

**PENGEMBANGAN SENYAWA BERTANDA ^{99m}Tc -ETAMBUTOL UNTUK DIAGNOSIS TUBERKULOSIS :
2. KARAKTERISASI FISIKO-KIMIA DAN MIKROBIOLOGIS**

Nanny Kartini Oekar, Kustiwa, E. Susilawati
Pusat Teknologi Nuklir Bahan dan Radiometri – BATAN

ABSTRAK

PENGEMBANGAN SENYAWA BERTANDA ^{99m}Tc -ETAMBUTOL UNTUK DIAGNOSIS TUBERKULOSIS: 2. KARAKTERISASI FISIKO-KIMIA DAN MIKROBIOLOGIS. Penyakit tuberkulosis (TBC) disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang dapat menyerang berbagai bagian tubuh seperti antara lain paru-paru (sangat umum), kulit, tulang, kelenjar getah bening, kelenjar tiroid, dan saluran urogenital. Senyawa bertanda ^{99m}Tc -etambutol yang telah berhasil diteliti penandaannya pada tahun 2004 merupakan senyawa berbentuk kompleks khelat dengan radionuklida ^{99m}Tc sebagai inti logamnya. Senyawa tersebut diharapkan dapat digunakan untuk tujuan diagnosis penyakit TBC dengan teknik nuklir di bidang kedokteran, terutama untuk TBC yang letaknya jauh di dalam tubuh manusia dan tidak terjangkau dengan metode konvensional. Sebelum senyawa bertanda ^{99m}Tc -etambutol digunakan untuk tujuan diagnosis, senyawa tersebut harus memenuhi persyaratan radiofarmaka yang baik, sehingga perlu dilakukan karakterisasi. Hasilnya menunjukkan bahwa senyawa bertanda ^{99m}Tc -etambutol mempunyai karakteristik fisiko kimia sebagai berikut : pH adalah 6,0 - 6,5; kemurnian radiokimia $93,7 \pm 1,3 \%$, nilai P_{oct} yang menunjukkan besaran lipofilisitas adalah $0,023 \pm 0,015$, ikatan dengan protein plasma sebesar $61,12 \pm 0,02 \%$ dan bermuatan listrik negatif. Terjadinya perubahan struktur molekul etambutol setelah menjadi ^{99m}Tc -etambutol tidak mempengaruhi afinitas bakterial dan daya bakterisidanya terhadap *Mycobacterium*. Adanya penurunan afinitas bakterial yang nyata dari ^{99m}Tc -etambutol terhadap bakteri *M. bovisis* yang hidup dan mati menunjukkan kespesifikan radiofarmaka ini untuk mendeteksi penyakit TBC yang masih aktif.

Kata kunci : radiofarmaka, ^{99m}Tc -etambutol, diagnosis, tuberkulosis.

ABSTRACT

THE DEVELOPMENT OF ^{99m}Tc -ETHAMBUTOL LABELLED COMPOUND FOR TUBERCULOSIS DIAGNOSIS: 2. PHYSICO-CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION. Tuberculosis (TBC) disease is caused by *Mycobacterium tuberculosis* which can attack the various part of the body, such as lung (very common), skin, bone, lymph gland, thyroid gland and urogenital tract. The ^{99m}Tc -ethambutol compound which have been succeeded labelled in 2004 was a chelat complex compound with radionuclide ^{99m}Tc as its metal core. The ^{99m}Tc -ethambutol was expected can be used for diagnosis of TBC desease in nuclear medicine, especially for deep seated TBC infection in human body and out of reach with conventional diagnosis method. Before ^{99m}Tc -ethambutol is used for the diagnosis purpose, the compound have to fulfill the criteria of the good radiopharmaceutical. Therefore, the characterization of this compound have to be conducted. The result indicated the ^{99m}Tc -ethambutol had physico-chemical characteristic as follows : the pH of 6,0 – 6,5, radiochemical purity of $93,7 \pm 1,3 \%$, the value of P_{oct} for liphofilicity was $0,023 \pm 0,015$, plasma protein binding of $61,12 \pm 0,02 \%$ and had the negative electric charge. The alteration of ethambutol to ^{99m}Tc -ethambutol did not influence either the

bereaksi membentuk senyawa kompleks ^{99m}Tc -etambutol yang biasanya berbentuk kompleks khelat dengan ^{99m}Tc sebagai inti logamnya (3,4). Sebelum digunakan bagi kebutuhan manusia, senyawa bertanda ^{99m}Tc -etambutol harus memenuhi persyaratan radiofarmaka yang baik (3,4). Untuk itu perlu dilakukan karakterisasi senyawa ^{99m}Tc -etambutol baik secara fisiko-kimia maupun mikrobiologis. Pada penelitian ini dipelajari sifat-sifat fisiko-kimia dan afinitas mikrobiologis dari senyawa bertanda ^{99m}Tc -etambutol. Data yang diperoleh digunakan sebagai pendukung dalam menentukan apakah senyawa bertanda tersebut telah memenuhi persyaratan suatu radiofarmaka yang ideal.

BAHAN DAN PERALATAN

Bahan yang digunakan adalah senyawa bertanda ^{99m}Tc -etambutol hasil penelitian terdahulu (3), larutan NaCl fisiologis steril dan *aqua bidest* steril (IPHA), oktanol (E.Merck), bakteri *Mycobacterium tuberculosis (M.tb.) strain H37RV* (patogen), *Mycobacterium bovisis*, media perbenihan *Lowenstein-Jensen* yang sesuai untuk bakteri TBC, eter dan alkohol teknis (Brataco), penyaring steril (Millipore 0,22 μm), kertas pH universal (E.Merck), serum darah manusia dan lain-lain.

Alat yang digunakan adalah inkubator (Heureus), *dose calibrator* (Victoreen), *shaker incubator* (Karl Kolb) jarum suntik *disposable* (Terumo), alat pengering (*hair dryer*), pengaduk vortex, botol MC.Carney, parel gelas, otoklaf, sentrifuga, timbangan analitis (Metler), tabung reaksi steril ukuran 25 mL, masker, ose, pembakar spiritus, peralatan untuk menyiapkan media perbenihan, *laminar air flow* (Koy Pharma), pipet ependorf berbagai ukuran dan lain-lain.

TATA KERJA

Penyiapan senyawa bertanda ^{99m}Tc -etambutol

Radiofarmaka ^{99m}Tc -etambutol disiapkan dengan cara mencampurkan sediaan etambutol-HCl dengan larutan radionuklida Na^{99m}Tc -perteknetat ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$), sehingga terjadi reaksi penandaan etambutol dengan radionuklida ^{99m}Tc .

Reaksi penandaan dilakukan pada temperatur kamar melalui reaksi tidak langsung dengan menggunakan reduktor $\text{Sn}^{(II)}\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 400 μg yang berikatan dengan pirofosfat dalam perbandingan 1 : 25 (mol/mol). Setelah larutan ini dicampur dengan etambutol sebanyak 3,5 mg dan manitol 5 mg, yang dilarutkan dalam air untuk injeksi, kemudian ditambah dengan larutan ^{99m}Tc -perteknetat

supernatan dan endapan dipisahkan. Ke dalam supernatan ditambahkan lagi larutan TCA 5 % sebanyak 1 mL. Proses pengendapan dan pemisahan diulang kembali seperti percobaan di atas. Fraksi endapan dicuci dengan 1 mL larutan NaCl fisiologis dengan mengocoknya memakai pengaduk vortex, kemudian disentrifuga dan endapan dipisahkan dari supernatan. Masing-masing fraksi dicacah dengan alat pencacah saluran tunggal. Besarnya ikatan dengan protein plasma dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ ikatan protein plasma} = \frac{\text{Cacahan endapan}}{\text{Cacahan (endapan + supernatan)}} \times 100\%$$

Penentuan muatan listrik

Muatan listrik dari senyawa bertanda ^{99m}Tc -etambutol ditentukan dengan metode elektroforesis kertas menggunakan kertas Whatman 1 ukuran 25 x 1 cm sebagai fase diam dan sebagai larutan elektrolit adalah dapar fosfat 0,05 N pH 7. Setelah sediaan ^{99m}Tc -etambutol ditotolkan di atas kertas, kemudian arus listrik dialirkan dengan perbedaan tegangan listrik antara katoda dan anoda sebesar 375 V selama 1 jam. Setelah itu kertas diangkat dan dikeringkan, kemudian dipotong-potong tiap cm dan setiap potongan kertas dicacah dengan pencacah saluran tunggal.

Karakterisasi mikrobiologis ^{99m}Tc -etambutol

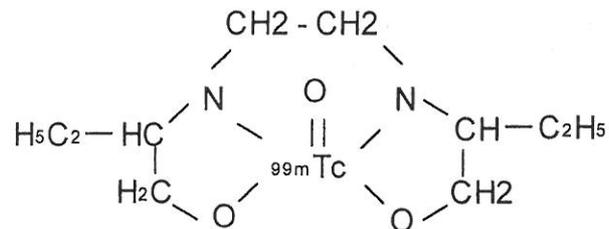
Penentuan afinitas bakterial

Sebanyak 5 ose ($\phi = 2\text{mm}$) *Mycobacterium bovis* disuspensikan dalam NaCl fisiologis sampai homogen dan volume diatur menjadi 6 mL. Radiofarmaka ^{99m}Tc -etambutol disiapkan dengan konsentrasi radioaktif 5 mCi/1,2 mL, untuk pembandingan disiapkan pula larutan ^{99m}Tc -perteknetat dengan konsentrasi radioaktif yang sama.

Ke dalam 6 buah tabung reaksi bertutup rapat, masing-masing dimasukkan 0,2 mL radiofarmaka ^{99m}Tc -etambutol, kemudian ditambahkan 2,3 mL larutan NaCl fisiologis dan 0,5 mL suspensi bakteri *M. bovis*. Seluruh tabung diinkubasi pada 37 °C sambil diaduk. Setelah 1, 2, 3, 4 dan 5 jam inkubasi, setiap tabung disentrifugasi, supernatan dipisahkan dan endapan dicuci dengan 0,5 mL larutan NaCl fisiologis, kemudian masing-masing fase endapan dan supernatan dicacah. Persentase *uptake* dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Afinitas bakterial (\%)} = \frac{\text{Cacahan endapan}}{\text{Cacahan (endapan + supernatan)}} \times 100\%$$

bakteri, sehingga pembentukan dinding sel bakteri terhambat. Setelah mengalami proses penandaan dengan radionuklida teknesium-99m, senyawa bertanda yang terbentuk diduga mempunyai struktur molekul seperti tertera pada Gambar 1. Reaksi antara etambutol dengan radioisotop ^{99m}Tc terbentuk melalui pembentukan kompleks organo-logam, dimana ion ^{99m}Tc merupakan inti logamnya (2).



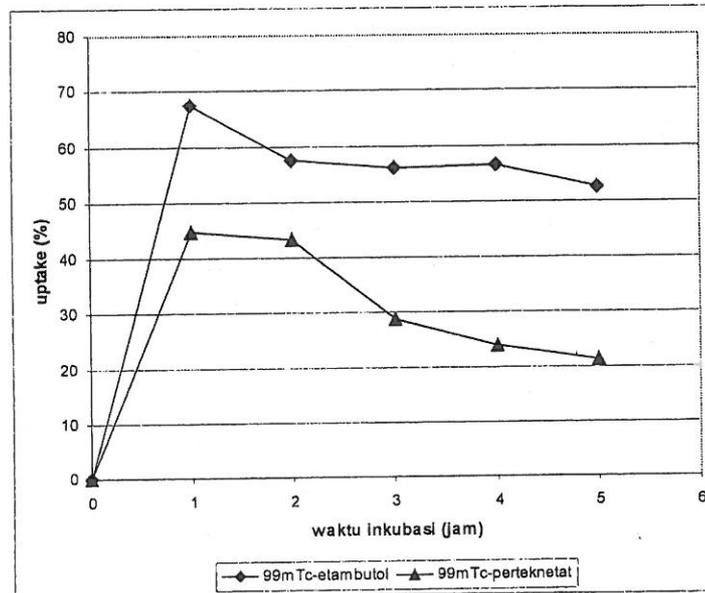
Gambar 1. Struktur molekul senyawa bertanda ^{99m}Tc -etambutol (2).

Senyawa bertanda ^{99m}Tc -etambutol dibuat dengan tujuan agar dapat digunakan sebagai radiofarmaka untuk melakukan sidik infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Suatu radiofarmaka yang akan digunakan untuk tujuan diagnosis di dalam tubuh, harus terakumulasi dengan baik pada organ atau tempat yang akan disidik dengan rentang waktu yang optimal sehingga dapat dilakukan proses pencitraan. Untuk memenuhi persyaratan bagi suatu radiofarmaka yang baik, maka perlu dilakukan karakterisasi terhadap senyawa bertanda tersebut sehingga sifat-sifatnya dapat diketahui.

Suatu sediaan radiofarmasi harus mempunyai pH yang optimal. Pada kondisi ini selain terjadi penandaan yang maksimal juga sediaan ini harus tidak terlalu mempengaruhi pH darah manusia (7,4) pada saat disuntikkan secara *intra vena*. Dari hasil percobaan terlihat pada Tabel 1 bahwa ^{99m}Tc -etambutol mempunyai pH antara 6,0 – 6,5.

Sifat yang utama harus ditentukan adalah kemurnian radiokimianya, karena suatu radiofarmaka yang baik harus mempunyai kemurnian radiokimia lebih besar dari 90 %. Verma, dkk.(7) memberikan batasan bagi radiofarmaka ^{99m}Tc -etambutol yang dibuat dengan formulanya hanya mempunyai kemurnian radiokimia 85 %. Dengan menggunakan dua macam sistem kromatografi yaitu: yang pertama menggunakan kertas Whatman 31ET dan pelarut asetonitril 50 % diperoleh pengotor radiokimia berupa senyawa ^{99m}Tc -tereduksi bebas yang tidak berikatan dengan ligan (etambutol). Sistem yang kedua menggunakan fase diam ITLC-SG dengan pelarut aseton dimana

berangsur-angsur menurun, tetapi dengan derajat penurunan yang tidak drastis, karena setelah 5 jam inkubasi, masih diperoleh nilai *uptake* sebesar 53 %. Daya afinitas bakterial ^{99m}Tc -perteknetat terhadap *M. bovisis* lebih rendah dari ^{99m}Tc -etambutol yaitu hanya 45 %, kemudian menurun dengan cepat pada 2 jam inkubasi, sehingga setelah 5 jam hanya tinggal 20 % (Gambar 2).



Gambar 2. Gambaran afinitas bakterial ^{99m}Tc -etambutol dan ^{99m}Tc -perteknetat terhadap *Mycobacterium bovisis*

Afinitas bakterial radiofarmaka ^{99m}Tc -etambutol ini terhadap *M.bovisis* yang masih hidup dan yang telah dimatikan dengan pemanasan (*heat killed bacteria*) dibandingkan, dan hasilnya dapat dilihat pada Gambar 3.

Pada Gambar 3 terlihat ada perbedaan yang berarti antara *uptake* ^{99m}Tc -etambutol oleh bakteri yang hidup dan yang mati. Hal ini menunjukkan bahwa radiofarmaka tersebut sangat spesifik untuk bakteri *M.bovisis* yang hidup, dan tidak untuk yang telah mati, yaitu pada satu jam pertama sebesar 67% untuk yang hidup dan hanya 10 % untuk yang mati. *Uptake* ^{99m}Tc -etambutol kemudian menurun secara proporsional dengan bertambahnya waktu inkubasi, sehingga pada 24 jam nilainya menjadi sebesar 23,2 % untuk bakteri yang hidup dan hanya 1,1 % oleh bakteri yang mati. Hasil ini sangat bermanfaat bagi para praktisi medis, karena dapat membedakan antara penyakit TBC yang masih aktif dengan yang tidak aktif dari hasil pencitraan pasien dengan kamera gamma, setelah penyuntikkan radiofarmaka ^{99m}Tc -etambutol.

(tidak bertanda ^{99m}Tc). Hal ini memberikan kesimpulan bahwa reaksi penandaan tidak mempengaruhi *active-site* dimana reaksi antara etambutol dengan asam mikolat pada dinding sel bakteri terjadi, sehingga inhibisi pembentukan dinding sel bakteri tetap berlangsung. Selain itu dari percobaan ini pun terlihat bahwa radiofarmaka ^{99m}Tc -etambutol, memberikan daya bakterisida yang optimal, tetapi pada saat dilakukan pengenceran sebesar 5 kali saja daya bakterisida tersebut telah turun sampai 50 %.

KESIMPULAN

Penandaan etambutol dengan radionuklida teknesium-99m menghasilkan suatu senyawa bertanda ^{99m}Tc -etambutol yang mempunyai karakteristik fisiko-kimia sebagai berikut : pH sediaan 6,0 – 6,5, kemurnian radiokimia $93,7 \pm 1,3$ %, nilai P_{oct} yang menunjukkan besaran lipofilisitas adalah $0,023 \pm 0,015$, ikatan dengan protein plasma sebesar $61,12 \pm 0,02$ % dan bermuatan listrik negatif.

Perubahan struktur molekul etambutol setelah menjadi ^{99m}Tc -etambutol tidak mempengaruhi afinitas bakterial dan daya bakterisidanya terhadap bakteri *Mycobacterium*. Terjadi perbedaan afinitas bakterial yang berarti dari ^{99m}Tc -etambutol terhadap *Mycobacterium bovis* yang hidup dengan yang dimatikan dengan cara pemanasan (*heat killed bacteria*), dan perbedaan ini makin besar dengan bertambahnya waktu inkubasi, yaitu dari 6 : 1 pada 1 jam pertama, menjadi 20 : 1 pada 24 jam kemudian.

Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa karakteristik fisiko-kimia senyawa bertanda ^{99m}Tc -etambutol sudah cukup baik, tetapi untuk memastikan apakah dapat digunakan di bidang kedokteran nuklir sebagai radiofarmaka penyidik infeksi TBC dengan baik dan aman, harus didukung oleh hasil uji preklinis pada hewan dan uji klinis pada volunter.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih yang sebesar-besarnya kami ucapkan kepada Saudari Yetti Suryati dari Kelompok Biodinamika dan Biosintesis, Bidang Senyawa Bertanda dan Radiometri yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Harinanto G, Ngili Y. Kuman tuberculosa yang kian resisten. Harian Pikiran Rakyat 2003 November 20: 24.