber-sumber protein yang di hidrolisis bermacam-macam enzim atau disebut in silico peptida. In silico bioaktif peptida merujuk pada penggunaan teknik komputasi dan simulasi untuk merancang, menganalisis, dan memprediksi aktivitas bioaktif dari peptida. Pendekatan in silico ini memungkinkan peneliti untuk melakukan eksplorasi secara virtual sebelum melakukan eksperimen laboratorium.

Metode in silico adalah teknik komputasi yang digunakan untuk memprediksi dan menganalisis sifat dan interaksi peptida bioaktif tanpa memerlukan eksperimen laboratorium. Pendekatan ini semakin penting dalam penemuan dan pengembangan peptida dengan efek terapeutik potensial, termasuk aktivitas antidepresan dan antikecemasan. Dengan memanfaatkan alat komputasi canggih, peneliti dapat secara efisien menyaring dan mengidentifikasi kandidat peptida yang menjanjikan, sehingga mengurangi waktu dan biaya yang terkait dengan metode eksperimental tradisional (Mine et al., 2010).

Beberapa basis data online dan perangkat lunak sangat penting dalam analisis in silico peptida bioaktif. Alat seperti PeptideRanker, BIOPEP-UWM, dan PeptideDB menyediakan sumber daya yang berharga untuk analisis urutan peptida, prediksi bioaktivitas, dan pengambilan data peptida. PeptideRanker sangat berguna untuk memprediksi skor bioaktivitas peptida berdasarkan urutannya, sementara BIOPEP-UWM menawarkan fungsionalitas untuk menentukan potensi aktivitas biologis dan produk hidrolisis enzim. PeptideDB berfungsi sebagai basis data komprehensif dari peptida alami dan sintetis, yang memudahkan pencarian urutan dengan sifat yang diinginkan (Minkiewicz et al., 2008; Wardani et al., 2023). Gambar 2. Merupakan contoh langkah-langkah in silico dengan menggunakan data base BIOPEP-UWM.

BIOPEP-UWM: ANALYSIS

PROFILES OF POTENTIAL BIOLOGICAL ACTIVITY

Select Activity:
* - all activities

- ☒ alpha-amylase inhibitor | aami
- ☒ antiemetic | am
- ☒ ACE inhibitor | ah
- ☐ celiac toxic | ctoc
- ☐ antibacterial | ab
- ☐ antithrombotic | at
- ☐ immunomodulating | im
- ☐ opioid | op
- ☐ stimulating | sti
- ☐ immunostimulating | is
- ☒ neuropeptide | ne
- ☐ regulating | re
- ☐ anticancer | ac
- ☐ antioxidative | ao
- ☐ contracting | con
- ☐ bacterial permease ligand | lig
- ☐ anti inflammatory | ai
- ☐ natriuretic | nat
- ☐ inhibitor | inh

BIOPEP-UWM: Select protein from database

Protein: 1775 | Beta-conglycinin, alpha chain, precursor, soybean (Glycine max) | 605

- 1768 | Agglutinin isolectin 2, precursor, bread wheat (Triticum aestivum) | 213
- 1769 | Agglutinin isolectin 1, precursor, bread wheat (Triticum aestivum) | 212
- 1770 | Allergenic peptide, low-molecular weight glutenin chain, fragment, wheat (Triticum aestivum) | 30
- 1771 | Pollen allergen-like protein, wheat (Triticum aestivum) | 118
- 1772 | Expansin-B1, precursor, rice (Oryza sativa subsp japonica) | 267
- 1773 | Profilin A, rice (Oryza sativa subsp japonica) | 131
- 1774 | Non-specific lipid-transfer protein, precursor, maize (Zea mays) | 120
- 1775 | beta-conglycinin, alpha chain, precursor, soybean (Glycine max) | 605**
- 1776 | P34 probable thiol protease, precursor, soybean (Glycine max) | 379
- 1777 | Profilin-1, soybean (Glycine max) | 131
- 1778 | Stress-induced protein SAM22, soybean (Glycine max) | 158
- 1779 | Allergen Ara h 1, clone P17, precursor, peanut (Arachis hypogaea) | 614
- 1780 | Conglutin-7, precursor, peanut (Arachis hypogaea) | 172
- 1781 | Glycinin, fragment, peanut (Arachis hypogaea) | 507
- 1782 | Glycinin, peanut (Arachis hypogaea) | 530
- 1783 | Profilin, peanut (Arachis hypogaea) | 131
- 1784 | Conglutin, precursor, peanut (Arachis hypogaea) | 145
- 1785 | Arachin 6, peanut (Arachis hypogaea) | 529
- 1786 | 2 S seed storage protein 1, precursor, oriental sesame (Sesamum indicum) | 148
- 1787 | 7 S globulin, oriental sesame (Sesamum indicum) | 585

BIOPEP-UWM: Profiles of proteins potential biological activity

sort by id | sort by activity | sort by sequence | Export to EXCEL

ID of protein: 1775. Name: Beta-conglycinin, alpha chain, precursor, soybean (Glycine max)
Protein sequence:
MMRARFPLLLGLVFLASVSVSFGIAYWEKNPKHMKCLQSCNSERDYSYRNGACHARCNLLKVEKECEEGEIPRPQHPEREPPQPGKEKEE

ID	Name of peptide	Activity	Number	Sequence	Location
2890	neuropeptide	neuropeptide	1	GQ	[363-364]
8310	Arsenolytic peptide	neuropeptide	2	YL	[255-256],[333-334]
9634	Kyotorphin	neuropeptide	4	YR	[49-50],[233-234],[277-278],[490-497]
10116	Antinociceptive peptide	neuropeptide	6	RP	[75-76],[77-78],[79-80],[102-103],[108-109],[157-158]
10454	Neuropeptide	neuropeptide	1	RR	[188-189]
10455	Neuropeptide	neuropeptide	6	IL	[235-236],[259-260],[265-266],[341-342],[462-463],[600-601]

Gambar 2 Contoh In Silico menggunakan BIOPEP-UWM

4. Bioaktif Sintesis Bioaktif Peptida

Secara konvensional bioaktif peptida dihasilkan dari hidrolisis enzim-enzim yang sudah diperkirakan dan disimulasikan melalui *in silico*. Dengan demikian target bioaktif yang dituju dapat diprediksi dengan menggunakan enzim apa saja untuk hidrolisis. Selanjutnya proses sebelum proses identifikasi dan pembuktian bioaktif, hidrolisat hasil hidrolisis enzim atau fermentasi tersebut harus dimurnikan terlebih dahulu.

Banyak kendala yang terjadi dalam proses sintesis peptida dengan menggunakan metode konvensional. Diantaranya: kontrol terbatas terhadap fragmen peptida yang terbentuk, efisiensi rendah dan proses pemurnian yang membutuhkan waktu lama. Sehingga untuk membuktikan peptida yang dituju memiliki bioaktif akan memerlukan proses yang panjang.

Metode Fmoc (Fluorenylmethyloxycarbonyl) strategy merupakan salah satu teknik utama dalam sintesis peptida bioaktif, yang menawarkan kontrol ketat terhadap urutan asam amino yang disintesis. Teknik ini sering digunakan dalam Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS), di mana peptida disintesis dari asam amino yang diikat pada resin padat. Metode ini sangat berguna untuk menghasilkan peptida dengan urutan tertentu dan kemurnian tinggi, yang sangat penting dalam penelitian dan aplikasi farmasi (Behrendt et al., 2016).

Langkah pertama dalam Fmoc strategy adalah pemilihan dan persiapan resin. Resin yang sesuai, seperti polystyrene resin yang dimodifikasi, dipilih sebagai fase padat. Resin ini memiliki gugus reaktif yang akan mengikat asam amino pertama. Resin direndam dalam pelarut seperti DMF (N,N-dimethylformamide) untuk membuatnya membengkak dan lebih reaktif. Setelah itu, asam amino pertama, yang dilindungi oleh gugus Fmoc pada ujung amina, diikat ke resin melalui gugus karboksilnya menggunakan agen pengikat seperti DIC (diisopropylcarbodiimide) atau HBTU (O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate).

Setelah asam amino pertama terikat pada resin, tahap berikutnya adalah deproteksi Fmoc. Gugus Fmoc dihilangkan menggunakan larutan basa, biasanya piperidine dalam DMF. Penghapusan gugus Fmoc membuka gugus amina yang akan bereaksi dengan asam amino berikutnya. Tahap ini diulang setelah setiap penambahan asam amino untuk memungkinkan elongasi rantai peptida secara berurutan. Deproteksi yang efektif memastikan bahwa setiap asam amino dapat ditambahkan dengan benar sesuai dengan urutan yang diinginkan.

Setelah setiap deproteksi, asam amino berikutnya yang juga dilindungi oleh Fmoc ditambahkan ke resin. Proses ini disebut coupling, di mana asam amino baru bergabung dengan rantai peptida yang sedang tumbuh melalui reaksi kimia dengan gugus amina bebas yang baru saja di-deproteksi. Agen pengikat yang sama seperti DIC atau HBTU digunakan untuk memfasilitasi reaksi ini. Siklus ini diulang hingga seluruh urutan peptida selesai disintesis. Setelah setiap coupling, capping dapat dilakukan untuk memastikan tidak ada gugus amina bebas yang tidak bereaksi, mencegah elongasi peptida yang tidak diinginkan.

Setelah rantai peptida lengkap, peptida dilepaskan dari resin menggunakan larutan asam kuat, seperti TFA (trifluoroacetic acid), yang juga menghilangkan gugus pelindung samping dari asam amino. Peptida yang terikat pada resin dapat dilepaskan dalam bentuk larutan, dan biasanya diendapkan dengan menambahkan pelarut non-pelarut seperti eter dingin untuk mendapatkan peptida dalam bentuk padat. Setelah itu, peptida dimurnikan menggunakan berbagai teknik kromatografi untuk memastikan kemurnian dan identitas peptida yang dihasilkan.

Langkah terakhir adalah karakterisasi peptida yang disintesis. Massa peptida ditentukan menggunakan teknik spektrometri massa seperti MALDI-TOF atau ESI-MS untuk memastikan bahwa peptida yang disintesis memiliki massa yang sesuai dengan target. Metode tambahan seperti NMR (Nuclear Magnetic Resonance) atau analisis HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) dapat digunakan untuk memastikan struktur dan kemurnian peptida. Langkah-langkah ini memastikan bahwa peptida yang dihasilkan memiliki urutan dan kemurnian yang diinginkan, siap untuk digunakan dalam penelitian lebih lanjut atau aplikasi terapeutik (Behrendt et al., 2016).

Dalam keseluruhan proses Fmoc strategy, keunggulan utamanya adalah kemampuannya untuk menghasilkan peptida dengan urutan yang tepat dan kemurnian tinggi, yang sangat penting untuk penelitian dan aplikasi farmasi. Meskipun memerlukan peralatan khusus dan keterampilan teknis yang tinggi, keuntungannya dalam kontrol urutan dan kemurnian membuatnya menjadi pilihan utama dalam sintesis peptida bioaktif. Dengan demikian, metode ini terus menjadi alat yang berharga dalam ilmu biokimia dan bioteknologi (Diao and Meibohm, 2013; Hojo et al., 2014).

Banyak penelitian yang menggunakan Fmoc sebagai metode sintesis peptidanya. Setelah memastikan fragmen peptida yang dituju dari sumber protein dan enzim yang digunakan, kemudian dilakukan sintesis peptida sesuai dengan Fmoc agar mendapatkan tingkat kemurnian peptida yang tinggi dan mengurangi proses

pemunian apabila menggunakan hidrolisis enzim. Fmoc digunakan oleh (Pantic et al., 2017) pada penelitian Penelitian Peptida Pseudin-2 sebagai Antidepresan dari kulit katak, dan peptida GLYX-13 untuk depresi (Donello et al., 2019),

5. Screening in vitro Antidepresan dan antikecemasan

Pengujian in vitro untuk screening aktivitas antidepresan dan antikecemasan merupakan langkah awal yang krusial dalam penelitian farmakologi. Metode-metode ini digunakan untuk mengevaluasi potensi senyawa bioaktif, termasuk peptida, dalam memodulasi berbagai target molekuler yang terkait dengan gangguan depresi dan kecemasan. Dengan menggunakan berbagai teknik laboratorium yang canggih, para peneliti dapat mengidentifikasi dan mengkarakterisasi senyawa yang menjanjikan sebelum melanjutkan ke uji in vivo dan klinis.

Salah satu uji utama dalam screening ini adalah uji penangkapan serotonin dan norepinefrin. Serotonin (5-HT) dan norepinefrin (NE) adalah neurotransmitter kunci yang terlibat dalam regulasi suasana hati. Banyak obat antidepresan bekerja dengan menghambat reuptake dari neurotransmitter ini, sehingga meningkatkan konsentrasinya di sinaps. Dalam uji in vitro, sel yang mengekspresikan transporter serotonin (SERT) dan norepinefrin (NET) diinkubasi dengan senyawa yang diuji, dan penangkapan neurotransmitter diukur menggunakan teknik seperti HPLC (Ahn et al., 2023). Hasilnya memberikan indikasi awal apakah senyawa tersebut memiliki potensi sebagai inhibitor reuptake serotonin dan norepinefrin. Selain itu, metode ini juga dapat menggunakan sel dari jaringan ileum guinea pig dan vas deferens tikus. Prinsip pengujiannya sama dengan menggunakan sel kultur yaitu dengan mengukur neurotransmitter (serotonin, norepinefrin, serotonin, dopamin dll) yang di eksresikan oleh sel dan kemudian analisis dengan menggunakan HPLC. Sel dari jaringan ileum guinea pig dan vas deferens tikus berhubungan dengan reseptor opioid (Ohinata et al., 2007b)

Assay reseptor GABA merupakan metode lain yang sering digunakan dalam penelitian antikecemasan. GABA (γ -Aminobutyric Acid) adalah neurotransmitter utama yang menghambat aktivitas saraf dan berperan penting dalam pengurangan kecemasan. Uji ini melibatkan penggunaan sel yang mengekspresikan reseptor GABA, di mana aktivitas reseptor dapat diukur melalui teknik seperti patch-clamp electrophysiology atau menggunakan fluorescent dye untuk memantau perubahan ion. Metode ini menggunakan sel CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary). Sel-sel ini ditransfeksi secara transient dengan plasmid yang mengandung gen subunit reseptor GABA_A ($\alpha 2$, $\beta 3$, $\gamma 2$) dan gen YFP. Teknik ini memungkinkan pengukuran aktivitas reseptor melalui perubahan fluoresensi, yang diinduksi oleh ikatan ligan atau modulasi alosterik. Senyawa yang meningkatkan aktivitas reseptor GABA diharapkan memiliki efek anxiolytic atau penenang (Johansson et al., 2013)

Selain itu, uji binding reseptor juga menjadi bagian integral dari screening aktivitas antidepresan dan antikecemasan. Uji ini menilai afinitas senyawa terhadap berbagai reseptor yang berhubungan dengan mood dan kecemasan. Teknik radioligand binding assay digunakan untuk mengukur seberapa kuat senyawa mengikat reseptor target, memberikan gambaran tentang potensi efektivitasnya (ligan berlabel radioaktif (misalnya, 3H atau ^{125}I), digunakan untuk mengikat reseptor). Sel kultur yang digunakan adalah sel-sel dari otak tikus. Hasil dari uji ini membantu mengidentifikasi senyawa yang dapat menjadi kandidat obat yang potensial (Malyshev et al., 2021).

Assay neurogenesis dan uji kelangsungan hidup serta apoptosis sel juga penting dalam penelitian ini. Assay neurogenesis menilai efek senyawa pada pembentukan sel saraf baru, yang relevan dalam mekanisme aksi antidepresan. Uji kelangsungan hidup dan apoptosis sel mengukur pengaruh senyawa terhadap kesehatan sel saraf, terutama dalam kondisi stres oksidatif. Metode ini menggunakan berbagai teknik, termasuk MTT assay untuk kelangsungan hidup sel dan TUNEL assay untuk deteksi apoptosis, membantu memahami dampak senyawa pada kesehatan neuron (Mirzayans and Murray, 2020).

Secara keseluruhan, pengujian in vitro memberikan landasan penting dalam penemuan dan pengembangan sifat antidepresan dan antikecemasan dari bioaktif peptida. Dengan mengevaluasi interaksi senyawa dengan berbagai target molekuler, para peneliti dapat mengidentifikasi senyawa yang menjanjikan untuk pengembangan lebih lanjut. Kombinasi berbagai uji ini tidak hanya membantu dalam memahami mekanisme aksi senyawa, tetapi juga mempercepat proses penemuan obat yang efektif dan aman bagi penderita gangguan mood dan kecemasan.

Selain itu dengan pengujian in vitro yang kebanyakan menggunakan cell kultur tetapi dengan target reseptor dan neurotransmitter yang berbeda-beda mempermudah peneliti untuk memahami mekanisme antidepresan yang ditimbulkan dari peptida yang digunakan. Selanjutnya pengujian dapat dibuktikan secara in vivo dengan menggunakan uji tingkah laku pada hewan coba.

6. Pembuktian secara in vivo potensi Antidepresan dan antikecemasan

Pengujian in vivo pada tikus untuk menilai aktivitas antidepresan dan antikecemasan senyawa adalah langkah penting dalam penelitian farmakologi. Metode ini digunakan untuk menilai berbagai respons perilaku dan fisiologis tikus yang berhubungan dengan gangguan mood dan kecemasan. Beberapa metode yang umum digunakan mencakup Forced Swim Test (FST), Tail Suspension Test (TST), Elevated Plus Maze (EPM), Open Field Test (OFT), Light/Dark Box Test, (Cryan, 2010).

1. Forced Swim Test (FST)

Forced Swim Test (FST) adalah metode yang paling sering digunakan untuk menilai aktivitas antidepresan. Tikus ditempatkan dalam wadah berisi air dan diamati berapa lama mereka tetap bergerak aktif untuk mencoba melarikan diri. Obat antidepresan biasanya mengurangi waktu imobilitas, menunjukkan bahwa tikus lebih berusaha untuk berenang atau melarikan diri, yang diterjemahkan sebagai indikasi aktivitas antidepresan.

2. Tail Suspension Test (TST)

Tail Suspension Test (TST) digunakan untuk mengukur perilaku depresi berdasarkan respons tikus yang digantung di udara dengan ekornya. Waktu imobilitas diukur sebagai indikator perilaku putus asa. Obat antidepresan biasanya mengurangi waktu imobilitas, menunjukkan bahwa tikus lebih termotivasi untuk mencoba melarikan diri, yang dianggap sebagai indikasi efek antidepresan.

3. Elevated Plus Maze (EPM)

Elevated Plus Maze (EPM) adalah metode untuk menilai efek anxiolytic (pengurang kecemasan). Tikus ditempatkan di maze berbentuk tanda tambah dengan dua lengan terbuka dan dua lengan tertutup. Waktu yang dihabiskan di lengan terbuka dibandingkan dengan waktu di lengan tertutup digunakan untuk menilai tingkat kecemasan. Obat anxiolytic cenderung meningkatkan waktu yang dihabiskan di lengan terbuka, menunjukkan bahwa tikus merasa lebih sedikit cemas.

4. Open Field Test (OFT)

Open Field Test (OFT) digunakan untuk mengukur aktivitas motorik dan tingkat kecemasan. Tikus ditempatkan di arena terbuka dan pergerakannya dilacak. Parameter yang diukur termasuk jarak yang ditempuh, frekuensi masuk ke area tengah, dan waktu yang dihabiskan di area tengah. Obat anxiolytic cenderung meningkatkan eksplorasi area tengah, menunjukkan penurunan kecemasan.

5. Light/Dark Box Test dan Social Interaction Test

Light/Dark Box Test menilai perilaku kecemasan berdasarkan preferensi tikus terhadap area gelap atau terang. Tikus cenderung menghabiskan lebih banyak waktu di area gelap saat cemas. Social Interaction Test mengukur kecemasan sosial berdasarkan interaksi tikus dengan tikus lain. Obat anxiolytic biasanya meningkatkan interaksi sosial, menunjukkan penurunan kecemasan (Benoit et al., 2020).

Penggunaan berbagai metode ini, baik yang konvensional maupun yang terbaru, memungkinkan penilaian komprehensif terhadap efek antidepresan dan anxiolytic dari senyawa yang diuji. Teknik-teknik ini tidak hanya membantu dalam memahami mekanisme aksi senyawa tetapi juga mempercepat proses penemuan obat yang efektif dan aman bagi penderita gangguan mood dan kecemasan.

Uji perilaku pada hewan coba memiliki beberapa kekurangan di antara adalah reproduktivitas yang buruk, data yang dihasilkan memiliki perbedaan yang besar terhadap ulangan, dan penanganan yang cukup rumit (Li et al., 2024). Menggabungkan uji perilaku dengan analisis biomarker dapat memberikan gambaran yang lebih komprehensif tentang efek antidepresan. Biomarker seperti kortikosteron, BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), dan neurotransmitter lainnya dapat diukur untuk mendukung hasil uji perilaku (Benoit et al., 2020)(Zhang et al., 2023).

7. Kesimpulan

Peptida bioaktif yang berasal dari pangan memiliki potensi besar sebagai agen antidepresan dan antikecemasan alami. Mekanisme bioaktifnya meliputi modulasi neurotransmitter, peningkatan faktor neurotropik, stimulasi neurogenesis, serta pengaturan sumbu hipotalamus-pituitari-adrenal (HPA). Namun, proses identifikasi dan pembuktiannya memerlukan pendekatan multidisipliner. Pendugaan secara in silico mampu mempercepat penentuan kandidat peptida yang potensial sebelum dilakukan sintesis dengan metode Fmoc yang menawarkan kemurnian tinggi. Selanjutnya, screening in vitro pada berbagai target reseptor dan neurotransmitter menjadi tahap penting sebelum pembuktian in vivo melalui uji perilaku pada hewan coba.

Integrasi metode *in silico*, *in vitro*, dan *in vivo* memungkinkan efisiensi dalam menemukan, menyaring, dan memvalidasi peptida bioaktif sebagai kandidat pangan fungsional sekaligus agen terapeutik. Dengan demikian, pengembangan peptida bioaktif berbasis pangan berpeluang besar untuk mendukung kesehatan mental serta menjadi alternatif dari obat sintetik yang sering menimbulkan efek samping.

Daftar Pustaka

- Abubakar, A., Sani, I.H., Malami, S., Yaro, A., Jahan, I., Adnan, N., et al., 2021, Review: Anxiety Disorders: Recent Global Approach to Neuro-pathogenesis, Drug Treatment, Cognitive Behavioral Therapy, and Their Implications, *Bangladesh J. Med. Sci.*, 20, 487–503.
- Ahn, H., Park, K., Kim, D., Chi, S.G., Choi, K.H., Han, S.J., and Song, C., 2023, Implications for Combination Therapy of Selective Monoamine Reuptake Inhibitors on Dopamine Transporters, *Biomedicines*, 11, 1–10.
- Behrendt, R., White, P., and Offer, J., 2016, Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis., *J. Pept. Sci. an Off. Publ. Eur. Pept. Soc.*, 22, 4–27.
- Benoit, S., Chaumontet, C., Schwarz, J., Cakir-Kiefer, C., Boulrier, A., Tomé, D., and Miclo, L., 2020, Anxiolytic Activity and Brain Modulation Pattern of the α -Casozepine-Derived Pentapeptide YLGYL in Mice., *Nutrients*, 12, .
- Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., and Kumar, V., 2020, A Review on Bioactive Peptides: Physiological Functions, Bioavailability and Safety, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 26, 139–150.
- Chen, H.-L., Lan, Y.-W., Tu, M.-Y., Tung, Y.-T., Chan, M.N.-Y., Wu, H.-S., et al., 2021, Kefir peptides exhibit antidepressant-like activity in mice through the BDNF/TrkB pathway., *J. Dairy Sci.*, 104, 6415–6430.
- Craske, M.G. and Stein, M.B., 2016, Anxiety., *Lancet (London, England)*, 388, 3048–3059.
- Cryan, J.F., 2010, Depression., In: Koob, G.F., Moal, M. Le, and Thompson, R.F. (eds), *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*. Academic Press, Oxford, pp. 382–386.
- Diao, L. and Meibohm, B., 2013, Pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides., *Clin. Pharmacokinet.*, 52, 855–868.
- Donello, J.E., Banerjee, P., Li, Y.-X., Guo, Y.-X., Yoshitake, T., Zhang, X.-L., et al., 2019, Positive N-Methyl-D-Aspartate Receptor Modulation by Rapastinel Promotes Rapid and Sustained Antidepressant-Like Effects., *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 22, 247–259.
- Ewert, J., Eisele, T., and Stressler, T., 2022, Enzymatic production and analysis of antioxidative protein hydrolysates, *Eur. Food Res. Technol.*, 248, 2167–2184.
- Hojo, K., Shinozaki, N., Hidaka, K., Tsuda, Y., Fukumori, Y., Ichikawa, H., and Wade, J.D., 2014, Aqueous microwave-assisted solid-phase peptide synthesis using Fmoc strategy. III: racemization studies and water-based synthesis of histidine-containing peptides., *Amino Acids*, 46, 2347–2354.
- Johansson, T., Norris, T., and Peilot-Sjögren, H., 2013, Yellow fluorescent protein-based assay to measure GABA(A) channel activation and allosteric modulation in CHO-K1 cells., *PLoS One*, 8, e59429.
- Kanegawa, N., Suzuki, C., and Ohinata, K., 2010, Dipeptide Tyr-Leu (YL) exhibits anxiolytic-like activity after oral administration via activating serotonin 5-HT_{1A}, dopamine D1 and GABAA receptors in mice., *FEBS Lett.*, 584, 599–604.
- Kang, L., Han, T., Cong, H., Yu, B., and Shen, Y., 2022, Recent research progress of biologically active peptides, *Biofactors*, 48, 575–596.
- Li, T., Zhang, X., Ren, Y., Zeng, Y., Huang, Q., and Wang, C., 2022, Antihypertensive effect of soybean bioactive peptides: A review, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 62, 74–81.
- Li, W., Xi, Y., Wang, J., Zhang, Y., Li, H., and Liu, X., 2024, Food-derived protein hydrolysates and peptides: anxiolytic and antidepressant activities, characteristics, and mechanisms, *Food Sci. Hum. Wellness*, 13, 1168–1185.
- Liu, Z. and Udenigwe, C.C., 2019, Role of food-derived opioid peptides in the central nervous and gastrointestinal systems., *J. Food Biochem.*, 43, e12629.
- Lorenzo, J.M., Munekata, P.E.S., Gómez, B., Barba, F.J., Mora, L., Pérez-Santaescolástica, C., and Toldrá, F., 2018, Bioactive peptides as natural antioxidants in food products--A review, *Trends food Sci. & Technol.*, 79, 136–147.
- Malhi, G.S. and Mann, J.J., 2018, Depression., *Lancet (London, England)*, 392, 2299–2312.
- Malyshev, A. V., Sukhanova, I.A., Zlobin, A.S., Gedzun, V.R., Pavshintsev, V. V., Vasileva, E. V., et al., 2021, *In silico* Screening and Behavioral Validation of a Novel Peptide, LCGA-17, With Anxiolytic-Like Properties, *Front. Neurosci.*, 15, 1–13.

- McCarron, R.M., Shapiro, B., Rawles, J., and Luo, J., 2021, Depression, *Ann. Intern. Med.*, 174, ITC65–ITC80.
- Mine, Y., Li-Chan, E., and Jiang, B., 2010, Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals,.
- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba, M., and Darewicz, M., 2008, BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences, *J. AOAC Int.*, 91, 965–980.
- Mirzayans, R. and Murray, D., 2020, Do TUNEL and other apoptosis assays detect cell death in preclinical studies?, *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 1–12.
- Mizushige, T., 2021, Neuromodulatory peptides: Orally active anxiolytic-like and antidepressant-like peptides derived from dietary plant proteins, *Peptides*, 142, .
- Mizushige, T., Kanegawa, N., Yamada, A., Ota, A., Kanamoto, R., and Ohinata, K., 2013, Aromatic amino acid-leucine dipeptides exhibit anxiolytic-like activity in young mice., *Neurosci. Lett.*, 543, 126–129.
- Mizushige, T., Uchida, T., and Ohinata, K., 2020, Dipeptide tyrosyl-leucine exhibits antidepressant-like activity in mice., *Sci. Rep.*, 10, 2257.
- Mora, L., Gallego, M., Aristoy, M.-C., Reig, M., and Toldrá, F., 2019, Bioactive peptides., In, *Innovative thermal and non-thermal processing, bioaccessibility and bioavailability of nutrients and bioactive compounds*. Elsevier, pp. 333–345.
- Mótyán, J., Tóth, F., and Tózsér, J., 2013, Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology, *Biomolecules*, 3, 923–942.
- Nong, N.T.P. and Hsu, J.L., 2022, Bioactive Peptides: An Understanding from Current Screening Methodology, *Processes*, 10, 1–25.
- Ohinata, K., Agui, S., and Yoshikawa, M., 2007a, Soymorphins, novel mu opioid peptides derived from soy beta-conglycinin beta-subunit, have anxiolytic activities., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2618–2621.
- Ohinata, K., Agui, S., and Yoshikawa, M., 2007b, Soymorphins, novel μ opioid peptides derived from soy β -conglycinin β -subunit, have anxiolytic activities, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2618–2621.
- Ota, A., Yamamoto, A., Kimura, S., Mori, Y., Mizushige, T., Nagashima, Y., et al., 2017, Rational identification of a novel soy-derived anxiolytic-like undecapeptide acting via gut-brain axis after oral administration., *Neurochem. Int.*, 105, 51–57.
- Pantic, J.M., Jovanovic, I.P., Radosavljevic, G.D., Arsenijevic, N.N., Conlon, J.M., and Lukic, M.L., 2017, The Potential of Frog Skin-Derived Peptides for Development into Therapeutically-Valuable Immunomodulatory Agents., *Molecules*, 22, .
- Purnawati, E., Saraswati, L.D., Wurjanto, M.A., and Yuliawati, S., 2022, The Effect of the Covid-19 Pandemic on Mental Health (Children, Adolescents, Young Adults) and Mental Health Service: Systematic Review, *Unnes J. Public Heal.*, 11, 179–197.
- Suratno, D.Y., Palupi, N.S., and Astawan, M., 2014, Pola Konsumsi Pangan Fungsional dan Formulasi Minuman Fungsional Instan Berbasis Antioksidan, *J. Mutu Pangan*, 1, 56–64.
- Wardani, D.W., Ningrum, A., Manikharda, Vanidia, N., Munawaroh, H.S.H., Susanto, E., and Show, P.-L., 2023, In silico and in vitro assessment of yellowfin tuna skin (*Thunnus albacares*) hydrolysate antioxidation effect, *Food Hydrocoll. Heal.*, 3, 100126.
- WHO, 2022, COVID-19 pandemic triggers 25% increase in prevalence of anxiety and depression worldwide,.
- Yan, J., Zhao, J., Yang, R., and Zhao, W., 2019, Bioactive peptides with antidiabetic properties: A review, *Int. J. Food Sci. & Technol.*, 54, 1909–1919.
- Zhang, Ming, Li, A., Yang, Q., Li, J., Zheng, L., Wang, G., et al., 2023, Matrine alleviates depressive-like behaviors via modulating microbiota-gut-brain axis in CUMS-induced mice., *J. Transl. Med.*, 21, 145.
- Zhao, H., Sonada, S., Yoshikawa, A., Ohinata, K., and Yoshikawa, M., 2016, Rubimetide, humanin, and MMK1 exert anxiolytic-like activities via the formyl peptide receptor 2 in mice followed by the successive activation of DP1, A2A, and GABAA receptors., *Peptides*, 83, 16–20.
- Zhao, S., Rong, C., Gao, Y., Wu, L., Luo, X., Song, S., et al., 2021, Antidepressant-like effect of *Ganoderma lucidum* spore polysaccharide-peptide mediated by upregulation of prefrontal cortex brain-derived neurotrophic factor., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 105, 8675–8688.