

Penandaan *Human Serum Albumin (HSA)nanospheres* dengan radionuklida teknesium-99m

Labelling of human serum albumin (HSA)-nanospheres with technetium-99m radionuclide

Nanny Kartini Oekar *) dan Eva Maria Widyasari

Pusat Teknologi Nuklir Bahan dan Radiometri – BATAN, Bandung

Abstrak

Penandaan HSA-nanosfer dengan radionuklida teknesium-99m, dilakukan dengan metode langsung dan tidak langsung menggunakan pirofosfat sebagai *co-ligand*. Keberhasilan penandaan ditentukan dengan berbagai macam sistem kromatografi, sehingga dapat memisahkan senyawa bertanda ^{99m}Tc -HSA-nanosfer dengan pengotor radiokimianya. Beberapa parameter yang berpengaruh dalam penandaan dipelajari, seperti pH, jumlah dan jenis reduktor, cara penandaan, jumlah nanokoloid dan temperatur pada saat reaksi berlangsung.

Hasil menunjukkan bahwa kondisi penandaan langsung yang optimum diperoleh pada jumlah HSA-nanosfer 0,5 mL, jumlah reduktor $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 100-150 μg , dan inkubasi pertama dilaksanakan pada pH = 2 selama 25 menit pada temperatur kamar, kemudian penandaan dilakukan pada pH 5,5 – 6,0 dengan inkubasi kedua selama 15 menit pada temperatur kamar. Metode ini menghasilkan efisiensi penandaan > 90% dengan pengotor radiokimia berupa ^{99m}Tc -perteknetat bebas.

Penandaan tidak langsung dengan menggunakan HSA-nanosfer sebanyak 0,5 mL, jumlah reduktor $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 100 μg yang direaksikan dahulu dengan Na-pirofosfat sebanyak 1,0 mg (perbandingan ion $\text{Sn}^{(2+)}$: pirofosfat = 1 : 5 mol/mol) pada kondisi pH 7,4 dan inkubasi dilakukan pada temperatur 37 °C selama 15 menit. Inkubasi kedua setelah penambahan ^{99m}Tc -perteknetat dilakukan pada temperatur kamar selama 15 menit menghasilkan efisiensi penandaan $93,4 \pm 1,2$ % dengan ^{99m}Tc -perteknetat dan ^{99m}Tc -pirofosfat sebagai pengotor radiokimia.

Kata kunci : limfosintigrafi, nanokoloid, teknesium-99m, pengotor radiokimia.

Abstract

Labelling of HSA-nanospheres with technetium-99m was carried out by direct and indirect method using sodium pyrophosphate as co-ligand agent. The labelling efficiency was determined by several chromatography system for separation of ^{99m}Tc -HSA-nanospheres labelled compound from its radiochemical impurities. Several parameters influencing the labelling process were studied such as pH, kinds and quantity of reductor agent, labelling method, quantity of HSA-nanospheres and temperature and the duration of incubation.

The result show that the optimum direct labelling condition was found by using 0.5 mL HSA-nanospheres solution (which had absorbance of 0.6 at $\lambda = 202$ nm), 100-150 μg of $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ as reductor, pH mixture was 2 and the first incubation was done at room temperature for 25 minutes. The labelling process was continued by adding technetium-99m of certain activity, and finally pH was adjusted to 5.5-6.0. The second incubation was carried out at room temperature for 15 minutes. This direct method resulted

more than 90% of labelling efficiency, with free ^{99m}Tc -pertechnetate as radiochemical impurity.

The indirect labelling process by using 0.5 mL of HSA-nanospheres solution, 100 μg of $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ was prior reacted with 1.0 mg of sodium pyrophosphate (1 : 5 mol/mol), the pH was adjusted to 7.4 and incubation was done in the incubator at 37 °C for 15 minutes. After adding ^{99m}Tc -pertechnetate solution, the second incubation was done at room temperature for 15 minutes. This indirect labelling resulted 93.4 \pm 1.2 % of labelling efficiency with remain of ^{99m}Tc -pertechnetat and ^{99m}Tc -pyrophosphate as radiochemical impurities.

Key words: lymphoscintigraphy, nanocolloid, technetium-99m, radiochemical impurities.

Pendahuluan

Limfosintigrafi (*lymphoscintigraphy*) adalah metode diagnosis yang dilakukan dengan cara menyuntikkan sediaan radiofarmasi yang berbentuk nanokoloid dengan ukuran 50-300 nm bertanda radioisotop ke dalam saluran limfatik secara subkutan, intradermal atau peritumoral. Pergerakan radiofarmaka yang disuntikkan tersebut dideteksi dari luar tubuh dengan kamera gamma atau dengan *probe* khusus untuk limfosintigrafi yang biasanya dilaksanakan secara paralel pada saat dilakukan pembedahan tumor/kanker. Keberhasilan suatu pembedahan atau keberhasilan suatu terapi kanker payudara, ovarium atau prostat dapat dipantau dengan cara melihat adanya *sentinel node* pada saluran limfatik pasien dengan metode limfosintigrafi, sehingga tindak lanjut pembedahan atau pengobatan dapat dirancang dengan sebaik-baiknya (Dillehay, *et al.*, 2006).

Keberhasilan diagnosis sistem limfatik dengan metode limfosintigrafi sangat bergantung pada keadaan fisik dari partikel radiofarmaka yang disuntikkan. Keadaan fisis ini meliputi ukuran, bentuk dan jumlah partikel yang dikandung dalam radiofarmaka tersebut (Gopal, 2004; Zolle, 2007). Nanopartikel dengan ukuran lebih kecil dari 50 nm akan cepat teralir oleh cairan limfe, sehingga resistensinya di dalam saluran dan kelenjar limfatik akan rendah. Sebaliknya apabila ukuran partikel lebih besar dari 300 nm akan terdeposit lebih lama dilokasi penyuntikkan (Zolle, 2007). Hal ini mengakibatkan pelaksanaan limfosintigrafi kadang-kadang mengalami kegagalan atau membutuhkan waktu *scanning* yang sangat lama (lebih dari 2 jam) dimana hal ini membuat pasien tidak nyaman. Selain ukuran partikel, jenis dan jumlah partikel yang terkandung

dalam radiofarmaka tersebut juga mempunyai peranan penting. Partikel yang bersifat *biodegradable* akan memberikan hasil yang lebih baik dan jumlah partikel yang optimal akan memberikan radioaktifitas jenis yang lebih tepat, sehingga dosis yang disuntikkan dapat dipertahankan sesuai dengan yang dibutuhkan tanpa harus menaikkan volume yang disuntikkan (Zolle, 2007). Terlalu besarnya volume yang disuntikkan akan menyebabkan pasien tidak nyaman. Selama ini limfosintigrafi di kedokteran nuklir dilaksanakan dengan menggunakan ^{99m}Tc -TSC(sulfur)-mikrokoloid yang partikelnya berukuran 1-10 μm . Kelemahan radiofarmaka ini, selain ukurannya besar juga karena partikel akan terbentuk setelah ditandai dengan teknesium-99m, sehingga sangat sulit untuk mendapatkan dan mengukur ukuran partikel yang ideal. Untuk memecahkan masalah tersebut, dibutuhkan suatu radiofarmaka yang lebih ideal terutama radiofarmaka dengan ukuran yang lebih tepat dipilih ukuran 100 -200 nm, dimana ukuran tersebut akan memberikan jaminan bahwa ukuran yang diperoleh akan lebih homogen karena *range*-nya lebih kecil, apabila dibandingkan dengan 50-300 nm, sehingga retensinya dalam saluran limfe lebih baik. Partikel HSA-nanospheres berbentuk nanokoloid yang dibuat dari bahan dasar protein (albumin) serum manusia, kemudian ditandai dengan radioaktif ^{99m}Tc dan diharapkan menjadi suatu radiofarmaka ^{99m}Tc -HSA-nanosfer yang lebih spesifik dan lebih stabil dari sediaan yang sudah ada. Keberhasilan penelitian ini diharapkan dapat menjawab salah satu tantangan tentang masalah kesehatan masyarakat yang dihadapi pada saat ini, sehingga iptek nuklir dapat berperan serta dalam memecahkan masalah kesehatan bangsa Indonesia.

Metodologi

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *human serum albumin* (HSA) dan glutaraldehid buatan Sigma, etanol absolut, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Napirofosfat, asetonitril, metanol, aseton, amonia buatan E.Merck, air untuk injeksi dan larutan salin fisiologis (NaCl 0,9%) steril buatan IPHA-laboratories.

Bahan penunjang yang digunakan adalah kertas saring ukuran 100 nm dan 220 nm (Sartonet), ITLC-SG (PALL), berbagai ukuran alat suntik *disposable* steril (Terumo), kertas pH universal (E.Merck), kertas kromatografi Whatman 1, Whatman 31ET, dan Whatman 3MM.

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pompa vakum (Presision), eksikator (buatan Cina), alat penyaring ukuran diameter 10 dan 25 mm, spektrofotometer (Hitachi), alat *Scanning Electron Microscope* (SEM) merek JEOL, inkubator (Memmert), pengocok yang dilengkapi dengan penangas air (Memmert), alat pemanas yang dilengkapi pengaduk magnetik (Nouva), alat pencacah saluran tunggal (Ortec), timbangan analitis (Mettler), vial gelas ukuran 12 mL dan seperangkat alat kromatografi kertas.

Cara Kerja

Preparasi partikel HSA-nanosfer (nanokoloid) berukuran 100-200 nm.

Pembuatan partikel HSA-nanosfer (nanokoloid).

Sebanyak 120 mg HSA dilarutkan dalam 1,2 mL air suling sampai larut sempurna. Ke dalamnya ditetesi 4,8 mL etanol absolut sambil diaduk sampai penetesan selesai kemudian pengadukan dilanjutkan selama 5 menit. Setelah itu sebanyak 44 μL larutan 2,5 % glutaraldehid ditambahkan ke dalamnya sambil terus diaduk, dan volume sediaan dibuat menjadi 8 mL dengan penambahan air suling. Pengocokan dilanjutkan dengan alat *shaker waterbath* selama 24 jam pada temperatur 20 °C. Setelah itu campuran dipanaskan selama 2 jam pada 70 °C, dan kemudian disentrifuga pada 10.000 rpm selama 20 menit. Endapan yang terbentuk didispersikan dalam 8 mL air suling.

Seleksi ukuran HSA-nanosfer (nanokoloid)

Campuran yang mengandung partikel HSA-nanosfer disaring dengan saringan penyaring kertas Whatman 1, dan filtrat disaring dengan saringan ukuran 220 nm. Filtrat yang diperoleh dari penyaringan kedua disaring dengan saringan ukuran 100 nm. Endapan yang terdapat di atas saringan dibilas kembali air untuk injeksi dengan volume

secukupnya (biasanya 2 kali volume larutan yang disaring), sehingga diperoleh partikel dengan ukuran antara 100 dan 220 nm.

Penentuan ukuran dan jumlah partikel HSA-nanosfer (nanokoloid)

Suspensi nanokoloid yang telah diperoleh ditetaskan ke atas *disk* (piringan kecil) yang terbuat dari logam secara merata dan kemudian dikeringkan dalam eksikator selama semalam. Setelah terbentuk lapisan tipis dari suspensi tersebut ditentukan ukuran partikelnya dengan alat SEM.

Penentuan jumlah nanokoloid yang terbentuk

Jumlah partikel yang berada dalam sediaan ditentukan dengan cara menentukan tinggi resapan/absorbansi (*absorbance*) pada panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer. Panjang gelombang maksimum ditentukan terlebih dahulu dengan alat spektrofotometer yang sama. Sediaan nanokoloid yang dibuat diencerkan dengan air suling, kemudian diukur pada panjang gelombang yang bervariasi yaitu mulai dari $\lambda = 185 - 210$ nm.

Pemilihan sistem kromatografi yang tepat untuk menentukan efisiensi penandaan

Untuk menentukan keberhasilan penandaan dicoba berbagai sistem kromatografi menaik yaitu yang pertama menggunakan fase diam lapis tipis ITLC-SG (1x10 cm) dengan fase gerak aseton (ITLC-SG/aseton) kemudian selanjutnya berturut-turut digunakan kertas Whatman 31ET (1x10cm) /larutan NaCl fisiologis (0,9 %); kertas Whatman 1(1x17 cm)/NaCl fisiologis (0,9 %); kertas Whatman 1 (1x17 cm)/metanol 85%; kertas Whatman 31 ET(1x10 cm) /asetonitril 50 %, kertas Whatman 3MM/metanol 95 % dan kertas Whatman 3MM/NaCl 0,9%.

Sediaan hasil penandaan ditotolkan sebanyak 2-4 μL menggunakan pipet *eppendorf* pada titik nol dari fase diam kromatografi, dicelupkan dalam larutan/cairan fase gerak yang sesuai dan setelah fase gerak naik hingga ke batas atas fase diam,

kemudian diangkat dan dikeringkan dalam oven. Kertas atau lapis tipis ITLC-SG yang telah kering dipotong-potong setiap satu cm dan tiap potongan dicacah dengan alat pencacah saluran tunggal (*single channel analyzer*). Dari hasil kromatografi dapat diketahui metode kromatografi mana dari sederet sistem kromatografi yang dipilih yang memberikan hasil yang lebih akurat dalam memisahkan senyawa bertanda $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HSA-nanosfer yang terbentuk dari pengotor radiokimianya.

Penandaan HSA-nanosfer dengan radio-nuklida teknesium-99m

Metode penandaan langsung

Sebanyak 5 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 50 μL HCl 0,1 N kemudian ditambahi air suling sampai volumenya 2 mL. Larutan diambil sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan ke dalam 0,5 mL sediaan HSA-nanosfer, pH campuran diatur menjadi 2,0 dengan penambahan HCl 0,1 N. Campuran diinkubasi pada temperatur kamar selama 25 menit dan larutan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertechnetat ditambahkan ke dalamnya. Setelah dikocok campuran dibiarkan untuk inkubasi kedua kalinya pada temperatur kamar selama 15 menit. Hasil penandaan ditentukan dengan kromatografi yang sesuai.

Pengaruh jumlah reduktor $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pada penandaan secara langsung

Penandaan secara langsung dilaksanakan dengan berbagai jumlah reduktor $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, yaitu 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200 dan 250 μg . Parameter lainnya tetap seperti pada percobaan sebelumnya. Besarnya efisiensi penandaan ditentukan dengan kromatografi yang sesuai.

Pengaruh jumlah HSA-nanosfer pada penandaan secara langsung

Penandaan dilaksanakan dengan metode seperti pada percobaan sebelumnya, hanya besarnya volume HSA-nanosfer divariasikan, yaitu dari 0 sampai 1000 μL dengan kenaikan sebesar 100 μL . Parameter lainnya disamakan dengan percobaan sebelumnya. Hasil penandaan dianalisis dengan kromatografi yang sesuai.

Pengaruh pH pada penandaan secara langsung

Pengaruh pH yang dipelajari adalah pH pada saat dilakukan inkubasi antara HSA-nanosfer sebanyak 0,5 mL dengan reduktor SnCl_2 (ion Sn^{2+}) sebanyak 100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$. Sebelum dilakukan proses tersebut, pH dari satu seri sediaan yang terdiri dari 5 buah vial, masing-masing diatur menjadi 2, 3, 4, 5, dan 6. Semua sediaan kemudian diinkubasi pada temperatur kamar selama 25 menit. Setelah itu ke dalam masing-masing vial ditambahi larutan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertechnetat sebanyak 2 mCi/300 μL , dan sediaan dibiarkan bereaksi pada temperatur kamar selama 15 menit. Kondisi pH setelah penambahan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ diperiksa dengan kertas pH dan tidak diatur kembali. Efisiensi penandaan yang dihasilkan ditentukan dengan kromatografi yang sesuai.

Metode penandaan tidak langsung

Metode A

Sebanyak 5mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 50 μL HCl 0,1N dan kedalamnya ditambahkan air suling sebanyak 0,45 mL. Bahan Na-pirofosfat ditimbang sebanyak 50 mg, dilarutkan dalam 1 mL

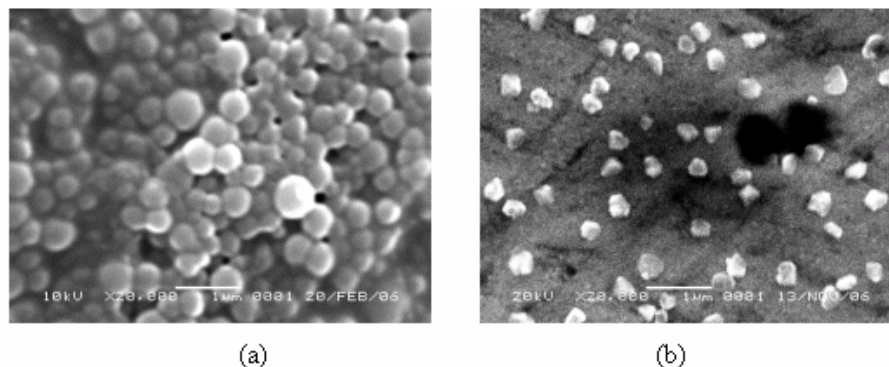
air suling steril, kemudian kedua larutan dicampurkan dan volumenya dibuat menjadi 2 mL. Sebanyak 0,5 mL dari campuran larutan tersebut (mengandung 1,25 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan 12,5 mg Na-pirofosfat) ditambahkan ke dalam 0,5 mL sediaan HSA-nanosfer dan pH diatur menjadi 2 - 2,5 dengan penambahan HCl 0,1 N. Campuran diinkubasi pada temperatur kamar selama 15 menit, kemudian pH dinaikkan menjadi 4,0 dengan penambahan larutan NaOH 0,1 N. Ke dalam larutan ditambahkan radionuklida $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertechnetat sebanyak 5 mCi/0,5 mL. Reaksi penandaan dibiarkan berlangsung pada temperatur kamar selama 10 menit, setelah itu efisiensi penandaan ditentukan dengan dua sistem kromatografi kertas yang sesuai.

Metode B

Sebanyak 50 mg Na-pirofosfat dilarutkan dalam 5 mL air suling kemudian sebanyak 5 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ditambahkan ke dalamnya dan biarkan sampai larut sempurna. Sebanyak 100 μL dari larutan tersebut ditambahkan ke dalam 2 buah vial yang masing-masing berisi 500 μL HSA-nanosfer dan pH masing-masing campuran diatur menjadi 7,4 dengan penambahan HCl 0,1 N. Satu vial yang berisi campuran tersebut diinkubasi dalam inkubator selama 15, dan vial lainnya selama 30 menit pada 37 °C. Setelah itu campuran didinginkan sampai mencapai temperatur kamar dan ke dalamnya ditambahkan larutan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertechnetat masing-masing sebanyak 2 mCi/400 μL , dikocok, dan kedua vial tersebut diinkubasi untuk kedua kalinya pada temperatur kamar selama 30 menit. Setelah reaksi penandaan selesai, besarnya efisiensi penandaan ditentukan dengan kromatografi kertas Whatman 3MM/NaCl 0,9 % dan kertas Whatman 3MM/metanol 95 %. Hasil dari kedua percobaan ini dibandingkan.

Hasil Dan Pembahasan

Limfosintigrafi idealnya dilaksanakan dengan menggunakan radiofarmaka berbentuk nanokoloid dengan ukuran antara 50 – 300 nm. Apabila digunakan radiofarmaka nanokoloid yang mempunyai ukuran < 50 nm, akan terjadi pengaliran kembali (*wash out*) radioaktivitas yang terlalu cepat dari saluran limfatik, sehingga limfosintigrafi sulit dilaksanakan. Sebaliknya apabila menggunakan radiofarmaka yang ukurannya >300 nm, pengalirannya di dalam saluran limfatik akan sulit dan radioaktivitas akan terkumpul pada daerah penyuntikkan (Dillehay, 2006; Zolle, 2007). Untuk mempertahankan kehomogenan ukuran partikel sehingga lebih aman dalam penggunaannya



Gambar 1. Partikel HSA-nanosfer sebelum (a) dan sesudah (b) disaring.

Keterangan: dilihat dengan alat Scanning Electron Microscope - SEM (JEOL)

untuk limfosintigrafi, maka dibuat *range* ukuran yang lebih sempit yaitu 100-200 nm. Selain itu, hal ini juga mempermudah teknik preparasi partikel, mengingat saringan kertas dengan pori ukuran nanometer yang diperlukan untuk seleksi ukuran partikel yang mudah diperoleh dipasaran yaitu ukuran 100 nm dan 220 nm. Berdasarkan pemikiran inilah, maka dipilih partikel HSA-nanosfer dengan ukuran 100-200 nm, sehingga limfosintigrafi dapat dilaksanakan dengan baik.

Preparasi partikel HSA-nanosfer dilakukan berdasarkan reaksi denaturasi albumin oleh etanol absolut dan untuk menstabilkan bentuk partikel ditambahkan glutaraldehid.

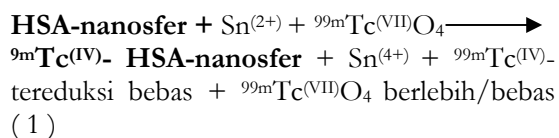
Pada Gambar 1-(a) terlihat bahwa HSA-nanosfer yang baru dibuat berbentuk partikel dengan ukuran yang tidak homogen dan bergerombol membentuk kesatuan (agregat). Tetapi setelah disaring melalui penyaring ukuran 220 nm dan 100 nm, terjadi seleksi ukuran partikel sehingga HSA-nanosfer berukuran lebih homogen dan terdispersi secara merata dalam pelarut (air) seperti terlihat pada Gambar 1-(b).

Sediaan (suspensi) HSA-nanosfer apabila dilihat secara visual merupakan sediaan yang jernih menyerupai larutan, tidak terlihat adanya partikel-partikel atau keruh. Untuk mengetahui jumlah partikel per satuan volume (konsentrasi) menjadi sulit karena tidak dapat dilakukan secara mikroskopik. Sedangkan dalam melakukan penandaan harus dibuat suatu standar dari jumlah partikel yang digunakan. Untuk mengatasi hal tersebut dilakukan pengukuran resapan/absorbansi (*absorbance*)

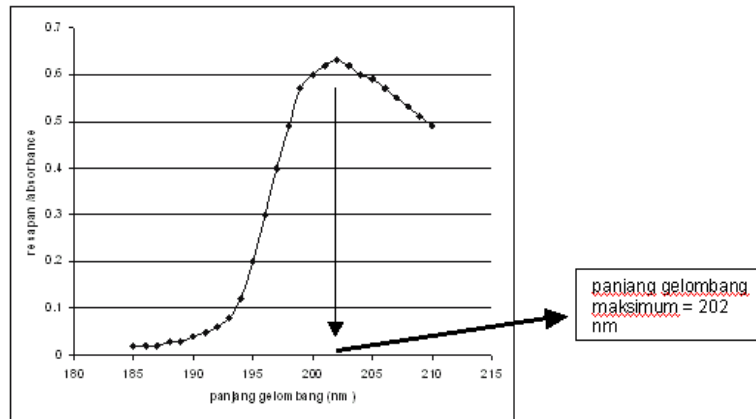
sediaan pada panjang gelombang maksimum yang sebelumnya telah ditentukan dengan alat spektrofotometer. Sesuai dengan kaidah metode spektrofotometri bahwa tingginya absorbansi suatu sampel berbanding lurus dengan kadar/konsentrasi dari sample yang diukur (Khopkar, 1990). Bahan HSA-nanosfer merupakan partikel berukuran nanometer yang terdispersi dalam air untuk injeksi. Setiap partikel akan mengabsorpsi sinar UV yang mengenainya, sehingga besarnya absorbansi yang terukur oleh alat spektrofotometer sebanding dengan jumlah partikel yang ada dalam sediaan tersebut. Pada Gambar 2, terlihat bahwa pada pengenceran 10 kali, sediaan HSA-nanosfer tersebut mempunyai panjang gelombang maksimum 202 nm dengan resapan sebesar 0,64.

Keberhasilan penandaan HSA-nanosfer dengan radionuklida ^{99m}Tc , dapat diketahui dari tingginya efisiensi penandaan. Efisiensi penandaan ditentukan dengan berbagai macam sistem kromatografi untuk memisahkan senyawa bertanda ^{99m}Tc -HSA-nanosfer dari pengotor radiokimianya.

Penandaan secara langsung diduga melalui reaksi (1)

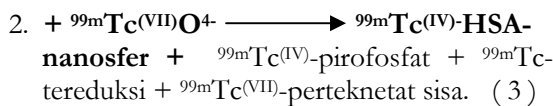
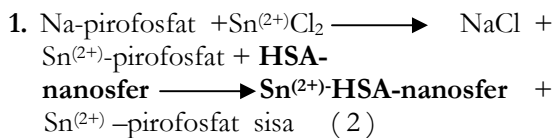


Reaksi tersebut akan menghasilkan pengotor radiokimia seperti ^{99m}Tc -perteknetat bebas dan ^{99m}Tc -tereduksi bebas.



Gambar 2. Kurva resapan maksimum HSA-nanosfer diukur dengan spektrofotometer UV (pengenceran 10 x)

Pada proses penandaan tidak langsung dengan menggunakan Na-pirofosfat sebagai *ω-ligand*, terjadi reaksi (2) dan (3)



Seperti terlihat pada reaksi (2) dan (3), penandaan tidak langsung akan menghasilkan senyawa bertanda ${}^{99m}\text{Tc}$ -HSA-nanosfer dan pengotor radiokimia ${}^{99m}\text{Tc}$ -pirofosfat, ${}^{99m}\text{Tc}$ -perteknetat dan ${}^{99m}\text{Tc}$ -tereduksi.

Tabel I menunjukkan hasil dari beberapa sistem kromatografi yang dicoba untuk memisahkan ${}^{99m}\text{Tc}$ -HSA-nanosfer dengan pengotor radiokimianya. Dengan melihat nilai Rf dari masing-masing komponen senyawa bertanda ${}^{99m}\text{Tc}$ yang kemungkinan ada dalam reaksi penandaan, dapat disimpulkan bahwa dari keenam sistem kromatografi yang dicoba tidak ada satu pun yang dapat memisahkan senyawa bertanda ${}^{99m}\text{Tc}$ -HSA-nanosfer dari pengotor radiokimia ${}^{99m}\text{Tc}$ -tereduksi bebas, karena keduanya selalu berimpit berada pada titik awal kromatografi (Rf=0). Senyawa ${}^{99m}\text{Tc}$ -tereduksi dapat berupa ${}^{99m}\text{TcO}_2$ atau bentuk hidrolisanya yaitu ${}^{99m}\text{Tc}(\text{OH})_4$ yang keduanya

berbentuk koloid, sehingga dalam kromatografi tidak terbawa oleh fase gerak.

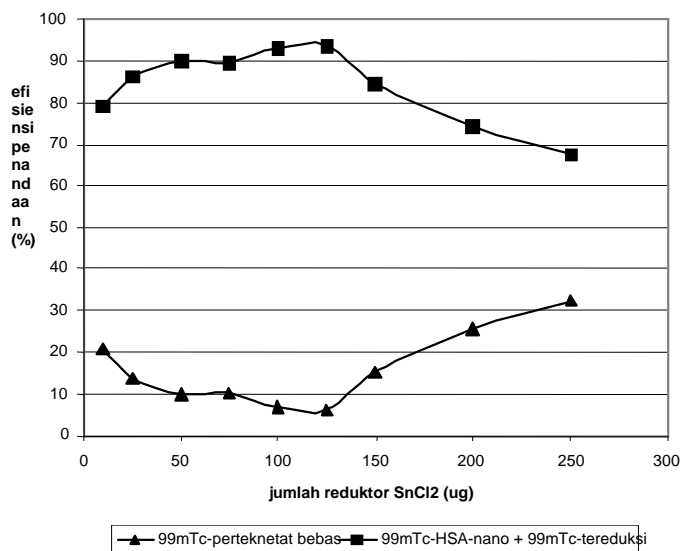
Dalam penelitian ini tidak dilakukan penentuan besarnya pengotor radiokimia ${}^{99m}\text{Tc}$ -tereduksi karena bentuknya koloid juga, akan tetapi diharapkan tidak akan mengganggu dalam pencitraan karena akan terakumulasi pada organ target yang dituju. Hal ini sesuai dengan beberapa pustaka (Owunwanne,1995; Zolle, 2007) yang menerangkan bahwa dalam analisis senyawa bertanda ${}^{99m}\text{Tc}$ -koloidal (${}^{99m}\text{Tc}$ -MAA, ${}^{99m}\text{Tc}$ -sulfur koloid) tidak dilakukan penentuan besarnya pengotor radiokimia ${}^{99m}\text{Tc}$ -tereduksi.

Penandaan secara langsung yang dilakukan dalam berbagai jumlah reduktor $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yang hasilnya dapat dilihat pada Gambar 3, menunjukkan bahwa jumlah reduktor yang optimal adalah sebesar 100-125 μg yang memberikan efisiensi penandaan > 90 %.

Sebagai akibat dari tidak dapat dipisahkannya pengotor ${}^{99m}\text{Tc}$ -tereduksi dari senyawa bertanda ${}^{99m}\text{Tc}$ -HSA-nanosfer, maka pada penandaan langsung sangat sulit untuk mengetahui keberhasilan penandaan. Seperti terlihat pada Gambar 4 yang merupakan gambaran efisiensi penandaan dengan jumlah HSA-nanosfer yang bervariasi yaitu dari 0, 100 dan seterusnya sampai dengan 1000 μL dari HSA-nanosfer yang mempunyai resapan sebesar 0,6 pengenceran 10 kali yang diukur pada panjang gelombang 202 nm. Pada gambar tersebut terlihat bahwa seolah-olah tidak ada bedanya antara variasi jumlah HSA-nanosfer,

Tabel I. Pemisahan hasil penandaan dengan beberapa sistem kromatografi (Rf).

No.	Sistem kromatografi menaik		Hasil pemisahan (Rf)			
	Fase diam	Fase gerak	^{99m} TcO ₄	^{99m} Tc-red	^{99m} Tc-piro	^{99m} Tc-nano
1.	Lapis tipis ITLC-SG	Aseton	1,0	0,0	0,0	0,0
2.	Kertas Whatman 31 ET	Asetonitril 50%	1,0	0,0	1,0	0,0
3.	Kertas Whatman 31 ET	Metanol 85 %	0,6	0,0	0,0	0,0
4.	Kertas Whatman 1	NaCl 0,9 %	0,8	0,0	1,0	0,0
5.	Kertas Whatman 3MM	Metanol 95 %	0,6	0,0	0,0	0,0
6.	Kertas Whatman 3MM	NaCl 0,9 %	0,8	0,0	0,8	0,0



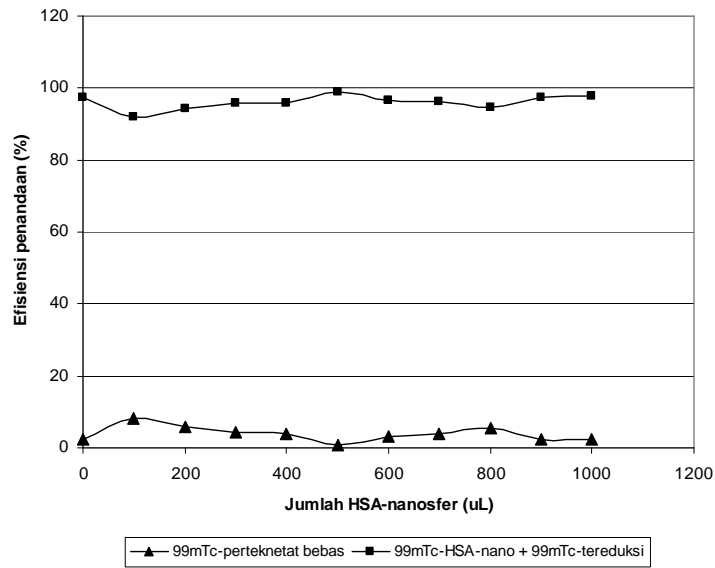
Gambar 3. Efisiensi penandaan ^{99m}Tc-HSA-nanosfer pada berbagai jumlah reduktor SnCl₂.2H₂O

Keterangan: Jumlah HSA-nanosfer : 500 µL, pH inkubasi pertama 2-2,5, inkubasi pertama pada t-kamar selama 25 menit, pH saat penandaan 4,0 dengan ^{99m}Tc sebanyak 2 mCi, inkubasi penandaan (kedua) pada t-kamar selama 15 menit dan pH akhir adalah 5,5-6,0.

karena sama-sama menghasilkan efisiensi penandaan >90%. Hal ini merupakan kelemahan dari metode penandaan secara langsung.

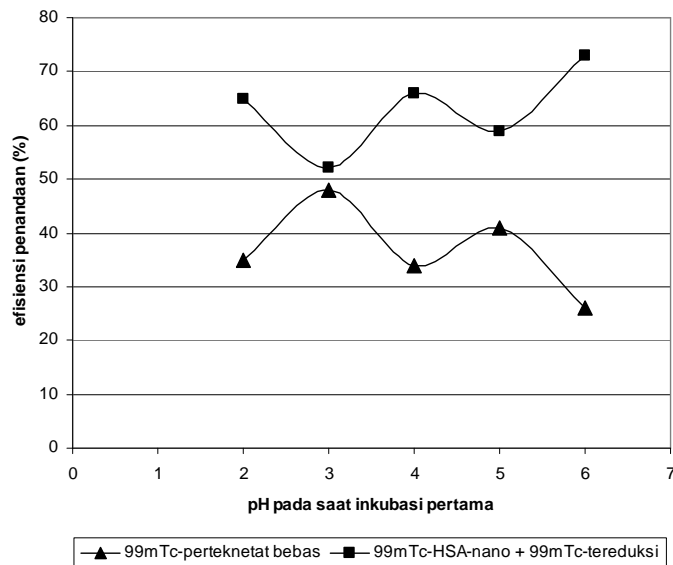
Penandaan secara langsung dengan kondisi pH pada inkubasi pertama yang bervariasi yaitu dari 2, 3, 4, 5 dan 6 hasilnya dapat dilihat pada Gambar 5. Kondisi pH tidak diubah lagi pada saat penambahan ^{99m}Tc-pertechnetat ke dalam campuran, pH sediaan

dibiarkan seadanya sehingga diperoleh pH akhir sediaan 2,0; 3,5; 4,5; 5,5 dan 6,0. Dari gambar terlihat bahwa yang memberikan efisiensi penandaan tertinggi adalah pada pH inkubasi 2,0 yaitu 65 %, kemudian persentasenya turun pada pH 3,0 dan kemudian seolah-olah naik lagi pada pH 4, 5 dan 6. Tetapi yang perlu dicatat pada percobaan ini adalah, sediaan mulai keruh pada pH = 4 demikian pula pada 5 dan 6. Hal



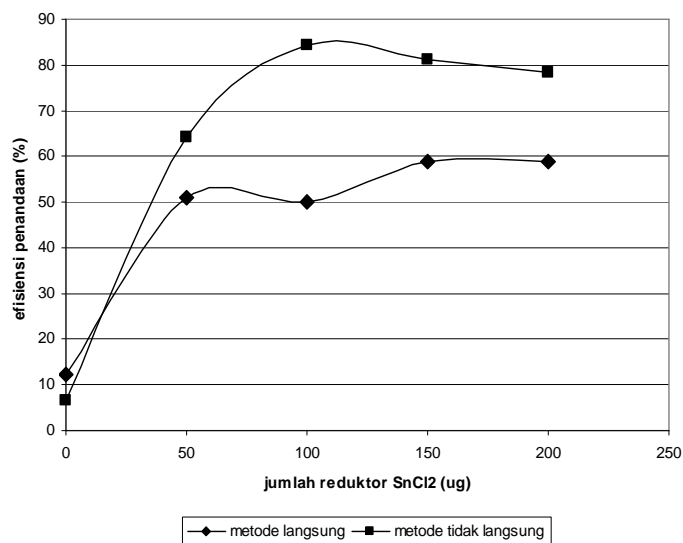
Gambar 4. Efisiensi penandaan ^{99m}Tc-HSA-nanosfer secara langsung dengan jumlah HSA-nanosfer yang bervariasi

Keterangan :Jumlah reduktor 100 µg; pH inkubasi pertama 2-2,5, inkubasi pertama pada t-kamar selama 25 menit; pH saat penandaan 4,0 dengan ^{99m}Tc sebanyak 2 mCi.; inkubasi penandaan (kedua) pada t-kamar selama 15 menit dan pH akhir 5,5-6,0.



Gambar 5. Efisiensi penandaan ^{99m}Tc-HSA-nanosfer pada penandaan secara langsung dengan pH yang bervariasi.

Keterangan : Jumlah SnCl₂.2H₂O 100 µg, inkubasi pertama pada t-kamar selama 25 menit; jumlah HSA-nanosfer 500 µL; inkubasi penandaan 15 menit pada t-kamar



Gambar 6. Perbandingan hasil penandaan ^{99m}Tc-HSA-nanosfer metode langsung dan tidak langsung pada jumlah reduktor yang bervariasi.

Keterangan : Jumlah HSA-nanosfer 500 μL; pH inkubasi 7,4 pada 37 °C selama 30 menit; jumlah pirofosfat sebanyak 5 x jumlah SnCl2 (mol:mol); pH akhir 6,0—6,5 .

Tabel II. Pengaruh waktu dan temperatur inkubasi pada penandaan ^{99m}Tc-HSA- nanosfer secara tidak langsung.

Inkubasi kedua t-kamar Waktu (menit)	Inkubasi pertama Waktu (menit)	Efisiensi Penandaan (%) (n = 3)	
		Temperatur 37 °C	Temperatur kamar
15	15	93,4 ± 1,2	92,4 ± 4,4
15	30	87,3 ± 10,7	89,8 ± 2,9

Keterangan : Jumlah HSA-nanosfer 500 μL; pH inkubasi 7,4; jumlah Sn-pirofosfat 100:1000 μg (1:5 mol:mol); pH akhir 6,0—6,5 .

ini membuktikan bahwa penandaan HSA-nanosfer secara langsung tidak dapat dilakukan pada pH lebih besar dari 3. Kondisi terbaik bagi penandaan langsung adalah inkubasi pertama dilakukan pada pH 2, di mana pada saat ini terjadi reaksi antara ion Sn⁽²⁺⁾ dengan HSA-nanosfer. Setelah itu pH dinaikkan ke 4 dan kemudian ditambah larutan ^{99m}Tc-pertechnetat dan inkubasi kedua kali pada pH 5,5 – 6,0. Pada tahap ini akan terjadi reaksi antara Sn-HSA-nanosfer dengan ^{99m}Tc-pertechnetat membentuk ^{99m}Tc-HSA-nanosfer. Proses penandaan seperti ini menghasilkan sediaan yang jernih.

Metode penandaan secara tidak langsung, adalah penandaan dengan penambahan *co-ligand* (ko-ligan) pirofosfat yang akan berikatan terlebih dahulu dengan ion Sn⁽²⁺⁾ membentuk suatu kompleks Sn(II)-pirofosfat. Kompleks ini stabil pada pH netral maupun basa, sehingga penandaan HSA-nanosfer dapat dilakukan pada kondisi netral sampai basa karena sediaan hasil penandaan tetap jernih tidak menjadi keruh.

Berdasarkan pemikiran bahwa Sn-pirofosfat dapat berikatan dengan sel darah merah (SDM) secara *in-vivo* pada kondisi pH darah yaitu 7,4 (Setiawan dkk., 1987), dan

diyakini bahwa SDM terdiri juga dari protein, maka dicoba untuk melakukan pengikatan Sn-pirofosfat ke HSA-nanosfer pada kondisi pH 7,4 dan temperatur 37 °C. Setelah itu baru ^{99m}Tc-perteknetat ditambahkan ke dalamnya dan sediaan diinkubasi kembali pada temperatur kamar selama 30 menit. Apabila hasilnya dibandingkan dengan penandaan pada kondisi yang sama tetapi tanpa penambahan pirofosfat, (Gambar 6).

Pada Gambar 6 terlihat apabila penandaan dilakukan dengan penambahan pirofosfat, menghasilkan sediaan yang jernih, dan pH dapat diatur dalam kondisi netral maupun basa tanpa terjadi kekeruhan. Tetapi apabila hal tersebut dilakukan tanpa penambahan pirofosfat (langsung) maka pada jumlah SnCl₂.2H₂O sebesar 150 µg saja, campuran telah keruh. Keuntungan lain dari metode penandaan tidak langsung adalah besarnya efisiensi penandaan dapat ditentukan lebih akurat karena pengotor radiokimia ^{99m}Tc-pirofosfat yang kemungkinan terbentuk saat proses penandaan dapat dipisahkan dengan baik menggunakan sistem kromatografi fase diam Whatman 31 ET dan fase gerak asetonitril 50 %, atau Whatman 1 dan larutan NaCl 0,9 %, atau Whatman 3MM dengan fase gerak NaCl 0,9 % (lihat Tabel I).

Pengaruh waktu dan temperatur inkubasi pertama pada penandaan secara tidak langsung ini, menghasilkan efisiensi penandaan seperti tertera pada Tabel II. Kondisi inkubasi pertama yaitu waktu yang dibutuhkan untuk mereaksikan Sn-pirofosfat dengan partikel HSA-nanosfer. Kondisi yang optimum untuk tahap ini adalah dalam inkubator dengan

temperatur 37 °C selama 15 menit. Setelah penambahan radionuklida teknesium-99m, inkubasi kedua dilakukan pada temperatur kamar selama 15 menit. Dari Tabel II terlihat bahwa waktu 15 menit sudah cukup memberikan kesempatan untuk terjadinya reaksi penandaan antara HSA-nanosfer dengan ^{99m}Tc, yang terbukti dari hasilnya yang memberikan efisiensi penandaan tertinggi yaitu 93,4 % dengan standar deviasi yang paling kecil yaitu 1,2 %.

Kesimpulan

Partikel HSA-nanosfer sudah berhasil dibuat dari bahan *human serum albumin* yang didenaturasi menggunakan etanol absolut. Seleksi ukuran partikel dilakukan dengan 2 kali penyaringan, sehingga diperoleh partikel berukuran antara 100 – 200 nm yang terdispersi secara homogen dalam pelarut air.

Kondisi optimum penandaan yang terbaik adalah dengan metode tidak langsung menggunakan jumlah HSA-nanosfer sebanyak 500 µL, jumlah reduktor SnCl₂.2H₂O sebanyak 100 µg yang direaksikan dahulu dengan Na-pirofosfat sebanyak 1 mg (perbandingan ion Sn⁽²⁺⁾ : pirofosfat = 1 : 5 mol/mol) sebagai ko-ligan pada kondisi pH 7,4 dan temperatur 37 °C selama 15 menit. Inkubasi kedua setelah penambahan ^{99m}Tc-perteknetat dilakukan pada temperatur kamar selama 15 menit menghasilkan efisiensi penandaan sebesar 93,4 ± 1,2 %, dengan pengotor radiokimia berupa ^{99m}Tc-perteknetat dan ^{99m}Tc-pirofosfat sisa yang mungkin ada setelah reaksi penandaan berakhir.

Daftar Pustaka

- Dillehay, G. L. Henkin R. E. *et.al*, 2006, Lymphoscintigraphy in oncology, *Nuclear Medicine*, 2nd ed. Mosby Elsevier Inc., Philadelphia, 1480-1481.
- Gopal B. S., 2004, Fundamental of Nuclear Pharmacy. *Miscellaneous Imaging Procedures*, 5th ed., Springer, USA, 319.
- Kaplan W. D., Davis, M. A., and Rose C. M., 1979, A Comparison of Two Technetium-99m-Labelled Radiopharmaceuticals for Lymphoscintigraphy. *J.Nucl.Med.*, 20, 933-937.
- Khopkar S. M., 1990, *Konsep Dasar Kimia Analitik*, terjemahan Saptorahardjo A. Ed.1, UI-Press, Indonesia, 219. Lymphatic filariasis. Strategy direction for lymphatic filariasis research. [serial on-line] 2002, Feb; 1: <http://www.who.int/tdr/diseases/lymphfil/direction.htm>
- Owunwanne, A., Patel M, and Sadek S., 1995, *The hand book of radiopharmaceuticals*. 1st ed., Chapman and Hall Medical Clays Ltd., England, 67-68.

- Setiawan E., Sukanta, Kartini N., and Nurlaila Z., 1987, Peranan Senyawa Pirofosfat pada Penandaan Sel Darah Merah dengan Teknesium-99m Secara In-vivo. Skripsi Sarjana (S1), Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, UNPAD, Bandung, 72-73.
- Zolle, I., 2007, *Technetium-99m pharmaceuticals, ^{99m}Tc-Labelled Colloids*, 1st ed. Springer, Berlin, Heidelberg, 230-235.

* Korespondensi : Dra.. Nanny Kartini Oekar. M.Sc.
Pusat Teknologi Nuklir Bahan dan Radiometri - BATAN, Bandung
Telp. (021)765-9409
Email: nanny_kartini@yahoo.co.id