

**UJI AKTIVITAS PENGHAMBATAN POLIMERISASI HEME
(1)-N-(2-NITROBENZIL)-1,10- FENANTROLINIUM IODIDA
DAN (1)-N-(4-NITROBENZIL)-1,10- FENANTROLINIUM
IODIDA SECARA *IN VITRO***

***IN VITRO* ANALYSIS OF THE HEME POLYMERIZATION
INHIBITORY ACTIVITY FROM (1)-N-(2-NITROBENZYL)-1,10-
PHENANTROLINIUM IODIDE AND (1)-N-(4-NITROBENZYL)-
1,10-PHENANTROLINIUM IODIDE**

**Laela Hayu Nurani¹, Dwi Utami¹, Wahyu Widyaningsih¹, Iin Narwanti¹, Eti
Nurwening², Jumina³**

¹Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta
Jl Prof. Dr. Soepomo, Janturan Yogyakarta

²Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara Yogyakarta

³Fakultas MIPA, Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara Yogyakarta
Email: laelafarmasi@yahoo.com

ABSTRAK

Kemampuan penghambatan polimerisasi heme (1)-N-(2-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida dan (1)-N-(4-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida telah diteliti. Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan dari senyawa baru (1)-N-(2-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida dan (1)-N-(4-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida dalam menghambat polimerisasi heme. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental secara *in vitro*. Aktivitas penghambatan polimerisasi heme dilihat berdasarkan nilai IC₅₀ (konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat polimerisasi heme hingga 50%). Nilai IC₅₀ diperoleh menggunakan analisis probit. Aktivitas penghambatan polimerisasi heme ditunjukkan dengan nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ senyawa (1)-N-(2-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida tidak dapat ditentukan. Nilai IC₅₀ senyawa (1)-N-(4-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida dan klorokuin secara berturut-turut adalah 0,571±0,071; 25,498±1,876 mg/mL. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa (1)-N-(4-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida memiliki kemampuan penghambatan polimerisasi heme yang lebih baik jika dibandingkan dengan klorokuin sedangkan senyawa (1)-N-(2-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida tidak memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi heme.

Kata kunci: Polimerisasi heme, (1)-N-(2-nitrobenzil)-1,10- fenantrolinium iodida, (1)-N-(4-nitrobenzil)-1,10- fenantrolinium iodida, klorokuin, malaria

ABSTRACT

The inhibitory activity of heme polymerization of (1)-N-(2-nitrobenzyl)-1,10-phenantrolinium iodide and (1)-N-(4-nitrobenzyl)-1,10-phenantrolinium iodide have been done. This study aims to analyse the (1)-N-(2-nitrobenzyl)-1,10-phenantrolinium iodide and (1)-N-(4-nitrobenzyl)-1,10-phenantrolinium iodide as inhibitory of polimerization heme. Analysis of heme inhibitory polimerization activity used the experimental *in vitro* method. The activity showed by IC₅₀ (the capable concentration of extract to inhibiting polymerization heme

by 50%). The IC_{50} value acquired by probit analysis. Assess IC_{50} of (1)-N-(2-nitrobenzyl)-1,10-phenantrolinium iodide not to be identified, (1)-N-(4-nitrobenzyl)-1,10-phenantrolinium iodide and chloroquine by successively are $0,571\pm 0,071$; $25,498\pm 1,876$ mg/mL. The result showed the (1)-N-(4-nitrobenzyl)-1,10-phenantrolinium iodide had the highest value of the heme polymerization inhibitory activity than chloroquin, (1)-N-(2-nitrobenzyl)-1,10-phenantrolinium iodide hadn't the heme polymerization inhibitory activity.

Key words: Polymerization heme, (1)-N-(2-nitrobenzyl)-1,10-phenantrolinium iodide, (1)-N-(4-nitrobenzyl)-1,10-phenantrolinium iodide, chloroquin, malaria

PENDAHULUAN

Resistensi obat malaria adalah kemampuan dari parasit untuk terus hidup dalam tubuh manusia, berkembang biak dan menimbulkan gejala penyakit meskipun telah diberikan pengobatan secara teratur baik dengan dosis standart maupun dengan dosis yang lebih tinggi yang masih bisa ditolerir oleh pemakai obat. Resistensi parasit *Plasmodium falciparum* terhadap obat-obatan merupakan masalah di daerah endemik. Di wilayah-wilayah endemik, peningkatan resistensi parasit terhadap obat-obatan yang ada merupakan salah satu penyebab tingginya angka morbiditas dan mortalitas akibat malaria (Kublin *et al.*, 2003).

Salah satu obat antimalaria yang sering digunakan dalam pengobatan malaria yaitu klorokuin. Efektifitas klorokuin terbatas pada saat parasit malaria berada dalam tahap eritrositik. Beberapa fakta menunjukkan bahwa klorokuin bekerja di dalam vakuola makanan dari parasit. Klorokuin bekerja dengan mengikat cincin *feriprotoporfirin IX* suatu hematin yang merupakan hasil metabolisme hemoglobin didalam parasit. Ikatan *feriprotofirin IX* dari klorokuin ini bersifat melisiskan membran parasit sehingga mati. Konsentrasi sitotoksik dari klorokuin pada vakuola dapat menghambat pembentukan hemozoin pada eritrosit (Kublin *et al.*, 2003).

Saat ini level resistensi parasit terhadap klorokuin semakin tinggi, walaupun demikian sampai sekarang klorokuin masih digunakan di beberapa tempat di dunia (Winstanley *et*

al., 2004). Pada umumnya bila resistensi terhadap suatu obat antimalaria sudah terjadi akan diikuti dengan resistensi terhadap obat antimalaria lainnya. Tekanan obat yang terus menerus menyebabkan parasit akan memasuki jalur metabolisme yang lain dan menyebabkan terjadinya mutasi. Dengan demikian parasit terhindar dari pengaruh obat. Hal inilah yang menyebabkan resistensi parasit terhadap obat antimalaria terjadi secara perlahan-lahan (Cowman *et al.*, 1994).

Usaha untuk mengatasi resistensi klorokuin adalah menemukan antimalaria baru yang memiliki mekanisme aksi yang sama dan efek samping minimal. Telah dilakukan uji antiplasmodium pada derivat 1, 10 fenantrolin dibandingkan dengan klorokuin, ternyata derivat fenantrolin memiliki aktivitas yang lebih baik dengan IC_{50} $0,3 \mu M$ (Yapi *et al.*, 2000), dan Mustofa *et al.*, 2003 telah mensintesis 13 derivat 1, 10 fenantrolin dan dievaluasi kemampuan antiplasmodium secara *in vitro* dan hasilnya menunjukkan bahwa senyawa (1)-N-alkil- dan (1)-N-benzil-1,10-fenantrolinium, (1)-N-metil-1,10-fenantrolinium sulfat, (1)-N-etil-1,10-fenantrolinium sulfat, (1)-N-benzil-1,10-fenantrolinium klorida, (1)-N-benzil-1,10-fenantrolinium bromida dan (1)-N-benzil-1,10-fenantrolinium iodida memiliki kemampuan sebagai antiplasmodium.

Berdasarkan analisis terhadap senyawa turunan (1)-N-benzil-1,10-fenantrolinium iodida yang telah ada tersebut, perlu dilakukan modifikasi struktur terhadap senyawa (1)-N-benzil-1,10-fenantrolinium iodida untuk meningkatkan stabilitas dan aktivitas

antiplasmodialnya. Dalam penelitian ini diusulkan pengembangan senyawa baru turunan (1)-N-benzil-1,10-fenantrolin dengan substituent gugus nitro (NO₂) pada gugus benzil. Gugus nitro merupakan suatu gugus dengan stabil terhadap hidrolisis ataupun oksidasi (Mc Murrey *et al.*, 2004). Sesuai dengan HKSA dari senyawa pada benzil penurunan muatan bersih pada atom N1 akan meningkatkan aktivitas antimalaria (Mustofa *et al.*, 2002), maka diharapkan senyawa baru ini memiliki aktivitas antimalaria yang lebih tinggi. Dengan demikian perlu dilakukan kajian aktivitas antimalaria dari turunan (1)-N (benzil)-1,10-fenantrolin iodida dengan substituen termodifikasi gugus *electron withdrawing groups* (Nitro). Untuk membuktikan dugaan tersebut perlu ditentukan mekanisme kerja antimalaria melalui penghambatan polimerisasi heme secara *in vitro* menggunakan metode *Basillico* yang dimodifikasi.

METODE PENELITIAN

Alat

Neraca analitik (BP 221 S), sentrifugator (Universal 32 R), inkubator (Lab Line), ELISA reader (Bio-Rad Benchmark), *effendorf*, mikrokultur 96 sumuran steril (Nalgene Nunc International, Denmark).

Bahan

Bahan yang digunakan adalah (1)-N-(2-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida, (1)-N-(4-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida, NaOH (0,2 M, 0,1 M), aquades, hematin, DMSO (100% dan 10%), asam asetat glasial, klorokuin, etanol 96%.

Jalan Penelitian

Uji penghambatan polimerisasi heme dilakukan menggunakan metode *Basillico* yang dimodifikasi. Sebanyak 100 µL larutan hematin 1 mM dalam NaOH 0,2 M dimasukkan ke dalam tabung *effendorf*, kemudian ditambahkan 50 µL bahan uji

dengan berbagai tingkatan kadar, yaitu 5,00; 2,50; 1,25; 0,63; dan 0,31 mg/mL. Replikasi sebanyak 3 kali untuk masing-masing kadar. Untuk memudahkan pembuatan larutan ekstrak dan klorokuin, proses pelarutannya ditambahkan DMSO hingga konsentrasi DMSO 10% (Guetzoyan *et al.*, 2009).

Untuk memulai reaksi polimerisasi heme, tambahkan 50 µL larutan asam asetat glasial (pH 2,6) pada tabung *effendorf* yang sudah berisi larutan hematin dan sampel, kemudian inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Sebagai kontrol positif adalah klorokuin difosfat, sedangkan sebagai kontrol negatif adalah akuades dan larutan DMSO 10%.

Setelah inkubasi berakhir, tabung *effendorf* disentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Buang supernatannya, endapan dicuci sebanyak 4 kali dengan 200 µL DMSO. Masing-masing pencucian dengan cara disentrifuse berkecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Endapan yang diperoleh ditambah 200 µL NaOH 0,1 M. Setiap 100 µL larutan yang diperoleh dimasukkan ke dalam mikroplate 96 sumuran dan dibaca nilai OD dengan *Elisa reader* pada panjang gelombang 405 nm.

Nilai aktivitas penghambatan polimerisasi heme dinyatakan dalam IC₅₀ yaitu kadar yang mampu menghambat polimerisasi heme hingga 50% yang dibandingkan dengan kontrol negatif. Kurva standar dibuat dengan cara membuat seri konsentrasi hematin (yang telah dilarutkan dalam NaOH 0,2 M). Seri kadarnya adalah : 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6; 7,8; dan 3,9 mM.

Analisis data dihitung menggunakan perhitungan persen penghambatan.

$$\begin{aligned} & \text{Persen penghambatan} \\ & = \frac{A - B}{A} \times 100\% \end{aligned}$$

Dengan A adalah kadar hematin pada kontrol negatif (akuades) dan B adalah kadar hematin setelah pemberian senyawa uji. Aktivitas penghambatan polimerisasi heme dinyatakan dalam IC₅₀ (kadar ekstrak yang mampu menghambat polimerisasi hem hingga

50%). Nilai IC_{50} ini diperoleh menggunakan analisis probit. Perbedaan nilai IC_{50} dihitung menggunakan uji *independent sample T-test*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

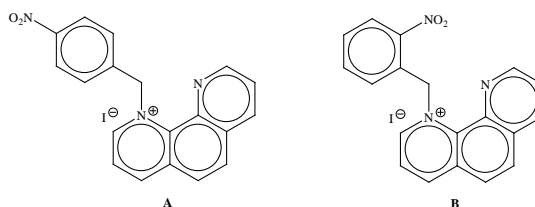
Nilai persen penghambatan heme (1)-N-(2-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida (Tabel I) konsentrasi 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31 mg/ml secara berurutan masing-masing sebesar 57,798; 44,756; 43,146; 47,026; 47,996 %, persen penghambatan (1)-N-(4-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida (Tabel I) pada konsentrasi 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31 mg/ml secara berurutan adalah 74,761; 76,598; 54,249; 48,058; 45,210 % dan persen penghambatan klorokuin (Tabel I) pada konsentrasi 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31 mg/mL yaitu 25,193; 20,878; 8,731; 5,477; 4,607 %. Dari hasil tersebut diketahui bahwa semakin besar konsentrasi klorokuin semakin besar pula persentasi penghambatan yang dihasilkan. Rerata nilai IC_{50} klorokuin sebesar $25,498 \pm 1,876$ mg/mL, dan rerata nilai IC_{50} senyawa baru (1)-N-(4-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida $0,571 \pm 0,071$ mg/mL sedangkan nilai IC_{50} (1)-N-(2-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida tidak dapat ditentukan.

Senyawa baru turunan (1)-N-benzil 1,10-fenantrolin memiliki substituen gugus nitro (NO_2) pada gugus benzil. Gugus nitro merupakan suatu gugus yang cukup stabil terhadap hidrolisis ataupun oksidasi (Mc Murry, *et al.*, 2004). Sesuai dengan HKSA pada senyawa benzil akan terjadi penurunan muatan bersih pada atom N1 akan mengakibatkan adanya peningkatan aktivitas antimalaria, maka senyawa baru ini memiliki aktivitas antimalaria yang lebih tinggi. Penghambatan polimerisasi heme dapat melalui (1) interaksi antara senyawa terpenoid, fenol dan sterol dengan sistem elektronik heme (2) ekstrak tersebut terdiri dari senyawa-senyawa yang memiliki gugus hidroksil yang dapat berikatan dengan ion besi heme (Basilico *et al.*, 1998).

Adanya gugus benzil pada atom N1 mengakibatkan peningkatan aktivitas

antimalaria, hal ini terbukti dalam penelitian ini kemampuan penghambatan polimerisasi heme

(1)-N-(4-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida (Gambar 1) lebih baik dibandingkan klorokuin. Namun, aktivitas penghambatan polimerisasi heme (1)-N-(2-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida tidak dapat ditentukan hal ini kemungkinan besar hal ini terkait dengan karakteristik senyawa (1)-N-(2-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida yang mudah menguap sehingga sulit untuk mendapatkan nilai penghambatan polimerisasi heme yang optimal.



Gambar 1. A; (1)-N-(4-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida, B; (1)-N-(2-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida

Keberadaan gugus nitro pada senyawa turunan fenantrolin terbukti mampu meningkatkan aktivitas penghambatan polimerisasi heme, hal ini didasarkan pada penelitian penghambatan polimerisasi heme terhadap senyawa N-(3,4-dimetoksibenzil)-1,10-fenantrolinium bromida dan nilai IC_{50} yang didapatkan adalah 3,63 mM (1,491 mg/mL) (Fitriastuti D, *et al.*, 2014). Sehingga, terbukti nilai IC_{50} senyawa (1)-N-(4-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida lebih kecil jika dibandingkan dengan nilai IC_{50} senyawa N-(3,4-dimetoksibenzil)-1,10-fenantrolinium bromida ($0,571$ mg/mL < 1,491 mg/mL).

Tabel I. Pengaruh (1)-N-(2-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida dan (1)-N-(4-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida terhadap aktivitas penghambatan polimerisasi heme dibandingkan dengan klorokuin

Bahan	Konsentrasi (mg/ml)	Rerata kadar beta hematin (mM) \pm SD	Rerata %penghambatan \pm SD	Rerata nilai IC ₅₀ (mg/mL) \pm SD
(1)-N-(2-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida	5	97,381 \pm 5,990	57,798 \pm 2,596	Tidak dapat ditentukan
	2,5	127,476 \pm 6,896	44,756 \pm 2,989	
	1,25	131,190 \pm 2,459	43,146 \pm 1,066	
	0,63	122,238 \pm 0,786	47,026 \pm 0,341	
	0,31	120,000 \pm 1,030	47,996 \pm 0,446	
(1)-N-(4-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida	5	58,238 \pm 0,733	74,761 \pm 0,318	0,571 \pm 0,071
	2,5	54,000 \pm 0,378	76,598 \pm 0,164	
	1,25	105,571 \pm 8,918	54,249 \pm 3,865	
	0,63	119,857 \pm 7,692	48,058 \pm 3,333	
	0,31	126,429 \pm 0,247	45,210 \pm 0,107	
Klorokuin	5	97,979 \pm 0,916	25,193 \pm 0,699	25,498 \pm 1,876
	2,5	103,633 \pm 0,380	20,878 \pm 0,290	
	1,25	119,540 \pm 0,773	8,731 \pm 0,591	
	0,63	123,802 \pm 0,637	5,477 \pm 0,486	
	0,31	124,941 \pm 0,898	5,219 \pm 0,686	
Aquades		230,750	-	-
DMSO		224,750	-	-

Senyawa (1)-N-(4-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida memiliki nilai IC₅₀ lebih kecil daripada klorokuin. Uji *independent* sampel T-test dilakukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan bermakna antara nilai IC₅₀ klorokuin dengan ekstrak etanol batang brotowali. Uji *independent* sampel *T-test* digunakan untuk menguji kesamaan rata-rata dari 2 populasi yang bersifat *independent*, dimana peneliti tidak memiliki informasi mengenai ragam populasi (Utami, 2005). Hasil analisis menunjukkan bahwa IC₅₀ klorokuin dengan IC₅₀ senyawa baru (1)-N-(4-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida memiliki nilai yang berbeda dan bermakna (signifikansi 0,000 \leq 0,05).

KESIMPULAN

Kemampuan penghambatan polimerisasi heme (1)-N-(4-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida lebih baik dibandingkan dengan klorokuin (IC₅₀ (1)-N-(4-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida 0,571 \pm 0,0712

<IC₅₀ klorokuin 25,498 \pm 1,876 mg/mL) sedangkan senyawa (1)-N-(2-nitrobenzil)-1,10-fenantrolinium iodida tidak memiliki aktivitas penghambatan polimerisasi heme.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada DIKTI atas program Hibah Pekerti Tahun Anggaran 2013/2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Cowman AF, D Galatis, and JK Thompson, 1994, Selection for Mefloquine Resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to Amplification of the PFMDR1 Gene and Cross-Resistance to Halofantrine and Quinine, USA: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 1143–1147.
- Fitriastuti, D., Mardjan MID., Jumina, Mustofa, 2014, Synthesis and HemePolymerization Inhibitory Activity (HPIA) Assay OfAntiplasmodium of (1)-n-(3,4-

- dimethoxybenzyl)-1,10-Phenanthroline Bromide From Vanillin, *Indonesian Journal of Chemistry*, 14 (1), 1-6.
- Guetzoyan, L., Yu, X., Ramiandrasoa, F., Pethe, S., Rogier, C., Pradines, B., Cresteil, T., Perree-Fauvet, M., dan Mahy, J., 2009, Antimalarial acridines: Synthesis *in vitro* activity against *P. falciparum* and interaction with hematin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 8032-8039.
- Hadanu, R., Mastjeh, S., Jumina, Mustofa, Sholikhah, E.N., Wijayanti, M.A., and Tahir, I., 2007, Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis (QSAR) Of Antimalarial 1,10-Phenanthroline Derivatives Compounds, *Indonesian Journal of Chemistry*, 7, 1, 72-77.
- Kublin JG, JF Cortese, EM Njunju, RA Mukadama, JJ Wirima, PN Kazembe, AA Djimde, B Kouriba, and CV Plowe. Reemergence of Chloroquine-Sensitive *Plasmodium falciparum* Malaria after Cessation of Chloroquine Use in Malawi, *The Journal of Infectious Diseases*, 2003; 187: 1870-1875.
- Utami, Herni, 2005, *Modul Praktikum Analisis Variansi Terapan, Laboratorium Komputasi Statistika dan Matematika Program Studi Statistika*, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Widjayanti, M.A., Solikhah, E.N., Tahir, I., Hadanu, R., Jumina, Supargiono, and Mustofa, 2006, Antiplasmodial Activity and Acute Toxicity of N-alkyl and N-benzyl-1, 10-Phenanthroline Derivatives in Mouse Malaria Model, *Journal of Health Science*, 52, 6, 794-799.
- Winstanley P, Ward S, Snow R, & Breckenridge A, 2004, Therapy of *Falciparum Malaria* in Sub-Saharan Africa: from Molecule to Policy, *American society for microbiology journals*, 17(3): 612-637.
- Yapi, A.D., Mustofa, M., Valentin, A., Chavignon.O., Teulade., J., Mallie, M., Chapat, J., and Blace, Y., 2000, New Potential Antimalarial Agents: Synthesis and Biological Activities of Original Diaza-analogs of Phenanthrene, *Journal chemical & pharmaceutical bulletin.*, 48, 12, 1886-1889.