

**KARAKTERISTIK FISIKO-KIMIA DAN BIOAFINITAS  $^{99m}\text{Tc}$ -GLUKOSA-6-FOSFAT  
TERHADAP JARINGAN TUMOR DALAM HEWAN MODEL**

**Nanny Kartini Oekar, Witri Nuraeni, Epy Isabela, Iswahyudi, Hendris Wongso,  
Isti Daruwati, A.Hanafiah Ws.**

Pusat Teknologi Nuklir Bahan dan Radiometri – BATAN  
Jl. Tamansari No. 71, Bandung, 40132  
e-mail : nanny@batan.go.id, nannykartini@gmail.com

Diterima:16-09-2013

Diterima dalam bentuk revisi: 30-10-2013

Disetujui: 12-12-2013

**ABSTRAK**

**KARAKTERISTIK FISIKO-KIMIA DAN BIOAFINITAS  $^{99m}\text{Tc}$ -GLUKOSA-6-FOSFAT TERHADAP JARINGAN TUMOR DALAM HEWAN MODEL.** Senyawa bertanda  $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat apabila disuntikkan ke dalam tubuh manusia akan terakumulasi di dalam jaringan atau organ yang tingkat metabolismenya relatif lebih cepat atau lebih tinggi seperti halnya sel-sel kanker atau tumor maligna dari pada organ atau jaringan lainnya yang normal, sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan dan *viabilitas* sel-sel maligna di dalam tubuh manusia. Telah dikembangkan metode baku preparasi kit-kering glukosa-6-fosfat yang akan menghasilkan kit-diagnostik yang memenuhi persyaratan. Karakteristik fisiko-kimia  $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat yang ditentukan meliputi kemurnian radiokimia menggunakan metode kromatografi kertas dan lapis tipis, lipofilisitas menggunakan metode partisi n-oktanol/air, besarnya ikatan dengan protein plasma ditentukan dengan metode pengendapan menggunakan larutan TCA 20 %, muatan listrik menggunakan metode elektroforesis kertas. Stabilitas sediaan baik berupa kit-kering maupun senyawa bertanda ditentukan dengan metode kromatografi. Adapun tingginya afinitas terhadap sel kanker dibuktikan dengan menyuntikkan senyawa tersebut ke dalam tubuh hewan model yang mempunyai jaringan tumor artifisial di dalam tubuhnya. Hasilnya menunjukkan bahwa kit kering glukosa-6-fosfat stabil sampai 20 minggu pada penyimpanan di lemari es ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), sedangkan senyawa bertanda  $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat stabil pada temperatur kamar sampai 2 jam setelah penandaan dengan kemurnian radiokimia yang diperoleh sebesar  $94,4 \pm 2,25\%$ . Radioaktivitas dari  $^{99m}\text{Tc}$ -perteknetat yang dapat ditambahkan ke dalam kit-kering tersebut sekitar 5-30 mCi dengan volume tidak lebih dari 3 mL. Senyawa bertanda  $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat mempunyai sifat hidrofilik dengan koefisien partisi octanol/air (P) sebesar  $1,09 \pm 0,45$  dan tingginya ikatan dengan protein plasma sebesar  $81,26 \pm 12,74\%$ . Rasio akumulasi pada jaringan tumor (target) terhadap jaringan normal (non-target) otot dan hati masing-masing sebesar 4 kali (400 %) pada 60 menit pasca injeksi (p.i) dan 2,5 kali (250%) pada 45 menit p.i. Diharapkan senyawa bertanda tersebut dapat mengsubstitusi kebutuhan akan  $^{18}\text{F}$ FDG-(*flouro dioxy glucose* bertanda F-18) bagi kedokteran nuklir yang tidak memiliki fasilitas cyclotron dan PET yang harganya sangat mahal, untuk dapat mendeteksi adanya tumor.

**Kata kunci :** Bioafinitas,  $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat, sel tumor artifisial, kit-diagnostik.

**ABSTRACT**

**PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTIQUES AND BIOAFFINITY OF  $^{99m}\text{Tc}$ -GLUCOSE-6-PHOSPHATE ON TUMOR TISSUES IN ANIMAL MODEL.**  $^{99m}\text{Tc}$ -glucose-6-phosphate when injected into the human body will be accumulated in the tissues or organ with metabolic rate is relatively faster or higher than in other organs or normal tissues as well as cancer cells or malignant tumor, so it can be used to detect the presence and viability of malignant cells in the human body. The standard methods of preparation glucose-6-phosphate dried-kit as ideally diagnostics kit has been carried out. Physico-chemical characteristics of  $^{99m}\text{Tc}$ -glucose-6-phosphate have been investigated, included radiochemical purity was

determined using the paper and thin-layer chromatography method, lipophilicity using the partitions octanol/water method, the protein-plasma binding was determined by precipitation method using a solution of 20% TCA and the electric charge using paper electrophoresis method. Stability of the preparation in the form of dried-kits and labeled compounds is also determined by chromatographic methods. Whereas the high affinity for cancer cells demonstrated by injecting the compound into the body of animals model that have artificially tumor tissue in the body. The results showed that dry kit glucose-6-phosphate is stable up to 20 weeks storage in the refrigerator (4°C), while labeled compound  $^{99m}\text{Tc}$ - glucose-6-phosphate is stable at room temperature up to 2 hours after labeling. Radiochemical purity obtained were  $94.4 \pm 2.25\%$ . Radioactivity of  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetate can be added to the dried-kit were 5-30 mCi with a maximum volume 3 mL.  $^{99m}\text{Tc}$ -glucose-6-phosphate was hydrophilic with partition coefficient octanol/water (P) of  $1.09 \pm 0.45$  and plasma protein binding of  $81.26 \pm 12.74\%$ . The ratio of accumulation in tumor tissues (target) to normal tissues (non-target) in muscle and liver were 4 times (400%) after 60 min post injection (p.i.) and 2.5 times (250%) after 45 min p.i. respectively. This labeled compound is expected to substitute of  $^{18}\text{F}$ FDG-(dioxo glucose labeled fluoro-18) for nuclear medicine no having cyclotron and PET facilities

**Keywords:** Bioaffinity,  $^{99m}\text{Tc}$ -glucose-6-phosphate, artificial tumor cells, diagnostic kit

## 1. PENDAHULUAN

Kedokteran nuklir di bidang onkologi mempunyai peran sebagai modalitas diagnostik, pemantauan dan penilaian respon terapi, serta terapi (radioterapi interna). Pemanfaatan pencitraan kedokteran nuklir dalam bidang onkologi sangat dipengaruhi oleh mekanisme penangkapan radiofarmaka yang digunakan pada suatu pemeriksaan. Sel-sel keganasan (maligna) mempunyai sifat yang unik yakni akan berkembang dengan sangat cepat melebihi perkembangan dari sel normal sekitarnya, sehingga terjadi peningkatan metabolisme yang signifikan). Kecepatan metabolisme sel-sel keganasan menyebabkan peningkatan konsumsi glukosa yang lebih tinggi, dan ini menjadi dasar penggunaan senyawa FDG (floro deoksi glukosa) bertanda radioaktif fluor-18 yang dihasilkan dari *cyclotron* dan pemeriksaannya menggunakan alat PET (*Positron Emision Tomography*) di kedokteran nuklir untuk mendeteksi lokasi dan derajat keganasan penyakit tersebut (1,2,3). Fasilitas PET di

Indonesia baru ada dua buah, dan keduanya berada di Jakarta.

Sementara itu, fasilitas kedokteran nuklir tersebar di seluruh daerah di Indonesia, khususnya di rumah sakit besar yang berada di daerah-daerah, kebutuhan akan PET sangat tidak mungkin untuk dipenuhi disebabkan karena harganya yang relatif mahal. Selain itu teknologi radiofarmasi untuk pembuatan  $^{18}\text{F}$ -FDG sangat tidak mungkin untuk dilakukan di rumah sakit tersebut. Keadaan ini menjadi suatu tantangan bagi para peneliti untuk berupaya agar kedokteran nuklir yang tidak mempunyai fasilitas PET dapat membantu penderita kanker untuk menentukan lokasi dan derajat keparahan dari penyakitnya (2). Berlatar belakang dari masalah kesehatan tersebut, dilakukan penelitian ini. Selama ini, kedokteran nuklir di Indonesia untuk melakukan diagnosis kanker menggunakan radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI (metoksi iso butil isonitrit) (4) dengan mekanisme akumulasi pada tumor yang berbeda dengan  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P. Kemudian dikembangkan oleh be-

berapa peneliti lain senyawa bertanda  $^{99m}\text{Tc}$ -minigastrin (5) dan  $^{99m}\text{Tc}$ -peptida (6).

Pembuatan senyawa bertanda  $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat telah berhasil diteliti dengan menunjukkan kualitas yang cukup memuaskan, dengan menandai senyawa glukosa-6-fosfat dengan radioaktif teknesium-99m melalui metode penandaan tidak langsung (7). Keberadaan senyawa ini pada awalnya dibutuhkan untuk mendeteksi kelainan yang ada pada kelenjar pineal (*pineal gland*) yang terletak di bawah otak kecil (*cerebellum*) pada manusia. Sel-sel kelenjar tersebut merupakan sel yang sangat aktif karena fungsi dari kelenjar ini sangat menentukan fungsi-fungsi organ atau sistem tubuh manusia (8). Sel yang sangat aktif akan membutuhkan keberadaan senyawa glukosa-6-fosfat di dalam sistemnya, sehingga jumlah glukosa-6-fosfat akan dibutuhkan jauh lebih tinggi dari pada sel organ lainnya. Kemiripan dalam hal kecepatan metabolisme dari kelenjar pineal dan sel-sel keganasan yang menjadikan dasar pemikiran untuk membuktikan apakah senyawa bertanda  $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat dapat digunakan untuk penatalaksanaan penyakit keganasan sebagai pengganti senyawa bertanda  $^{18}\text{F}$ FDG (1,3,7).

Dalam upaya menghasilkan suatu senyawa bertanda yang memenuhi persyaratan (9), dalam penelitian ini dilakukan formulasi kit-kering glukosa-6-fosfat yang ideal sehingga apabila dicampur dengan larutan  $^{99m}\text{Tc}$ -perteknetat memberikan senyawa bertanda  $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat dengan kualitas yang baik. Selain itu karakteristik fisiko-kimia dari  $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat yang diperoleh dan kestabilan dari

kit-kering pada penyimpanan juga dipelajari. Untuk membuktikan apakah senyawa bertanda ini dapat terakumulasi pada jaringan tumor, dilakukan percobaan dengan menyuntikkan sediaan tersebut pada hewan model yang telah mempunyai jaringan tumor pada tubuhnya karena sebelumnya telah diinduksi dengan senyawa yang bersifat karsinogenik yaitu DMBA (*7,12-dimethylbenz-[a]-anthracene*). Selanjutnya, seberapa besar akumulasinya pada jaringan tumor dan rasionya dibandingkan terhadap akumulasi pada jaringan atau organ normal dapat diketahui. Dari hasil yang diperoleh, diharapkan senyawa bertanda  $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat ini dapat mengsubstitusi kebutuhan  $^{18}\text{F}$ FDG- (*flouro dioxy glucose* bertanda F-18) yang produksinya membutuhkan keberadaan *cyclotron* dan pemeriksaannya di kedokteran nuklir membutuhkan fasilitas PET yang harganya sangat mahal.

## 2. BAHAN DAN PERALATAN

Bahan yang digunakan adalah glukosa-6-fosfat dan timah(II)diklorida dihidrat keduanya buatan Sigma, Natrium pirofosfat, HCl, NaOH, n-oktanol dan aseton semuanya buatan E.Merck. Aqua bidest steril proinjeksi, larutan NaCl fisiologis steril buatan IPHA Laboratory. Bahan yang bersifat karsinogenik yaitu DMBA (*7,12-dimethylbenz-[a]-anthracene*) buatan Sigma dan minyak jagung yang ada dipasaran. Pelat kromatografi TLC-SG buatan E.Merck, ITLC-SA buatan AGILEN dan kertas lakmus pH universal buatan E.Merck. Sebagai obat bius untuk hewan uji digunakan injeksi ketalar/ketamin buatan Schering Pharmaceutical.

Peralatan yang digunakan adalah timbangan analitis (Mettler), alat *Freeze dryer Freezone-6* (Labconco), alat pencacah saluran tunggal (Ortec), kalibrator dosis (Victoreen), alat elektroforesis kertas, oven listrik (Memmert), sentrifuga, pengaduk vortex dan seperangkat alat kromatografi kertas menaik.

Hewan uji adalah tikus (*Ratus norvergicus*) galur *Sprague Dowley*, alat penatah hewan/animal scanner LB.2723 (Dunnschicht-Berthold), alat untuk memberikan obat ke tikus lewat oral (*sonde*) dan seperangkat alat bedah hewan. Persetujuan Etik (*Ethical approval*) untuk penelitian ini mengacu pada dokumen No. 002/KEPPHP-BATAN/VIII/2012 tanggal 10 Agustus 2012 yang dikeluarkan oleh Komisi Penggunaan dan Pemeliharaan Hewan Percobaan (KEPPHP) BATAN.

### 3. TATA KERJA

#### 3.1 Preparasi kit-kering glukosa-6-fosfat (G-6-P)

Kit-kering glukosa-6-fosfat dibuat dengan komposisi terbaik (7) yaitu berisi glukosa-6-fosfat sebagai ligan utama sebanyak 8 mg,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  sebagai reduktor sebanyak 0,6 – 0,9 mg yang diikat dengan Na-pirofosfat dengan perbandingan 1 : 25 kali (g/g) yang dikemas dalam satu buah vial larutan suntik. Kit-kering tersebut dibuat secara aseptis di ruang steril kemudian dikeringkan dengan cara liofilisasi menggunakan alat *freeze dryer* (Labconco). Kit-kering yang sudah jadi ditentukan karakteristik fisiko-kimianya dan disimpan di temperatur 4°C (lemari es).

#### 3.2. Karakterisasi fisiko-kimia senyawa bertanda $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat

##### 3.2.1. Penentuan kemurnian radiokimia $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat

Kemurnian radiokimia dari sediaan  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -G-6-P yang dihasilkan dari kit-kering tersebut ditentukan dengan metode kromatografi lapis tipis menaik. Sebanyak 1 mL larutan  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat dengan aktivitas sekitar 1-5 mCi. yang diperoleh dari generator radioisotop  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$  dimasukkan ke dalam kit-kering glukosa-6-fosfat, kemudian campuran dikocok dengan pengaduk vortex sampai tercampur dan terlarut sempurna. Vial yang berisi campuran tersebut dipanaskan di penangas air mendidih selama 10 menit, kemudian didinginkan dan sekitar 1-2  $\mu\text{L}$  sediaannya ditotolkan pada pelat kromatografi ITLC-SA (1x10 cm) dan TLC-SG (1x10 cm) yang sebelumnya sudah dikeringkan di oven dengan suhu 80°C. Pelat tersebut kemudian dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang berisi pelarut yang berbeda. Pelat ITLC-SA dikembangkan dengan pelarut air untuk memisahkan pengotor radiokimia  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tereduksi bebas sedangkan TLC-SG dalam pelarut aseton kering untuk memisahkan pengotor radiokimia  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat bebas. Setelah kromatografi selesai, pelat dikeringkan dan tiap cm dipotong dan masing-masing potongan dicacah dengan alat pencacah saluran tunggal. Kemurnian radiokimia senyawa bertanda  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat dapat dihitung dari hasil kromatografi tersebut.

### 3.2.2. Penentuan sterilitas kit-kering glukosa-6-fosfat

Senyawa bertanda  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P yang dihasilkan dari kit kering glukosa-6-fosfat ditujukan untuk disuntikkan ke manusia (pasien), karena itu sediaan tersebut harus steril. Kit-kering glukosa-6-fosfat ditentukan sterilitasnya sesuai dengan metode yang dianjurkan oleh IAEA (9), menggunakan 3 macam media yaitu thioglikolat cair dalam tabung reaksi ( $\Phi$ :1,2 x 15 cm) untuk bakteri aerob maupun bakteri anaerob dan media *Sabouraud Glucose Agar* (SGA) dan Nutrien Agar padat (NA) dalam cawan petri ( $\Phi$  8-10 cm) untuk bakteri dan kapang/fungi. Media yang sudah dicampur dengan sediaan dari kit-kering yang telah direkonstruksi dengan NaCl fisiologis steril diinkubasi di temperatur tertentu. Penentuan sterilitas dari fungi dilakukan pada temperatur kamar sedangkan sterilitas dari bakteri dalam inkubator pada temperatur 37 °C. Sediaan harus steril tidak boleh mengandung mikroba baik berupa bakteri atau pun fungi (kapang).

### 3.2.3. Penentuan lipofilisitas sediaan $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat

Sebanyak 100 uL sediaan  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P dimasukkan ke dalam tabung reaksi polietilen ( $\Phi$ :0,8 x 10 cm) yang telah berisi 1 mL n-oktanol dan 1 mL larutan NaCl 0,9 % pH 7,4. Campuran tersebut di aduk dengan pengaduk vortex kuat-kuat selama kurang lebih 5 menit dan diukur radioaktivitasnya dengan alat kalibrator dosis. Setelah itu campuran tersebut di sentrifuga selama 15 menit pada 6000 rpm, dan fase n-oktanol dipisahkan dari fase air/NaCl. Masing - masing fase diambil cuplikannya sebanyak 4

uL dan ditotolkan ke kertas saring Whatman 3MM (1x1 cm), dikeringkan dan kemudian dicacah dengan alat pencacah saluran tunggal. Fase air ditambah lagi dengan 1 mL n-oktanol dan perlakuan seperti di atas diulang kembali. Setelah itu diambil sejumlah tertentu fase n-oktanol di cuci dengan larutan NaCl 0,9 % pH 7,4 dengan volume yang sama, aduk dan sentrifuga sampai kedua fase tadi terpisah sempurna, setelah itu kedua fase tersebut dicacah seperti percobaan sebelumnya. Perlakuan ini diulang beberapa kali sampai besarnya cacahan dari kedua fase tersebut relatif konstan.

### 3.2.4. Penentuan besarnya ikatan $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat dengan protein plasma

Sebanyak 100 uL sediaan  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P dimasukkan ke dalam tabung reaksi polietilen ( $\Phi$ :0,8 x 10 cm) yang telah berisi 1 mL serum darah manusia, aduk dengan pengaduk vortex dan radioaktivitasnya diukur dengan alat kalibrator dosis. Setelah itu campuran tersebut diinkubasi dalam inkubator pada 37 °C selama 30 menit. Selanjutnya ke dalam tabung tersebut ditambahkan 1 mL larutan 20 % trikloroasetat (TCA), aduk dengan pengaduk vortex dan akhirnya disentrifuga untuk memisahkan endapan protein plasma dan supernatannya. Endapan ditambahi 1 mL larutan NaCl 0,9% pH 7,4, aduk kuat, kemudian disentrifuga, fase endapan dan fase supernatan dipisahkan. Fase supernatan dicampurkan, sebanyak 0,5 mL larutan TCA 20 % ditambahkan ke dalamnya, diaduk dan disentrifuga, kemudian fase endapan dan supernatan dipisahkan. Setelah pemisahan

sempurna, masing-masing fase diukur radioaktivitasnya dengan alat kalibrator dosis. Dengan mengetahui besarnya radioaktivitas kedua fase tersebut, besarnya ikatan protein plasma dari  $^{99m}\text{Tc-G-6-P}$  dapat dihitung.

### 3.2.5. Penentuan muatan listrik sediaan $^{99m}\text{Tc-glukosa-6-fosfat}$

Kertas Whatman 1 ( 1 x 40 cm) disiapkan tiap cm-nya ditandai dengan pensil dan diberi nomor dari mulai -20 dari satu sisi sampai +20 ke sisi lainnya. Setelah itu kertas tersebut diletakkan dialat elektroforesis dengan menggunakan dapar fosfat 0,05 M pH 7,0 sebagai larutan elektrolitnya. Kertas tersebut dibasahi dengan larutan elektrolit dan sediaan  $^{99m}\text{Tc-G-6-P}$  yang diperoleh dari kit-kering ditotolkan ke kertas tersebut pada titik-0 (ditengan-tengah). Kemudian listrik dialirkan dari anoda ke katoda pada tegangan listrik 350 V selama 1 jam. Setelah waktu 1 jam selesai, alat dimatikan dan kertas dikeringkan kemudian setiap cm dipotong dan dicacah dengan alat pencacah saluran tunggal. Muatan listrik dari sediaan  $^{99m}\text{Tc-G-6-P}$  dapat diketahui dengan melihat besarnya cacahan dan arah migrasi radioaktivitas pada elektrogram tersebut.

### 3.2.6. Penentuan stabilitas sediaan $^{99m}\text{Tc-glukosa-6-fosfat}$

Stabilitas sediaan  $^{99m}\text{Tc-G-6-P}$  pada penyimpanan di temperatur ruang setelah proses penandaan dan stabilitas kit kering G-6-P pada penyimpanan di lemari es ( $4^{\circ}\text{C}$ ) setelah proses pembuatan ditentukan

dengan melihat kemurnian radiokimianya. Sedangkan penentuan stabilitas kit-kering selain dilihat kemurnian radiokimianya, juga diamati perubahan warna, bau dan kevakuman dari kit-kering tersebut pada waktu-waktu tertentu mulai 0, 1, 12, 17, 18 dan 22 minggu setelah disimpan di lemari es. Sediaan  $^{99m}\text{Tc-G-6-P}$  setelah ditandai dengan  $^{99m}\text{Tc}$  menggunakan radioaktivitas yang berbeda yaitu aktivitas rendah < 10 mCi dan yang tinggi > 25 mCi di simpan di temperatur ruang dan pada waktu-waktu tertentu yaitu 0, 1, 2, 3, 4 dan 5 jam, kemurnian radiokimianya ditentukan dengan metode kromatografi seperti telah dijelaskan pada subbab 3.2.1.

## 3.3. Analisis pendahuluan afinitas $^{99m}\text{Tc-glukosa-6-fosfat}$ terhadap sel kanker

### 3.3.1. Penyiapan hewan uji (10).

Hewan uji sebagai model yang digunakan adalah tikus galur *Sprague Dowley* (SD) yang dikembangkan di laboratorium Biodinamika PTNBR, BATAN, Bandung. Sekelompok tikus SD betina, terdiri dari 10 ekor berumur 5 minggu diinduksi dengan bahan karsinogenik DMBA (*7,12-dimethylbenz-[a]-anthracene*) secara oral. Dosis DMBA yang diberikan setiap minggu sebesar 0,04 g/g BB dalam bentuk larutan dalam minyak jagung (10). Induksi dilakukan selama 10 minggu, hewan dipelihara sebaik-baiknya diruang isolasi dengan memberikan makanan dan minuman yang cukup. Setiap minggu berat dari hewan tersebut ditimbang, pertumbuhan tumor pada tubuhnya diamati. Apabila ada hewan uji yang terdeteksi telah tumbuh

tumor yaitu terlihat atau teraba ada benjolan di tubuhnya, hewan tersebut kemudian digunakan sebagai model pada percobaan selanjutnya untuk analisis afinitas  $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat terhadap jaringan/sel tumor.

### 3.3.2. Percobaan pendahuluan bioafinitas $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P terhadap jaringan tumor.

Hewan uji yang terdeteksi telah tumbuh tumor pada tubuhnya, dibius dahulu menggunakan ketamin dengan dosis yang sesuai agar hewan tersebut pingsan tetapi tidak mati. Kemudian sediaan  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P dengan dosis 1,6 mCi/mL disuntikkan melalui vena ekornya, dan segera tikus tersebut diletakkan di atas meja alat *animal scanner* untuk melihat akumulasi radioaktif pada tubuhnya. Proses penatahan (*scanning*) tubuh tikus ini mengambil waktu sekitar 30 menit, kemudian pada 60 menit dan 180 menit dihitung setelah penyuntikan penatahan hewan diulangi kembali. Gambar penatahan menghasilkan kesimpulan di daerah atau organ mana pada hewan tersebut terjadi akumulasi radioaktivitas.

### 3.3.3. Percobaan pendahuluan bioakumulasi $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P pada hewan model bertumor

Lima ekor hewan model yang telah bertumor disuntik dengan  $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat melalui vena ekor, dan masing-masing hewan disimpan untuk waktu tertentu, mulai pada 15, 30, 45, 60 dan 90 menit. Pada setiap interval waktu tersebut hewan dibius sampai mati, kemudian dibedah dan jaringan tumor (target) dan organ lainnya (non-target) yakni otot, paru, darah, tulang dan hati di ambil cuplikannya dan di cacah dengan alat pencacah saluran tunggal. Dari tingginya cacahan dapat dihitung besarnya akumulasi radioaktivitas per gram organ, dan dapat dibandingkan untuk memperoleh nilai rasio akumulasi target/non-target.

## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Kit glukosa-6-fosfat seperti yang digambarkan pada Gambar 1 telah berhasil dibuat dalam bentuk kering dengan cara liofilisasi menggunakan alat *freeze dryer*.



Gambar 1. Kit-kering glukosa-6-fosfat yang steril  
Berisi : 8 mg glukosa-6-fosfat, 0,6-0,9 mg  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dan 12-18 mg Na-pirofosfat

Apabila ke dalam kit tersebut ditambahkan larutan steril  $^{99m}\text{Tc}$ -perteknetat, akan terbentuk sediaan  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P yang diharapkan mempunyai karakteristik fisiko-kimia serta karakteristik biologis yang baik dan ideal untuk sediaan radiofarmasi.

Senyawa bertanda  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P diperoleh dengan menambahkan larutan  $^{99m}\text{Tc}$ -perteknetat steril dari generator radioisotop  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$ , ke dalam kit-kering glukosa-6-fosfat dan setelah direaksikan pada temperatur air mendidih selama 10 menit, kemurnian radiokimianya ditentukan dengan metode kromatografi. Kemurnian radiokimia (KRK) dihitung dengan rumus [1]. Radiofarmaka yang baik mempunyai KRK > 90%.

$$\text{KRK } ^{99m}\text{Tc-G-6-P} = \left\{ 100\% - \left( \frac{^{99m}\text{Tc-tereduksi}}{^{99m}\text{Tc-04}} \right) \right\} [1]$$

Dari sembilan percobaan, diperoleh kemurnian radiokimia  $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat adalah  $94,4 \pm 2,25\%$  dengan pengotor radiokimia baik berupa  $^{99m}\text{Tc}$ -perteknetat dan  $^{99m}\text{Tc}$ -tereduksi kurang dari 10 %.

Persyaratan sediaan yang akan disuntikkan ke dalam tubuh (sediaan parenteral) harus steril. Sehingga semua radiofarmaka yang dibuat harus ditentukan sterilitasnya. Apabila setelah masa inkubasi (7 hari) ada koloni mikroba yang tumbuh di salah satu media, penentuan sterilitas harus diulang dengan jumlah sampel dua kali lebih banyak dari yang pertama. Apabila hasilnya masih menunjukkan adanya mikroba yang tumbuh, maka kit-kering yang sudah dibuat tersebut harus dibuang dan pembuatan kit-kering harus diulang kembali. Tetapi apabila setelah 7 hari tidak menunjukkan adanya

mikroba yang tumbuh, maka pengamatan dilanjutkan sampai 14 hari. Sesudah waktu tersebut, apabila disemua media tidak ada mikroba yang tumbuh, dapat dipastikan bahwa kit-kering tersebut dalam keadaan steril (9). Pada penentuan kesterilan kit-kering glukosa-6-fosfat yang dibuat, setelah seluruh media diinkubasi selama 7 hari kemudian dilanjutkan sampai 14 hari, hasilnya menunjukkan tidak ada mikroba yang tumbuh disemua media yang digunakan, maka dapat disimpulkan bahwa kit-kering glukosa-6-fosfat tersebut dalam keadaan steril.

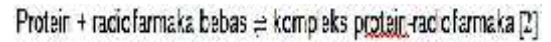
Karakteristik fisiko-kimia selanjutnya yang diteliti dari  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P adalah nilai lipofilisitas dengan cara menentukan besarnya koefisien partisi radiofarmaka tersebut dalam pelarut nonpolar dan polar, yang dinyatakan dengan  $\log P_{\text{Oct}/\text{Air}}$ . Penentuan koefisien partisi ( $P_{\text{Oc}/\text{Air}}$ ) suatu radiofarmaka adalah penting untuk mengetahui cara kerja atau untuk mengetahui akumulasi radiofarmaka apabila telah dimasukkan ke dalam tubuh. Senyawa yang mempunyai  $P_{\text{Oc}/\text{Air}}$  tinggi artinya bersifat lipofilik dan sangat mudah untuk terlarut dalam lemak dan akan mudah menembus lapisan lipid. Sebaliknya yang mempunyai nilai  $P_{\text{Oc}/\text{Air}}$  rendah artinya bersifat hidrofilik akan sangat mudah diekskresikan melalui ginjal. Hal ini akan mempengaruhi sifat biologisnya seperti toksisitas dan juga akan menentukan efek radiasi terhadap tubuh (11). Hasil yang diperoleh dari 5 kali pengulangan menunjukkan bahwa  $P_{\text{Oc}/\text{Air}}$  senyawa bertanda  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P adalah  $1,09 \pm 0,45$ , hal ini membuktikan bahwa sediaan tersebut bersifat hidrofilik. Dengan demikian



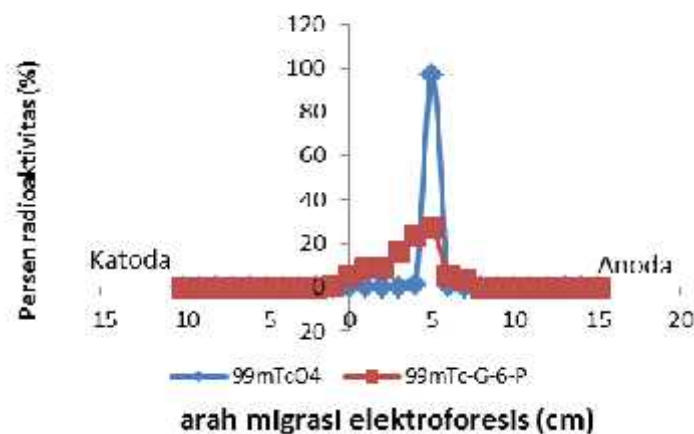
akan mudah diekskresikan ke ginjal tetapi akan sulit untuk menembus lapisan lipid seperti halnya sawar darah otak. Dengan sifat lipofilisitas dari radiofarmaka seperti tersebut, diharapkan bahwa senyawa bertanda ini tidak bersifat toksik dan efek radiasinya terhadap organ tubuh lainnya relatif rendah karena akan cepat diekskresikan keluar tubuh melalui ginjal.

Karakteristik fisiko-kimia yang tidak kalah pentingnya adalah besarnya ikatan antara  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P dengan protein plasma darah, dan besar kecilnya ikatan ini akan mempengaruhi keefisienan penggunaan obat tersebut. Derajat ikatan protein plasma yang rendah, menyebabkan senyawa tersebut akan lebih mudah menembus atau berdifusi me-nembus membran sel. Protein yang umum terkandung dalam plasma adalah albumin, lipoprotein, glikoprotein,  $\alpha$ ,  $\beta$  dan  $\gamma$  globulin, dan yang paling utama terikat dengan albumin. Dari 5 kali pengulangan senyawa bertanda  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P mempunyai derajat ikatan dengan protein plasma sebesar  $81,26 \pm 12,74\%$ . Pada umumnya obat-obatan berada dalam darah dengan 2 macam bentuk yaitu terikat dan

bebas (*unbound form*), dan kedua bentuk ini berada dalam kesetimbangan kimia dengan ikatan yang umumnya bersifat *reversible* seperti tertera pada persamaan [2].



Bentuk bebas akan menunjukkan efek farmakologi, tetapi juga merupakan fraksi yang mudah dimetabolisme atau diekskresi. Sebaliknya bentuk kompleks dengan protein plasma dapat merupakan persediaan (*resevoir*) yang secara berangsur-angsur akan dilepaskan kembali menjadi bentuk bebas sesuai dengan tinggi-rendahnya kadar bentuk bebas yang berada dalam darah setelah mengalami metabolisme dan ekskresi. Hal ini akan mempengaruhi lamanya waktu paruh biologis (*biological half-life*) dari radio-farmaka tersebut (12). Dengan melihat tingginya ikatan protein plasma dari  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P diharapkan senyawa bertanda tersebut mempunyai waktu paruh biologis yang optimal sehingga kadarnya dalam sel kanker optimal juga sehingga memberikan waktu yang cukup untuk melakukan pencitraan kanker dengan kamera gamma di kedokteran nuklir (1,2).

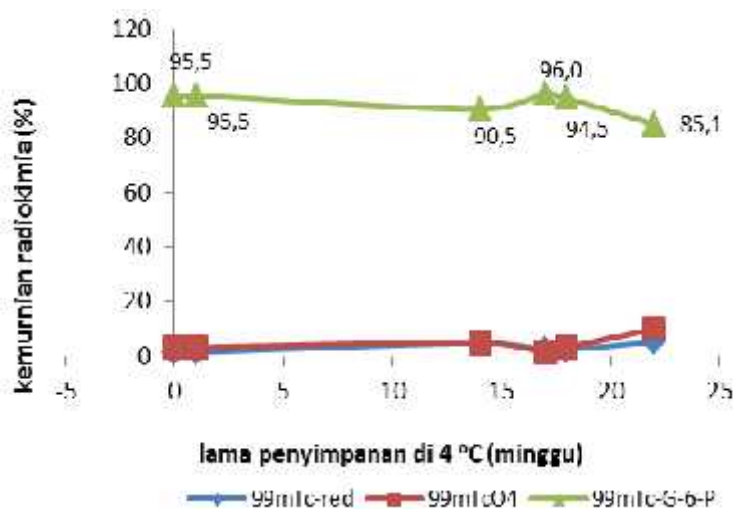


Gambar 2. Elektrogram  $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat dan  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetat

Jenis muatan listrik dari obat-obatan termasuk radiofarmaka penting pula ditentukan, sehingga diketahui apakah radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P bermuatan listrik, negatif, positif atau netral. Elektroforesis kertas adalah metode yang sangat umum dan terpilih untuk menentukan muatan listrik suatu senyawa bertanda. Kecepatan elektro-migrasi dari suatu senyawa sangat tergantung kepada muatan listriknya. Senyawa yang mempunyai muatan negatif akan bergerak ke arah anoda dan sebaliknya yang mempunyai muatan positif bergerak ke arah katoda, sedangkan yang bermuatan netral akan tinggal dititik nol (tengah-tengah) (13). Senyawa bertanda  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P setelah dielektro-foresis ternyata mempunyai muatan listrik negatif karena bergerak ke arah anoda dengan jarak dan pola migrasi agak berbeda dari  $^{99m}\text{Tc}$ -perteknetat yang migrasinya lebih cepat seperti digambarkan pada Gambar 2. Hal ini disebabkan karena  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  berupa ion negatif yang molekulnya relatif kecil dibandingkan dengan  $^{99m}\text{Tc}$ -

G-6-P yang juga bermuatan negatif tetapi bentuk dan ukuran molekulnya lebih kompleks dan besar.

Kit kering radiofarmaka atau juga dikenal dengan istilah *cold kits* (9) adalah sediaan yang mengandung ligan utama dalam hal ini glukosa-6-fosfat dan bahan lain yang jenis dan jumlahnya tertentu sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya (7) yang dikemas terpisah dari radionuklida penandanya ( $^{99m}\text{Tc}$ ) dan dikeringkan dengan cara liofilisasi. Proses liofilisasi atau *freeze drying* adalah proses mengeringkan material melalui sublimasi, yaitu perubahan langsung dari fase beku ke fase uap tanpa melalui fase cair. Metode ini sangat umum digunakan dalam pengeringan kit radiofarmaka untuk mendukung kestabilannya (13). Kit-kering glukosa-6-fosfat setelah dikeringkan dan disimpan dalam lemari es, dan pada waktu-waktu tertentu bentuk, penampilan dan kemurnian radiokimianya diamati.



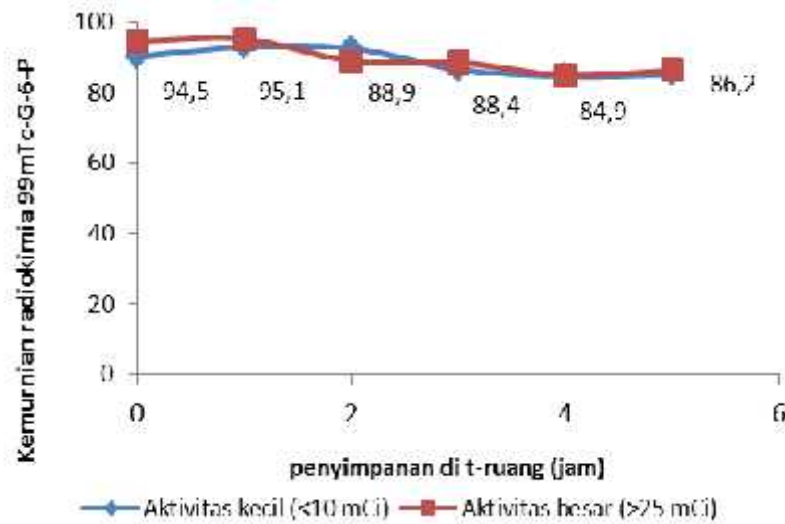
Gambar 3. Stabilitas Kit-kering G-6-P pada penyimpanan di lemari es.

Dari hasil yang diperoleh ternyata sampai dengan 20 minggu (5 bulan) penampilannya masih baik ditunjukkan dengan warnanya yang masih bagus, penampilannya tidak berubah dan kit masih vakum. Setelah kit tersebut ditandai dengan teknesium-99m masih memberikan kemurnian radiokimia > 90%. Berbeda halnya setelah disimpan selama 22 minggu, kemurnian radiokimianya hanya mencapai 85 % (Gambar 3). Dari hasil percobaan ini dapat disimpulkan bahwa kit-kering glukosa-6-fosfat masih stabil sampai 20 minggu apabila disimpan di lemari es.

Tingginya radioaktivitas <sup>99m</sup>Tc-perteknetat yang digunakan untuk me-

nandai kit-kering glukosa-6-fosfat tersebut ternyata tidak mempengaruhi kestabilan radiofarmaka <sup>99m</sup>Tc-G-6-P yang dibentuk. Seperti terlihat pada Gambar 4, bahwa stabilitas radio-farmaka tersebut pada temperatur ruang, menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antara pemakaian <sup>99m</sup>Tc-perteknetat dengan aktivitas lebih kecil dari 10 mCi dan aktivitas lebih besar dari 25 mCi, masih sekitar 2 jam dengan KRK masih diatas 90%, kemudian turun sampai sekitar 88 % pada 3 jam selanjutnya.

Hasil evaluasi karakteristik fisiko kimia dari senyawa bertanda <sup>99m</sup>Tc-glukosa-6-fosfat dan kit-kering glukosa-6-fosfat dapat disimpulkan seperti tertera pada Tabel 1.



Gambar 4. Perbandingan stabilitas <sup>99m</sup>Tc-G-6-P di t-ruang dengan perbedaan radioaktivitas teknesium-99m

Tabel 1. Karakteristik fisiko-kimia kit-kering G-6-P dan radiofarmaka <sup>99m</sup>Tc-G-6-P

Karakteristik fisiko-kimia	Glukosa-6-fosfat
Stabilitas kit-kering G-6-P	20 minggu (5 bulan) penampilannya masih baik
Sterilitas	Steril (Tekdok IAEA No. 466)
Stabilitas sediaan <sup>99m</sup> Tc-G-6-P disimpan di temperatur ruang	Stabil sampai 2 jam
Lipofilisitas (P <sub>oct/Air</sub> )	1,09 ± 0,45 (hidrofilik)
Ikatan Protein Plasma (%)	81,26 ± 12,74 %
Muatan listrik	negatif

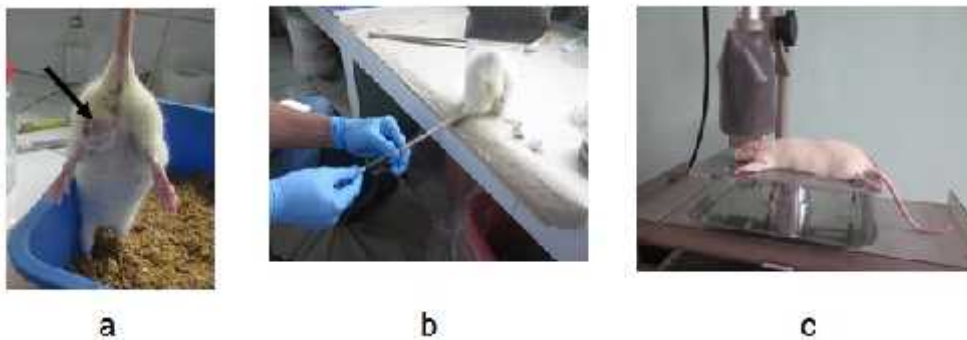
Sejauh ini, belum ada hasil riset dari peneliti lain yang menggunakan metode penandaan yang sama dengan metode yang digunakan pada penelitian ini untuk memperoleh senyawa bertanda  $^{99m}\text{Tc-G-6-P}$ .

Kajian awal evaluasi biologis untuk mengetahui afinitas sediaan  $^{99m}\text{Tc-G-6-P}$  terhadap hewan uji tikus *Sprague Dowley* yang telah diinduksi dengan DMBA dan telah tumbuh tumor pada tubuhnya, diperlihatkan pada Gambar 5.

Penatahan menggunakan alat *Animal Scanner* dengan variasi waktu pasca injeksi

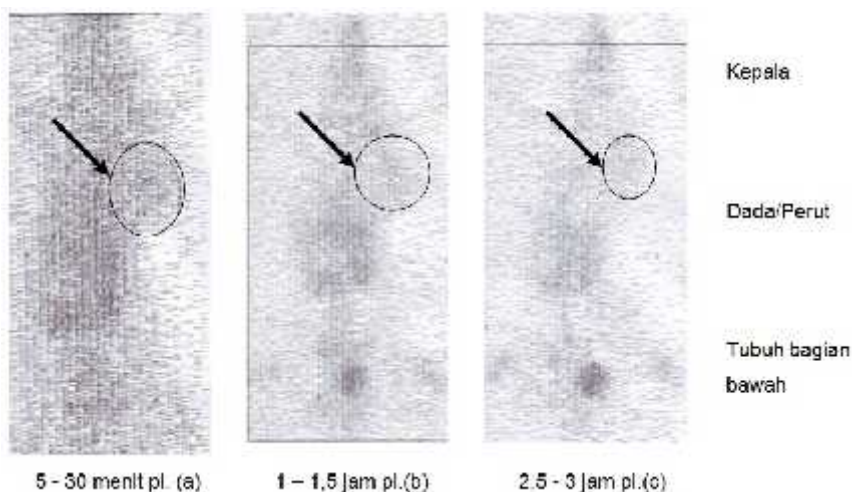
dari 5 menit sampai dengan 3 jam, hasilnya dapat dilihat pada Gambar 6. Satu kali proses penatahan membutuhkan waktu sekitar 30 menit.

Pada Gambar 6.a terlihat bahwa radioaktivitas pada 5 sampai 30 menit pasca injeksi (p.i) secara cepat didistribusikan ke seluruh tubuh, termasuk ke jaringan tumor (yang ditunjuk tanda panah). Kemudian pada jam-jam berikutnya dimulai 1 sampai 3 jam pasca injeksi, akumulasi radioaktivitas makin turun ditunjukkan dengan gambaran yang makin kabur (Gambar 6.b dan 6.c).

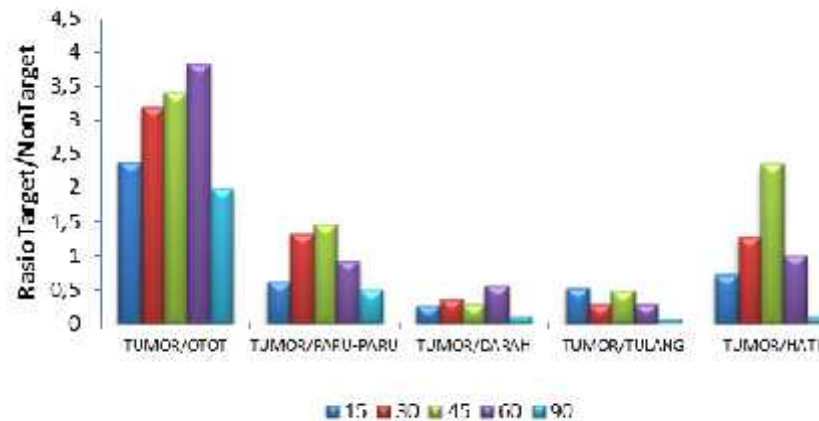


Gambar 5. Proses penatahan hewan uji bertumor setelah disuntik  $^{99m}\text{Tc-G-6-P}$

Keterangan : (a). Hewan SD bertumor ditunjukkan dengan panah hitam  
 (b). Proses penyuntikan sediaan  $^{99m}\text{Tc-G-6-P}$  melalui vena ekor  
 (c). Proses penatahan dengan alat *Animal Scanner*



Gambar 6. Gambaran hasil penatahan hewan uji SD setelah disuntik satu mL sediaan  $^{99m}\text{Tc-G-6-P}$  dengan aktivitas 1,6 mCi. Panah hitam : menunjukkan uptake radioaktivitas pada jaringan tumor



Gambar 7. Rasio Akumulasi  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-F dalam target (tumor) dengan non-target (organ lain)

Tetapi hal ini sejalan juga dengan penurunan pada organ-organ lainnya, kecuali di kandung kemih yang menunjukkan akumulasi radioaktivitas lebih tinggi, dan hal ini membuktikan bahwa ekskresi terbanyak sediaan  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P melalui ginjal.

Gambaran biodistribusi sediaan  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P dalam tubuh hewan uji menggunakan alat *animal scanner* yang tersedia di PTNBR menghasilkan gambaran yang kurang baik, karena alat yang sudah tua (tahun 1970-an). Untuk itu diperlukan data biodistribusi tambahan yang dilakukan dengan cara menyuntik hewan uji dengan  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P, kemudian interval waktu tertentu yaitu 15, 30, 45, 60 dan 90 menit pasca injeksi hewan tersebut dibedah, dan tiap organ diukur radio-aktivitasnya. Dengan demikian persen akumulasi  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P pada organ-organ tertentu dapat diketahui. Supaya datanya lebih akurat dihitung rasio akumulasi dalam organ target yaitu jaringan tumor dibandingkan dengan organ normal seperti otot, paru-paru, darah, tulang dan hati. Hasilnya seperti terlihat pada Gambar 7

yang menunjukkan bahwa akumulasi  $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat pada jaringan tumor relatif lebih tinggi dari pada jaringan normal dengan waktu yang berbeda-beda. Misalnya, apa-bila dibandingkan antara tumor dan otot, yang tertinggi adalah pada 60 menit pasca injeksi dengan rasio sebesar 3,9 (hampir 400 % lebih tinggi). Tetapi apabila dibandingkan dengan hati, maka akumulasi yang tertinggi pada tumor dibandingkan dengan sel hati yaitu pada 45 menit pasca injeksi, sebesar 2,5 kalinya (250%). Reberio, dkk. melakukan biodistribusi terhadap kelinci normal dan fokus penelitiannya adalah di daerah kepala (*pineal gland*) (8).

## 5. KESIMPULAN

Sediaan glukosa-6-fosfat telah berhasil diformulasi dalam bentuk kit-kering berupa vial tunggal, kering, steril dan apabila disimpan dalam lemari es (4 °C), stabil sampai dengan 20 minggu atau 5 bulan. Kestabilan dilihat dari penampilan, warna, bau dan kevakuman kit-kering tersebut.

Kit-kering tersebut setelah ditandai dengan  $^{99m}\text{Tc}$ -perteknetat menghasilkan

sediaan  $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat yang mempunyai kemurnian radiokimia  $94,4 \pm 2,25\%$  dan bertahan sampai 2 jam apabila disimpan di temperatur kamar. Senyawa bertanda  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P mempunyai sifat hidrofilik, ikatan dengan protein plasma sebesar  $81,26 \pm 12,74\%$  dan bermuatan listrik negatif.

$^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat mempunyai afinitas yang cukup tinggi terhadap sel kanker artifisial di dalam hewan model tikus *Sprague Dowley* (SD) pada 5-30 menit pertama pasca injeksi. Rasio akumulasi pada target-non target yang tertinggi adalah rasio antara tumor dan otot hampir 4 kalinya (400%) pada 60 menit pasca injeksi, sedangkan dengan hati 2,5 kali (250%) pada 45 menit pasca injeksi.

Dengan sifat fisiko-kimia seperti tersebut di atas, diharapkan sediaan  $^{99m}\text{Tc}$ -G-6-P dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan dan viabilitas sel kanker di kedokteran nuklir.

## 6. DAFTAR PUSTAKA

1. Hidayat B. *Peran Kedokteran Nuklir di Bidang Onkologi*, Kongres Nasional Persatuan Kedokteran Nuklir Indonesia VI dan Persatuan Kedokteran dan Biologi Nuklir Indonesia VIII, Bandung, 4-6 Desember 2008.
2. Kowalsky RJ, Falen SW. *Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine*, 2<sup>nd</sup> Ed., American Pharmacist Association, 2004; 472-3.
3. Chung JK, *FDG PET in Lung Cancer*, Kongres Nasional Persatuan Kedokteran Nuklir Indonesia V dan Persatuan Kedokteran dan Biologi Nuklir Indonesia VII, Jakarta, 10-11 Desember 2004.
4. Lee MC, *The role of nuclear medicine in the diagnosis and therapy of brain tumor*, Kongres Nasional Persatuan Kedokteran Nuklir Indonesia V dan Persatuan Kedokteran dan Biologi Nuklir Indonesia VII, Jakarta, 10-11 Desember 2004.
5. Shanthly N, Aruva MR, Zhang K, Cardi CA, Xiobing T, Wickstrom E, Thakur ML, *Imaging oncogene mRNA for early diagnosis of cancer*, Trends in Radiopharmaceuticals (ISTR-2005), Proceedings of an International Symposium, Vienna, 14-18 Nov. 2005; 113-47.
6. Ferro-Flores G, Artega de Murphy C, Ramirez DMF, Pedraza-Lopez M, Rodrigues-Cortes J, Melendez-Alafort L. *Preparation and Evaluation of Third Generation Technetium-99m Radiopharmaceuticals*. Trends in Radiopharmaceuticals (ISTR-2005), Proceeding on an International Symposium, Vienna, 14-15 Nov. 2005; 55-63.
7. Kartini NO, Susilawati E, Isabela I. *Pengembangan Senyawa Bertanda  $^{99m}\text{Tc}$ -glukosa-6-fosfat untuk Pencitraan Kelenjar Pineal*. Jurnal Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia 2003 Agustus ;1(IV):11-26.
8. Rebiro MJ, Santos AC, De Lima JJP. *Labelling of the Pineal Gland with  $^{99m}\text{Tc}$ -glucose-6-phosphate*. Modern Trend in Radiopharmaceuticals for Diagnosis and Therapy, IAEA-TEKDOC 1029, Austria, 1998; 221-5.
9. IAEA. *Sterility Testing*, Technical Reports Series No. 466, Technetium-99m

- Radiopharmaceuticals: manufacture of Kits, IAEA, Vienna Austria, 2008; 3-4; 173-7.
10. Fakultas Farmasi UGM. Cancer Chemoprevention Research Centre: Uji *Antikarsinogenesis in Vivo*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada; 2009.
11. Nogrady T. *Kelarutan dan koefisien partisi* dalam buku Kimia Medisinal: Pendekatan secara biokimia edisi kedua. Bandung: Penerbit ITB; 1992; 6-8.
12. Wikipedia. *Plasma Protein Binding*, diunduh tanggal 31 Desember 2012 dari [http://en.wikipedia.org/wiki/plasma\\_protein\\_binding](http://en.wikipedia.org/wiki/plasma_protein_binding).
13. Decristoforo C, Zolle I. *Quality Control Methods of  $^{99m}\text{Tc}$ -Radiopharmaceuticals* in Technetium-99m Pharmaceuticals. Berlin-Heidelberg: Springer; 2007; 97, 124-53, 143.
14. Saha GB. *PET radiopharmaceuticals* in Fundamentals of Nuclear Pharmacy. Cleveland, USA: Springer; 2003; 144-5.

