

Metode Non-Enzimatis Riboflavin-Nitrobluetetrazolium (Rb-NBT) Sebagai Teknik Penentuan Aktivitas Penangkal Radikal Bebas Anion Superoksida pada Kompleks Mangan(III)-Salen

Yusi Deawati^{1,2}, Djulia Onggo¹, Irma Mulyani¹, Yuli Ainun Rosidah¹, Iwan Hastiawan², Ratna Annisa Utami³, Dikdik Kurnia⁴

¹Kelompok Riset Kimia Anorganik dan Fisik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung

²Laboratorium Kimia Fisik dan Anorganik, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Bandung

³Laboratorium Bioteknologi Farmasi, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung

⁴Laboratorium Kimia Organik, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Bandung

*Penulis korespondensi: yusi.deawati@unpad.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v6.n1.16283>

Abstrak: Pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas penangkal radikal bebas superoksida secara *in vitro* terhadap senyawa kompleks polimerik $[Mn(salen)N(CN)_2]_n$, baik dengan metode non-enzimatis maupun enzimatis. Aktivitas penangkal radikal bebas superoksida yang didapatkan dari kedua metode ini dinyatakan dengan IC_{50} . Melalui metode non-enzimatis riboflavin-nitrobluetetrazolium (Rb-NBT), radikal superoksida yang dihasilkan dari penyinaran riboflavin, bereaksi dengan nitrobluetetrazolium sebagai indikator dan senyawa kompleks, lalu serapan NBT tereduksi diukur pada panjang gelombang 560 nm. Dengan metode non-enzimatis ini, dihasilkan nilai IC_{50} yang tinggi, konsisten, dan standar deviasinya sangat kecil, yaitu $3,4 \pm 0,4 \mu M$. Sedangkan secara enzimatis, radikal superoksida yang dihasilkan dari reaksi antara xantin dan xantin oksidase ditangkap oleh sitokrom C (sebagai indikator) dan senyawa kompleks, kemudian sitokrom C tereduksi diukur serapannya pada panjang gelombang 450 nm. Melalui metode enzimatis McCord-Fridovich (McCF) ini, dihasilkan beberapa nilai IC_{50} kompleks $[Mn(salen)N(CN)_2]_n$ yang tidak konsisten, yang disebabkan oleh tidak berfungsinya enzim. Dengan demikian, metode non-enzimatis Rb-NBT lebih mudah dan lebih akurat untuk digunakan sebagai teknik penentuan aktivitas penangkal radikal anion superoksida dibandingkan dengan metode enzimatis.

Kata kunci: penangkal radikal bebas, superoksida, non-enzimatis, $[Mn(III)(salen)N(CN)_2]$, riboflavin-NBT

Abstract: In this research, the *in vitro* activity test of superoxide free-radical scavenger has been done to the polymeric complex compound of $[Mn(salen)N(CN)_2]_n$, either by non-enzymatic or enzymatic method. The activity of superoxide free radical scavenger obtained from these two methods expressed by IC_{50} . Through the non-enzymatic method of riboflavin-nitrobluetetrazolium (Rb-NBT), superoxide radicals generated by riboflavin irradiation, was reacted with nitrobluetetrazolium as an indicator and complex compound, then the reduced NBT absorbances were measured at a wavelength of 560 nm. With the non-enzymatic method, resulted the IC_{50} value that are high, consistent, and its standard deviation was very small, i.e. $3.4 \pm 0.4 \mu M$. While enzymatically, superoxide radicals generated from the reaction between xanthine and xanthine oxidase were captured by the cytochrome C (as an indicator) and complex compound, then the reduced cytochrome C absorbances were measured at a wavelength of 450 nm. Through the McCord-Fridovich (McCF) enzymatic method, produced some of IC_{50} values of $[Mn(salen)N(CN)_2]_n$ complex which inconsistent, caused by unfunctional of enzyme. Thus, the non-enzymatic method Rb-NBT is more simple and accurate to be used as a technique of determining the activity of anion superoxide radical scavenger than the enzymatic method.

Keywords: free radical scavenger, superoxide, non-enzymatic, $[Mn(III)(salen)N(CN)_2]$, riboflavin-NBT

PENDAHULUAN

Radikal anion superoksida merupakan prekursor awal dalam pembentukan spesi oksigen reaktif (ROS) lainnya, yaitu radikal hidroksil, radikal nitrat oksida, radikal peroksinitrat, hidrogen peroksida, hipoklorit, dan oksigen singlet (Koltover 2018). Oleh karena itu

keberadaan radikal anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) yang berlebihan di dalam tubuh makhluk hidup sangat berbahaya, karena dapat merusak sel-sel sehingga menyebabkan penuaan dini dan berbagai penyakit degeneratif seperti diabetes, ginjal, jantung, liver, stroke, dan kanker (Ahmadinejad *et al.* 2017).

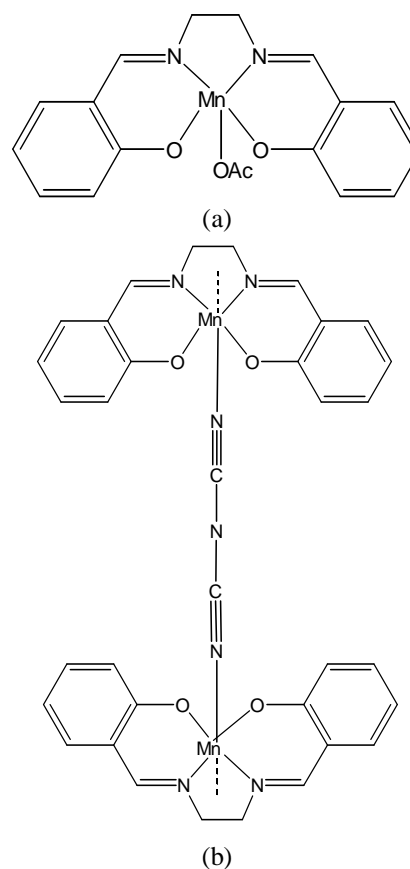
Radikal superoksida dan ROS yang berlebihan tersebut dapat berasal dari proses metabolisme yang berlebihan di dalam tubuh akibat olah raga atau aktivitas fisik yang terlalu berat atau dari luar tubuh seperti paparan sinar-X, ozon, pengisapan rokok, polusi udara, dan zat kimia dari industri yang mencemari lingkungan (Neeraj *et al.* 2013).

Untuk mencegah kelebihan radikal superoksida di dalam tubuh, banyak dikembangkan penelitian tentang obat-obatan maupun suplemen yang mengandung senyawa alami maupun sintetik yang memiliki kemampuan menangkal radikal superoksida. Salah satu kelompok senyawa sintetik tersebut yaitu senyawa-senyawa kompleks logam mangan(III)-salen yang mengandung atom pusat Mn(III) yang terkoordinasi kepada 2 atom donor N dan 2 atom O dari ligan salen (N,N'-bis(salisilidena)etana-1,2-diamina) (Doctrow *et al.* 2016; Nworie 2016).

Di dalam penentuan potensi penangkal radikal superoksida dari senyawa-senyawa kompleks mangan(III)-salen dan turunannya, pada umumnya digunakan uji *in vitro* secara tidak langsung yang disebut dengan uji superoksida dismutase (SOD) dengan menggunakan metode enzimatis McCord-Fridovich (McCF) dan metode non-enzimatis riboflavin-nitrobluetetrazolium (Rb-NBT) (Deawati, 2017). Melalui kedua uji tersebut dapat diketahui aktivitas penangkal radikal superoksida dengan menghitung nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi suatu senyawa yang dapat menghambat sebesar 50% dari reaksi reduksi suatu indikator oleh radikal superoksida. Salah satu senyawa mangan(III)-salen yang pertama kali ditentukan nilai IC_{50} -nya dengan metode enzimatis McCF yaitu kompleks $[Mn(salen)OAc]$ (Gambar 1a) atau dikenal dengan kode paten EUK-108. Kompleks ini berstruktur monomerik dan terkoordinasi oleh ligan asetat pada arah aksial. Kompleks $[Mn(salen)OAc]$ memberikan nilai IC_{50} sebesar 1,3–2,5 μM . Sedangkan penentuan aktivitas penangkal radikal superoksida dengan metode non-enzimatis Rb-NBT terhadap kompleks $[Mn(salen)OAc]$ memberikan nilai IC_{50} sebesar 2,7 μM .

Sampai saat ini, penentuan aktivitas penangkal radikal superoksida baru dipelajari sebatas untuk senyawa-senyawa kompleks mangan(III)-salen dan turunannya yang berstruktur monomerik. Sementara itu penelitian tentang senyawa-senyawa yang berstruktur polimerik telah berkembang pesat sampai saat ini, terutama di bidang material magnetik. Salah satu material magnetik dari kompleks mangan(III)-salen yang berstruktur polimerik yaitu senyawa $[Mn(salen)N(CN)_2]_n$ (Gambar 1b), yang mengandung disianamida sebagai ligan jembatan yang menghubungkan antara atom-atom pusat Mn(III) dari dua monomer yang berbeda (Shi *et al.* 2002). Oleh karena itu, pada penelitian ini dipelajari pengaruh struktur polimerik kompleks $[Mn(salen)N(CN)_2]_n$ terhadap aktivitas penangkal radikal superoksida

dengan metode non-enzimatis Rb-NBT dan metode enzimatis McCF.



Gambar 1. Struktur senyawa kompleks (a) $[Mn(salen)OAc]$ dan (b) $[Mn(salen)N(CN)_2]_n$

BAHAN DAN METODE

Alat

Alat dan instrumen yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas, instrumen analisis unsur CHN Vario EL III-elemental analyzer system GmbH, spektrofotometer PerkinElmer System 2000 FTIR, spektrometer Bruker Daltonics ESQUIRE 3000Plus (ESI-Ion Trap MSn), neraca magnetic susceptibility balance (MSB) Sherwood Scientific, dan konduktometer HANNA Instruments HI 8819W Professional ATC. Peralatan yang digunakan dalam uji bioaktivitas meliputi mikropipet, mikroplat 96-well, kotak cahaya ($25 \times 25 \times 25 \text{ cm}^3$) yang dilapisi aluminium foil serta menggunakan lampu tungsten 18 Watt, dan spektrofotometer mikroplat reader Multiskan Go Thermofischer Scientific UV/vis double beam, serta mikroplat reader ez read 400 Biochrom.

Bahan

Dalam penelitian ini digunakan bahan-bahan kimia dengan kemurnian tinggi dari Sigma-Aldrich, yaitu etilendiamina 99%, salisilaldehid 98%, etanol absolut 99,5%, mangan(II) asetat tetrahidrat 99%, akuades, dan metanol 99,8%. Bahan-bahan kimia

yang digunakan dalam uji SOD, yaitu nitrobluetetrazolium klorida (NBT) 98% dari Thermoscientific, tetrametiletilendiamina (TEMED) 99% dari Biorad, riboflavin 98%, larutan buffer fosfat 1,0 M pH 7,4 (25°C), kit SOD dari Sigma-Aldrich, dan akuabides.

Sintesis Ligan H₂Salen

H₂Salen (N,N'-bis(salisilidena)etana-1,2-diamina) sebagai prekursor ligan dalam senyawa kompleks disintesis melalui prosedur dan kondisi sintesis yang sama dengan yang telah dilaporkan sebelumnya (Deawati *et al.* 2017). Sebanyak 1,75 mL salisilaldehida (16,4 mmol) dicampurkan dengan 0,55 mL etilenadiazin (8,22 mmol) dalam 20 mL etanol absolut. Campuran tersebut direfluks sambil diaduk dengan pengaduk magnet. Setelah reaksi berlangsung, padatan berwarna kuning mulai terbentuk. Setelah 3 jam, padatan kuning yang dihasilkan disaring dan dicuci dengan etanol, serta dikeringkan pada suhu ruang. Adapun perolehan padatan H₂salen yang didapatkan yaitu sebesar 88%.

Sintesis Kompleks [Mn(salen)Cl].2H₂O

Sintesis senyawa kompleks [Mn(salen)Cl].2H₂O dilakukan berdasarkan prosedur dan kondisi sintesis yang sama dengan prosedur sintesis [Mn(salen)OAc] yang telah dilaporkan, disertai modifikasi (Deawati *et al.* 2017). Sebanyak 0,54 g (2 mmol) H₂salen dilarutkan dalam 35 mL etanol 95% pada gelas kimia 100 mL sambil diaduk dan dipanaskan pada suhu 65°C sampai larut seluruhnya. Dalam gelas kimia yang berbeda sebanyak 0,79 g (4 mmol) Mn(II)Cl₂.4H₂O dilarutkan dalam 15 mL etanol 95% dan dipanaskan hingga suhu mencapai 65°C. Selanjutnya larutan Mn(II)Cl₂.4H₂O dituangkan ke dalam larutan H₂salen, sambil larutan tetap diaduk dan dipanaskan pada rentang suhu 65-70°C sampai volume larutan menjadi 25 mL. Larutan didiamkan pada suhu ruang sampai terbentuk kristal coklat gelap (\pm 3 hari). Kristal tersebut dipisahkan dari larutan dan dicuci menggunakan etanol dan akuades, serta dikeringkan di udara terbuka. Rekristalisasi dilakukan menggunakan pelarut metanol.

Sintesis Kompleks [Mn(salen)N(CN)₂]_n

Kompleks ini disintesis dengan mengikuti prosedur yang dilakukan oleh Panja *et al.* (2002) dengan modifikasi prekursor. Sejumlah 0,39 g (1 mmol) kompleks [Mn(salen)Cl] direaksikan dengan 0,18 g (2 mmol) garam NaN(CN)₂ dalam pelarut metanol. Dihasilkan padatan kompleks coklat-kehitaman mengkilap. Rekristalisasi dilakukan menggunakan pelarut metanol. Perolehan padatan kompleks yang dihasilkan adalah sebesar 85-88%.

Uji Penangkal Radikal Superoksida/SOD (Superoksida Dismutase)

Uji SOD-like Metode Non-enzimatik Riboflavin-Nitrobluetetrazolium (Rb-NBT)

Terhadap kompleks [Mn(salen)N(CN)₂]_n dilakukan uji SOD-like Rb-NBT seperti yang dilakukan oleh Retnoningrum *et al.* (2016). Prinsip metode ini adalah mempelajari kemampuan senyawa kompleks untuk menghambat reduksi NBT oleh spesi O₂⁻ yang dihasilkan dari penyinaran riboflavin pada suhu 25°C. Sampel kompleks dibuat dalam 10–12 variasi konsentrasi larutan dalam metanol. Larutan sampel kompleks dicampurkan dengan 85 μM nitrobluetetrazolium (NBT), 0,8 mM tetramethylethylenediamine (TEMED), 12 μM riboflavin, 0,016 M bufer fosfat 1,0 M pH 7,4, dan akuabides. Dalam teknik pelaksanaannya, dibuat tiga jenis larutan uji, yaitu larutan awal (tanpa kompleks), larutan sampel (berisi kompleks), dan larutan standar (tanpa riboflavin/sampel). Komposisi ketiga larutan ini tertera pada Tabel 1.

Masing-masing larutan kemudian dipipet menggunakan pipet mikro dan ditempatkan pada mikroplat. Dalam satu mikroplat, diatur penempatan masing-masing larutan uji, yaitu 3 baris larutan sampel, 3 baris larutan blanko 2, 1 baris larutan blanko 1, dan 1 baris larutan blanko 3. Mikroplat yang telah berisi larutan uji disinari oleh lampu berpipa-4 (Philips TLD/18 W, berjarak 20 cm) di dalam kotak cahaya berukuran 25 × 25 × 25 cm³ berlapis kertas aluminium selama 15 menit. Setelah penyinaran ini, sebagian larutan berubah warna yang semula kuning menjadi ungu, yang menandakan NBT telah tereduksi. Serapan NBT-tereduksi ini diukur duplo pada λ 560 nm dalam mikroplat *reader*. Data serapan NBT-tereduksi yang didapat digunakan untuk menghitung persen inhibisi. Persen inhibisi ini dihitung dari selisih antara serapan larutan tak terinhibisi (A_{blanko 1} - A_{blanko 2}) dan serapan larutan terinhibisi (A_{sampel} - A_{blanko 3}) dibagi dengan serapan larutan tak terinhibisi dikali 100, seperti pada Persamaan 1.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(A_{\text{blanko 1}} - A_{\text{blanko 2}}) - (A_{\text{sampel}} - A_{\text{blanko 3}})}{(A_{\text{blanko 1}} - A_{\text{blanko 2}})} \times 100 \quad \text{Persamaan 1}$$

Penentuan nilai IC₅₀, yang merupakan aktivitas penangkal radikal superoksida dari sampel kompleks, didapatkan dengan menarik garis dari inhibisi 50% pada plot kurva antara persen inhibisi dan konsentrasi kompleks (Deawati *et al.* 2017; Yan *et al.* 2016).

Uji SOD-like Metode enzimatik McCord-Fridovich (McCF)

Kit SOD berisi 5 mL larutan WST-1 ((2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfonil)-2H tetrazolium), 100 μL larutan enzim xantin-xantin oksidase, 100 mL larutan buffer, 50 mL larutan penyangga encer).

Tabel 1. Komposisi larutan untuk uji SOD-like Rb-NBT.

Reagen/Larutan Kompleks/Pelarut	Konsentrasi per uji	Volume Larutan (μL) per uji			
		Sampel	Blanko 1	Blanko 2	Blanko 3
NBT 10 Mm	85 μM	1,7	1,7	1,7	1,7
Riboflavin 0,5 mM	12 μM	4,8	4,8	-	-
Bufer fosfat 1,0 M pH 7,4	0,016 M	3,2	3,2	3,2	3,2
Akuabides	-	188,7	188,7	193,5	193,5
TEMED 0,1 M	0,8 mM	1,6	1,6	1,6	1,6
Metanol (MeOH)	-	-	40	-	40
$[\text{Mn}(\text{salen})\text{OAc}]_{(\text{MeOH})}$	variasi konsentrasi	40	-	40	-
Total		240	240	240	240

Tabel 2. Pengisian mikroplat pada uji SOD-like McCF dengan kit SOD dari Sigma.

	Sampel	Blanko 1	Blanko 2	Blanko 3
Larutan sampel	20 μL		20 μL	
Pelarut		20 μL		20 μL
Larutan kerja WST	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL
Larutan kerja enzim	20 μL	20 μL		
Buffer encer			20 μL	20 μL

Pertama-tama dilakukan pembuatan larutan kerja sebagai berikut:

- Larutan kerja WST: 1 mL larutan WST dilarutkan dengan 19 mL larutan penyangga.
- Larutan kerja enzim: larutan enzim dalam tabung disentrifugasi selama 5 detik, kemudian dipipet sebanyak 15 μL dan dilarutkan dengan 2,5 mL buffer encer.
- Larutan kerja sampel: dibuat larutan kompleks dengan 8 variasi konsentrasi, yaitu 200; 100; 50; 20; 10; 5; 1; dan 0,1 μM

Setelah larutan kerja disiapkan, selanjutnya mikroplat diisi mengikuti Tabel 2. Seluruh mikroplat yang telah berisi larutan tersebut diinkubasi pada 37°C selama 20 menit dan kemudian dibaca absorbansinya pada 450 nm menggunakan mikroplat reader. Persen inhibisi juga dihitung menggunakan Persamaan 1 dan nilai IC_{50} didapatkan dengan menarik garis dari inhibisi 50% pada plot kurva antara persen inhibisi dan konsentrasi kompleks seperti pada uji Rb-NBT.

HASIL DAN PEMBAHASAN

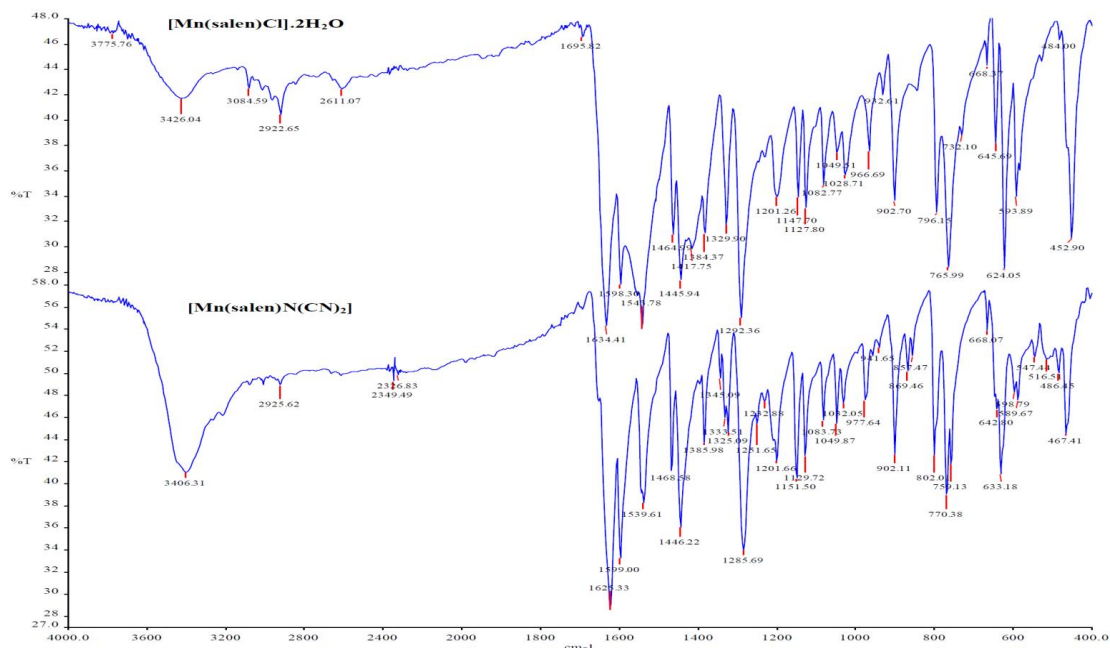
Karakterisasi Senyawa Kompleks $[\text{Mn}(\text{Salen})\text{N}(\text{CN})_2]_n$

Analisis unsur senyawa kompleks $[\text{Mn}(\text{salen})\text{N}(\text{CN})_2]_n$ ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{MnN}_5\text{O}_2$) hasil sintesis menunjukkan bahwa masing-masing senyawa memiliki nilai persen unsur C, H, dan N yang bersesuaian dengan perhitungan teoritis di dalam tanda kurung, yaitu %C = 55,77 (55,82); %H = 3,39 (3,64); %N = 17,96 (18,08). Hasil ini menunjukkan bahwa kompleks $[\text{Mn}(\text{salen})\text{N}(\text{CN})_2]_n$ telah berhasil disintesis.

Kompleks $[\text{Mn}(\text{salen})\text{N}(\text{CN})_2]_n$ bersifat paramagnetik pada suhu ruang dengan momen magnet sebesar $\mu_{\text{terukur}} = 4,9$ BM. Hasil ini sesuai dengan momen magnet *spin only* untuk Mn^{3+} , yang memiliki 4 elektron tidak berpasangan ($\mu_{\text{spin only}} = 4,9$ BM).

Larutan kompleks $[\text{Mn}(\text{salen})\text{N}(\text{CN})_2]_n$ dalam metanol memberikan nilai konduktivitas molar sebesar 0,19 $\text{Scm}^2\text{mol}^{-1}$. Nilai konduktivitas molar yang sangat rendah ini menunjukkan bahwa kompleks merupakan senyawa non-ionik.

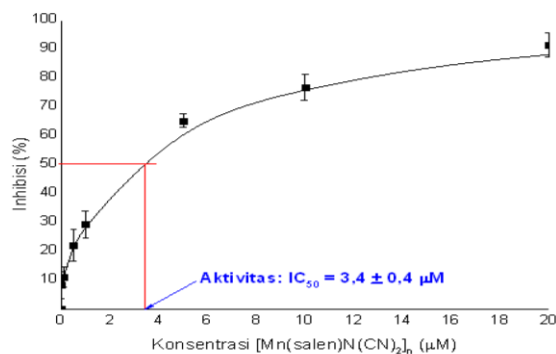
Dari spektrum FTIR kompleks $[\text{Mn}(\text{salen})\text{N}(\text{CN})_2]_n$ yang ditunjukkan pada Gambar 2, diamati adanya perbedaan maupun pergeseran bilangan gelombang pada puncak-puncak yang signifikan dibandingkan dengan spektrum prekursoranya, yaitu kompleks $[\text{Mn}(\text{salen})\text{Cl}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Di dalam spektra $[\text{Mn}(\text{salen})\text{N}(\text{CN})_2]_n$, vibrasi gugus fungsi O-H, N-H, dan C-H terjadi berturut-turut pada bilangan gelombang 3406 dan 2925 cm^{-1} , sementara di dalam spektrum $[\text{Mn}(\text{salen})\text{Cl}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ terjadi berturut-turut pada 3426-3775 dan 2611-3084 cm^{-1} . Bentuk puncak dengan intensitas yang lebih tinggi dan melebar pada 3406 cm^{-1} mengindikasikan bahwa terdapat vibrasi yang disebabkan oleh adanya interaksi ikatan hidrogen pada kompleks $[\text{Mn}(\text{salen})\text{N}(\text{CN})_2]_n$ dari ligan disianamida. Terkoordinasinya disianamida juga ditunjukkan dengan adanya vibrasi $\text{C}\equiv\text{N}$ yang muncul pada 2319-2326 cm^{-1} . Puncak khas vibrasi C-N dan C-O berturut-turut muncul pada 1626 dan 1446 cm^{-1} pada spektrum $[\text{Mn}(\text{salen})\text{N}(\text{CN})_2]_n$. Ikatan logam-ligan di dalam kompleks $[\text{Mn}(\text{salen})\text{N}(\text{CN})_2]_n$ diamati pada daerah sidik jari, yaitu untuk vibrasi Mn-N pada 589-



Gambar 2. Spektrum FTIR kompleks $[Mn(salen)N(CN)_2]$ dibandingkan dengan $[Mn(salen)Cl].2H_2O$.

Hasil Uji Rb-NBT Kompleks $[Mn(salen)N(CN)_2]_n$

No.	Konsentrasi Sampel	Pengukuran ke-	A Sampel	A Blanko 2	%Inhibisi
1.	50 μM	1	0,070	0,055	98
		2	0,067	0,056	99
		3	0,077	0,054	98
		Rata-rata	0,071		
2.	20 μM	1	0,093	0,054	95
		2	0,115	0,053	92
		3	0,152	0,050	87
		Rata-rata	0,120		
3.	10 μM	1	0,205	0,049	80
		2	0,219	0,049	78
		3	0,271	0,049	72
		Rata-rata	0,232		
4.	5 μM	1	0,324	0,058	66
		2	0,308	0,049	67
		3	0,339	0,046	63
		Rata-rata	0,324		
5.	1 μM	1	0,623	0,062	28
		2	0,567	0,053	34
		3	0,631	0,047	25
		Rata-rata	0,607		
6.	0,5 μM	1	0,684	0,067	21
		2	0,639	0,074	28
		3	0,696	0,047	17
		Rata-rata	0,673		
7.	0,1 μM	1	0,760	0,058	10
		2	0,712	0,046	15
		3	0,766	0,046	8
		Rata-rata	0,746		
8.	0,01 μM	1	0,800	0,044	3
		2	0,729	0,047	13
		3	0,763	0,048	9
		Rata-rata	0,764		
9.	0 μM	1	0,852	0,045	-3
		2	0,797	0,047	4
		3	0,834	0,046	-1
		Rata-rata	0,828		



Data ke-	IC ₅₀ (μM)
1	3,3
2	3
3	3,8
Rata-rata	3,4
Standar Deviasi	0,4

Ket.:

Pengukuran ke-	A Blanko 1	A Blanko 3
1	0,852	0,045
2	0,797	0,047
3	0,834	0,046
Rata-rata	0,828	0,046

Gambar 3. Data Absorbansi NBT-diformazan pada uji Rb-NBT (non-enzimatik) terhadap kompleks $[Mn(salen)N(CN)_2]_n$ dan grafik persen inhibisi versus konsentrasi.

Hasil Uji McCF Kompleks $[Mn(salen)N(CN)_2]_n$					
No.	Konsentrasi Sampel	Pengukuran ke-	A Sampel	A Blanko 2	%Inhibisi
1.	200 μM	1	0,050	0,048	97
		2	0,049	0,048	
		Rata-rata	0,050		
2.	100 μM	1	0,079	0,048	39
		2	0,078	0,048	
		Rata-rata	0,079		
3.	50 μM	1	0,084	0,048	31
		2	0,082	0,049	
		Rata-rata	0,083		
4.	20 μM	1	0,085	0,048	23
		2	0,087	0,047	
		Rata-rata	0,086		
5.	10 μM	1	0,086	0,047	23
		2	0,086	0,048	
		Rata-rata	0,086		
6.	5 μM	1	0,087	0,047	22
		2	0,086	0,048	
		Rata-rata	0,087		
7.	1 μM	1	0,089	0,048	19
		2	0,088	0,048	
		Rata-rata	0,089		
8.	0,1 μM	1	0,094	0,048	7
		2	0,095	0,048	
		Rata-rata	0,095		
9.	0 μM	1	0,098	0,048	0
		2	0,097	0,047	
		Rata-rata	0,098		

Ket.:		
Pengukuran ke-	A Blanko 1	A Blanko 3
1	0,098	0,048
2	0,097	0,047
Rata-rata	0,098	0,048

Gambar 4. Data Absorbansi cyt c-tereduksi pada uji McCF (enzimatis) terhadap sampel kompleks $[Mn(salen)N(CN)_2]_n$.

633 cm^{-1} dan Mn-O pada 467 cm^{-1} (Deawati *et al.* 2017).

Spektrum ESI-MS kompleks $[Mn(salen)N(CN)_2]_n$ pada daerah ionisasi positif di dalam pelarut metanol menunjukkan adanya spesi kationik ligan salen $[salen+H]^+$ pada m/z 269, spesi kationik $[Mn(salen)]^+$ pada $m/z = 320,9$ dengan intensitas yang paling tinggi, dan spesi kationik dimer $[Mn_2(salen)_2-H]^+$ pada $m/z = 641,8$.

Aktivitas Penangkal Radikal Anion Superoksida Uji Rb-NBT

Pada uji aktivitas penangkal radikal superoksida dengan metode fotoreduksi riboflavin-nitrobluetetrazolium (Rb-NBT) terjadi dua tahapan reaksi. Pertama, yaitu reaksi fotokimia terhadap riboflavin menyebabkan riboflavin tereksitasi dan kemudian tereduksi oleh tetrametiletlenadiamina (TEMED) menjadi semikuinon; dan reaksi kedua, semikuinon mendonorkan satu elektron kepada oksigen di sekitarnya, sehingga terbentuk radikal superoksida. Selanjutnya terjadi reaksi kompetisi penangkapan satu elektron $O_2^{\cdot-}$ antara NBT dan sampel kompleks, yang teramati dengan terjadinya perubahan warna NBT dari kuning (sebelum tereduksi) menjadi ungu (setelah tereduksi oleh radikal superoksida membentuk NBT-diformazan).

Absorbansi NBT-diformazan diukur pada λ 560 nm untuk mengetahui seberapa besar sampel kompleks dapat menghambat reaksi reduksi NBT oleh $O_2^{\cdot-}$, dengan menghitung persen inhibisi dari setiap variasi konsentrasi kompleks menggunakan Persamaan 1. Aktivitas penangkal radikal superoksida berbanding terbalik dengan jumlah NBT-diformazan yang terbentuk atau berbanding lurus dengan persen inhibisi.

Kompleks $[Mn(salen)N(CN)_2]_n$ memberikan nilai $IC_{50} = 3,4 \pm 0,4 \mu M$ yang didapatkan dengan menarik garis dari inhibisi 50% pada plot kurva antara persen

inhibisi dan konsentrasi kompleks pada Gambar 3. Ditentukan juga IC_{50} dari kompleks $[Mn(salen)OAc]$ untuk mengontrol mutu dari metode uji Rb-NBT, dengan nilai yang sebanding dengan hasil yang dilaporkan sebelumnya, yaitu $2,3 \pm 0,5 \mu M$ (Deawati *et al.* 2017).

Hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas penangkal radikal superoksida dari kompleks polimerik $[Mn(salen)N(CN)_2]_n$ sebanding dengan kompleks monomerik $[Mn(salen)OAc]$. Dengan demikian struktur polimerik pada kompleks $[Mn(salen)N(CN)_2]_n$ tidak berpengaruh terhadap aktivitas penangkal radikal superoksida.

Uji McCF

Uji aktivitas penangkal radikal superoksida dengan metode enzimatik xanthine oksidase-cyt c atau uji McCF (McCord-Fridovich) yang dilakukan pada penelitian ini hasilnya tidak baik. Serapan cytochrome c-reduksi yang sangat rendah (serapan blanko 1 pada Gambar 4), meskipun tanpa adanya kompetisi dengan senyawa kompleks, mengindikasikan bahwa $O_2^{\cdot-}$ yang dihasilkan sangat sedikit akibat mutu enzim yang sangat rendah.

Hasil uji McCF menunjukkan bahwa kompleks $[Mn(salen)N(CN)_2]_n$ memiliki nilai IC_{50} di atas 100 μM , sedangkan aktivitas kompleks pembandingnya, yaitu $[Mn(salen)OAc]$, memiliki IC_{50} sebesar 100 μM yang jauh lebih rendah dibandingkan dengan nilai yang telah dilaporkan sebelumnya sebesar 2,5 μM (Deawati *et al.* 2017). Dengan demikian, hasil uji McCF yang dilakukan pada penelitian ini tidak dapat dipakai untuk menentukan aktivitas penangkal radikal bebas dari senyawa kompleks $[Mn(salen)N(CN)_2]_n$.

KESIMPULAN

Metode non-enzimatik fotoreduksi riboflavin-nitrobluetetrazolium (Rb-NBT) untuk menentukan

aktivitas penangkal radikal anion superoksida dari suatu senyawa merupakan teknik yang lebih mudah dan akurat dibandingkan dengan metode enzimatis xanthine oxidase-cyt c/metode McCord-Fridovich (McCF). Struktur polimerik pada kompleks $[\text{Mn}(\text{salen})\text{N}(\text{CN})_2]_n$ tidak memberikan pengaruh terhadap aktivitas penangkal radikal superoksida, yang ditunjukkan dengan nilai $\text{IC}_{50} = 3,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$ yang sebanding dengan IC_{50} kompleks monomerik $[\text{Mn}(\text{salen})\text{OAc}]$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI) yang telah memberikan dana bagi penelitian ini melalui Beasiswa Pendidikan Dalam Negeri (BPPDN) Tahun 2013, Beasiswa Peningkatan Kualitas Publikasi Internasional (PKPI)–*Sandwich-like* Tahun 2015, dan Hibah Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (PUPT) Tahun 2016 (No. 813g/11.C01/PL/2016). Kemudian ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Prof. Dr. Evamarie Hey-Hawkins dari Universität Leipzig Jerman untuk analisis unsur CHN, FTIR, dan ESI-MS, serta terima kasih kepada Dr. Debbie S. Retnoningrum dari Laboratorium Bioteknologi Farmasi, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung atas penggunaan spektrofotometer mikroplate reader.

DAFTAR PUSTAKA

- Neeraj, J.P., Singh, S. & Singh, J. (2013). Role of free radicals and antioxidants in human health and disease. *International Journal of Current Research and Review*. 5(19): 14–22.
- Koltover, V.K. (2018). Antioxidant biomedicine: From chemistry of free-radicals to reliability of biological systems. *Research in Medical & Engineering Sciences*. 3: 1–6.
- Deawati, Y., Onggo, D., Mulyani, I., Hastiawan, I. & Kurnia, D. (2017). Activity of superoxide dismutase mimic of $[\text{Mn}(\text{salen})\text{OAc}]$ complex compound non-enzymatically in vitro through riboflavin photoreduction. *Molekul*. 12(1): 61–69.
- Doctrow, S.R., Fish, B., Huffman, K.D., Lazarova, Z., Medhora, M., Williams, J.P. & Moulder, J.E. (2016). Salen manganese complexes mitigate radiation injury in normal tissues through modulation of tissue environment, including through redox mechanisms. In *Redox-Active Therapeutics* (pp. 265-285). Springer, Cham.
- Retnoningrum, D.S., Rahayu, A.P., Mulyanti, D., Dita, A., Valerius, O. & Ismaya, W.T. (2016). Unique characteristics of recombinant hybrid manganese superoxide dismutase from *Staphylococcus equorum* and *S. saprophyticus*. *Protein Journal*. 35(2): 136–144.
- Ahmadinejad, F., Møller, S. G., Hashemzadeh-Chaleshtori, M., Bidkhorji, G., & Jami, M. (2017). Molecular mechanisms behind free radical scavengers function against oxidative stress. *Antioxidants*. 6(3): 51–65.
- Nworie, F.S. (2016). Bis(salicylidene) ethylenediamine(salen) and bis(salicylidene) ethylenediamine-metal complexes: From structure to biological activity. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*. 3: 76–85.
- Panja, A., Shaikh, N., Vojtisek, P., Gao, S., & Banerjee, P. (2002). Synthesis, crystal structures and magnetic properties of 1D polymeric $[\text{MnIII}(\text{salen})\text{N}_3]$ and $[\text{MnIII}(\text{salen})\text{Ag}(\text{CN})_2]$ complexes. *New Journal of Chemistry*. 26(8): 1025–1028.
- Yan, G., He, Y., Li, G., Xiong, Y., Song, P. & Wang, R. (2016). Bovine serum albumin metal complexes for mimic of SOD. *Journal of Chemical Sciences*. 128(11): 1783–1788.
- Shi, Q., Cao, R., Li, X., Luo, J., Hong, M., & Chena, Z. (2002). Syntheses, structures, electrochemistry and magnetic properties of chain-like dicyanamide manganese(III) and iron(III) complexes with salen ligand. *New Journal of Chemistry*. 26(10): 1397–1401.