

VALIDASI METODE PENENTUAN KADAR GADOLINIUM (III) DAN LIGAN DIETHYL TETRAAMINE PENTAACETIC ACID (DTPA) DALAM *CONTRAST AGENT* Gd-DTPA

Rien Ritawidya, Martalena Ramli, dan Cecep Taufik Rustendi
Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka – BATAN

ABSTRAK

VALIDASI METODE PENENTUAN KADAR GADOLINIUM (III) DAN LIGAN DIETHYL TETRAAMINE PENTAACETIC ACID (DTPA) DALAM *CONTRAST AGENT* Gd-DTPA. Gd-DTPA merupakan salah satu *contrast agent* yang penting dalam *Magnetic Resonance Imaging* (MRI). Kadar ion Gd (III) dan ligan DTPA bebas dalam *contrast agent* yang terlalu besar akan bersifat toksik pada tubuh manusia. Oleh karena itu diperlukan suatu metode untuk penentuan kadar ion Gd (III) dan ligan DTPA bebas sehingga *contrast agent* dapat digunakan untuk tujuan klinis. Metode analisis yang dipilih pada penelitian ini adalah titrasi kompleksometri yang harus divalidasi sehingga diperoleh data-data perolehan kembali (*recovery*), koefisien variansi (CV) dan linearitas. Serangkaian percobaan yang telah dilakukan pada penentuan Gd (III) dengan DTPA menunjukkan hasil parameter akurasi % *recovery* antara 30,33 %-183,59 %, presisi dari % CV antara 2,34 %-35,25 %, dan linearitas dengan nilai $R=0.9760$. Sementara pada penentuan DTPA dengan Gd (III) menunjukkan hasil % *recovery* antara 105,15 %-139,12 %, nilai % CV antara 6,78 %-10,96 %, dan nilai $R=0.9994$. Hasil validasi menunjukkan bahwa metode penentuan ini tidak dapat digunakan sebagai salah satu metode alternatif penentuan ion Gd(III) bebas dan ligan DTPA bebas dalam *contrast agent*.

Kata Kunci : Gd-DTPA, *contrast agent*, ion Gd (III), kompleksometri, validasi

ABSTRACT

METHOD VALIDATION FOR DETERMINATION OF GADOLINIUM (III) AND DIETHYL TETRAAMINE PENTAACETIC ACID (DTPA) LIGAND AMOUNT DETERMINATION IN Gd-DTPA CONTRAST AGENT. Gd-DTPA is one of the contrast agent which is important in Magnetic Resonance Imaging (MRI) application. The presence of free Gd (III) ion and free DTPA ligand is extremely toxic in human body. Therefore, it needs a method in order to determine free ion Gd (III) and free DTPA ligand concentration which then MRI would be applicable for clinical purpose. The analytical method that selected for the research was complexometric titration. The research was carried out in order to make validation method of free ion Gd (III) and free DTPA ligand determination, then validation criteria such as % recovery, % coefficient of variance and linearity could be obtained. Some experiments that had been done on determination of free Gd (III) with DTPA resulted in % recovery between 30,33% - 183,59%, the precision from %CV between 2,34% - 35,25% and linearity showed with value of $R = 0,9525$. Meanwhile on determination of DTPA with Gd (III) resulted in % recovery between 105.15% - 139,12%, %CV between 6,78% - 10,96% and $R = 0,9525$. Validation result indicates that determination method can not be used as a method to determine free ion Gd(III) and free DTPA ligand in contrast agent.

Keywords : Gd-DTPA, contrast agent, ion Gd (III), complexometric, validation

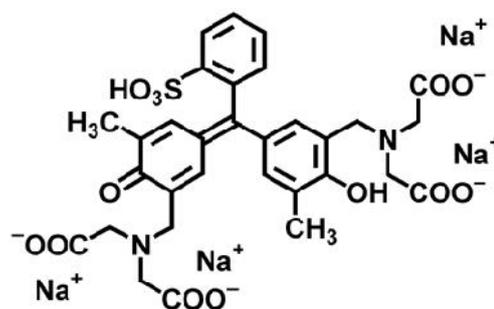
PENDAHULUAN

Magnetic Resonance Imaging (MRI) adalah suatu metode pencitraan jaringan tubuh dalam bentuk gambar berupa potongan-potongan bagian tubuh menggunakan medan magnet berkekuatan antara 0,064 – 1,5 tesla (1 tesla = 1000 Gauss) dan resonansi getaran terhadap inti atom hidrogen [1]. Keuntungan utama MRI adalah tidak berbahaya bagi pasien karena tidak menggunakan radiasi pengion. Teknik penggambaran MRI relatif rumit karena gambaran yang dihasilkan tergantung pada banyak parameter. Salah satu cara untuk mendapatkan gambaran organ yang jelas adalah dengan adanya suatu *contrast agent*. *Contrast agent* adalah senyawa yang diberikan pada prosedur MRI untuk meningkatkan dan memperjelas kontras suatu gambaran atau citra dari organ terutama pada jaringan lunak sistem saraf pusat, hati, sistem pencernaan, sistem limfatik, payudara, sistem kardiovaskular dan paru [2]. Gd-DTPA merupakan salah satu *contrast agent* yang penting dalam MRI [3]. Kompleks Gd-DTPA telah digunakan secara klinis dan dipasarkan di Amerika Serikat dengan nama dagang “Magnevist”.

Penggunaan Gd-DTPA sebagai *contrast agent* harus memenuhi persyaratan yang ditentukan, antara lain konsentrasi ion Gd (III) dan ligan DTPA bebas yang kecil. Keberadaan ion Gd (III) dan ligan DTPA bebas dalam *contrast agent* harus seminimal mungkin karena sifatnya yang toksik pada tubuh manusia [3]. Adanya ion Gd (III) bebas dapat terjadi karena beberapa hal antara lain kinetika reaksi yang lambat, adanya atom donor Gd di luar daerah koordinasi atau terbentuknya partikel nano oxi-hidroksi Gd pada pH sedikit netral. Oleh karena itu sebelum digunakan pada manusia, preparat Gd

DTPA harus dianalisa untuk menentukan jumlah ion Gd (III) dan ligan DTPA bebasnya [3].

Metode penentuan kadar ion Gd (III) dan ligan DTPA bebas telah dilaporkan dalam berbagai pustaka. Salah satu metodenya adalah titrasi kompleksometri [3] yang merupakan metode titrasi berdasarkan reaksi kompleksasi antara ion logam dengan ligan. Pada penelitian ini digunakan *xylenol orange* sebagai indikator kompleksometri, yang akan menunjukkan perubahan warna dengan adanya ion logam Gd bebas [3]. Gambar struktur kimia dari *xylenol orange* dapat dilihat di bawah ini:



Gambar 1. Struktur xylenol orange [3]

Validasi metode adalah konfirmasi melalui pengujian dan pengadaan bukti yang obyektif bahwa persyaratan tertentu untuk suatu tujuan khusus harus dipenuhi. Validasi metode dalam penelitian ini bertujuan untuk menentukan batas suatu metode seperti presisi, akurasi, dan lain-lain. [4]. Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan kedekatan hasil analisa dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali analit yang ditambahkan, biasanya antara 80 %-120 %. Sementara presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang-ulang pada sampel-sampel yang

diambil dari campuran yang homogen. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relative (koefisien variansi). Kriteria presisi diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variansi (CV) $\leq 2\%$ [6].

$$\text{Simpangan baku (SB)} = \frac{d^2}{N}$$

Dimana, d = selisih nilai data duplo

N = banyak percobaan atau pengamatan

$$\% \text{ Recovery} = \left(\frac{\text{Massa eksperimen}}{\text{massa teoritis}} \right) \times 100 \%$$

$$\% \text{ CV} = \left(\frac{\text{Simpangan baku}}{\text{rata-rata nilai}} \right) \times 100 \%$$

Suatu data pengukuran dianggap baik jika memiliki akurasi dan presisi yang baik. Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi metode titrasi kompleksometri pada penentuan ion Gd (III) dan ligan DTPA bebas dalam sediaan Gd-DTPA sehingga diperoleh kriteria-kriteria validasi yang meliputi akurasi, presisi, dan linieritas.

TATA KERJA

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan adalah *Gadolinium trichloride* (Strem Chemicals), *Dietilene triamine pentaaceticacid* (Sigma Aldrich), indikator *xyleneol orange* (Merck) dan larutan dapar asetat pH 5,8. Alat yang digunakan adalah timbangan Analitik (*Denver Instrument*), pH meter (Orion), *magnetic stirrer* (Cimarec), buret mikro (pyrex), labu ukur berbagai ukuran dan peralatan gelas pendukung lainnya dari pyrex.

Penentuan ion Gd (III) bebas

Penentuan ion Gd (III) bebas dilakukan dengan menggunakan metode titrasi kompleksometri. Pada kegiatan ini larutan GdCl_3 dititrasi dengan larutan DTPA. Indikator warna yang digunakan pada titrasi ini adalah zat warna *xyleneol*

orange. Volume larutan DTPA yang dipipet divariasikan antara 0,05 mL – 0,5 mL, sedangkan konsentrasi larutan DTPA-nya ditetapkan sebesar 0.0001 M. Larutan *xyleneol orange* dibuat dengan melarutkan 3 mg *xyleneol orange* dalam 10 mL dapar asetat pH 5,8 sehingga diperoleh larutan indikator dengan konsentrasi 0,3 mg/mL, yang selanjutnya dibagi dalam 10 vial dan disimpan dalam *deep freezer*. Hasil pengukuran yang diperoleh akan digunakan untuk perhitungan tingkat presisi, akurasi, dan linieritas. Analisis yang dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan nyata maka dilakukan uji t (*t-test*) dengan derajat kepercayaan P = 95 %.

Penentuan ligan DTPA bebas

Penentuan ligan DTPA bebas dilakukan dengan menggunakan prosedur yang sama dengan prosedur di atas namun pada kasus ini larutan DTPA dititrasi dengan larutan GdCl_3 dimana volume larutan DTPA yang dipipet divariasikan antara 0,01 mL – 0,5 mL sedangkan larutan GdCl_3 ditetapkan pada konsentrasi 0,001 M. Hasil pengukuran yang diperoleh akan digunakan untuk perhitungan tingkat presisi, akurasi, dan linieritas. Analisis yang dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan nyata maka dilakukan uji t (*t-test*) dengan derajat kepercayaan P = 95 %.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pelaksanaan validasi metode analisis (*assay*) menurut US Pharmacopea XXII [4] dapat dikelompokkan atas tiga kategori. Kategori pertama berkaitan dengan metode analisis untuk penentuan kuantitatif komponen utama obat dalam bentuk *bulk*. Kategori kedua berkenaan dengan penentuan pengotor (*impurities*) di dalam senyawa obat dalam

bentuk “*bulk*” dan kategori ketiga berkenaan dengan metode analitis untuk penentuan karakteristik kinerja, misalnya disolusi, pelepasan obat (*drug release*) dan lain-lain.

Ion Gd (III) yang sangat berbahaya dan kehadiran ligan DTPA bebas yang juga tidak diinginkan, membuat metode analitis penentuan ion Gd (III) dan ligan DTPA bebas termasuk dalam kategori kedua.

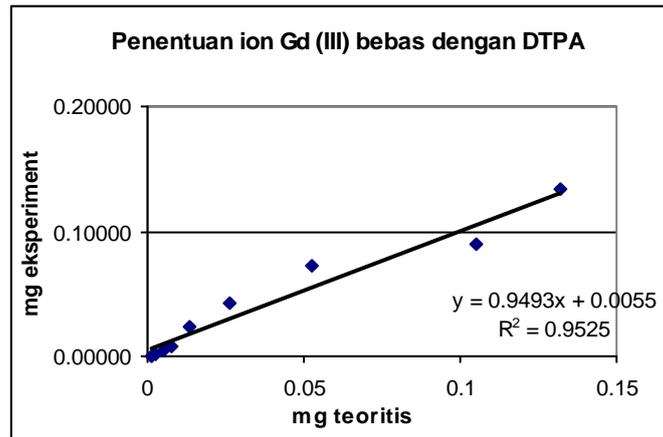
Hasil penentuan % *recovery*, standar deviasi (SD) dan kesalahan acak (%CV) pada kegiatan penentuan ion Gd(III) bebas dengan DTPA disajikan pada Tabel 1.

Suatu metode analisa dianggap valid jika memenuhi kriteria-kriteria seperti akurasi dan presisi yang baik. Data akurasi yang diamati didasarkan atas nilai % *recovery*. Dari percobaan titrasi Gd (III) dengan DTPA diperoleh % *recovery* yang berada pada rentang 30,33 %-183,59 %. Dari Tabel 1 dapat

dilihat bahwa % *recovery* semakin kecil dengan semakin kecilnya konsentrasi analit yang diperiksa. Hal ini bisa dikarenakan kesalahan paralaks dari individu yang melakukan analisa. Hal ini dapat diperbaiki dengan meningkatkan ketrampilan individu yang melakukan analisa tersebut. Uji linieritas dilakukan dalam upaya untuk mengamati akurasi suatu metoda analisis. Uji ini dilaksanakan dengan mengamati hubungan linier antara nilai Gd (III) yang sebenarnya dengan yang terukur. Dari grafik linieritas pada percobaan titrasi kompleksometri Gd (III) dengan DTPA menunjukkan hubungan linier yang baik ditandai dengan nilai koefisien korelasi $R^2 = 0,9525$ ($R=0,9760$). Hasil penentuan % *recovery*, standar deviasi (SD) dan kesalahan acak (% CV) pada kegiatan penentuan ligan DTPA bebas dengan Gd(III) disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. Hasil perhitungan penentuan Gd (III) dengan DTPA

No	N	mg Teoritis	mg Eksperimen	% <i>Recovery</i>	SD	%CV
1	10	0,1318	0,1340	101,69	0,0031	2,34
2	10	0,1054	0,0902	85,55	0,0022	2,42
3	10	0,0527	0,0718	136,28	0,0022	3,07
4	10	0,0264	0,0433	164,15	0,0049	11,43
5	10	0,0132	0,0242	183,59	0,0015	6,20
6	10	0,0079	0,0083	104,67	0,0008	10,09
7	10	0,0053	0,0048	91,67	0,0005	10,57
8	10	0,0026	0,0018	69,00	0,0002	10,37
9	10	0,0013	0,0004	30,33	0,0001	35,25

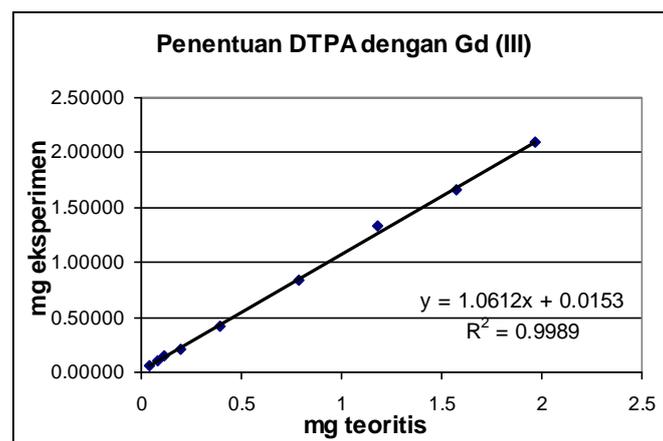


Gambar 2. Grafik linieritas penentuan ion Gd(III) bebas dengan DTPA

Tabel 2. Hasil perhitungan penentuan DTPA dengan Gd (III)

No	N	mg Teoritis	mg Eksperimen	% Recovery	SD	%CV
1	10	1,9668	2,0993	106,74	0,23	10,96
2	10	1,5734	1,6544	105,15	0,18	10,69
3	10	1,1800	1,3276	112,50	0,09	6,78
4	10	0,7837	0,8327	106,25	0,09	10,44
5	10	0,3933	0,4213	107,11	0,04	9,24
6	10	0,1967	0,2137	108,67	0,02	8,02
7	10	0,1180	0,1483	125,67	0,02	10,32
8	10	0,0787	0,1031	130,95	0,01	9,65
9	10	0,0393	0,0547	139,12	0,01	21,31

Dimana N = Jumlah pengulangan



Gambar 3. Grafik linieritas penentuan ligan DTPA bebas dengan Gd(III)

Pada percobaan penentuan DTPA dengan Gd (III) dengan metode analisa yang sama diperoleh % *recovery* yang berada pada rentang yang cukup baik yaitu antara 106,74 %-139,12 % dan linieritas yang baik dengan nilai koefisien korelasi $R^2 = 0,9989$ ($R = 0,9994$)

Untuk mengetahui apakah ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan antara nilai pengukuran dari metode titrasi kompleksometri dengan nilai kandungan sebenarnya maka dilakukan uji t (*t-test*) dengan derajat kepercayaan 95 % [7].

$$t = \frac{(\bar{y} - \sim) \sqrt{N}}{s}$$

dimana \bar{y} , \sim , N, dan s masing-masing adalah nilai rerata hasil analisis, nilai sebenarnya, jumlah perulangan analisis (*replication*), dan simpangan baku (standar deviasi). Nilai t dari hasil perhitungan kemudian dibandingkan dengan nilai t dari tabel dengan tingkat kepercayaan 95 %. Hasil analisa penentuan Gd (III) dengan DTPA memperlihatkan nilai t_{hitung} yang lebih kecil (-1,0153) dari t_{tabel} (2,31) untuk tingkat kepercayaan 95 %. Sedangkan percobaan penentuan DTPA dengan Gd (III) memperlihatkan nilai t_{hitung} yang lebih besar (-3,4596) dari t_{tabel} (2,31) untuk tingkat kepercayaan 95 %. Hal ini menunjukkan bahwa pada penentuan Gd (III) dengan DTPA menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata antara nilai kandungan Gd (III) hasil analisis atau eksperimen dengan nilai yang sebenarnya. Namun ada perbedaan yang nyata antara nilai DTPA analisa dengan nilai yang sebenarnya

Koefisien variasi (CV) sebagai ukuran presisi metode analisis memperlihatkan

kecenderungan yang bervariasi. Nilai % CV pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2. Hasil yang didapat menunjukkan adanya kesalahan acak (*random error*) yang bervariasi dari individu yang melakukan analisis yang ditunjukkan dengan % CV yang besar yaitu lebih dari 2 %. Suatu data dinilai memiliki presisi yang baik jika memiliki % CV kurang dari 2 %. Hal ini dikarenakan konsentrasi analit, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium sangat berpengaruh sehingga % CV cenderung meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisa.

Kegiatan penelitian ini berhubungan dengan faktor lingkungan yaitu temperatur. Proses sintesa atau pembuatan senyawa *contrast agent* Gd-DTPA dilakukan dengan proses refluks. Hal ini menandakan bahwa pembentukan Gd-DTPA tidak terjadi secara spontan sementara kegiatan validasi metode titrasi kompleksometri ini dilakukan pada suhu kamar sehingga hal ini menjadi kendala dalam kegiatan ini.

KESIMPULAN DAN SARAN

Pada metode analisis kadar ion Gd (III) dan ligan DTPA bebas ternyata tidak memenuhi persyaratan % *recovery*, akurasi dan presisi walaupun linearitas yang bagus dan dari uji t (*t-test*) diperoleh nilai yang nyata dan tak nyata. Dengan demikian metode analisa pada penelitian ini tidak dapat digunakan sebagai alternatif penentuan ion Gd (III) bebas dan ligan DTPA bebas dalam *contrast agent*.

DAFTAR PUSTAKA

1. **NOTOSISWOYO M., dkk,** Pemanfaatan *Magnetic Resonance Imaging* (MRI) sebagai sarana diagnosa pasien, Media Litbang Kesehatan Volume XIV Nomor 3, 2004.
2. **GUNAWAN A H., SUGIHARTO Y., MASKUR.,** Sintesis Gd-DTPA-Folat untuk MRI Contrast Agent dan Karakterisasinya. Menggunakan Perunut Radioaktif ^{153}Gd -DTPA-Folat. Jurnal Sains Materi Indonesia. Edisi Khusus Material untuk Kesehatan 2012, hal: 1-6. ISSN : 1411 – 1098.
3. **ALESANDRO B., GIANCARLO C., ELIANA G., FRANCO F.,** How To Determine Free Gd And Free Ligand In Solution Of Gd Chelates. A Technical Notes, Contrast Med. Mol. Imaging 1: 184-188. 2006.
4. **MUTALIB A., RAMLI M., HERLINA SARMINI E., SUHARMADI., BESARI C.,** Validasi Penentuan Sn (II) Di Dalam Kit Radiofarmaka, Jurnal Radioisotop dan Radiofarmaka, Vol 1, No 1, 1998.
5. **RAHMAT A H.,** Validasi Metode Pengujian, Pelatihan Validasi Metode Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka BATAN, Pusat Penelitian Sistem Mutu dan Teknologi Pengujian, LIPI:2009.
6. **RIYADI W.,** Validasi Metode Analisis.24-03-2009
7. **SOEDIGDO S ., SOEDIGDO P.,** Pengantar Cara Statistika Kimia, Penerbit ITB:1977.