

## PREPARASI RADIOFARMAKA $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-INH UNTUK DIAGNOSIS TUBERKULOSIS

Laksmi Andri Astuti, Sri Setyowati, Triningsih, Maskur dan Widyastuti  
Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka (PRR)  
Badan Tenaga Nuklir Nasional

### ABSTRAK

**PREPARASI RADIOFARMAKA  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-INH UNTUK DIAGNOSIS TUBERKULOSIS.** Radiofarmaka telah menunjukkan manfaat yang nyata dan spesifik dalam pelayanan kesehatan terutama untuk diagnosis dan terapi antara lain untuk penyakit kanker dan infeksi. Salah satu cara menangani banyaknya kasus tuberkulosis yang banyak terdapat di Indonesia, teknik kedokteran nuklir menggunakan radiofarmaka *diethylenetriaminepentaacetic acid-isonicotinic acid hydrazide* (DTPA-INH) yang yang ditandai dengan teknesium-99m dapat dipakai salah satu metoda alternatif untuk diagnosis tuberkulosis. Saat ini telah dilakukan preparasi  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-INH,  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-INH dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu: konyugasi DTPA-INH dan analisis hasil konyugasi dengan HPLC kolom C-18. Penandaan DTPA-INH dengan Tc-99m dilakukan dengan menambahkan  $\text{SnCl}_2$  sebagai reduktor dan larutan  $^{99m}\text{Tc}$  perteknetat dari generator  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ . Hasil penandaan dianalisis dengan menggunakan kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis, sedangkan stabilitas DTPA-INH dilakukan untuk menentukan waktu kadaluwarsanya. Hasil analisis dengan HPLC menggunakan kolom C-18 menunjukkan telah terjadi konyugasi antara DTPA dengan INH, sedangkan analisis dengan kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis menunjukkan kemurnian radiokimia lebih besar dari 90 % dan hasil pelabelan terbaik didapatkan pada penambahan  $\text{SnCl}_2$  sebanyak 200  $\mu\text{g}$ . Hasil uji stabilitas untuk sediaan yang belum dilabel, menunjukkan sediaan masih stabil pada minggu ke 13. Pengujian kestabilan  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-INH pada suhu kamar menunjukkan kemurnian radiokimia masih stabil sampai 3 jam setelah penandaan.

**Kata kunci :** radiofarmaka, Tc-99m, DTPA, INH, diagnosis, tuberkulosis.

### ABSTRACT

**PREPARATION OF  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-INH RADIOPHARMACEUTICALS FOR TUBERCULOSIS DIAGNOSIS.** Radiopharmaceuticals have shown a real and spesifik usefulness in medical services, especially for diagnosis and therapy of several deadly diseases such as cancer and infection. To handle Tuberculosis which is common in Indonesia, nuclear medicine techniques which uses DTPA-INH radiopharmaceutical labeled with technetium-99m offer an alternative method for tuberculosis diagnosis. Preparation of  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-INH and its analysis have been carried out. The preparation consisted of several steps, conjugation of DTPA with INH and the conjugated DTPA-INH was labeled with  $^{99m}\text{Tc}$ , followed by C-18 HPLC analysis. Radiochemical purity of  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-INH was analysed using TLC/paper chromatography. Stability test of DTPA-INH to know the expiry date was carried out . The HPLC result showed that the conjugated DTPA-INH has been formed. The radiochemical purity of  $^{99m}\text{Tc}$ -TPA-INH analysed with TLC/paper chromatography was obtained at higher than 90 %. Best result was obtained by addition of 200  $\mu\text{gram}$  of  $\text{SnCl}_2$ . The stability test showed that DTPA-INH was stable until 13 weeks and the stability of labeled DTPA-INH at room temperature was stable after 3 hours incubation post labeling.

**Key words:** radiopharmaceutical, Tc-99m, DTPA, INH, diagnosis, tuberculosis

## PENDAHULUAN

Penyakit tuberkulosis adalah penyakit menular langsung yang disebabkan oleh kuman TB (*Mycobacterium Tuberculosis*), sebagian besar kuman TB menyerang Paru, tetapi dapat Juga mengenai organ tubuh lainnya. Kuman Tuberkulosis berbentuk batang, mempunyai sifat khusus yaitu tahan terhadap asam pada pewarnaan. Oleh karena itu disebut pula sebagai Basil Tahan Asam (BTA). Kuman TB cepat mati dengan sinar matahari langsung, tetapi dapat bertahan hidup beberapa jam di tempat yang gelap dan lembab. Dalam jaringan tubuh kuman ini dapat *dormant*, tertidur lama selama beberapa tahun. Diperkirakan setiap tahun 450.000 kasus baru TB dimana sekitar 1/3 penderita terdapat disekitar puskesmas, 1/3 ditemukan di pelayanan rumah sakit/klinik pemerintah dan swasta, praktek swasta dan sisanya belum terjangkau unit pelayanan kesehatan. Sedangkan kematian karena TB diperkirakan 175.000 per tahun. Penyakit TB menyerang sebagian besar kelompok usia kerja produktif [1]

Isoniazid atau isonikotinil hidrazid (INH) secara *in vitro* bersifat *tuberkulostatik* (menahan perkembangan bakteri) dan *tuberkulosid* (membunuh bakteri). Mekanisme kerja isoniazid memiliki efek pada lemak, biosintesis asam nukleat, dan glikolisis. Efek utamanya ialah menghambat biosintesis asam mikolat (*mycolic acid*) yang merupakan unsur penting dinding sel mikobakterium. Isoniazid menghilangkan sifat tahan asam dan menurunkan jumlah lemak yang terekstrasi oleh metanol dari mikobakterium. Isoniazid masih merupakan obat yang sangat penting untuk mengobati semua tipe TBC. Efek sampingnya

dapat menimbulkan anemia sehingga dianjurkan juga untuk mengkonsumsi vitamin penambah darah seperti piridoksin (vitamin B6)

Diagnosis TBC secara konvensional biasanya dilakukan dengan sinar-X (roentgen), tes *Mantoux* atau uji apus *sputum*. Pemeriksaan dengan sinar-X sangat akurat bagi TBC paru-paru, tetapi bagi TBC extra paru-paru sering kurang akurat. Demikian halnya dengan kedua metode yang lain sering memberikan hasil yang negatif. Teknik diagnosis dengan metode pencitraan (*imaging*) menggunakan beberapa peralatan, diantaranya *magnetic resonance imaging* (MRI), *ultra sonography* (USG), (*CT-Scan*) atau cara lain, kadang-kadang tidak dapat diterapkan secara spesifik untuk lokasi infeksi yang terjadi pada bagian tubuh yang sangat dalam (*deep sealed infection*), misalnya dalam tulang dan persendian [2].

Radiofarmaka yang umum digunakan untuk diagnosis penyakit antara lain Tc-99m-MIBI untuk diagnosis perfusi jantung, Tc-99m-HMPAO untuk diagnosis perfusi otak dan lain-lain. Untuk diagnosis TB radiofarmaka yang memungkinkan dikembangkan di Indonesia adalah Tc-99m-DTPA-INH. Radionuklida yang digunakan untuk penandaan sediaan radiofarmaka ini adalah Tc-99m karena memiliki beberapa keunggulan, antara lain dapat berikatan secara kimia dengan bermacam-macam ligan dan mempunyai umur paruh 6 jam dengan energi gamma 140 keV [3], sifat-sifat tersebut sangat ideal sebagai radiofarmaka penyidik tuberkulosis. Disamping itu penggunaan Tc-99m di kedokteran nuklir di Indonesia sudah rutin melalui pengadaan generator Mo-99/Tc-99m dari PT Batan

Teknologi. Isoniazid sampai sekarang masih merupakan obat yang sangat penting untuk mengobati semua tipe TBC. Isoniazid selain bersifat *tuberkulostatik* juga bersifat *tuberkulosid* (membunuh bakteri), berdasarkan sifat ini maka Isoniazid bertanda radioaktif dapat terakumulasi pada daerah yang terakumulasi bakteri, dalam hal ini *Mycobacterium tuberculosis*. Isoniazid dapat dilabel dengan Teknesium Tc-99m melalui metoda tidak langsung, yaitu dikonyugasikan dengan suatu ligan yang disebut *bifunctional chelating agent* (BFC) dimana ligan tersebut akan dapat berikatan dengan Tc-99m melalui ikatan kompleks koordinat. Senyawa BFC yang umum digunakan ialah MAG3, DTPA, DOTA dan HYNIC.

Tingginya angka penyebaran penyakit Tuberkulosis sudah menjadi masalah yang sangat serius di seluruh dunia tak terkecuali di Indonesia. Salah satu kegagalan program pengendalian penyakit TBC adalah kelemahan dalam diagnostik[4]. Teknik kedokteran nuklir berupaya melengkapi kelemahan pada diagnosis konvensional dengan mengembangkan radiofarmaka yang lebih spesifik sehingga apabila disuntikkan ke tubuh manusia, radiofarmaka tersebut akan terakumulasi di tempat terjadinya TBC. Senyawa bertanda  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-INH diharapkan dapat digunakan untuk tujuan tersebut. Pada penelitian ini dilaporkan hasil preparasi  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-INH yang meliputi konyugasi DTPA-INH, penandaan dengan  $^{99m}\text{Tc}$  beserta analisisnya, uji stabilitas selama penyimpanan dan uji stabilitas sediaan pada suhu kamar. Diharapkan hasil penelitian ini dapat menyumbangkan tambahan informasi dalam pengembangan radiofarmaka di Indonesia.

## BAHAN DAN TATA KERJA

### Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan adalah  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Aldrich), Isoniazid (Sigma), DTPA anhydride (Aldrich), DMF (Sigma), Triethylamine (Sigma), ITLC-SG (Gelman), Tc-99m (Batan Teknologi), gas nitrogen (lokal), TFA (Fluka), Metanol (Merck),  $\text{NaHCO}_3$  (Merck), Aseton (Merck), air bidestilasi steril (IPHA) dll.

Alat yang digunakan ialah peralatan gelas standar, Syringe dan pipet eppendorf sebagai ukuran, timbangan analitik, *rotary evaporator*, pH meter, HPLC (Shimadzu) peralatan kromatografi kertas/lapis tipis, TLC scanner (Veenstra Instrumen).

### Tata kerja

#### Konyugasi DTPA-INH

DTPA yang sudah dilarutkan dalam DMF direaksikan dengan INH dengan perbandingan mol 1:3 kemudian ditambahkan triethylamine sebanyak 2,2 mol, reaksi dibiarkan kurang lebih 24 jam, kesempurnaan reaksi dicek dg pelat TLC dengan eluen 0,05% TFA dan metanol dengan perbandingan volume 3:2, spesi INH akan terelusi pada Rf 0,89, sedangkan spesi DTPA-INH akan terelusi pada Rf 0,75. Triethylamine dan DMF diuapkan pada tekanan rendah pada temperatur 50°C dengan memakai alat *rotary-evaporator* [5], hasil konyugat disimpan pada suhu -40°C. Kemurnian konyugat DTPA-INH dianalisis dengan HPLC kolom C-18 fasa balik dengan menggunakan pelarut 0,5% TFA dan metanol dengan perbandingan volume 7:3 .

## Penandaan $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-INH

Penandaan dengan Tc-99m dilakukan dengan cara : melarutkan 5 $\mu\text{g}$  konyugat DTPA-INH dalam 1 ml air steril, kemudian tambahkan 100-220 larutan SnCl<sub>2</sub>, Sn(II) disini berfungsi sebagai reduktor untuk mereduksi Tc-99m. Kemudian pH diatur menjadi 7,5 dengan menggunakan NaHCO<sub>3</sub>, lalu tambahkan 2 mCi larutan Tc-99m. Inkubasi dilakukan selama 15 menit pada temperatur kamar.

## Analisis

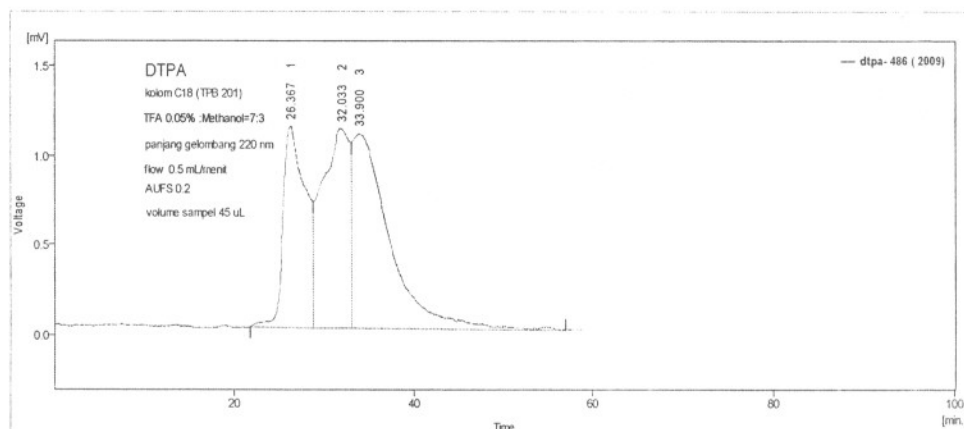
Analisis yang dilakukan meliputi karakterisasi sediaan sebelum dilabel menggunakan HPLC kolom C-18 untuk mengetahui waktu retensinya dan analisis efisiensi pelabelan dan kemurnian radiokimia menggunakan kromatografi lapi tipis dengan fasa diam ITLC-SG sedangkan untuk fasa gerak dipakai aseton. Kromatografi lapis tipis (KLT) ini untuk menentukan % Tc bebas karena spesi Tc bebas akan terelusi pada R<sub>f</sub> (0,9-1), sedangkan spesi konyugat Tc-99m-DTPA-INH akan tertahan pada R<sub>f</sub> 0 sedangkan untuk menentukan % Tc koloid dipakai fasa gerak Pyridine:asam asetat: air (3:2,5:1).

## Uji stabilitas

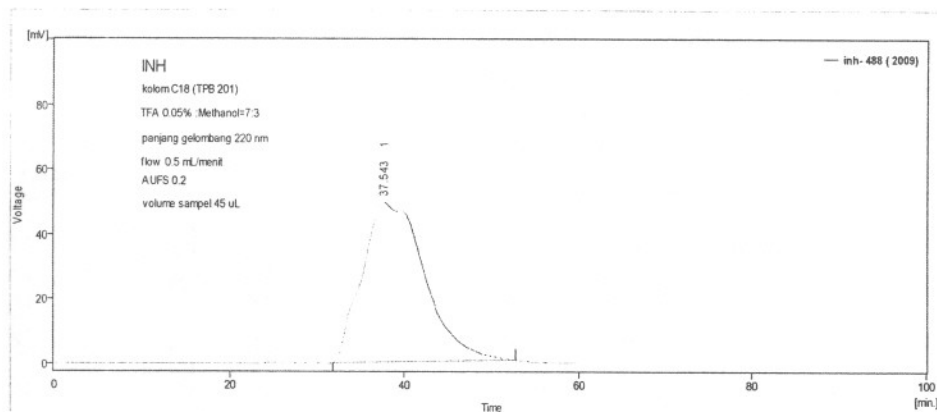
Uji stabilitas yang akan dilakukan meliputi uji stabilitas sediaan yang belum dilabel terhadap penyimpanan untuk menentukan waktu kadaluwarsanya (*shelf life*). Stabilitas sediaan yang belum dilabel ( konyugat DTPA-INH ) akan diamati setiap minggu dengan cara melakukan penandaan dengan Tc-99m, hasil penandaan dilakukan analisis efisiensi pelabelan dan kemurnian radiokimia menggunakan kromatografi lapis tipis dengan fasa diam ITLC-SG sedangkan untuk fasa gerak dipakai aseton, penandaan ini akan diulang sampai dengan waktu dimana sediaan ini menunjukkan penurunan efisiensi pelabelan yang signifikan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

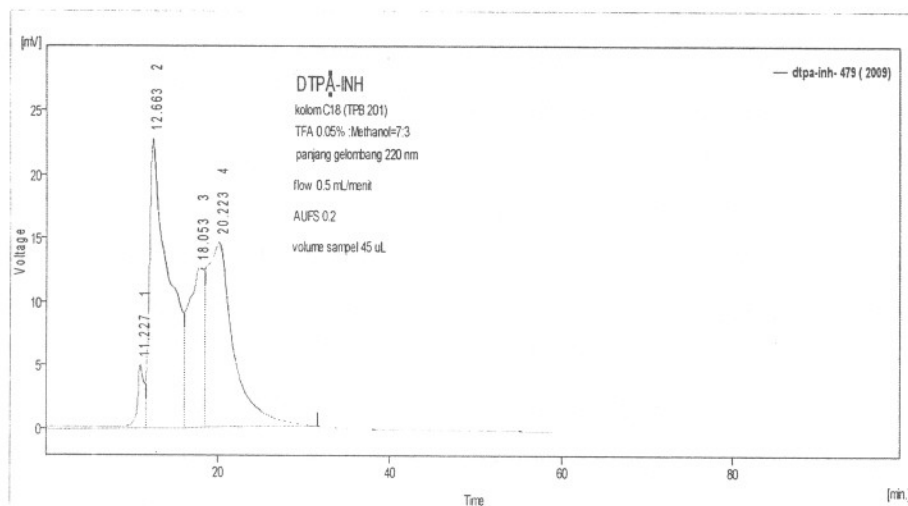
Hasil analisis dengan HPLC kolom C-18 dapat dilihat pada gambar 1, gambar 2 dan gambar 3. Gambar 1 adalah kromatogram HPLC dari DTPA dengan eluen TFA 0,5% : metanol (7:3), *flow rate* 0,5 ml/mnt detektor uv pada panjang gelombang 220nm.



**Gambar 1.** Kromatogram HPLC DTPA kolom C-18 (TPB 201), eluen TFA 0,05%:metanol ( 7 : 3 ), *flow rate* 0,5 ml/mnt detektor UV dengan panjang gelombang 220 nm.



**Gambar 2.** Kromatogram HPLC INH kolom C-18 (TPB 201), eluen TFA 0,05% :metanol (7 : 3) *flow rate* 0,5 ml/mnt, detektor UV dengan panjang gelombang 220 nm

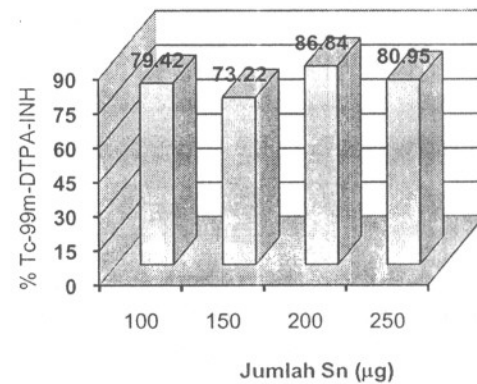


**Gambar 3.** Kromatogram HPLC konyugat DTPA-INH kolom C-18 (TPB 201), eluen TFA 0,05% : metanol (7 : 3) *flow rate* 0,5 ml/mnt detektor UV dengan panjang gelombang 220 nm.

dari gambar 1 dapat dilihat bahwa kromatogram DTPA menunjukkan puncak 1 pada menit ke 26,360, puncak ke 2 pada menit ke 32,033 dan puncak ke 3 pada menit 33,90. Gambar 2 adalah kromatogram HPLC dari INH, dari gambar 2 menunjukkan bahwa INH terdeteksi pada 1 puncak dengan waktu retensi 37,543 menit. Gambar 3 adalah kromatogram dari HPLC konyugat DTPA-INH, dari gambar 3 ini dapat dilihat bahwa puncak yang signifikan ada 2 puncak yaitu puncak 1 pada menit ke 12,663 dan puncak 2 pada menit ke 20,223. Dari gambar 1, gambar 2 dan gambar 3 ini dapat dilihat bahwa tidak

terdapat puncak yang sama dari DTPA maupun INH yang terdeteksi di kromatogram konyugat DTPA-INH, dengan demikian bisa disimpulkan bahwa semua DTPA maupun INH telah berubah menjadi konyugat DTPA INH. Hal ini diperkuat dengan pemantauan kesempurnaan reaksi yang dilakukan dengan cara dicek dg pelat TLC dengan eluen 0,05% TFA dan metanol dengan perbandingan volum 3:2 ternyata hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa spesi INH akan terelusi pada  $R_f$  0,89, sedangkan spesi DTPA-INH akan terelusi pada  $R_f$  0,75[5].

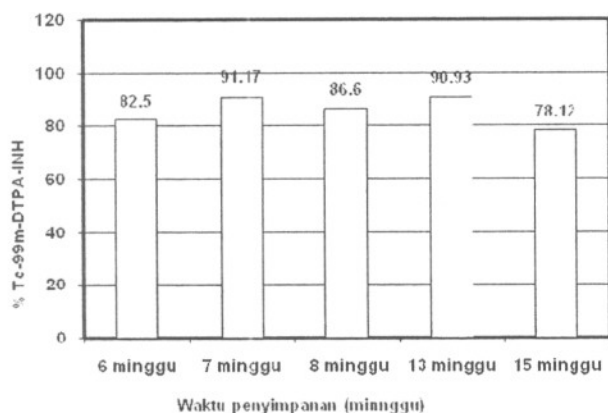
Hasil kemurnian radiokimia dengan kromatografi kertas/KLT untuk Tc-99m-DTPA-INH pada variasi jumlah SnCl<sub>2</sub> dapat dilihat pada gambar 4, penandaan dilakukan dengan menggunakan 5 µg konyugat, <sup>99m</sup>Tc yang ditambahkan 2 mCi dan waktu inkubasi 15 menit. Dari gambar 4 dapat dilihat bahwa pada dengan penambahan 100 µg SnCl<sub>2</sub> didapatkan Tc-99m-DTPA-INH sebesar 79,42 %, untuk penambahan SnCl<sub>2</sub> sebanyak 150 µg didapatkan Tc-99m-DTPA-INH sebesar 73,22%, untuk penambahan SnCl<sub>2</sub> sebanyak 200 µg didapatkan Tc-99m-DTPA-INH sebesar 86,84%, sedangkan untuk penambahan SnCl<sub>2</sub> sebanyak 250 µgram didapatkan Tc-99m-DTPA-INH sebesar 80,95 %. Hasil dari komposisi ini kemudian dipakai untuk uji stabilitas *bulk* DTPA-INH dimana pada minggu ke 7 hasil kemurnian radiokimia Tc-99m-DTPA-INH bisa mencapai 91,17 %. Hasil ini tidak berbeda jauh dari acuan pustaka yang bisa mencapai 95 % [5]. Dari semua hasil ini bisa disimpulkan bahwa penambahan SnCl<sub>2</sub> yang terbaik adalah sebanyak 200 µg karena mendapatkan hasil % Tc-99m-DTPA-INH yang terbesar.



**Gambar 4.** Hasil variasi jumlah jumlah SnCl<sub>2</sub> Pada penandaan Tc-99m-DTPA-INH

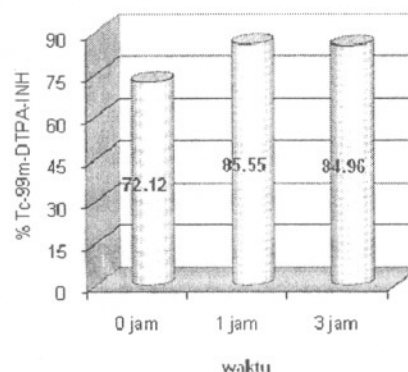
Hasil uji stabilitas sediaan DTPA-INH dalam penyimpanan dapat dilihat pada dan gambar 5. Penandaan dilakukan dengan menggunakan 5 µgram konyugat, <sup>99m</sup>Tc yang ditambahkan 2 mCi, SnCl<sub>2</sub> yang ditambahkan 200 µl dan waktu inkubasi 15 menit, dari gambar 5 dapat dilihat bahwa pada pengamatan selama 15 minggu didapatkan hasil % Tc-99m-DTPA-INH masih relatif stabil sampai minggu ke 13 sedangkan pada minggu ke 15 hasil %Tc-99m-DTPA-INH sudah menurun menjadi 78,12% atau lebih rendah dari 80% sedangkan pada minggu ke 13% Tc-99m-DTPA-INH masih bisa mencapai 90,93 %. Untuk itu bisa disimpulkan bahwa konyugat DTPA-INH masih stabil pada minggu ke 13.





**Gambar 5.** Hasil uji stabilitas sediaan DTPA-INH dalam penyimpanan

Hasil uji Stabilitas  $\text{Tc-99m-DTPA-INH}$  pada suhu kamar dapat dilihat pada gambar 6, penandaan dilakukan dengan menggunakan 5  $\mu\text{gram}$  konyugat,  $^{99m}\text{Tc}$  yang ditambahkan 2 mCi,  $\text{SnCl}_2$  yang ditambahkan 200  $\mu\text{l}$  dan waktu inkubasi 15 menit serta pengamatan dilakukan pada 0 jam, 1 jam dan 3 jam setelah waktu inkubasi. Dari gambar 6 dapat dilihat bahwa pada 0 jam setelah waktu inkubasi kemurnian radiokimia  $\text{Tc-99m-DTPA-INH}$  adalah 78,12 %, pada 1 jam setelah waktu penandaan kemurnian radiokimia  $\text{Tc-99m-DTPA-INH}$  adalah 85,55 %, pada 3 jam setelah waktu penandaan kemurnian radiokimia  $\text{Tc-99m-DTPA-INH}$  adalah 84,96 %, dari hasil uji stabilitas  $\text{Tc-99m-DTPA-INH}$  dapat disimpulkan bahwa bahwa  $\text{Tc-99m-DTPA-INH}$  masih stabil pada pengamatan sampai 3 jam setelah waktu penandaan.



**Gambar 6.** Hasil uji stabilitas  $\text{Tc-99m-DTPA-INH}$  pada suhu kamar

## KESIMPULAN

Dari serangkaian percobaan yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa pada percobaan preparasi  $\text{Tc-99m-DTPA-INH}$  didapatkan konyugat  $\text{DTPA-INH}$  dengan kemurnian radiokimia 91%. Pelabelan  $\text{DTPA-INH}$  dengan  $\text{Tc-99m}$  yang optimum didapatkan pada penambahan  $\text{SnCl}_2$  sebanyak 200  $\mu\text{g}$ . Radiofarmaka  $\text{Tc-99m-DTPA-INH}$  stabil pada suhu kamar sampai 3 jam setelah penandaan serta konyugat  $\text{DTPA-INH}$  stabil dalam penyimpanan sampai 13 minggu pada suhu  $-40^\circ\text{C}$ .

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan Terimakasih yang sebesar besarnya ditujukan kepada Ibu Siti Darwati, Bp Adang Hardi G. serta teman-teman PRR-BATAN yang tidak bisa disebutkan namanya satu persatu baik secara langsung maupun tidak langsung membantu penelitian ini sehingga penelitian ini bisa diselesaikan.

---

## DAFTAR PUSTAKA

1. <http://www.infeksi.com>. Situs resmi RSPI-SS, Rumah Sakit Penyakit infeksi Dr Sulianti Saroso Jakarta, 2007.
2. GANO, L., PATRICIO, L., CANTIHO, G., MARTINS, T., MARQUES, E., Ciprofloxacin in imaging of Infection versus sterile inflammation, IAEA-TecDoc 1029, IAEA, Vienna , 1998
3. DEUTCH, E., LIBSON, K., LINDOY, L.F., Progress of Inorganic Chemistry, John Willey&Son, New York 1983.
4. WINARJANI, K., Pedoman penanganan tuberculosis paru dengan resistensi multi obat, Kumpulan naskah ilmiah tuberculosis Perhimpunan dokter paru Indonesia. Pertemuan Ilmiah Nasional Tuberculosis. Sumsel-Jambi, 1997.
5. MISRA, A.K., *et. al.*, Design and syntesis of isoniazide mimetic conjugated with DTPA, Potensial ligand of novel radiopharmaceutical and contrast agent for medical imaging Bis (amide) of diethilenetriaminepentaaceticacid: DTPA-BIS(INH).