

UJI PRAKLINIS ^{99m}Tc -KANAMISIN SEBAGAI RADIOFARMAKA UNTUK PENCITRAAN INFEKSI

lim Halimah¹, Ahmad Ridwan², Mukh Syaifudin³

¹ Pusat Sains dan Teknologi Nuklir Terapan - BATAN,
Jl. Tamansari 71 Bandung, 40132

² Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Jl. Ganesha 10 Bandung, 40132

³ Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi - BATAN,
Jl. Lebak Bulus Raya - Pasar Jumat, Jakarta Selatan Kotak Pos 7043 JKSKL
E-mail: iimhalimah@batan.go.id

Diterima: 11-06-2014

Diterima dalam bentuk revisi: 28-08-2014

Disetujui: 25-09-2014

ABSTRAK

UJI PRAKLINIS ^{99m}Tc -KANAMISIN SEBAGAI RADIOFARMAKA UNTUK PENCITRAAN INFEKSI. ^{99m}Tc -kanamisin merupakan salah satu radiofarmaka yang digunakan untuk mendiagnosis infeksi hingga ke bagian tubuh yang sangat dalam. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan informasi mengenai karakteristik praklinis ^{99m}Tc -kanamisin meliputi toksisitas, sterilitas, pirogenitas, dan biodistribusi. Uji toksisitas dilakukan pada 5 ekor mencit yang diinjeksi ^{99m}Tc -kanamisin secara intra vena ekor, dilanjutkan dengan pengamatan sampai dengan 24 jam setelah injeksi. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ^{99m}Tc -kanamisin tidak bersifat toksik. Uji sterilitas dengan metode inokulasi ^{99m}Tc -kanamisin secara langsung pada medium nutrient agar dan tioglikolat cair menunjukkan bahwa ^{99m}Tc -kanamisin bersifat steril. Uji pirogenitas pada 3 ekor kelinci yang diinjeksi ^{99m}Tc -kanamisin secara intra vena pada telinga menunjukkan bahwa suhu total respon sebesar 2,9 °C, yang berarti ^{99m}Tc -kanamisin belum bebas pirogen. Biodistribusi ^{99m}Tc -kanamisin dilakukan pada mencit yang tidak diinfeksi dan yang diinfeksi dengan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara intramuskular pada 24 jam sebelum injeksi ^{99m}Tc -kanamisin. Beberapa sampel organ dan jaringan mencit diambil pada interval waktu 30, 60, dan 180 menit pasca injeksi ^{99m}Tc -kanamisin secara intravena melalui ekor mencit, menunjukkan bahwa ^{99m}Tc -kanamisin terakumulasi di dalam organ target yaitu otot paha kiri. Nilai rasio otot paha kiri terhadap otot paha kanan yang diperoleh sebesar 3,63 dan 5,64, masing-masing untuk *E. coli* dan *S. aureus*. Radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin bersifat tidak toksik, steril, mengandung pirogen, terdistribusi di dalam tubuh mencit dengan baik, dan diekskresikan secara cepat dari dalam tubuh mencit melalui ginjal mulai 30 menit pasca injeksi, baik pada mencit yang diinfeksi bakteri maupun mencit yang tidak diinfeksi bakteri.

Kata kunci : biodistribusi, infeksi, pirogenitas, sterilitas, ^{99m}Tc -kanamisin, toksisitas

ABSTRACT

^{99m}Tc -KANAMYCIN PRECLINICAL TESTING AS A RADIOPHARMACEUTICAL FOR INFECTION IMAGING. Infectious disease is the leading cause of death in worldwide, especially in developing countries such as Indonesia. Early detection and determination of the exact location of infection by imaging methods can facilitate treatment. ^{99m}Tc -kanamycin is one of the radiopharmaceuticals that widely used for such purpose. The aim of the study was to obtain the information on the preclinical characteristics of ^{99m}Tc -kanamycin including toxicity, sterility, pyrogenicity, and biodistribution. Toxicity test conducted in 5 mice injected radiopharmaceutical ^{99m}Tc -kanamycin intra venous tail, showed that the radiopharmaceutical was not toxic for 24 hours after intravenous injection. Sterility testing of radiopharmaceutical ^{99m}Tc -kanamycin conducted with direct inoculation on Nutrient Agar and liquid Thioglicolat medium showed that the radiopharmaceutical was sterile. Pyrogenicity test conducted in 3 rabbits injected with the radiopharmaceutical ^{99m}Tc -kanamycin showed that the total temperature response was 2.9°C, that means that the radiopharmaceutical was not free from pyrogen. Biodistribution of ^{99m}Tc -

kanamycin at intervals of 30, 60, and 180 minutes post intravenously injection through the tail of mice, infected with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* intramuscularly 24 hours earlier, showed that ^{99m}Tc -kanamycin accumulates in the target organ of the left thigh muscle. The ratio values of left to right thigh muscle were 3.63 and 5.64 for *E. coli* and *S. aureus*, respectively. Radiopharmaceutical ^{99m}Tc -kanamycin was not toxic, sterile, pyrogen, distributed in the body of mice, and were rapidly excreted from the body through the kidneys starting 30 minutes post injection, both in bacterials infected or without bacterials infected mice.

Keywords : biodistribution, infection, pyrogenicity, sterility, ^{99m}Tc -kanamycin, toxicity

1. PENDAHULUAN

Berbagai macam radiofarmaka untuk pencitraan inflamasi telah dikembangkan, diantaranya leukosit bertanda ^{111}In dan ^{99m}Tc , *human polyclonal IgG* bertanda ^{111}In dan ^{99m}Tc , ^{67}Ga -sitrak, ^{99m}Tc -nanokoloid, dan ^{18}F -*fluorodeoxyglucose*. Penggunaan radiofarmaka tersebut dapat mendeteksi adanya inflamasi, namun tidak dapat membedakan antara inflamasi yang disebabkan oleh adanya infeksi dan inflamasi yang tidak disebabkan oleh infeksi.

Dalam perkembangan terakhir, diagnosis infeksi dengan metode pencitraan dilakukan dengan antibiotik bertanda radioaktif. Penggunaan antibiotik dalam metode pencitraan didasarkan pada sifat antibiotik yang dapat berikatan dengan mikroorganisme (1). Antibiotik digunakan sebagai pembawa zat radioaktif ke bagian tubuh yang terinfeksi. Dosisnya yang sangat kecil tidak menyebabkan kematian mikroorganisme, melainkan hanya diambil dan dimetabolisme oleh mikroorganisme sehingga keberadaan antibiotik bertanda radioaktif dapat dideteksi oleh kamera gamma (2,3).

Setiap obat-obatan perlu memenuhi uji keamanan penggunaannya secara praklinis. Radiofarmaka, seperti halnya obat-obatan, sebelum diaplikasikan pada pasien harus memenuhi beberapa persyaratan me-

liputi sifat fisik, kimia, dan biologi, yaitu kejernihan larutan, kemurnian radiokimia, sterilitas, pirogenitas, dan biodistribusi pada hewan uji. Hal tersebut bertujuan agar hal-hal yang merugikan pasien pada saat uji klinis dapat diminimalisasi (4,5).

Penggunaan kanamisin sebagai antibiotik yang dapat ditandai dengan radionuklida ^{99m}Tc didasarkan pada strukturnya yang memiliki beberapa gugus fungsi, seperti $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, dan $-\text{O}-$, sehingga mudah berikatan dengan ^{99m}Tc . Selain itu, proses penandaan kanamisin dengan ^{99m}Tc lebih sederhana dibandingkan dengan antibiotika lain, lebih cepat, efisien, dan tidak memerlukan *bifunctional chelating agents* (6).

Penelitian radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin pernah dilakukan oleh Roohi dkk. (6) hasilnya memperlihatkan akumulasi yang tinggi pada 4 jam setelah injeksi radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin di paha tikus yang diinfeksi dengan bakteri *Staphylococcus aureus*. Namun demikian, belum diketahui biodistribusi ^{99m}Tc -kanamisin selama interval waktu 4 jam setelah penyuntikan dan pada infeksi bakteri selain *S. aureus* seperti *Escherichia coli*. Oleh karena itu dalam penelitian ini akan dilakukan uji biodistribusi ^{99m}Tc -kanamisin dengan interval waktu kurang dari 4 jam setelah injeksi radiofarmaka pada dua infeksi bakteri, yaitu *E.*

coli dan *S. aureus*. Modifikasi interval waktu bertujuan untuk melihat apakah radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin terakumulasi tinggi pada interval waktu di bawah 4 jam, yaitu 30, 60, dan 180 menit. Sementara penggunaan dua jenis bakteri bertujuan untuk melihat apakah ada perbedaan dalam *uptake* radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin oleh kedua bakteri tersebut. Dengan demikian dapat diketahui waktu terbaik untuk mendapatkan kualitas pencitraan yang optimal.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin yang memenuhi persyaratan untuk digunakan secara klinis. Hasil akhir yang diharapkan dari penelitian ini adalah radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin bersifat tidak toksik, steril, tidak pirogen, serta terakumulasi di dalam organ target hewan uji dan cepat diekskresikan dari dalam tubuh.

2. TATA KERJA

2.1 Bahan dan peralatan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah radionuklida ^{99m}Tc dalam bentuk larutan $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ yang diperoleh dari generator $^{99}\text{Mo} - ^{99m}\text{Tc}$ (PT. BATAN Teknologi, Serpong) dan kanamisin sulfat (Meiji). Bahan lainnya adalah NaCl fisiologis dan aquabidest steril pro-injeksi produksi (IPHA Laboratories), alkohol 70%, minyak nabati, medium nutrient agar (Oxoid), dan tioglikolat cair (Merck).

Bahan lain yang menunjang penelitian ini adalah bakteri dan hewan percobaan. Bakteri tersebut adalah *Staphylococcus aureus* (*wild-type*) dan *Escherichia coli* (*wild-type*), yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Sekolah Ilmu dan Teknologi

Hayati Institut Teknologi Bandung (SITH ITB). Dua jenis hewan percobaan yang digunakan adalah mencit putih (*Mus musculus*) *strain* Swiss dan kelinci putih New Zealand White. Mencit putih yang digunakan untuk uji toksisitas dan biodistribusi berjenis kelamin jantan berumur 4 – 5 minggu dengan berat badan antara 30 – 40 g. Kelinci putih yang digunakan berumur 2 – 3 bulan dan berat badan berkisar antara 2 – 3 kg, serta diadaptasikan terlebih dahulu di dalam kandang kelinci di laboratorium hewan PTNBR BATAN selama minimal 24 jam sebelum perlakuan uji pirogenitas.

Peralatan yang digunakan antara lain *syringe* berukuran 1 ml, termokopel, *rabbit restrainer*, timbangan hewan, timbangan analitis (Mettler Toledo), *laminar airflow* (BBL Biological Cabinet), *incubator* (Mettmert), *Single Channel Analyzer* (Ortec) dan *Dose Calibrator* (Victoreen), autoklaf (Hirayama), inkubator (Mettmert), alat pengaduk (Retsch Mixer), seperangkat alat kromatografi lapis tipis, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet mikro (Eppendorf), pinset, gunting bedah, kertas merang, dan kertas *tissue*.

2.2 Pembuatan senyawa bertanda ^{99m}Tc -kanamisin

Setiap vial yang berisi kit cair kanamisin terdiri atas kanamisin sulfat 5 mg, Napirofosfat 1,25 mg, SnCl_2 0,25 mg dan aquabides 1,25 ml. Kit cair kanamisin selanjutnya ditandai dengan radionuklida ^{99m}Tc dengan waktu inkubasi 5 menit sehingga terbentuk senyawa kompleks ^{99m}Tc -kanamisin, dan ditentukan kemurnian radiokimianya dengan cara kromatografi meng-

gunakan *Thin Layer Chromatography* (TLC) dengan eluen NaOH 0,5 N dan kertas Whatman 3 dengan eluen aseton kering.

2.3 Uji toksisitas

Dalam penelitian ini dilakukan uji toksisitas abnormal yang bertujuan untuk mendeteksi suatu bahan uji terhadap adanya reaktivitas biologis yang tidak diharapkan dan tidak dapat diterima. Se-banyak 0,1 ml radiofarmaka ^{99m}Tc -kana-misin dengan aktivitas 0,2 mCi diinjeksikan pada 5 ekor mencit secara intravena. Selanjutnya adalah mengamati daya tahan hidup dan gejala ketoksikan senyawa pada mencit-mencit, sesaat setelah injeksi, pada 24 jam setelah injeksi, dan pengamatan terus berlangsung hingga satu minggu setelah injeksi.

2.4 Uji sterilitas

Uji sterilitas yang dilakukan merupakan uji inokulasi langsung kit cair kanamisin ke dalam medium nutrient agar dan tioglikolat cair sebanyak 0,2 ml. Medium tioglikolat cair dan nutrien agar, baik yang berisi kit cair kanamisin maupun kontrol diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 37 °C selama 14 hari.

2.5 Uji pirogenitas

Uji ini menggunakan 3 ekor kelinci, yang diukur suhu tubuhnya pada 30 menit sebelum diinjeksikan radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin, serta pada menit ke-30, 60, 90, 120, 150, dan 180 setelah diinjeksikan radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin secara intravena pada telinga kelinci. Selanjutnya dilakukan perhitungan dengan mengguna-

kan rumus berikut:

$$T \text{ inisial} : T_{\text{pada } t} (- 30 \text{ menit})$$

$$T \text{ respon} : T_{\text{maksimal}} - T_{\text{inisial}}$$

- Suhu inisial (T inisial) : suhu pada 30 menit sebelum injeksi
- Suhu maksimal (T maksimal) : suhu tertinggi pada pengukuran 180 menit setelah penyuntikan
- Suhu respon (T respon) : selisih antara T maksimal dan T inisial

Kemudian dilakukan analisis apakah radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin memenuhi persyaratan bebas pirogen ataukah tidak, yang mengacu pada tabel di bawah ini.

Tabel 1. Syarat pirogenitas sediaan

Jumlah kelinci	Sediaan uji memenuhi syarat jika jumlah respon tidak melebihi (°C)	Sediaan uji tidak memenuhi syarat jika jumlah respon melebihi (°C)
3	1,20	2,70
6	2,80	4,30
9	4,50	6,00
12	6,60	6,60

2.6 Uji biodistribusi

Uji biodistribusi dilakukan untuk mengetahui pola penyebaran radiofarmaka di dalam tubuh mencit. Terdapat 3 kelompok hewan uji, yaitu kelompok hewan yang tidak diinfeksi bakteri sebagai kontrol, kelompok hewan yang diinduksi infeksi dengan bakteri *E. coli*, dan kelompok hewan yang diinduksi infeksi dengan bakteri *S. aureus*. Masing-masing kelompok dibagi lagi menjadi 3 sub-kelompok, yaitu kelompok uji 30 menit, 60 menit dan 180 menit. Masing-masing sub-

kelompok terdiri atas 3 hewan uji, sehingga jumlah seluruh hewan uji yang digunakan adalah 27 ekor. Penyuntikan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* bertujuan untuk membuat hewan model yang menerima infeksi buatan pada otot paha kiri belakang, yang disebabkan oleh kedua bakteri tersebut.

Uji biodistribusi radiofarmaka ^{99m}Tc-kanamisin pada mencit yang tidak diinfeksi bakteri dilakukan dengan menyuntikkan 0,05 ml radiofarmaka ^{99m}Tc-kanamisin dengan aktivitas ± 200 µCi, secara intravena melalui ekor mencit. Selanjutnya mencit dibiarkan bebas di dalam kandangnya. Pada interval waktu 30, 60, dan 180 menit setelah injeksi radiofarmaka mencit ditimbang, didislokasi, dan dibedah untuk kemudian diambil organ-organnya seperti: otot paha kiri, otot paha kanan, darah, hati, dan ginjal. Sampel organ diambil secukupnya, kira-kira 1 gram untuk setiap organ. Darah yang mengalir di dalam jantung diambil terlebih dahulu dengan menggunakan *syringe* berukuran 1 ml. Darah yang digunakan sebagai sampel hanya sebanyak ± 0,2 ml. Setiap sampel organ ditimbang kemudian diukur aktivitasnya dengan alat pencacah saluran tunggal (*Single Channel Analyzer*) dan dihitung persentase cacahan pada tiap gram organ.

Prosedur uji biodistribusi pada mencit yang terinfeksi bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dilakukan sama seperti pada mencit yang tidak diinfeksi bakteri, namun terlebih dahulu mencit diinduksi infeksi menggunakan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* pada otot paha kiri belakang 24 jam sebelum injeksi radiofarmaka ^{99m}Tc-kanamisin. Pengambilan otot paha kiri dilakukan pada otot yang

tampak kemerahan karena adanya inflamasi. Induksi infeksi dilakukan dengan menyuntikkan sebanyak 0,1 ml suspensi bakteri (dengan kepadatan 2×10^8) secara intramuskular pada paha kiri belakang mencit (6, 8).

Setelah semua sampel organ diketahui aktivitasnya, dilakukan perhitungan persentase dosis injeksi ^{99m}Tc-kanamisin per gram organ (% ID/g), dengan menggunakan rumus berikut (5, 9).

$$\%ID / g = \frac{\text{cacahan per gram organ}}{\text{cacahan dosis yang diberikan}} \times 100\%$$

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Uji toksisitas

Hasil pengamatan terhadap mencit pada uji toksisitas ditampilkan pada Tabel 2. Suatu radiofarmaka dikatakan bersifat toksik apabila terdapat minimal 1 ekor mencit yang digunakan dalam uji toksisitas menunjukkan gejala abnormal seperti kejang-kejang, muntah, tremor, dan bahkan ada mencit yang mati (7). Berdasarkan hasil pengamatan yang tertera di dalam Tabel 2, tidak terdapat mencit yang menunjukkan perilaku abnormal setelah injeksi radiofarmaka ^{99m}Tc-kanamisin. Kondisi mencit yang tetap normal hingga akhir pengamatan kemungkinan disebabkan jumlah kanamisin sulfat yang digunakan masih di bawah ambang nilai toksisitas akut kanamisin sulfat yang digunakan secara intravena pada mencit yaitu 240 mg/kg (LD₅₀ = 240 mg/kg). Kanamisin sulfat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 1×10^{-6} mg/kg. Jumlah kanamisin sulfat yang demikian sedikit dibandingkan dengan dosisnya pada LD₅₀ disebabkan

penggunaannya yang hanya sebagai *tracer* (pembawa), yang kemudian dimanfaatkan dalam mendiagnosis keberadaan infeksi di dalam tubuh. Selain itu, jumlah radionuklida yang digunakan pun hanya sedikit, yaitu 0,75 ml dengan aktivitas 0,62 mCi, sehingga efek toksik yang dihasilkannya pun sangat kecil, tidak sampai berpengaruh terhadap fisiologis mencit (10). Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin bersifat tidak toksik sehingga aman untuk digunakan dalam aplikasinya secara klinis.

Tabel 2. Hasil pengamatan uji toksisitas

Mencit ke-	Gejala yang diamati pada		
	sesaat setelah injeksi	24 jam setelah injeksi	1 minggu setelah injeksi
1	normal	normal	normal
2	normal	normal	normal
3	normal	normal	normal
4	normal	normal	normal
5	normal	normal	normal

3.2 Uji sterilitas

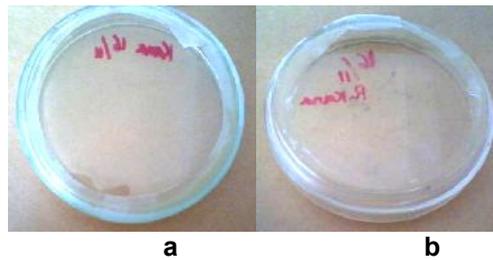
Hasil pengamatan terhadap media yang digunakan dalam uji sterilitas ditampilkan pada Tabel 3.

Kit cair kanamisin dinyatakan steril setelah pengamatan selama 14 hari tidak terdapat pertumbuhan jamur maupun bakteri pada media nutrient agar dan tioglikolat cair yang telah ditetesi kit cair kanamisin maupun yang dibiarkan terbuka di dalam *laminar airflow* (LAF) selama pelaksanaan uji sterilitas (Gambar 1). Hasil tersebut serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Zainuddin dkk. (11) pada radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin. Dalam penelitian tersebut tidak dijumpai pertumbuhan bakteri dan jamur pada media nutrient agar dan sabouroud glucose agar yang telah ditetesi radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin sebanyak $\pm 0,2$ ml, diinkubasi pada 37 °C, dan diamati selama 7 hari.

Tabel 3. Hasil pengamatan uji sterilitas

Media	Sampel	Pertumbuhan jamur dan/atau bakteri pada hari ke-													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Nutrient Agar	Udara ruang LAF ^{99m}Tc -kanamisin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Udara ruang LAF ^{99m}Tc -kanamisin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : Tanda (-) : menunjukkan tidak ada kontaminasi bakteri maupun jamur.



Gambar 1. Hasil uji sterilitas kit cair kanamisin (a) dan hasil uji sterilitas ruang *laminar airflow* (kontrol) (b).

Tabel 4. Berat badan dan respon suhu tubuh kelinci dalam uji pirogenitas

Kelinci (berat badan)	T inisial (°C)	T maksimum (°C)	T respon (°C)
1 (2,95 kg)	39,0	39,8	0,8
2 (2,40 kg)	39,0	40,7	1,7
3 (2,25 kg)	39,4	39,8	0,4

Jamur maupun bakteri tidak dijumpai tumbuh pada media perbenihan yang telah ditetesi kit cair kanamisin disebabkan radiofarmaka yang dibuat telah dibebaskan dari kontaminan dengan cara penyaringan menggunakan penyaring bakteri yang telah steril (Millipore) pada saat pembuatannya. Kondisi ruang pembuatan kit cair kanamisin serta prinsip kerja yang aseptis turut mendukung diperolehnya kit yang steril. Berdasarkan hasil tersebut, kit cair kanamisin yang dibuat dapat dinyatakan steril dan layak digunakan sebagai kit diagnostik untuk pencitraan infeksi.

3.3 Uji pirogenitas

Uji ini dilakukan dengan menggunakan metode *rabbit pyrogen test* terhadap 3 ekor kelinci. Hasil pengamatan terhadap berat badan dan suhu tubuh kelinci ditunjukkan dalam Tabel 4.

Berdasarkan suhu awal yang diperoleh menunjukkan bahwa semua kelinci dalam percobaan ini memenuhi syarat sebagai hewan uji, karena suhu tubuhnya tidak melebihi 39,8 °C. Setelah dilakukan injeksi

radiofarmaka ^{99m}Tc-kanamisin, terjadi peningkatan suhu tubuh kelinci, dan diperoleh suhu maksimum selama pengukuran seperti yang tertera pada Tabel 4. Suhu respon total ketiga kelinci adalah sebesar 2,9 °C, yang berarti bahwa radiofarmaka ^{99m}Tc-kanamisin belum memenuhi persyaratan bebas pirogen. Dalam penelitian ini adanya respon yang tidak memenuhi persyaratan bebas pirogen kemungkinan disebabkan masih adanya pirogen di dalam radiofarmaka ^{99m}Tc-kanamisin melebihi batas yang diperbolehkan, sehingga menimbulkan kenaikan suhu tubuh kelinci melebihi batas yang diperbolehkan. Pirogen tersebut dapat berasal dari peralatan yang digunakan maupun dari larutan ^{99m}Tc-perteknetat. Keberadaan pirogen inilah yang menyebabkan terjadinya kenaikan suhu yang cukup tinggi pada 2 ekor kelinci yang diinjeksi radiofarmaka ^{99m}Tc-kanamisin.

3.4 Uji biodistribusi

Uji biodistribusi radiofarmaka ^{99m}Tc-kanamisin dilakukan setelah kemurnian

radiokimianya diketahui dan memiliki nilai lebih besar dari 90%. Dalam penelitian ini, radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin yang akan diuji biodistribusinya pada mencit memiliki kemurnian radiokimia sebesar 93,49%.

Secara umum, radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin terdistribusi di dalam tubuh mencit yang telah diinduksi infeksi dengan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* maupun mencit yang tidak diinfeksi bakteri (Gambar 2, Gambar 3, dan Gambar 4). Pada saat pembedahan, dilakukan pengamatan terhadap otot paha kiri belakang mencit yang diinduksi infeksi menggunakan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Otot tersebut berwarna kemerahan yang menandakan terjadi infeksi yang disertai inflamasi.

Pada mencit yang diinfeksi dengan *E. coli*, akumulasi radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin pada semua organ mencapai puncaknya pada 60 menit setelah injeksi, kecuali pada ginjal yang menunjukkan nilai tertinggi pada 30 menit setelah injeksi.

Berdasarkan Gambar 2, tampak adanya akumulasi radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin yang lebih besar pada otot paha kiri dibandingkan otot paha kanan. Hal tersebut dikarenakan adanya bakteri yang berikatan dengan radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin. Ikatannya tersebut tampak cukup efektif pada 60 menit setelah injeksi. Pada 30 menit setelah injeksi akumulasinya yang ditunjukkan oleh nilai % ID/g yang rendah disebabkan karena radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin masih banyak berada di dalam darah. Sementara pada 180 menit setelah injeksi nilai %ID/g menjadi berkurang disebabkan oleh adanya proses eliminasi radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin dari dalam tubuh melalui urin. Hal tersebut

didukung oleh kenyataan adanya akumulasi yang signifikan dalam ginjal.

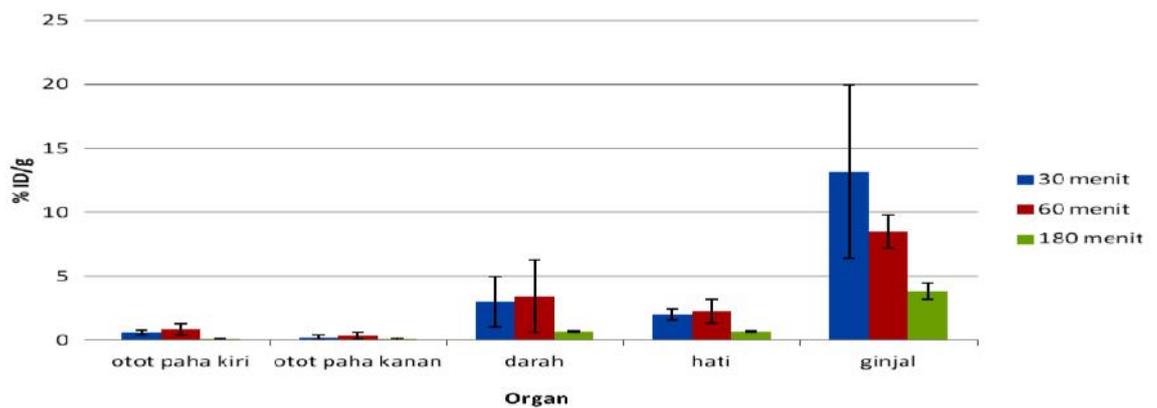
Pola yang sama juga ditunjukkan pada darah dan hati. Keberadaan radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin di dalam darah hingga 180 menit setelah injeksi semakin berkurang, kemungkinan disebabkan karena radiofarmaka sudah berpindah ke ginjal dan dikeluarkan dari tubuh melalui urin. Akumulasi radiofarmaka yang cukup signifikan pada hati diduga merupakan indikasi bahwa radiofarmaka ini terurai di dalam tubuh karena proses metabolisme sehingga terbentuk TcO_2 dan TcO_4 , yang kemudian akan dikeluarkan melalui feses. Berdasarkan hasil uji biodistribusi dan uji *scanning* dengan kamera gamma yang menunjukkan akumulasi yang tinggi pada ginjal, radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin dikatakan bersifat hidrofil sehingga ideal untuk digunakan sebagai pencitra infeksi. Akumulasi yang tinggi pada ginjal menunjukkan bahwa radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin cepat diekskresikan dari tubuh sehingga akumulasi di organ target lebih tinggi dibandingkan organ non target (6).

Di dalam penelitian yang dilakukan oleh Sumpena dkk. (8), uji biodistribusi radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin pada mencit yang diinfeksi oleh bakteri *E. coli* menunjukkan akumulasi radiofarmaka yang lebih besar pada otot paha yang diinfeksi dari pada otot paha yang tidak diinfeksi. Pada penelitian tersebut diperoleh informasi bahwa akumulasi tertinggi radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin adalah pada otot paha kiri yang dicapai pada 2 jam setelah injeksi ($0,16 \% \pm 0,001 \%$) dan kemudian nilainya

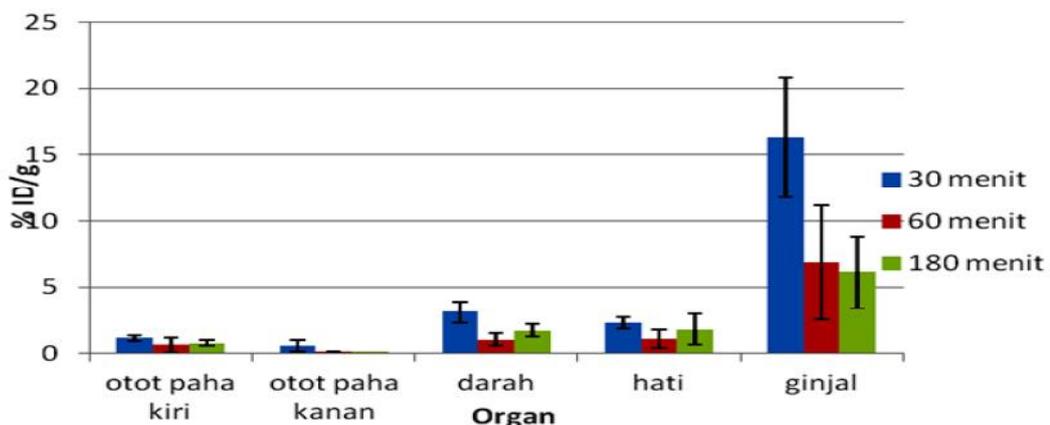
menurun pada 4 jam ($0,13 \% \pm 0,000 \%$) dan 24 jam ($0,08 \% \pm 0,001 \%$) setelah injeksi. Selain itu juga diketahui bahwa radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin terakumulasi pada darah dan hati.

Berdasarkan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini, dapat dikatakan radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin memiliki keunggulan dibandingkan dengan radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin yaitu dalam hal akumulasinya di organ target. Pada hewan yang diinfeksi oleh *E. coli*, *uptake* ^{99m}Tc -kanamisin tertinggi adalah sebesar $0,86\% \pm 0,44\%$ pada 60 menit

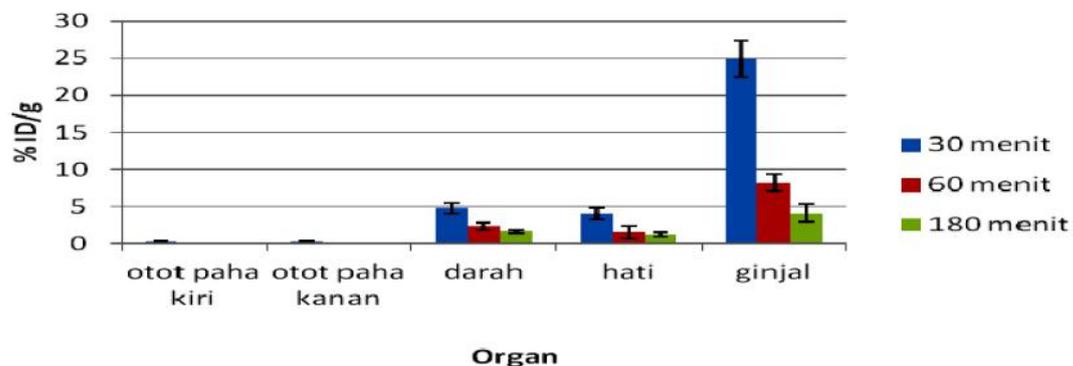
setelah injeksi, sedang *uptake* ^{99m}Tc -siprofloksasin tertinggi di organ target adalah sebesar $0,16 \% \pm 0,001 \%$ pada 120 menit setelah injeksi. Namun demikian, radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin masih lebih lambat dikeluarkan dari dalam tubuh, dimana pada 180 menit setelah injeksi akumulasi di dalam ginjal masih sebesar $3,83 \% \pm 0,66 \%$, jauh lebih besar dibandingkan jumlah radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin yang terakumulasi di dalam ginjal pada 240 menit setelah injeksi yaitu sebesar $0,94 \% \pm 0,007 \%$.



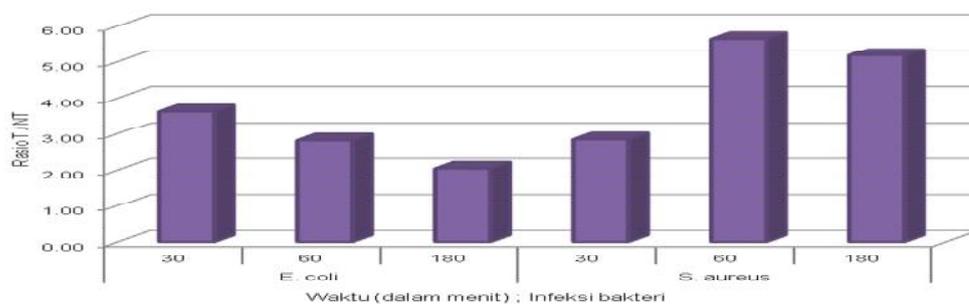
Gambar 2. Biodistribusi ^{99m}Tc -kanamisin pada mencit yang diinfeksi bakteri *E. coli* pada waktu 30, 60, dan 180 menit.



Gambar 3. Biodistribusi ^{99m}Tc -kanamisin pada mencit yang diinfeksi bakteri *S. aureus* pada waktu 30, 60, dan 180 menit.



Gambar 4. Biodistribusi ^{99m}Tc-kanamisin pada mencit yang tidak diinfeksi bakteri pada waktu 30, 60, dan 180 menit.



Gambar 5. Rasio target – non target pada mencit yang diinfeksi bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

Uji biodistribusi radiofarmaka ^{99m}Tc-kanamisin pada mencit yang diinfeksi *S. aureus* menunjukkan % ID/g radiofarmaka yang lebih besar pada 30 menit setelah injeksi di semua organ dan jaringan yang diambil (Gambar 3). Otot paha kiri yang merupakan jaringan target memiliki nilai % ID yang cukup besar (dibandingkan otot normal, dengan rasio target terhadap non target (yaitu % ID/g di otot paha kiri dibandingkan dengan di otot paha kanan) sebesar 2,84% (Gambar 5). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa bakteri *S. aureus* berikatan cukup kuat dengan radiofarmaka ^{99m}Tc-kanamisin pada 30 menit setelah injeksi, dan nilainya berkurang pada 60 menit setelah injeksi. Nilainya kembali naik pada 180 menit setelah injeksi, pada semua

organ/jaringan kecuali ginjal. Kenaikan nilai % ID/g tersebut menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antara hasil yang diperoleh pada 60 menit dan 180 menit setelah injeksi, berdasarkan uji statistik ($P < 0,05$). Radiofarmaka pun cepat diekresikan dari tubuh, dimana pada 30 menit setelah injeksi % ID/g di ginjal sebesar 16,28 % dan setelah 60 menit nilainya turun dengan signifikan menjadi 6,83 %.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Shah dkk. (12) yang menggunakan radiofarmaka ^{99m}TcN-sitafloksasin ditiokarbamat, menunjukkan hasil yang berbeda, meskipun sama - sama menggunakan bakteri *S. aureus*. Penelitian tersebut menunjukkan akumulasi radiofarmaka yang

semakin besar di dalam ginjal seiring dengan bertambahnya waktu. Adapun interval waktu yang digunakan adalah 30, 60, 90, dan 120 menit.

Penghitungan rasio target (T) – non target (NT) bertujuan untuk mengetahui perbandingan radiofarmaka ^{99m}Tc -kana-misin yang masuk ke jaringan target (otot paha kiri) dan jaringan non target (otot paha kanan). Berdasarkan Gambar 5, nilai rasio target terhadap non target terbesar diperoleh pada 60 menit setelah injeksi radiofarmaka untuk perlakuan infeksi dengan *S. aureus* yaitu 5,64. Nilai tersebut jauh lebih besar dari yang diperoleh dalam penelitian Roohi dkk. (6), yaitu lebih besar dari 2, pada 4 dan 24 jam setelah injeksi. Menurut Saha (10), untuk setiap studi diagnostik diperlukan rasio aktivitas target – non target yang besar agar diperoleh pen-citraan organ target yang lebih jelas.

Rasio target – non target dapat digunakan untuk aplikasi pada uji klinis, yaitu bahwa untuk memperoleh pencitraan terhadap infeksi yang cukup jelas dapat dilakukan setelah injeksi radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin dalam 60 menit. Hasil uji biodistribusi ini didukung oleh pencitraan menggunakan kamera gamma pada tikus yang diinfeksi bakteri *E. coli*.

Adanya perbedaan waktu akumulasi radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin tertinggi pada mencit yang diinfeksi dengan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* kemungkinan disebabkan oleh perbedaan struktur kedua bakteri tersebut. Diduga bakteri *S. aureus* bersifat lebih rentan terhadap kanamisin dibandingkan bakteri *E. coli*, sehingga lebih cepat terbentuk ikatan antara bakteri *S. aureus* dengan

radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin. Kerentanan tersebut disebabkan *S. aureus* tidak memiliki lapisan lipopolisakarida sehingga kanamisin yang bersifat polar dapat dengan mudah dan cepat masuk ke dalam sel bakteri. Sementara *E. coli* memiliki lapisan lipopolisakarida yang menyebabkan kanamisin tidak dapat dengan mudah dan membutuhkan waktu lebih lama untuk masuk ke dalam sel bakteri (13). Pada mencit yang diinfeksi *S. aureus*, akumulasi radiofarmaka tertinggi diperoleh pada 30 menit setelah injeksi, sementara pada mencit yang diinfeksi dengan *E. coli* akumulasi tertinggi diperoleh pada 60 menit setelah injeksi.

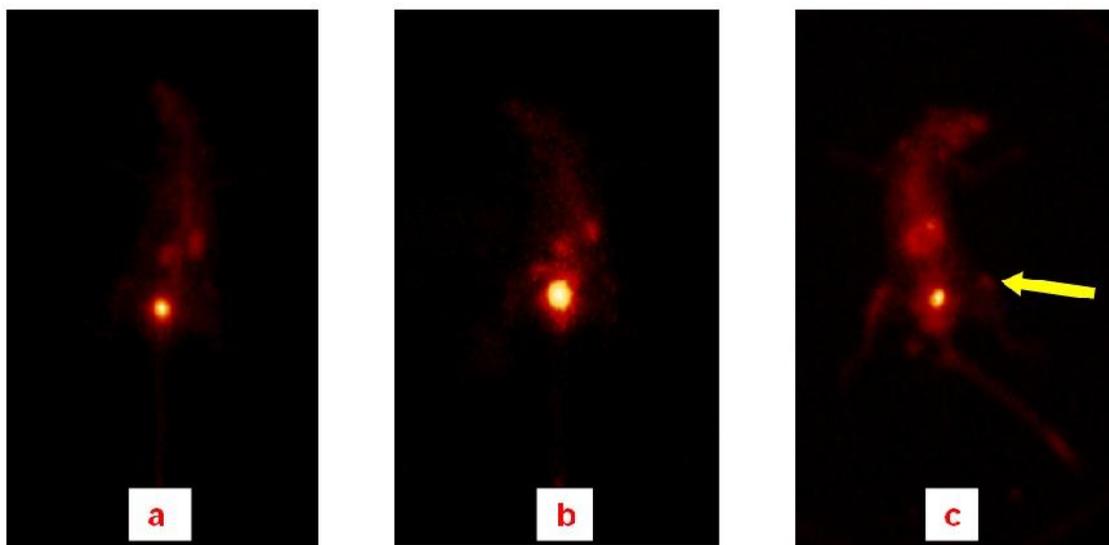
Pada mencit yang tidak diinfeksi bakteri, menunjukkan pola penurunan aktivitas radiofarmaka yang seiring dengan waktu (Gambar 4). Otot paha kiri dan otot paha kanan memiliki nilai % ID/g yang sangat kecil jika dibandingkan dengan di darah, hati, dan ginjal. Hal tersebut dikarenakan tidak terdapat infeksi pada otot-otot tersebut yang kemudian akan berikatan dengan radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin, sehingga nilai %ID/g yang ada merupakan nilai aktivitas radiofarmaka yang terbawa oleh darah di dalam otot.

Nilai % ID/g radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin di dalam ginjal pada 30 menit setelah injeksi adalah sebesar 24,9% dan berkurang hingga lebih dari setengahnya pada 60 menit setelah injeksi yaitu sebesar 8,25% dan tinggal 4,15% pada 180 menit setelah injeksi. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada keadaan normal, yaitu tanpa adanya infeksi, radiofarmaka yang diinjeksikan akan segera dikeluarkan dari dalam

tubuh, sebagian besar melalui urin, dan se-
lebihnya melalui feses. Berdasarkan hasil
yang diperoleh, baik pada mencit yang di-
infeksi bakteri *E. coli* dan *S. aureus* mau-pun
mencit yang tidak diinfeksi, menunjuk-kan
adanya akumulasi radiofarmaka di dalam hati,
yang mengindikasikan bahwa radiofarmaka
 ^{99m}Tc -kanamisin diekskresi-kan juga melalui
empedu, yang kemudian akan dikeluarkan
melalui feses.

Penggunaan mencit yang tidak di-

infeksi bakteri sebagai pembanding, juga
bertujuan untuk melihat apakah ada aku-
mulasi radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin oleh
bakteri yang merupakan mikroflora tubuh.
Meskipun dalam penelitian ini tidak
mengambil sampel lambung dan usus,
namun dapat diketahui bahwa kemungkin-
an radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin akan
terakumulasi pada organ tersebut dengan
nilai %ID/g yang tidak berbeda secara
signifikan di setiap interval waktunya.



Gambar 6. Pencitraan menggunakan kamera gamma pada tikus yang diinfeksi bakteri *E. coli*.

Keterangan:

- a : pencitraan pada 30 menit setelah injeksi ^{99m}Tc -kanamisin.
 - b : pencitraan pada 60 menit setelah injeksi ^{99m}Tc -kanamisin.
 - c : pencitraan pada 180 menit setelah injeksi ^{99m}Tc -kanamisin.
- Tanda panah menunjukkan tempat terjadinya infeksi.

Dugaan tersebut diambil berdasarkan
penelitian yang dilakukan oleh Shah dkk.
(12), Shah dkk. (14), dan Shah dan Khan
(15). Penelitian tersebut menggunakan
radiofarmaka yang berbeda-beda yaitu
 ^{99m}Tc -N-sitafloksasin ditiokarbamat, ^{99m}Tc -
ganeroksasin, dan ^{99m}Tc -trikarbonil moksi-
floksasin. Dengan demikian dapat dikata-
kan bahwa radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin

akan terakumulasi (terikat) secara signifi-
kan oleh organ/jaringan yang diinfeksi oleh
bakteri yang merupakan patogen bagi
tubuh. Fakta inilah yang menunjukkan
bahwa radiofarmaka ^{99m}Tc -kanamisin ber-
sifat spesifik.

Berdasarkan uji statistik ANOVA dua
arah dengan tingkat kepercayaan 95%
yang dilakukan terhadap hasil uji bio-

distribusi, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara semua perlakuan waktu dan jenis organ yang diambil, kecuali pada perlakuan mencit yang diinfeksi *S. aureus* pada 60 dan 180 menit. Secara umum waktu dan jenis organ/jaringan yang diambil berpengaruh terhadap hasil uji biodistribusi, yang ditunjukkan oleh nilai % ID/g baik pada mencit yang diinfeksi bakteri *E. coli* dan *S. aureus*, maupun mencit yang tidak diinfeksi bakteri.

4. KESIMPULAN

Secara keseluruhan dapat disimpulkan bahwa radiofarmaka ^{99m}Tc-kanamisin yang digunakan dalam penelitian ini bersifat tidak toksik, steril, masih mengandung pirogen, serta terakumulasi di dalam organ target hewan uji yaitu pada 60 menit setelah injeksi, dan cepat diekskresikan dari dalam tubuh yaitu mulai 30 menit setelah injeksi.

5. UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kementerian Riset dan Teknologi atas bantuan dana penelitian yang diberikan. Kepada Bapak Iswahyudi, Bapak Ahmad Sidik, Bapak Epy Isabela, Sdri. Isti Daruwati, M.Si., Apt., Sdri. Eva Maria Widyasari, M.Si., dr. Fadil Nazir, SpKN, dan Sdr. Prasetya Widodo, A.Md. terima kasih atas bantuan teknis yang diberikan selama penelitian berlangsung.

6. DAFTAR PUSTAKA

1. Welling M, Ferro-Flores G, Pirmettis I. Technetium-99m labelled infection imaging agents. In: IAEA Radioisotopes And Radiopharmaceuticals Series No. 1, editors. Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Status and Trends. Vienna: International Atomic Energy Agency; 2009. p. 137-56.
2. Mirshojaei SF, Gandomkar M, Najafi R, Ebrahimi SES, Babaei MH, Shafiei A, Talebi MH. Radio labelling, quality control and biodistribution of ^{99m}Tc-cefotaxim as an infection imaging agent. J Radioanal Nucl Chem 2010; Published online: 12 September 2010.
3. Basry TH, Nurlaila Z, Ilyas R. Formulasi radiofarmaka ^{99m}Tc-siprofloksasin untuk diagnosis infeksi. Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknik Nuklir. Bandung:P3TKn BATAN;2005.
4. Hesslewood SR. Sterility testing of radiopharmaceuticals and pyrogen testing of radiopharmaceuticals. In: Zolle I, editor. Technetium-99m pharmaceuticals: preparation and quality control in nuclear medicine. New York: Springer; 2007. p.146-50
5. International Atomic Energy Agency. General procedures in quality control. In: Technical Reports Series No. 466, editors. Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Manufacture of Kits. Vienna: International Atomic Energy Agency;2008. p.50-8.
6. Roohi S, Mushtaq A, Jehangir M, Malik SA. Synthesis, quality control and biodistribution of ^{99m}Tc-kanamycin. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 2006;267:561-66.
7. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995) : *Farmakope Indonesia Edisi IV*, Jakarta, 855-919.

8. Sumpena Y, Sugiharti RJ, Zainudin N. Biodistribusi dan uji *clearance* ^{99m}Tc -siprofloksasin pada mencit (*Mus musculus*) yang terinfeksi bakteri *Escherichia coli*. Prosiding Seminar Sains dan Teknologi Nuklir. Bandung: PTNBR – BATAN;2007.
9. Sugiharti RJ, Sumpena Y, Misyetti. Perbandingan pola biodistribusi ^{99m}Tc -CTMP dan ^{99m}Tc -MDP pada hewan uji sebagai radiofarmaka penyidik tulang. Jurnal Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia 2009;X(2):89-96.
10. Saha GB. Fundamentals of nuclear pharmacy. 5th ed. New York: Springer-Verlag; 2004.
11. Zainuddin, N., Hidayat, B, dan Iljas, R. Pengembangan dan Aplikasi Klinis Kit-Kering Radiofarmaka Siprofloksasin. Jurnal Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia 2009;X(1):11-23.
12. Shah SQ, Khan AU, Khan MR. Radiosynthesis and biological evaluation of ^{99m}Tc -sitafloxacin dithiocarbamate as a potential radiotracer for *Staphylococcus aureus* infection. J Radioanal Nucl Chem 2010: Published online: 19 September 2010.
13. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The molecular biology of the cell 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
14. Shah SQ, Khan AU, Khan MR. Synthesis, biological evaluation and biodistribution of the ^{99m}Tc -ganeroxacin complex in artificially infected rats. J Radioanal Nucl Chem 2011;288:207-213.
15. Shah SQ, Khan MR. Radiosynthesis and biological evaluation of the ^{99m}Tc -tricarbonyl moxifloxacin dithiocarbamate complex as a potential *Staphylococcus aureus* infection radiotracer. Applied Radiation and Isotopes 2011;69:686-690.