

INTERACTION OF IRON(II) MIXED-LIGAND COMPLEXES WITH DNA: BASE-PAIR SPECIFICITY AND THERMAL DENATURATION STUDIES

Interaksi Antara Kompleks Mixed-Ligand Besi(II) dan DNA: Kajian Spesifitas Pasangan Basa dan Denaturasi Thermal DNA

Mudasir, Karna Wijaya, Endang Tri Wahyuni

Chemistry Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
Gadjah Mada University, Yogyakarta

Hidenari Inoue

Department of applied Chemistry, Keio University, 3-14-1 Hiyoshi,
Kohoku-ku, Yokohama 223-8522, Japan

Received 16 September 2004; Accepted 14 October 2004

ABSTRACT

A research about base-pair specificity of the DNA binding of $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$, $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ and $[\text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2]^{2+}$ complexes and the effect of calf-thymus DNA (ct-DNA) binding of these metal complexes on thermal denaturation of ct-DNA has been carried out. This research is intended to evaluate the preferential binding of the complexes to the sequence of DNA (A-T or G-C sequence) and to investigate the binding strength and mode upon their interaction with DNA. Base-pair specificity of the DNA binding of the complexes was determined by comparing the equilibrium binding constant (K_b) of each complex to polysynthetic DNA that contain only A-T or G-C sequence. The K_b value of the interaction was determined by spectrophotometric titration and thermal denaturation temperature (T_m) was determined by monitoring the absorbance of the mixture solution of each complex and ct-DNA at $\lambda = 260 \text{ nm}$ as temperature was elevated in the range of 25 – 100 °C. Results of the study show that in general all iron(II) complexes studied exhibit a base-pair specificity in their DNA binding to prefer the relatively facile A-T sequence as compared to the G-C one. The thermal denaturation experiments have demonstrated that $\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ dan $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ interact weakly with double helical DNA via electrostatic interaction as indicated by insignificant changes in melting temperature, whereas $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ most probably binds to DNA in mixed modes of interaction, i.e.: intercalation and electrostatic interaction. This conclusion is based on the fact that the binding of $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ to ct-DNA moderately increase the T_m value of ct-DNA

Keywords: DNA Binding, mixed-ligand complexes

PENDAHULUAN

Proposal bahwa senyawa organik planar dapat berikatan dengan DNA secara "interkalasi" pertama kali dinyatakan oleh Lerman [1] untuk menerangkan ikatan antara senyawa mutagenik akrudin dengan DNA. Sejak penemuan bersejarah ini, studi tentang ikatan "molekul kecil" (*small molecule*) dengan DNA berkembang sangat pesat. Ketertarikan para peneliti akan bidang ini pada skala praktis dirangsang oleh adanya kenyataan bahwa kebanyakan molekul kecil yang mampu berikatan dengan DNA adalah senyawa obat yang efektif, khususnya pada pengobatan kemoterapi (*chemotherapy*) kanker. Keefektifan fungsi senyawa tersebut sebagai obat maupun fungsi yang lain sangat ditentukan oleh jenis, kekuatan dan situs ikat molekul tersebut ke DNA serta parameter-parameter termodinamika yang menyertai proses pengikatan/interkalasi. Oleh sebab itu pemahaman

yang mendasar tentang hal-hal di atas menjadi kebutuhan yang mendesak jika kita ingin mengembangkan senyawa baru yang mampu mengenali sisi-sisi tertentu (*site specific*) DNA atau konformasi DNA serta dalam rangka memberikan fasilitas untuk studi-studi di bidang biologi molekuler seperti reaksi pemutusan DNA dan reaksi transfer elektron yang dimediasi DNA (*DNA-mediated electron transfer reactions*).

Meskipun pada awalnya fokus penelitian banyak ditujukan pada interkalasi antara molekul kecil bahan alam dan turunan sintetiknya dengan DNA, tetapi seiring dengan berkembang pesatnya "Kimia DNA-Logam" (*Metal-DNA Chemistry*), dalam dekade terakhir ini senyawa kompleks *mixed-ligand* yang mengandung ligan 1,10-fenantrolin (phen) dan modifikasinya seperti 4,7-difenil-1,10-fenantrolin (dip) mendapat perhatian yang sangat serius dari para peneliti yang menekuni rekognisi DNA maupun

desain obat baru. Hal ini karena senyawa kompleks jenis ini dapat berikatan secara non-kovalen dengan DNA melalui interkalasi, ikatan groove maupun elektrostatis dengan sangat efektif sebagaimana halnya molekul-molekul bahan alam.

Secara umum, interaksi antara "Molekul kecil" (*small molecule*) seperti senyawa kompleks *mixed-ligand* dengan DNA dapat terjadi baik melalui ikatan kovalen maupun non-kovalen. Untuk interaksi non-kovalen, variasi interaksinya sangat beragam, tetapi secara garis besar dapat dikelompokkan menjadi tiga macam mode interaksi [2], yaitu:

- **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,
- **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 memegang peranan penting pada interaksi jenis ini.
- **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 π -*stacking* -elektron, disamping interaksi-interaksi yang disebut pada ikatan *groove*.

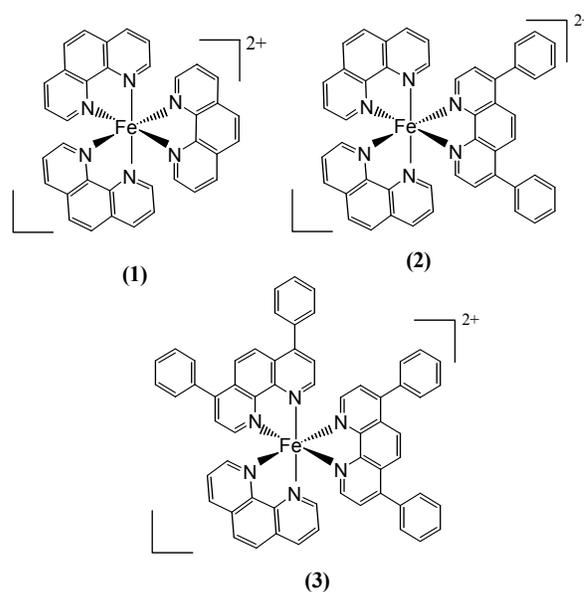
Desain dan pembuatan senyawa kompleks yang mampu mengikat dan bereaksi pada sekuen (*sequence*) tertentu dari DNA menjadi sangat penting jika kita ingin menggambarkan secara jelas bagaimana informasi genetik diekspresikan dalam tataran molekuler. Pemahaman yang lengkap tentang bagaimana membidik situs tertentu DNA tidak saja akan membantu ditemukannya obat-obat kemoterapi baru tetapi juga akan mengembangkan kemampuan para ilmuwan dalam mendesain agen pembukti struktur DNA dan diagnostik yang sensitif.

Kompleks logam transisi seperti besi(II) merupakan kompleks yang banyak diminati sebagai molekul model dalam rangka mewujudkan usaha-usaha tersebut. Kestabilan dan ke-inert-an kompleks yang terbentuk serta kelarutannya dalam air ditambah dengan sifat-sifat spektroskopiknya yang spesifik sangat cocok sebagai model senyawa untuk tujuan-tujuan studi dalam sistem biologis. Dengan karakteristik spektroskopik dan gugus fungsionalnya, kompleks logam telah membantu dalam merumuskan mekanisme kerja metalloprotein pada pusat aktif protein yang sangat berguna dalam mekanisme tubuh.

Dari studi-studi terbaru yang dilaporkan, kebanyakan senyawa kompleks yang dipakai

adalah dari kompleks logam *Tris-* atau *Bis-*, yakni ligan-ligan yang terikat pada logam pusat berasal dari jenis yang sama. Sayangnya, untuk senyawa kompleks jenis ini hasil yang dilaporkan menunjukkan bahwa disamping sistem interaksinya dengan DNA yang ternyata cukup lemah, lebih jauh lagi ternyata mode interaksinya (ikatan luar, ikatan groove atau interkalasi) juga masih menjadi topik perdebatan. Padahal, sebagaimana disebutkan di atas, pemahaman yang eksak tentang mode dan kekuatan ineteraksi ini sangat vital sebagai konsep dasar dalam mendesain senyawa baru yang lebih efektif untuk tujuan-tujuan sebagaimana diuraikan diatas. Lebih dari itu, logam pusat dari senyawa kompleks yang banyak dilaporkan dipakai untuk studi interaksi dengan DNA adalah ruthenium (Ru) yang meskipun secara laboratorium terbukti sangat baik, tetapi pada skala praktis masih perlu dipertanyakan mengingat logam ini kurang umum dijumpai pada makhluk hidup serta bersifat racun.

Berdasarkan pada kenyataan di atas maka dalam penelitian ini telah dikaji tentang spesifisitas pengikatan senyawa kompleks besi(II), $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$, $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ dan $[\text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2]^{2+}$ (Gambar 1) pada pasangan-basa DNA dan pengaruh interaksi senyawa kompleks tersebut pada temperatur denaturasi *calf-thymus* DNA (CT-DNA). Dari penelitian ini dapat diketahui preferensi pengikatan senyawa kompleks tersebut pada pasangan-basa DNA (A-T atau G-C) dan juga dapat dievaluasi kekuatan dan jenis interaksi kompleks tersebut dengan DNA. Dengan demikian pemahaman terhadap sifat-sifat interaksi kompleks ini dengan DNA menjadi lebih eksak.



Gambar 1 Struktur kimia senyawa kompleks besi(II) yang digunakan dalam penelitian: (1) $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$, (2) $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ dan (3) $[\text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2]^{2+}$

METODE PENELITIAN

Bahan Kimia

Tris(phen)iron(II) perklorat, $[\text{Fe}(\text{phen})_3](\text{ClO}_4)_2$ dibuat mengikuti prosedur Schilt and Taylor [3] dan hasilnya diidentifikasi dengan analisis unsur dan spektrometri UV-Tampak. Senyawa kompleks *mixed-ligand* besi(II), masing-masing $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})](\text{ClO}_4)_2$ dan $[\text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2](\text{ClO}_4)_2$, dibuat dari Tris(phen)iron(II) perklorat dengan metode reaksi substitusi ligan sesuai dengan prosedur yang telah dikembangkan oleh Mudasir, dkk. [4]. Konsentrasi setiap kompleks besi(II) yang digunakan dalam studi interaksi dengan DNA ditentukan secara spektrofotometri berdasarkan pada nilai absorptivitas molar masing-masing kompleks pada pita MLCT (*metal-to-ligand charge transfer*), yaitu $\epsilon_{510 \text{ nm}} = 11,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ untuk kompleks $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$, $\epsilon_{517 \text{ nm}} = 16,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ untuk kompleks $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ dan $\epsilon_{525 \text{ nm}} = 19,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ untuk $[\text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2]^{2+}$ [4]. Bufur Tris (2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol) dibeli dari Junsei Chemical Co. Ltd. (Tokyo-Japan) dan NaCl untuk mengatur konsentrasi garam dalam medium larutan berasal dari Wako Pure Chemical Industries (Japan). Semua bahan kimia dan pelarut (metanol, aseton, asetonitril, kloroform) yang digunakan mempunyai kualitas *analytical grade* atau lebih tinggi. Air bebas mineral diproduksi oleh Laboratorium Kimia Analitik, Jurusan Kimia FMIPA UGM.

Sampel DNA

Sampel-sampel DNA yang terdiri dari DNA alam (*calf thymus DNA*: ct-DNA) dan DNA sintetik ($\text{poly}[(\text{dA-dT})_2]$ dan $\text{poly}[(\text{dG-dC})_2]$) diperoleh dari Sigma Chemical Co. (USA). Sampel-sampel padatan DNA berada dalam bentuk garam natrium disimpan dalam lemari es pada suhu di bawah 4 °C. Larutan stock CT-DNA, $\text{poly}[(\text{dA-dT})_2]$ dan $\text{poly}[(\text{dG-dC})_2]$ dibuat dalam pelarut air yang mengandung bufer Tris-HCl 5 mM, pH=7,2. Konsentrasi setiap larutan stock DNA ditentukan berdasarkan nilai absorptivitas molarnya menggunakan spektrofotometri UV-tampak, yaitu $\epsilon_{260} = 1.31 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{254} = 1.68 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and $\epsilon_{262} = 1.32 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ masing-masing untuk ct-DNA [5], $\text{poly}[(\text{dA-dT})_2]$ [6] dan $\text{poly}[(\text{dG-dC})_2]$ [7] dan dinyatakan dalam satuan *base-pair equivalents* per dm^3 (bp/dm^3).

Prosedur Kerja

Penentuan spesifikitas ikatan kompleks besi(II) ke pasangan basa DNA

Selektivitas pengikatan senyawa kompleks *mixed-ligand* besi(II) pada jenis pasangan basa

DNA ditentukan dengan mengevaluasi besarnya harga konstanta kesetimbangan interaksi (K_b) antara masing-masing senyawa kompleks dengan ct-DNA, $\text{poly}[(\text{dA-dT})_2]$ dan $\text{poly}[(\text{dG-dC})_2]$. Dua jenis DNA yang terakhir adalah DNA sintetik yang masing-masing hanya berisi pasangan basa adenin-thimin (A-T) dan guanin-citosin (G-C). Harga K_b untuk masing-masing kompleks dengan berbagai jenis DNA ditentukan dengan titrasi spektrofotometri. Untuk keperluan tersebut, sejumlah konsentrasi tertentu dari kompleks besi(II) ditambahkan perlahan-lahan dengan volume tertentu larutan stock DNA sehingga konsentrasi DNA dalam larutan mencapai minimal 10 kali konsentrasi senyawa kompleks (antara $10^{-6} - 10^{-4} \text{ bp}/\text{dm}^3$) dan efek hipokromisitas (penurunan intensitas absorbansi) yang terjadi pada pita MLCT akibat terjadinya interaksi kompleks dengan DNA dimonitor dengan spektrofotometri UV-tampak (Jasco V-550 UV-VIS) yang dilengkapi dengan pengatur temperatur sel (ETC-505T) dan pengaduk magnetik. suhu sel tempat sampel dijaga pada $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. Harga K_b untuk setiap interaksi senyawa kompleks besi(II) dengan berbagai DNA dihitung menggunakan persamaan berikut:

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

ϵ_A , ϵ_F dan ϵ_B berturut-turut adalah absorptivitas molar teramati ($A_{\text{obs}}/[\text{complex}]$), absorptivitas molar kompleks besi(II) dalam keadaan tidak berikatan dan absorptivitas molar besi(II) dalam keadaan berikatan sempurna dengan DNA. Jika dibuat kurva antara $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F)$ versus $[\text{DNA}]$, maka harga K_b dapat dihitung dari rasio kemiringan kurva (*slope*) dengan intersep. Setiap kondisi pengukuran diulang tiga kali dan hasil yang diperoleh dirata-rata. Selanjutnya, selektivitas ikatan setiap kompleks pada sekuen DNA dievaluasi dengan membandingkan harga K_b interaksi setiap kompleks pada berbagai jenis DNA. Jika K_b suatu kompleks dengan $\text{poly}[(\text{dA-dT})_2]$ lebih tinggi dari harga K_b interaksi kompleks tersebut dengan $\text{poly}[(\text{dG-dC})_2]$, maka kompleks dikatakan selektif terhadap sekuen A-T, sedangkan jika sebaliknya maka kompleks dikatakan selektif terhadap guanin-citosin G-C. Tingkat selektivitas interaksi diukur dari tinggi rendahnya perbedaan K_b untuk masing-masing DNA.

Pengukuran temperatur denaturasi DNA

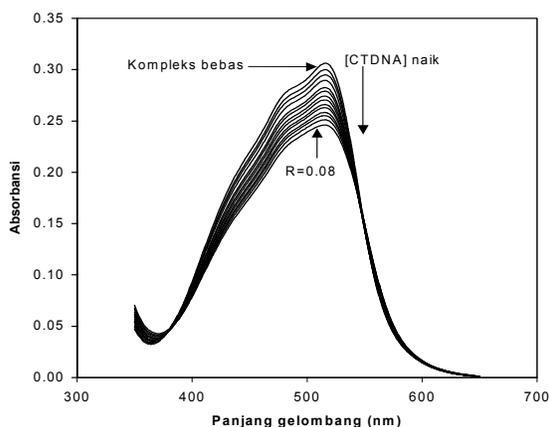
Untuk mengamati pengaruh interaksi senyawa kompleks *mixed-ligand* besi(II) pada temperatur denaturasi ct-DNA telah dilakukan percobaan pengukuran temperatur denaturasi (T_m) ct-DNA pada kondisi bebas dan berikatan dengan senyawa kompleks *mixed-ligand* besi(II) pada rasio

[kompleks]/[ct-DNA] (R) = 0,5 menggunakan spektrofotometer UV-Tampak Jasco V-550 yang dilengkapi pengontrol temperatur sel ETC-505T dan pengaduk magnetik. Larutan bufer yang mengandung ct-DNA atau campuran senyawa kompleks *mixed-ligand* besi(II) dan ct-DNA diaduk secara terus menerus dengan pengaduk magnetik dan suhu larutan dinaikkan secara bertahap dari 25 sampai 100 °C dengan kecepatan pemanasan 1 °C/menit. Pembacaan absorbansi larutan dilakukan secara otomatis oleh alat spektrofotometer pada setiap 10 detik dan ditampilkan pada layar monitor sebagai kurva kenaikan temperatur lawan absorbansi larutan pada $\lambda = 260$ nm. Temperatur denaturasi ct-DNA bebas dan berikatan dengan senyawa kompleks ditentukan dari titik tengah kurva transisi hiperkromisitas yang teramati. Setiap pengukuran diulang selama tiga kali dan hasil yang diperoleh dirata-rata.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Specificitas Ikatan Senyawa Kompleks Besi(II) pada Pasangan Basa DNA

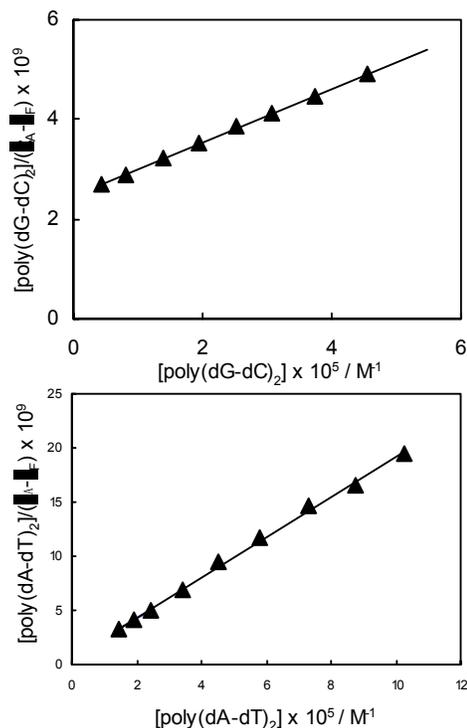
Untuk mengetahui apakah senyawa kompleks mixed-ligand besi(II) yang diselidiki memiliki preferensi tertentu terhadap sekuen DNA dalam interaksinya dengan DNA, telah dilakukan titrasi spektrofotometri untuk kompleks $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ dan $[\text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2]^{2+}$ menggunakan oligo-nukleotida sintetik yang hanya terdiri dari sekuen adenin-thimin (A-T), yaitu $\text{poly}[(\text{dA-dT})_2]$ dan oligonukleotida sintetik yang hanya terdiri dari sekuen guanin-citosin (G-C), yaitu $\text{poly}[(\text{dG-dC})_2]$.



Gambar 2 Profil spektra pada daerah tampak (pita MLCT) untuk titrasi senyawa kompleks $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ dengan ct-DNA dalam medium bufer Tris-HCl 5 mM pH=7,2 dan konsentrasi garam (NaCl) 40 mM pada suhu 25 °C.

Contoh spektra absorpsi pita MLCT hasil titrasi kompleks $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ dengan $\text{poly}[(\text{dA-dT})_2]$ dalam medium larutan bufer Tris-HCl 5 mM, pH=7,2 dan konsentrasi garam NaCl 50 mM pada suhu 25°C diberikan pada Gambar 2. Secara umum spektra absorpsi kedua kompleks pada pita MLCT mengalami gejala hipokromisitas dan pergeseran merah masing-masing sebesar 2-3 nm untuk kompleks $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ dan 5-6 nm $[\text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2]^{2+}$ dengan adanya kedua polinukleotida sintetik. Hal ini menunjukkan bahwa kedua kompleks berinteraksi secara efektif dengan kedua polioligonukleotida tersebut.

Analisis lebih lanjut terhadap spektra hasil titrasi dilakukan dengan membuat plot antara $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F)$ versus $[\text{DNA}]$ (Gambar 3) untuk kedua jenis DNA sintetik sesuai dengan persamaan (1). Dari kurva tersebut harga K_b interaksi masing-masing senyawa kompleks baik dengan $\text{poly}[(\text{dA-dT})_2]$ maupun $\text{poly}[(\text{dG-dC})_2]$ diperoleh dari rasio slope/intersep grafik. Hasil perhitungan selengkapnya untuk masing-masing senyawa kompleks pada masing jenis DNA disajikan dalam Tabel 1.



Gambar 3 Plot antara $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F)$ versus $[\text{DNA}]$ untuk titrasi spektrofotometri senyawa kompleks $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ dengan $\text{poly}[(\text{dG-dC})_2]$ (atas) dan $[\text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2]^{2+}$ dengan $\text{poly}[(\text{dA-dT})_2]$ (bawah) dalam medium bufer Tris-HCl 5 mM pH=7,2 dan konsentrasi garam (NaCl) 50 mM pada suhu 25 °C.

Tabel 1 Afinitas pengikatan kompleks *mixed-ligand* besi(II) pada berbagai jenis DNA

DNA	Konstanta ikatan (K_b) ^a / M ⁻¹		
	[Fe(phen) ₃] ²⁺	[Fe(phen) ₂ (dip)] ²⁺	[Fe(phen)(dip) ₂] ²⁺
Calf thymus DNA	4,70 x 10 ²	1,75 x 10 ⁴	1,72 x 10 ⁴
Poly(dA-dT)	---	2,71 x 10 ⁴	2,58 x 10 ⁵
Poly(dG-dC)	---	1,92 x 10 ⁴	---

^aNilai rata-rata dari tiga kali pengukuran dengan simpangan baku nisbi (RSD) < 15 %, semua harga ditentukan pada medium larutan NaCl 50 mM, bufer Tris 5 mM (pH = 7,2), suhu 25 °C.

Dengan melihat harga K_b yang diperoleh untuk tiap-tiap senyawa kompleks dapat disimpulkan bahwa kedua kompleks, khususnya [Fe(phen)(dip)₂]²⁺ dapat dikatakan lebih menyukai sekuen A-T daripada sekuen G-C dalam berinteraksi dengan DNA. Hal ini terlihat dari harga konstanta ikatan (K_b) kompleks tersebut dengan DNA sintetik bersekuen A-T ternyata 12 kali lebih besar dari harga K_b interaksi kompleks tersebut dengan sekuen G-C. Preferensi ini mungkin disebabkan oleh kenyataan bahwa ukuran dan bentuk kompleks menjadi semakin sesak dengan digantinya ligan phen oleh dip sehingga menuntut sisi interaksi yang lebih longgar dan ini dipenuhi oleh sekuen A-T yang secara struktural lebih longgar (*facile*) dalam mengakomodasi ligan dip

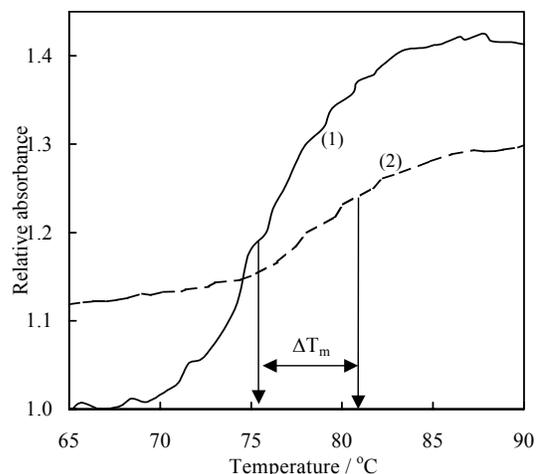
Tingginya preferensi kompleks [Fe(phen)(dip)₂]²⁺ terhadap sekuen A-T relatif terhadap preferensi kompleks [Fe(phen)₂(dip)]²⁺ terhadap sekuen yang sama diduga juga disebabkan oleh tipe ikatan yang berbeda yang dilakukan oleh masing-masing kompleks dengan double heliks DNA. Kompleks [Fe(phen)(dip)₂]²⁺ berinteraksi melalui mode interkalasi [8,9] sehingga molekul kompleks tersebut harus masuk lebih dekat ke pasangan DNA dan karenanya sangat sulit terjadi pada sekuen G-C yang sempit, sementara itu kompleks [Fe(phen)₂(dip)]²⁺ diduga kuat berinteraksi dengan DNA melalui ikatan elektrostatis dan karenanya tidak perlu masuk ke sisi dalam struktur DNA, oleh karena itu preferensi ikatannya baik pada sekuen A-T maupun G-C tidak terlampau berbeda (K_b untuk sekuen A-T 1,5 kali lebih besar dari K_b untuk sekuen G-C).

Efek Interaksi senyawa kompleks besi (II) pada Temperatur Denaturasi DNA

Denaturasi lembaran polinukleotida dari struktur double heliks menjadi lembaran tunggal (*single stranded*) secara spektra absorpsi akan teramati sebagai gejala hiperkromisitas (kenaikan intensitas absorpsi) pada panjang gelombang sekitar 260 nm. Interaksi senyawa kompleks pada double heliks DNA akan menyebabkan ikatan antar basa dalam molekul DNA menjadi lebih kuat dan karenanya temperatur denaturasi (T_m) DNA biasanya akan naik dengan adanya senyawa yang

berinteraksi dengan DNA. Besar-kecilnya kenaikan temperatur denaturasi akan sangat bergantung pada seberapa kuat senyawa kompleks tersebut berinteraksi dengan DNA. Semakin kuat interaksi kompleks dengan DNA akan semakin tinggi pula kenaikan temperatur denaturasi. Karena itu, eksperimen temperatur denaturasi DNA dapat dijadikan indikator untuk mengetahui jenis ikatan dan seberapa kuat ikatan suatu molekul dengan DNA. Ikatan elektrostatis biasanya tidak akan memberikan perubahan temperatur denaturasi yang besar karena ikatan terjadi tanpa melibatkan pasangan basa DNA, sebaliknya interkalasi molekul ke pasangan basa DNA menyebabkan ikatan antar pasangan basa dalam DNA menjadi sangat kuat dan karenanya temperatur denaturasi DNA akan naik secara signifikan [10].

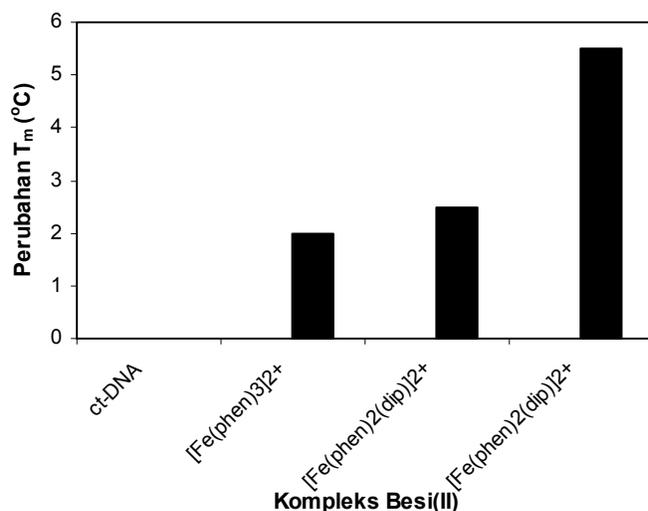
Dalam penelitian ini telah dilakukan penentuan T_m ct-DNA bebas dan ct-DNA yang berikatan dengan senyawa kompleks besi(II) dalam larutan. Contoh spektra penentuannya diberikan pada Gambar 4, sedangkan hasilnya disajikan dalam bentuk diagram pada Gambar 5.



Gambar 4 Profil denaturasi thermal ct-DNA bebas (1) dan berinteraksi dengan senyawa kompleks *mixed-ligand* [Fe(phen)(dip)₂]²⁺ λ = 260 nm dalam (2). Spektra diukur larutan bufer Tris-HCl 5 mM pH=7,2 dan konsentrasi garam (NaCl) 50 mM pada rasio [CT-DNA]/[complex] (R) = 0,5.

Sebagaimana perkiraan sebelumnya, harga T_m ct-DNA dengan adanya senyawa kompleks besi(II) terlihat mengalami kenaikan. Penambahan kompleks $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ dan $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ hanya berpengaruh sedikit saja pada perubahan harga T_m ct-DNA, yaitu antara 2-2,5 °C. Hal ini konsisten dengan dugaan bahwa kedua kompleks ini sebagian besar berinteraksi dengan DNA melalui ikatan elektrostatik sehingga tidak terjadi penguatan yang signifikan pada ikatan antar pasangan basa DNA. Di sisi lain penambahan kompleks $[\text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2]^{2+}$ ke dalam larutan ct-DNA ternyata dapat menaikkan harga T_m ct-DNA tersebut secara cukup signifikan ($\Delta_m = 5,5$ °C). Data ini mendukung asumsi sebelumnya bahwa kompleks ini kemungkinan besar berinteraksi dengan ct-DNA melalui proses interkalasi karena perubahan temperatur denaturasi yang ditimbulkan relatif besar. Hal yang sama juga teramati untuk kompleks $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{dppz})]^{2+}$ yang terinterkalasi ke T pasangan basa DNA ($\Delta_m = 5,2$ °C), sedangkan kompleks $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{2+}$ yang diyakini tidak dapat terinterkalasi ke pasangan basa DNA dan hanya berinteraksi secara elektrostatik saja menaikkan harga T_m antara 1-2 °C [11].

Mengingat ketiga kompleks yang dipelajari mempunyai muatan yang sama, maka pengaruh muatan ligan pada kenaikan T_m dapat diabaikan dan karenanya perbedaan T_m pada ketiga kompleks dapat dipandang semata-mata akibat dari perbedaan jenis ikatan ketiga kompleks tersebut dengan DNA. Dengan melihat data yang ditampilkan pada Gambar 5 dapat disimpulkan bahwa kompleks $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ dan $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ berinteraksi tidak begitu kuat



Gambar 5 T Perubahan temperatur denaturasi (Δ_m) ct-DNA oleh penambahan kompleks *mixed-ligand* besi(II) pada $R([\text{kompleks}]/[\text{ct-DNA}]) = 0,5$.

dengan DNA melalui ikatan elektrostatik, sedangkan interaksi kompleks $[\text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2]^{2+}$ dengan DNA adalah campuran antara ikatan elektrostatik dan proses interkalasi.

KESIMPULAN

Dari data hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa dalam berinteraksi dengan DNA secara umum senyawa kompleks *mixed-ligand* besi(II) mempunyai preferensi ke sekuen A-T dibandingkan ke sekuen G-C. Hal ini disebabkan sekuen A-T lebih longgar dibandingkan sekuen G-C, sedangkan ukuran kompleks semakin besar (*bulky*) sesuai dengan urutan kenaikan jumlah ligan dip dalam kompleks. Hasil eksperimen denaturasi thermal DNA menyarankan bahwa kompleks $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ dan $[\text{Fe}(\text{phen})_2(\text{dip})]^{2+}$ berinteraksi lemah dengan DNA melalui ikatan elektrostatik karena memberikan perubahan temperatur denaturasi yang tidak signifikan, sedangkan kompleks $[\text{Fe}(\text{phen})(\text{dip})_2]^{2+}$ kemungkinan besar berinteraksi baik melalui interkalasi maupun elektrostatik. Hal ini konsisten dengan data preferensi kompleks ini pada sekuen A-T DNA yang jauh lebih besar dibandingkan preferensi kedua kompleks yang lain pada A-T.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas dukungan dana penelitian Proyek Peningkatan Penelitian Perguruan Tinggi, DPPM-DIKTI melalui Penelitian Hibah Bersaing XII dengan No. Kontrak: 018/P4T/DPPM/PHBXII/III/2004 tanggal 1 Maret 2004.

DAFTAR PUSTAKA

- Lerman, L.S., 1961, *J. Mol. Biol.*, 3,18.
- Chow, C. S. and Bogdan, F. M., 1997, *Chem. Rev.* 97, 1489.
- Schilt, A. A. and Taylor, R. C. 1959, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 9, 211.
- Mudasir, Yoshioka, N., and Inoue, H., 1999, *Transition Met. Chem.*, 24, 210.
- Well, R. D., J. E. Larson, R. C. Shortle and C. R. Cantor, 1970, *J. Mol. Biol.* 54, 465.
- Liu, F., Meadows, K.A. and McMillin, D.R. 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 6699.
- Schmechel, D.E.V. and Crothers, D.M., 1971, *Biopolymers*, 10, 465.
- Mudasir, Yoshioka, N., and Inoue, H., 1999, *J. Inorg. Biochem.*, 77, 239.
- Lincoln, P. and Norden, B., 1998, *J. Phys. Chem. B*, 102, 9583.
- Choi, S-D., Kim, M-S., Kim, S. K., Tuite, E. and Norden, B., 1997, *Biochemistry*, 36, 214.
- Nair, R. B., Teng, E. S., Kirk, S. L., and Murphy, C. J., 1998, *Inorg. Chem.*, 37, and refs. there in.