

KAJIAN ENANTIOSELEKTIVITAS DAN MEKANISME INTERAKSI ANTARA SENYAWA KOMPLEKS BESI(II)-FENANTROLIN DENGAN DNA

Mudasir, Karna Wijaya dan Iqmal Tahir

Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

INTISARI

Seiring dengan berkembang pesatnya bidang Kimia DNA-logam, senyawa kompleks logam yang mengandung 1,10-fenantrolin (phen) dan turunannya seperti 4,7-difenil-1,10-fenantrolin (dip) mendapat banyak perhatian dari para peneliti di bidang biologi molekuler dan bioteknologi. Hal ini disebabkan oleh kegunaan senyawa kompleks tersebut untuk pembuktian konformasi DNA (*DNA-structural probe*) dan sebagai mediator reaksi pemutusan DNA. Dalam penelitian ini, telah dipelajari enantioselektivitas dan mekanisme interaksi kompleks *mixed-ligand* besi(II) yang mengandung ligan phen dan dip dengan *Calf-Thymus* (CT)-DNA menggunakan spektrometri UV-tampak dan spektropolarimetri (*Circular dichroism*: CD). Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua kompleks yang dipelajari berinteraksi secara kuat dengan *double helix* CT-DNA ($K_b > 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ bp}^{-1}$). Kekuatan ikatan antara kompleks besi(II) dengan DNA naik dengan urutan $[\text{Fe}(\text{phen})_2]^{2+} < \text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})^{2+} < \text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2^{2+}$ sesuai dengan urutan hidrofobisitas kompleks tersebut. Hasil studi kinetika interaksi menyarankan bahwa proses interaksi untuk semua kompleks besi(II)-fenantrolin dengan DNA berlangsung melalui order reaksi tingkat satu dengan konstanta laju reaksi (k) berkisar 275 – 336 per menit. Dari data laju reaksi dapat diduga bahwa proses interaksi semua kompleks besi(II)-fenantrolin dengan DNA berlangsung dengan cepat, yang diikuti dengan terjadinya pergeseran kesetimbangan diastereoisomer kompleks-DNA dari bentuk Λ ke bentuk Δ yang berlangsung secara perlahan-lahan.

(Kata kunci: kompleks besi(II), 1,10-fenantrolin, interaksi DNA, mekanisme)

ABSTRACT

In parallel with the development of metal-DNA chemistry, metal complexes containing 1,10-phenanthroline (phen) and its derivatives have attracted a great deal of attention from workers in the field of molecular biology and biotechnology. These types of complexes have been widely used as DNA structural probes and mediator for DNA-cleavage reactions. In this study, Kinetics and mechanism of the interaction of iron(II) complexes containing phen and dip ligands with calf-thymus (CT)-DNA was studied using UV-Visible and circular dichroism (CD) spectrometry. Results of the study show that iron(II)-phenanthroline complexes interact with DNA quite strongly (binding constant, $K_b > 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ bp}^{-1}$). The binding constants of the interaction of iron(II) complexes to DNA increase with the increase of dip ligand, i.e.: $[\text{Fe}(\text{phen})_2]^{2+} < [\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+} < [\text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2]^{2+}$ in accordance with the increase in their hydrophobicity. Kinetic study of the interaction suggests that all iron(II)-phenanthroline complexes studied interact with DNA by first-order reaction with rate constants ranging from 275 to 336 min^{-1} . From kinetic data, it has been estimated that the interaction of iron(II) complex to DNA undergoes instantly after the addition of DNA to the solution containing iron(II) complex. This process is followed by equilibrium shift of complex-DNA diastereomers from Λ - to

Δ - form that kinetically proceeds in relatively slow process.

(Keywords: *iron(II) complex, 1,10-phenanthroline, DNA interaction, mechanism*)

PENDAHULUAN

Dalam sepuluh tahun terakhir ini, studi tentang interaksi non-kovalen antara senyawa kompleks logam yang mengandung fenantrolin dan turunannya dengan asam nukleat berkembang sangat pesat. Hal ini disebabkan peran baru senyawa kompleks ini baik sebagai pembukti struktur (*Structural probe*) asam deoksiribonukleat (DNA)⁽¹⁻²⁾ maupun sebagai mediator reaksi pemutusan DNA⁽³⁻⁴⁾, disamping peran konvensionalnya dalam kimia analisis. Menurut Tullius⁽⁵⁾ setidaknya ada tiga peran utama senyawa kompleks logam dalam kaitannya dengan DNA, yakni:

- (1) Kompleks logam yang digunakan sebagai sarana (*tools*) dalam biologi molekuler, sebagaimana disebut diatas.
- (2) Metalloprotein yang mengatur ekspresi gen dengan cara mengikatkan diri ke DNA.
- (3) Kompleks logam yang berperan sebagai obat, khususnya dalam *Chemotherapy*.

Pemahaman yang baik tentang kekuatan interaksi, kinetika dan mekanisme interaksi antara kompleks dengan asam nukleat adalah sarat penting guna pengembangan bidang-bidang ini.

Interaksi antara "Molekul kecil" (*small molecule*) seperti senyawa kompleks dengan asam nukleat dapat terjadi baik melalui ikatan kovalen maupun non-kovalen. Untuk jenis ikatan yang kedua variasinya sangat beragam. Namun demikian setidaknya ada tiga macam mode interaksi yang telah dikenal secara umum⁽⁶⁾, yaitu:

- (1) Ikatan elektrostatis/ ikatan eksternal: molekul ligan terikat pada sisi luar struktur molekul DNA, biasanya pada sisi pospat, sedangkan gaya yang bekerja utamanya adalah tarikan elektrostatis.
- (2) Ikatan *groove*: Molekul ligan berada pada daerah *groove* dari molekul DNA baik pada sisi *groove* mayor maupun minor. Ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik dan interaksi van der Waals bekerja pada ikatan ini.
- (3) Interkalasi: seluruh atau sebagian molekul aromatis ligan yang planar masuk ke dalam celah diantara 2 pasangan-basa dari *double helix* DNA. Interaksi yang lazim terjadi adalah *stacking* π -elektron, disamping interaksi-interaksi yang disebut pada ikatan *groove*.

Dari studi terbaru yang telah dilaporkan, kebanyakan senyawa kompleks yang dipakai adalah dari kompleks logam *tris-* atau *bis-* dengan ligan-ligan yang terikat pada logam pusat hanya terdiri dari satu jenis ligan (bukan kompleks ligan campuran). Sayangnya, untuk senyawa kompleks jenis ini hasil yang dilaporkan menunjukkan bahwa ikatannya dengan DNA cukup lemah dan lebih serius lagi mode interaksinya (ikatan luar, ikatan *groove* atau interkalasi) masih menjadi topik perdebatan. Padahal, sebagaimana disebutkan di atas, pemahaman yang eksak tentang kekuatan, kinetika dan mekanisme interaksinya dengan DNA sangat diperlukan dalam rangka mendesain senyawa baru yang lebih efektif untuk tujuan-tujuan sebagaimana diuraikan di atas. Lebih dari itu, logam pusat dari senyawa kompleks yang banyak dilaporkan dipakai untuk studi interaksi dengan DNA adalah rutenium (Ru) yang meskipun secara laboratorium terbukti sangat baik, tetapi pada tataran praktis masih perlu dipertanyakan kegunaannya mengingat logam ini kurang

umum dijumpai dalam makhluk hidup serta bersifat racun.

Berdasar pada kenyataan-kenyataan tersebut, dalam lima tahun terakhir ini peneliti telah berusaha mensintesis senyawa kompleks *mixed-ligand* besi(II) yang mengandung phen dan turunannya yang ditargetkan untuk dapat berikatan secara efisien dengan DNA⁽¹⁾. Dengan mensubstitusi 1 atau 2 ligan phen dalam senyawa kompleks dengan turunannya yang mempunyai substituen planar seperti gugus fenil diharapkan problem kontroversial tentang mekanisme dan mode ikatannya dapat dihindari. Lebih dari itu dengan diintroduksikannya substituen fenil yang planar dan mempunyai delokalisasi elektron- π , diharapkan afinitas ikatannya terhadap pasangan-basa DNA juga dapat ditingkatkan. Pemilihan logam besi(II)

sebagai logam pusat didasarkan pada kenyataan bahwa logam ini lebih umum dijumpai dalam makhluk hidup dan tidak bersifat racun. Pertimbangan lain adalah cara sintesisnya yang relatif mudah dibanding sintesis senyawa organik pada umumnya.

Meskipun interaksi antara kompleks logam dengan DNA telah banyak dilaporkan, tetapi kinetika dan mekanisme interaksinya belum banyak diteliti. Dengan mengacu pada mekanisme-mekanisme yang telah dilaporkan terdahulu, dalam penelitian ini telah dipelajari mekanisme dan kinetika interaksi antara senyawa kompleks *mixed-ligand* besi(II) yang mengandung phen dan dip, yaitu $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ dan $[\text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2]^{2+}$ dengan *calvithymus*(CT)-DNA.



Gambar I-1. Struktur of iron(II) complexes with phen and dip ligands: (1) $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$; (2) $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ and (3) $[\text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2]^{2+}$

Sebagai data pembanding, dalam penelitian ini juga telah dipelajari mekanisme dan kinetika interaksi dari $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ dengan CT-DNA. Struktur kimia dari tiga senyawa kompleks besi(II)-fenantrolin yang digunakan dalam penelitian ini diberikan dalam Gambar I-1. Sebagai studi tambahan untuk mendukung inti penelitian, sebelum

Parameter-parameter tersebut ditentukan terlebih dahulu juga telah ditentukan konstanta ikat interaksi antara senyawa kompleks besi(II)-fenantrolin dengan DNA.

MATERI DAN METODE

Materi dan Instrumentasi

Materi penelitian

1,10-fenantrolin (phen) dan 4,7-difenil-1,10-fenantrolin (dip) diperoleh dari Kanto Chemical Co. Inc. (Tokyo, Japan). Natrium perklorat untuk ion-lawan pada proses kromatografi dan ferro amonium sulfat heksahidrat masing-masing berasal dari Kanto Chemicals Co. Inc. dan Wako Pure Chemicals Industries (Tokyo, Japan). Asetonitril, aseton, etanol dan kloroform (*special grade*) dan *distilled, demineralized water (HPLC grade)* diperoleh dari Katayama Chemicals Industries. *Tris*-(1,10-fenantrolin)besi(II), $[\text{Fe}(\text{phen})_3](\text{ClO}_4)_2$ disintesis berdasarkan prosedur Schilt dan Taylor⁽⁸⁾ dan prosedur K. Miyoshi, *et. al.*⁽⁹⁾ dan kemurniannya diidentifikasi terlebih dahulu dengan analisis unsur (*elemental analysis*) dan UV-Vis spektroskopi sebelum dipakai sebagai *starting material* dalam sintesis berikutnya. Kompleks *mixed-ligand* besi (II), $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ dan $[\text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2]^{2+}$ disintesis dengan metode substitusi ligan^(7,10), sedangkan pemurniannya dilakukan dengan HPLC semi-preparatif^(11,12). Sampel *Calvithymus* DNA sebagai padatan garam natriumnya dibeli dari Sigma Chemicals Co. (USA) dan disimpan di bawah suhu 4 °C (dalam lemari es). Sampel DNA dilarutkan dalam 50 mM NaCl/5 mM Tris-HCl buffer pH=7,2, sedangkan konsentrasinya ditentukan dengan cara mengukur absorbansi pada panjang gelombang 260 nm ($\epsilon = 13.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) dan hasilnya dinyatakan dalam satuan ekuivalen pasangan basa per liter (bp/L).

Instrumentasi dan pengukuran

Spektra UV-Vis dari interaksi senyawa kompleks besi(II)-fenantrolin dengan DNA diukur menggunakan spektrofotometer Jasco V-550 yang dilengkapi dengan pengatur temperatur sel. Data hasil

pengukuran disimpan dalam bentuk *text-file* untuk kemudian diolah dengan program Microsoft Excel 2000. *Circular Dichroism* (CD) spektra senyawa kompleks besi(II)-fenantrolin dengan adanya DNA dan tanpa adanya DNA direkam dengan spektropolarimeter Jasco J-720 W1 yang dioperasikan pada suhu kamar. Scanning pengambilan spektra dilakukan pada panjang gelombang 200-700 nm dalam sel kuarsa dengan ketebalan 1-cm. Hasil pengukuran spektra ditampilkan dalam skala perubahan absorptivitas molar ($\Delta\epsilon, \text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Metode Penelitian

Penentuan konstanta ikatan kompleks besi(II)-DNA

Konstanta ikatan (K_b) untuk interaksi tiap-tiap kompleks dengan DNA dalam konsentrasi larutan garam NaCl 50 μM ditentukan dengan metode titrasi absorpsi. Sejumlah tertentu kompleks besi(II) (10 – 50 μM) dalam buffer Tris-HCl 5 mM, pH=7,2, dititrasi dengan DNA (10^{-6} – 10^{-4} M bp) menggunakan *micro-syringe* dan perubahan absorbansi yang terjadi pada pita *metal-to-ligand charge transfer* (MLCT) kompleks akibat interaksi kompleks dengan DNA dimonitor dengan spektrofotometer. Harga K_b interaksi dalam konsentrasi NaCl 50 mM untuk tiap-tiap kompleks dihitung dengan dengan Persamaan-1⁽¹³⁾.

$$[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F) = [\text{DNA}]/(\epsilon_B - \epsilon_F) + 1/K_b(\epsilon_B - \epsilon_F) \quad (1)$$

dimana ϵ_A dan ϵ_F masing-masing menyatakan absorptivitas molar kompleks teramati selama proses titrasi dan absorptivitas molar kompleks bebas (ketika tidak berikatan dengan DNA). Konstanta ikat untuk setiap kompleks dengan DNA dihitung dari harga intersep dan slope yang diperoleh dari plot $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F)$ lawan $[\text{DNA}]$ dan diberikan oleh harga

perbandingan antara slope terhadap intersep grafik.

Penentuan kinetika interaksi

Kinetika interaksi antara kompleks besi(II)-fenantrolin dan DNA dipelajari dengan menggunakan spektropolarimetri/CD. Untuk tujuan ini, sejumlah tertentu kompleks besi(II) ($10\text{--}50\ \mu\text{M}$) dalam buffer Tris-HCl 5 mM, pH=7,2 dititrasikan dengan DNA ($10^6\text{--}10^7\ \text{M bp}$) dan spektra CD yang muncul secara perlahan-lahan sesudah penambahan DNA dimonitor sebagai fungsi waktu setelah pencampuran. Dari data yang diperoleh dibuat plot order reaksi (tingkat 1, 2 atau 3, dipilih yang cocok) sehingga diperoleh konstanta laju reaksi (k) antara kompleks besi(II)-fenantrolin dengan DNA. Data laju reaksi (k) yang diperoleh selanjutnya dipakai untuk menganalisis apakah pergeseran keseimbangan enantiomer (reaksi rasemisasi) terjadi sesudah atau sebelum interaksi dengan jalan membandingkannya dengan laju rasemisasi enantiomer kompleks besi(II)-fenantrolin yang tidak berikatan dengan DNA (*free enantiomer*). Dari data-data yang diperoleh diusulkan mekanisme interaksi senyawa kompleks dengan CT-DNA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Konstanta Ikatan (K_b) Interaksi Kompleks Besi(II) dengan DNA

Konstanta ikatan antara senyawa kompleks besi(II)-fenantrolin dan CT-DNA untuk setiap kompleks besi(II) ditentukan dengan melakukan titrasi spektrofotometri kompleks besi(II) dengan CT-DNA dalam larutan yang mengandung NaCl 50 mM dan bufer Tris-HCl 5 mM

(pH = 7,2). Perubahan absorpsi pada panjang gelombang 350 – 600 nm (pita MLCT: $d \rightarrow \pi^*$) diamati selama titrasi sebagai fungsi konsentrasi dari CT-DNA yang ditambahkan. Hasil titrasi menunjukkan bahwa semua kompleks besi(II) yang dipelajari memperlihatkan penurunan molar absorptivitas (terjadi efek hipokromisitas) pada pita MLCT dengan naiknya konsentrasi CT-DNA yang ditambahkan ke dalam larutan, tetapi besarnya efek hipokromisitas bervariasi dari satu kompleks ke kompleks yang lain. Disamping itu juga teramati adanya pergeseran bathokromik (pergeseran λ_{max} ke arah λ lebih tinggi: pergeseran merah) sebesar 2 nm untuk kompleks $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ dan $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ relatif terhadap λ_{max} senyawa kompleks bebas (tidak berikatan dengan CT-DNA), sedangkan pergeseran bathokromik yang cukup signifikan (6 nm) ditunjukkan oleh kompleks $[\text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2]^{2+}$. Fenomena efek hipokromisitas dan pergeseran bathokromik ini merupakan indikasi bahwa senyawa kompleks besi(II) yang dipelajari berinteraksi dengan *double helix* CT-DNA⁽¹⁴⁾.

Harga konstanta ikatan (K_b) untuk interaksi setiap kompleks besi(II) dengan DNA ditentukan dengan membuat plot antara $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$ lawan $[\text{DNA}]$ sesuai dengan persamaan (1) dan harga K_b diperoleh dari nilai banding antara slope dengan intersep kurva. Data untuk pembuatan kurva diperoleh dari spektra kompleks selama proses titrasi spektrofotometri sebagaimana diuraikan di atas. Hasil penentuan harga K_b serta data tentang efek hipokromisitas dan pergeseran bathokromik untuk setiap kompleks dalam berinteraksi dengan CT-DNA diberikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Konstanta ikatan (K_b), hipokromisitas dan pergeseran bathokromik senyawa kompleks besi(II)-fenantrolin yang berinteraksi dengan CT-DNA.

Kompleks	Hipokromisitas / %	Pergeseran Bathokromik /nm	Konstanta ikatan (K_b) / $M^{-1} \text{ bp}^{-1}$, 25 °C
$[\text{Fe}(\text{phen})_2]^{2+}$	$15 \pm 1,7$	1-2	$(4,68 \pm 0,19) \times 10^3$
$\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})^{2+}$	$18 \pm 1,6$	1-2	$(1,75 \pm 0,52) \times 10^4$
$\text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2^{2+}$	$20 \pm 2,3$	5-6	$(1,32 \pm 5,85) \times 10^5$

Data pada Tabel 1 memperlihatkan dengan jelas bahwa tiga parameter yang menjadi indikator interaksi kompleks besi(II) dengan DNA naik sesuai dengan kenaikan jumlah ligan dip dalam kompleks, yaitu: $[\text{Fe}(\text{phen})_2]^{2+} < \text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})^{2+} < \text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2^{2+}$. Urutan ini sesuai dengan urutan ukuran dan hidrofobisitas kompleks akibat adanya substituen 2 gugus fenil pada ligan dip, sehingga menambah afinitas kompleks untuk berinteraksi dengan DNA. Kenaikan afinitas interaksi ini disebabkan oleh tersedianya lebih banyak elektron- π pada ligan dip. Dari data ini dapat disimpulkan bahwa gugus fenil pada ligan dip yang terkoordinasikan ke atom besi(II) memperbesar daya ikat kompleks besi(II)-fenantrolin ke *double helix* CT-DNA melalui interaksi π - π stacking dan interaksi hidrofobik.

Studi Kinetika dan Mekanisme Interaksi

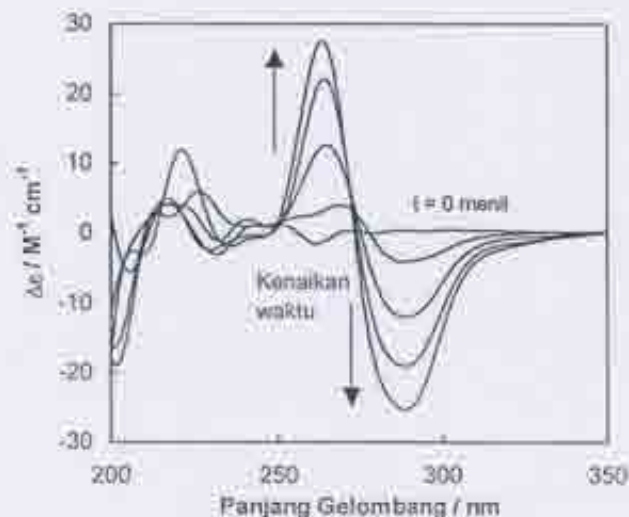
Kinetika interaksi senyawa rasemik kompleks besi(II)-fenantrolin dengan CT-DNA dipelajari dengan mengamati spektra CD yang muncul setelah penambahan CT-DNA ke dalam larutan yang mengandung campuran rasemik kompleks besi(II)-fenantrolin. Larutan rasemik kompleks besi(II)-fenantrolin sendiri tanpa adanya CT-DNA tidak akan memberikan spektra CD karena spektra CD untuk masing-masing enantiomer saling menghilangkan

sehingga total spektra CD yang teramati menjadi berharga nol. Namun demikian dengan adanya CT-DNA yang ditambahkan ke dalam larutan campuran rasemik kompleks besi(II), larutan tersebut ternyata memberikan spektra CD yang sangat kuat. Hal ini menunjukkan bahwa dengan adanya CT-DNA, dalam larutan terjadi pergeseran kesetimbangan enantiomer senyawa kompleks sehingga enantiomer yang satu lebih dominan dibanding enantiomer yang lain sehingga total spectra CD dalam larutan tidak lagi bernilai nol. Fenomena ini dapat terjadi karena selektivitas/afinitas salah satu enantiomer kompleks besi(II) dalam berinteraksi dengan CT-DNA lebih tinggi dari selektivitas/afinitas enantiomer yang lain, sehingga mendorong terjadinya pergeseran kesetimbangan enantiomer menuju ke bentuk yang lebih *favorable* untuk berinteraksi dengan CT-DNA. Studi tentang kinetika interaksi kompleks DNA dan kinetika rasemisasi kompleks besi(II) ini dapat dipakai dalam membantu memprediksi mekanisme yang terjadi selama proses interaksi.

Sebagai salah satu contoh, Gambar 2 memperlihatkan kenaikan intensitas spektra CD yang muncul secara perlahan-lahan sebagai fungsi waktu setelah pencampuran larutan rasemik senyawa $[\text{Fe}(\text{phen})_2]^{2+}$ dengan CT-DNA. Dari data tersebut dapat ditentukan laju interaksi antara senyawa besi(II)-fenantrolin dengan CT-DNA dengan cara membuat plot order reaksi. Hasil studi menunjukkan bahwa

plot logaritma konsentrasi (dalam hal ini diwakili oleh besaran $[1-CD/CD_{max}]$) lawan waktu ternyata merupakan garis lurus (lihat Gambar 3), sedangkan plot-plot untuk order reaksi yang lain (order 2 dan 3) ternyata tidak linear. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa proses interaksi antara senyawa besi(II)-fenantrolin dengan CT-DNA mengikuti order reaksi tingkat 1.

Dari gambar 3 juga telah dapat ditentukan konstanta laju reaksi untuk interaksi antara senyawa besi(II)-fenantrolin dengan CT-DNA dan hasilnya disajikan pada Tabel 2 bersama-sama dengan parameter-parameter spektra CD. Pada table tersebut juga dicantumkan konstanta laju reaksi proses rasemisasi senyawa kompleks Λ - $[Fe(phen)_3]^{2+}$ bebas (tak berikatan dengan DNA) sebagai data pembandingan dalam penentuan mekanisme interaksi.



Gambar 2. Kenaikan spektra CD larutan rasemik kompleks $[Fe(phen)_3(dip)]^{2+}$ sebagai fungsi waktu setelah penambahan CT-DNA ke dalam larutan

Jika dianalogikan dengan interaksi kompleks besi(II)-bipiridin dengan DNA⁽¹⁵⁾, maka proses interaksi antara senyawa besi(II)-fenantrolin dengan DNA diduga berlangsung dengan cepat, sehingga munculnya spektra CD secara perlahan-lahan setelah campuran rasemik senyawa besi(II)-fenantrolin ditambah dengan CT-DNA dapat diasumsikan disebabkan oleh rasemisasi senyawa kompleks yang telah berinteraksi dengan DNA, yaitu pergeseran kesetimbangan kompleks diastereomer Besi(II)-phenantrolin-CT-DNA ($[FeL_3]^{2+}$ -DNA), bukan oleh proses pengikatan senyawa besi(II)-fenantrolin ke *double*

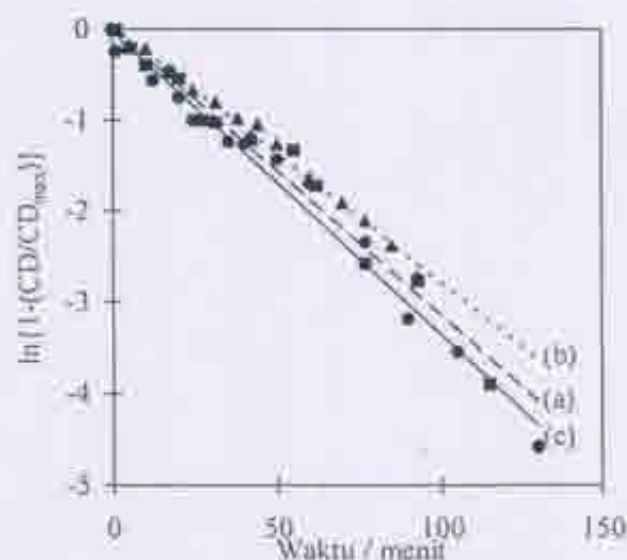
helix CT-DNA. Jika munculnya spektra CD disebabkan oleh hal yang terakhir maka spektra CD akan muncul dengan cepat segera setelah penambahan CT-DNA ke dalam campuran rasemik senyawa kompleks besi(II). Asumsi ini didukung dengan kuat oleh data laju interaksi yang disajikan pada Tabel 2, dimana laju interaksi antara senyawa besi(II)-phenantrolin dengan CT-DNA ternyata tidak berbeda jauh dengan data laju rasemisasi kompleks bebas Λ - $[Fe(phen)_3]^{2+}$ (dalam orde yang sama, yakni 10^3 menit).

Tabel 2. Data spektra CD dan laju interaksi kompleks besi(II)-fenantrolin dengan CT-DNA

Kompleks ^a	λ_{max} /nm ($\Delta\epsilon$ / $M^{-1} cm^{-1}$) pita MLCT	$k^b \times 10^2$ / menit ⁻¹
$\Lambda-[Fe(phen)_3]^{2+}$	438 (+17); 542 (-21)	$4,32 \pm 0,28$
$[Fe(phen)_3]^{2+}$	464 (-2,0); 542(+3,0)	$3,13 \pm 0,31$
$[Fe(phen)_2(DIP)]^{2+}$	470(-4,0); 550(+5,0)	$2,75 \pm 0,25$
$[Fe(phen)(DIP)_2]^{2+}$	474(-6,0); 556(+4,0)	$3,36 \pm 0,37$

^aDilakukan dalam 5 mM Tris buffer pH = 7,2, 50 mM NaCl pada 25 °C.

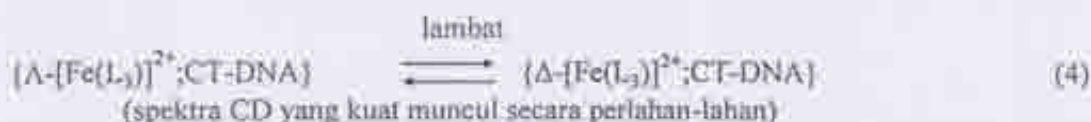
^bkonsanta laju rasemisasi (kompleks bebas) atau konsanta laju interaksi kompleks dan CT-DNA merupakan rata-rata dari paling sedikit dua kali pengukuran.



Gambar 3. Kurva penentuan order reaksi proses interaksi kompleks besi(II) phenantrolin dengan CT-DNA: (a) $[Fe(phen)_3]^{2+}$, (b) $[Fe(phen)_2(dip)]^{2+}$ dan (c) $[Fe(phen)(dip)_2]^{2+}$

Data pada Tabel 2. merupakan bukti tak terbantahkan bahwa munculnya spektra CD setelah penambahan CT-DNA ke dalam campuran rasemik larutan besi(II)-fenantrolin bukan disebabkan oleh proses pengikatan kompleks ke CT-DNA tetapi oleh proses rasemisasi salah satu bentuk diastereomer, ($[FeL_3]^{2+} \cdot DNA$) agar dicapai energi bebas interaksi yang

minimum, yaitu pergeseran dari bentuk enantiomer Λ^- ke bentuk enantiomer Δ^- . Berdasarkan pada fakta yang telah diuraikan di atas maka diusulkan bahwa mekanisme interaksi antara senyawa besi(II)-fenantrolin dengan DNA berlangsung sesuai dengan tahapan berikut:



Karena harga K_b untuk reaksi kesetimbangan (3a&b) berorder 10^4 – 10^6 , sedangkan konsentrasi CT-DNA dalam larutan paling sedikit 10 kali lebih besar dari konsentrasi kompleks besi(II), dapat diasumsikan bahwa seluruh kompleks besi(II) dalam larutan berada dalam keadaan berikatan dengan CT-DNA. Konsekuensinya, reaksi kesetimbangan proses rasemisasi (2) dapat diabaikan meskipun secara teoritis kemungkinan terjadi. Di sisi lain, sebagaimana diuraikan di atas diastereomer kompleks besi(II)-DNA terbentuk segera setelah penambahan CT-DNA ke dalam larutan. Pada tahap ini dimungkinkan munculnya spektra CD secara cepat jika sesudah berikatan dengan DNA setiap enantiomer menghasilkan spektra CD yang sedikit berbeda, sehingga resultan spektra CD-nya tidak benar-benar nol. Spektra CD ini biasanya disebut dengan *induced* CD, sedangkan spektra CD yang teramati dan muncul secara perlahan-lahan dalam penelitian ini terlalu kuat untuk dikaitkan dengan *induced* CD. Oleh karena itu dapat dipastikan bahwa spektra CD yang muncul pada saat larutan rasemik kompleks besi(II)-fenantrolin ditambah dengan CT-DNA adalah diakibatkan oleh proses rasemisasi diastereomer senyawa kompleks-DNA sebagaimana digambarkan oleh reaksi kesetimbangan (4). Pergeseran kesetimbangan terjadi ke arah

kanan atau dari bentuk Λ - ke bentuk Δ -diastereomer. Hal ini disimpulkan dari kenyataan bahwa profil spektra CD yang teramati sesuai dengan profil spektra CD senyawa kompleks $\Delta\text{-[Fe(phen)}_3\text{)]}^{2+}$ (16). Alasan mengapa enantiomer bentuk Δ - berikatan dengan CT-DNA lebih stabil adalah karena baik senyawa kompleks bentuk Δ - maupun CT-DNA merupakan senyawa optis aktif yang memutar bidang polarisasi cahaya ke arah kanan (*right-handed*) sehingga secara struktural sangat bersesuaian.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan hal-hal sebagai berikut:

- (1) Kekuatan ikatan antara kompleks besi(II)-fenantrolin dengan CT-DNA naik dengan urutan $[\text{Fe(phen)}_3]^{2+} < \text{Fe(phen)}_2(\text{dip})^{2+} < \text{Fe(phen)(dip)}_2^{2+}$. Urutan ini sesuai dengan urutan hidrofobisitas kompleks tersebut. Kenaikan afinitas interaksi kompleks besi(II)-fenantrolin pada CT-DNA kemungkinan besar disebabkan oleh bertambahnya fasilitas interaksi melalui 2 gugus fenil yang terdapat pada ligan dip.
- (2) Proses interaksi semua kompleks besi(II)-fenantrolin yang diselidiki

dengan CT-DNA berlangsung melalui order reaksi tingkat satu, yang tercermin dari linearitas kurva yang dihasilkan dari plot $\ln(1-(CD/CD_{max}))$ vs waktu (t) untuk setiap kompleks besi(II) yang dipelajari.

- (3) Mekanisme interaksi semua kompleks besi(II)-fenantrolin dengan CT-DNA berlangsung dengan cepat, tetapi sesudah itu terjadi pergeseran kesetimbangan diastereoisomer kompleks besi(II)-DNA dari bentuk Λ ke bentuk Δ . Hal ini didukung oleh data laju interaksi semua kompleks dengan CT-DNA (dimonitor sebagai pemunculan spektra CD) yang nilainya hampir sama dengan nilai laju proses rasemisasi enantiomer murni kompleks besi(II)-fenantrolin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terselenggara atas bantuan dana dari Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Dasar (P2IPD), DP2M DIKTI, Jakarta melalui surat kontrak penelitian Nomor: 18/P2IPD/DPPM/III/2001 tanggal 15 Maret 2001.

DAFTAR PUSTAKA

- Kelly, J.M., Tossi, A.B., McConnell, D.J. and OhUigin, C., 1985, *Nucleic Acid Res.*, **13**, 6017.
- Stradowski, C., Gerner, H., Currel, I.J. and Schulte-Frohlinde, D., 1987, *Biopolymers*, **26**, 189.
- Basile, L.A. and Barton, J.K., 1987, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 7548.
- Basile, L.A., Raphael, A.L. and Barton, J.K., 1987, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 7550.
- Tullius, T.D., 1989, dalam *Metal-DNA Chemistry*, Edt. Tullius, T.D., ACS Symposium Series, American Chemical Society, Chap. 1, hal. 1.
- Chow, C.S. and Bogdan, E.M., 1997, *Chemical Review*, 1489-1513.
- Mudasir, Yoshioka, N., Inoue, H., 1999, *Transition Metal Chemistry*, **24**, 218-223.
- Schilt, A.A. and Taylor, R.C., 1959, *Inorg. Nucl. Chem.*, **9**, 211.
- Miyoshi, K., Toura, T., Shimda, C., and Yoneda, H., 1975, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **48**, 1783.
- Mudasir, Yoshioka, N., Inoue, H., 2001, *J. Coord. Chem.*, **52**, 333.
- Mudasir, Yoshioka, N., Inoue, H., 1997, *Talanta*, **44**, 1195.
- Mudasir, Arai, M., Yoshioka, N., Inoue, H., 1998, *Journal of Chromatography A*, **799**, 171.
- Pyle, A.M., Rehmann, J.P., Meshoyrer, R., Kumar, C.V., Turro, N.J. and Barton, J.K., 1989, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3051.
- Wilson, W.D. and Jones, R.L., 1982, *Intercalation in Biological System*, in *Intercalation Chemistry*, Whittingham, M.S. and Jacobson, A.J. (Eds.), Academic Press, New York, Ch. 14, p. 445-501.
- Hard, T. and Norden, B., 1986, *Biopolymers*, **25**, 1209.
- Blin, E.B. and Wilkin, R.G., 1975, *Inorganic Chemistry*, **14**, 2952.