

## PENGEMBANGAN DAN APLIKASI KLINIS KIT-KERING RADIOFARMAKA SIPROFLOKSASIN

Nurlaila Zainuddin,<sup>1)</sup> Basuki Hidayat<sup>2)</sup>, Rukmini Iljas<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Pusat Teknologi Nuklir Bahan dan Radiometri-BATAN  
Jln. Tamansari 71 Bandung 40132

<sup>2)</sup>Bagian Kedokteran Nuklir-RS Hasan Sadikin  
Jln. Pasir Kaliki 192, Bandung

### ABSTRAK

**PENGEMBANGAN DAN APLIKASI KLINIS KIT-KERING RADIOFARMAKA SIPROFLOKSASIN.** Radiofarmaka <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin tersedia dalam bentuk kit-cair yang dikemas terpisah dari radionuklidanya. Sediaan dalam bentuk ini mempunyai stabilitas yang rendah. Guna memenuhi kebutuhan radiofarmaka untuk diagnosis infeksi telah dilakukan modifikasi pembuatan kit-kering radiofarmaka siprofloksasin menggunakan larutan infus siprofloksasin laktat yang beredar di pasaran dengan metode liofilisasi. Kit-kering siprofloksasin terdiri dari flakon A berisi 2 mg siprofloksasin laktat dan flakon B berisi 2 mg reduktor Sn-tartrat. Preparasi sediaan <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin dilakukan dengan menambahkan radioisotop <sup>99m</sup>Tc ke dalam flakon A yang telah dilarutkan dalam akuabides, diikuti penambahan larutan reduktor Sn-tartrat dari flakon B pada kondisi penandaan optimal. Kemurnian radiokimia <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin ditentukan dengan metode kromatografi menggunakan fase diam ITLC-SG dengan fase gerak aseton kering. Pengujian aktivitas biologis dan *uptake* <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin terhadap mikroorganisme dilakukan secara *in-vitro*. Selain itu, dilakukan juga pemeriksaan sterilitas, toksisitas dan evaluasi klinis terhadap *volunter*. Hasil penandaan kit-kering siprofloksasin dengan radionuklida <sup>99m</sup>Tc diperoleh <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin dengan kemurnian radiokimia sebesar  $96,39 \pm 2,01\%$ . Pengujian aktivitas biologis terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* menunjukkan bahwa kit-kering siprofloksasin setelah proses penandaan dengan <sup>99m</sup>Tc tidak kehilangan daya bakterisidanya dan *uptake* maksimum terjadi pada waktu inkubasi 1 jam sebesar  $83,06 \pm 10,95\%$  dan  $80,26 \pm 8,58\%$  masing-masing terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Kit-kering radiofarmaka siprofloksasin merupakan sediaan yang steril, vakum dan tidak toksik. Uji klinis radiofarmaka <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin terhadap *volunter* yang menderita abses hati dan korpus tulang belakang menunjukkan adanya akumulasi radioaktivitas di daerah tersebut. Aplikasi klinis <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin dengan teknik pencitraan menggunakan kamera gamma menunjukkan bahwa radiofarmaka ini dapat digunakan untuk penyidik infeksi.

**Kata kunci:** siprofloksasin, <sup>99m</sup>Tc, kit-kering, infeksi.

### ABSTRACT

**DEVELOPMENT AND CLINICAL APPLICATION OF THE RADIOPHARMACEUTICAL DRIED-KIT OF CIPROFLOXACIN.** Nowadays, the <sup>99m</sup>Tc-ciprofloxacin radiopharmaceutical is available in the form of liquid-kit, which is separately packed with its radionuclide. The radiopharmaceuticals in that form has low stability. In order to fulfill the necessity of radiopharmaceutical for the diagnosis of infection, the modification of the preparation radiopharmaceutical dried-kit of ciprofloxacin using a commercial ciprofloxacin infuse solution by lyophilization method has been carried out. Ciprofloxacin dried-kit consists of 2 mg of ciprofloxacin lactate in the vial A and 2 mg of stannous tartrate in the vial B. The preparation of <sup>99m</sup>Tc-ciprofloxacin was performed by adding <sup>99m</sup>Tc radionuclide into the vial A dissolved in sterile water for injection, followed by addition of Sn-tartrate solution from the vial B at the optimum condition of labeling. The radiochemical purity of <sup>99m</sup>Tc-ciprofloxacin was analyzed by chromatographic method using ITLC-SG as a stationary phase and acetone as a mobile phase. In vitro determination of the biological activity and uptake of <sup>99m</sup>Tc-ciprofloxacin were performed to microorganism. Meanwhile, the sterility, toxicity and clinical evaluation were also observed. The labelling result of ciprofloxacin dried-kit with <sup>99m</sup>Tc radionuclide indicated that radiochemical purity of <sup>99m</sup>Tc-ciprofloxacin was  $96.39 \pm 2.01\%$ . The determination of biological activity to *S. aureus* and *E. coli* showed that after labelling the bactericide activity was not change i.e.  $83.06 \pm 10.95\%$  and  $80.26 \pm 8.58\%$  for *S. aureus* and *E. coli* respectively, whereas the maximum

uptake were occurred after one hour incubation. Clinical evaluation of  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin to liver and bone marrow abscess patients showed the radioactivity accumulation around those areas. Clinical application of  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin with tomography technique using gamma camera showed that this radiopharmaceutical could be used for infection imaging.

**Key words:** ciprofloxacin,  $^{99m}\text{Tc}$ , dried-kit, infection.

## 1. PENDAHULUAN

Penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram positif maupun gram negatif merupakan penyakit yang penyebarannya sangat luas dan dapat menjangkiti seluruh lapisan masyarakat. Beberapa metode diagnosis dengan metode pencitraan (*imaging*) menggunakan berbagai peralatan, di antaranya *ultrasonography* (USG), *magnetic resonance imaging* (MRI), *computed tomography* (CT-scan) kadang-kadang tidak dapat diterapkan secara spesifik untuk lokasi infeksi yang terjadi pada bagian tubuh yang sangat dalam (*deep-seated infection*), misalnya dalam tulang dan persendian (1,2). Untuk maksud ini, metode teknik nuklir menggunakan radiofarmaka merupakan metode alternatif yang dapat diterapkan. Salah satu radiofarmaka yang dapat digunakan adalah siprofloksasin bertanda teknesium-99m. Pendeteksian dilakukan dengan metode pencitraan dengan alat kamera gamma. Pencitraan menggunakan radiofarmaka ini sangat spesifik, di mana dapat dibedakan antara infeksi dan inflamasi steril (3).

Siprofloksasin adalah suatu antibiotik spektrum luas, golongan fluorokinon yang biasa digunakan dalam terapi infeksi baik yang disebabkan oleh bakteri gram-positif maupun gram-negatif, di antaranya *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Eubacterium*,

*Brucella alcaligenes*, *Aeromonas*, *Paseurella*, *Mycobacterium* dan *Actinormyces* [2]. Senyawa fluorokinon ini bersifat membunuh bakteri (bakterisid) dengan cara mengikat enzim *DNA-gyrase* yang diperlukan DNA untuk berubah dari bentuk spiral ganda menjadi bentuk spiral tunggal pada saat pembelahan sel (4).

Dalam bidang radiofarmasi, teknesium-99m merupakan radio-nuklida yang dipakai secara luas dalam pembuatan radiofarmaka untuk tujuan diagnosis. Hal ini disebabkan beberapa sifat yang menguntungkan dari radionuklida tersebut sebagai penyidik organ, yaitu mempunyai umur paro yang pendek (6,08 jam), memancarkan sinar gamma murni dengan energi yang ideal untuk pencitraan dengan kamera gamma (140 keV), toksisitas rendah dan dapat berikatan dengan berbagai molekul organik (5).

Kemajuan teknologi formulasi telah mempengaruhi perkembangan radiofarmaka. Bentuk sediaan kering yang dapat mempertinggi kestabilan dan teknologi produk *instant* yang dapat meningkatkan kenyamanan pemakai telah dimanfaatkan pula dalam formulasi radiofarmaka yang dikenal dengan sediaan kit-kering radiofarmaka, yaitu radiofarmaka setengah jadi, steril dan bebas pirogen yang dikemas secara

terpisah dengan radioisotop atau radionuklidanya dan dikeringkan dengan cara liofilisasi (beku-kering) (6).

Sejalan dengan perkembangan teknologi formulasi tersebut, teknologi penyediaan radioisotop  $^{99m}\text{Tc}$  yang semula diperoleh dari induk  $^{99}\text{Mo}$  dengan cara ekstraksi pelarut organik telah berhasil diganti dengan teknologi generator radioisotop  $^{99m}\text{Tc}$ . Generator ini berisi radionuklida induk  $^{99}\text{Mo}$  dan radionuklida anak  $^{99m}\text{Tc}$  dalam kesetimbangan sehingga pengguna di rumah sakit setiap hari secara *instant* dapat memperoleh larutan  $^{99m}\text{Tc}$  dalam bentuk  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ . Dengan tersedianya kit-kering radiofarmaka, larutan  $^{99m}\text{Tc}$  dari generator dapat langsung ditambahkan ke dalam kit-kering tersebut dan diperoleh radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$  yang siap dipakai tanpa harus melalui langkah pemurnian atau sterilisasi.

Dalam penelitian terdahulu telah dilakukan penandaan siprofloksasin dengan radionuklida  $^{99m}\text{Tc}$  menggunakan siprofloksasin HCl sebagai bahan awal. Penelitian tersebut meliputi formulasi dan penyediaan radiofarmaka dalam bentuk kit-cair dan kit-kering (7,8). Sediaan dalam bentuk kit-cair mempunyai stabilitas yang rendah selama penyimpanan, sedangkan sediaan dalam bentuk kit-kering setelah ditandai dengan radionuklida  $^{99m}\text{Tc}$  memberikan kemurnian radiokimia yang rendah, yaitu lebih kecil dari 64% (8). Untuk mengatasi masalah ini, dalam penelitian ini akan dilakukan pengembangan dan modifikasi formulasi pembuatan kit-kering siprofloksasin menggunakan larutan infus siprofloksasin laktat [9] yang beredar di

pasaran sebagai bahan awal. Untuk mengetahui bahwa sediaan tersebut memenuhi persyaratan sebagai radiofarmaka diagnosis infeksi, dilakukan juga beberapa pengujian di antaranya kemurnian radiokimia (4,5), aktivitas biologis dan *uptake* secara *in-vitro* oleh mikroba, sterilitas dan toksisitas sediaan. Selain itu, dilakukan juga uji pendahuluan klinis pada beberapa volunteer di rumah sakit untuk memastikan bahwa radiofarmaka tersebut dapat digunakan untuk diagnosis infeksi. Penelitian ini bertujuan memperoleh kit-kering siprofloksasin untuk radiofarmaka bertanda teknesium-99m yang mempunyai kualitas dan stabilitas yang baik dengan harga yang terjangkau karena dibuat di dalam negeri, sehingga radiofarmaka ini dapat digunakan secara luas untuk menunjang pelayanan yang lebih baik di bidang kesehatan.

## 2. TATA KERJA

### 2.1. Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan adalah radionuklida  $^{99m}\text{Tc}$  dalam bentuk larutan  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  yang diperoleh dari generator  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  buatan BATAN-Teknologi. Siprofloksasin laktat dalam bentuk larutan infus 0,2% buatan Dexa Medica, Sn-tartrat produksi Sigma, larutan NaCl fisiologis dan akuabides steril produksi IPHA Laboratories. Bahan lainnya adalah ITLC<sup>TM</sup>-SG buatan Pall Corporation, asam klorida, aseton serta pereaksi lain produksi E.Merck dengan tingkat kemurnian pereaksi analisis, media agar nutrisi padat dan agar glukosa *sabouroud* (SGA)

produksi Oxoid.

Bakteri yang digunakan adalah *S.aureus* dan *E.coli* biakan Biofarma, media *trypton soya broth* (TSB), agar nutrisi buatan Difco, hewan uji mencit putih galur Swiss dengan berat  $\pm 25$  gram.

Peralatan yang dipakai antara lain pengering-beku (*freeze-dryer*) Labconco, *dose calibrator*, pencacah saluran tunggal (C.Schlumberger) dengan detektor Nal-Tl, inkubator (Heraeus), timbangan analitis (Sauter), *laminar air flow*, seperangkat alat kromatografi menaik dan seperangkat alat kamera gamma.

## 2.2. Optimalisasi jumlah Sn-tartrat

Penyiapan larutan Sn-tartrat sebagai reduktor dilakukan dengan menambahkan 14  $\mu\text{L}$  HCl 10N (dibuat dari HCl fuming 37%  $\approx 11,8\text{N}$ ) ke dalam flakon yang berisi 10 mg Sn-tartrat. Kemudian ditambahkan aqua-bides steril sampai volume tepat 10 mL dan dialiri gas nitrogen selama  $\pm 5$  menit.

Ke dalam flakon 10 mL dimasukkan berturut-turut 1 mL larutan infus siprofloksasin laktat (0,2%) dan 0,25 mL larutan  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  dengan radioaktivitas 8-10 mCi. Ke dalam campuran segera ditambahkan larutan Sn-tartrat (1mg/mL) dengan jumlah bervariasi (300, 400, 500, 600 dan 700  $\mu\text{g}$ ). Campuran dikocok perlahan-lahan sampai homogen, pH berkisar 3,5 dan diinkubasi pada temperatur kamar selama 15 menit. Kemurnian radiokimia  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin ditentukan dengan metode kromatografi tipis. (7)

## 2.3. Penentuan waktu inkubasi

Penandaan siprofloksasin dengan

radionuklida  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  dilakukan sama seperti pada percobaan terdahulu dengan menggunakan 2 mg siprofloksasin laktat yang diperoleh dari percobaan variasi jumlah ligan (6) dan 500  $\mu\text{g}$  reduktor Sn-tartrat (1mg/mL). Campuran diinkubasi pada temperatur kamar dengan waktu yang bervariasi (0, 5, 10, 15 dan 20 menit). Kemurnian radiokimia  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin ditentukan dengan metode instant kromatografi lapis tipis.

## 2.4. Penetapan kemurnian radiokimia $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin

Kemurnian radiokimia senyawa bertanda  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin ditentukan dengan cara instant kromatografi lapis tipis [9]. Sebagai fase diam digunakan ITLC<sup>TM</sup>-SG (1x10 cm) dan sebagai fase gerak digunakan pelarut aseton. Kromatogram dipotong-potong sepanjang 1 cm, kemudian dicacah dengan pencacah saluran tunggal yang dilengkapi dengan detektor Nal-Tl. Pengotor radiokimia dalam bentuk Tc-perteknetat ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) diperoleh dengan fase gerak aseton dengan harga  $R_f = 1,0$ . Persentase pengotor radiokimia dan persentase kemurnian radiokimia  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin dihitung dengan cara sebagai berikut :

Pengotor radiokimia ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) (%) =

$$\frac{\text{Jumlah cacahan pada } R_f (^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-) - \text{Cacahan LB}}{\text{Jumlah cacahan pada kromatogram} - \text{Cacahan LB}} \times 100\%$$

Kemurnian radiokimia  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin (%) =  $100\% - (^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-)\%$  di mana LB adalah latar belakang

## 2.5. Pembuatan kit-kering radiofarmaka sipprofloksasin

Kit-kering radiofarmaka sipprofloksasin terdiri dari 2 buah flakon 10 mL (A dan B), yang masing-masing dalam keadaan steril, kering dan vakum. Flakon A berisi 2 mg sipprofloksasin laktat dan flakon B berisi 2 mg bahan reduktor Sn-tartrat.

Sebanyak 1 mL larutan infus sipprofloksasin laktat 0,2 %, masing-masing dimasukkan ke dalam 100 buah flakon 10 mL steril, kemudian dikeringkan dengan cara liofilisasi (flakon A).

Dalam wadah terpisah yang berisi 110 mg Sn-tartrat ditambahkan 100  $\mu$ L HCl 10N, dikocok sampai larut sempurna, kemudian ditambahkan akuabides bebas oksigen hingga volume 100 mL. Larutan disaring dengan penyaring bakteri (0,22  $\mu$ m), kemudian dimasukkan masing-masing sebanyak 1 mL ke dalam flakon 10 mL steril dan dikeringkan dengan cara liofilisasi (flakon B).

## 2.6. Penyediaan radiofarmaka $^{99m}\text{Tc}$ -sipprofloksasin

Ke dalam flakon A dan B masing-masing ditambahkan 1 mL akuabides steril, dikocok perlahan-lahan hingga larut. Kemudian ke dalam flakon A ditambahkan sejumlah tertentu larutan  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  dan segera ditambahkan 0,5 mL larutan dari flakon B. Campuran dikocok sebentar, diinkubasi selama 15 menit pada temperatur kamar, kemurnian radiokimia  $^{99m}\text{Tc}$  sipprofloksasin serta pengotor radiokimianya ditentukan dengan kromatografi lapis tipis.

## 2.7. Pengujian sterilitas kit-kering radiofarmaka sipprofloksasin

Sterilitas kit-kering radiofarmaka sipprofloksasin (flakon A dan B) diuji menggunakan 2 macam media yaitu agar nutrien padat dan agar glukosa sabouroud (SGA). Kit-kering radiofarmaka sipprofloksasin (masing-masing flakon A dan B) dilarutkan dalam 1 mL larutan NaCl fisiologis. Dengan menggunakan jarum ose, larutan tersebut dioleskan pada permukaan masing-masing media secara aseptis di bawah laminar air flow. Selanjutnya tabung perbenihan diinkubasi dalam inkubator pada temperatur 37 °C dan pertumbuhan bakteri serta kapang dipantau selama 7 – 10 hari.

## 2.8. Pengujian toksisitas radiofarmaka $^{99m}\text{Tc}$ -sipprofloksasin

Pengujian toksisitas dilakukan terhadap sekelompok (10 ekor) mencit putih galur Swiss tanpa membedakan jenis kelaminnya (11), dengan berat berkisar 20 g. Sebanyak kurang lebih 200  $\mu$ L ( $\approx$  500  $\mu$ Ci) radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -sipprofloksasin disuntikkan pada masing-masing mencit melalui vena ekor. Hewan tersebut dipelihara seperti biasa dan diamati selama 7 hari terhadap kemungkinan adanya yang mati.

## 2.9. Pengujian biologis in-vitro radiofarmaka $^{99m}\text{Tc}$ -sipprofloksasin terhadap bakteri

### 2.9.1 Aktivitas biologis

Di atas biakan plat agar nutrien yang masing-masing berisi *S. aureus* dan

E.Coli diletakkan 100  $\mu$ L radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin, kemudian disimpan dalam inkubator 37°C selama 24 jam. Sebagai standar digunakan prosedur yang sama untuk larutan infus siprofloksasin. Ukuran diameter lingkaran inhibisi yang terjadi pada biakan plat agar menyatakan aktivitas biologis masing-masing cuplikan.

### 2.9.2. Ikatan pada bakteri

Ke dalam tabung sentrifuga yang berisi 2 mL larutan NaCl fisiologis (0,9%), yang masing-masing mengandung  $\approx 10^7$  sel bakteri *S. aureus* dan *E.Coli* ditambahkan 100  $\mu$ L radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin. Suspensi diinkubasi pada temperatur 37°C selama waktu tertentu (1, 2, 3, 4, 5 dan 24 jam) sambil dikocok, kemudian disentrifugasi. Endapan dan supernatan dipisahkan, selanjutnya endapan dicuci dengan 0,5 mL larutan NaCl fisiologis dan dicacah. Sebagai kontrol, digunakan larutan  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  yang diperlakukan sama seperti di atas. Persen ikatan pada bakteri diperoleh dengan cara sebagai berikut :

Persen ikatan pada bakteri =

$$\frac{\text{cacahan endapan}}{\text{cacahan (endapan + supernatan)}} \times 100\%$$

### 2.10. Uji klinis radiofarmaka $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin

Uji klinis radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin dilakukan terhadap tiga orang volunteer di Bagian Kedokteran Nuklir RS Dr. Hasan Sadikin, Bandung. Radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin disuntikkan secara intra vena dengan dosis  $\approx 15$  mCi. Setelah waktu tertentu (1, 2 dan 4 jam) dilakukan pencitraan menggunakan alat kamera

gamma.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam pembuatan kit radiofarmaka bertanda teknesium-99m, banyak faktor yang mempengaruhi efisiensi penandaan dengan kemurnian radiokimia yang tinggi seperti di antaranya jumlah reduktor, jumlah ligan, pH dan waktu inkubasi. Efisiensi penandaan  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin ditentukan dari kemurnian radiokimianya yang dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis seperti yang dikembangkan oleh Siaens dkk.(10). Pemakaian fase diam ITLC-SG dengan fase gerak aseton dapat memisahkan pengotor radiokimia dalam bentuk  $^{99m}\text{Tc}$ -perteknetat ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) dengan  $R_f = 1,0$ ; sedangkan pengotor radiokimia dalam bentuk  $^{99m}\text{Tc}$ -tereduksi ( $^{99m}\text{TcO}_2$ ) akan berimpit dengan  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin dengan  $R_f = 0,0$ . Dari penelitian sebelumnya diketahui bahwa pengotor radiokimia dalam bentuk  $^{99m}\text{Tc}$ -tereduksi yang dievaluasi secara biologis menggunakan hewan percobaan terlihat bahwa tidak terjadi akumulasi pada hati (7).

Penggunaan larutan infus siprofloksasin sebagai bahan awal dalam penelitian formulasi kit-kering radiofarmaka siprofloksasin memberikan suatu kelebihan di mana tidak dibutuhkan modifikasi pH. Larutan infus yang tersedia di pasaran mempunyai pH 3,0 – 3,5. Dari penelitian terdahulu (7) diperoleh bahwa pada pH 3,0 – 3,5 memberikan kemurnian radiokimia yang tertinggi dan ini merupakan pH di mana  $^{99m}\text{Tc}$ -

siprofloksasin tersebut stabil. Akan tetapi, untuk memperoleh kondisi penandaan yang optimal dengan pemakaian larutan infus ini, perlu dilakukan variasi beberapa parameter yang berpengaruh dalam penandaan sipprofloksasin dengan  $^{99m}\text{Tc}$ , di antaranya jumlah reduktor dan waktu inkubasi.

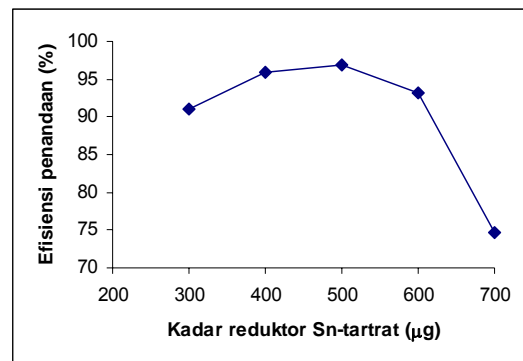
Dari percobaan optimalisasi jumlah reduktor Sn-tartrat dengan tiga kali pengulangan diperoleh bahwa penggunaan Sn-tartrat dengan jumlah 500  $\mu\text{g}$  memberikan efisiensi penandaan yang maksimal sebesar  $97,24 \pm 2,40 \%$  (Gambar 1), dengan pengotor radiokimia ( $^{99m}\text{TcO}_4$ ) sebesar  $2,76 \pm 1,17 \%$ . Penggunaan jumlah Sn-tartrat yang lebih kecil dari 500  $\mu\text{g}$  memberikan efisiensi penandaan yang rendah karena jumlah tersebut terlalu sedikit sehingga proses reduksi kurang sempurna yang mengakibatkan tingginya pengotor radiokimia dalam bentuk ( $^{99m}\text{TcO}_4$ ). Di samping itu, efisiensi penandaan juga akan menurun bila digunakan Sn-tartrat dalam jumlah yang lebih besar dari 500  $\mu\text{g}$ , di mana pada kondisi ini mengakibatkan pH sediaan menjadi lebih asam ( $\text{pH} < 3$ ) sehingga meningkatkan terbentuknya pengotor radiokimia (7).

Pada Tabel 1 disajikan pengaruh waktu inkubasi terhadap efisiensi penandaan  $^{99m}\text{Tc}$ -sipprofloksasin dengan tiga kali pengulangan. Inkubasi pada temperatur kamar sambil dikocok beberapa saat memberikan efisiensi penandaan relatif kecil yaitu  $89,63 \pm 1,17\%$ . Penambahan waktu inkubasi selama 15 dan 20 menit diperoleh hasil yang lebih tinggi dan relatif konstan, masing-masing sebesar  $96,73 \pm 0,68 \%$  dan  $96,67 \pm 1,28\%$ . Perpanjangan waktu inkubasi

sampai 30 menit tidak banyak berpengaruh terhadap efisiensi penandaan sehingga untuk percobaan selanjutnya digunakan waktu inkubasi selama 15 menit pada temperatur kamar.

Tabel 1. Penentuan waktu inkubasi dalam penandaan sipprofloksasin dengan teknesium-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ )

Waktu inkubasi (menit)	Efisiensi penandaan $^{99m}\text{Tc}$ -sipprofloksasin (%)
Segera	$89,63 \pm 1,17$
5	$94,26 \pm 0,82$
10	$94,56 \pm 1,06$
15	$96,73 \pm 0,68$
20	$96,67 \pm 1,28$
30	$95,57 \pm 1,24$



Gambar 1. Penentuan jumlah reduktor Sn-tartrat dalam penandaan sipprofloksasin dengan teknesium-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ )

Kit-kering radiofarmaka sipprofloksasin dibuat berdasarkan hasil yang diperoleh dari percobaan optimalisasi jumlah reduktor Sn-tartrat. Dalam pembuatan kit-kering ini, seluruh tahap pengerjaan dilakukan secara aseptik di bawah *laminar air flow*. Kit didesain dalam

2 flakon terpisah (A dan B), dikeringkan dengan cara liofilisasi, flakon A mengandung 2 mg siprofloksasin laktat dan flakon B mengandung 2 mg Sn-tartrat. Desain dalam 2 flakon terpisah ini karena dalam pembuatan radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin tersebut, larutan Sn-tartrat sebagai reduktor ditambahkan segera setelah penambahan larutan  $^{99m}\text{Tc}$ -perteknetat ditambahkan pada ligan siprofloksasin. Apabila kit-kering ini didesain dalam satu flakon di mana Sn-tartrat dan siprofloksasin berada dalam campuran, maka pada penandaan dengan  $^{99m}\text{Tc}$  diperoleh larutan yang keruh. Hal ini diduga terbentuknya senyawa koloid dari sejumlah reduktor Sn(II) yang terdapat di dalam kit sehingga diperoleh efisiensi penandaan yang rendah (8,12).

Untuk memastikan bahwa kit-kering siprofloksasin setelah ditandai dengan  $^{99m}\text{Tc}$  memenuhi persyaratan sebagai radiofarmaka yang dapat diaplikasikan secara klinis, perlu dilakukan beberapa pengujian fisikokimia dan biologis.

Pengujian kemurnian radiokimia  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin menggunakan metode kromatografi lapis tipis yang dilakukan terhadap 5 flakon kit-kering siprofloksasin memberikan efisiensi penandaan sebesar  $96,39 \pm 2,01$  % (Tabel 2). Harga ini memenuhi persyaratan kemurnian radiokimia, mengingat bahwa radiofarmaka dengan hasil klinis yang baik umumnya mempunyai kemurnian radiokimia  $\geq 90$  % (4, 5).

Sama halnya dengan larutan parenteral lainnya, radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin harus steril. Adanya

mikroorganisme baik bakteri maupun kapang/jamur dalam sediaan dapat menyebabkan infeksi pada pasien. Pengujian sterilitas radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin dilakukan dengan menggunakan metode yang terdapat pada Farmakope Indonesia IV [11]. Dalam pengujian ini digunakan agar nutrisi padat untuk mengetahui adanya bakteri *aerob* dan *anaerob*, sedangkan penggunaan *agar glukosa sabouroud* dimaksudkan untuk mengetahui adanya kapang atau jamur. Dari hasil pengujian dengan tiga kali pengulangan diperoleh bahwa setelah diinkubasi selama tujuh hari tidak terjadi pertumbuhan baik bakteri *aerob* dan *anaerob* maupun jamur dalam semua media. Hal ini menunjukkan bahwa radiofarmaka tersebut dalam keadaan steril (Tabel 2)

Persyaratan lain yang harus dipenuhi suatu radiofarmaka yang digunakan secara parenteral adalah harus tidak toksik. Pengujian toksisitas suatu sediaan menurut Farmakope Indonesia IV (11) dilakukan menggunakan hewan percobaan mencit putih dengan dosis yang sama dengan dosis yang diberikan pada manusia. Guna menjamin keamanan pemakaian untuk manusia, dalam percobaan ini, pengujian toksisitas radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin dilakukan dengan menggunakan dosis yang lebih tinggi yaitu lebih kurang 100 kali dari dosis untuk manusia. Pengujian dilakukan terhadap dua kelompok mencit putih, yang masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor. Dari hasil pemantauan selama 7 hari setelah



penyuntikan, tidak ada satupun mencit dari masing-masing kelompok tersebut yang mati, ini berarti bahwa radiofarmaka tersebut tidak toksik (Tabel 2).

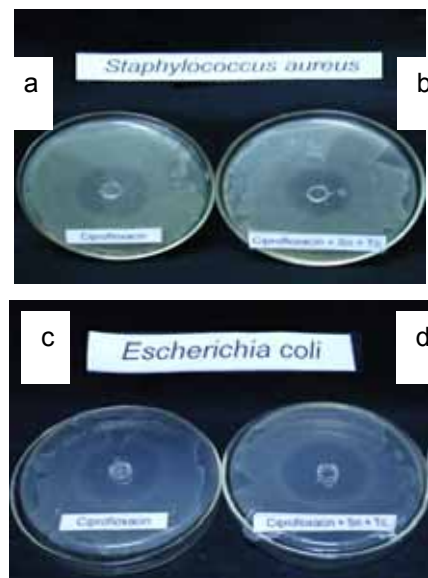
Reaksi penandaan sipprofloksasin dengan radionuklida  $^{99m}\text{Tc}$  dapat menyebabkan terjadinya perubahan struktur molekul dari sipprofloksasin tersebut (3). Adanya atom O (oksigen) yang mempunyai pasangan elektron bebas dalam struktur molekul sipprofloksasin memungkinkan senyawa tersebut membentuk kompleks dengan  $^{99m}\text{Tc}$ , di mana pasangan elektron bebas ini akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan radionuklida tersebut. Adanya perubahan struktur molekul ini dapat mengakibatkan terjadinya perubahan karakter dan sifat mikrobiologis sipprofloksasin baik daya bakterisida maupun *uptake*-nya terhadap sel mikroba. Untuk mengetahui hal ini, dilakukan pengujian secara *in-vitro* menggunakan beberapa mikroba.

Pengujian daya bakterisida radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -sipprofloksasin terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. Coli* menunjukkan bahwa kit-kering sipprofloksasin setelah proses penandaan dengan  $^{99m}\text{Tc}$  tidak kehilangan daya bakterisidanya. Hal ini dapat dilihat dari luasnya daya inhibisi terhadap biakan kedua mikroba tersebut pada media plat agar yang dibandingkan dengan sipprofloksasin sebagai bahan awal. Dari hasil percobaan dengan lima kali pengulangan diperoleh diameter inhibisi  $^{99m}\text{Tc}$ -sipprofloksasin terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. Coli* masing-masing sebesar  $3,90 \pm 0,34$  cm dan  $4,14 \pm 0,13$  cm, sedangkan sipprofloksasin sebesar  $4,37 \pm 0,19$  cm dan

$3,82 \pm 0,07$  cm masing-masing terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. Coli* (Gambar 2, Tabel 2).

Tabel 2. Pengujian hasil penandaan kit-kering sipprofloksasin dengan radionuklida  $^{99m}\text{Tc}$

Jenis pengujian	Hasil	Keterangan
Kemurnian radiokimia	$96,39 \pm 2,01$ %	-
Sterilitas	Steril	-
Toksitas	Tidak toksik	-
Inhibisi terhadap <i>S. aureus</i>	$3,90 \pm 0,34$ cm	Sipprofloksasin $4,37 \pm 0,19$ cm
Inhibisi terhadap <i>E. coli</i>	$4,14 \pm 0,13$ cm	Sipprofloksasin $3,82 \pm 0,07$ cm



Gambar 2. Pengujian daya bakterisida sipprofloksasin (a, c),  $^{99m}\text{Tc}$ -sipprofloksasin (b,d) terhadap mikroba

Hasil uji mikrobiologis ini, memperlihatkan bahwa daya bakterisida dari radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -sipprofloksasin terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. Coli* tidak menunjukkan perbedaan yang berarti dengan sipprofloksasin sebagai bahan awal

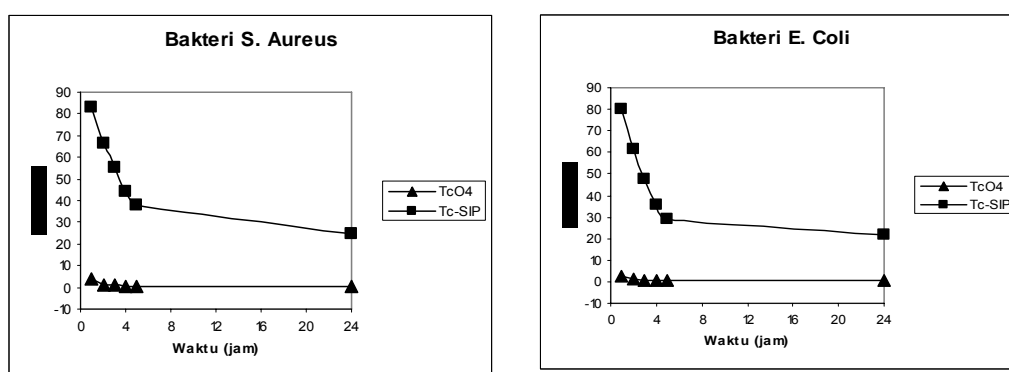
karena masih memenuhi persyaratan daya bakterisida suatu antibiotika sebesar 80%–125% (11). Hal ini menunjukkan pula bahwa reaksi penandaan tidak mempengaruhi pusat aktif reaksi antara siprofloksasin dengan enzim-girase pada bakteri.

Afinitas bakterial suatu senyawa juga menggambarkan *uptake* senyawa tersebut oleh mikroba. Dengan tiga kali pengulangan diperoleh *uptake*  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin oleh bakteri *S. aureus* dan *E. coli* pada satu jam pertama inkubasi masing-masing sebesar  $83,06 \pm 10,95 \%$  dan  $80,26 \pm 8,58 \%$ , yang kemudian menurun secara perlahan dengan bertambahnya waktu. Terlihat setelah 4 jam inkubasi masih memberikan *uptake* yang cukup tinggi sebesar  $44,41 \pm 7,60 \%$  dan  $35,64 \pm 2,85 \%$  masing-masing terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Hasil ini didukung oleh data biodistribusi  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin pada mencit putih di mana diperoleh rasio abses-otot sebesar  $2,1 \pm 0,4$  dan  $1,9 \pm 0,3$  masing-masing untuk bakteri *S. aureus* dan *E. coli* pada 4 jam setelah penyuntikan *intra vena* (13) Sebagai pembandingan, dilakukan juga percobaan menggunakan larutan  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ , di mana

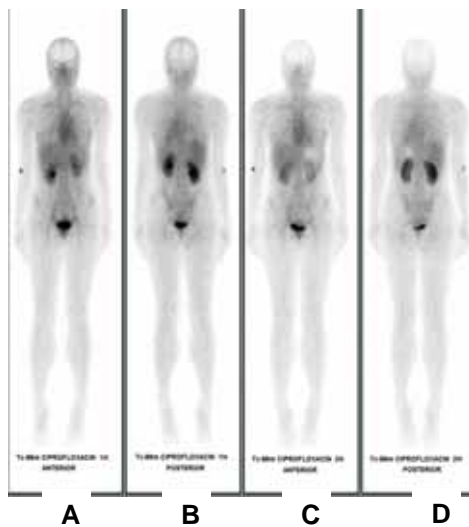
diperoleh *uptake* yang sangat rendah (< 5%) baik terhadap *S. aureus* maupun *E. coli* (Gambar 3).

Uji klinis radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin dilakukan terhadap tiga orang volunteer di Bagian Kedokteran Nuklir RS Dr. Hasan Sadikin, Bandung. Radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin disuntikkan secara *intra vena*, masing-masing dengan dosis  $\approx 15 \text{ mCi}$ . Setelah waktu tertentu (1 dan 2 jam) dilakukan pencitraan menggunakan alat kamera gamma.

Gambar 4 menunjukkan distribusi radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin yang disuntikkan secara *intra vena* pada volunteer normal. Terlihat adanya akumulasi normal di sistem *genito-urinary* (ginjal dan kandung kemih), samar-samar juga terlihat adanya akumulasi di jantung dan hati. Untuk mengetahui bahwa radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin dapat digunakan untuk diagnosis infeksi, pengujian dilakukan terhadap *volunter* yang menderita peradangan (*abses*) pada organ hati.



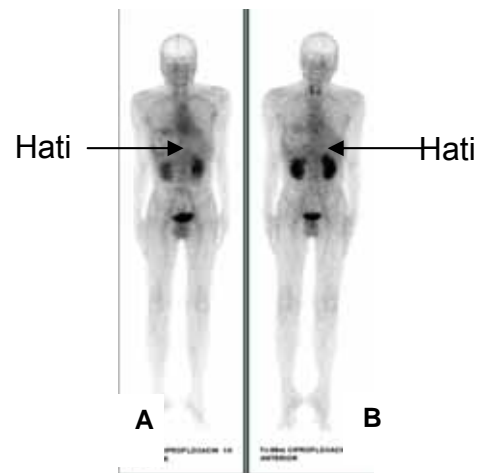
Gambar 3. Afinitas bakterial  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin



Gambar 4. Hasil pencitraan seluruh tubuh radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -sipprofloksasin pd *volunter* normal menggunakan kamera gamma. (A: *anterior*, B: *posterior* 1 jam *pasca* penyuntikan, C: *anterior*, D: *posterior* 2 jam *pasca* penyuntikan).

Dari hasil pencitraan seluruh tubuh menunjukkan terjadi peningkatan akumulasi radioaktivitas secara patologis pada lesi di hati (terlihat di perifer hati) yang mengelilingi daerah yang tidak menangkap radioaktivitas (*void*). Akumulasi di daerah perifer ini dapat disebabkan oleh dua hal, pertama karena adanya bakteri yang hidup dan yang kedua karena adanya peningkatan aliran darah (*perfusi*). Daerah *void* disebabkan karena terkumpulnya radang dan nanah (*pus*), di mana pada tempat tersebut tidak terjadi peningkatan aliran darah (*perfusi*) (Gambar 5).

Pengujian dilakukan juga terhadap *volunter* yang menderita abses pada korpus tulang belakang *torakal VI* dan pencitraan dilakukan menggunakan alat gabungan *Single-Photon Emission Computed Tomography - Computed Tomography* (SPECT-CT).



Gambar 5. Hasil pencitraan seluruh tubuh radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -sipprofloksasin pada *volunter* yang menderita *abses* pada organ hati menggunakan kamera gamma (SPECT), (A) 1 jam, (B) 4 jam *pasca* penyuntikan.

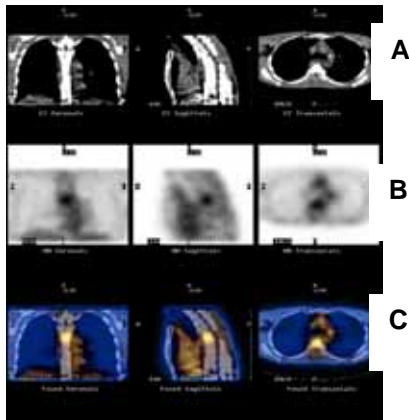
Gambar 6A menunjukkan pencitraan berdasarkan *CT* di mana terlihat adanya destruksi pada korpus tulang belakang. Gambar 6B adalah pencitraan menggunakan SPECT di mana terlihat jelas adanya akumulasi radioaktivitas radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -sipprofloksasin pada daerah kelainan, yang sesuai dengan citra *CT*. Gabungan kedua citra tersebut (SPECT dan *CT*) dengan hasil yang memuaskan dapat dilihat pada Gambar 6C.

Dari berbagai percobaan di atas menunjukkan bahwa radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -sipprofloksasin merupakan sediaan yang tidak toksik dan dapat digunakan untuk pemakaian pada manusia di mana dengan metode pencitraan dapat mendeteksi daerah terjadinya infeksi.

#### 4. KESIMPULAN

Kit radiofarmaka sipprofloksasin dapat dibuat dengan cara liofilisasi dalam dua flakon terpisah (sipprofloksasin laktat

dan reduktor Sn-tartrat), kondisi vakum dan steril.



Gambar 6. Pencitraan radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin pada *volunter* yang menderita abses pada korpus tulang belakang menggunakan gabungan alat SPECT-CT 1 jam *pasca* penyuntikan. (A) citra anatomi *Computed Tomographic* (CT); (B) citra SPECT; (C) citra gabungan SPECT-CT.

Penandaan kit-kering siprofloksasin dengan radionuklida  $^{99m}\text{Tc}$  menghasilkan  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin dengan kemurnian radiokimia yang memenuhi persyaratan sebagai radiofarmaka ( $\geq 90\%$ ), tidak toksik dan masih mempunyai daya bakterisida terhadap mikroba *S. Aureus* dan *E.coli*. Uji klinis di rumah sakit dengan metode pencitraan menggunakan kamera *gamma* dan SPECT-CT terhadap *volunter* memberikan hasil yang memuaskan dan menunjukkan harapan untuk dapat digunakan sebagai radiofarmaka untuk diagnosis infeksi.

## 5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr. Mimin Ratna Suminar atas partisipasi aktifnya dalam penelitian ini, demikian juga kepada Sdr. Rizky Juwita S. dan Sdr. Yetti Suryati dan seluruh staf dan

teknisi Kelompok Biodinamika serta seluruh staf medik Bagian Kedokteran Nuklir-RSHS.

## 6. DAFTAR PUSTAKA

1. Larikka MJ, Ahonen AK, Niemela O, Puronto O, Junila JA, Hamalainen MM, Britton KE, Syrjala HP.  $^{99m}\text{Tc}$ -cyprofloxacin (infecton) imaging in diagnosis of knee prosthesis infections. Nucl. Med. Comm. 2002;23:167-170.
2. Dass SS, Hall AV, Wareham DW, Britton KE. Infection imaging with radiopharmaceuticals in the 21<sup>th</sup> century. Brazilian Archives of Biology 2002;45:223-228.
3. Gano L, Patricio L, Cantiho G, Pena H, Martins T, Marques E. Ciprofloxacin in imaging of infective versus sterile inflammation, IAEA-TecDoc 1029, Vienna, 1998, 213-220.
4. Britton KE, Solanki KK, Wareham DW, Dass SS. Analysis of infecton imaging for patients in the UK., IAEA Coordinated Research Programme, London, 1999.
5. Owunwanne A, Patel M, Sadek S. *The Handbook of Radiopharmaceuticals*, 1<sup>st</sup> ed., London:Chapman & Hall Medical; 1995:9-12.
6. <http://Amanda.uams.edu/other/nuclear/chem.html>, Chemistry of radiopharmaceutical, 1-5.
7. Hasan Basry T, Nurlaila Z, Rukmini I. Formulasi radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin untuk diagnosis infeksi. Prosiding Seminar Nasional Sains

- dan Teknik Nuklir. Bandung: Puslitbang  
Teknik Nuklir-BATAN; 2005:38-45.
8. Rukmini I. Desain kit kering  
radiofarmaka siprofloksasin,  
P3TkN/Lap301008/ NP/2005.
  9. CHOI TAE HYUN, Komunikasi pribadi,  
Kiram, KCCH, Korea, 2006.
  10. Siaens RH, Rennen HJ, Boerman OC,  
Dierckx R, Slegers G. Synthesis and  
comparison of  $^{99m}\text{Tc}$ -enrofloxacin and  
 $^{99m}\text{Tc}$ -cyprofloxacin, J. Nucl.Med. 2004;  
45(12):2088-2094.
  11. Dep. Kesehatan Republik Indonesia,  
Farmakope Indonesia IV; 1992:855–  
859.
  12. Bhardwaj N, Bhatnagar A, Singh AK.  
Development and evaluation of a  
single vial cold kit for infection  
imaging : Tc-99m cyprofloxacin.  
World. J. Nucl. Med. 2005;4:244-251
  13. Yana S, Rizky JS, Nurlaila Z.  
Biodistribusi dan uji *clearance*  $^{99m}\text{Tc}$ -  
siprofloksasin pada mencit (*Mus  
musculus*) yang terinfeksi bakteri  
*Escherichia coli*, Prosiding Seminar  
Nasional Sains dan Teknik Nuklir.  
Bandung: PTNBR-BATAN; 2007:393-  
398.

