

## Pengembangan formulasi radiofarmaka siprofloksasin dalam wadah tunggal

### Development of ciprofloxacin radiopharmaceutical formulation in single vial

Nurlaila Z.\*), Maula Eka S. dan Eva Maria W

Pusat Teknologi Nuklir Bahan dan Radiometri – BATAN, Bandung

#### Abstrak

Penyakit infeksi bakteri masih merupakan penyebab kematian terbesar di Indonesia. Deteksi lokasi infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram positif dan gram negatif pada bagian tubuh yang sangat dalam dapat dilakukan dengan teknik nuklir menggunakan radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin. Guna memenuhi kebutuhan radiofarmaka ini telah dilakukan pengembangan formulasi dalam wadah tunggal yang didasari pada pemakaian Sn(II) klorida dan asam tartrat sebagai pengganti Sn(II) tartrat. Penelitian ini bertujuan mendapatkan kondisi optimal pembuatan  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin dengan efisiensi penandaan yang maksimal. Berbagai parameter yang mempengaruhi terbentuknya  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin seperti jumlah asam tartrat, jumlah ion Sn(II) sebagai reduktor, pH reaksi dan waktu inkubasi telah dipelajari. Efisiensi penandaan dan besarnya kemurnian radiokimia  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin ditentukan menggunakan 2 macam sistem kromatografi, yaitu kromatografi kertas Whatman I/metil etil keton untuk memisahkan pengotor radiokimia  $^{99m}\text{Tc}$ -perteknetat bebas dan ITLC-SG/(etanol:air:amonia = 2:5:1) yang dapat memisahkan  $^{99m}\text{Tc}$ -tereduksi bebas. Kondisi pembuatan yang optimal diperoleh pada penggunaan 2 mg siprofloksasin HCl, 0,06  $\mu\text{g}$  asam tartrat, 50  $\mu\text{g}$   $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH = 2,95 - 3,20 dan waktu inkubasi 15 menit pada temperatur kamar, memberikan efisiensi penandaan 90 - 93 % yang stabil selama 20 menit pada temperatur kamar. Selain itu dilakukan juga pengujian pengaruh besarnya volume larutan  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  terhadap efisiensi penandaan  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin. Pemakaian larutan  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  dengan volume lebih besar dari 0,3 mL memberikan efisiensi penandaan lebih kecil dari 90 %.

**Kata kunci** : radiofarmaka, siprofloksasin,  $^{99m}\text{Tc}$ , wadah tunggal

#### Abstract

Bacterial infection diseases is the greatest death causes in Indonesia. Detection of the deep-seated infection location caused by the gram positive and gram negative bacteria could be done with nuclear technique using  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin radiopharmaceutical. In order to fulfill the necessity of this radiopharmaceutical, the development of formulation in single vial based on Sn(II) chloride and tartaric acid instead of Sn(II) tartrat has been carried out. The aim of this investigation is to obtain the optimum condition of  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin preparation with maximum labelling efficiency. Several parameters influencing the labelling process of  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin such as the amount of tartaric acid, pH of the reaction, the amount of Sn(II) ion as a reducing agent and the incubation time has been studied. The labelling efficiency and the radiochemical purity of  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin were determined by double chromatography system using Whatman I/methyl ethyl keton to determine the free  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetate and ITLC-SG/(ethanol:water:ammonia = 2:5:1) to separate the free  $^{99m}\text{Tc}$ -reduced.

The optimum preparation condition was obtained at pH = 2.95-3.20, 2 mg of ciprofloxacin, 0.06 µg of tartaric acid, 50 µg of SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O and 15 minutes incubation time at room temperature, gave 90-93 % of labelling efficiency, in which was stable for 20 minutes at room temperature. Beside that, studies on the effect of Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> solution volume to the <sup>99m</sup>Tc-ciprofloxacin labelling efficiency was carried out. Labelling with up to 0.3 mL of Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> solution volume gave less than 90 % labelling efficiency.

**Key words** : radiopharmaceutical, ciprofloxacin, <sup>99m</sup>Tc, single vial

## Pendahuluan

Dalam penyediaan radiofarmaka siprofloksasin bertanda radionuklida teknesium-99m (<sup>99m</sup>Tc), kondisi optimal penandaan memegang peranan penting. Beberapa metode penandaan siprofloksasin dengan <sup>99m</sup>Tc menggunakan berbagai reduktor yang berfungsi untuk mereduksi bilangan oksidasi <sup>99m</sup>Tc telah dilaporkan, di antaranya penggunaan formamidin asam sulfinat (Britton *et al.*, 1997; Gano *et al.*, 1998), Sn(II) tartrat (Sonmezoglu *et al.*, 2001; Britton *et al.*, 2002; Larikka *et al.*, 2002; Dumarey *et al.*, 2002; Siaens *et al.*, 2004) dan polimer asam iminodiasetat (Kleisner *et al.*, 2002).

Guna memenuhi kebutuhan radiofarmaka untuk diagnosis infeksi pada bagian atau organ yang berada di dalam tubuh, telah berhasil diformulasi radiofarmaka <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin di BATAN-Bandung (Hasan Basry *et al.*, 2005). Di samping itu telah dikembangkan pula pembuatan kit-kering radiofarmaka siprofloksasin dalam dua vial terpisah (Nurlaila *et al.*, 2009) menggunakan bahan dasar larutan infus siprofloksasin laktat. Namun, sejalan dengan perkembangan teknologi formulasi, larutan infus siprofloksasin yang biasa digunakan untuk pembuatan kit-kering radiofarmaka siprofloksasin tidak ada lagi di pasaran. Bila digunakan larutan infus siprofloksasin buatan dari pabrik yang berbeda yang ada di pasaran, perlu dilakukan penelitian lanjutan mengingat larutan infus tersebut mempunyai formula yang berbeda sehingga dapat mempengaruhi kondisi penandaan siprofloksasin dengan radionuklida <sup>99m</sup>Tc.

Berkaitan dengan keperluan tersebut, dalam penelitian ini dilakukan pengembangan formulasi radiofarmaka siprofloksasin dalam

wadah tunggal menggunakan bahan baku siprofloksasin HCl. Dalam penelitian ini digunakan SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O sebagai reduktor serta penambahan asam tartrat yang berfungsi sebagai ko-ligan (Mazzi, 2007). Berbagai parameter yang berpengaruh dalam penandaan siprofloksasin dengan radionuklida <sup>99m</sup>Tc juga dipelajari, antara lain jumlah reduktor, pH, kondisi dan waktu inkubasi serta jumlah penambahan asam tartrat.

## Metodologi

### Bahan

Berbagai bahan yang digunakan di antaranya siprofloksasin HCl buatan Zhe Jiang Xianju Shifang Pharmaceutical (Cina), larutan NaCl fisiologis (0,9 %) dan akuabides produksi IPHA Laboratories (Bandung, Indonesia), radionuklida <sup>99m</sup>Tc dalam bentuk larutan Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> yang diperoleh dari generator <sup>99</sup>Mo-<sup>99m</sup>Tc buatan BATAN Teknologi (Serpong, Indonesia). Bahan lainnya adalah SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, asam tartrat, asam klorida, sodium hidroksida, etanol, amonia, metil etil keton serta pereaksi lain produksi E. Merck (Darmstadt, Jerman) dengan tingkat kemurnian pereaksi analisis.

Bahan penunjang yang digunakan yaitu kertas pH universal (E. Merck, Darmstadt, Jerman), kertas kromatografi Whatman I (Whatman, Maidstone, Inggris), ITLC<sup>TM</sup>-SG (Pall, Michigan, Amerika Serikat), penyaring bakteri steril (Millipore, Bedford, Amerika Serikat) dan alat suntik *disposable* steril (Terumo, Laguna, Filipina) berbagai ukuran.

Peralatan yang dipakai antara lain *dose calibrator* (Victoreen, Amerika Serikat), pencacah saluran tunggal (Highland, Illinois,

Amerika Serikat) dengan detektor NaI-Tl, timbangan analitis (Metler), *laminair air flow* (Clemco, Australia), pengocok vorteks (Retsch Mixer, Belanda), oven (Mettler, Schwabach), pH-meter (Denver, Amerika Serikat) dan seperangkat alat kromatografi menaik.

#### **Cara Penelitian**

##### **Penentuan jumlah asam tartrat**

Penentuan jumlah asam tartrat dilakukan dengan jalan mencampurkan 1 mL larutan siprofloksasin HCl (2 mg/mL NaCl fisiologis) dan 0,1 mL larutan SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (1 mg/mL HCl 0,01N) serta 0,1 mL larutan asam tartrat dengan konsentrasi yang bervariasi (0,2; 0,15; 0,1; 0,05; 0,04; 0,02; 0,01; 0,005 mM), dimana campuran mempunyai pH dengan rentang 3,05–3,25. Selanjutnya ditambahkan larutan Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> (0,3 mL / ≈ 2,5 mCi) dan diinkubasi pada temperatur kamar selama 15 menit. Efisiensi penandaan ditentukan dengan melihat kemurnian radiokimia <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin yang dilakukan dengan metode kromatografi.

##### **Penentuan jumlah reduktor SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O yang optimal**

Pengerjaan dilakukan seperti pada percobaan 1, akan tetapi penambahan 0,1 mL larutan SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O mengandung jumlah yang bervariasi (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 dan 120 µg). Asam tartrat (0,1 mL) yang digunakan adalah larutan asam tartrat dengan konsentrasi 0,04 mM seperti yang diperoleh pada percobaan penentuan jumlah asam tartrat. Sebelum penambahan larutan Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> (0,3 mL / ≈ 2,5 mCi), pH campuran diatur 3,0–3,1 dengan penambahan larutan HCl atau NaOH 0,01 N. Efisiensi penandaan <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin ditentukan dengan metode kromatografi.

##### **Optimalisasi pH penandaan**

Percobaan penentuan pH optimal penandaan siprofloksasin dengan radionuklida <sup>99m</sup>Tc dilakukan seperti pada percobaan 2. Dalam percobaan ini digunakan 0,1 mL larutan yang mengandung 50 µg SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O seperti hasil yang diperoleh pada percobaan 2, dan pH larutan diatur bervariasi dengan penambahan larutan HCl atau NaOH 0,01N.

Efisiensi penandaan <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin ditentukan dengan metode kromatografi.

##### **Pengaruh waktu inkubasi terhadap efisiensi penandaan <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin**

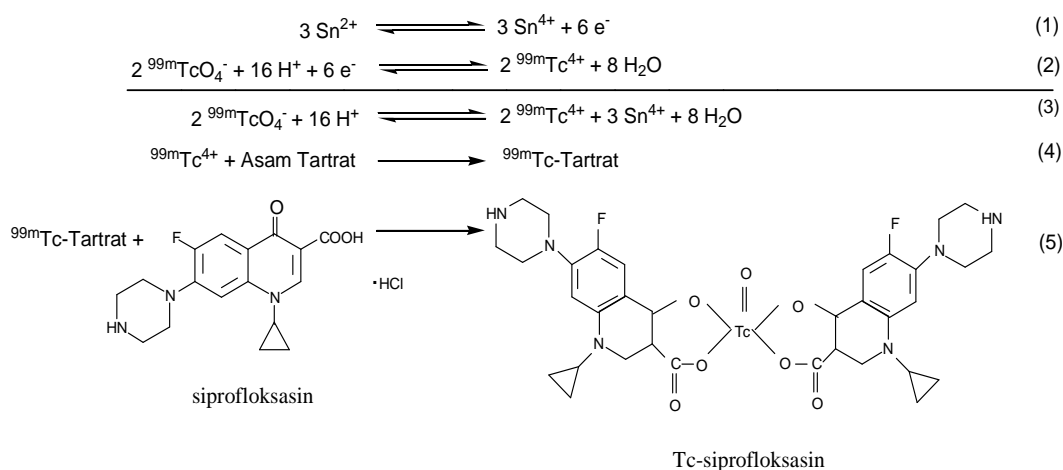
Penentuan waktu inkubasi <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin dilakukan seperti pada percobaan optimalisasi pH penandaan (percobaan 3). Larutan diatur pH nya = 3,0 seperti yang diperoleh dari hasil percobaan 3. Setelah penambahan larutan Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> (0,3 mL / ≈ 2,5 mCi), campuran diinkubasi pada temperatur kamar dengan waktu yang bervariasi (5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75 menit). Efisiensi penandaan <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin ditentukan dengan metode kromatografi.

##### **Pengaruh volume <sup>99m</sup>Tc-perteknetat terhadap efisiensi penandaan <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin**

Percobaan ini dilakukan seperti pada percobaan 4, dan digunakan larutan <sup>99m</sup>Tc-perteknetat (Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>) dengan volume yang bervariasi (0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 dan 2,5 mL). Campuran diinkubasi pada temperatur kamar selama 15 menit, kemudian efisiensi penandaan <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin ditentukan dengan metode kromatografi.

##### **Penentuan kemurnian radiokimia <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin**

Kemurnian radiokimia <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin ditentukan dengan 2 macam metode kromatografi, yaitu kromatografi kertas dengan fase diam kertas Whatman I dan kromatografi lapis tipis *instant (Instant Thin Layer Chromatography, ITLC)* dengan fase diam ITLC-SG, masing-masing dengan ukuran 1 x 10 cm yang setiap 1 cm ditandai dengan pensil dan diberi nomor dari -1 sampai 8. Larutan <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin ditotolkan pada titik nol, kemudian kertas Whatman I dielusi secara menaik dengan fase gerak metil etil keton, sedangkan ITLC-SG dielusi secara menaik dengan fase gerak campuran etanol : air : amonia (2:5:1) sampai skala 8. Kromatogram dikeringkan, dipotong setiap satu skala (1 cm) dan dicacah dengan pencacah saluran tunggal, detektor NaI-Tl.

Gambar 1. Mekanisme reaksi penandaan siprofloksasin dengan radionuklida  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

## Hasil dan Pembahasan

Radiofarmaka  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin dapat diformulasi dengan cara menandai ligan siprofloksasin dengan radionuklida  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , yang membentuk kompleks khelat dengan  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  sebagai logam inti dan siprofloksasin sebagai ligan.

Radionuklida  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  tersedia dalam bentuk senyawa  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  (natrium perteknetat) dan mempunyai bilangan oksidasi + 7. Untuk dapat bereaksi dengan ligan siprofloksasin, radionuklida  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  harus mempunyai bilangan oksidasi yang lebih rendah, sehingga harus direduksi terlebih dahulu dengan reduktor  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Dalam penelitian ini, pembentukan radiofarmaka  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin dilakukan dengan suatu reaksi antara, dimana asam tartrat berfungsi sebagai ko-ligan dan reaksinya disebut sebagai reaksi pertukaran ligan. Reaksi penandaan siprofloksasin dengan radionuklida  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  diduga berjalan dengan mekanisme reaksi seperti yang tertera pada Gambar 1. Dari mekanisme reaksi terlihat bahwa pengotor radiokimia yang mungkin ada pada sediaan  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin adalah  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{VII})$ -perteknetat ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) bebas dan  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{IV})$ -tereduksi ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ ) bebas. Berdasarkan hal tersebut maka harus dipilih

metode yang tepat untuk menentukan besarnya efisiensi penandaan yang diperoleh dengan cara memisahkan senyawa  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin dari pengotor radiokimianya  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  dan  $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ .

Efisiensi penandaan  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin ditentukan dari kemurnian radiokimianya yang dilakukan dengan metode kromatografi kertas (Kleisner *et al.*, 2002) dan kromatografi lapis tipis *instant* (*Instant Thin Layer Chromatography*, ITLC) (Siaens *et al.*, 2004). Penggunaan kromatografi kertas Whatman I dengan fase gerak metil etil keton dapat memisahkan pengotor radiokimia dalam bentuk  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) dengan  $R_f = 1,0$ ; sedangkan pengotor radiokimia dalam bentuk  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tereduksi ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ ) akan berimpit dengan  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin ( $R_f = 0,0$ ). Penggunaan kromatografi lapis tipis *instant* dengan fase gerak campuran etanol : air : amonia (2:5:1) dapat memisahkan pengotor radiokimia dalam bentuk  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tereduksi ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ ) dengan  $R_f = 0,0$ ; sedangkan  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) dan  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin akan bermigrasi ke arah batas pelarut. Dengan menggunakan gabungan 2 macam metode kromatografi tersebut dapat diketahui kemurnian radiokimia  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin yang terbentuk.

Tabel I. Penentuan jumlah asam tartrat dalam penandaan siprofloksasin dengan teknesium-99m (siprofloksasin = 2 mg,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  = 100  $\mu\text{g}$ , pH = 3,05 - 3,25, radioaktivitas  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  = 2,5 mCi, inkubasi temperatur kamar 15 menit, volume akhir = 1,5 mL, n = 5).

Konsentrasi asam tartrat (mM)	Jumlah asam tartrat ( $\mu\text{g}$ )	Kemurnian radiokimia (%)		
		$(^{99\text{m}}\text{TcO}_4)^-$	$^{99\text{m}}\text{TcO}_2$	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin
0,20	0,300	10,41 $\pm$ 1,70	3,65 $\pm$ 0,44	85,94 $\pm$ 1,38
0,15	0,225	8,82 $\pm$ 0,56	4,50 $\pm$ 0,42	86,68 $\pm$ 0,97
0,10	0,150	7,36 $\pm$ 1,16	5,41 $\pm$ 0,66	87,23 $\pm$ 1,03
0,05	0,075	5,49 $\pm$ 2,06	6,80 $\pm$ 2,73	87,71 $\pm$ 2,43
0,04	0,060	5,10 $\pm$ 0,20	6,16 $\pm$ 1,97	88,74 $\pm$ 2,13
0,02	0,030	4,58 $\pm$ 0,47	6,86 $\pm$ 3,24	88,56 $\pm$ 3,51
0,01	0,015	4,63 $\pm$ 1,19	8,65 $\pm$ 0,34	86,72 $\pm$ 0,82
0,005	0,0075	5,00 $\pm$ 0,66	7,90 $\pm$ 0,15	87,10 $\pm$ 0,81
0,0025	0,0037	5,42 $\pm$ 0,36	7,91 $\pm$ 0,23	86,67 $\pm$ 0,58

Persentase pengotor radiokimia dan kemurnian radiokimia  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin dapat dihitung dengan persamaan (6) dan (7) :

Pengotor radio kimia (%) = (Jumlah cacahan pada masing-masing Rf - LB / Jumlah cacahan pada kromatogram - LB) x100 % (6)

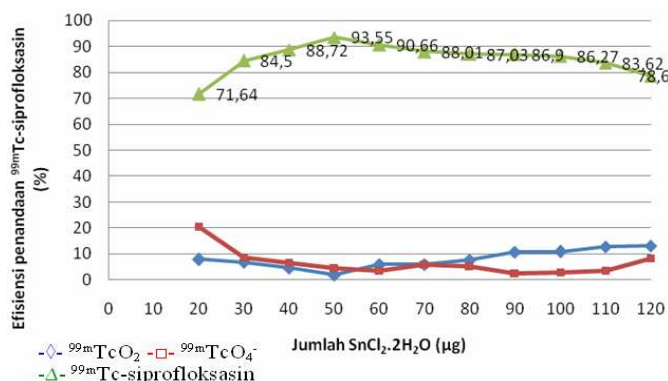
Kemurnian  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin (%) = 100 % - [ $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$  + ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ )] 100 % (7)

Dalam penelitian terdahulu (Hasan Basry *et al.*, 2005) telah diformulasi radiofarmaka siprofloksasin menggunakan bahan awal siprofloksasin HCl dengan reduktor Sn-tartrat dengan bentuk kit cair dalam 2 wadah terpisah. Senyawa ini mempunyai stabilitas yang rendah dalam penyimpanan dan pembuatan radiofarmaka ini dalam bentuk kit-kering, setelah ditandai dengan radionuklida  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  memberikan kemurnian radiokimia yang rendah, berkisar 64 % (Rukmini, 2005). Berdasarkan hasil ini dikembangkan penandaan alternatif yang didasarkan pada reaksi  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dan asam tartrat sebagai pengganti Sn-tartrat, mengingat  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  merupakan suatu reduktor kuat, akan tetapi bila digunakan untuk penandaan siprofloksasin membentuk senyawa yang berbentuk koloid (Martins *et al.*, 2001).

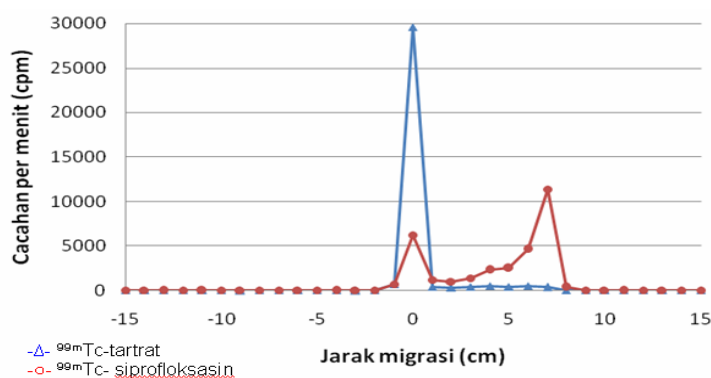
Penandaan siprofloksasin dengan memvariasikan jumlah asam tartrat ditampilkan pada Tabel I. Dari hasil percobaan terlihat

bahwa efisiensi penandaan yang dinyatakan dengan kemurnian radiokimia yang tinggi diperoleh pada penggunaan asam tartrat 0,03–0,06  $\mu\text{g}$  atau dengan konsentrasi 0,02 mM–0,04 mM yaitu berkisar 88 %. Penggunaan asam tartrat yang lebih besar dari 0,06  $\mu\text{g}$ , dan lebih kecil dari 0,03  $\mu\text{g}$  memberikan efisiensi penandaan antara 85–87 %.

Dalam penandaan suatu senyawa dengan radionuklida  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , reduktor merupakan parameter yang sangat penting dimana jumlah reduktor yang digunakan sangat bergantung pada kondisi dan jenis senyawa atau ligan yang ditandai. Oleh karena itu perlu dicari jumlah reduktor yang optimal agar diperoleh efisiensi penandaan yang maksimal. Pengaruh jumlah reduktor  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  terhadap efisiensi penandaan  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin dapat dilihat pada Gambar 2. Dari hasil percobaan penggunaan jumlah reduktor  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dengan rentang 20-120  $\mu\text{g}$  terlihat bahwa efisiensi penandaan yang maksimal diperoleh pada pemakaian reduktor sebesar 50  $\mu\text{g}$  dengan efisiensi penandaan sebesar 93,55  $\pm$  1,06 %. Pemakaian jumlah reduktor yang lebih kecil dari 50  $\mu\text{g}$  memperlihatkan bahwa jumlah tersebut tidak cukup untuk mereduksi  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  yang ada di dalam campuran, terlihat dengan masih tingginya  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ).



Gambar 2. Pengaruh jumlah reduktor SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O terhadap efisiensi penandaan <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin (siprofloksasin = 2 mg, asam tartrat = 0,06 µg, pH = 3,0 - 3,1, radioaktivitas <sup>99m</sup>Tc = 2,5 mCi, inkubasi temperatur kamar 15 menit, volume akhir = 1,5 mL, n = 4).

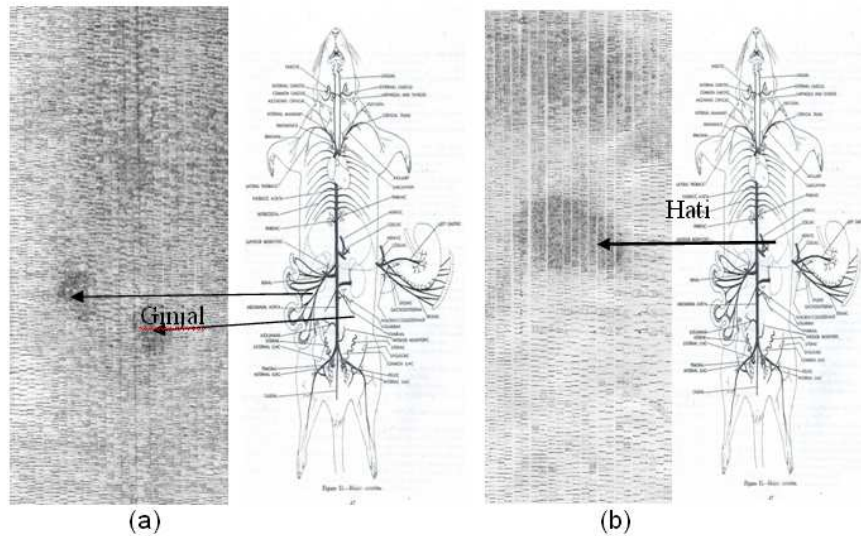


Gambar 3. Perbandingan pola migrasi <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin dan <sup>99m</sup>Tc-tartrat dengan metode elektroforesis (fase diam kertas Whatman I, fase gerak dapar fosfat 0,1N pH = 7,4 selama 1 jam).

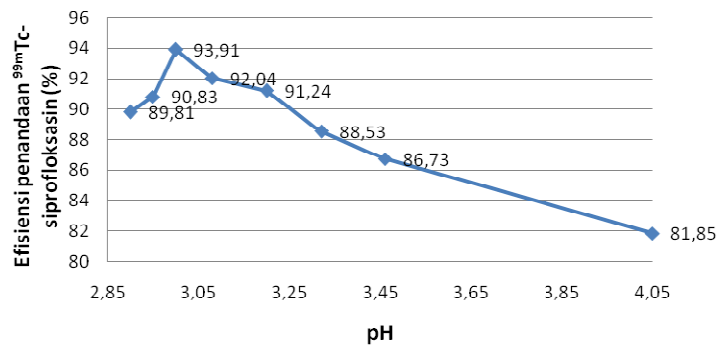
Selain itu, penggunaan jumlah reduktor lebih besar dari 50 µg meningkatkan jumlah pengotor radiokimia dalam bentuk koloid (<sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub>). Hal ini dinyatakan juga oleh Bhardwaj (2005) bahwa pembentukan koloid dapat disebabkan oleh jumlah senyawa reduktor yang berlebih.

Dalam percobaan penentuan jumlah reduktor, efisiensi penandaan maksimal diperoleh pada pemakaian reduktor SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O sebesar 50 µg. Jumlah ini relatif kecil dibandingkan dengan pemakaian reduktor Sn-tartrat dimana efisiensi penandaan maksimal diperoleh pada penggunaan sebesar 500 µg (Nurlaila *et al.*, 2009). Hal ini dapat dimengerti

mengingat SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O merupakan salah satu reduktor dengan daya reduksi yang kuat. Namun bila digunakan tanpa penambahan asam tartrat, dalam waktu singkat terjadi kekeruhan, dimana terjadi pembentukan koloid dalam jumlah yang berarti (Martins *et al.*, 2001). Adanya asam tartrat dalam reaksi, selain diperkirakan membentuk Sn-tartrat yang berfungsi sebagai reduktor juga berfungsi sebagai ko-ligan yang menstabilkan pembentukan kompleks <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin karena anion tartrat juga biasa digunakan sebagai ligan penukar dalam pembuatan radiofarmaka bertanda teknesium-99m (Saha, 2004).



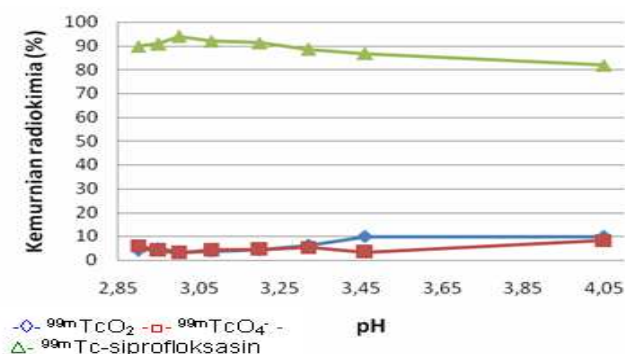
Gambar 4. Penyidikan tikus putih (*Wistar*) normal pada 1 jam pasca injeksi  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin (a) dan  $^{99m}\text{Tc}$ -tartrat (b).



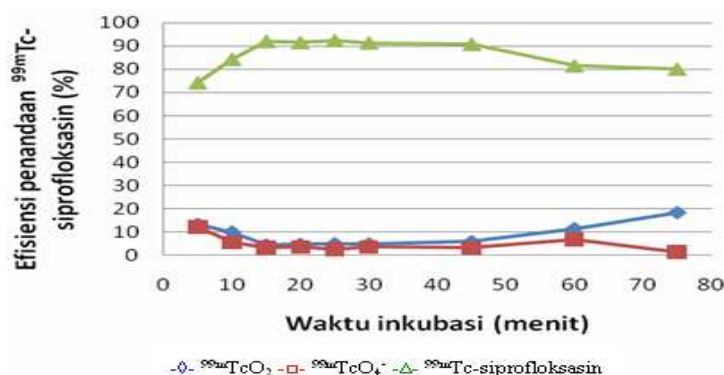
Gambar 5. Pengaruh pH terhadap efisiensi penandaan  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin (siprofloksasin = 2 mg, asam tartrat = 0,06  $\mu\text{g}$ ,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  = 50  $\mu\text{g}$ , radioaktivitas  $^{99m}\text{Tc}$  = 2,5 mCi, inkubasi temperatur kamar 15 menit, volume akhir = 1,5 mL, n = 5).

Walaupun penambahan asam tartrat untuk berikatan dengan reduktor  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ada dalam jumlah yang sangat kecil, akan tetapi timbul keraguan bahwa kompleks yang terjadi mungkin bukan  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin tetapi  $^{99m}\text{Tc}$ -tartrat mengingat anion tartrat dapat juga berfungsi sebagai ligan penukar seperti yang diuraikan sebelumnya. Di samping itu, metode kromatografi yang digunakan tidak dapat

memisahkan kedua senyawa kompleks tersebut. Untuk mengetahui hal ini dilakukan percobaan penandaan asam tartrat tanpa siprofloksasin dengan jumlah dan prosedur yang sama seperti penandaan siprofloksasin dengan radionuklida  $^{99m}\text{Tc}$ . Kemudian kedua senyawa tersebut dielusi dengan metode elektroforesis menggunakan pelarut dapar fosfat 0,1N, pH 7,4.



Gambar 6. Kemurnian radiokimia <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin pada berbagai kondisi pH (siprofloksasin = 2 mg, asam tartrat = 0,06 µg, SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O = 50 µg, radioaktivitas <sup>99m</sup>Tc = 2,5 mCi, inkubasi temperatur kamar 15 menit, volume akhir = 1,5 mL, n = 5).



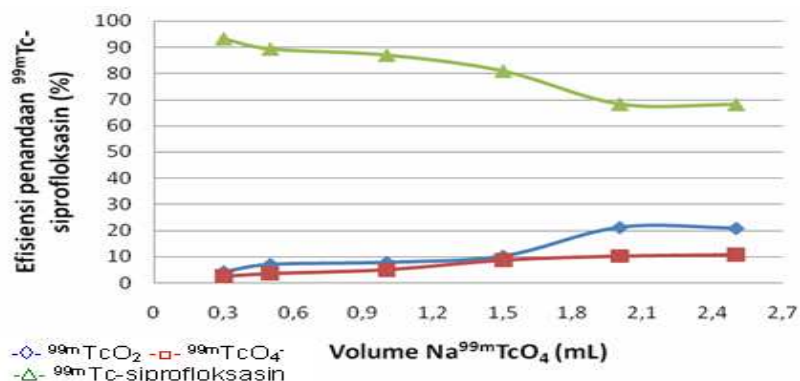
Gambar 7. Pengaruh waktu inkubasi terhadap efisiensi penandaan <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin (siprofloksasin = 2 mg, asam tartrat = 0,06 µg, SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O = 50 µg, pH = 3,0; radioaktivitas <sup>99m</sup>Tc = 2,5 mCi, volume akhir = 1,5 mL, n = 5).

Dari hasil percobaan ini terlihat adanya perbedaan pola kromatogram yang signifikan antara kedua senyawa tersebut (Gambar 3). Untuk memperkuat pembuktian ini, dilakukan evaluasi secara biologis dimana kedua sediaan ini masing-masing disuntikkan pada hewan uji tikus putih (*Wistar*) normal, kemudian dilakukan penyidikan dengan alat *animal scanner* pada 1 jam pasca injeksi. Hasil penyidikan (Gambar 4) memberikan pola distribusi yang berbeda, terlihat bahwa <sup>99m</sup>Tc-tartrat terakumulasi pada organ hati, sedangkan <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin tidak terakumulasi pada organ tersebut tetapi terakumulasi pada organ ginjal

seperti yang ditunjukkan oleh peneliti terdahulu dimana ginjal merupakan rute ekskresi dari senyawa tersebut (Yana *et al.*, 2007).

Parameter lain yang sangat mempengaruhi efisiensi penandaan <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin adalah kondisi pH. Hasil percobaan menunjukkan bahwa kondisi optimal untuk penyediaan <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin yang memenuhi persyaratan sebagai radiofarmaka mempunyai rentang pH yang sangat pendek yaitu 2,95 – 3,20 dan efisiensi penandaan maksimal sebesar 93,91 ± 1,25 % diperoleh pada pH = 3,0 (Gambar 5).





Gambar 8. Pengaruh volume <sup>99m</sup>Tc-perteknetat terhadap efisiensi penandaan <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin (siprofloksasin = 2 mg, asam tartrat = 0,06 µg, SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O = 50 µg, pH = 3,0, radioaktivitas <sup>99m</sup>Tc = 2,5 mCi, n = 4).

Efisiensi penandaan yang dinyatakan dengan kemurnian radiokimia akan menurun pada pH di bawah 2,95 yang sebagian besar pengotor ada dalam bentuk (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>), sedangkan pada pH di atas 3,20 terlihat <sup>99m</sup>Tc tereduksi (<sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub>) cenderung meningkat (Gambar 6).

Suatu reaksi kimia selalu mempunyai waktu reaksi yang optimal untuk menghasilkan produk yang maksimal. Gambar 7 memperlihatkan bahwa efisiensi penandaan yang memenuhi persyaratan sebagai radiofarmaka dengan kemurnian radiokimia  $\geq 90\%$  (Owunwanne *et al.*, 1995) diperoleh pada inkubasi temperatur kamar dengan rentang waktu 15 sampai 45 menit setelah penambahan radionuklida <sup>99m</sup>Tc. Inkubasi pada temperatur kamar dengan waktu 5 dan 10 menit memberikan efisiensi penandaan yang relatif kecil, masing-masing sebesar  $74,42 \pm 0,66\%$  dan  $84,42 \pm 0,09\%$ . Penambahan waktu inkubasi lebih dari 45 menit memberikan hasil yang menurun. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa tersebut mempunyai stabilitas yang relatif rendah. Namun bila ditinjau dari teknik penandaan, metode wadah tunggal ini sangat praktis, cepat dan sederhana karena hanya tinggal menambahkan radionuklida <sup>99m</sup>Tc ke dalam wadah kit-radiofarmaka. Oleh karena itu, untuk menghindari terjadinya penurunan kemurnian radiokimia sediaan <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin selama penyimpanan, sebaiknya

penambahan radionuklida dilakukan pada saat sediaan akan digunakan.

Dalam penyediaan radiofarmaka bertanda <sup>99m</sup>Tc, radionuklida dapat diperoleh dari generator <sup>99</sup>Mo-<sup>99m</sup>Tc yang hingga saat ini sudah banyak beredar di pasaran. Untuk mendapatkan radionuklida <sup>99m</sup>Tc dengan radioaktivitas tertentu kadang-kadang diperoleh volume yang cukup besar, dimana volume ini dapat mempengaruhi stabilitas radiofarmaka sehingga diperoleh efisiensi penandaan atau kemurnian radiokimia yang rendah. Hal ini disebabkan oleh reaksi hidrolisis sehingga mengakibatkan terjadinya penguraian dan terlepasnya <sup>99m</sup>Tc-tereduksi dari senyawa bertanda tersebut. Oleh karena itu, dalam penelitian dilakukan juga pengujian pengaruh volume larutan <sup>99m</sup>Tc-perteknetat terhadap efisiensi penandaan <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin seperti yang ditampilkan pada Gambar 8. Dari hasil percobaan dengan empat kali pengulangan terlihat bahwa pemakaian volume <sup>99m</sup>Tc-perteknetat 0,3 mL memberikan efisiensi penandaan yang maksimal sebesar  $93,14 \pm 1,02\%$ , penggunaan volume <sup>99m</sup>Tc-perteknetat lebih dari 0,3 mL memberikan efisiensi penandaan yang menurun. Hal ini menunjukkan bahwa pemakaian volume <sup>99m</sup>Tc-perteknetat lebih dari 0,3 mL, mengakibatkan terjadinya perubahan pH larutan dari rentang pH optimal 2,95 – 3,20, sehingga terjadi

penguraian yang menurunkan efisiensi penandaan  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin. Penggunaan volume  $^{99m}\text{Tc}$ -perteknetat lebih kecil dari 0,3 mL tidak dilakukan karena radioaktivitasnya sangat rendah sehingga secara klinis tidak memenuhi dosis radioaktivitas yang dibutuhkan.

### Kesimpulan

Radiofarmaka siprofloksasin bertanda teknesium-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) dapat diformulasi dalam wadah tunggal dengan campuran asam tartrat dan  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  sebagai reduktor.

Kondisi penandaan optimal dari radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin diperoleh pada pemakaian 2 mg siprofloksasin HCl, 0,06  $\mu\text{g}$  asam tartrat, 50  $\mu\text{g}$  reduktor  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dengan kondisi pH = 2,95 – 3,20 dan waktu

inkubasi minimal 15 menit pada temperatur kamar dengan efisiensi penandaan 90 – 93 %. Radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin stabil selama 20 menit pada temperatur kamar dengan kemurnian radiokimia masih di atas 90 %

Volume larutan  $^{99m}\text{Tc}$ -perteknetat berpengaruh terhadap efisiensi penandaan  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin, penggunaan volume lebih besar dari 0,3 mL menurunkan efisiensi penandaan.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr. Rukmini Ijas, Sdr. Epi Isabela dan Sdr. Iswahyudi yang telah banyak memberikan bantuan dalam pelaksanaan penelitian ini.

### Daftar Pustaka

- Bhardwaj N., Bhatnagar A., and Singh A. K., 2005, Development and evaluation of a single vial cold kit for infection imaging:  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin, *World J. Nucl. Med.*, 4, 244-251.
- Britton K. E., Vinjamuri S., Hall A. V., Solanki K., Siraj Q. H., Bomanji J., and Das S., 1997, Clinical evaluation of technetium-99m Infecton for the localisation of bacterial infection. *Eur. J. Nucl. Med.*, 24, 553-556.
- Britton K. E., Wareham D. W., Das S., Solanki K. K., Amarat H., Bhatnagar A., Katamihardja A. H. S., Malamitsi J., Moustafa H. M., Soroa V. E., Sundram F. X., and Padhy A. K., 2002, Imaging bacterial infection with  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin (Infecton). *J. Clin. Pathol.*, 55, 817-823.
- Dumarey N., Blocklet D., Appelboom T., Tant L., and Schoutens A., 2002, Infecton is not specific for bacterial osteo-articular infective pathology, *Eur. J. Nucl. Med., Mol. Imaging*, 29, 530-535.
- Gano L., Patricio L., Cantinho G., Pena H., Martins T., and Marques E., 1998, Ciprofloxacin in imaging of infective versus sterile inflammation, *IAEA-TecDoc 1029*, Vienna, 213-220.
- Hasan Basry T., Nurlaila Z., and Rukmini I., 2005, Formulasi radiofarmaka  $^{99m}\text{Tc}$ -siprofloksasin untuk diagnosis infeksi, Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknik Nuklir, Bandung, *Puslitbang Teknik Nuklir-BATAN*, 38-45.
- Kleisner I., Komarek P., Komarkova I., and Konopkova M., 2002, A new technique of  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin kit preparation, *Nuklearmedizin*, 41, 224-229.
- Larikka M. J., Ahonen A. K., Niemela O., Puronto O., Junila J. A., Hamalainen M. M., Britton K., and Syrjala H. P., 2002,  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin (Infecton) imaging in the diagnosis of knee prosthesis infection, *Nucl. Med. Commun.*, 23, 167-170.
- Martins P. A., Faintuch B. L., and Pereira N. P. S., 2001, Optimization of labeling ciprofloxacin with  $^{99m}\text{Tc}$  and biodistribution in normal and injected rats, *J. Nucl. Med.*, 42, 264P.
- Nurlaila Z., Basuki H., and Rukmini I., 2009, Pengembangan dan aplikasi klinis kit-kering radiofarmaka siprofloksasin, *Jurnal Sains dan Teknologi Nuklir*, X(1), 11-23.
- Owunwanne A., Patel M., and Sadek S., 1995, *The Handbook of Radiopharmaceuticals*, 1<sup>st</sup> ed., London:Chapman & Hall Medical, pp.18–22.

- Rukmini I., 2005, Desain kit kering radiofarmaka siprofloksasin, P3TkN/Lap301008/ NP/2005.
- Saha G. B., 2004, *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, 5<sup>th</sup> ed., New York: Springer, 101.
- Siaens R. H., Rennen H. J., Boerman O.C., Dierckx R., Slegers G., 2004, Synthesis and comparison of <sup>99m</sup>Tc-enfloxacin and <sup>99m</sup>Tc-ciprofloxacin, *J. Nucl. Med.*, 45(12), 2088-2094.
- Sonmezoglu K., Sonmezoglu M., Halac M., Akgun I., Turkmen C., Onsel C., Kanmaz B., Solanki K., Britton K.E., and Uslu I., 2001, Usefulness of <sup>99m</sup>Tc-ciprofloxacin (Infecton) scan in diagnosis of chronic orthopedic infections: comparative study with <sup>99m</sup>Tc-HMPAO leukocyte scintigraphy, *J. Nucl. Med.*, 42, 567-574.
- Yana S., Rizky J. S., and Nurlaila Z., 2007, Biodistribusi dan uji *clearance* <sup>99m</sup>Tc-siprofloksasin pada mencit (*Mus musculus*) yang terinfeksi bakteri *Escherichia coli*, Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknik Nuklir, Bandung, PTNBR-BATAN, 393-397.

---

<sup>\*)</sup> Corresponden : Nurlaila Z

Pusat Teknologi Nuklir Bahan dan Radiometri - BATAN, Bandung

Email : nurlailaz@yahoo.com