

## Preparasi Radiofarmaka Nanokoloid *Human Serum Albumin* (HSA) untuk Limfosintigrafi

### Preparation of Human Serum Albumin (HSA) Nanocolloid Radiopharmaceutical for Lymphoscintigraphy

Yunilda\*, Rohadi Awaludin, Veronika Yulianti Susilo, Sri Setiowati, Widyastuti Widjaksana

*Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka, Badan Tenaga Atom dan Nuklir, Indonesia*  
\*E-mail: yunil@batan.go.id

Diterima: 3 Agustus 2016

Direvisi: 18 Januari 2017

Disetujui: 17 Februari 2017

#### Abstrak

Nanokoloid *human serum albumin* (HSA) yang ditandai dengan radionuklida teknesium-99m dapat digunakan dalam bidang kedokteran nuklir untuk mendeteksi kanker payudara melalui pemeriksaan *sentinel lymph node* (SLN). Pemeriksaan SLN berfungsi untuk mendeteksi penyebaran sel kanker sebelum maupun setelah operasi. Deteksi ditandai dengan adanya akumulasi radiofarmaka pada kelenjar getah bening dan dibantu menggunakan kamera gama atau SPECT. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh protokol pembuatan radiofarmaka nanokoloid HSA dengan komposisi dan persyaratan yang disesuaikan dengan *technical leaflet nanocoll albumon* yang mengacu pada *The Society Of Nuclear Medicine And Molecular Imaging (SNMMI)* dan *European Association Of Nuclear Medicine (EANM)*. Penelitian ini meliputi tahap preparasi dan pengujian kualitas. Metode preparasi dilakukan dengan mendenaturasi protein HSA pada pH dan suhu pemanasan tertentu. Pengujian kualitas dilakukan menggunakan alat *particle size analyzer (PSA)* untuk mengukur besar partikel dan alat TEM untuk melihat bentuk morfologi partikel serta menggunakan kromatografi kertas untuk pengujian *yield* penandaannya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa diperoleh nanokoloid *human serum albumin* (HSA) yang ditandai dengan radionuklida teknesium-99m dengan ukuran partikel 80% berukuran <100 nm, bentuk morfologi *yield* penandaan >95% dengan pH sediaan 7,3-7,4 sesuai dengan persyaratan. Hasil penelitian ini adalah protokol pembuatan nanokoloid HSA

**Kata kunci:** *Sentinel lymph node*; Limfosintigrafi; Radiofarmaka; Nanopartikel; *Human serum albumin*

#### Abstract

*Nanocolloid human serum albumin (HSA) labeled with technetium-99m is widely used in nuclear medicine for detection of breast cancer through examination of sentinel lymph node (SLN). SLN examination is used to detect the spread of cancer cells before and after surgery. Accumulation of a radiopharmaceutical in lymph nodes was detected by using a gamma camera or SPECT. The aim of this study is to establish the protocol of HSA nanocolloid preparation with composition and specification in accordance with the Technical Leaflet Nanocoll Albumon which refers to The Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (SNMMI) and European Association of Nuclear Medicine (EANM). This study includes the step of preparation and quality test. The method was carried out by means of protein denaturation of HAS at certain pH and heating at certain temperature. Quality tests were carried out using particle size analyzer (PSA) to determine the particle size, Transmission Electron Microscopy (TEM) to observe the morphology of the particles, and paper chromatography to measure radiolabeling yield. This study has obtained the particle size 80% of <100 nm, the yield of morphology labelling >95% and pH of 7.3–7.4. The result was a protocol of preparing HSA nanocolloid.*

**Keywords:** *Sentinel lymph node*; Lymphoscintigraphy; Radiopharmaceuticals; Nanoparticle; *Human serum albumin*

## PENDAHULUAN

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia. Pada tahun 2012, kanker menjadi penyebab kematian sekitar 8,2 juta orang. Kanker paru, kanker hati, kanker perut, kanker kolorektal, dan kanker payudara adalah penyebab terbesar kematian akibat kanker setiap tahunnya. Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2013, Badan Litbang Kementerian Kesehatan RI, penyakit kanker serviks dan kanker payudara menduduki tingkat teratas penyakit kanker yang juga menaikkan tingkat kematian di Indonesia.<sup>1</sup>

Untuk mengendalikan kedua jenis kanker tersebut perlu dilakukan deteksi dini terhadap penyakit ini. Dalam bidang kedokteran nuklir, deteksi dini terhadap penyakit kanker payudara dilakukan dengan cara memeriksa kelenjar getah bening atau *Sentinel Lymph Node* (SLN). Kelenjar getah bening berfungsi menyaring getah bening dari seluruh kelenjar yang bersifat patogen dan juga menyaring limbah seluler, sel-sel mati dan sel-sel kanker. Dengan adanya sel-sel kanker yang berada pada kelenjar getah bening, maka dengan menyuntikkan suatu sediaan radiofarmaka akan terjadi akumulasi sediaan radiofarmaka pada kelenjar getah bening. Hal ini merupakan suatu metode untuk mendeteksi adanya sel kanker pada kelenjar getah bening yang disebut dengan limfo sintigrafi.<sup>2,3,4</sup>

Pemeriksaan ini dilakukan dengan cara menyuntikkan sediaan radiofarmaka ke dalam tubuh pasien melalui *subcutaneous injection*, *peritumoral injection* dan *subdermalinjection*. Radiofarmaka yang disuntikkan akan dideteksi dengan menggunakan kamera gama atau *probe gama*. Pemeriksaan SLN ini digunakan untuk mendeteksi penyebaran sel kanker, baik sebelum operasi maupun setelah operasi sehingga bisa dilakukan tindakan terapi yang tepat. Sediaan radiofarmaka yang digunakan untuk penelusuran sistem limfatik ini adalah teknesium-99m nanokoloid *human serum albumin* (HSA). Selama ini kebutuhan rumah sakit akan radiofarmaka ini diimpor dari luar negeri yaitu *nanocoll albumon*. Selain

menggunakan metode radiofarmaka, untuk menentukan SLN dapat digunakan tanpa radioaktif yaitu dengan *blue dye test*.<sup>5,6,7,8,9</sup>

Penelitian ini melakukan preparasi sediaan radiofarmaka nanokoloid HSA dengan komposisi dan persyaratan kualitasnya yang disesuaikan dengan *nanocoll albumon* yang mengacu pada *The Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* (SNMMI) dan *European Association of Nuclear Medicine* (EANM) yang disediakan untuk memenuhi kebutuhan permintaan rumah sakit. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan preparasi sediaan nanosfer HSA bentuk koloid dengan ukuran partikel 100-200 nm dengan menggunakan bahan pendukung dan metode yang berbeda dengan penelitian ini.<sup>10</sup> Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan aturan dan langkah-langkah (protokol) guna memperoleh sediaan nanokoloid yang hasilnya disesuaikan dengan SNMMI dan EANM untuk digunakan sebagai radiofarmaka.

## METODE

Penelitian ini merupakan penelitian terapan dengan desain eksperimental laboratorium. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Sintesa dan Senyawa Bertanda Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka (PTRR), BATAN.

### Alat dan bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *human serum albumin* (HSA) (Aldrich), dilarutkan dalam larutan salin (NaCl 0,9%) (IPHA-laboratories), larutan perteknetat teknesium-99m yang dibuat oleh PTRR BATAN, SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Aldrich) dilarutkan dalam larutan asam klorida pekat, kemudian diencerkan dengan akuabides (IPHA-laboratories). Bahan pembuat buffer digunakan NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O dan Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck). Glukosa (Merck) yang dilarutkan dalam akuabides digunakan sebagai larutan pendispersi. Kertas Whatman No. 1, metanol (Merck). Sebagai penyaring digunakan filter *Millipore* 0,22 μm *disposable* steril. Satu set alat pemanas dan *stirrer* untuk proses denaturasi. *Particle Size*

*Analyzer* (PSA) (Malvern), *Transmission Electron Microscope* (TEM) (JEOL JEM-1400 Electron Microscope).

### Prosedur kerja

#### Pembuatan nanokoloid HSA

*Human serum albumin* ditimbang, dilarutkan dalam larutan salin dan selanjutnya dilarutkan dalam larutan NaOH. Larutan ditambahkan larutan  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dengan dialiri gas nitrogen. pH larutan diatur hingga pH 7,3-7,4. Larutan dipanaskan sambil diaduk dengan kecepatan yang stabil pada suhu  $90^\circ\text{C}$  selama 30 menit. Larutan didinginkan sambil diaduk. Setelah tercapai suhu kamar, ditambahkan larutan glukosa dalam buffer fosfat. Larutan disaring dengan kertas saring dan dibagi ke dalam vial masing-masing 1 ml.

#### Analisa karakteristik partikel

##### Pengukuran partikel

Pengukuran partikel sediaan radiofarmaka nanokoloid HSA diuji menggunakan alat *particle size analyzer* (PSA). Ukuran partikel yang diperoleh harus memenuhi syarat agar dapat dipergunakan pasien.

##### Analisa bentuk morfologi partikel

Bentuk morfologi partikel dari sediaan radiofarmaka nanokoloid HSA dilakukan dengan menggunakan alat TEM.

##### Metode penandaan

Penandaan sediaan nanokoloid HSA dilakukan dengan menambahkan 2–10 mCi larutan perteknetat teknesium-99m ke dalam vial yang berisi sediaan radiofarmaka nanokoloid HSA, kemudian dilakukan inkubasi selama 10 menit pada temperatur kamar.

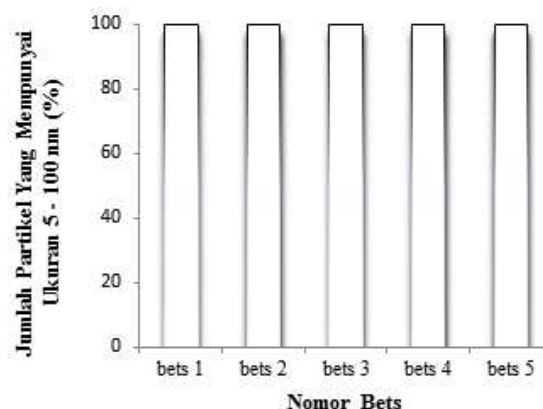
#### Penentuan kemurnian radiokimia

Pemakaian sediaan radiofarmaka teknesium-99m nanokoloid HSA ini harus memenuhi syarat kemurnian radiokimia yaitu  $>95\%$ . Untuk itu dilakukan pengujian dengan metoda Kromatografi Kertas (KK). Kertas Whatman No 1 digunakan sebagai fase diam, dan sebagai fase gerak digunakan larutan

metanol 80%. Pada kromatografi kertas ini, teknesium-99m nanokoloid HSA berada pada  $R_f = 0,0$  sedangkan teknesium yang berupa teknesium bebas berada pada posisi  $R_f = 0,3-0,5$ . Persentase kemurnian radiokimia teknesium-99m nanokoloid HSA diperoleh dengan menghitung aktivitas teknesium-99m HSA pada  $R_f = 0$ , dibagi dengan aktifitas total dari  $R_f = 0$  sampai dengan  $R_f = 1$  dikali 100 %.

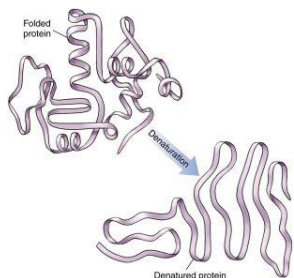
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengukuran nanopartikel HSA dengan alat PSA menunjukkan bahwa lebih dari 80% dari jumlah partikel, berukuran  $<100$  nm pada Gambar 1, sehingga sediaan nanokoloid HSA dapat digunakan untuk limfosintigrafi.<sup>11,12</sup>



**Gambar 1. Hasil pengukuran ukuran partikel pada beberapa bets**

*Human Serum Albumin* merupakan protein yang terdiri dari gabungan asam amino. Pembentukan partikel berukuran nano pada nanokoloid HSA ini dilakukan dengan cara denaturasi protein HSA yaitu dengan pengaturan pH dan pemanasan. Pada proses denaturasi ini terjadi pemutusan ikatan pada struktur sekunder, tersier, dan kuarterner, sehingga protein yang berbentuk *folding* akan membuka lipatnya dan volumenya menjadi besar.<sup>13</sup> Sebagai ilustrasi dapat dilihat pada gambar 2 di bawah ini:



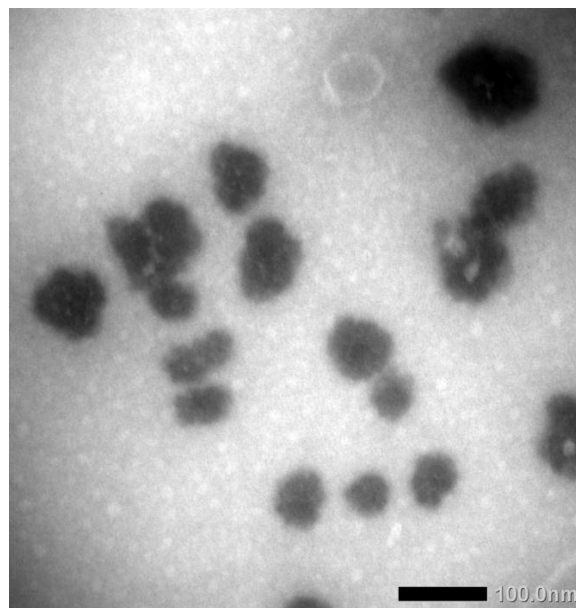
**Gambar 2. Ilustrasi pembukaan lipatan pada protein**

Pada preparasi nanokoloid HSA, sebelum dilakukan proses merupakan larutan molekul-molekul protein HSA yang bentuk molekulnya masih berupa *folded*, kemudian karena pengaturan pH dan pemanasan tertentu maka molekul-molekul protein HSA tersebut terdenaturasi sehingga molekul-molekul protein tersebut membuka lipatannya menjadi molekul-molekul besar yang ukurannya sesuai dengan persyaratan.

Bentuk morfologi dan ukuran partikel nanokoloid HSA diukur dengan alat TEM. Hasil pengukurannya dapat dilihat pada Gambar 3 yang memperlihatkan bentuk morfologi dan ukuran partikel nanokoloid HSA. Bentuk morfologinya berupa partikel-partikel yang ukurannya bervariasi. Dari skala partikel, terlihat rata-rata ukuran partikel lebih kecil dari 100 nm. Dengan demikian, ukuran ini dinyatakan telah memenuhi syarat.<sup>11</sup>

Pada Gambar 3 terlihat partikel terpisah satu dengan yang lain, hal ini disebabkan adanya glukosa pada sediaan nanokoloid HSA. Fungsi dari glukosa adalah sebagai pendispersi, sehingga partikel terpisah satu sama lain. Glukosa mempunyai gugus yang bersifat hidrofilik dan hidrofobik pada masing-masing ujung molekulnya. Ujung yang bersifat hidrofobik berinteraksi dengan partikel nanokoloid HSA, sedangkan partikel yang bersifat hidrofilik berinteraksi dengan pelarut air, sehingga masing-masing partikel saling terpisah.<sup>14,15,16</sup>

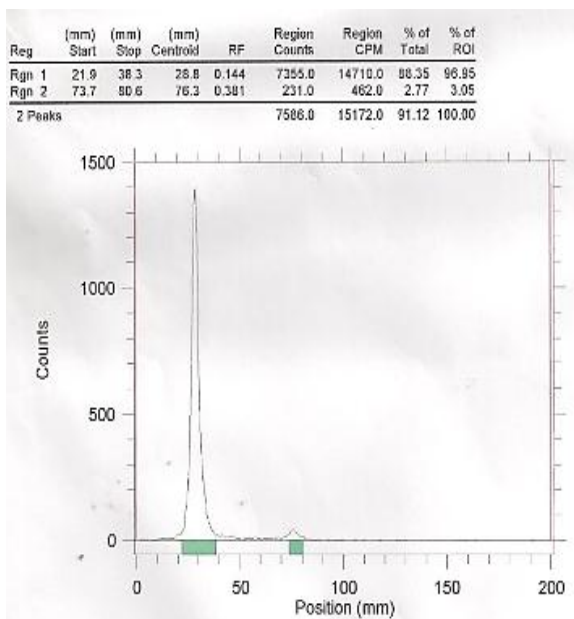
Setelah proses di atas, untuk mengetahui persentase kompleks teknesium-99m nanokoloid HSA yang terbentuk, digunakan metode kromatografi kertas.



**Gambar 3. Partikel Nanokoloid HSA diukur dengan alat TEM**

Hasil penentuan kemurnian radiokimia yang telah dilakukan telah didapatkan posisi kompleks teknesium-99m nanokoloid HSA dan teknesium-99m bebas seperti terlihat pada Gambar 4a dan 4b.

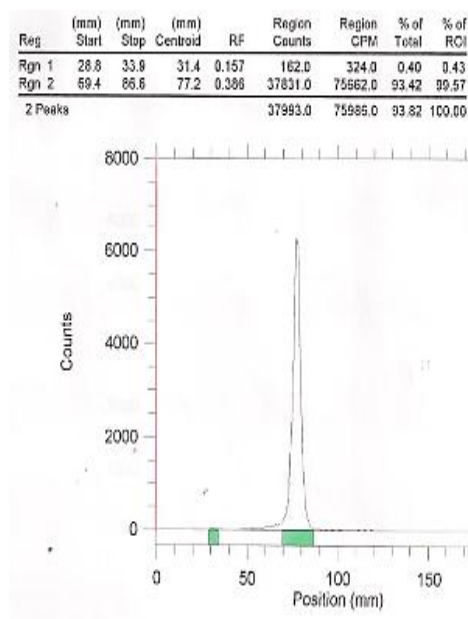
Pada Gambar 4a terlihat posisi puncak kompleks teknesium-99m nanokoloid HSA berada pada  $R_f = 0,14$  dan pada Gambar 4b posisi puncak teknesium-99m bebas pada  $R_f = 0,38$ . Sediaan nanokoloid HSA merupakan senyawa koloid, dimana adanya partikel dalam larutan. Partikel-partikel tersebut adalah berupa nano HSA yang berikatan dengan teknesium-99m. Dalam sistem kromatografi ini, nanopartikel teknesium-99m HSA tidak bisa terbawa pelarut ke atas, sedangkan teknesium-99m fraksi bebas akan terbawa oleh fasa gerak yang berupa larutan polar pada posisi  $R_f = 0,38$ , sehingga senyawa nanopartikel teknesium-99m HSA dan teknesium-99m bebas dapat terpisah. Dengan menghitung aktivitas di masing-masing  $R_f$ , dapat diketahui persentase teknesium-99m yang berikatan dengan nano HSA dan teknesium-99m yang tidak berikatan, sehingga diketahui *yield* penandaan nanokoloid HSA ini.<sup>17</sup>



**Gambar 4a. Posisi puncak kompleks teknesium-99m nanokoloid HSA dengan Rf = 0,14**

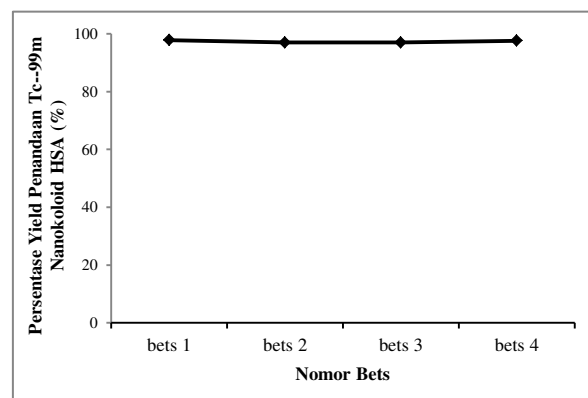
Hasil *yield* penandaan nanokoloid HSA dengan teknesium-99m dari 4 bets yang dilakukan dapat dilihat pada gambar 5. Pada gambar 5 diketahui bahwa teknesium-99m nanokoloid HSA yang dibuat telah memenuhi persyaratan jika digunakan untuk mendeteksi SLN dengan metode limfointigrafi. Dalam sediaan radiofarmaka tersebut, 95% sediaan merupakan kompleks nanokoloid teknesium-99m HSA dan 5% lainnya merupakan teknesium-99m bebas. Dalam larutan perteknetat ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ), teknesium-99m merupakan senyawa yang sangat stabil dengan tingkat oksidasi +7. Untuk berikatan dengan biomolekul seperti HSA, teknesium berada pada tingkat oksidasi +5. Senyawa yang umum digunakan untuk mereduksi teknesium-99m dari +7 ke tingkat oksidasi +5 digunakan larutan  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .<sup>18,19,20,21</sup>

Pada penelitian ini juga dilakukan juga pengujian pH pada setiap bets. Hasil pengukuran pH berkisar antara 7.3-7.4. Pada akhir preparasi dilakukan penambahan *buffer* fosfat. Penambahan *buffer* fosfat berfungsi untuk mempertahankan pH nanokoloid HSA. *Human serum albumin* ini terdiri dari



**Gambar 4b. Posisi puncak teknesium-99m bebas dengan Rf = 0,38**

gabungan beberapa asam amino yang memiliki gugus karboksil (-COOH) dan gugus amina (-NH<sub>2</sub>). Dalam larutan, asam amino ini bersifat amfoter yang cenderung menjadi asam pada larutan basa dan menjadi basa pada larutan asam. Dalam keadaan asam, asam amino seperti *human serum albumin* akan bermuatan negatif. Muatan negatif pada nanokoloid HSA perlu dipertahankan karena senyawa ini akan berikatan secara dengan teknesium-99m yang bermuatan +5. *Buffer* fosfat akan tetap mempertahankan pH larutan di akhir tahap penelitian.<sup>18,22,23</sup>



**Gambar 5. Yield penandaan teknesium-99m nanokoloid HSA**

## KESIMPULAN

Telah diperoleh protokol pembuatan nanokoloid HSA dengan hasil ukuran partikel, bentuk morfologi, dan kemurnian radiokimia yang memenuhi persyaratan kualitas yang disesuaikan dengan *Technical Leaflet Nano Albumon* yang mengacu pada *The Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (SNMMI)* dan *European Association of Nuclear Medicine (EANM)*.

## SARAN

Dari penelitian yang dilakukan disarankan untuk melanjutkan pengujian kestabilan sediaan nanokoloid HSA ini, yaitu kestabilan setelah dilabel dengan teknesium-99m dan kestabilan selama penyimpanan setelah preparasi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih saya sampaikan kepada Bapak Indra Saptiama dan Ibu Grace Tj Sulung budi yang telah membantu penelitian ini.

## DAFTAR RUJUKAN

1. Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI;2015.
2. Tokin CA, Cope FO, Metz WL, Blue MS, Potter BM, Abbruzzese BC, et al. The efficacy of Tilmanocept in sentinel lymph node mapping and identification in breast cancer patients: a comparative review and meta-analysis of the <sup>99m</sup>Tc-labeled nanocolloid human serum albumin standard of care. *Clin Exp Metastasis*. 2012;29(7): 681–6.
3. Vidal-Sicart S, Valdés Olmos R. Sentinel node mapping for breast cancer: Current situation. *J Oncol*. 2012;1-7.
4. Kraft O, Havel M. Sentinel lymph nodes and planar scintigraphy and SPECT/CT in various types of tumours. Estimation of some factors influencing detection success. *Nucl Med Rev*. 2013;16(1):17–25.
5. Brouwer O, Buckle T, Vermeeren L, Klop W, Balm A, Van Der Poel HG, et al. Comparing the hybrid fluorescent-radioactive tracer indocyanine green- <sup>99m</sup>Tc-Nanocolloid with <sup>99m</sup>Tc-nanocolloid for sentinel node identification: A validation study using lymphoscintigraphy and SPECT/CT. *J Nucl Med* [Internet]. 2012;53(7):1034–40. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84863472429&partnerID=40&md5=8dce238efb4551b484845ec89818bdca>
6. Van Den Berg NS, Buckle T, Kleinjan GI, Klop WM, Horenblas S, Van Der Poel HG, et al. Hybrid tracers for sentinel node biopsy. *Q J Nucl Med Mol Imaging Off Publ Ital Assoc Nucl Med [and] Int Assoc Radiopharmacol (IAR), [and] Sect Soc Radiopharm*. 2014;58(2):193–206.
7. Heuveling DA, Visser GWM, De Groot M, De Boer JF, Baclayon M, Roos WH, et al. Nanocolloidal albumin-IRDye 800CW: A near-infrared fluorescent tracer with optimal retention in the sentinel lymph node. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2012;39(7):1161–8.
8. Schiller E, Bergmann R, Wunderlich G, Andreeff M, Jacob A, Pietzsch H-J. Ga-68- and Cu-64-Labeled NOTA-Albumin Conjugates for PET Sentinel Lymph Node Imaging. *ISRN Mol Imaging* [Internet]. 2013;2013:1–8. Available from: <http://www.hindawi.com/isrn/molecular.ima ging/2013/386976/>
9. Wallace AM, Han LK, Povoski SP, Deck K, Schneebaum S, Hall NC, et al. Comparative evaluation of [(99m)tc]tilmanocept for sentinel lymph node mapping in breast cancer patients: results of two phase 3 trials. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2013;20(8): 2590–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3705144&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
10. Widyasari EM, Oekar NK. Formulasi kit Human Serum Albumin (HSA)-nanosfer sebagai radiofarmaka untuk studi limfosintigrafi di kedokteran nuklir. 2012;13(1):49-60.
11. Giammarile F, Alazraki N, Aarsvold JN, Audisio RA, Glass E, Grant SF, et al. The EANM and SNMMI practice guideline for lymphoscintigraphy and sentinel node localization in breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013;40(12):1932–47.
12. Giammarile F1, Alazraki N, Aarsvold JN, Audisio RA, Glass E, Grant SF, et al. Response to comment by Aprile et al.: the EANM and SNMMI practice guideline for lymphoscintigraphy and sentinel node localization in breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41(6):1259–60.

13. Misra PK, Dash U, Maharana S. Investigation of bovine serum albumin-surfactant aggregation and its physicochemical characteristics. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;483:36–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.06.052>
14. Amin S, Barnett G V., Pathak JA, Roberts CJ, Sarangapani PS. Protein aggregation, particle formation, characterization& rheology. *Curr Opin Colloid Interface Sci* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;19(5):438–49. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135902941400096X>
15. Roberts CJ. Protein aggregation and its impact on product quality. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;30:211–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.08.001>
16. Zhanga S,Chena X, Ding S, Lei Q. Unfolding of human serum albumin by gemini and single-chain surfactants: A comparative study. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2016;495:30–8.
17. International Atomic Energy Agency. Radiopharmaceuticals for Sentinel Lymph Node Detection: Status and Trends. IAEA Hum Heal Ser. (6).Vienna:International Atomic Energy Agency;2015. Available from:<http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/Pub1674web-3264500.pdf>
18. International Atomic Energy Agency. Technetium-99m radiopharmaceuticals: Manufacture of kits. Technical report series No. 466. Viena: Austria; 2008.
19. Santos I, Fernandes C, Maria L, Gano L, Santos IC, Paulo A. Re(I) and 99mTc(I) tricarbonyl complexes with ether-containing pyrazolyl-based chelators: Chemistry, biodistribution and metabolism We dedicate this paper to Professor Maria José Calhorda on the occasion of her 65th birthday. *J Organomet Chem* [Internet]. Elsevier B.V; 2014;760:138–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jorgchem.2013.11.013>
20. Motaleb MA, Lashine EM. Preparation and biological evaluation of 99m tc-tmpp as a novel agent for tumor diagnosis. *Int J Adv Res*. 2015;3(10):362–70.
21. Kluba CA, Mindt TL. Click-to-chelate: Development of technetium and rhenium-tricarbonyl labeled radiopharmaceuticals. *Molecules*. 2013;18(3):3206–26.
22. Nurlaila Z. Formulasi radiofarmaka 99mtc-glutation untuk diagnosis kanker. *J Sains dan Teknol Nukl Indones*. 2010;(2):77–86.
23. N, Triaspolitica. "Mengenal Penyakit Kanker, Jenis, Gejala, Penyebab Berikut Pengobatan Kanker." *Mau Nanya Dong Dok*. N.p, 20 June 2017. Web. 28 June 2017. <<https://nanyadongdok.blogspot.com/2017/06/mengenal-penyakit-kanker-jenis-gejala.html>>.