

PERBANDINGAN METODE SINTESIS DAN KARAKTERISASI ETILENDIAMIN-FOLAT SEBAGAI PREKURSOR PEMBUATAN SENYAWA PENGONTRAS MRI GADOLINIUM DIETILENTRIAMIINPENTAASETAT-FOLAT

COMPARISON OF SYNTHESIS METHOD AND CHARACTERIZATION OF ETHYLENEDIAMINE-FOLATE AS A PRECURSOR IN THE SYNTHESIS OF MRI CONTRAST AGENT GADOLINIUM DIETHYLENTRIAMINEPENTAACETATE-FOLATE

Retna Putri Fauzia*, Abdul Mutalib, R. Ukun M. S. Soedjanaatmadja, Anni Anggraeni, Zuhrotun Nafisah, Muhammad Yusuf, dan Husein H. Bahti
Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jalan Raya Bandung-Sumedang Km.21, Jatinangor, Sumedang 45363

*Email: retna.fauzia@unpad.ac.id

ABSTRAK

Gadolinium dietilentriaminpentaasetat-folat (Gd-DTPA-Folat) telah diusulkan sebagai senyawa pengontras *magnetic resonance imaging* yang memiliki potensi diagnosis penyakit kanker yang mengekspresikan reseptor folat berlebih. Pada studi sebelumnya, DTPA-Folat sebagai ligan pengompleks dari Gd-DTPA-Folat disintesis melalui pembentukan derivat asam folat, etilendiamin-folat (EDA-Folat) melalui lima tahapan reaksi. Pada studi ini, metode sintesis dari derivat asam folat, EDA-Folat menggunakan metode sintesis secara tidak langsung (sintesis (γ)EDA-Folat) akan dibandingkan dengan metode sintesis secara langsung (sintesis (α)EDA-Folat dan (γ)EDA-Folat). Asam folat akan dikonjugasikan dengan N-hidrosuksisusksinimida (NHS) untuk membentuk NHS-Folat, selanjutnya dikonjugasikan dengan EDA akan menghasilkan EDA-Folat. EDA-Folat yang dihasilkan akan dikarakterisasi dengan spektrofotometri UV, inframerah dan spektroskopi massa. Analisis kemurnian dari produk EDA-Folat yang dihasilkan akan diuji dengan KCKT kolom C₁₈, fase gerak asetronitril/air (TFA 0,5%) 2:8, laju alir 0,5 mL menit dan detektor UV-DAD 280 nm, uji statistik menggunakan *software minitab* 15 dilakukan untuk menguji perbedaan kedua metode. Perolehan hasil menunjukkan karakteristik yang identik antara produk EDA-Folat yang disintesis secara langsung dan tidak langsung dengan spektrofotometri UV, inframerah dan spektroskopi massa. Uji statistik dengan *software minitab* 15 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan antara kedua metode sintesis EDA-Folat.

Kata Kunci: EDA-Folat, DTPA-Folat, Gd-DTPA-Folat, *Magnetic Resonance Imaging*

ABSTRACT

Gadolinium diethylenetriaminepentaacetate-folate (Gd-DTPA-Folate) has been proposes as potential MRI contrast agent for cancers that overexpress reseptor folate. In our previous study, DTPA-Folate as a ligand of Gd-DTPA-Folate was synthesized through preparation a derivative folic Acid, ethylenediamine-folate (EDA-Folate) via five steps reaction. In the present study, synthesis methods of a derivative folic acid, EDA-Folate via indirect method (synthesis of (γ)EDA-Folate) will be compared with a direct method synthesis (syntesis of (α)EDA-Folate and (γ)EDA-Folate). Folic acid will be conjugated with N-Hydroxysuccinimide (NHS) become NHS-Folate then conjugated with ethylenediamine and resulted EDA-Folate. EDA-Folate will be characterized using Spectrophotometry UV, infrared and mass spectroscopy. Analysis purity of EDA-Folate products will be tested using HPLC C₁₈ column, mobile phase acetoneitril/water (TFA 0.5%) 2:8, flow rate 0.5 mL/minutes and detector UV-DAD 280 nm, statistical test using software minitab 15 will be done to tested the differences of two methods. The result showed that the identical characterictic between EDA-Folate via indirect and direct methods using spectrophotometry UV, infrared and mass spesctroscopy. Statistical test using minitab 15 showed that there was no differences between two methods of EDA-Folate synthesis.

Key Words: EDA-Folate, DTPA-Folate, Gd-DTPA-Folate, *Magnetic Resonance Imaging*

PENDAHULUAN

Konjugasi asam folat pada beberapa ligan sebagai suatu penanda tumor/kanker telah berhasil disintesis dalam 10 tahun terakhir, misalnya ^{67}Ga -defroksamin-Folat (Wang *et al.*, 1996) dan ^{111}In -DTPA-Folat (Wang *et al.*, 1997). Asam folat dibuktikan dapat membawa senyawa obat tertentu langsung menuju pada kanker yang mengekspresikan reseptor folat berlebih dibandingkan dengan sel normal, misalnya kanker ovarium (Parker *et al.*, 2005).

Asam folat dapat dikonjugasikan dengan senyawa pengontras *magnetic resonance imaging* (MRI) Gd-DTPA (Gunawan *et al.*, 2006 ; Fauzia *et al.*, 2016) yang sudah direkomendasikan oleh *Food and Drug Agency* USA pada tahun 1988 dengan nama dagang magnevist, membentuk Gd-DTPA-Folat (Fauzia *et al.*, 2015). Sehingga dapat digunakan untuk membawa senyawa pengontras Gd-DTPA langsung menuju kanker yang positif reseptor folat. Dengan penggunaan senyawa pengontras tertarah pencitraan kanker dengan menggunakan modalitas MRI akan semakin jelas hingga tingkat seluler dan dapat digunakan untuk diagnosis dan deteksi dini penyakit kanker.

Melalui jalur *receptor mediated endocytosis* (Zwicke *et al.*, 2012) untuk asam folat dapat dimanfaatkan secara selektif dan non-destruktif mengantarkan folat terkonjugasi molekul kecil, makromolekul, dan pembawa obat seperti liposom ke dalam sel tumor terkultur. Ketika reseptor folat

secara non kovalen dihubungkan ke molekul asam folat yang terkonjugasi melalui bagian gamma karboksilnya, afinitas konjugat yang terikat kovalen pada permukaan sel reseptor folat untuk reseptor permukaan sel folat yang lain pada dasarnya tetap atau tidak berubah. Selanjutnya, diikuti pengikatan pada reseptor pada permukaan sel, folat terkonjugasi diinternalisasi oleh sel dengan cara yang sama seperti vitamin yang tidak dimodifikasi. Penggunaan kembali reseptor folat bisa dilakukan setelah semua konjugat folat terakumulasi pada sel target. Namun hambatan utama dalam desain konjugat folat ini adalah sintesis senyawa tersebut.

Penelitian saat ini yang paling sederhana adalah penggunaan metode langsung dengan memperlakukan substrat pilihan asam folat dengan pereaksi penghilang air atau disiklokarbodiimida. Hasil yang diperoleh merupakan campuran antara konjugat alfa yang tidak aktif dan konjugat gamma yang aktif dan sering disertai dengan bentuk derivat bis- dan atau asam folat tersisanya (Wang *et al.*, 1997 ; Fuchs *et al.*, 1999).

Cara lain dilakukan untuk menghasilkan bentuk gamma aktif dari derivat asam folat tanpa harus melalui pemisahan dengan melakukan pendekatan alternatif sintesis derivat asam folat yang bergantung pada asilasi monoester pada asam glutamat dengan asam pteorat melalui metode substitusi secara regiospesifik/tidak langsung gugus asam karboksilat gamma dari asam

folat (Fuchs *et al.*, 1999 ; Sunamoto *et al.*, 2007).

Pada penelitian ini telah dilakukan dua rute metode sintesis secara langsung dan tidak langsung untuk menghasilkan derivat asam folat, etilendiamin folat (EDA-Folat), sebagai prekursor pembuatan senyawa pengontras MRI Gd-DTPA-Folat (Fauzia *et al.*, 2015) dengan mengadopsi dari kedua metode tersebut (Wang *et al.*, 1997 ; Fuchs *et al.*, 1999 ; Sunamoto *et al.*, 2007). Sehingga bisa ditentukan apakah kedua metode berbeda secara atau tidak dalam perolehan kemurnian EDA-Folat yang akan digunakan sebagai prekursor pembuatan senyawa pengontras MRI Gd-DTPA-Folat (Fauzia *et al.*, 2015).

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan

Bahan-bahan kimia yang digunakan dibeli dari Sigma Aldrich and Merck, untuk sintesis EDA-Folat secara langsung³ bahan kimia yang digunakan adalah: asam folat, aseton, asetonitril, dietileter, disikloheksilkarbodiimida (DCC), dimetilsulfooksida (DMSO), etilendiamin (EDA), N-Hidroksisuksinimida (NHS) dan piridin. Sedangkan untuk sintesis EDA-Folat dengan metode tidak langsung (Fuchs *et al.*, 1999 ; Sunamoto *et al.*, 2007) beberapa tambahan bahan kimia seperti: 2-propanol, (γ)metil glutamat, akuabides, asam klorida, hidrazin hidrat, kalium tiosianat, metanol, natrium azida, natrium hidroksida, tersier

buntil nitril, tetrahidrofuran (THF), tetrametilguanidin, trifloroasetat (TFA) dan trifloroasetat anhidrid (TFAA).

Prosedur Penelitian

Sintesis EDA-Folat dengan metode langsung

Asam folat (1 mmol) dilarutkan dalam DMSO 10 mL pada 40°C hingga larut sempurna. NHS (2 mmol) dan DCC (1,2 mmol) dimasukkan ke dalam larutan asam folat, campuran diaduk pada kecepatan pengadukan 375 rpm pada 60°C selama 6 jam. Suspensi campuran larutan disaring, filtrat dicuci dengan aseton dan dietileter. Larutan NHS-Folat direaksikan dengan EDA (10 mmol) dan 10 μ L piridin. Campuran larutan diinkubasi pada suhu ruang selama 12 jam. Larutan EDA-Folat disaring dan dicuci dengan asetonitril dan selanjutnya dikeringkan pada desikator vakum selama 72 jam.

Sintesis EDA-Folat dengan metode tidak langsung

EDA-Folat dihasilkan melalui 5 tahapan reaksi⁶, yaitu pembentukan asam pirofolat, pteroil hidrazid, pteroil azida, metil ester asam folat dan pembentukan EDA-Folat sebagai produk akhir.

Penentuan kemurnian EDA-Folat

Kemurnian produk EDA-Folat dianalisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan fase diam C18 dan fase gerak asetonitril:air (TFA 0,5%) 2:8, kecepatan alir 0.5 mL/menit dan panjang gelombang UV-DAD 280 nm.

Uji Statistik

Uji statistik dilakukan dengan *software* Minitab 15 untuk mengetahui apakah kedua metode berbeda secara signifikan atau tidak dengan dua hipotesis:

H_0 adalah tidak terdapat perbedaan yang signifikan

H_1 adalah terdapat perbedaan yang signifikan

Karakterisasi EDA-Folat

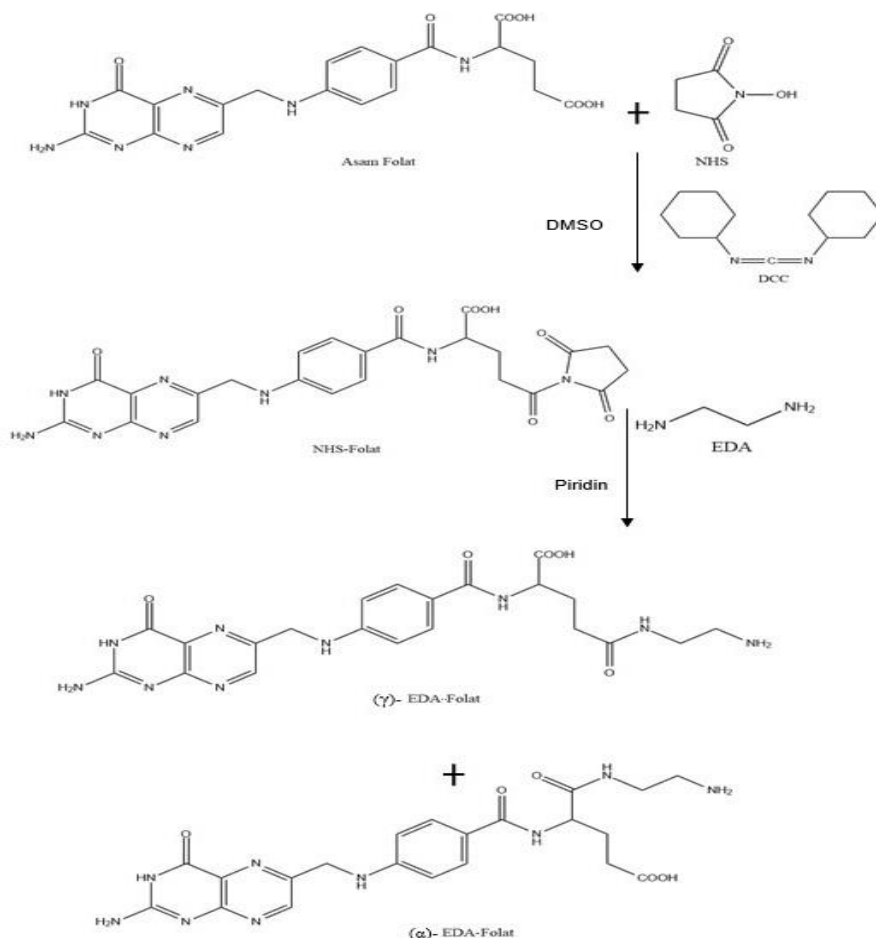
Padatan EDA-Folat yang dihasilkan (metode langsung dan tidak langsung) dikarakterisasi dengan spektrofotometer UV, inframerah dan spektrometer massa.

HASIL DAN PEMBAHASAN

EDA-Folat Metode Langsung

Asam folat merupakan vitamin B yang memiliki kelarutan cukup baik di dalam air, dalam penelitian ini digunakan DMSO dalam pelarutan asam folat karena DMSO termasuk pelarut polar aprotik yang dapat melarutkan baik senyawa polar maupun nonpolar.

(γ)karboksil dari asam folat diaktivasi dengan karbodiimida menjadi NHS-Folat, hasil samping dari reaksi ini adalah disikloheksil urea yang akan dipisahkan dalam bentuk padatan ketika disaring. Berikut ini adalah reaksi pengaktifan asam folat dengan NHS dan DCC menjadi NHS-Folat:



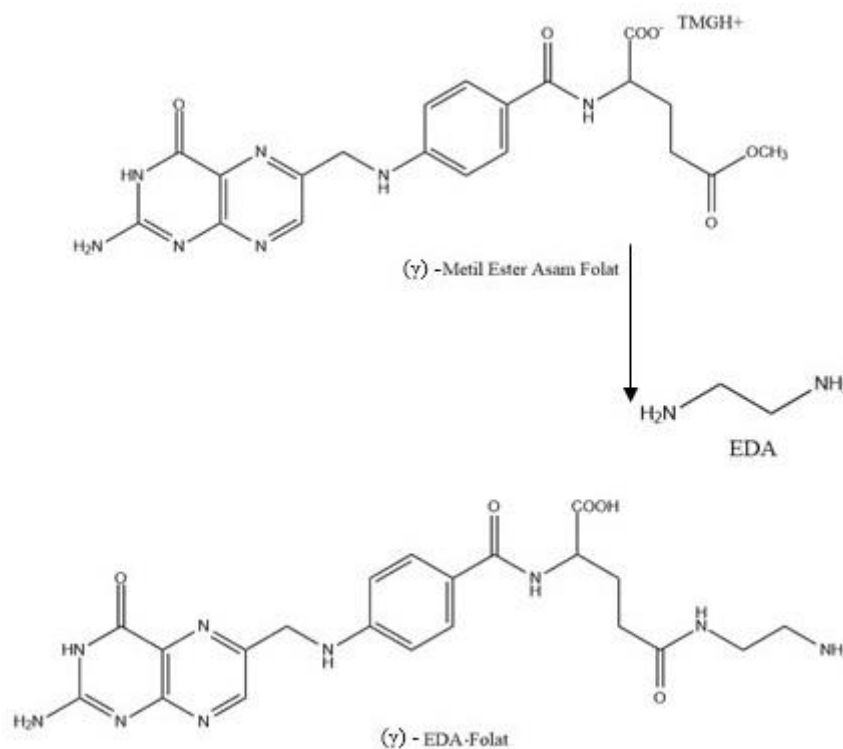
Gambar 1. Reaksi pembentukan (γ)-EDA Folat dan (α)-EDA Folat dari asam folat yang sudah teraktivasi (NHS-Folat) dengan EDA dan piridin.

Reaksi menunjukkan kemungkinan etilendiamin akan mensubstitusi gugus hidroksi pada karboksilat di posisi (γ) dan (α). Sehingga perlu pemisahan lebih lanjut untuk mendapatkan (γ)EDA-Folat dengan kemurnian yang lebih tinggi. (γ)EDA-Folat merupakan prekursor dalam pembentukan (γ)DTPA-Folat yang akan digunakan sebagai ligan pengompleks dengan gadolinium membentuk *targeted MRI contrast agents* Gd-DTPA-Folat (Fauzia *et al.*, 2015).

EDA-Folat Metode Tidak Langsung

EDA-Folat yang disintesis dengan metode tidak langsung menghasilkan

kemurnian (γ)EDA-Folat yang lebih baik dibandingkan dengan metode langsung. Rute sintesis yang dilakukan merupakan modifikasi beberapa metode sintesis (Wang *et al.*, 1997 ; Fuchs *et al.*, 1999 ; Sunamoto *et al.*, 2007) yaitu dimulai dari sintesis asam pirofolat, pteroil hidrasi, pteroil azida dan (γ)metil ester asam folat. Selanjutnya (γ)metil ester asam folat akan bereaksi dengan etilendiamin membentuk (γ)EDA-Folat yang ditunjukkan dengan reaksi pada Gambar 2 dengan perolehan rendemen lebih dari 70% (Fauzia *et al.*, 2015).

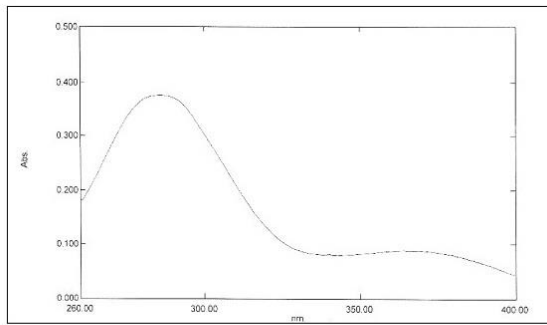


Gambar 2. Reaksi pembentukan (γ)-EDA Folat dengan metode tidak langsung dari (γ)-metil ester asam folat dengan EDA.

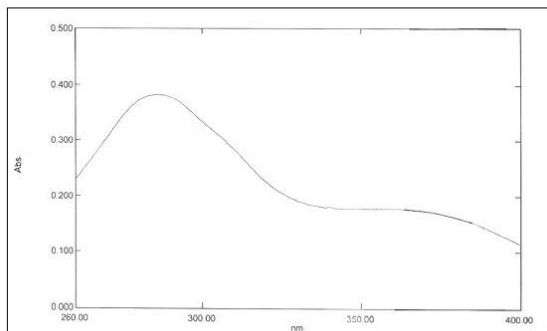
Hasil Karakterisasi EDA-Folat

Karakterisasi EDA-Folat dengan metode langsung dan tidak langsung menggunakan beberapa metode

spektroskopi, diantaranya spektrofotometri ultraviolet, spektrofotometri inframerah dan spektrometer massa.



(a)



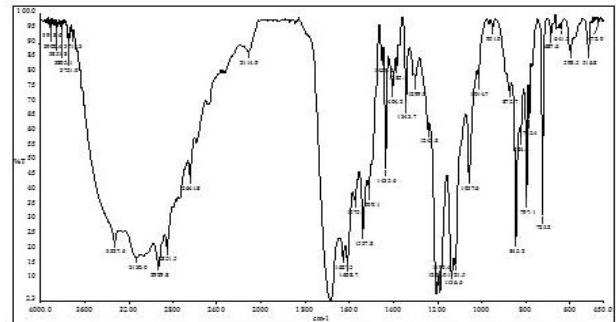
(b)

Gambar 3. Hasil karakterisasi EDA-Folat metode langsung (a) dan EDA-Folat metode tidak langsung (b) dengan spektrofotometer ultraviolet, keduanya menunjukkan puncak pada panjang gelombang 280 dan 362 nm.

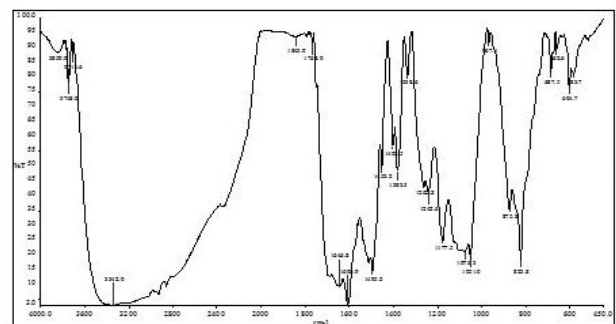
Pada Gambar 3 dapat dilihat hasil karakterisasi dari EDA-Folat dengan metode langsung (a) dan tidak langsung (b) yang menunjukkan dua puncak yang hampir identik yaitu di 280 nm dan 362 nm. Panjang gelombang 280 nm berasal dari ikatan C=C dari cincin benzen yang ada pada asam folat yang menyebabkan terjadi transisi elektronik dari $\pi \rightarrow \pi^*$. Sedangkan panjang gelombang 362 nm berasal dari ikatan C=O dari gugus karboksilat yang menyebabkan terjadi transisi elektronik dari

Hasil karakterisasi dengan metode spektrofotometri inframerah menunjukkan beberapa bilangan gelombang yang khas baik untuk EDA-Folat dengan metode

langsung maupun EDA-Folat dengan metode tidak langsung ditunjukkan pada Gambar 4.



(a)



(b)

Gambar 4. Hasil karakterisasi EDA-Folat metode langsung (a) dan EDA-Folat metode tidak langsung (b) dengan spektrofotometer inframerah, menunjukkan puncak yang khas pada beberapa bilangan gelombang.

Pada Gambar 4 terlihat ada beberapa puncak yang khas dan hampir identik satu sama lain baik untuk EDA-Folat metode langsung (a) dan EDA-Folat metode tidak langsung (b). Pada bilangan gelombang 3400-3300 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus O-H yang berasal dari masing-masing karboksilat, ini dipertegas juga dengan adanya bilangan gelombang dengan intensitas cukup tinggi di 1700-1600 cm^{-1} yang berasal dari C=O (karboksilat tersebut). Bilangan gelombang 1070-1050 menunjukkan puncak yang khas dari C-O/C-N dan satu puncak di

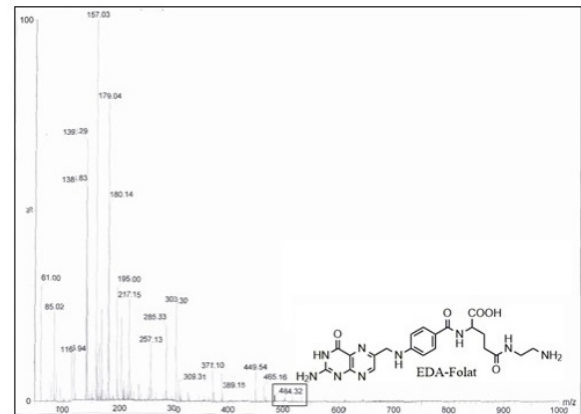
840-820 yang menunjukkan benzen tersubstitusi para.

Data pada Tabel 1 adalah bilangan gelombang EDA-Folat metode langsung dan tidak langsung dengan spektrofotometer inframerah.

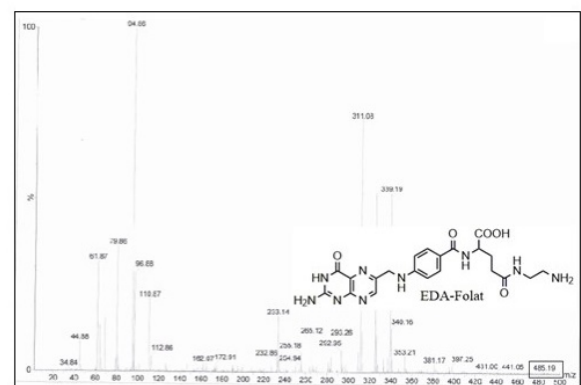
Tabel 1. Hasil karakterisasi EDA-Folat dengan metode spektrofotometer inframerah untuk EDA-Folat langsung dan tidak langsung.

No	Bilangan Gelombang/cm ⁻¹	Dugaan
1	3400 – 3300	O-H karboksilat
2	1700 – 1600	C=O karboksilat
3	1070 – 1050	C-O atau C-N
4	840 – 820	Benzena tersubstitusi <i>para</i>

Hasil karakterisasi dengan spektrometer massa menunjukkan m/z yang hampir identik di 484 Da dan 485 Da hal ini dikarenakan terjadi penambahan protonasi dari gugus H⁺ pada EDA-Folat metode tidak langsung.



(a)

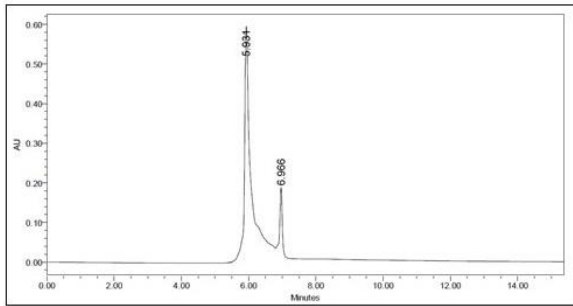


(b)

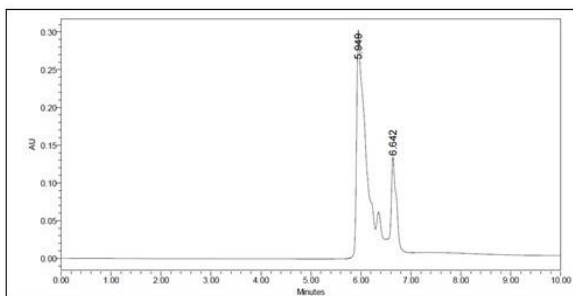
Gambar 5. Hasil karakterisasi EDA-Folat metode langsung (a) dan EDA-Folat metode tidak langsung (b) dengan spektrometer massa, masing-masing menunjukkan berat molekul pada m/z 484 dan 485 Da.

Kemurnian EDA-Folat

Kemurnian EDA-Folat metode langsung dan tidak langsung ditentukan dengan metode KCKT menggunakan fase diam C18, fase gerak dengan elusi gradien air (0.5%):asetonitril 8:2, kecepatan alir 0.5 mL/menit dan UV-DAD 280 nm.



(a)



(b)

Gambar 6. Analisis kemurnian EDA-Folat metode langsung (a) dan EDA-Folat metode tidak langsung (b) dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi menggunakan fase diam C18, fase gerak dengan elusi gradien air (0.5%) : asetonitril 8:2, kecepatan alir 0.5 mL/menit dan UV-DAD 280 nm, masing-masing menunjukkan waktu retensi pada 5.931 dan 5.949 menit.

Kromatogram EDA-Folat metode langsung pada Gambar 6.a menunjukkan puncak dari (γ)EDA-Folat di waktu retensi 5.931 menit dengan presentase kemurnian hampir 90%. Sedangkan kromatogram EDA-Folat metode tidak langsung Gambar 5.b menunjukkan puncak (γ)EDA-Folat pada waktu retensi 5.949 menit dengan presentase kemurnian yang lebih kecil yaitu di bawah 80%, hal ini dikarenakan tahapan reaksi yang cukup rumit sehingga beberapa produk samping dihasilkan.

Uji Statistik Perbedaan Metode

Uji statistik dilakukan untuk mengetahui perbedaan metode sintesis EDA-Folat dari varians masing-masing waktu retensi EDA-Folat menggunakan *Software* Minitab 15, dengan dua hipotesis: H_0 adalah tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua metode. H_1 adalah terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua metode. Gambar 7 menunjukkan hasil uji statistik yang dilakukan.

Two-sample T for C1 vs C2				
	N	Mean	StDev	SE Mean
C1	3	5,93300	0,00265	0,0015
C2	3	5,940667	0,000577	0,00033
Difference = μ (C1) - μ (C2)				
Estimate for difference: -0,00767				
95% CI for difference: (-0,01439; -0,00094)				
T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = -4,90 P-Value = 0,039 DF = 2				

Gambar 7. Hasil uji statistik perbandingan metode sintesis EDA-Folat dengan *software* Minitab 15.

Hipotesis null (H_0) ditolak artinya tidak ada perbedaan yang signifikan antara kedua metode sintesis EDA-Folat.

KESIMPULAN

Metode sintesis EDA-Folat dengan menggunakan metode langsung dan tidak langsung menunjukkan karakteristik yang identik pada beberapa metode karakterisasi seperti spektrofotometri ultraviolet, inframerah dan spektrometri massa dengan perolehan kemurnian masing-masing lebih dari 80%. Uji statistik yang dilakukan

menunjukkan bahwa kedua metode tidak berbeda secara signifikan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih pada berbagai pihak yang sudah membantu dalam penelitian ini, terutama kepada Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka Badan Tenaga Nuklir Nasional (PTRR-BATAN) dan PT. Kimia Farma, Tbk.

DAFTAR PUSTAKA

- Fauzia, R.P., A. Mutalib, R.U.M.S. Soedjanaatmadja, A. Anggraeni, H.H. Bahti. 2016. Modifikasi Metode Sintesis Gadolinium Dietilentriamin Pentaasetat Sebagai Senyawa Pengontras *Magnetic Resonance Imaging*. *Journal Chimica et Natura Acta*. **4**(1): 7-15.
- Fauzia, R.P., A. Mutalib, R.U.M.S. Soedjanaatmadja, H.H. Bahti, A. Anggraeni, A.H. Gunawan, H. Pujiastuti, & Y. Hidayati. 2015. Synthesis and Characterization of Gadolinium Diethylenetriamine Pentaacetate-Folate. *Science Direct Procedia Chemistry*. **17**: 139 – 146.
- Fuchs, P.L., D.A. Lantrip, & J. Luo. 1999. *Folic Acid Derivates*. USA patent WO 1999020626 A1.
- Gunawan, A.H, A. Mutalib, S. Aguswarini, dan H. Lubis. 2006. Akumulasi dan Clearance dari Contrast Agents MRI Gd-DTPA yang Disimulasikan dengan ¹⁵³Gd-DTPA dalam Hewan Mencit. *Jurnal Kimia Indonesia*. **1**(2): 78-81.
- Parker, N., J.T.Mary, W. Elaine, D.L. Jevrey, S.L. Philip, and P.L. Christopher. 2005. Folate Receptor Expression in Carcinomas and Normal Tissues Determined by a Quantitative Radioligand Binding Assay. *Analytical Biochemistry*. **338**: 284–293
- Sunamoto, J., K. Ushio, & H. Masaki. 2007. *Folate Modified Cholesterol Bearing Pullulan as a Drug Carrier*. USP 20070042970A1. USA patent.
- Wang, S., R. Lee, C. Mathias, M.A. Greem, & P. Low. 1996. Synthesis, Purification, and Tumour Cell Uptake a ⁶⁷Ga-Defroxiamine-Folate, a Potential Radiopharmaceutical for Tumour Imaging. *Bioconjugate Chemistry*. **7**(1): 56-62.
- Wang, S., J. Luo, D.A. Lanrip, D.J. Waters, C.Mathias, M.A. Green, P. Fuchs, & P. Low. 1997. Design and Synthesis of [¹¹¹In]-DTPA-Folate for Use as a Tumour Targeted Radiopharmaceutical. *Bioconjugate Chemistry*. **8**: 673-679.
- Zwicke, G.L., G.A. Mansoori, & C.J. Jeffery. 2012. Utilizing The Folate Receptor for Active Targeting of Cancer Nanotherapeutics. *Nano Reviews*. **3**: 1-11.