

PEMBUATAN SEDIAAN ^{99m}Tc -SEL DARAH MERAH SEBAGAI PENYIDIK LIMPA

Oleh: Dr. A. Hanafiah Ws.*

SARI

Telah dilakukan penandaan sel darah merah (SDM) dengan radionuklida ^{99m}Tc menggunakan SnCl_2 sebagai reduktor. Kondisi penandaan optimum dengan menggunakan darah tikus diperoleh pada pemakaian $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $1\mu\text{g}$ dan suhu pemanasan $49-50^\circ\text{C}$ selama 15 menit. Efisiensi penandaan dan kemurnian radiokimia ditentukan dengan kromatografi kertas menaik menggunakan kertas Whatman No. 1 sebagai fase diam dan metanol 85% sebagai fase gerak. Studi biologis dan penyidikan pada tikus Wistar menunjukkan tertimbunnya sediaan ini pada limpa.

ABSTRACT

Labeling of red blood cells with ^{99m}Tc radionuclide was carried out using SnCl_2 solution as a reductor. The optimum required condition for rat blood was obtained in a solution containing $1\mu\text{g}$ $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ which was heated for 15 minutes at $49-50^\circ\text{C}$. Labeling efficiency and radiochemical purity of radiolabeled compound was determined by ascending paper chromatography using Whatman No. 1 paper as stationary phase and methanol 85% as mobile phase. The result of biodistribution and imaging in the Wistar white rat revealed that the preparation was accumulated in the spleen.

* Pusat Penelitian Teknik Nuklir (Batan)-Bandung, alumni Jurusan Farmasi ITB.

PENDAHULUAN

Pemakaian sel darah merah (SDM) bertanda radioaktif untuk menyidik limpa, pertama kali diperkenalkan oleh Gray dan Sterling pada tahun 1950, yang pada saat itu menggunakan Krom-51 (^{51}Cr) sebagai zat radioaktifnya (9). Senyawa ini memberikan hasil penyidikan yang baik, namun setelah diketemukannya radionuklida Teknesium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), para peneliti berusaha menggantikan kedudukan ^{51}Cr ini dengan $^{99\text{m}}\text{Tc}$, karena banyaknya faktor yang lebih menguntungkan pada radionuklida tersebut, antara lain paparan radiasi dan energi γ yang rendah serta waktu paruh yang singkat (2).

Beberapa radionuklida lain yang juga dapat digunakan untuk penandaan SDM, antara lain adalah ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{67}Ga , dan ^{68}Ga , yang berada dalam bentuk khelat dengan oksin atau asetil asetonat (9).

Penandaan SDM dengan radionuklida $^{99\text{m}}\text{Tc}$ diperkenalkan pertama kali oleh Fischer dan kelompok kerjanya pada tahun 1967 dengan menggunakan metode yang hampir sama seperti dengan ^{51}Cr (3). Pada saat itu, pembuatannya ditujukan untuk sidik plasenta karena pada pembuatannya sel-sel darah tersebut hanya diinkubasi hingga suhu 37°C . Dengan makin berkembangnya pengetahuan dalam radiofarmasi, beberapa peneliti mencoba mengembangkan penandaan SDM dengan radionuklida $^{99\text{m}}\text{Tc}$ dengan maksud untuk dapat digunakan dengan tujuan yang sama seperti ^{51}Cr -SDM (1, 6, 8, 10). Hingga saat ini senyawa SDM bertanda zat radioaktif masih merupakan satu-satunya sediaan yang dipakai sebagai penyidik limpa mengingat belum adanya senyawa lain yang secara spesifik terakumulasi di organ tersebut. Tc_2S_7 dalam bentuk mikrokoloid yang digunakan untuk penyidikan organ sistem retikuloendothelium, kurang spesifik untuk penyidikan limpa.

Sel darah merah yang telah kehilangan plastisitasnya akibat pengaruh kimia, fisika, atau imunologis akan dikeluarkan dari peredaran darah oleh jaringan retikulum limpa, dan sel darah merah yang telah berubah bentuk ini akan ditimbun di limpa. Dengan bantuan zat radioaktif, kompleks yang terbentuk dapat memberikan gambaran mengenai kelainan organ tersebut.

Berdasarkan hal-hal di atas serta untuk memenuhi kebutuhan rumah sakit akan sediaan tersebut, maka dalam penelitian ini dikemukakan usaha penandaan SDM tikus dengan radionuklida $^{99\text{m}}\text{Tc}$, dengan meragamkan beberapa parameter yang berpengaruh dalam pembuatan sediaan tersebut. Dilakukan pula pengamatan biodistribusi serta penyidikan pada hewan percobaan.

BAHAN DAN TATA KERJA

Bahan dan peralatan

^{99m}Tc , diperoleh dari Laboratorium Sub-Bidang Senyawa Bertanda, Pusat Penelitian Teknik Nuklir (PPTN), dalam bentuk larutan ^{99m}Tc -perteknetat. Larutan NaCl fisiologis 0,9% dan air untuk injeksi buatan IPHA Laboratories, dekstrosa buatan Bruxelles, timah (II) klorida, asam sitrat, natrium sitrat, serta sejumlah pereaksi lain buatan E. Merck dengan tingkat kemurnian pereaksi analisis.

Sebagai binatang percobaan digunakan tikus putih jenis Wistar, umur kurang lebih 3 bulan dengan bobot badan kira-kira 200 gram.

Peralatan yang digunakan ialah pencacah saluran tunggal (C-Schlumberger) dengan detektor NaI(Tl), lemari aseptis (Clemco), alat penatah (*scanner*, Berthold), penangas air, (Karl Kolb) serta alat pemusing (sentrifuga).

Penandaan SDM dengan radionuklida ^{99m}Tc

Di dalam tabung pemusing, sejumlah 6 ml darah dicampur dengan 0,5 ml larutan ACD, dan plasmanya dipisahkan dengan pemusingan selama 5 menit pada 3000 rpm. Lapisan atas (plasma) campuran tersebut dibuang, sedangkan lapisan bawah (SDM) diambil. Ke dalam 2 ml SDM ditambahkan larutan SnCl_2 dengan berbagai konsentrasi yang sebelumnya telah disaring dengan penyaring berukuran $0,22\ \mu\text{m}$ (millipore), lalu campuran dikocok hingga merata. Larutan dicuci dengan 3 ml larutan NaCl 0,9%, ditambah ^{99m}Tc -perteknetat dengan aktivitas kurang lebih 5 mCi, kemudian dikocok dan dibiarkan selama 5 menit. Pencucian dilakukan sekali lagi dengan 3 ml larutan NaCl 0,9%, dan selanjutnya sediaan ^{99m}Tc -SDM dipindahkan ke dalam vial steril. Sediaan tersebut dipanaskan di atas penangas air pada suhu $49-50^\circ\text{C}$ selama waktu tertentu sambil dikocok. Sediaan ^{99m}Tc -SDM ini pun siap untuk dipakai. Perlu diperhatikan di sini bahwa semua pereaksi harus steril dan seluruh tahap pengerjaan harus dilakukan di dalam lemari steril.

Pembuatan larutan ACD

Ke dalam campuran 0,80 g asam sitrat, 2,55 g natrium sitrat, dan 1,20 g dekstrosa ditambahkan air untuk injeksi hingga 100 ml. Larutan kemudian disaring dengan penyaring berukuran $0,22\ \mu\text{m}$.

Penentuan kemurnian radiokimia senyawa ^{99m}Tc -SDM

Kemurnian radiokimia senyawa ^{99m}Tc -SDM ditentukan dengan cara kromatografi kertas menaik dengan kertas Whatman No. 1 ukuran 2×20 cm persegi

sebagai fase diam dan metanol 85% sebagai fase gerak. Senyawa $^{99m}\text{Tc-SDM}$ ditotolkan pada kertas kromatografi dan dielusi sampai jarak migrasi kira-kira 15 cm dari tempat penotolan. Setiap 1 cm kromatogram, setelah dikeringkan, dicacah dengan pencacah saluran tunggal. R_F senyawa $^{99m}\text{Tc-SDM}$ terletak pada daerah 0.00 sedangkan R_F perteknetat bebas pada daerah 0.50–0.60.

Perbandingan aktivitas yang tercacah pada daerah R_F perteknetat bebas terhadap aktivitas total, menyatakan jumlah pengotor radiokimia dari senyawa bertanda tersebut.

Penetapan penimbunan aktivitas senyawa $^{99m}\text{Tc-SDM}$ pada hewan percobaan

Sebanyak 0.1 ml sediaan $^{99m}\text{Tc-SDM}$ disuntikkan kepada tikus putih melalui vena ekor. Setelah kurang lebih 1 jam, tikus dibunuh dengan eter dan ditimbang beratnya. Selanjutnya dilakukan pembedahan dan organ serta jaringan yang diperlukan diambil dan ditimbang. Cuplikan dari organ atau jaringan tersebut juga ditimbang dan diukur aktivitasnya dengan alat pencacah saluran tunggal. Hasil pencacahan aktivitas, baik per organ atau jaringan maupun per gram organ atau jaringan, dihitung dan dinyatakan dalam persentase penimbunan aktivitas. Cuplikan otot dan tulang diambil dari bagian paha (femur), sedangkan darah sebanyak 0.1 ml diperoleh dari jantung pada saat pembedahan. Untuk standar dilakukan pengukuran aktivitas sediaan dengan volume yang diketahui.

Penyidikan

Sejumlah 0.1 ml sediaan $^{99m}\text{Tc-SDM}$ disuntikkan kepada tikus putih melalui vena ekor. Setelah beberapa waktu, tikus dibius dengan eter dan dilakukan penyidikan dengan menggunakan alat Dunnschicht Scanner II.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam pengadaan sediaan $^{99m}\text{Tc-SDM}$, dicoba meragamkan beberapa parameter yang berpengaruh dalam pembuatan sediaan tersebut. Reduksi Tc (VII) menjadi Tc yang bervalensi lebih rendah menggunakan SnCl_2 sebagai reduktor, merupakan reaksi tahap awal sebelum Tc membentuk kompleks dengan SDM. Schwartz (1971) dan Ehrlich (1982) telah membuktikan bahwa penambahan SnCl_2 sebagai reduktor pada penandaan SDM dengan radionuklida ^{99m}Tc berpengaruh terhadap hasil penandaan (2, 7).

Dari percobaan penentuan kadar reduktor, pemakaian $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak $1.0 \mu\text{g}$ memberikan hasil penandaan yang maksimal sebesar $99.0 \pm 1.9\%$. Pemakaian SnCl_2 yang berlebih diduga berpengaruh terhadap hidrolisis Tc bervalensi rendah sehingga menurunkan hasil penandaan seperti terlihat pada

Tabel 1 Pengaruh kadar reduktor terhadap hasil penandaan

SnCl ₂ .2H ₂ O (μg)	Hasil penandaan (%) ± s.b
0,5	97,6 ± 1,7
1,0	99,0 ± 1,9
1,5	98,0 ± 2,6
2,0	96,9 ± 2,0
2,5	95,5 ± 1,3

tabel 1. Tampak bahwa penggunaan SnCl₂ yang lebih besar dari 1,0 μg memberikan hasil penandaan yang lebih kecil. Walaupun demikian, pemakaian SnCl₂ sampai 2,0 μg masih memberikan hasil penandaan yang memenuhi persyaratan dengan kemurnian radiokimia di atas 95%.

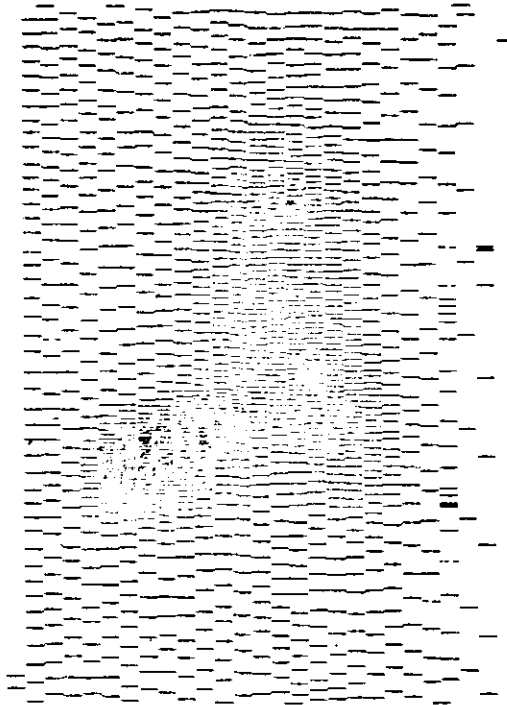
Untuk mendapatkan senyawa ^{99m}Tc-SDM yang dapat digunakan sebagai penyidik limpa, sel darah merah tersebut harus didenaturasi terlebih dahulu pada suhu tertentu. Beberapa pustaka menyatakan bahwa suhu optimal adalah 49–50°C dan suhu ini kritis sekali terhadap denaturasi sel darah merah (5, 7). Bila pemanasan dilakukan kurang dari 49°C, penandaan menjadi kurang sempurna, sehingga diduga kompleks ini tidak memenuhi sarannya. Sebaliknya, suhu pemanasan yang melebihi 50°C menyebabkan pecahnya sel-sel darah merah dan akan terbentuk endapan Fe(OH)₃. Di samping itu, lamanya pemanasan juga berpengaruh terhadap hasil penandaan, sebagaimana terlihat pada tabel 2. Waktu pemanasan optimal diperoleh bila sediaan dipanaskan selama 15 menit pada suhu 49–50°C dengan hasil penandaan sebesar 99,1 ± 1,9%. Kurangnya waktu pemanasan menyebabkan rendahnya hasil penandaan dan sel darah merah tersebut masih dalam keadaan normal sehingga sediaan tetap berada dalam aliran darah di seluruh tubuh. Bila waktu pemanasan terlalu lama, sel darah merah akan menggumpal sehingga dapat menurunkan hasil penandaan (4).

Tabel 2 Pengaruh waktu pemanasan terhadap hasil penandaan

Waktu pemanasan (menit)	Hasil penandaan (%) ± s.b.
5	96,5 ± 1,1
15	99,1 ± 1,9
25	94,4 ± 2,0
35	93,3 ± 2,8

Keterangan:

- Pengulangan dilakukan sebanyak lima kali.
- s.b. : simpangan baku



Gambar 1 Hasil penandaan pada tikus, 15 menit setelah penyuntikan sediaan ^{99m}Tc -sel darah merah (dosis: 1 mCi/0,1 ml).

Hasil penandaan atau kemurnian radiokimia yang tinggi belum menunjang bahwa suatu sediaan dapat mencapai sasaran yang diinginkan. Di samping itu, salah satu persyaratan sediaan radiofarmasi adalah bahwa sediaan tersebut harus mempunyai data biodistribusi atau hasil telaah biologi pada hewan percobaan sehingga didapat kepastian bahwa senyawa tersebut dapat digunakan untuk tujuan yang diinginkan.

Dari tabel 3 dapat dilihat hasil biodistribusi sediaan pada tikus putih. Kurang lebih 1 jam setelah penyuntikan, penimbunan aktivitas tertinggi per organ atau jaringan terjadi pada limpa (18,10%), kemudian berturut-turut pada hati (10,09%), ginjal (6,36%), darah (4,61%), dan paru-paru (3,94%) sedangkan pada organ atau jaringan lain terjadi penimbunan aktivitas yang sangat kecil. Demikian juga, pada per gram organ atau jaringan terlihat bahwa penimbunan aktivitas tertinggi terdapat pada limpa, yaitu sebesar 32,55% (tabel 4). Tertimbunnya sediaan ^{99m}Tc -SDM di limpa disebabkan karena hilangnya plastisitas SDM akibat pemanasan, sehingga sel-sel darah merah tersebut dikeluarkan dari peredaran darah oleh jaringan retikulum darah merah di limpa. Sementara

Tabel 3 Persentase penimbunan aktivitas per organ

Organ/jaringan	Penimbunan aktivitas (%) \pm s.b.
Jantung	0,27 \pm 0,41
Usus	1,05 \pm 1,50
Kulit	1,45 \pm 3,00
Tulang	1,49 \pm 1,27
Otot	2,40 \pm 4,05
Paru-paru	3,94 \pm 4,15
Darah	4,61 \pm 3,06
Ginjal	6,36 \pm 2,14
Hati	10,09 \pm 7,71
Limpa	18,10 \pm 5,59

Keterangan:

- Pengulangan dilakukan sebanyak lima kali.
- s.b. : simpangan baku

Tabel 4. Persentase penimbunan aktivitas per gram organ

Organ/jaringan	Penimbunan aktivitas (%) \pm s.b.
Otot	0,03 \pm 0,06
Usus	0,04 \pm 0,06
Kulit	0,05 \pm 0,10
Tulang	0,07 \pm 0,06
Jantung	0,54 \pm 0,82
Darah	0,76 \pm 0,28
Hati	1,78 \pm 1,21
Paru-paru	4,47 \pm 5,16
Ginjal	5,52 \pm 2,39
Limpa	32,55 \pm 8,45

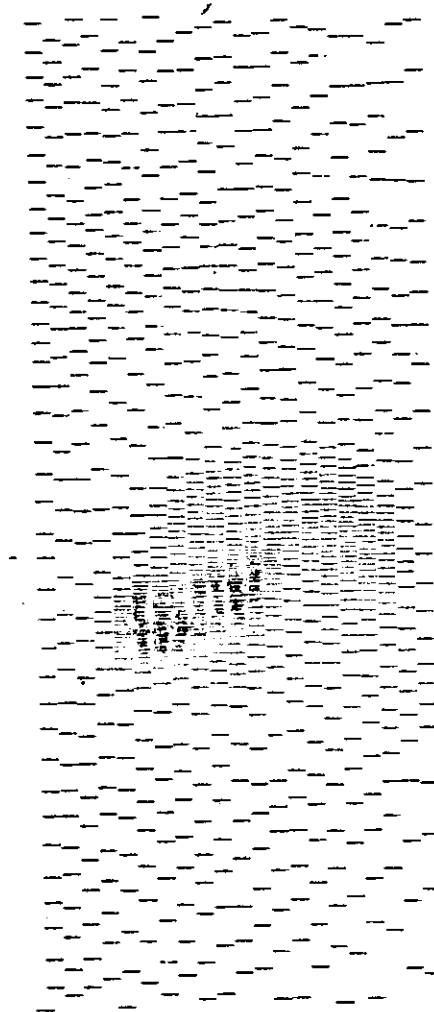
Keterangan:

- Pengulangan dilakukan sebanyak lima kali.
- s.b. : simpangan baku.

itu, tingginya aktivitas yang tertimbun pada hati, ginjal, dan paru-paru, berkaitan erat dengan fungsi fisiologis masing-masing-organ tersebut. Sistem retikulo-endotelium (RES) hati yang mampu melakukan fagositosis terhadap kuman atau benda asing lainnya dalam darah, memungkinkan penimbunan sediaan

tersebut. Begitu pula dengan fungsi ekskresi ginjal; tampak bahwa sebagian dari sediaan diekskresikan melalui urin. Sediaan yang tertimbun di paru-paru terjadi karena sel-sel darah merah terperangkap dalam kapiler paru-paru yang berukuran lebih kecil dari sel darah merah tersebut.

Hasil penyidikan pada tikus putih memperlihatkan hasil yang saling menunjang dengan data biodistribusi. Tampak terjadi penimbunan aktivitas pada limpa dan tidak terlihat adanya penimbunan aktivitas pada organ lain. Perbedaan selang waktu antara penyuntikan dengan dilakukannya penyidikan cukup berpengaruh terhadap gambaran yang didapat.



Gambar 2 Hasil penatahan pada tikus, 45 menit setelah penyuntikan sediaan ^{99m}Tc -sel darah merah (dosis: 1 mCi/0,1 ml).

Pada gambar 2, penyidikan yang dilakukan 45 menit setelah penyuntikan sediaan, memberikan gambaran yang lebih baik dibandingkan dengan penyidikan yang dilakukan pada 15 menit setelah penyuntikan. Pada penyidikan yang dilakukan, 15 menit setelah penyuntikan masih terlihat adanya penimbunan pada organ lain (gambar 1). Walaupun demikian, Ehrlich (1982) mengemukakan bahwa penyidikan dapat dilakukan pada 30 menit setelah penyuntikan dan penimbunan aktivitas di limpa masih terlihat sampai 120 menit setelah penyuntikan (2).

KESIMPULAN

Pembuatan ^{99m}Tc -SDM dipengaruhi oleh beberapa parameter, antara lain kadar reduktor, waktu, serta suhu pemanasan. Kondisi penandaan optimum diperoleh pada pemakaian $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebesar $1 \mu\text{g}$, suhu pemanasan $49-50^\circ\text{C}$, dengan waktu pemanasan selama 15 menit.

Evaluasi yang walaupun terbatas pada uji biodistribusi dan penyidikan pada tikus putih, memberikan hasil yang memuaskan dan menunjang sediaan ^{99m}Tc -SDM untuk dapat digunakan sebagai penyidik limpa.

SARAN

Meskipun data yang diperoleh cukup menunjang penggunaan sediaan ^{99m}Tc -SDM tikus sebagai penyidik limpa, masih perlu diteliti lebih lanjut faktor-faktor yang mempengaruhi pembuatan sel darah merah manusia bertanda ^{99m}Tc , sehingga diharapkan metode pembuatan sediaan tersebut dapat diterapkan untuk mengetahui berbagai kelainan pada limpa manusia. Untuk memenuhi syarat sebagai sediaan radiofarmasi, perlu dilakukan uji biologis seperti sterilitas, toksisitas, apirogenitas, dan lain sebagainya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dra. Sami Rahayu Darsuki dan Drs. Ujang Supriatna yang telah banyak memberikan bantuan.

PUSTAKA

- 1 Eckelman, W., P. Richard, and W. Hauser, Technetium Labeled Red Blood Cells, *J.Nucl.Med.*, 12, 22-24, (1971).
- 2 Ehrlich, C.P. *et al.*, Splenic Scintigraphy Using Tc-99m Labeled Heat-Denatured Red Blood Cells in Pediatric Patients: Concise Communication, *J.Nucl.Med.*, 23, 209-213, (1982).

- 3 Fischer, J., R. Wolf, and A. Leon, Technetium-99m as Label for Erythrocytes. *J.Nucl.Med.*, 8, 229–232, (1967).
- 4 Marsh, G.W., S.M. Lewis, and L. Szur, The Use of ⁵¹Cr-Labeled Heat-Damaged Red Blood Cells to Study Splenic Function: I. Heat Damaged Red Blood Cells and Splenic Function, *Brit.J. Haemat.*, 12, 164–166, (1966).
- 5 Marsh, G.W., S.M. Lewis, and L. Szur, The Use of ⁵¹Cr-Labeled Heat-Damaged Red Blood Cells to Study Splenic Function: II. Splenic Atrophy in Thrombocythaemia, *Brit.J.Haemat.*, 12, 167–171, (1966).
- 6 Ryo, U.Y. *et al.*, Evaluation of Labeling Procedures and in Vivo Stability of ^{99m}Tc-Red Blood Cells, *J.Nucl.Med.*, 17, 133–136, (1976).
- 7 Schwartz, K.D., and M. Kruger, Improvement in Labeling Erythrocytes with ^{99m}Tc-Pertechnetate, *J.Nucl.Med.*, 12, 323–324, (1971).
- 8 Smith, T.D., P. Richards, A Simple Kit for the Preparation of ^{99m}Tc-Labeled Red Blood Cells, *J.Nucl.Med.*, 17, 126–132, (1976).
- 9 Srivastava, S.C., and L.R. Chervu, Radionuclide-Labeled Red Blood Cells: Current Status and Future Prospect, *Sem. Nucl. Med.*, 14, 68–82, (1984).
- 10 Yunus, A.A., and S.R. Tamat, Kompleks Tc-99m-Sel Darah Merah untuk Penatahan Limpa, PRAB: 275.RIP.1573., BATAN.