

**FORMULASI KIT HUMAN SERUM ALBUMIN (HSA)-NANOSFER SEBAGAI
RADIOFARMAKA UNTUK STUDI LIMFOSINTIGRAFI DI KEDOKTERAN NUKLIR**

Eva Maria Widyasari, Nanny Kartini Oekar

Pusat Teknologi Nuklir Bahan dan Radiometri - BATAN
Jl. Tamansari 71 Bandung, 40132
E-mail: evamaria@batan.go.id

Diterima: 02-12-2011
Diterima dalam bentuk revisi: 02-01-2012
Disetujui: 12-01-2012

ABSTRAK

FORMULASI KIT HUMAN SERUM ALBUMIN (HSA)-NANOSFER SEBAGAI RADIOFARMAKA UNTUK STUDI LIMFOSINTIGRAFI DI KEDOKTERAN NUKLIR. Untuk keperluan limfosintigrafi, formula kit HSA-nanosfer dirancang sedemikian sehingga setelah ditandai dengan ^{99m}Tc menghasilkan radiofarmaka ^{99m}Tc -HSA-nanosfer dengan kemurnian radiokimia >90%. Jumlah $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebagai reduktor, Na-pirofosfat sebagai ko-ligan, dan HSA-nanosfer yang optimum, beserta cara dan waktu inkubasi, kondisi penandaan, dan metode sterilisasi dipelajari dan dievaluasi sehingga dapat digunakan untuk membuat kit HSA-nanosfer kering dan stabil selama penyimpanan. Pengaruh umur partikel HSA-nanosfer terhadap efisiensi penandaan juga diteliti. Hasil menunjukkan bahwa $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 250 μg yang telah direaksikan dengan 1,875 mg natrium pirofosfat, merupakan jumlah yang ideal. Jumlah optimal partikel HSA-nanosfer terdispersi dalam air adalah 25-50 μL , dan volume sediaan diatur kurang dari 225 μL . Campuran diinkubasi pada 37 °C selama 15 menit dalam keadaan vakum atau tidak vakum, kemudian ditambah larutan ^{99m}Tc -perteknetat dan diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Volume akhir ^{99m}Tc -HSA-nanosfer sebanyak 525 μL menghasilkan efisiensi penandaan lebih tinggi dari pada volume akhir 2 mL. Umur partikel HSA-nanosfer yang disimpan pada temperatur 4 °C sampai 2 bulan tidak berpengaruh nyata terhadap hasil penandaan. Metode sterilisasi yang sesuai untuk pembuatan kit ini adalah penyaringan menggunakan millipore steril dengan ukuran pori 0,22 μm untuk masing-masing larutan komponen kit sebelum proses pencampuran.

Kata kunci: limfosintigrafi, HSA-nanosfer, ^{99m}Tc , kit-radiofarmaka

ABSTRACT

FORMULATION OF HUMAN SERUM ALBUMIN (HSA)-NANOSPHERES KIT AS RADIOPHARMACEUTICAL FOR LYMPHOSCINTIGRAPHY STUDY IN NUCLEAR MEDICINE. In order to the application in lymphoscintigraphy, the HSA-nanospheres kit has been designed and formulated to have radiochemical purity more than 90 % after it was labeled with ^{99m}Tc . Total amount of $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ as reducing agent, sodium pyrophosphate as co-ligand and HSA-nanospheres as primary ligand, as well as the labeling condition and sterilization method were studied and evaluated. The influence of the storage time of HSA-nanospheres was also studied. The use of 250 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ have been reacted with 1.875 mg of sodium pyrophosphate was found to be an ideal number. The optimal amount of the water-dispersed HSA-nanospheres was 25 - 50 μL and the total solution volume was set less than 225 μL . This mixture was incubated at 37 °C for 15 minutes in a vacuum or not and after the labeling process with ^{99m}Tc , it was incubated at room temperature for 15 minutes. The ^{99m}Tc -HSA-nanospheres final volume of 525 μL gives a higher labeling efficiency than the final volume of 2 mL. The age of HSA-nanospheres stored at 4 °C did not significantly influence the labeling results. The sterilization method suitable for this kit making is sterile filtration by a millipore of 0.22 μm pore size for each kit component solution before mixing process.

Keywords: lymphoscintigraphy, HSA-nanospheres, ^{99m}Tc , radiopharmaceutical kit

1. PENDAHULUAN

Baru-baru ini di bidang kedokteran nuklir berkembang teknik diagnosis dengan cara menelusuri sistem limfatik, disebut dengan metode *lymphoscintigraphy* (limfosintigrafi). Pada metode ini, sediaan radiofarmasi berbentuk nanokoloid dengan ukuran 100-200 nm bertanda radioisotop disuntikkan ke dalam saluran limfatik secara intradermal, subkutan atau peritumoral. Pergerakan radiofarmaka yang disuntikkan tersebut dideteksi dari luar tubuh dengan kamera gamma atau dengan *probe* khusus untuk limfosintigrafi yang biasanya dilakukan secara paralel dengan pembedahan tumor atau kanker (1).

Limfosintigrafi banyak disarankan oleh paramedis sebagai metode diagnosis komplementer untuk mengetahui keadaan saluran limfatik para penderita kanker payudara. Di Indonesia kasus kanker payudara menduduki peringkat ke dua setelah kanker leher rahim. Keberhasilan pembedahan atau keberhasilan terapi kanker payudara 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 (1). Selain itu, limfosintigrafi bermanfaat untuk pasien yang menderita *filarial lymphedema* yaitu pembengkakan atau edema pada saluran limfatik yang diakibatkan oleh cacing filaria (2,3).

Selama ini, limfosintigrafi di kedokteran nuklir dilakukan dengan menggunakan ^{99m}Tc -TSC-mikrokoloid (sulfur koloid) yang mempunyai ukuran partikel

sekitar 1-10 μm . Selain ukuran partikelnya yang relatif besar, radiofarmaka ini akan membentuk partikel setelah ditandai dengan ^{99m}Tc bersamaan dengan terbentuknya senyawa bertanda diteknesium penta sulfida ($^{99m}\text{Tc}_2\text{S}_7$) yang berbentuk koloidal sehingga sangat sulit untuk mendapatkan ukuran partikel ideal yang dapat digunakan dalam limfosintigrafi. Hal ini menyebabkan pelaksanaan limfosintigrafi kadang-kadang mengalami kegagalan atau membutuhkan waktu *scanning* yang sangat lama (lebih dari 2 jam) sehingga pasien merasa tidak nyaman (4,5). Untuk memecahkan masalah tersebut, dibutuhkan suatu radiofarmaka yang lebih ideal, terutama radiofarmaka dengan ukuran yang lebih tepat (100 -200 nm), dan retensinya dalam saluran limfe lebih baik.

Human serum albumin (HSA)-nanosfer berupa partikel bulat berukuran nanometer yang dibuat dari bahan dasar protein (albumin) dan ditandai dengan ^{99m}Tc , diharapkan menjadi suatu radiofarmaka ^{99m}Tc -HSA-nanosfer yang lebih spesifik dengan ukuran partikel yang lebih kecil dari sediaan yang sudah ada. Penandaan partikel HSA-nanosfer telah berhasil dilakukan pada penelitian sebelumnya dengan diperolehnya senyawa bertanda ^{99m}Tc -HSA-nanosfer yang mempunyai kemurnian radiokimia $93,4 \pm 1,2\%$ (4,5). Biodistribusi dari radiofarmaka ^{99m}Tc -HSA-nanosfer dan pemanfaatannya untuk pencitraan sumsum tulang dan deteksi inflamasi pada hewan uji juga telah dipelajari dan memberikan hasil yang cukup memuaskan (6,7).

Kit radiofarmaka adalah sediaan radiofarmaka yang dikemas terpisah dari radionuklida penandanya, dan akan menjadi radiofarmaka bertanda radioaktif apabila dicampurkan dengan radionuklida yang umumnya adalah ^{99m}Tc (8). Kit tersebut dapat diformulasi dalam bentuk cair maupun kering. Untuk tujuan pengembangan radiofarmaka HSA-nanosfer dalam bentuk kit-radiofarmaka yang lebih stabil dan mudah untuk ditranpostasi ke rumah sakit perlu dirancang dan dicari formula yang lebih ideal sehingga dapat dikembangkan menjadi suatu sediaan kit-kering yang dapat menghasilkan radiofarmaka ^{99m}Tc -HSA-nanosfer dengan kemurnian radiokimia > 90% setelah ditambah larutan ^{99m}Tc (9,10). Keberhasilan penelitian ini diharapkan dapat menjawab tantangan tentang masalah kesehatan masyarakat yang dihadapi pada saat ini, sehingga iptek nuklir dapat berperan serta dalam memecahkan masalah kesehatan bangsa Indonesia.

2. TATA KERJA

2.1. Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan berisi *human serum albumin* (HSA)-nanosfer yang telah dibuat dan didispersikan dalam air dengan konsentrasi 10^7 partikel/mL. Bahan lain adalah ^{99m}Tc perteknetat, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (E. Merck), Na-pirofosfat (E. Merck), metanol (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), saringan millipore steril ukuran 0,22 μm , berbagai

ukuran alat suntik *disposable* steril (Terumo), kertas pH universal (E. Merck) dan kertas Whatman 3MM.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroskop (Nikon), spektrofotometer UV-Visible (Hitachi-200), inkubator (Mettmert), alat pengaduk vortex, alat pencacah saluran tunggal atau *single channel analyzer* (Ortec), timbangan analitis (Mettler), pengering beku-vakum Freezone-6 (Labconco), vial gelas ukuran 12 mL lengkap dengan tutup karet kaki tiga dan *seal* aluminium buatan Labconco, serta seperangkat alat kromatografi kertas.

2.2. Analisis Partikel HSA-nanosfer (nanokoloid)

Sediaan yang mengandung partikel HSA-nanosfer sebelum digunakan dalam proses penandaan dianalisis terlebih dahulu ukuran dan jumlah partikelnya. Ukuran partikel ditentukan dengan alat SEM seperti telah dilaporkan pada karya tulis sebelumnya (4). Demikian juga jumlah partikel yang ada dalam sediaan, secara praktis ditentukan dengan cara spektrofotometri UV yaitu menentukan tingginya serapan (A) pada panjang gelombang maksimum yang telah diketahui pada penelitian sebelumnya yaitu $\lambda = 202$ nm (4). Supaya jumlah partikel dapat diketahui secara kuantitatif maka sediaan yang mempunyai serapan 0,6 ($A=0,6$) pada panjang gelombang 202 nm ($\lambda=202$ nm) tersebut ditentukan dengan cara *haemocytometry* menggunakan mikroskop. Sebanyak 100 μL sediaan HSA-nanosfer ditambah setetes larutan gentian violet 10% dalam air, diaduk dengan pengaduk vortex

beberapa menit sampai tercampur sempurna. Sebanyak 10 μL campuran yang telah berwarna tersebut diteteskan di atas gelas objek khusus untuk *haemocytometer*, kemudian dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Ukuran dan jumlah partikel HSA-nanosfer yang ada di dalam sediaan tersebut dihitung dengan cara yang sama dengan cara perhitungan sel darah merah (11). Dari perlakuan ini dapat diketahui dengan lebih pasti dan praktis jumlah partikel dengan ukuran diameter yang diinginkan (± 200 nm) di dalam 1 mL sediaan. Dengan demikian volume sediaan HSA-nanosfer dan pengenceran yang dibutuhkan dalam proses formulasi kit-kering dapat diketahui hanya dengan menentukan besarnya serapan pada panjang gelombang 202 nm.

2.3. Metode Penandaan Radiofarmaka $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HSA-nanosfer

Metode penandaan yang digunakan pada penelitian ini adalah metode penandaan tidak langsung (*indirect labeling*) seperti yang telah diperoleh pada penelitian sebelumnya (5). Radiofarmaka $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HSA-nanosfer dibuat dengan mereaksikan sejumlah tertentu HSA-nanosfer (yang mempunyai serapan $A=0,6$ pada $\lambda = 202$ nm) dengan larutan Sn-pirofosfat dengan perbandingan molar yang divariasikan, kemudian pH diatur menjadi 7,4 dan sediaan diinkubasi dalam inkubator 37 °C selama 15 dan 30 menit. Larutan Sn-pirofosfat adalah larutan yang mengandung $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan Na-pirofosfat dengan variasi perbandingan tertentu di dalam air. Ke dalam campuran tadi ditambahkan

larutan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat 1 mCi/0,3-0,5 mL, kemudian diaduk hati-hati dan dibiarkan pada suhu kamar selama 15 menit. Parameter yang dipelajari dalam penelitian ini antara lain adalah : jumlah HSA-nanosfer sebagai ligan utama, perbandingan molar antara $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (bahan pereduksi) dan Na-pirofosfat (ko-ligan) di dalam senyawa Sn-pirofosfat sebagai bahan pereduksi, kemudian lamanya waktu inkubasi pertama dalam inkubator dan inkubasi ke dua pada proses penandaan dengan radionuklida $^{99\text{m}}\text{Tc}$ beserta kondisinya.

Penentuan efisiensi penandaan dilakukan dengan tiga macam sistem kromatografi kertas menaik. Fase diam yang digunakan untuk ketiga macam sistem kromatografi tersebut adalah kertas Whatman 3 MM sedangkan fase geraknya masing-masing menggunakan larutan metanol 95%, larutan NaCl 0,9 % dan larutan HCl 1 N. Sediaan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HSA-nanosfer ditotolkan pada kertas Whatman 3MM dengan ukuran 1 cm x 13 cm di titik nol dan kemudian masing-masing dielusikan dalam tiga macam fase gerak. Setelah fase gerak naik sempurna sampai pada titik 11, kromatogram diangkat, kemudian setelah kering dipotong-potong tiap cm dan dicacah dengan alat *single channel analyzer*.

2.3.1. Perbandingan dan jumlah $\text{Sn(II)Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan Na-pirofosfat

Pada pembuatan larutan Sn-pirofosfat, ditentukan perbandingan yang optimal antara $\text{Sn(II)Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebagai reduktor dan Na-pirofosfat sebagai ko-ligan. Variasi perbandingan yang dicoba yaitu 1:0; 1:2,5; 1:5; 1:7,5 dan 1:10 mol $\text{Sn(II)Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

per mol Na-pirofosfat. Jumlah sediaan dispersi HSA-nanosfer yang digunakan dalam penandaan adalah sebanyak 100 μL , $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 100 μg dalam 100 μL larutan Sn-pirofosfat dan penandaan dilakukan seperti dijelaskan pada bagian 2.3.

2.3.2. Optimalisasi waktu inkubasi

Optimalisasi waktu inkubasi dilakukan pada 2 seri vial, yaitu pertama diinkubasi selama 15 menit, sedangkan seri kedua diinkubasi selama 30 menit dalam inkubator 37 °C. Setiap seri masing-masing terdiri dari 5 buah vial dan berisi sejumlah HSA-nanosfer yang bervariasi yaitu 500, 750, 1000, 1250 dan 1500 μL . Larutan Sn-pirofosfat yang digunakan sebanyak 100 μL dengan perbandingan terbaik yang diperoleh pada percobaan sebelumnya (1 : 7,5 mol/mol). Setelah didinginkan sampai suhu kamar ditambahkan ke dalamnya larutan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat sebanyak 1 mCi/0,3-0,5 mL dan volume akhir sediaan disamakan menjadi 2 mL. Campuran diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit dan setelah itu efisiensi penandaan ditentukan dengan kromatografi kertas menaik.

2.3.3. Optimalisasi kondisi inkubasi

Untuk mempertinggi efisiensi penandaan, kondisi inkubasi diubah dengan jalan memvakumkan vial yang berisi HSA-nanosfer dan Sn-pirofosfat pada saat inkubasi pertama yaitu pada suhu 37 °C. Demikian juga setelah penambahan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat sewaktu inkubasi ke dua pada suhu kamar (reaksi penandaan) vial tetap

dalam keadaan vakum.

2.3.4. Optimalisasi jumlah HSA-nanosfer

Untuk optimalisasi jumlah HSA-nanosfer dilakukan penandaan terhadap dua seri vial yang berisi sediaan HSA-nanosfer dengan jumlah yang bervariasi, yaitu : 0, 50, 100, 150, dan 200 μL . Seri pertama dicampur dengan dengan 100 μL larutan Sn-pirofosfat yang mengandung 100 μg SnCl_2 dan 1,0 mg Na-pirofosfat (1:5 mol/mol), sedangkan seri kedua dicampur dengan 200 μL larutan yang sama. Volume akhir disamakan yaitu 2 mL.

Jumlah HSA-nanosfer dicoba diperkecil yaitu 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 dan 50 μL , dan jumlah Sn-pirofosfat 100 μL mengandung 200 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dengan Na-pirofosfat 1,5 mg (1:7,5 mol/mol). Kondisi inkubasi sama seperti percobaan sebelumnya, dan volume akhir sediaan setelah penandaan diatur menjadi 2 mL. Efisiensi penandaan ditentukan dengan kromatografi kertas menaik.

2.3.5. Pemilihan metode sterilisasi kit HSA-nanosfer

Sebagai persiapan untuk pembuatan kit-HSA-nanosfer dipilih metode sterilisasi yang paling sesuai agar tidak merusak partikel HSA-nanosfer dan mempengaruhi efisiensi penandaan. Metode sterilisasi yang dicoba adalah pemanasan di dalam otoklav selama 30 menit dan penyaringan dengan saringan millipore steril 0,22 μm . Sterilisasi dilakukan pada sediaan HSA-nanosfer yang dicampur dengan Sn-pirofosfat dan telah diinkubasi pada suhu 37 °C. Setelah disterilkan, campuran

ditambah dengan larutan ^{99m}Tc -perteknetat dari generator ^{99}Mo - ^{99m}Tc dan proses penandaan dilanjutkan seperti pada percobaan sebelumnya. Efisiensi penandaan ditentukan dan dibandingkan dengan sediaan yang tidak disterilkan.

2.3.6. Pengaruh lamanya waktu penyimpanan HSA-nanosfer terhadap efisiensi penandaan

Proses penandaan dilakukan terhadap dua macam HSA-nanosfer yang berbeda umurnya. Pertama adalah HSA-nanosfer yang telah disimpan di dalam lemari pendingin selama lebih dari 2 bulan, dan yang ke dua adalah sediaan yang berumur kurang dari 2 bulan. Efisiensi penandaan kedua macam HSA-nanosfer dibandingkan.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sediaan (suspensi) HSA-nanosfer apabila dilihat secara visual merupakan sediaan yang jernih menyerupai larutan, dan tidak terlihat adanya partikel-partikel. Pada laporan penelitian sebelumnya (4) telah dijelaskan bahwa penentuan jumlah partikel ditentukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 202 nm. Sebelum digunakan sediaan HSA-nanosfer diencerkan dahulu sampai mempunyai serapan 0,6 ($A=0,6$), kemudian sediaan tersebut digunakan untuk membuat kit HSA-nanosfer. Pengukuran jumlah partikel dilakukan menggunakan mikroskop dengan metode *haemocytometri* yaitu cara untuk mengukur jumlah sel darah (11). Dengan

metode ini diperoleh jumlah partikel dari sediaan HSA-nanosfer yang menunjukkan serapan 0,6 pada spektrofotometer UV adalah sekitar 10^7 partikel per mL.

Besarnya efisiensi penandaan dan kemurnian radiokimia dihitung berdasarkan hasil ketiga kromatografi. Pengotor radiokimia dalam bentuk ^{99m}Tc -perteknetat bebas diketahui dari sistem kromatografi menggunakan fase diam kertas Whatman 3MM dengan fase gerak metanol 95 %, sedangkan pengotor ^{99m}Tc -pirofosfat bebas diketahui dengan sistem Whatman 3MM/NaCl 0,9 % dan ^{99m}Tc -tereduksi bebas dengan sistem Whatman 3MM/HCl 1N. Besarnya kemurnian radiokimia (KRK) ^{99m}Tc -HSA-nanosfer dapat dihitung menggunakan Persamaan [1].

Pada kegiatan ini dilakukan optimalisasi perbandingan $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebagai reduktor dengan Na-pirofosfat yang bertindak sebagai ko-ligan

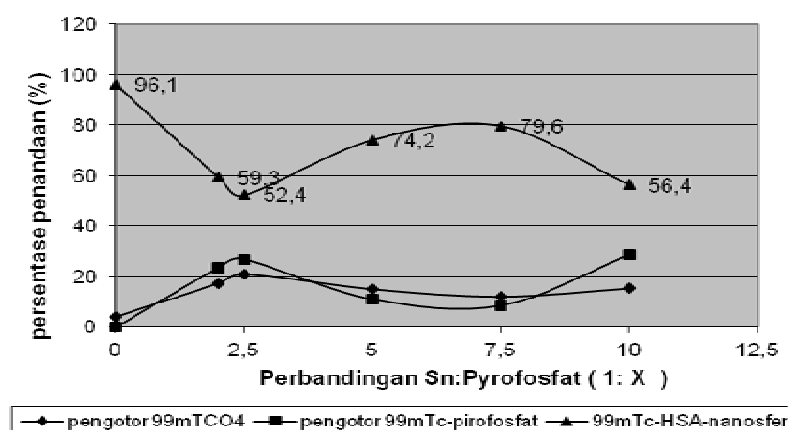
Apabila reduktor digunakan tanpa ko-ligan, hasil penandaan seolah-olah tinggi seperti terlihat pada Gambar 1.

Pada fenomena ini, sebenarnya yang terbentuk bukanlah senyawa bertanda ^{99m}Tc -HSA-nanosfer, tetapi hanya senyawa ^{99m}Tc yang tereduksi baik berupa $^{99m}\text{TcCO}_2$ atau $^{99m}\text{Tc}(\text{OH})_2$ yang semuanya merupakan koloid dan akan tinggal pada titik 0 (awal) di kromatogram. Hal ini diperkuat dengan data bahwa pada kondisi ini, larutan hanya dapat mencapai pH=4, karena bila lebih tinggi dari pH tersebut sediaan menjadi keruh, sedangkan sediaan dengan perbandingan yang lain dapat mencapai pH=7,4.

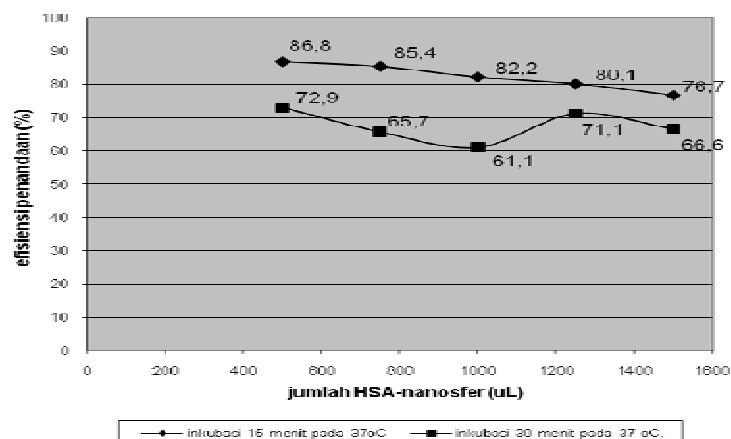
$$\% \text{KRK}^{99m}\text{Tc-HSA-nanosfer} = 100 - (\% ^{99m}\text{TcCO}_4 + \% ^{99m}\text{Tc-red} + \% ^{99m}\text{Tc-pirofosfat}) \quad [1]$$

Pada Gambar 1 terlihat bahwa perbandingan Sn:pirofosfat yang optimal adalah 1:7,0-7,5 mol/mol dengan menghasilkan efisiensi penandaan ^{99m}Tc -HSA-nanosfer tertinggi dan pengotor radiokimia seperti ^{99m}Tc -perteknetat bebas serta ^{99m}Tc -pirofosfat dengan persentase terendah. Pada percobaan ini jumlah HSA-nanosfer yang digunakan adalah 250 μL . Inkubasi pertama dilakukan pada suhu 37°C dalam inkubator untuk mereaksikan ion Sn(II) yang telah berikatan dengan pirofosfat membentuk Sn-pirofosfat yang akan lebih mudah berikatan dengan HSA-nanosfer. Partikel HSA-nanosfer yang terbentuk dari

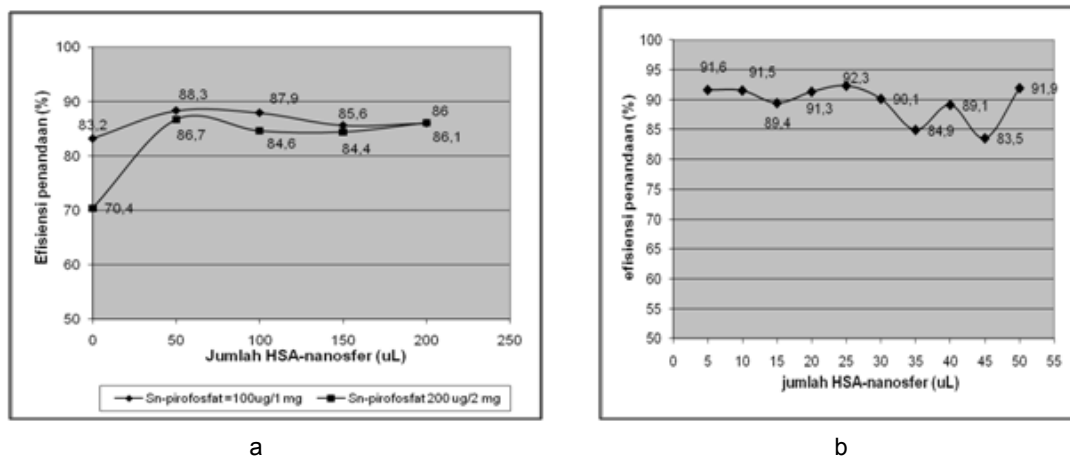
protein albumin mempunyai banyak gugus yang dapat berikatan dengan Sn-pirofosfat, dan proses ini terjadi pada saat inkubasi pertama (12). Lamanya waktu inkubasi pertama yang digunakan adalah 30 menit dan 15 menit. Pada saat ditambah radionuklida $^{99m}\text{Tc(VII)}$ -perteknetat, ion Sn(II) yang telah terikat pada partikel HSA-nanosfer akan mereduksi $^{99m}\text{Tc(VII)}$ tersebut ke tingkat oksidasi yang lebih rendah sehingga terbentuk senyawa bertanda ^{99m}Tc -HSA-nanosfer. Proses ini terjadi pada waktu inkubasi ke dua yang dilakukan pada suhu kamar selama 15 menit, dan hasilnya dapat dilihat pada Gambar 2.



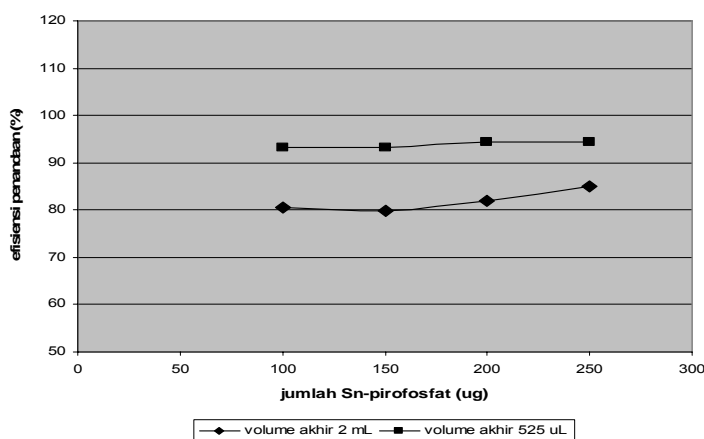
Gambar 1. Optimalisasi perbandingan Sn-pirofosfat pada formulasi kit HSA-nanosfer (menggunakan HSA-nanosfer sebanyak 250 μL).



Gambar 2. Pengaruh waktu inkubasi pembentukan Sn-pirofosfat pada penandaan ^{99m}Tc -HSA-nanosfer dengan jumlah HSA-nanosfer yang bervariasi.



Gambar 3. Optimalisasi jumlah HSA-nanosfer dalam kit HSA-nanosfer.



Gambar 4. Efisiensi penandaan ^{99m}Tc-HSA-nanosfer dalam volume dan jumlah Sn-pirofosfat yang bervariasi dan di bawah kondisi vakum.

Inkubasi pertama selama 15 menit ternyata memberikan hasil penandaan yang lebih baik dari pada inkubasi 30 menit dengan perbedaan yang cukup berarti. Fenomena ini mungkin terjadi karena pada saat waktu inkubasi diperpanjang, terjadi penguraian kembali ion Sn(II) yang awalnya sudah terikat di HSA-nanosfer. Kemungkinan lain adalah terjadinya pengurangan daya reduksi dari Sn(II) yang teroksidasi menjadi Sn(IV) akibat sediaan terlalu lama dipanaskan pada 37 °C.

Penandaan partikel HSA-nanosfer

menggunakan perbandingan Sn:pirofosfat sebesar 1 : 5 mol/mol, tetapi dengan jumlah yang berbeda yaitu 100 µg/1 mg dan 200 µg/2 mg. Jumlah HSA-nanosfer sebanyak 50 µL memberikan efisiensi penandaan tertinggi, dan hasil ini tidak berubah banyak walaupun jumlah HSA-nanosfer dinaikkan sampai 200 µL (Gambar 3-a). Pada Gambar 3-b terlihat bahwa jumlah HSA-nanosfer di bawah 50 µL juga masih menghasilkan efisiensi penandaan berkisar antara 84–92% dengan perbandingan Sn-pirofosfat 1 : 7,5.

Pada Gambar 4 terlihat nyata bahwa

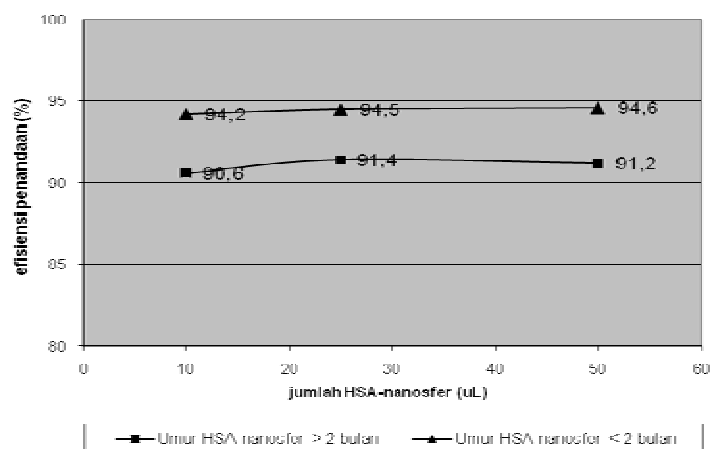
besarnya volume pada waktu inkubasi pertama dan inkubasi ke dua sangat mempengaruhi efisiensi penandaan. Reaksi antara molekul Sn(II)-pirofosfat dengan partikel HSA-nanosfer (inkubasi pertama) berlangsung lebih baik apabila dilakukan dalam volume yang kecil yaitu 225 μL . Jumlah $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebesar 250 μg dan pirofosfat 1,875 mg dalam volume sebesar 100 μL merupakan jumlah optimal.

Reaksi penandaan (inkubasi ke dua) lebih berhasil apabila dilakukan dalam volume akhir yang lebih kecil yaitu 525 μL dari pada dalam volume 2 mL. Reaksi penandaan dalam volume 525 μL memberikan efisiensi penandaan > 90%, sedangkan dalam volume 2 mL hanya mencapai 80–95% (Gambar 4). Hal ini memberikan batasan untuk jumlah volume larutan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat yang dapat ditambahkan pada reaksi penandaan yaitu maksimal 0,3 mL.

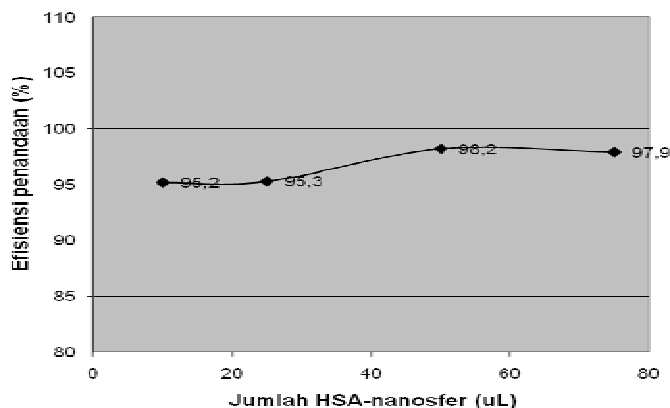
Partikel HSA-nanosfer yang terdispersi dalam air pro-injeksi disimpan dalam suhu 4°C (lemari es), dan akan digunakan pada waktu membuat kit HSA-

nanosfer. Penyimpanan dapat berminggu-minggu atau sampai beberapa bulan. Telah diketahui bahwa HSA-nanosfer dibuat dari *human serum albumin* yang merupakan protein dan umumnya mudah rusak apabila disimpan lama. Untuk mengetahui kestabilan HSA-nanosfer selama penyimpanan maka dilakukan penandaan menggunakan dua sediaan HSA-nanosfer yang umurnya berbeda, yaitu yang sudah disimpan lebih dari 2 bulan dan yang kurang dari 2 bulan.

Pada Gambar 5 terlihat bahwa penyimpanan tidak menyebabkan perubahan yang signifikan, karena hasil penandaan masih tetap di atas 90%. Kit HSA-nanosfer digunakan secara parenteral, oleh karena itu harus disterilkan (12). Umumnya, sterilisasi radiofarmaka dilakukan dengan cara penyaringan sediaan curah (larutan *bulk*) sebelum dimasukkan ke dalam vial steril secara aseptis. Mengingat bahwa sediaan HSA-nanosfer berbentuk partikel dengan bahan dasar protein, maka dicoba dua macam cara sterilisasi.



Gambar 5. Pengaruh umur partikel HSA-nanosfer terhadap efisiensi penandaan



Gambar 6. Efisiensi penandaan ^{99m}Tc -HSA-nanosfer setelah disterilkan dengan cara menyaring masing-masing komponen kit HSA-nanosfer.

Metode yang pertama adalah cara otoklav pada suhu $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ dengan tekanan lebih dari satu atmosfer selama 30 menit, sedangkan metode ke dua adalah penyaringan dengan saringan *millipore* $0,22\text{ }\mu\text{m}$ steril terhadap campuran HSA-nanosfer dengan Sn-pirofosfat setelah inkubasi pada $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Efisiensi penandaan HSA-nanosfer steril dengan ^{99m}Tc -perteknetat memberikan hasil seperti tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Perubahan efisiensi penandaan ^{99m}Tc -HSA-nanosfer setelah proses sterilisasi

Efisiensi Penandaan (%) (n=2)		
Asli	Otoklav	Penyaringan
$93,5 \pm 1,1$	Rusak*	$86,3 \pm 1,9$

*) dilihat dengan mikroskop

Berdasarkan pengamatan menggunakan mikroskop pemanasan dalam otoklav menyebabkan partikel menjadi rusak. Penyaringan yang dilakukan terhadap campuran HSA-nanosfer dan Sn-pirofosfat setelah inkubasi pertama ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ dalam inkubator) juga mempengaruhi efisiensi penandaan, hal ini kemungkinan disebabkan karena molekul dari partikel

HSA(nanosfer)-Sn-pirofosfat yang terbentuk pada inkubasi tersebut merupakan molekul dengan ukuran yang lebih besar sehingga sebagian tertahan oleh saringan dan menghasilkan efisiensi penandaan yang lebih rendah, yaitu $86,3 \pm 1,9\%$.

Untuk mencegah terjadinya hal tersebut, maka penyaringan untuk sterilisasi dilakukan pada masing-masing sediaan HSA-nanosfer dan larutan Sn-pirofosfat sebelum dicampur dan diinkubasi pada $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cara sterilisasi tersebut terbukti dapat digunakan dalam pembuatan kit radiofarmaka HSA-nanosfer, karena tetap memberikan hasil penandaan yang tinggi, yaitu lebih besar dari 95% seperti terlihat pada Gambar 6

4. KESIMPULAN

Formula kit HSA-nanosfer yang optimal dan memberikan efisiensi penandaan sebesar $93,5 \pm 1,1\%$ diperoleh dengan komposisi sebagai berikut: jumlah HSA-nanosfer $25\text{-}50\text{ }\mu\text{L}$, larutan Sn-pirofosfat sebanyak $200\text{ }\mu\text{L}$ yang mengandung $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $250\text{ }\mu\text{g}$ sebagai

reduktor dan Na-pirofosfat sebesar 1,875 mg sebagai ko-ligan, diinkubasi pada 37 °C selama 15 menit dalam volume tidak lebih dari 225 µL, serta dapat dilakukan dalam keadaan vakum atau pun tidak.

Proses penandaan kit HSA-nanosfer dengan penambahan larutan ^{99m}Tc-perteknetat dan inkubasi selama 15 menit pada suhu kamar dengan volume akhir 525 µL dapat memberikan efisiensi penandaan yang lebih tinggi apabila dibandingkan dengan volume akhir 2 mL. Penyimpanan sediaan partikel HSA-nanosfer dalam media air selama 2 bulan tidak berpengaruh nyata terhadap mutu kit HSA-nanosfer yang dibuat dari partikel tersebut. Efisiensi penandaan yang dihasilkan setelah penambahan larutan ^{99m}Tc-perteknetat, terbukti masih memberikan kemurnian radiokimia lebih tinggi dari 90%.

Dalam proses pembuatan kit radiofarmaka HSA-nanosfer, sterilisasi dapat dilakukan dengan penyaringan menggunakan saringan millipore steril ukuran 0,22 µm terhadap masing-masing larutan komponen kit sebelum dicampurkan dan sebelum proses inkubasi pertama. Apabila diperlukan kit-kering, proses pengeringan dapat dilakukan dengan metode liofilisasi dalam alat *freeze dryer*.

5. UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada saudara Epy Isabela dari Laboratorium Sintesis Senyawa Bertanda yang telah banyak membantu dalam menyelesaikan penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

1. Dillehay GL. Lymphoscintigraphy in oncology. In Nuclear medicine. 2nd ed. Philadelphia: Mosby Elsevier Inc; 2006. p. 1480-1.
2. Jaykanth A, Shelley S, Indirani M, Manokaran G, Shilpa K, Alok P. Lymphoscintigraphy as an imaging modality in lymphatic system. The Annual Scientific Meeting of The Indonesian Society of Nuclear Medicine and The Indonesian Society of Nuclear Medicine and Biology; 20-21 November 2009, Melia Purosani Hotel, Yogyakarta Indonesia; 2009.
3. Lymphatic filariasis. Strategy direction for lymphatic filariasis research. [serial online]. 2002 Feb 1; Available from: <http://www.who.int/tdr/diseases/lymphfil/direction.htm>.
4. Kartini NO, Widyasari EM. Penandaan human serum albumin (HSA)-nanosfer dengan radionuklida teknesium-99m. *Majalah Farmasi Indonesia* 2008;19(3): 117-27.
5. Kartini NO, Widyasari EM, Isabela E. Karakteristik fisiko-kimia radiofarmaka ^{99m}Tc-human serum albumin (HSA)-nanosfer. *Jurnal Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia* 2010 Februari;XI(1): 35-44.
6. Sugiharti RJ, Halimah I, Widyasari EM, Kania PP. Biodistribusi ^{99m}Tc-human serum albumin-nanosfer pada mencit putih (*Mus musculus*) sebagai radiofarmaka untuk limfosintigrafi. *Prosiding Seminar Sains dan Teknologi Nuklir*; Juni 2009; Bandung. Bandung: PTNBR BATAN; 2009. p. 342-6.

-
7. Sugiharti RJ, Halimah I, Kania PP, Kartini NO. Penggunaan radiofarmaka ^{99m}Tc -Human Serum Albumin nanosfer untuk pencitraan sumsum tulang dan deteksi inflamasi pada hewan uji. Prosiding Seminar Nasional Keselamatan, Kesehatan dan Lingkungan V; Oktober 2009; Depok. Jakarta: PTKMR BATAN; 2009. p. 217-26.
 8. Owunwanne A, Patel M, Sadek S. The hand book of radiopharmaceuticals. 1st ed. England: Chapman and Hall Medical Clays Ltd; 1995. p. 67-8.
 9. Saha GB. Fundamental of nuclear pharmacy. 5th ed. Cleveland, USA: Springer; 2004. p. 83.
 10. Nunn A. Radiopharmaceuticals, chemistry and pharmacology. 10th ed. New York (NY): Marcel Dekker Inc; 1992.
 11. Gandasoebrata R. Penuntun laboratorium klinik. 11 ed. Jakarta: Dian Rakyat; 2004. p. 20-1.
 12. Zole I. Technetium-99m pharmaceuticals: preparation and quality control in nuclear medicine. New York, Berlin Heidelberg: Springer; 2007. p. 230.