

PENENTUAN TANGKAPAN RADIOFARMAKA ^{99m}Tc -SIPROFLOKSASIN TERHADAP CIPROFLOXACIN-RESISTANT *Escherichia coli* DAN CIPROFLOXACIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus*

Isti Daruwati¹, Maria Agustine², Maula Eka Sriyani¹, Iim Halimah¹, Rizky Juwita
Sugiharti¹ dan Nelly D. Leswara²

¹Pusat Sains dan Teknologi Nuklir Terapan, Badan Tenaga Nuklir Nasional,
Jl Tamansari No. 71 Bandung 40134.

²Departemen Farmasi-Universitas Indonesia, Gedung D, Kampus UI Depok, 16424
e-mail : isti@batan.go.id

ABSTRAK

PENENTUAN TANGKAPAN RADIOFARMAKA ^{99m}Tc -SIPROFLOKSASIN TERHADAP CIPROFLOXACIN-RESISTANT *ESCHERICHIA COLI* DAN CIPROFLOXACIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus*. Kedokteran nuklir di Indonesia telah memberikan kontribusi nyata dalam diagnosis suatu penyakit. Salah satunya melalui pengembangan radiofarmaka untuk penyakit infeksi yaitu ^{99m}Tc -siprofloksasin. Bagian Kedokteran Nuklir, RS Hasan Sadikin telah memanfaatkan radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin untuk berbagai jenis infeksi serta menentukan keberhasilan terapi antibiotik dengan teknik ini. Namun, dalam aplikasi radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin kekhawatiran mengenai keakuratan diagnosis pada kasus infeksi yang bakterinya telah resisten. Penelitian ini difokuskan pada penentuan tangkapan bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) dan *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) yang telah dibuat resisten terhadap siprofloksasin. Metode yang digunakan adalah menyiapkan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* yang direstiskan dengan pemberian antibiotik siprofloksasin secara berturut-turut masing-masing selama 5 dan 4 hari pada konsentrasi dibawah kadar hambat minimum (KHM), kemudian diberikan 60 μL radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin dan diinkubasi selama 1 malam. Adanya tangkapan dinyatakan dengan besarnya persentase ^{99m}Tc -siprofloksasin dalam masing-masing media pertumbuhan bakteri tersebut. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa bakteri *E. coli* dan *S. aureus* yang sudah resisten yang disebut juga dengan Ciprofloksacin-resistant *E. coli* (CREC) dan Ciprofloksacin-resistant *S. aureus* (CRSA) memberikan tangkapan masing-masing sebesar $32,76 \pm 3,80\%$ ($n=6$) dan $42,09 \pm 10,35\%$ ($n=6$). Tangkapan CREC dan CRSA diatas secara statistik melalui uji t dengan tingkat kepercayaan 95% tidak berbeda secara nyata dengan tangkapan *E. coli* dan *S. aureus* terhadap ^{99m}Tc -siprofloksasin yang sama.

Kata Kunci: radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin, resisten siprofloksasin, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

UPTAKE OF ^{99m}Tc -CIPROFLOXACIN RADIOPHARMACEUTICAL TO CIPROFLOXACIN-RESISTANT *Escherichia coli* AND CIPROFLOXACIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus*

Nuclear medicine in Indonesia has contributed significantly in establishing the diagnosis of diseases through the development of radiopharmaceutical for infectious diseases, such as ^{99m}Tc -ciprofloxacin. Nuclear Medicine Division in Hasan Sadikin Hospital has been utilizing the ^{99m}Tc -ciprofloxacin for diagnosis various types of infections and for determining the effectiveness of antibiotic therapy. However there has been an obstacle in the accuracy of ^{99m}Tc -ciprofloxacin when it was used for diagnosis of antibiotic resistance infection. Therefore, to ensure the validity of diagnosis of antibiotic resistance infection with ^{99m}Tc -ciprofloxacin, the uptake of ciprofloxacin resistant *Escherichia coli* (CREC) and ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* (CRSA) needs to be conducted. The CREC and CRSA were prepared by treating *E. coli* and *S. aureus* with ciprofloxacin with concentration below minimum inhibitory concentration (MIC) for 5 and 4 days respectively. The CREC and CRSA were then treated with 60 μL ^{99m}Tc -ciprofloxacin which was followed by incubating the mixture for 1 night. The uptake is expressed as the percentage of ^{99m}Tc -ciprofloxacin which was deposited in each tube of the bacterial growth medium. The uptake of ^{99m}Tc -ciprofloxacin by CREC and CRSA were found to be $32.76 \pm 3.80\%$ ($n = 6$) and $42.09 \pm 10.35\%$ ($n = 6$) respectively. These uptakes were not significantly different with the uptake of ^{99m}Tc -ciprofloxacin by *E. coli* and *S. aureus* when compared statistically by t test with 95% confidence level.

Key Words: ^{99m}Tc -ciprofloxacin radiopharmaceutical, ciprofloxacin-resistant, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

PENDAHULUAN

Perkembangan kedokteran nuklir di Indonesia telah menghasilkan suatu teknik diagnosis baru untuk mendeteksi lokasi dari penyakit infeksi. Diagnosis dengan suatu radiofarmaka memiliki keunggulan dalam sensitivitas, bersifat non-invasif dan lebih cepat serta mampu untuk mendeteksi lokasi infeksi pada daerah yang sulit dijangkau dengan metode lain (*deep seated infection*) [1,2]. Radiofarmaka didefinisikan sebagai suatu senyawa radioaktif dengan maksud untuk dimasukkan ke dalam tubuh manusia, baik untuk tujuan terapi maupun diagnosis serta mengalami perubahan metabolisme di dalam tubuh [3].

Radionuklida yang paling banyak digunakan untuk tujuan diagnosis adalah teknesium-99m (Tc-99m). Penggunaan Tc-99m untuk tujuan diagnosis karena Tc-99m mempunyai waktu paruh yang relatif pendek (6,02 jam), memancarkan sinar gamma murni dengan energi 140,5 keV yang ideal untuk pencitraan dengan kamera gamma, dan mempunyai toksisitas yang rendah. Tc-99m cukup mudah diproduksi dan harganya juga relatif murah [7,8].

Ligan yang umumnya digunakan untuk diagnosis infeksi adalah senyawa berupa antibiotik yang ditandai dengan radionuklida Tc-99m [4]. Antibiotik secara umum bersifat bakterisid dan berdasarkan sifat ini maka antibiotik bertanda radioaktif akan terakumulasi pada daerah infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Salah satu radiofarmaka yang telah dikembangkan dan digunakan sebagai radiodiagnosis adalah ^{99m}Tc -siprofloksasin [5,6].

Antibiotik siprofloksasin merupakan golongan fluorokuinolon yang mempunyai spektrum antibakteri yang luas [7]. sehingga antibiotik siprofloksasin yang ditandai dengan radionuklida Tc-99m dapat digunakan untuk mendeteksi lokasi infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram negatif maupun bakteri gram positif [8]. Seiring dengan perkembangan dalam penggunaan ^{99m}Tc -siprofloksasin untuk diagnosis infeksi bakteri, kedokteran nuklir juga mulai

memanfaatkan radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin untuk mengetahui efektivitas terapi suatu antibiotik.

Pada penggunaan ^{99m}Tc -siprofloksasin untuk mengetahui efektivitas terapi suatu antibiotik, apabila seorang pasien telah menerima terapi antibiotik kemudian diperoleh hasil positif pada pencitraan, maka pasien tersebut dinyatakan belum sembuh dari infeksinya, namun apabila hasil pencitraan diperoleh hasil negatif maka muncul pertanyaan apakah pasien tersebut telah sembuh dari infeksinya atau bakteri yang menyebabkan infeksi tersebut telah resisten sehingga tidak berikatan dengan radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin. Berdasarkan pemikiran di atas, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan tangkapan bakteri yang telah resisten terhadap suatu antibiotik terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin.

METODOLOGI

Bahan

Siprofloksasin infus 2% (PT Finusolprima Farma International), Siprofloksasin HCl (Zhejiang Xianju Shifang Pharmaceutical – Cina), bakteri *E. coli* (ITB), bakteri *S. aureus* (ITB), agar Mueller-Hinton (OXOID), agar nutrient (OXOID), tioglikolat cair (MERCK), ^{99m}Tc dalam bentuk larutan $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ yang diperoleh dari generator $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ buatan PT. Industri Nuklir Indonesia, $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (E. Merck), asam tartrat (E. Merck), akuabidest steril pro injeksi (IPHA), NaCl 0,9% (IPHA), HCl 0,1N (E. Merck), HCl 0,01N (E. Merck), NaOH 0,1N (E. Merck), NaOH 0,01N (E. Merck), etanol (E. Merck), amonia (E. Merck), metil etil keton (E. Merck), suspensi Mc. Farland, kertas kromatografi ITLC-SG (PALL Scientific) dan kertas kromatografi Whatman 1 (Gelman).

Alat

Laminar Air Flow (Biological Cabinet), *freeze-dryer* (Labconco), autoklaf (Hirayama), inkubator (Memmert), cawan petri, sumuran berdiameter 6 mm, tabung

reaksi, ose, jangka sorong (Vernier Caliper), pembakar spiritus, mikro pipet (*ependorf*), tip, *syringe*, *shaker incubator* (Karl Korb), *dose calibrator* (victoreen), pH meter (denver instrument), oven (Memmert), pencacah gamma saluran tunggal (Ortec), *vortex* (Retch Mixer), kontainer timbal, seperangkat alat kromatografi dengan bejana silinder, penyaring bakteri (milipore 0,22 μ m), sentrifuga (Fisher), kertas indikator universal, vial (Labconco), timbangan analitik (Mettler Toledo) dan alat-alat gelas lainnya.

Prosedur kerja

Pembuatan media tioglikolat cair

Sebanyak 29 gram tioglikolat dilarutkan dalam 1 liter air aquadest, kemudian dipanaskan hingga larut sempurna dan disterilkan dengan autoklaf bersuhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

Pembuatan media agar nutrient

Sebanyak 28 gram agar nutrient dilarutkan dalam 1 liter aquadest, kemudian disterilkan dengan autoklaf bersuhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Agar nutrient kemudian dituang ke dalam cawan petri masing-masing sebanyak ~15 mL secara aseptis dan dibiarkan membeku. Untuk pembuatan agar miring, 5 mL media yang masih cair dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril secara aseptis. Tabung diletakkan dengan posisi miring dan dibiarkan membeku.

Pembuatan media Mueller-Hinton

Sebanyak 38 gram Mueller-Hinton dilarutkan dalam 1 liter aquadest, kemudian disterilkan dalam autoklaf bersuhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Agar Mueller-Hinton yang masih cair kemudian dituang ke cawan petri masing-masing sebanyak \pm 20 mL secara aseptis dan dibiarkan membeku.

Pembuatan kit kering siprofloksasin

Kit kering siprofloksasin dibuat dengan metode liofilisasi menggunakan *freeze dryer* secara aseptis pada ruang kelas 100 (*Laminar Air Flow*). Larutan *bulk* kit kering siprofloksasin disiapkan dengan menimbang 40,0 mg siprofloksasin HCl; 7,5 mg SnCl₂

dan 7,5 mg asam tartrat. Masing-masing bahan kemudian dilarutkan dalam air steril yang telah dijenuhkan dengan gas N₂. Semua bahan kemudian dicampur jadi satu dan dibagi kedalam 16 buah vial yang telah disiapkan. Vial-vial kemudian ditutup dengan septa dalam keadaan setengah terbuka yang kemudian dimasukkan ke dalam *freeze-dryer*. Proses liofilisasi dilakukan selama 22 jam dengan suhu mencapai -40 °C. Kit kering steril disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4 °C.

Penentuan kemurnian radiokimia kit kering siprofloksasin dengan ^{99m}TcO₄⁻

Sebanyak 1,5 mL larutan ^{99m}TcO₄⁻ dimasukkan ke dalam vial kit kering siprofloksasin kemudian dihomogenkan dengan *vortex* selama 40 detik dan larutan diinkubasi selama 15 menit pada temperatur kamar. Radioaktivitas dan pH dari sediaan ^{99m}Tc-siprofloksasin diukur. Kemurnian radiokimia ^{99m}Tc-siprofloksasin diuji dengan metode kromatografi dengan 2 sistem yaitu dengan menggunakan: a) kertas Whatman 1 sebagai fase diam dan etil metil keton sebagai fase gerak dan b) ITLC-SG sebagai fase diam dan campuran etanol : air : ammonia (2 : 5 : 1) sebagai fase gerak. Larutan ^{99m}Tc-siprofloksasin ditotolkan pada masing-masing kertas ~1 cm dari bagian bawah strip kertas Whatman dan ITLC-SG yang kemudian dielus sampai ~1 cm dari bagian atas strip-strip ini tersebut. Kertas kromatografi selanjutnya dikeringkan dalam oven dan kemudian dipotong per 1 cm dan dicacah per bagiannya dengan menggunakan pencacah gamma saluran tunggal. Persentase kemurnian radiokimia ^{99m}Tc-siprofloksasin dihitung berdasarkan nilai 100% dikurangi dengan persentase pengotor TcO₂ dan TcO₄⁻ [12].

Penentuan Kadar Hambat Minimal Antibiotik (KHM) Siprofloksasin terhadap *S. aureus* dan *E. coli*

Pengukuran KHM dilakukan dengan metode pengenceran serial antibiotik siprofloksasin. Tioglikolat cair (0,8 mL) dimasukan kedalam 13 tabung. Suspensi bakteri *S. aureus* (0,1 mL dengan

konsentrasi 10^7 bakteri/mL) kemudian ditambahkan kedalam masing-masing tabung tersebut. Campuran kemudian dihomogenkan yang diikuti dengan penambahan 0,1 mL larutan antibiotik dari serial pengenceran antibiotik siprofloksasin. Campuran dihomogenkan kembali dengan vortex dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Satu set kontrol (3) disiapkan, terdiri dari: a) kontrol media (berisi 0,8 mL tioglikolat cair); b) kontrol bakteri *S. aureus* (berisi 0,8 mL tioglikolat cair ditambah 0,1 mL suspensi bakteri *S. aureus*) dan c) kontrol antibiotik siprofloksasin (berisi 0,8 mL tioglikolat cair ditambah 0,1 mL larutan antibiotik siprofloksasin). Ketiga kontrol ini diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil diamati dengan melihat kekeruhan larutan tioglikolat yang mengandung suspensi bakteri *S. aureus* dan larutan antibiotik siprofloksasin. KHM antibiotik untuk bakteri *S. aureus* diamati pada konsentrasi antibiotik siprofloksasin terkecil yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Prosedur yang sama dilakukan dengan bakteri *E. coli*.

Pencentuan resistensi bakteri

Larutan tioglikolat cair yang berisi bakteri yang telah diberikan antibiotik siprofloksasin dengan konsentrasi dibawah KHM selama 4 hari untuk *S. aureus* dan 5 hari untuk *E. coli* ditumbuhkan pada agar Muller-Hinton yang telah dibuat sumuran dengan diameter 6 mm, kemudian pada lubang No 1, 2, dan 3 dimasukkan konsentrasi antibiotik KHM, masing-masing sebanyak 20 μL dengan konsentrasi 7,8 ppm dan 3,9 ppm untuk *S. aureus*, dan *E. coli*. Kontrol bakteri terdiri dari *S. aureus* dan *E. coli* yang ditumbuhkan pada agar Muller-Hinton, berurut-turut sumuran No 1A, 2A, dan 3A. Antibiotik KHM dengan konsentrasi 7,8 ppm (20 μL) ditambahkan pada sumuran 1A (*S. aureus*) dan 3,9 ppm (20 μL) pada sumuran 2A (*E. coli*). Agar Mueller-Hinton kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil yang diamati adalah berupa zona diameter.

Bakteri dianggap resisten bila zona antibiotiknya lebih kecil dibandingkan dengan zona antibiotik kontrol bakteri. Cara lain yang digunakan untuk memeriksa keresistenan bakteri adalah dengan cara membuat suspensi bakteri yang ingin diperiksa keresistennya dalam NaCl fisiologis dengan konsentrasi 10^7 bakteri/mL. Suspensi (0,1 mL) ini kemudian ditambahkan ke dalam 0,8 mL tioglikolat cair. Antibiotik siprofloksasin dengan konsentrasi KHM kemudian ditambahkan pada campuran, 7,8 ppm (0,1 mL) untuk bakteri *S. aureus* dan 3,9 ppm (0,1 mL) untuk bakteri *E. coli*. Sebagai kontrol dipakai bakteri *E. coli* dan *S. aureus* yang juga dibuat suspensi dalam NaCl fisiologis dengan konsentrasi 10^7 bakteri/mL. Suspensi ini (0,1 mL) kemudian ditambahkan ke dalam 0,8 mL tioglikolat cair. Antibiotik siprofloksasin dengan konsentrasi KHM kemudian ditambahkan pada campuran, yaitu 7,8 ppm (0,1 mL) untuk bakteri *S. aureus* dan 3,9 ppm (0,1 mL) untuk *E. coli*. Tabung yang berisi suspensi bakteri dan antibiotik kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati kekeruhannya. Bakteri dianggap resisten bila memberikan kekeruhan pada media.

Tangkapan bakteri terhadap $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin

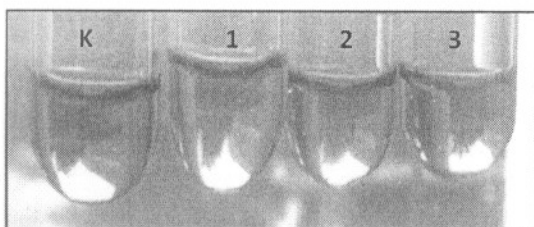
Biakkan masing-masing bakteri *E. coli* dan *S. aureus* yang resisten di dalam cawan petri yang telah berumur 24 jam diambil beberapa sengkeli dan dimasukkan ke dalam vial steril berisi 20 mL larutan natrium klorida fisiologis sehingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan kekeruhan 10^7 kuman/mL yang didapat dari pengenceran Mc Farland III. Suspensi bakteri kemudian dimasukkan kedalam 6 tabung reaksi dengan volume masing-masing 2 mL. Sebagai pembanding digunakan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* yang diperlakukan sama seperti bakteri yang resisten.

Pencampuran bakteri dengan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin dan TcO_4^- dilakukan dengan cara sebagai berikut; a) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -siprofloksasin dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang

telah berisi suspensi bakteri sebanyak 60,0 μ L dan b) TcO_4^- dimasukkan ke dalam tabung yang berisi tioglikolat cair yang telah berisi bakteri sebanyak 60,0 μ L. Campuran kemudian dihomogenkan yang diikuti dengan inkubasi di dalam *shaker incubator* pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah itu semua tabung diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Suspensi bakteri kemudian dipindahkan ke dalam tabung sentrifuge yang kemudian diikuti dengan sentrifugasi selama 5 menit. Larutan selanjutnya didekantasi dan endapan yang tersisa kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis (2 x 1 mL). Selanjutnya setiap tabung dicacah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *S. aureus* dan *E. coli* dari laboratorium Mikrobiologi ITB. Pada tahap awal penelitian ini perlu dilakukan penentuan KHM siprofloksasin yaitu konsentrasi siprofloksasin terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. KHM dapat ditandai dengan kejernihan pada media uji yang dibandingkan terhadap kontrol media. Metode yang digunakan untuk menentukan KHM siprofloksasin adalah metode serial pengenceran antibiotik dalam tabung. Sebagai pembanding kejernihan, digunakan kontrol media yang hanya berisi media yang dipakai yaitu tioglikolat cair. Berdasarkan metode tersebut, KHM siprofloksasin terhadap *E. Coli* dan *S. aureus* berturut-turut sebesar 3,90 ppm dan 7,81 ppm. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2 serta Tabel 12.



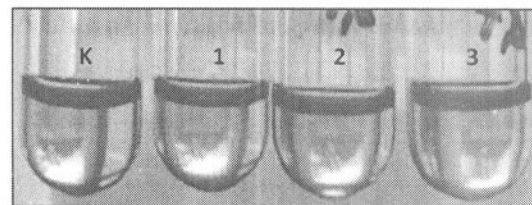
Keterangan Gambar : K = kontrol (media tioglikolat cair), 1,2,3 = media uji yang mengandung 3,90 ppm antibiotik siprofloksasin (triplo).

Gambar 1.Kejernihan media uji terhadap kontrol dalam penentuan KHM siprofloksasin terhadap *E. coli*

Tabel 1. KHM siprofloksasin terhadap *E. coli*

No	Konsentrasi siprofloksasin (ppm)	Tabung		
		I	II	III
1	125	-	-	-
2	62,5	-	-	-
3	31,25	-	-	-
4	15,62	-	-	-
5	7,81	-	-	-
6	3,90	-	-	-
7	1,95	+	+	+
8	0,98	+	+	+
9	0,49	+	+	+
10	0,24	+	+	+
11	0,12	+	+	+

Keterangan : - = jernih (tidak ada pertumbuhan bakteri);
+ = keruh (ada pertumbuhan bakteri)



Keterangan Gambar : K = kontrol (media tioglikolat cair), 1,2,3 = media uji yang mengandung 7,81 ppm antibiotik siprofloksasin (triplo).

Gambar 2. Kejernihan media uji terhadap kontrol dalam penentuan KHM siprofloksasin terhadap *S. aureus*

Tabel 2. KHM siprofloksasin terhadap *S. aureus*

No	Konsentrasi antibiotik (ppm)	Tabung		
		I	II	III
1	2000	-	-	-
2	1000	-	-	-
3	500	-	-	-
4	250	-	-	-
5	125	-	-	-
6	62,5	-	-	-
7	31,25	-	-	-
8	15,62	-	-	-
9	7,81	-	-	-
10	3,90	+	+	+
11	1,95	+	+	+
12	0,98	+	+	+
13	0,49	+	+	+

Keterangan : - = jernih (tidak ada pertumbuhan bakteri);
+ = keruh (ada pertumbuhan bakteri)

Selanjutnya, bakteri *E. Coli* dan *S. aureus* dibuat resisten terhadap siprofloksasin dengan cara memberikan siprofloksasin dengan konsentrasi dibawah KHM selama beberapa hari secara berturut-turut. Pada bakteri *E. coli* yang didapat KHM siprofloksasin pada konsentrasi 3,90 ppm, maka diberikan siprofloksasin pada konsentrasi dibawahnya, yaitu 1,95; 0,98; 0,49; 0,24 dan 0,12 ppm selama 5 hari berturut-turut. Demikian pula dengan *S. aureus* dengan KHM pada 7,81 ppm, diberikan siprofloksasin pada konsentrasi dibawahnya, yaitu 1,95; 0,98; dan 0,49 ppm selama 4 hari berurut-turut.

Metode yang dipakai untuk memeriksa keresistenan bakteri pada penelitian ini adalah dengan metode difusi agar cara lubang. Bakteri uji berupa suspensi bakteri *E. coli* dan *S. aureus* yang telah diberikan antibiotik masing-masing selama 5 dan 4 hari dioleskan pada permukaan agar Mueller-

Hinton yang sebelumnya telah dibuat lubang berdiameter 6 mm. Apabila diameter zona hambatan bakteri uji didapat lebih kecil daripada bakteri kontrol, maka bakteri uji tersebut dianggap telah resisten terhadap siprofloksasin.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa *E. coli* resisten yang selanjutnya disebut *Ciprofloxacin-resistant Escherichia coli* (CREC) diperoleh pada konsentrasi 1,95 ppm siprofloksasin, sedangkan *S. aureus* resisten yang selanjutnya disebut *Ciprofloxacin-resistant Staphylococcus aureus* (CRSA) diperoleh pada konsentrasi 0,49 ppm siprofloksasin. Data diameter zona hambatan bakteri dapat dilihat pada Tabel 3 dan Tabel 4.

Bakteri CREC dan CRSA selanjutnya dibiakkan pada agar nutrisi yang mengandung antibiotik siprofloksasin pada konsentrasi KHM agar hanya bakteri yang telah resisten saja yang akan hidup pada media agar tersebut. Sebagai data pendukung untuk membuktikan bahwa bakteri yang dibiakkan pada agar nutrisi tersebut telah resisten, dilakukan lagi pemeriksaan keresistenan bakteri dengan cara memasukkan suspensi bakteri resisten sebanyak 0,1 mL ke dalam 0,8 mL media tioglikolat cair dalam suatu tabung yang kemudian diikuti dengan penambahan siprofloksasin pada konsentrasi KHM (0,1 mL). Campuran kemudian dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Sebagai kontrol digunakan bakteri.

Tabel 3. Diameter zona hambatan *E. coli* yang telah diberikan siprofloksasin selama 5 hari berturut-turut.

*/sumuran	Diameter Zona Hambat (cm)									$\bar{x} \pm SD$
	Petri I			Petri II			Petri III			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
1,95	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60 ± 0,00
0,98	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60 ± 0,00
0,49	0,60	0,60	0,60	0,88	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,63 ± 0,09
0,24	0,88	0,80	0,89	0,60	0,60	0,60	1,07	0,83	0,94	0,80 ± 0,17
0,12	0,63	0,76	0,87	0,87	0,93	0,84	0,72	0,80	0,65	0,79 ± 0,10
kontrol bakteri	2,08	2,29	2,20							2,19 ± 0,11

Keterangan : Konsentrasi antibiotik siprofloksasin pada sumuran 1, 2, 3 = 3,906 ppm, Volume antibiotik siprofloksasin pada setiap sumuran = 20 µL, * = bakteri yang diberikan siprofloksasin pada konsentrasi 1,95 ppm; 0,98 ppm; 0,49 ppm; 0,24 ppm; 0,12 ppm selama 5 hari.

Tabel 4. Diameter zona hambatan *S. aureus* yang telah diberikan siprofloksasin selama 4 hari berturut-turut

Diameter Zona Hambat (cm)										
*/sumuran	Petri I			Petri II			Petri III			$\bar{x} \pm SD$
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
1,95	1,06	0,91	1,01	1,12	0,6	1,11	0,6	0,6	0,6	0,85 ± 0,24
0,98	1,20	1,13	1,07	0,6	1,12	1,27	1,40	1,13	1,27	1,13 ± 0,22
0,49	1,10	1,03	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,70 ± 0,21
Kontrol bakteri	1,8									

Keterangan : Konsentrasi antibiotik siprofloksasin pada sumuran 1, 2, 3 = 7,812 ppm; Volume antibiotik siprofloksasin pada setiap sumuran = 20 µl; * = bakteri yang diberikan siprofloksasin pada konsentrasi 1,95 ppm; 0,98 ppm; 0,49 ppm selama 4 hari

Keresistenan bakteri terbukti apabila memberikan kekeruhan pada media sedangkan bakteri kontrol tetap jernih. Kekeruhan pada media bakteri resisten membuktikan bahwa bakteri tetap tumbuh meskipun telah diberikan antibiotik siprofloksasin pada konsentrasi KHM yang seharusnya dapat mencegah pertumbuhan bakteri. Bakteri CREC dan CRSA selanjutnya digunakan untuk dilihat tangkapannya terhadap ^{99m}Tc-siprofloksasin.

Dalam rangka penentuan tangkapan ^{99m}Tc-siprofloksasin, secara paralel disiapkan kit kering siprofloksasin yang telah dibuat secara aseptis dengan cara liofilisasi. Kit kering siprofloksasin bersifat steril yang ditunjukkan dengan tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri pada media uji selama 10 hari pengamatan. Penandaan kit kering siprofloksasin dilakukan dengan rekonstitusi kit kering siprofloksasin dengan 1,5 mL larutan teknesium perteknetat dengan radioaktivitas antara 2-8mCi/3mL. Hasil pengujian ^{99m}Tc-siprofloksasin dengan metode kromatografi kertas memberikan kemurnian radiokimia 85,67 ± 0,98%. (n=4) dengan pengotor ^{99m}TcO₄⁻ sebesar 9,49 ± 0,70% dan pengotor ^{99m}TcO₂ sebesar 4,83 ± 0,71%.

Pengujian tangkapan bakteri terhadap ^{99m}Tc-siprofloksasin diadaptasi dari penelitian sebelumnya dengan beberapa perubahan, yaitu pada penelitian terdahulu, suspensi bakteri yang telah ditambahkan dengan ^{99m}Tc-siprofloksasin, setelah diinkubasi langsung disentrifugasi [13], tetapi pada penelitian ini, suspensi bakteri yang telah ditambahkan dengan ^{99m}Tc-siprofloksasin, setelah diinkubasi kemudian

bakterinya dimatikan dengan cara autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Perbedaan lainnya adalah volume dari ^{99m}Tc-siprofloksasin yang ditambahkan. Pada penelitian terdahulu volume yang dimasukkan sebesar 100 µL, sedangkan pada penelitian ini volume yang dimasukkan sebesar 60,0 µL. Alasan perbedaan volume ini karena pada penelitian terdahulu komposisi kit kering siprofloksasin berbeda dengan komposisi kit kering siprofloksasin yang digunakan dalam penelitian ini sehingga perlu dikonversi jumlah siprofloksasin yang ditambahkan yang mengakibatkan perubahan dari volume yang ditambahkan.

Hasil uji tangkapan bakteri CREC dan CRSA terhadap ^{99m}Tc-siprofloksasin berupa persentase tangkapan. Sebagai pembanding digunakan bakteri yang tidak resisten untuk dilihat perbedaan antara tangkapan dari bakteri yang resisten dan bakteri yang tidak resisten. Sebagai kontrol dilakukan juga uji tangkapan bakteri resisten CREC dan CRSA dan bakteri kontrol terhadap larutan ^{99m}TcO₄⁻.

Hasil uji tangkapan bakteri CRSA terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc-siprofloksasin sebesar 42,09 ± 9,45% (n=6), sedangkan bakteri *S. aureus* sebagai pembanding tangkapan sebesar 37,30 ± 4,27% (n=6). Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 6 dan Tabel 7. Hasil uji tangkapan bakteri CREC sementara itu memberikan tangkapan sebesar 32,76 ± 3,47% (n=6) terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc-siprofloksasin, sedangkan bakteri *E. coli* sebagai pembanding memberikan tangkapan sebesar 32,89 ± 4,89% (n=6). Hasil uji

tangkapan bakteri CREC dan bakteri kontrol terhadap larutan $^{99m}\text{TcO}_4$ adalah $0,61 \pm 0,23\%$ dan $0,75 \pm 0,41\%$. Hasil uji tangkapan bakteri CRSA dan bakteri kontrol terhadap larutan $^{99m}\text{TcO}_4$ adalah $2,31 \pm 2,56\%$ dan $2,85 \pm 3,11\%$. Data lengkap dipresentasikan pada Tabel 6 dan 7.

Adanya tangkapan dari bakteri resisten terhadap ^{99m}Tc -siprofloksasin menunjukkan bahwa ^{99m}Tc -siprofloksasin masih dapat digunakan untuk mendiagnosis infeksi meskipun bakteri yang menyebabkan infeksi tersebut telah resisten. Baik bakteri resisten

dan kontrol mampu berikatan dengan radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin karena sisi aktif dari bakteri resisten tidak berubah. Resistensi akan menyebabkan enzim yang berperan dalam sintesis DNA berubah, tetapi tidak pada DNA bakteri. Sehingga interaksi antara DNA bakteri dengan ^{99m}Tc -Siprofloksasin tetap terjadi. Hasil uji statistika menggunakan uji t dengan tingkat kepercayaan 95% menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata antara tangkapan *E. coli* dengan CREC dengan nilai $p = 0,935$. Begitu pula dengan *S. aureus* dengan CRSA dengan nilai $p = 0,171$.

Tabel 6. Perbandingan tangkapan *E. coli* dan CREC terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin dan $^{99m}\text{TcO}_4$

		tangkapan (%)	
		^{99m}Tc -siprofloksasin	$^{99m}\text{TcO}_4$
CREC	1	27,07	0,42
	2	32,86	0,64
	3	29,26	0,52
	4	36,10	0,95
	5	35,97	0,79
	6	35,27	0,34
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$32,76 \pm 3,80$	$0,61 \pm 0,23$
<i>E. coli</i>	1	28,92	1,12
	2	29,19	0,96
	3	28,67	1,25
	4	33,79	0,37
	5	34,24	0,34
	6	42,55	0,44
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$32,89 \pm 5,35$	$0,75 \pm 0,41$

Tabel 7. Perbandingan tangkapan *S. aureus* dan CRSA terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin dan $^{99m}\text{TcO}_4$

		tangkapan (%)	
		^{99m}Tc -siprofloksasin	$^{99m}\text{TcO}_4$
CRSA	1	35,93	0,012
	2	35,02	0,02
	3	28,11	0,019
	4	50,40	4,75
	5	50,00	3,80
	6	53,09	5,29
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$42,09 \pm 10,35$	$2,31 \pm 2,56$
<i>S. aureus</i>	1	38,17	0,015
	2	31,44	0,017
	3	32,27	0,023
	4	41,21	5,70
	5	43,12	5,76
	6	37,60	5,61
	$\bar{x} \pm \text{SD}$	$37,30 \pm 4,68$	$2,85 \pm 3,11$

KESIMPULAN

Bakteri CREC dan CRSA memberikan tangkapan masing-masing sebesar $32,76 \pm 3,80\%$ dan $42,09 \pm 10,35\%$ terhadap radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin. Hasil uji statistika menggunakan uji t dengan menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata antara tangkapan *E. coli* dengan CREC dengan nilai $p = 0,935$. Begitu pula dengan *S. aureus* dengan CRSA dengan nilai $p = 0,171$. Hal ini menunjukkan bahwa radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin masih dapat digunakan untuk diagnosis infeksi bakteri yang disebabkan oleh *E. coli* dan *S. aureus* meskipun bakteri penyebab infeksi telah resisten.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ibu Yeti Suryati dan Bapak Epy Isabela yang telah memberikan kontribusi yang besar dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. BASRY, H. T., ZAINUDDUN, N., & ILJAS, R. (2005, Juni 14-15). Formulasi Radiofarmaka ^{99m}Tc - siprofloksasin untuk Diagnosis Infeksi. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknik Nuklir*, hal. 38-45.
2. SATYA S. DAS, ANNE V. HALL, DAVID W. WAREHAM AND KEITH E. BRITTON (2002) Infection Imaging with Radio pharmaceuticals in the 21st Century. *Braz. arch. biol. technol.* vol.45 no. spe Curitiba Sept. 2002
3. LESWARA, N. D. (2005). *Buku Ajar Radiofarmasi*. Jakarta: Ari Cipta.
4. AKRAM FAZLI1, MOJTABA SALOUTI, GHOLAMREZA AHMADI, FATEMEH MIRSHOJAEI, MOHAMMAD MAZIDI, ZAHRA HEYDARI (2012) Radiolabeling of Ceftriaxone with ^{99m}Tc as a Targeting Radiopharmaceutical for *Staphylococcus Aureus* Detection in Mouse Model. *Iranian Journal of Medical Physics* Vol. 9, No. 2, Spring 2012, 103-110.
5. ZAINUDDIN, N. (2002). Radiofarmaka untuk Deteksi Inflamasi dan Infeksi. *Jurnal Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia, III*, 15-30.
6. ZAINUDDIN, N., BASRY, T. H., ILJAS, R., & SUMINAR, M. R. (2005). Karakterisasi radiofarmaka ^{99m}Tc -siprofloksasin sebagai penyidik infeksi. *Majalah Farmasi Indonesia*, 214-221.
7. SAHA, G. B. (2003). *Fundamental of Nuclear Pharmacy* (fifth ed.). New York: Springer-Verlag Inc.
8. MAZZI, U. (2007). Technetium in Medicine. In I. Zolle (Ed.), *Technetium-99m Pharmaceuticals, Preparation dan Quality Control in Nuclear Medicine* (pp. 7-9). New York: Springer Berlin Heidelberg.
9. SETIABUDY, R. (2001). Antimikroba Lain. In S. G. Ganiswarna (Ed.), *Farmakologi dan Terapi* (4 ed., hal. 675-685). Jakarta: Gaya Baru.
10. GANO, L., PATRICIO, L., CANTINHO, G., PENA, H., MARTINS, T., & MARQUES, E. (1998). Ciprofloxacin in Imaging of Infective Versus Sterile Inflammation. *Modern Trend in Radiopharmaceuticals for Diagnosis and Therapy*.
11. SUMPENA, Y., SUGIHARTI, R. J., & ZAINUDDIN, N. (2007). Biodistribusi dan Uji Clearance ^{99m}Tc -siprofloksasin pada Mencit (*Mus mucus*) yang Terinfeksi Bakteri *Escherichia coli*. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi Nuklir PTNBR-BATAN Bandung*, hal. 393-397.
12. SRIYANI, M. E., & ZAINUDDIN, N. (2009) Karakterisasi Penyimpanan Kit Cair Radiofarmaka Siprofloksasin Dalam Wadah Tunggal. *Prosiding Seminar Nasional V SDM Teknologi Nuklir* Yogyakarta 5 November 2009, hal 661-668.
13. ZAINUDDIN, N., HIDAYAT, B., & ILJAS, R. (2009). Pengembangan dan Aplikasi Klinis Kit Kering Radiofarmaka Siprofloksasin. *Jurnal Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia, X*, 11-23.