

## OPTIMALISASI PENANDAAN $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-KETOKONAZOL SEBAGAI RADIOFARMAKA UNTUK DETEKSI INFEKSI FUNGI

Maula Eka Sriyani<sup>1</sup>, Slamet Ibrahim S<sup>2</sup>, Aang Hanafiah Ws<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pusat Teknologi Nuklir Bahan dan Radiometri – BATAN

<sup>2</sup>Sekolah Farmasi, ITB

E-mail: maulaeka@batan.go.id

Diterima: 18-12-2012

Diterima dalam bentuk revisi: 27-01-2013

Disetujui: 12-02-2013

### ABSTRAK

**OPTIMALISASI PENANDAAN  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-KETOKONAZOL SEBAGAI RADIOFARMAKA UNTUK DETEKSI INFEKSI FUNGI.** Kemiripan gejala yang timbul akibat penyakit infeksi, baik oleh bakteri, fungi atau virus pada stadium awal, mengakibatkan pengobatan seringkali tidak tepat. Diagnosis yang tepat sasaran dapat menjadikan pengobatan lebih efektif dan memiliki tingkat kesembuhan yang maksimal. Pada penelitian ini dilakukan pengembangan diagnosis infeksi fungi berbasis *drug-targeting relationship* antara radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol sebagai radioperunut dan fungi yang terdapat di dalam tubuh sebagai targetnya. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan sediaan radiofarmasi  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol menggunakan teknik penandaan tidak langsung dengan ko-ligan atau *bifunctional agent* sebagai penghubung antara radionuklida  $^{99m}\text{Tc}$  dengan ketokonazol. *Bifunctional agent* yang digunakan dalam penelitian ini yaitu dietilen triamin pentaasetat (DTPA). Dari penelitian ini diperoleh kondisi optimal penandaan  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol, yaitu komposisi jumlah ketokonazol 2 mg; DTPA 1,125 mg;  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  37,5  $\mu\text{g}$ ; pH 4,5 dan waktu inkubasi selama 5 menit, sehingga diperoleh kemurnian radiokimia sebesar  $97,77 \pm 0,33$  %. Uji *uptake in-vivo*  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol dilakukan terhadap *Candida albicans* yang diinfeksi ke dalam paha kiri mencit. Hasil percobaan menunjukkan bahwa rasio organ terinfeksi dan tidak terinfeksi (T/NT) setelah 2 jam injeksi sebesar  $3,16 \pm 0,04$  (n=5). Dari hasil yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol berhasil dibuat dan memenuhi syarat sebagai radiofarmaka.

**Kata kunci:**  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol, infeksi fungi, radiofarmaka, antifungi, radioperunut

### ABSTRACT

**OPTIMUM CONDITION FOR  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-KETOCONAZOLE LABELING AS A RADIOPHARMACEUTICAL FOR FUNGAL INFECTION DETECTION.** The symptoms of infectious disease at an early stage can't be distinguished between bacterial, fungal or viral infections and often make the treatment become improper. Effective treatment, also maximum cure can be achieved if the diagnosis is accurate. In this research, drug-targeting relationship based for fungal infection diagnosis has been developed. The  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketoconazole radiopharmaceutical as a radiotracer was used for diagnosis of fungi infection present in the body as a target. The objective of this research is to obtain the  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketoconazole using indirect labeling techniques with diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) as a co-ligand or bifunctional agent. The result showed that the optimum condition for  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketoconazole labeling with high radiochemical purity of  $97.77 \pm 0.33$  % were 2 mg ketoconazole, 1.125 mg DTPA, 37.5  $\mu\text{g}$   $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH=4.5 and incubation time at room temperature is 5 minutes. *In-vivo* uptake test has been carried out, and the result showed high ratio of infected and non infected organ (I/NI) 2 hours post injection, that was  $3.16 \pm 0.04$  (n=5). From the results, it can be concluded that the optimum condition of  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketoconazole has been established and meets the radiochemical purity requirement as a radiopharmaceutical.

**Keywords:**  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketoconazole, fungal infection, radiopharmaceuticals, antifungal agent, radiotracer

## 1. PENDAHULUAN

Penyakit yang disebabkan oleh infeksi, baik berupa bakteri, virus maupun fungi di dalam tubuh cukup sulit dilacak dan memiliki gejala yang hampir mirip. Seringkali, deteksi infeksi yang terdapat di dalam tubuh sulit dibedakan antara infeksi yang disebabkan oleh bakteri atau fungi, ataupun inflamasi steril. Sebanyak 50-70% kasus infeksi fungi patogen terbanyak disebabkan oleh *Candida albicans* (*C.albicans*) yang menyerang paru-paru, darah, jaringan otak, ginjal dan saluran pencernaan (1,2). Infeksi umumnya terjadi tanpa gejala tertentu, dan penyebarannya begitu cepat dengan indikasi yang tidak jelas. Jika penyebab infeksi dapat ditentukan dengan pasti, maka pengobatan yang harus dilakukan selanjutnya akan lebih efektif dan memberikan hasil kesembuhan yang lebih baik.

Diagnosis secara dini, cepat dan spesifik merupakan suatu langkah penting dan kritis terhadap keberhasilan pengobatan infeksi. Namun, hingga saat ini belum ada metode diagnosis dini yang cepat dan akurat untuk infeksi yang disebabkan oleh *C. Albicans* (3), terutama terhadap infeksi di bagian organ dalam (*deep seated infection*). Beberapa teknik diagnosis yang dilakukan sekarang berprinsip pada teknik kultur yang memiliki sensitivitas rendah dan memakan waktu lama. Teknik lain yang digunakan adalah teknik histopatologi yang memiliki keterbatasan karena teknik ini dilakukan secara *invasive*, dan menyebabkan pendarahan serta komplikasi lain. Pemeriksaan radiologis yang dilakukan, seperti *computed tomography-scan* (CT-

*scan*), maupun radiografi konvensional, memberikan hasil yang kurang spesifik dan tidak dapat membedakan secara jelas antara infeksi yang disebabkan oleh bakteri, fungi, ataupun inflamasi steril (4,5).

Salah satu metode yang digunakan untuk menentukan kelainan di dalam tubuh dan secara spesifik dapat membedakan infeksi oleh bakteri atau fungi adalah dengan pencitraan (*imaging*) menggunakan radiofarmaka sebagai agen pencitra (*imaging agent*). Radiofarmaka merupakan suatu senyawa yang mengandung radioaktif dan digunakan baik untuk tujuan diagnosis maupun terapi. Perbedaan utama dari radiofarmaka untuk tujuan diagnosis dan terapi adalah berdasarkan radionuklida yang digunakan. Pada kebutuhan diagnosis, umumnya radionuklida yang digunakan merupakan radionuklida pemancar radiasi gamma, karena jenis radiasi ini dalam dosis tertentu tidak bersifat merusak, memiliki daya tembus yang besar dan energi transfer (F) yang kecil, serta keberadaannya di dalam tubuh dapat dideteksi dari luar menggunakan kamera gamma. Radionuklida pemancar gamma yang sering digunakan untuk tujuan diagnosis diantaranya adalah teknesium-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ), karena memancarkan gamma murni dengan waktu paruh 6 jam dan energi 140 keV. Teknesium dapat berikatan dengan senyawa yang memiliki gugus donor elektron di dalam molekulnya, baik secara langsung ataupun tidak langsung (6). Radiofarmaka yang digunakan untuk kebutuhan terapi umumnya mengandung radionuklida pemancar beta atau alfa, karena kedua radiasi ini memiliki daya

tembus yang tidak begitu besar. Namun, karena bersifat seperti partikel, berjalan lebih lambat dan memiliki energi transfer yang besar, maka radionuklida pemancar beta atau alfa memiliki daya rusak terhadap sel yang dilaluinya (7). Biasanya, radiofarmaka untuk tujuan terapi digunakan pada penderita kanker.

Dewasa ini penggunaan radiofarmaka dalam pendeteksian infeksi atau inflamasi semakin meluas. Radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -sel darah putih ( $^{99m}\text{Tc}$ -White Blood Cell atau  $^{99m}\text{Tc}$ -WBC) digunakan untuk berbagai infeksi atau inflamasi (8),  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin untuk infeksi yang disebabkan oleh bakteri,  $^{99m}\text{Tc}$ -UBI dan peptida lain untuk infeksi umum, serta  $^{99m}\text{Tc}$ -etambutol digunakan untuk deteksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (9). Namun demikian, radiofarmaka yang digunakan untuk deteksi fungi masih sangat terbatas dan masih bersifat tidak spesifik terhadap fungi. Beberapa radiofarmaka yang

digunakan untuk deteksi fungi dapat dilihat pada Tabel 1.

Ketokonazol (1-[4-(4-[(2*R*,4*S*)-2-(2,4-Dichlorophenyl)-2 (1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy)phenyl) piperazin-1-yl]ethan-1-one) bekerja spesifik terhadap sel fungi dengan cara menghambat enzim sitokrom P450 14-*alpha*-demethylase (P45014DM) yang terlibat dalam jalur biosintesis sterol dan akan mengubah lanosterol menjadi ergosterol pada membran sel fungi (13). Ketokonazol memiliki beberapa gugus donor elektron yang dapat berikatan dengan  $^{99m}\text{Tc}$ , baik secara langsung ataupun tidak langsung (14). Hasil  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol yang terbentuk diharapkan dapat menjadi sediaan radiofarmasi pilihan yang digunakan dalam pencitraan infeksi fungi yang tidak hanya sensitif, tetapi juga bersifat spesifik, terutama untuk mendiagnosis adanya infeksi fungi di dalam tubuh.

Tabel 1. Radiofarmaka yang digunakan untuk diagnosis infeksi (10)

Radiofarmaka	Metode lokalisasi	Kekurangan
Gallium-67 sitrat	Berikatan dengan laktoferrin	Tidak spesifik untuk infeksi Kualitas gambar kurang baik
$^{99m}\text{Tc}$ -leukosit	Diapedesis dan kemotaksis	Spesifik untuk inflamasi, tidak spesifik untuk infeksi
$^{99m}\text{Tc}$ -nanokoloid	Meningkatkan permeabilitas vaskuler	Tidak spesifik terhadap infeksi
$^{99m}\text{Tc}$ -liposom	Fagositosis oleh polimorf dan makrofag	Pembuatannya sulit, terakumulasi di hati dan limpa, tidak spesifik untuk infeksi
Fluoro-18-deoksiglukosa	<i>Uptake</i> oleh sel yang metabolismenya aktif	Tidak spesifik terhadap infeksi
$^{99m}\text{Tc}$ -peptida antimikroba	Terikat pada membran sel mikroba	Tidak spesifik terhadap infeksi
$^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin (infekton) (11)	Terikat pada DNA gyrase bakteri	Kendala bila terdapat resistensi
$^{99m}\text{Tc}$ -etambutol	Menghambat sintesis asam mikolat untuk pembentukan dinding sel mikobakteri	Kendala bila terdapat resistensi
$^{99m}\text{Tc}$ -flukonazol (12)	Menghambat sintesis ergosterol	Kendala bila terdapat resistensi

Pada penelitian ini dilakukan penentuan parameter penandaan ketokonazol menggunakan radionuklida teknesium-99m, meliputi pH, waktu inkubasi, jumlah reduktor, jumlah ketokonazol, dan perbandingan DTPA dengan ketokonazol. Senyawa DTPA digunakan sebagai *bifunctional agent* untuk memudahkan berlangsungnya reaksi. Hasil penandaan optimal dihitung dengan mempertimbangkan jumlah pengotor  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA,  $^{99m}\text{Tc}$ -reduksi atau oksidasi dan  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  bebas menggunakan metode radiokromatografi kertas dan radioelektroforesis kertas.

## 2. TATA KERJA

### 2.1. Peralatan dan Bahan

Peralatan yang digunakan adalah tabung reaksi, erlenmeyer, *laminar air flow*, timbangan analitik, vortex *mixer*, mikropipet 0-200  $\mu\text{L}$ , *syringe* 1 mL, 3 mL, 5 mL dan 10 mL, vial gelas 2 mL dan 12 mL, oven, ose, cawan petri, kolom gelas, *dose calibrator* (RI Deluxe Isotop Calib II, merk victoreen, model 139000N), *single channel analyzer* (merk ORTEC, model 4890) dan perangkat elektroforesis kertas. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ketokonazol,  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  (buatan PT. Batan Teknologi),  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma Aldrich), DTPA (Fluka), akuabides steril (IKA *pharma*), NaCl fisiologis (IKA *pharma*), HCl, NaOH,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , asetonitril (E. Merck), kertas saring Whatman 3 MM, Whatman 31 ET dan Whatman 1.

Untuk uji *uptake in-vivo*  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol digunakan mencit Swiss jantan dengan berat 30-40 gram yang diperoleh dari laboratorium hewan di Badan Tenaga

Nuklir Nasional (BATAN). Fungi yang digunakan adalah spesies *Candida albicans* Nctc 3149 diperoleh dari Balai Pengawasan Obat dan Makanan, Bandung.

### 2.2. Pembuatan Larutan Stok Sn-DTPA

Sebanyak 2,5 mg  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ditambahkan ke dalam vial yang berisi 75 mg DTPA dalam 5 mL akuabidest steril. Vial yang berisi larutan Sn-DTPA kemudian divakum dan disimpan pada suhu kamar. Larutan harus dibuat dalam keadaan segar.

### 2.3. Penentuan pH Optimum

Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  larutan ketokonazol (20 mg/mL HCl 0,1N) dan 150  $\mu\text{L}$  larutan Sn-DTPA di dalam 6 buah vial, masing-masing ditambah larutan HCl 0,1N/NaOH 0,1N tetes demi tetes, sehingga pH larutan bervariasi menjadi 2; 2,5; 3; 3,5; 4 dan 4,5. Ke dalam masing-masing larutan ditambahkan  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  dengan aktivitas  $\pm 2$  mCi dan volume akhir dibuat 1 mL dengan penambahan NaCl fisiologis hingga didapat pH akhir campuran 3,5; 4; 4,25; 4,5; 4,75 dan 5. Campuran diinkubasi selama 15 menit pada temperatur kamar, dikocok sesekali dan efisiensi penandaan ditentukan berdasarkan kemurnian radiokimianya.

### 2.4. Penentuan Jumlah Optimum Sn-DTPA

Pengerjaan dilakukan seperti pada percobaan 2.3, akan tetapi larutan stok Sn-DTPA yang ditambahkan adalah sebanyak 50, 100, 150, 200, 250 dan 300  $\mu\text{L}$  dengan jumlah  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  yang bervariasi, masing-masing 12,5; 25; 37,5; 50; 62,5; 75 dan 87,5  $\mu\text{g}$ . Larutan diatur hingga pH 3,5 dengan

penambahan tetes demi tetes larutan NaOH 0,1N/HCl 0,1N. Setelah itu ditambahkan  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  dengan aktivitas  $\pm 2$  mCi dan diperoleh volume akhir larutan sebanyak 1 mL dengan pH 4,5. Selanjutnya larutan diinkubasi selama 15 menit pada temperatur kamar. Efisiensi penandaan ditentukan berdasarkan kemurnian radiokimia yang dihasilkan.

### 2.5. Optimalisasi Jumlah Ketokonazol

Optimalisasi jumlah ketokonazol dilakukan seperti pada percobaan 2.4. Parameter yang divariasikan adalah jumlah ketokonazol (2, 4, 6, 8, 10 mg), sedangkan jumlah Sn-DTPA yang ditambahkan sebanyak 150  $\mu\text{L}$ . Larutan diatur hingga pH 3,5 kemudian ditambahkan  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  dengan aktivitas  $\pm 2$  mCi dan diperoleh volume akhir larutan sebanyak 1 mL dengan pH 4,5. Campuran diinkubasi selama 15 menit pada temperatur kamar. Efisiensi penandaan ditentukan berdasarkan kemurnian radiokimia yang dihasilkan.

### 2.6. Penentuan Waktu Inkubasi

Penentuan waktu inkubasi dilakukan seperti pada percobaan 2.5. Ke dalam 100  $\mu\text{L}$  larutan ketokonazol (20 mg/mL HCl 0,1N) ditambahkan 150  $\mu\text{L}$  larutan stok Sn-DTPA. Larutan diatur hingga pH 3,5, selanjutnya ditambahkan  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  dengan aktivitas  $\pm 2$  mCi dan diperoleh volume akhir larutan sebanyak 1 mL dengan pH 4,5. Campuran diinkubasi pada temperatur kamar dengan waktu bervariasi mulai dari 0, 5, 10, 15, 20 dan 30 menit. Efisiensi penandaan ditentukan berdasarkan kemurnian radiokimia yang dihasilkan

### 2.7. Penentuan Kemurnian Radiokimia

Kemurnian radiokimia  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol ditentukan dengan metode kromatografi kertas menaik (*ascending paper chromatography*). Sistem pertama yaitu fase gerak asetonitril 100% dan fase diam whatman 3 MM. Sistem pertama digunakan untuk menentukan besarnya pengotor  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  yang masih tersisa yang terdapat pada Rf 0,9-1, sedangkan  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA,  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol dan  $^{99m}\text{TcO}_2$  terdapat pada Rf 0 (15). Sistem ke dua yaitu fase gerak asetonitril 50% dan fase diam whatman 31 ET. Sistem ke dua digunakan untuk menentukan besarnya pengotor  $^{99m}\text{TcO}_2$  yang masih tersisa yang terdapat pada Rf 0, sedangkan  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA,  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol dan  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  terdapat pada Rf 1-0,9 (15). Sediaan  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol ditotolkan pada titik nol fase diam, kemudian dilusi dengan masing-masing fase gerak. Kertas dikeringkan dan dipotong-potong dengan jarak 1 cm, kemudian masing-masing bagian dicacah menggunakan alat pencacah *Single Channel Analyzer* dengan detektor NaI(Tl).

### 2.8. Elektroforesis Kertas

Metode elektroforesis kertas dilakukan menggunakan fase diam Whatman 1 (1 x 39  $\text{cm}^2$ , diberi tanda -14 sampai dengan +24) dan larutan buffer fosfat 0,02N, pH 7,5 sebagai elektrolit. Pemisahan dilakukan selama 1 jam pada tegangan 350 volt. Sediaan  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol ditotolkan pada titik nol fase diam, kemudian dielektroforesis dengan elektrolit buffer fosfat. Kertas dikeringkan dan dipotong-potong dengan jarak 1 cm,

kemudian masing-masing bagian dicacah menggunakan alat pencacah *Single Channel Analyzer* dengan detektor NaI(Tl).

### 2.9. Uptake In-vivo Sediaan $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol Terhadap *C. albicans*

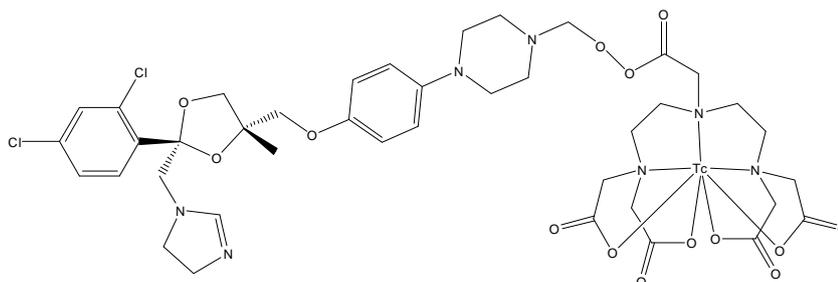
Sebanyak  $2 \times 10^6$  CFU *C. albicans* dalam 0,1 mL larutan NaCl fisiologis (diketahui dengan menggunakan standar Mc Farland) disuntikkan ke otot paha mencit jenis Swiss kemudian diinduksi selama 48 jam (14). Selanjutnya sediaan  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol disuntikkan ke ekor mencit secara intra vena. Setelah dua jam, mencit dibunuh dan organ-organ pentingnya, yaitu otot yang terinfeksi (T), otot yang tidak terinfeksi (NT), darah, usus, hati, ginjal, limpa, jantung dan kandung kemih diambil. Masing-masing organ kemudian ditimbang dan dicacah menggunakan alat *Single Channel Analyzer* dengan detektor NaI(Tl). Persentase penimbunan per gram organ dihitung dan dibandingkan antara target yang terinfeksi dengan yang tidak terinfeksi.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Secara kimia, ketokonazol memiliki beberapa atom donor elektron yang memungkinkan senyawa ini untuk ditandai dengan radionuklida  $^{99m}\text{Tc}$ , namun dalam kenyataannya, penandaan sulit

dilaksanakan. Hal ini disebabkan efek sterik yang dimiliki oleh masing-masing atom donor elektron, sehingga ketokonazol cukup sulit untuk ditandai secara langsung. Oleh karena itu, dalam penelitian ini digunakan teknik penandaan secara tidak langsung dengan menggunakan ko-ligan agar reaksi dapat terjadi. Ko-ligan yang digunakan yaitu dietilen triamin pentaasetat (DTPA). Senyawa DTPA akan bertindak sebagai *bifunctional agent* / jembatan penghubung antara atom  $^{99m}\text{Tc}$  dengan ketokonazol. Kompleks yang terjadi antara ketokonazol dengan DTPA dan Tc merupakan suatu kompleks khelat, dimana atom Tc akan terikat pada atom N dan beberapa atom O yang terdapat di dalam molekul DTPA. Perkiraan struktur molekul senyawa  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 1.

Dalam penandaan suatu senyawa atau ligan dengan radionuklida  $^{99m}\text{Tc}$  melalui pembentukan kompleks, terdapat beberapa faktor yang harus diperhatikan antara lain jumlah reduktor, jumlah ligan dan waktu inkubasi. Selain itu, kestabilan suatu kompleks sangat dipengaruhi oleh pH, sehingga penandaan harus dilakukan pada kondisi pH yang menyebabkan kompleks yang terbentuk menjadi stabil.



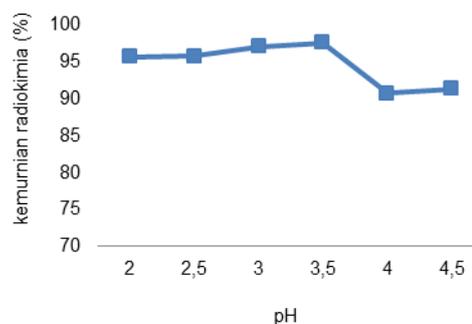
Gambar 1. Perkiraan struktur  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol.

Dalam penandaan  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol dan DTPA sebagai ko-ligan, dilakukan penentuan kondisi optimal dengan membuat variasi pada beberapa parameter, meliputi pH penandaan, jumlah ligan, ko-ligan dan reduktor serta waktu inkubasi. Efisiensi penandaan  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol ditentukan berdasarkan kemurnian radiokimia dengan menggunakan 2 sistem kromatografi kertas. Pertama, menggunakan fase diam Whatman 3MM dan fase gerak asetonitril. Ke dua menggunakan fase diam Whatman 31ET dan fase gerak asetonitril 50%. Sistem pertama dapat memisahkan pengotor radiokimia dalam bentuk ( $^{99m}\text{TcO}_4$ )<sup>-</sup> pada Rf 0,9-1,0 (15), sedangkan  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol berada pada Rf 0,0. Sistem ke dua memisahkan pengotor radiokimia dalam bentuk  $^{99m}\text{Tc}$  tereduksi ( $^{99m}\text{TcO}_2$ ) pada Rf 0,0 (15) dan  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol pada Rf 0,9-1,0. Dengan cara ini, persentase efisiensi penandaan dan tingkat kemurnian  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol yang terbentuk dapat dihitung menggunakan persamaan [1].

$$\text{Efisiensi \% penandaan } ^{99m}\text{Tc-DTPA-ketokonazol} = 100 - \left[ \frac{^{99m}\text{TcO}_2 + (^{99m}\text{TcO}_4)}{^{99m}\text{TcO}_2 + (^{99m}\text{TcO}_4)} \right] \quad [1]$$

Salah satu faktor yang sangat berperan dalam proses penandaan dengan radionuklida  $^{99m}\text{Tc}$  adalah pH. Faktor pH berperan penting dalam kestabilan senyawa bertanda. Menurut Pharmaceutical Codex (16), senyawa yang akan disuntikkan secara intra vena sebaiknya memiliki pH yang dapat diterima oleh darah, yaitu antara 3-10,5. Pada pH yang lebih tinggi dari 10,5 kerusakan jaringan sering terjadi, sedangkan pada pH lebih rendah dari 3,

biasanya terjadi rasa sakit pada lokasi penyuntikan. Pada penelitian ini, diperoleh kondisi optimal penandaan pada pH 3,5 (pH akhir 4,5) dengan kemurnian radiokimia sebesar  $97,77 \pm 0,33\%$ . Pada pH > 4,5 kemurnian radiokimia menjadi turun < 95% dan pada pH akhir di atas 5,25, larutan menjadi keruh. Hal ini menandakan bahwa pada pH tinggi, terjadi pembentukan  $\text{TcO}_2$  yang lebih banyak dan senyawa ketokonazol yang tidak larut. Keuntungan lain yang didapat pada pH yang rendah, Sn(II) yang terbentuk bersifat reduktor, sedangkan pada kondisi basa Sn membentuk ion  $\text{Sn}(\text{OH})_3^-$  yang tidak bersifat reduktor (17), sehingga proses reduksi Tc (VII) untuk mencapai bilangan oksidasi yang lebih rendah menjadi lebih sukar terbentuk (Tc(IV)) (17). Hasil penandaan dengan pH bervariasi dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kemurnian radiokimia  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol pada variasi pH penandaan.

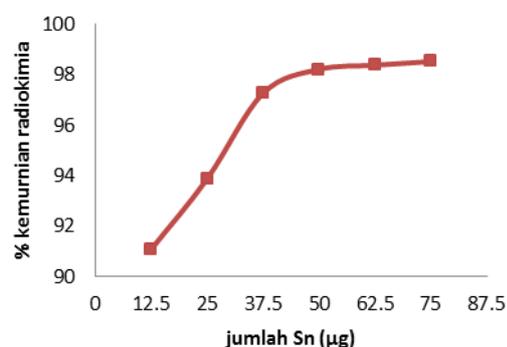
Faktor lain yang perlu diperhatikan pada saat penandaan ketokonazol dengan radionuklida  $^{99m}\text{Tc}$  adalah jumlah reduktor Sn (II) yang ditambahkan ke dalam larutan ketokonazol. Jumlah  $\text{SnCl}_2$  harus optimal karena dapat mereduksi  $^{99m/99}\text{Tc}$ -perteknetat yang terkandung di dalam eluat hasil dari generator. Selain itu, mengingat Tc(VII)

dapat tereduksi menjadi beberapa tingkat oksidasi yang berbeda, maka jumlah reduktor (Sn(II)) yang digunakan harus terkendali dengan baik agar jumlah pengotor  $^{99m}\text{TcO}_2$  maupun  $(^{99m}\text{TcO}_4)^-$  yang terkandung di dalam larutan berjumlah minimal. Jika jumlah Sn (II) terlalu banyak, maka akan terbentuk  $\text{SnO}(\text{OH})_2$  yang tidak dapat membentuk senyawa kompleks, tetapi jika jumlah Sn(II) yang ditambahkan ke dalam larutan kurang, maka jumlah  $(^{99m}\text{TcO}_4)^-$  yang tidak bereaksi masih banyak. Pada Gambar 2 diketahui jumlah Sn(II) yang diperlukan untuk mendapatkan hasil penandaan yang optimal adalah sebesar 37,5  $\mu\text{g}$ . Pada nilai yang lebih rendah, diperoleh hasil yang kurang optimal. Hal ini disebabkan Sn(II) belum cukup untuk mereduksi Tc(VII) menjadi Tc(IV).

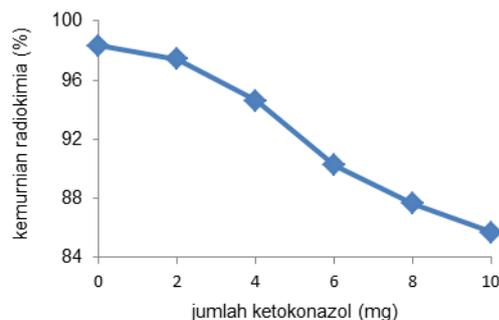
Jumlah Sn(II) optimal yang diambil untuk percobaan selanjutnya sebanyak 37,5  $\mu\text{g}$ , karena pada nilai yang lebih tinggi dari 50  $\mu\text{g}$ , jumlah DTPA yang terkandung di dalam larutan stok Sn-DTPA terlalu besar dan menghasilkan pengotor  $^{99m}\text{Tc-DTPA}$  yang cukup besar sehingga dapat mengganggu  $^{99m}\text{Tc-DTPA-ketokonazol}$  yang terbentuk. Nilai kemurnian radiokimia  $^{99m}\text{Tc-DTPA-ketokonazol}$  yang terbentuk dengan variasi jumlah  $\text{SnCl}_2$  dapat dilihat pada Gambar 3.

Parameter penting lainnya dalam penandaan adalah jumlah ligan pembentuk kompleks. Jumlah ligan yang tidak optimal akan menyebabkan jumlah pengotor naik dan efisiensi penandaan turun. Seperti terlihat pada Gambar 4, semakin besar jumlah ligan, kemurnian radiokimia menjadi semakin kecil. Hal ini disebabkan ikatan

ligan dengan ko-ligan berada pada perbandingan mol yang optimal untuk menghasilkan kemurnian radiokimia yang tinggi. Pada penandaan ketokonazol dengan radionuklida  $^{99m}\text{Tc}$  dan ko-ligan DTPA, semakin tinggi jumlah ketokonazol untuk jumlah DTPA yang tetap, akan menghasilkan penurunan kemurnian radiokimia.



Gambar 3. Kemurnian radiokimia  $^{99m}\text{Tc-DTPA-ketokonazol}$  pada variasi jumlah reduktor  $\text{SnCl}_2$ .



Gambar 4. Optimalisasi jumlah ketokonazol pada penandaan  $^{99m}\text{Tc-DTPA-ketokonazol}$ .

Hasil kemurnian radiokimia optimal  $^{99m}\text{Tc-DTPA-ketokonazol}$  yang diperoleh pada jumlah ketokonazol 2 mg sebesar  $97,43 \pm 0,03\%$ . Dalam hal ini, apabila jumlah ketokonazol lebih kecil maka senyawa yang akan terbentuk adalah pengotor  $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ .

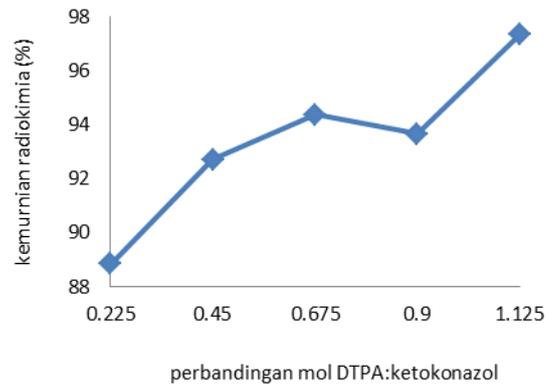
Dalam penandaan ketokonazol

dengan radionuklida teknesium, digunakan ko-ligan (*bifunctional agent*) sebagai jembatan penghubung antara ketokonazol dengan atom Tc. Jumlah DTPA yang digunakan harus optimal agar hasil penandaan yang didapat adalah  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol. Jika komposisi antara DTPA dan ketokonazol tidak sesuai, maka kompleks  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol tidak akan terbentuk secara sempurna. Kompleks yang terjadi akan terkotori dengan kompleks  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA. Oleh karena itu dilakukan optimalisasi perbandingan antara Sn yang sebelumnya telah diketahui jumlah optimalnya dengan jumlah DTPA yang digunakan.

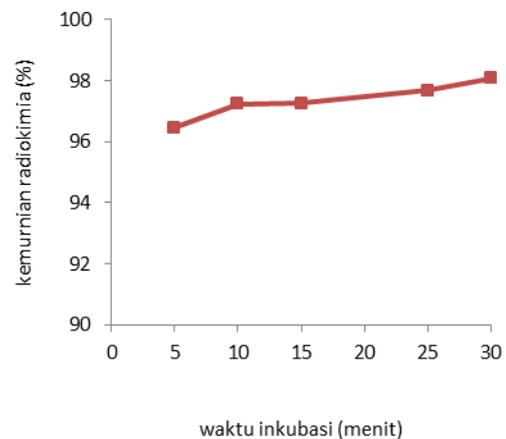
Berdasarkan Gambar 5, diketahui perbandingan mol DTPA : ketokonazol optimal yang digunakan, adalah 1 : 1,125 dengan efisiensi penandaan sebesar  $97,33 \pm 0,16\%$ . Dari hasil yang didapat pada Gambar 5, diketahui bahwa secara umum, untuk dapat berikatan dengan 1 atom Tc, diperlukan 1 molekul DTPA sebagai jembatan penghubung antara Tc dengan ketokonazol.

Pengaruh waktu inkubasi (5 s/d 30 menit) pada temperatur ruangan terhadap efisiensi penandaan  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol diperlihatkan pada Gambar 6. Dari hasil percobaan terlihat bahwa penambahan waktu inkubasi tidak mengakibatkan perbedaan hasil yang signifikan, yaitu masih berada pada kemurnian radiokimia  $97,37 \pm 0,79\%$ . Hasil ini memudahkan pada saat penandaan di rumah sakit karena penanganan yang relatif mudah, hanya cukup ditambahkan dengan  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  dan dengan waktu inkubasi yang

cukup singkat. Untuk selanjutnya waktu yang digunakan adalah antara 5 -10 menit inkubasi pada temperatur kamar sebelum digunakan.



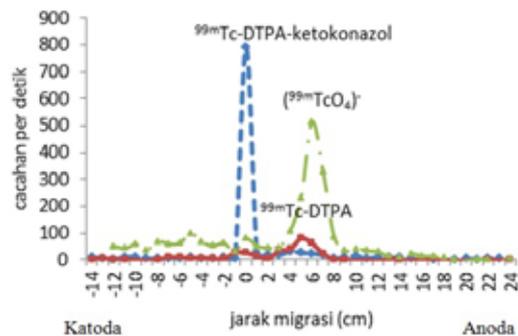
Gambar 5. Pengaruh perbandingan DTPA ketokonazol terhadap kemurnian radiokimia  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol.



Gambar 6. Pengaruh waktu inkubasi optimal pada penandaan  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol.

Untuk menegaskan bahwa kompleks yang terbentuk adalah  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol, maka dilakukan penentuan muatan listrik dari  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol,  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA dan  $(^{99m}\text{TcO}_4)^-$ . Dari hasil percobaan yang diperlihatkan pada Gambar 7, didapatkan bahwa puncak yang terdeteksi berbeda antara ketiga senyawa tersebut. Senyawa  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  bergerak paling jauh menuju anoda, hal ini

menunjukkan bahwa muatan ( $^{99m}\text{TcO}_4$ )<sup>-</sup> hasil ionisasi lebih negatif dibandingkan dengan kedua senyawa lain. Senyawa  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA juga bermuatan negatif, namun tidak bergerak sejauh  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ .

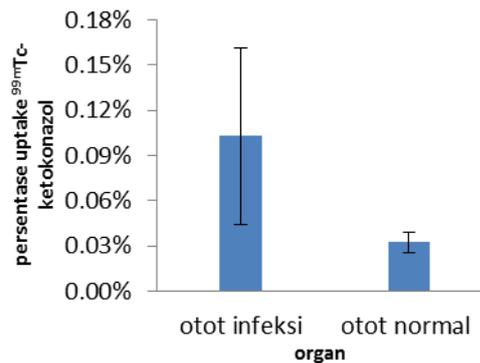


Gambar 7. Elektrofogram  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol,  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA.

Hasil ini sesuai dengan Saha, 2003 (14) yang menyatakan bahwa pada kompleks  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA, bilangan oksidasi dari  $^{99m}\text{Tc}$  yang berikatan dengan DTPA pada larutan pH netral adalah +4, sedangkan DTPA sendiri memiliki 5 asam karboksilat yang bila digabungkan akan membentuk senyawa dengan muatan -1, sedangkan senyawa  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol tidak bergerak dari titik penotolan, dan ini menandakan bahwa senyawa yang terbentuk tidak bermuatan.

Pada penelitian ini dilakukan juga uji coba *uptake in-vivo* pada hewan percobaan mencit yang diinduksi *C. albicans* untuk mengetahui akumulasi senyawa  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol pada organ yang terinfeksi *C. albicans* (T) dengan organ yang tidak terinfeksi (NT). Hasil pengamatan menunjukkan perbedaan *uptake* yang cukup besar antara organ yang terinfeksi dengan organ yang tidak terinfeksi dengan rasio

(T/NT) sebesar  $3,16 \pm 0,04$  (n=5) setelah 2 jam injeksi. Hasil pencitraan diharapkan dapat membedakan antara organ terinfeksi *C.albicans* dengan organ yang normal seperti ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Distribusi  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol setelah 2 jam penyuntikan pada otot hewan yang diinfeksi.

#### 4. KESIMPULAN

Penandaan  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol telah berhasil dilakukan dengan kemurnian radiokimia sebesar  $97,77 \% \pm 0,33 \%$  pada jumlah ketokonazol sebanyak 2 mg; DTPA 1,125 mg; reduktor  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3,75  $\mu\text{g}$ ; pH 4,5 dan waktu inkubasi 5 menit. Uji *uptake in-vivo*  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-ketokonazol pada mencit yang diinfeksi dengan *C. albicans*, menunjukkan rasio *uptake* pada organ terinfeksi terhadap organ yang tidak terinfeksi (T/NT) sebesar  $3,16 \pm 0,04$  (n=5) setelah 2 jam injeksi.

#### 5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kemenristek atas biaya yang telah diberikan sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik. Terima kasih juga disampaikan kepada Sdr. Iswahyudi dan rekan-rekan di kelompok SSB dan

Biodinamika Bidang SBR PTNBR-BATAN yang telah memberikan bantuan dalam pelaksanaan penelitian ini.

## 6. DAFTAR PUSTAKA

1. Arendrup MC. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care* 2010;16(5): 445–52.
2. Gompelmann D, Heussel CP, Schuhmann M, Herth FJ. The role of diagnostic imaging in the management of invasive fungal diseases: report from an interactive workshop. *Mycoses* 2011;54 Suppl 1: 27–31.
3. Groll AH, McNeil Grist L. Current challenges in the diagnosis and management of invasive fungal infections: report from the 15<sup>th</sup> International Symposium on Infections in the Immunocompromised. Host: Thessaloniki, Greece, 22– 25 June 2008. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33(2):101- 4.
4. Grossi PA. Aspects of invasive candidiasis in solid organ transplant recipients. *Drugs* 2009; 69 Suppl 1:15– 20.
5. Kartini, NO, Kustiwa, Isabela E. Pengembangan senyawa bertanda  $^{99m}\text{Tc}$ -etambutol untuk deteksi tuberkulosis: 1. Penandaan etambutol dengan radionuklida teknesium-99m. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknik Nuklir*; 14-15 Juni 2005; Bandung; Bandung: Puslitbang Teknik Nuklir, Batan; 2005.
6. Komarek P, Kleisner I, Komarkova I, et al. The use of redox polymers in labelling procedures of proteins and peptides with  $^{99m}\text{Tc}$ . II. Technique of preparations of kits for protein labeling by  $^{99m}\text{Tc}$  and its effect on stability and radiochemical purity. *Nucl Med Rev* 2000;3: 69-72.
7. Kuleta JK, Kozik MR, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular basis of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol* 2009;56: 211-24.
8. Leleu G, Aegerter P, Guidet B. Systemic candidiasis in intensive care units: a multicenter, matched-cohort study. *J Crit Care* 2002;17(3): 168–75.
9. Siaens RH, Rennen HJ, Boerman OC, Dierckx R, Slegers G. Synthesis and comparison of  $^{99m}\text{Tc}$ -enrofloxacin and  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin. *J Nucl Med* 2004; 45: 2088–94.
10. Das SS, Hall AV, Wareham DW, Britton KE. Infection imaging with radiopharmaceuticals in the 21st century. *Brazilian Archives of Biology and Technology, an international Journal* 2002 Sept;45 Special..
11. Vinjamuri S, Hall AV. Comparison of  $^{99m}\text{Tc}$  infecton imaging with radiolabelled white-cell imaging in the evaluation of bacterial infection. *Lancet* 1996;347: 233.
12. Lupetti A, Welling MM, Mazzi U, Nibbering PH, Pauwels EKJ. Technetium-99m labelled fluconazole and antimicrobial peptides for imaging of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* infections. *European Journal of Nuclear Medicine* 2002 May;29(5).
13. Hall GS. Interactions of yeasts, moulds

- and antifungal agents; how to detect resistance. Springer; Humana Press; 2011
14. Saha GB. Fundamentals of nuclear pharmacy. 5th ed. Springer. p. 98-102.
15. IAEA. Technetium-99m radiopharmaceuticals: manufacture of kits. Technical reports series no.466. Vienna: International Atomic Energy Agency; 2008.
16. Lund W. The pharmaceutical codex, principles and practice of pharmaceuticals.12th ed. London: The Pharmaceutical Press; 1994.
17. Zolle I. Technetium-99m pharmaceuticals: preparation and quality control in nuclear medicine. Berlin Heidelberg: Springer; 2007.