

UJI SEL DARAH MERAH BERTANDA ^{99m}Tc DISALUT IgG-ANTI-RhOD PADA TUBUH MANUSIA

Nanny Kartini H., Dudu Hadiyat, M. Ratnasuminar, R. Rukayah
Pusat Penelitian Teknik Nuklir - Badan Tenaga Atom Nasional

ABSTRAK

UJI SEL DARAH MERAH BERTANDA ^{99m}Tc DISALUT IgG-ANTI RhoD PADA TUBUH MANUSIA. Telah dilakukan penandaan sel darah merah dengan ^{99m}Tc yang kemudian disalut dengan IgG-anti RhoD. Setelah penyuntikan kembali sediaan ini ke dalam tubuh sukarelawan normal, menunjukkan suatu pola clearance dari darah yang spesifik pada 30 menit pertama pasca injeksi, bila dibandingkan dengan sel darah merah bertanda ^{99m}Tc yang tidak disalut dengan IgG-anti-RhoD. Demikian juga gambaran pola biodistribusi dalam organ-organ kritis seperti limpa, jantung, hati menunjukkan pola yang berbeda di antara kedua sediaan tersebut. Pola clearance yang normal ini dapat dipakai sebagai acuan untuk menyelidiki limpa dari sukarelawan lain yang mempunyai keluhan penyakit *glomerulo nefritis idiopatic* atau *rheumatoid arthritis*.

ABSTRACT

STUDY OF ^{99m}Tc -RED BLOOD CELLS COATED WITH IgG-ANTI-RhoD IN THE HUMAN BODY. Labeling of red blood cells (RBC) with ^{99m}Tc followed by coating with IgG-anti-RhoD has been done. After reinjection of this preparation to normal volunteers, the result was compared with that obtained with ^{99m}Tc -RBC without coating shows the specific blood clearance profile in the first 30 minutes post injection. Biodistribution profiles in some critical organs such as spleen, heart and liver were different for those two preparations. This normal clearance profile can be used as reference to observe the condition of the spleen in *glomerulo-nephritis idiopathic* and *rheumatoid arthritis idiopathic* patients.

PENDAHULUAN

Sejumlah jenis penyakit yang disebabkan oleh adanya endapan kompleks imun (immune complexes = IC) dalam sirkulasi darah, dapat menimbulkan kelainan-kelainan pada jaringan meskipun sejauh ini antigen penyebabnya seringkali tidak diketahui [1].

Bertambahnya jumlah kompleks imun dalam darah dapat ditemukan pada penyakit-penyakit yang disebabkan oleh infeksi virus dan parasit terutama infeksi pada saluran pernafasan.

Pada keadaan tubuh normal, kompleks imun dari sirkulasi darah dapat dibersihkan oleh sistem retikuloendotelial. Tidak sempurnanya fungsi sistem ini sangat berpengaruh terhadap kelancaran ekskresi kompleks imun tersebut, dan meningkatkan pengendapannya dalam jaringan. [2]. Pengendapan senyawa ini biasanya terjadi di dalam nefron-ginjal atau peredaran, sehingga dapat menyebabkan terjadinya penyakit glomerulo-nefritis atau arthritis-rheumatoid [3].

Untuk mempelajari apakah pengendapan kompleks imun pada ginjal atau jaringan lain ada hubungannya dengan fungsi sistem

retikuloendotelial limpa, maka dikembangkan suatu teknik yang menggunakan radionuklida. Frank dkk.[3], pada tahun 1979 mengembangkan suatu teknik pengukuran clearance dari eritrosit (sel darah merah) bertanda ^{99m}Tc , baik yang dibuat dengan metode *Heat Damage Erythrosit* (HDE) ataupun yang bersalut IgG-anti-D Rhesus.

Berdasar pada hasil penelitian dari para peneliti terdahulu [4] di mana telah diperoleh suatu metode pembuatan eritrosit bertanda ^{99m}Tc disalut IgG-anti-RhD, maka pada kertas kerja ini akan dibahas biodistribusi dan pola clearance sediaan tersebut pada tubuh manusia normal.

TATAKERJA

Bahan dan peralatan

Bahan yang digunakan adalah air untuk injeksi dan larutan NaCl fisiologis (IPHA), larutan natrium ^{99m}Tc -perteknetat dan kit kering radiofarmasi Pyrostan (PPTN-BATAN), imunoglobulin anti-RhoD (Cutter Biological), alkohol 70% (Kimia Farma), dan larutan injeksi heparin (Leo).

Alat-alat yang digunakan adalah tabung sentrifuga steril, tabung reaksi dan vial gelas, inkubator penangas air yang stabil pada 37 °C, laminar air flow (Clemco), pencacah saluran tunggal (Nuclear Association Division of Victoreen Inc.), gamma-camera (Toshiba) dan rate down scaler (Shimadzu).

Tata kerja

Kondisi sukarelawan

Sukarelawan dipilih laki-laki dewasa normal ber-rhesus positif umur berkisar antara 25-40 tahun, dengan berat tubuh bervariasi. Selama percobaan mereka dibiarkan melakukan kegiatan seperti biasanya, dan tidak dilakukan pembatasan makanan atau minumannya.

Pengambilan darah dilakukan sekitar jam 8.00 pagi, kemudian setelah darah itu diproses disuntikkan kembali ke dalam tubuh sukarelawan yang bersangkutan secara intra vena. Pengambilan cuplikan darah dilakukan pada 10, 30, 60, 180 dan 360 menit pasca injeksi.

Pembuatan sel darah merah (eritrosit) bertanda ^{99m}Tc disalut IgG- anti-RhoD

Sebelum pekerjaan dimulai alat-alat yang akan digunakan dalam proses pembuatan harus dipersiapkan steril dan disimpan dalam laminar air flow. Boks laminar air flow disiapkan secara aseptis dengan dibilas memakai alkohol 70%, dan disinari cahaya ultra-violet selama satu jam.

Semua pekerjaan pembuatan sediaan ini dilakukan secara aseptis di dalam boks laminar air flow dan dilaksanakan dengan teliti untuk menghindari terjadinya kontaminasi.

Sebanyak 3 ml darah yang mengandung heparin disentrifuga untuk memisahkan sel darah merah dari plasmanya. Kemudian sel darah merah tersebut dicuci dua kali, setiap kali dengan 5 ml NaCl fisiologis steril menggunakan sentrifuga selama 6 menit dengan kecepatan 2000 rpm.

Kemudian ditambahkan 1-1,5 ml NaCl fisiologis steril dan larutan Pyrostan sedemikian rupa sehingga kadar SnCl_2 yang ditambahkan sebanyak 2,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sel darah merah (tiap vial sediaan Pyrostan mengandung SnCl_2 sebanyak 4 μg). Campuran ini kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu kamar sambil diaduk perlahan-lahan. Kemudian dicuci dengan 2 x 5 ml NaCl fisiologis steril menggunakan sentrifuga.

Ke dalam sel darah merah tersebut ditambahkan 2 ml larutan Na^{99m}Tc -perteknetat dalam NaCl fisiologis dengan aktivitas sebesar 500 μCi . Campuran diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar sambil perlahan-lahan diaduk. Kemudian disentrifuga dan dicuci dua kali dengan masing-masing 5 ml NaCl fisiologis steril. Untuk mengetahui besarnya penandaan maka sebelum dan sesudah pencucian sediaan tersebut dicacah dengan alat pencacah saluran tunggal.

Setelah itu sebanyak 2 ml NaCl fisiologis ditambahkan ke dalam sel darah merah bertanda tersebut, kemudian ditambah larutan IgG-anti-RhoD sebanyak 200-250 μl , aduk perlahan-lahan sambil diinkubasi selama 20 menit pada inkubator penangas air dengan suhu 37 °C. Terakhir sediaan disentrifuga dan dicuci dengan 2x5 ml NaCl fisiologis steril, larutan dicacah dan siap untuk disuntikkan.

Penyuntikan sel darah merah bertanda ^{99m}Tc disalut IgG-anti-RhoD pada sukarelawan

Sediaan yang telah dibuat disuntikkan kepada sukarelawan yang bersangkutan secara intravena sebanyak 1 ml (200-300 μCi). Kemudian pada waktu-waktu tertentu yaitu 10, 30, 60, 180 dan 360 menit pasca injeksi, sebanyak 1 ml darahnya diambil dan besarnya aktivitas dicacah dengan pencacah saluran tunggal. Sebagai pembanding digunakan sediaan yang tidak disuntikkan yang secara bersamaan dicacah dengan cuplikan darah.

Selain pengambilan cuplikan darah, pada waktu yang sama juga dilakukan pencacahan organ-organ kritis, yaitu limpa, jantung, hati secara eksterna dari sukarelawan tersebut dengan alat rate down scaler.

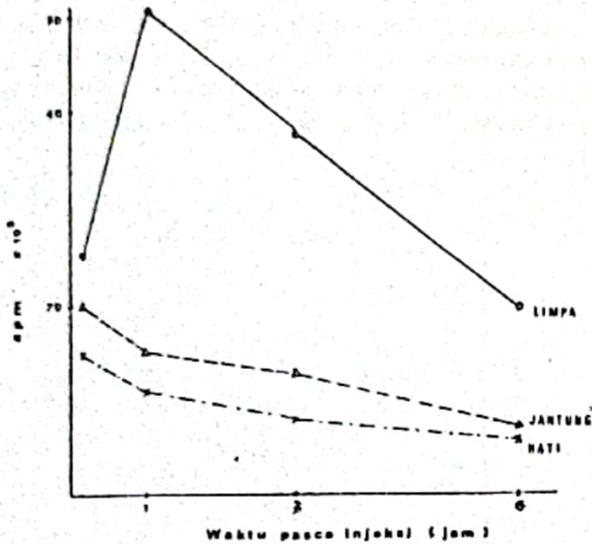
Sebagai pembanding, perlakuan lain dikerjakan terhadap sukarelawan yang sama dengan menggunakan sel darah merah bertanda ^{99m}Tc tanpa disalut dengan IgG-anti-RhoD.

Untuk mendapatkan pola kinetika di dalam darah percobaan dilakukan terhadap sukarelawan lain. Darah diambil pada 5, 10, 15, 20, 25 dan 30 menit setelah penyuntikan. Selain itu dicoba juga pengambilan darah tiap menit pada 10 menit pertama dan kemudian dilanjutkan tiap 5 menit sampai dengan 30 menit berikutnya, dan tiap cuplikan darah dicacah dengan alat pencacah saluran tunggal.

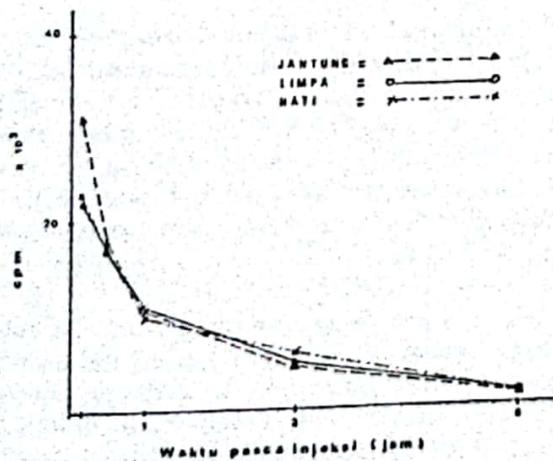
HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari salah seorang sukarelawan yang disuntik dengan sediaan ^{99m}Tc -SDM-disalut

IgG-anti-RhoD, dan beberapa minggu kemudian disuntik juga dengan ^{99m}Tc -SDM-tanpa disalut, memberikan data yang sangat menarik seperti tertera pada Gambar 1, 2 dan 3. Gambar 1 menunjukkan penimbunan keradioaktifan di dalam setiap organ kritis setelah penyuntikan ^{99m}Tc -SDM-bersalut IgG-anti RhoD.

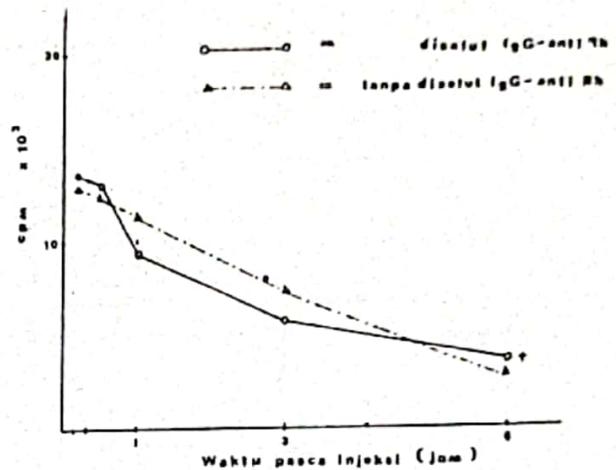


Gambar 1. Penyebaran sediaan ^{99m}Tc -SDM bersalut IgG-anti RhoD di dalam organ limpa, hati dan jantung sukarelawan.



Gambar 2. Penyebaran sediaan ^{99m}Tc -SDM tidak bersalut IgG-anti RhoD di dalam organ limpa, hati dan jantung sukarelawan.

Penimbunan radioaktivitas dalam limpa jauh lebih tinggi bila dibandingkan dengan organ-organ lain seperti hati dan jantung. Akan tetapi jika yang disuntikkan adalah ^{99m}Tc -SDM-tanpa disalut IgG-anti-RhoD, maka gambar penyebaran dalam organ-organ tersebut (Gambar 2) berbeda dengan yang pertama (Gambar 1). Tampaknya limpa, hati dan jantung menangkap sediaan tersebut dalam jumlah yang hampir sama. Hal ini terlihat pada pola penurunan aktivitas dalam tiap organ yang hampir tidak berbeda.



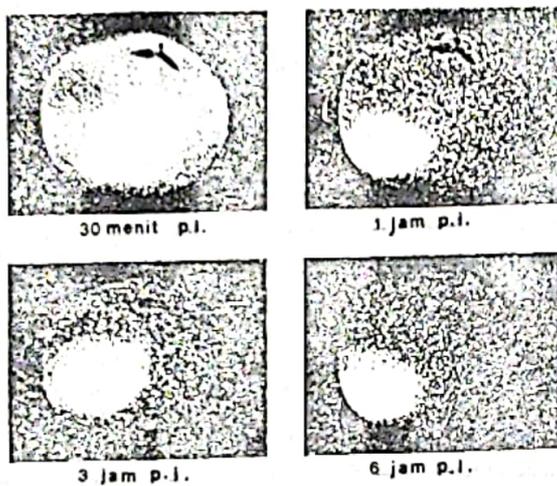
Gambar 3. Penurunan radioaktivitas dalam cuplikan darah sukarelawan setelah penyuntikan ^{99m}Tc -SDM-bersalut IgG-anti RhoD () dan ^{99m}Tc -SDM tidak bersalut IgG-anti RhoD ()

Gambar 3 memperlihatkan penurunan aktivitas (clearance) di dalam cuplikan darah yang diperoleh pada saat 10, 30, 60, 120 dan 360 menit pasca injeksi.

Dari hasil yang diperoleh dapat dibuktikan bahwa sel darah merah yang disalut dengan IgG-anti-RhoD ternyata jauh lebih banyak dapat tertangkap oleh limpa dibandingkan dengan organ lainnya. Ini sesuai dengan teori bahwa Fc-reseptor dalam limpa dapat berikatan dengan antigen DR3 yaitu antigen yang berada pada permukaan sel darah merah pada orang-orang yang mempunyai faktor rhesus positif [5,6]. Dari percobaan ini dapat disimpulkan bahwa manusia yang mempunyai limpa normal berkemampuan untuk mengikat SDM-bersalut IgG-anti RhoD, tetapi berbeda halnya bagi beberapa individu yang limpanya tidak mempunyai

Fc-reseptor, mereka tidak mempunyai kemampuan untuk mengikat senyawa ini. Dengan kata lain mereka tidak berkemampuan untuk dapat mengikat senyawa imun kompleks yang berada dalam sirkulasi darahnya, sehingga senyawa ini akan tetap berada dalam darah dan terendapkan dalam jaringan, kemudian dapat mencestuskan berbagai macam penyakit [6].

Penyidikan dengan gamma-camera terhadap limpa sukarelawan yang telah disuntik dengan ^{99m}Tc -SDM-bersalut IgG-anti RhoD, pada interval waktu yang sesuai dengan waktu pengambilan cuplikan darah, dapat dilihat pada Gambar 4.



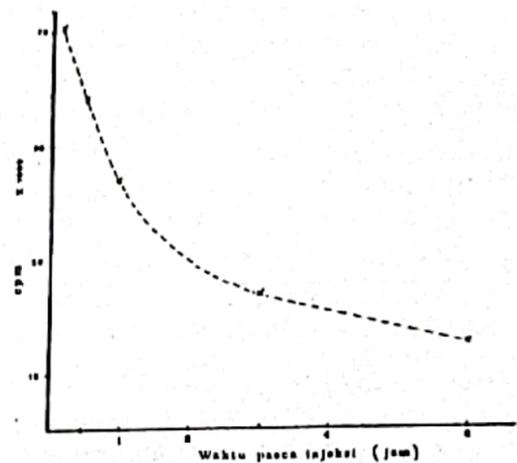
Gambar 4. Hasil penyidikan limpa sukarelawan dengan gamma-camera dengan aktivitas sediaan $300 \mu\text{Ci/ml}$.

Tabel 1. Besarnya cacahan per menit dalam 1 ml darah sukarelawan.

No. Sukarelawan	Waktu pasca injeksi (menit)				
	10	30	60	180	360
1	58034	46440	40559	21119	18898
2	87753	74300	47043	28829	19378
3	73908	67935	50852	31749	19868
4	99368	62124	54278	16067	9309
5	34138	42986	30486	19744	7811
Rata-rata	70640 ± 25593	58757 ± 13579	44643 ± 9410	23501 ± 6547	15052 ± 5960

Pada gambar ini terlihat bahwa penangkapan radioaktivitas oleh limpa sangat besar pada saat 30 menit pasca injeksi (p.i) dan bertahan sampai 6 jam p.i. Setelah itu jumlah radioaktivitas mulai berkurang. Hal ini ditunjukkan dengan adanya gambaran limpa yang mulai mengabur.

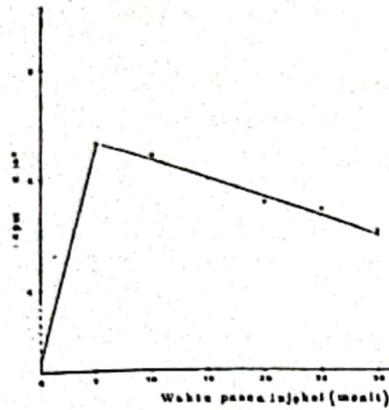
Dari beberapa orang sukarelawan ($n=5$) diperoleh suatu pola kinetika sediaan tersebut di dalam darah mulai dari 10, 30, 60, 180 dan 360 menit seperti dipaparkan pada Tabel 1 dan Gambar 5. Dalam gambar ini terlihat bahwa



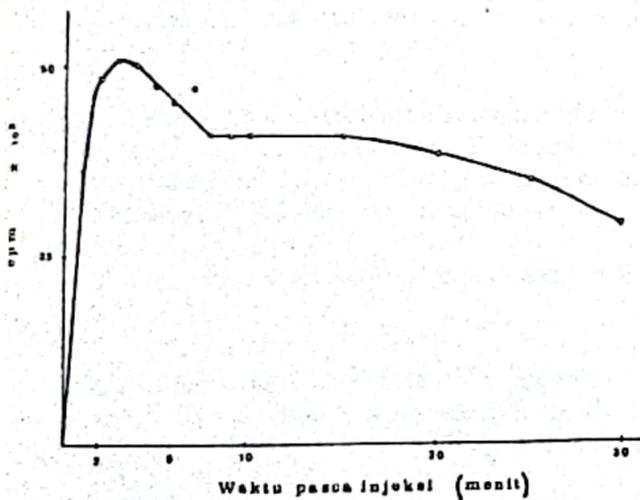
Gambar 5. Pola kinetika sediaan $\text{SDM-}^{99m}\text{Tc}$ -bersalut IgG-anti-RhoD di dalam darah

penurunan aktivitas dalam darah yang paling tajam terjadi pada 1 jam pertama setelah penyuntikan. Kemudian dari percobaan selanjutnya untuk mengetahui lebih mendalam mulai kapan terjadinya penurunan aktivitas, ternyata bahwa aktivitas di dalam darah mulai tampak pada menit pertama dan terus meningkat sampai 4 menit kemudian. Setelah itu aktivitas menurun terus (Gambar 6 dan 7).

Dan dari penyidikan limpa dengan alat rate down scaler pada interval waktu yang lebih pendek (tiap lima menit), ternyata retensi ^{99m}Tc -SDM disalut IgG-anti RhoD di dalam limpa terjadi pada 5 menit pasca injeksi seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2 dan Gambar 8. Dari gambar tersebut dapat dijelaskan bahwa 5 menit pertama merupakan fase absorpsi, dan tetap bertahan dalam limpa selama 20 menit, ini disebut fase laten, dan setelah itu terjadi



Gambar 6. Aktivitas di dalam darah dari 5 s/d 30 menit setelah penyuntikan.



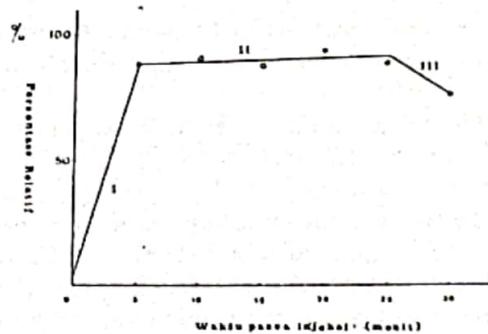
Gambar 7. Keadaan aktivitas tiap menit di dalam darah dari 1 s/d 10 menit setelah penyuntikan.

penurunan dan ini disebut dengan fase eliminasi.

Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa untuk mengetahui kelainan limpa dapat dipakai dua cara menggunakan sediaan ini, yaitu dengan membandingkan pola kinetiknya di dalam darah seperti Gambar 6, atau dengan melihat persentasenya di dalam limpa secara eksternal seperti pada Gambar 8. Kalau ada penyimpangan dari pola gambaran

Tabel 2. Persentase relatif retensi ^{99m}Tc -SDM -disalut IgG-anti RhoD di dalam

Waktu pasca injeksi (menit)	Persentase relatif (%) (n=3)
5	87,6 ± 20,9
10	90,5 ± 10,5
15	88,0 ± 9,5
20	94,1 ± 8,4
25	88,5 ± 3,4
30	78,2 ± 1,4



I = Fase absorpsi; II = Fase laten; III = Fase eliminasi

Gambar 8. Pola retensi ^{99m}Tc -SDM-disalut IgG-anti RhoD di dalam organ limpa normal setelah penyuntikan intra vena.

tersebut, dapat di artikan bahwa fungsi limpa dari pasien tersebut ada kelainan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Sediaan ^{99m}Tc -SDM bersalut IgG-anti RhoD dapat digunakan untuk mendeteksi keadaan limpa dari orang-orang yang mempunyai faktor rhesus positif.

Aplikasi lebih lanjut dapat diteruskan dengan mendeteksi limpa dari sukarelawan yang mempunyai penyakit kelainan ginjal yang tidak diketahui penyebabnya atau artritis rheumatoid.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jawet, E., Melnick, J.L., Adelberg, L.A., Review of medical microbiology, Lange Medical Publication, 14, California (1982), 203.
2. Heptinstall, R.H., Pathology of kidney, Little Brown and Company, 3, Boston (1983), 301-303.
3. Mc.Ginley, E., Martin, W., Henderson, N., Boulton-Jones, J.M., Defectif splenic reticuloendothelial function in idiopathic membranous nephropathy, Clin.Exp.Immunol., 56, (1984), 295 - 301.
4. Nanny Kartini, H. dkk., Penandaan SDM bersalut IgG-anti RhoD dengan ^{99m}Tc , Laporan teknis penelitian tahun 1990-1991, Proyek Penelitian Keselamatan Reaktor Riset, Bandung (1991).
5. Roitt Ivan, Essential Immunology, Blacwell Scientific Publication, 2, London (1957), 129 - 157.
6. Igaku Shoin, Saunders, Medical Dictionary, 26, Tokyo (1982), 90 - 91.

DISKUSI

Rosmiarty A. Wahid:

1. Apakah sel darah merah bersalut IgG-anti RhoD yang dibuat dalam penelitian ini dipersiapkan sebelumnya dalam satu kit, yang darahnya berasal dari donatur atau pasien langsung, mohon penjelasan.
2. Apakah diperhatikan/diteliti keseimbangan butir darah merah bersalut yang dimasukkan ke tubuh sukarelawan.

Nanny Kartini :

1. Pada saat penelitian tahap pertama yaitu mencari kondisi optimum penandaan/proses SDM ini, darah diperoleh dari PMI cabang Bandung yang sudah di uji memang berdarah Rhesus +. Tetapi untuk penelitian tahap ini yaitu uji terhadap manusia, tentu saja sel darah merahnya berasal dari orang yang sama yaitu donatur yang bersangkutan, dan setelah di proses lalu disuntikkan kembali kepada donatur.
2. Tidak diperhatikan, dan tidak perlu karena perhitungan di sini tidak absolut tetapi relatif.

A. Aziz B.:

Untuk penelitian ini dipakai sukarelawan, dan sukarelawan itu diperoleh dari mana dan apakah mereka tahu bahwa sediaan yang dipakai adalah radioaktif dan sampai sejauh mana pengaruh sampingan dari preparat radioaktif ini terhadap sukarelawan.

Nanny Kartini:

Sukarelawan diperoleh dari lingkungan PPTN, dan mereka mengetahui sekali bahwa yang disuntikkan adalah sediaan radioaktif. Pengaruh sampingan yang dikhawatirkan berasal dari 2 sebab yaitu :

- a. anti rhesus : tetapi efek sampingan anti rhesus tidak mungkin terjadi karena IgG-anti RhoD disini sudah berikatan dengan antigen DR₃ yang ada pada permukaan SDM pada saat proses penandaan/pembuatan sediaan, jadi tidak akan berfungsi lagi untuk mengendapkan/koagulasi darah pasien.
- b. radioaktif : untuk efek sampingan ini kemungkinan kecil sekali mengingat yang disuntikkan hanya sekitar 200 - 300 μCi , dan $T_{1/2}^{99m}\text{Tc}$ di dalam tubuh sangat cepat (< dari 6 jam) malahan pada 24 jam pertama radioaktivitas di dalam tubuh sudah hilang.

Nurhayati T.:

1. Apakah penentuan yang berhesus + diuji dulu?
2. Bagaimana menguji/menentukan bahwa orang yang disuntik itu normal?

Nanny Kartini:

1. Ya, diuji dulu dengan perekasi penentu faktor rhesus untuk in vitro.

2. Karena penelitian ini bekerjasama dengan salah seorang dokter dari klinik kita, dan dialah yang memilih siapa yang menjadi sukarelawan, tentu saja dengan melihat keadaan/kondisi sukarelawan tersebut sesuai dengan kartu status kliniknya.