

II. TINJAUAN PUSTAKA

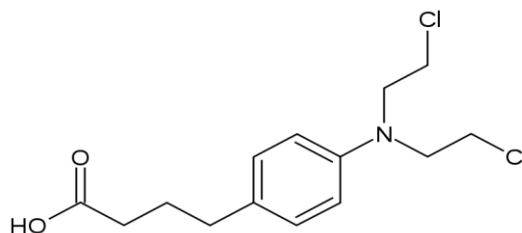
A. Klorambusil

Klorambusil adalah salah satu zat pengalkil yang paling banyak digunakan dalam pengobatan kanker dan merupakan zat pengalkil dwifungsi yakni zat yang mempunyai lebih dari satu gugus fungsi aktif pada molekulnya dan merupakan turunan mustar nitrogen yang aktif melawan penyakit kanker pada manusia.

Klorambusil (asam 4-[p-(bis[2-kloroetil]amino)fenil]butirat) merupakan bubuk kristal putih sedikit berbau dengan berat molekul 304,23. Memiliki titik lebur berkisar antara 64°C sampai 69°C. Klorambusil hampir tidak larut dalam air tetapi larut dalam alkali hidroksida encer, alkohol, aseton, dan kloroform.

Klorambusil mengalami hidrolisis dengan adanya air. Laju hidrolisisnya berlangsung paling cepat dan tidak tergantung pada pH pada daerah pH antara pH 4,5 dan 10 (Connors., *et al*, 1992).

Struktur molekul dari senyawa klorambusil ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur Senyawa Klorambusil (Connors, *et al.*, 1992).

Zat pengalkil merupakan senyawa kimia yang telah lama dikenal untuk kemoterapi dan dipakai sebagai antineoplastik. Zat antineoplastik adalah zat yang digunakan sebagai obat antikanker. Pada pemakaiannya zat pengalkil tersebar ke semua jaringan kecuali system syaraf pusat, zat ini bersifat toksis terhadap sumsum tulang, dan dapat menurunkan kekebalan serta bersifat karsinogenik dan mutagenik (Kauffman and Foye, 1996). Sebagai zat antineoplastik maka zat pengalkil sangat potensial mempunyai sifat sitotoksik yang menyebabkan mutagenik, karsinogenik, dan teratogenik. Reaksi alkilasi suatu nukleofil biasa berlangsung dalam dua tahap, yaitu pembentukan karbokation berlangsung lambat dan reaksi karbokation dengan nukleofil berlangsung cepat. Reaktifitas kimia karbokation berhubungan erat dengan konstanta laju reaksi kimianya (Fessenden and Fessenden, 1990).

Adapun beberapa syarat zat pengalkil yang dapat ditentukan nilai k_f atau reaktifitas kimianya dengan metode voltametri siklik adalah sebagai berikut :

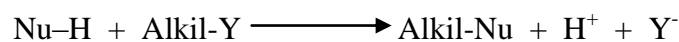
1. Larut dan stabil dalam pelarut dengan elektrolit pendukungnya.
2. Memiliki jendela potensial pada waktu dielektrolisis.
3. Voltammogram sikliknya memberikan nilai i_{pc} , i_{pa} , potensial puncak katodik (E_{pc}), dan potensial puncak anodic (E_{pa}) dengan i_{pc}/i_{pa} tidak sama dengan satu pada laju selusur potensial yang lambat.

Daya antikanker zat pengalkil ini disebabkan oleh efek sitotoksik terhadap sel kanker dengan terjadinya reaksi alkilasi basa DNA sel, membentuk ikatan kovalen yang bersifat tak reversibel. Zat pengalkil mempunyai gugus alkil yang dapat menggantikan atom H pada suatu molekul atau gugus alkil itu dapat ditambahkan

pada suatu atom dalam keadaan valensi rendah. Mekanisme kerja zat pengalkil terhadap DNA tergantung pada kestabilannya. Efek sitotoksik zat pengalkil yang disebabkan oleh substituen gugus alkil pada atom N-7 guanin DNA mengalami tautan silang dengan zat pengalkil dwifungsi, yaitu mempunyai lebih dari satu gugus fungsi aktif pada molekulnya. Adanya alkilasi pada N-7 guanin DNA merupakan petunjuk adanya efek antikanker, sedangkan alkilasi pada O-6 guanin DNA menunjukkan efek karsinogen (Lawley, 1994).

Penggantian hidrogen pada suatu atom dengan gugus alkil disebut alkilasi.

Alkilasi suatu asam nukleat atau protein akan melibatkan reaksi substitusi dimana atom nukleofilik (Nu) biopolymer mengganti gugus yang dipindahkan dari zat pengalkil. Reaksinya adalah sebagai berikut :



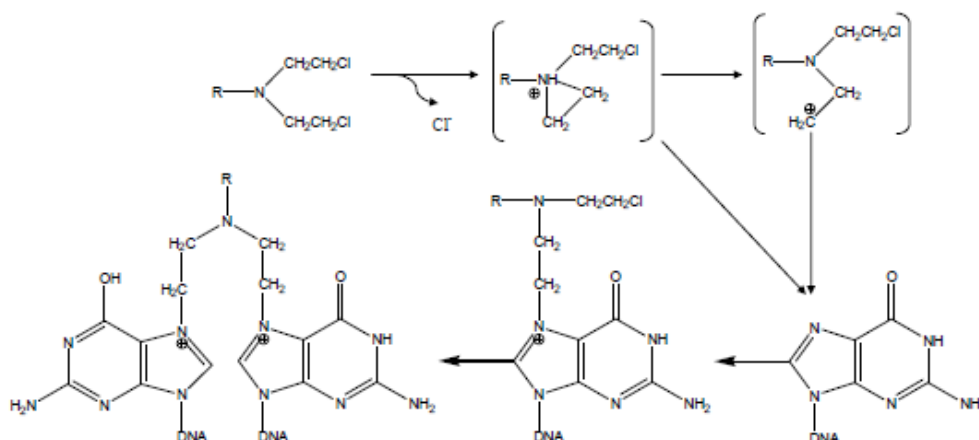
Laju reaksi bergantung pada nukleofilisitas atom yang bertambah besar jika nukleofil terionkan. Perbedaan laju tergantung pada protonasi dan konjugasi dengan gugus fungsional. Guanin adalah nukleofilik kuat pada N-7 DNA. Zat pengalkil yang sangat berpotensi mutagen menyerang DNA dengan membentuk kation reaktif yang tidak sangat stabil. Pada reaktifitas yang sangat tinggi hidrolisis dipercepat sebelum target DNA tercapai. Orde reaksi tergantung pada struktur dari zat pengalkil. Klorambusil termasuk senyawa mustar nitrogen yang relatif stabil pada pembentukan ion aziridinium, dikarenakan cincin aromatis mengurangi nukleofilisitas atom nitrogen (Wheeler, 1974).

Agen-agen alkilasi menghasilkan efek sitotoksik melalui transfer kelompok alkilnya ke berbagai konstituen seluler. Mekanisme agen ini melibatkan

pelaksanaan siklus intramolekuler untuk membentuk ion *ethilleneimonium*, secara langsung atau melalui pembentukan ion karbonium yang mentransfer kelompok alkil ke konstituen seluler. Situs penting alkilasi didalam basa DNA adalah posisi N-7 guanin, akan tetapi banyak basa lain yang juga dialkilasi, termasuk N-1 dan N-3 adenin, N-3 sitosin, dan O-6 guanin, serta atom-atom fosfat dan protein yang terkait dengan DNA. Interaksi ini terjadi pada rantai tunggal atau pada kedua rantai DNA melalui rangkai-silang (*cross-linking*), dengan dua gugus reaktif (Katzung, 2001).

Reaksi alkilasi nukleofil basa DNA (Gambar 2) pada sel kanker biasanya berlangsung dalam dua tahap, yaitu pembentukan karbokation dari zat pengalkil yang berlangsung lambat, kemudian karbokation yang terbentuk bereaksi dengan basa DNA yang berlangsung cepat dengan kecepatan yang tergantung pada sifat substituen yang terdapat pada senyawa pengalkil. Substituen yang bersifat penarik elektron menghambat laju alkilasi. Reaktivitas karbokation dapat ditentukan dengan mengukur konstanta laju reaksi kimianya (Wheeler, 1974).

Mekanisme alkilasi *guanine* pada DNA disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Mekanisme alkilasi *guanine* pada DNA (Katzung, 2001).

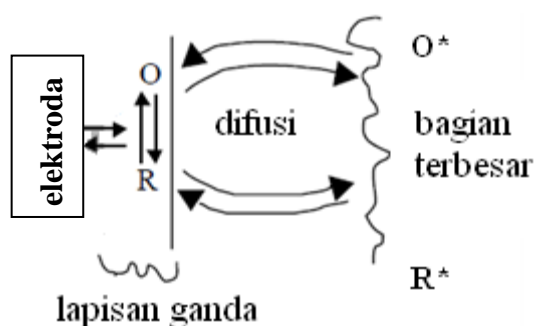
Bis(kloroetil)amin membentuk ion *ethilleneimonium* dan ion karbonium yang bereaksi dengan basa guanin N-7 dalam DNA, yang menghasilkan purin teralkilasi. Alkilasi residu guanin kedua menyebabkan rangka-silang rantai DNA (Katzung, 2001).

B. Voltammetri siklik

Voltametri merupakan salah satu metode elektroanalitik dengan prinsip dasar elektrolisis. Teknik voltammetri ini dapat digunakan untuk menganalisis senyawa kimia yang bersifat elektroaktif, mempelajari proses reduksi dan oksidasi diberbagai medium, proses adsorpsi pada permukaan, dan mempelajari laju transfer elektron di permukaan elektroda. Hasil analisis dengan menggunakan teknik ini dapat diketahui dari voltammogram yang terbentuk. Voltametri terbagi atas beberapa jenis, diantaranya adalah polarografi, voltametri pulsa normal, voltametri pulsa diferensial, voltametri gelombang persegi, dan voltametri siklik (Wang, 2000).

Voltammetri siklik merupakan salah satu teknik yang paling luas dan banyak digunakan untuk karakterisasi sistem redoks. Teknik ini dapat memberikan informasi kualitatif jumlah bilangan oksidasi dan stabilitasnya, juga laju reaksi transfer elektron heterogen. Voltammetri siklik dapat juga digabungkan dengan software simulasi untuk menghitung laju reaksi homogen dan heterogen. Percobaan pada voltammetri siklik termasuk sederhana. Instrumennya disebut potensiostat digunakan dengan menerapkan potensial listrik pada suatu elektroda pada larutan (Bott, 1997).

Penentuan nilai k_f dari senyawa klorambusil dapat dihitung menggunakan metode Nicholson-Shain, yang dikaji berdasarkan voltammogram siklik yang mengikuti mekanisme EC (reaksi elektrokimia (E) yang diikuti dengan reaksi kimia (C)). Mekanisme pada E menunjukkan proses transfer elektron yang berlangsung disekitar permukaan elektroda kerja. Dari E akan diperoleh perbandingan arus puncak anodik dengan katodik (i_{pa}/i_{pc}) yang digunakan untuk menghitung nilai k_f klorambusil.

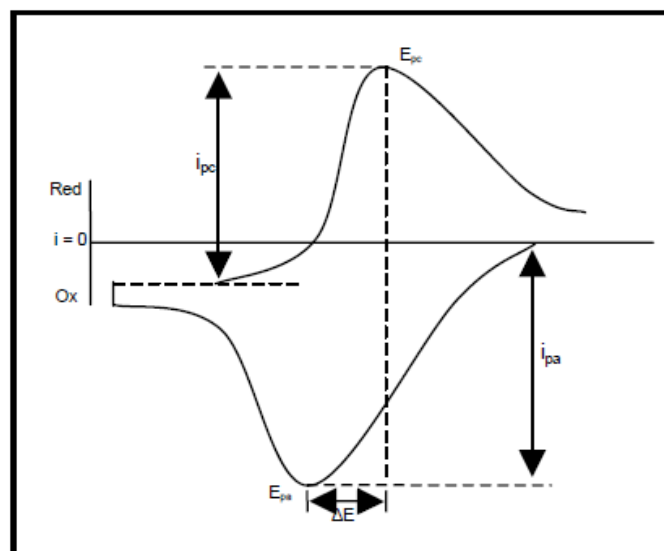


Gambar 3. Transfer elektron pada sistem elektrokimia (Bioanalytical, 2000).

Pada awal eksperimen larutan hanya mengandung bentuk R^* , tidak ada perubahan dari bentuk reduksi R^* ke bentuk oksidasi O^* (Gambar 3). Ketika arus dialirkan ke larutan melalui elektroda acuan menyebabkan terjadinya reduksi. Bersamaan dengan terjadinya reduksi (R), suatu lapisan ganda terbentuk. Saat potensial reduksi tercapai, arus anodik naik secara eksponensial terhadap potensial. Saat R^* berubah menjadi O^* , terdapat konsentrasi R^* dan O^* disekitar elektroda kerja sehingga terjadi difusi yang akan menurunkan konsentrasi keduanya. Laju reduksi elektroda dibatasi oleh difusi sehingga arus akan turun. Pada puncak anodik, potensial redoks cukup positif, semua R yang mencapai permukaan elektroda teroksidasi menjadi O. Selusur arus sekarang tergantung kepada laju transfer massa ke permukaan elektroda. Pada titik reduksi dari R ke O, selusur

berbalik menghasilkan suatu arus katodik. Selusur arus terus turun sampai potensialnya mendekati potensial redoks yang akhirnya menghasilkan arus puncak katodik (Paisley, 2000).

Potensial yang diberikan (antara elektroda kerja-elektroda acuan) dikendalikan oleh potensiostat yang menyebabkan arus mengalir diantara elektroda kerja dan elektroda bantu guna mempertahankan potensial yang dikehendaki. Eksperimen dimulai dengan memilih jendela potensial yang dibatasi oleh potensial awal dan potensial akhir. Zat elektroaktif mula-mula dioksidasi kemudian direduksi atau sebaliknya. Selusur potensial dengan laju konstan ($v=dE/dt$), dimulai dari potensial awal (E_s) sepanjang jendela potensial sampai potensial akhir (E_f). Kemudian arah laju selusur potensial (v) kembali ke potensial awal (Gambar 4) (Rudolph *et al.*, 1993)



Gambar 4. Voltammogram siklik (i_{pa} = arus puncak anodik; i_{pc} = arus puncak katodik; E_{pa} = potensial puncak anodik dan E_{pc} = potensial puncak katodik).

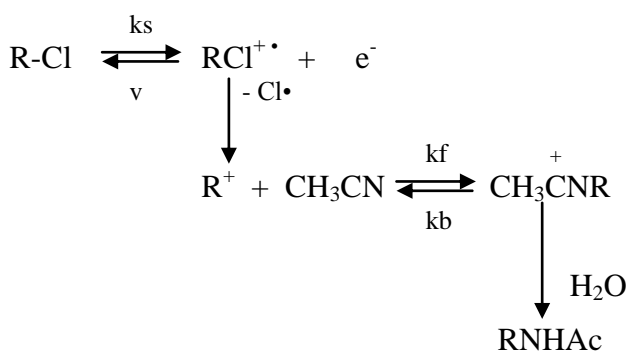
Reaksi kimia yang diamati terjadi pada permukaan elektroda kerja. Arus listrik pada elektroda kerja yang dibangkitkan oleh transfer elektron disebut arus faraday. Sebuah elektroda bantu dipasang pada sirkuit potensiostatik untuk menyeimbangkan proses faraday pada elektroda kerja untuk transfer elektron pada arah yang berlawanan (jika pada elektroda kerja terjadi reduksi, maka pada elektroda bantu terjadi oksidasi). Arus faraday pada elektroda kerja mengalami perubahan pada keluaran potensial yang sensitifitasnya dipilih, dinyatakan dalam ampere per volt dan direkam dalam bentuk analog atau digital (Heineman, 1984). Respon voltammeter siklik dinyatakan sebagai arus lawan potensial, yang disebut voltammogram siklik.

Proses-proses yang terjadi disekitar permukaan elektroda kerja meliputi reaksi elektrokimia, proses difusi, dan reaksi kimia. Reaksi elektrokimia atau proses transfer elektron adalah proses pemindahan elektron dari permukaan elektroda kerja ke zat elektroaktif atau sebaliknya. Perpindahan zat elektroaktif dari larutan induk ke permukaan elektroda dan sebaliknya disebut proses difusi, proses ini terjadi karena adanya perbedaan konsentrasi. Bila hasil proses elektrokimia menghasilkan suatu radikal ion yang reaktif terhadap pelarut maka reaksi kimia dapat terjadi (Gosser, 1993).

Berdasarkan ketiga proses pada permukaan elektroda tersebut, maka bentuk voltammogram siklik merupakan fungsi dari suhu, parameter eksperimen (potensial awal, potensial akhir, laju selusur potensial), parameter laju reaksi heterogen (koefisien transfer elektron, konstanta laju reaksi heterogen acuan, potensial elektroda acuan), koefisien difusi zat, konsentrasi zat, jenis elektroda,

luas permukaan elektroda, dan konstanta laju reaksi kimia (Gosser, 1993; Rudolph *et al*, 1994).

Saat analisis voltametri siklik, senyawa pengalkil dalam larutan asetonitril mengalami reaksi elektro oksidasi membentuk suatu radikal karbokation. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Reaksi elektrokimia zat pengalkil yang diikuti oleh reaksi kimia (k_s = konstanta transfer elektron heterogen standar, k_f = konstanta laju reaksi kimia maju, k_b = konstanta laju reaksi kimia balik, v = laju selusur potensial) (Hardoko, 1999).

Reaksi elektrokimia zat pengalkil yang diikuti oleh reaksi kimia karbokation yang terbentuk akan diserang oleh nukleofil yang ada dalam larutan yaitu asetonitril dengan laju reaksi kimia maju (k_f) tertentu dan saat selusur potensial dibalik dapat tereduksi kembali pada katoda yang ditunjukkan dengan adanya arus puncak katodik (i_{pc}). Reaksi elektrokimia yang berlangsung pada permukaan elektroda diikuti dengan reaksi kimia.

Menurut Gosser, karakteristik reaksi elektrokimia terlihat dari nilai konstanta transfer elektron heterogen standar (k_s), sedangkan karakteristik reaksi kimia terlihat dari nilai konstanta laju reaksi kimia maju (k_f) dan konstanta laju reaksi kimia balik (k_b). Teknik kompetitif dapat menetapkan reaktivitas relatif suatu zat

yang besarnya dipengaruhi oleh substituen yang terdapat pada zat pengalkil. Satu-satunya metode yang dapat digunakan untuk teknik pengkajian kompetitif ini adalah voltammetri siklik.

C. Metode Polar 4.2

Polar berasal dari kata *polarography* yang merupakan salah satu perangkat lunak elektrokimia. Secara analitik dan digital, program ini mensimulasikan voltammogram dari beberapa mekanisme transfer elektron secara virtual pada beberapa bentuk geometri elektroda (*planar, spiral, semispiral, cylindris, microdisc, thin film dan rotating electrodes*) dalam beberapa teknik (*linear sweep and cyclic voltammetry, direct current, normal pulse, differential pulse, and square wave*).

Metode Program Polar 4.2 dapat digunakan untuk menentukan nilai konstanta k_f , k_s , i_{pa} , i_{pc} , dan parameter lainnya. Sebagai acuan dipakai voltammogram siklik eksperimen dengan zat yang konsentrasinya diketahui dan laju selusur potensial (v) tertentu, yang menghasilkan parameter arus puncak anodik (i_{pa}), arus puncak katodik (i_{pc}), potensial puncak anodik (E_{pa}), dan potensial puncak katodik (E_{pc}), potensial elektroda acuan (E^0) pada jendela potensial awal (E_s) dan potensial akhir (E_f) eksperimen (Huang, 2000).

Berikut adalah cara kerja Program Polar 4.2 :

1. Diaktifkan program Simulasi Digital Polar 4.2 pada komputer, dipilih menu *Help*, dipilih submenu *Logon*, dimasukkan *Pasword* dan diklik *Ok*, ditampilkan pada Gambar 6.
2. Dipilih menu *Input*, dipilih submenu *Technique*, pilih No.1 *Linear Sweep and Cyclic Voltammetry*, lalu diklik *Ok* (Gambar 7).
3. Kembali ke menu *Input*, lalu dipilih submenu *Mechanism*, diklik *Digital Simulation*, tulis Fe^{2+} pada kolom *Chemical Reaction*, dipilih *Ok* (Gambar 8).
4. Kembali ke menu *Input*, lalu dipilih submenu *Instrument*, diisikan kondisi eksperimennya. Pengisian data pada submenu ini disesuaikan dengan data pada voltammogram siklik eksperimen yang telah diperoleh. Kemudian dipilih *Ok* (Gambar 9).
5. Kembali ke menu *Input*, lalu dipilih submenu *Chemicals*, diisikan data dalam submenu yang sesuai dengan kondisi eksperimennya. Nilai parameter k_s , α , E^0 , D , dan k_f diisi dengan merubah nilai-nilainya (Gambar 10).
6. Setelah data pada submenu *Instrument* dan *Chemicals* diisi, kemudian dipilih menu *Run* lalu klik submenu *Simulate*. Voltammogram siklik yang dihasilkan pada laju selusur potensial (v) harus sesuai dengan data voltammogram siklik eksperimen (Gambar 11).
7. Jika voltammogramnya terbalik, dipilih menu *Analysis*, dipilih submenu *Y Data*, dan dipilih $-Y$ (Gambar 12).
Selanjutnya dipilih menu *Display*, dipilih submenu *Option*, tanda *Check* pada *X Direction* dihilangkan dengan memilihnya, dan diklik *Ok* (Gambar 13).

8. Dipilih menu *Analysis*, dipilih submenu *Find Peak*, diperoleh data nilai i_{pa} , i_{pc} , E_{pa} , E_{pc} dan ΔE_p dari voltammogram siklik (Gambar 14).

Simulasi dilakukan berulang-ulang hingga diperoleh nilai i_{pa} , i_{pc} , E_{pa} , E_{pc} dan ΔE_p sama atau mendekati dengan eksperimen (acuan). Selanjutnya dilakukan simulasi pada laju selusur potensial yang lain. Bila didapat keadaan pertamakali : nilai i_{pa} simulasi $>$ nilai i_{pa} acuan dan nilai i_{pc} simulasi $>$ nilai i_{pc} acuan, maka nilai k_f diatur naik atau apabila nilai i_{pa} simulasi $<$ nilai i_{pa} acuan dan nilai i_{pc} simulasi $<$ nilai i_{pc} acuan, maka nilai k_f diatur turun.

D. Metode Nicholson-Shain

Untuk mekanisme reaksi elektrokimia yang reversibel (Er) dan reaksi kimia yang reversibel (Cr) atau tak-reversibel (Ci) dapat ditentukan dengan melihat hubungan perbandingan arus puncak katodik dengan arus puncak anodik pada perubahan laju selusur potensial yang merupakan hasil perhitungan k_f dari senyawa zat pengalkil yang diperbandingkan nilai i_{pc} dan i_{pa} nya (Nicholson-Shain, 1965).

Persamaan Nicholson-Shain diperoleh dari data pembuatan kurva kerja :

$$i_{pc}/i_{pa} = 0,506 - 0,433 \log k_f t$$

Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Apriani (2008) penentuan nilai konstanta laju reaksi kimia maju (k_f) senyawa zat pengalkil klorambusil ditentukan dengan menggunakan nilai perbandingan arus puncak katodik (i_{pc}) dengan arus puncak anodik (i_{pa}) dari tiap laju selusur potensial yang divariasikan.

Pada penelitian Apriani (2008) data nilai k_f klorambusil berdasarkan kurva $k_f t$ terhadap t pada suhu yang di variasi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Data nilai k_f klorambusil berdasarkan kurva $k_f t$ lawan t pada variasi suhu (20°C, 25°C, 30°C, dan 40°C).

Suhu (°C)	k_f
20	3,639
25	4,509
30	5,108
40	1,960

Apriani, 2008.