

PEMBUATAN INULIN BERTANDA TEKNESIUM-99m, SEBAGAI SEDIAAN UNTUK STUDI LAJU FILTRASI GLOMERULUS

Nanny Kartini H., A.Hanafiah Ws.

Pusat Penelitian Teknik Nuklir - Badan Tenaga Atom Nasional

ABSTRAK

PEMBUATAN INULIN BERTANDA TEKNESIUM-99m SEBAGAI SEDIAAN UNTUK STUDI LAJU FILTRASI GLOMERULUS. Clearance inulin dalam penetapan fungsi ginjal berdasarkan analisis laju filtrasi glomerulus (LFG) telah dijadikan standar pengukuran. Inulin karboksil-¹⁴C, inulin metoksi-³H, inulin-¹³¹I dan inulin-⁵¹Cr telah diusulkan sebagai sediaan untuk mengukur LFG. Namun demikian radionuklida yang digunakan dianggap kurang ideal untuk studi penyidikan. Sediaan yang disenangi adalah inulin bertanda teknesium-99m. Proses pembuatan serta penetapan biodistribusi sediaan ini telah dilakukan. Efisiensi penandaan dicapai $85 \pm 5,7\%$ pada pH 6,5. Uji biologi menunjukkan bahwa sediaan ini 15, 30 dan 45 menit setelah penyuntikan intra vena terakumulasi berturut-turut sebesar 98,9 ; 99,02 dan 99,92% organ ginjal.

ABSTRACT

PREPARATION OF INULIN LABELLED TECHNETIUM-99m FOR THE GLOMERULAR FILTRATION RATE STUDY. The clearance of inulin for measuring glomerular filtration rate (GFR) has been accepted as a standard. Inulin-carboxyl-¹⁴C, inulin methoxy-³H, inulin-¹³¹I, inulin-⁵¹Cr have all been suggested as agents for the measurement of GFR. However, all of these are not ideal radionuclides for imaging purposes. The preferred agent is inulin-^{99m}Tc. The labelling process and the determination of its biodistribution have been carried out. The highest labelling yield was $85 \pm 5.7\%$ at pH 6.5. Biological experiments showed that accumulation of the labeled inulin-^{99m}Tc after 15, 30 and 45 minutes post injection were 98.9 % ; 99.02 % and 99.92 % in the kidney.

PENDAHULUAN

Inulin adalah suatu polisakarida yang terdiri dari unit-unit fruktosa, dan sejak dulu biasa digunakan untuk menentukan laju filtrasi glomerulus (GFR = glomerular filtration rate). Hal ini disebabkan karena inulin tidak dimetabolisma oleh tubuh, kurang dari 2% terikat pada protein plasma, tidak diserap kembali oleh tubuli ginjal dan diekskresikan melalui urine dalam bentuk utuh [1]. Untuk tujuan tersebut inulin disuntikkan secara intravena karena absorpsinya melalui intramuskular dan subkutan tidak menentu, dan pemberian secara oral akan menyebabkan terhidrolisanya inulin dalam saluran pencernaan [1].

Kesulitan yang ditemui pada penggunaan inulin untuk penentuan LFG adalah perlu penggunaan peralatan infus yang konstan, serta kesulitan analisis cuplikan darah dan urine. Selain itu juga tidak memberikan kenyamanan pada penderita selama proses diagnosis berlangsung. Karena faktor tersebut maka beberapa substansi lain sebagai pengganti inulin

telah dikembangkan terutama sediaan yang bertanda radionuklida [2].

Inulin bertanda ¹⁴C, ¹³¹I, ³H dan ⁵¹Cr telah diusulkan untuk dipergunakan dalam penentuan LFG, tetapi sediaan ini dianggap kurang ideal karena selalu memberikan cacahan latar belakang (background) yang tinggi sehingga menyulitkan para pemakai dalam mengevaluasi hasil penyidikan dan radionuklida yang digunakan dianggap kurang ideal untuk penggunaan *in vivo*. Sediaan radiofarmasi lainnya yang dapat digunakan adalah ¹²⁵I-iothalamat dan ^{99m}Tc-Sn-DTPA yang diberikan secara intravena atau subkutan [1]. Lambat laun pemakaian ¹²⁵I-iothalamat ditinggalkan karena selain harganya yang relatif mahal juga memberikan resiko radiasi yang lebih besar terhadap penderita, bila dibandingkan dengan ^{99m}Tc-Sn-DTPA [1]. Sampai sekarang penggunaan ^{99m}Tc-Sn-DTPA masih dianggap yang paling ideal untuk tujuan penentuan LFG ini. Masalah yang dihadapi dengan penggunaan

radiofarmaka ini adalah pengukurannya tidak kuantitatif karena adanya ikatan senyawa ini dengan protein yang besarnya sukar untuk diketahui. Dalam studi yang terbaru (C.D.Russell, 1985), dilakukan pengukuran secara eksplisit dengan koreksi terhadap ikatan protein tadi, menggunakan ^{169}Yb -DTPA (ytterbium-169 DTPA) sebagai pembanding [3].

Mengacu kepada permasalahan di atas, timbul pemikiran untuk menggabungkan sifat-sifat ideal inulin sebagai substansi dalam penentuan LFG dengan sifat radionuklida teknesium-99m sebagai perunut yang saat ini dapat dikatakan paling baik dalam bidang kedokteran nuklir [1].

Dalam penelitian ini dilakukan penandaan inulin dengan radionuklida teknesium-99m, dan dipelajari parameter-parameter yang mempengaruhinya, untuk memperoleh kondisi optimum yang dapat dijadikan standar pada pembuatan radiofarmaka $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -inulin sebagai sediaan untuk studi laju filtrasi glomerulus. Kemudian dipelajari pula hasil penyidikan dalam tubuh tikus jenis Wistar, dan biodistribusi di dalam tubuh mencit jenis Swiss.

BAHAN DAN PERALATAN

Bahan yang diperlukan adalah asam klorida, alkohol, timah(II) klorida, natrium hidroksida, semuanya mempunyai kualitas analisis (E.Merck), air suling untuk injeksi, larutan NaCl fisiologis (IPHA), inulin (William & Hopkins), kertas Whatman 1 dan larutan natrium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat buatan PPTN-BATAN, Bandung.

Alat yang diperlukan : isotop kalibrator (Nuclear Associates), neraca analisis (August Sauter KG), alat penatah hewan (Metrohm-Herisau E), pencacah saluran tunggal (C.Sclumberger) dan seperangkat alat elektroforesa (Boujou).

TATA KERJA

Optimasi penandaan inulin dengan teknesium-99m

Penandaan sangat dipengaruhi oleh jumlah (kadar) timah (II) klorida sebagai reduktor, jumlah inulin, pH dan lamanya proses penandaan berlangsung. Dalam percobaan ini dipelajari pengaruh parameter-parameter tersebut terhadap hasil penandaan.

Pengaruh kadar timah (II) klorida terhadap penandaan

Dibuat bermacam-macam larutan timah(II) klorida sehingga larutan ini mengandung 25, 50, 100, 125, 150 dan 200 $\mu\text{g/ml}$. Larutan ini kemudian dicampurkan dengan 5-6 mCi/ml larutan natrium perteknetat- $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Inulin sebanyak 100 mg dilarutkan dalam natrium klorida 0,9% dengan sedikit pemanasan sampai terlarut sempurna.

Larutan inulin ini dicampurkan ke dalam larutan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat yang telah mengandung timah (II) tersebut dengan pengocokan selama 5 menit. Kemudian pH larutan diatur dengan penambahan natrium hidroksida 0,1 N atau asam klorida 0,1 N sampai mencapai 7,5. Selanjutnya larutan disimpan pada suhu kamar selama 30 menit, kemudian disaring dengan penyaring bakteri.

Hasil penandaan dapat ditentukan dengan cara elektroforesa kertas menggunakan kertas Whatman 1 ukuran 2x37 cm dan pelarut yang dipakai adalah dapar fosfat 0,05 M pH 9. Tegangan antara 2 katoda 450 mV dan lamanya elektroforesa 1 jam. Kertas elektrogram setelah dikeringkan, dipotong-potong tiap 1 cm dan dicacah.

Pengaruh kadar inulin terhadap hasil penandaan

Dari hasil percobaan yang pertama dapat diketahui berapa kadar timah(II) klorida yang optimal. Berdasarkan hal tersebut dilakukan penandaan seperti pada percobaan pertama dengan memvariasikan jumlah inulin yaitu 25, 50, 75, 100, 125, 150 dan 200 mg. Sedangkan pH tetap dipakai 7,5 dan kadar timah klorida yang dipakai adalah kadar yang optimum dari percobaan pertama.

Selanjutnya percobaan dilakukan sama seperti pada percobaan pertama, sehingga diketahui besarnya efisiensi penandaan.

Pengaruh pH terhadap hasil penandaan

Penandaan dilakukan pada pH 5,5 ; 6,5 ; 7,5 dan 8,5. Sedangkan kadar inulin dan kadar timah(II) klorida digunakan dari hasil percobaan sebelumnya, yaitu yang memberikan hasil yang terbaik. Cara melakukan percobaan sama seperti percobaan pertama dan kedua.

Evaluasi sediaan secara in vivo pada tikus putih (Wistar).

Sediaan yang digunakan adalah sediaan yang dibuat pada kondisi optimum seperti yang

diberikan oleh percobaan sebelumnya, yaitu dengan kadar inulin 125 mg, timah(II) klorida 75 µg dan pH penandaan 6,5.

Kemudian sediaan disuntikkan melalui vena ekor sebanyak 0,2-0,4 ml dengan aktivitas 2-3 mCi. Setelah itu tikus dibius dengan eter sampai pingsan dan dilakukan penyidikan dengan alat penata hewan.

Penentuan penimbunan sediaan dalam tubuh mencit putih.

Sediaan yang dibuat sama seperti percobaan sebelumnya. Setelah itu sediaan disuntikkan sebanyak 0,2-0,4 mCi/0,2-0,4 ml secara intra-vena kedalam tubuh mencit putih, melalui vena ekor. Pada 15, 30 dan 45 setelah penyuntikan mencit kemudian dibius dengan eter sampai mati dan dibedah, dan organ yang diperlukan diambil dan dicacah.

Besarnya penimbunan relatif per gram organ dapat dihitung.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penandaan ditentukan dengan cara elektroforesa kertas dimana ^{99m}Tc-inulin akan terpisah dari pengotornya, karena mereka bergerak dengan kecepatan yang berbeda. ^{99m}Tc-inulin mempunyai Rf= 0,19 sedangkan Rf ^{99m}Tc-tereduksi = 0, dan Rf ^{99m}TcO₄ = 0,46. Dari hasil elektrogram tersebut persentase hasil penandaan dapat dihitung dengan cara sebagai berikut :

$$\text{Hasil penandaan} = \frac{\text{cacahan } ^{99m}\text{Tc-Inulin}}{\text{cacahan } (^{99m}\text{Tc-Inulin} + ^{99m}\text{Tc-red} + ^{99m}\text{TcO}_4)} \times 100 \%$$

Tabel 1. Pengaruh kadar timah (II) klorida terhadap penandaan inulin (Kadar inulin = 100 mg; pH = 7,5)

No.	Kadar Sn(II)Cl (µg)	Hasil penandaan dalam persen
1	25	22,6 ± 5,4
2	50	47,0 ± 3,1
3	75	52,8 ± 4,7
4	100	52,3 ± 2,4
5	125	52,4 ± 4,2
6	150	42,5 ± 4,1
7	200	17,5 ± 3,6

Hasil diperoleh dari tiga kali pengulangan (n=3).

Percobaan mencari kadar timah(II) klorida yang optimal dalam penandaan, hasilnya terlihat pada Tabel 1.

Ternyata yang memberikan hasil penandaan yang terbaik adalah pada kadar SnCl₂ 75 µg sampai dengan 125 µg. Pada percobaan ini digunakan inulin sebanyak 100 mg dan pH pada 7,5. Perhitungan statistik memakai uji rentang Newman-Keuls membuktikan bahwa perlakuan nomor 3-5 berbeda nyata dari perlakuan nomor 2 dan 6.

Dari hasil di atas dilakukan percobaan selanjutnya mencari kadar inulin yang optimal. Timah(II) klorida yang digunakan 75 µg dan pH tetap 7,5. Pada Tabel 2 terlihat bahwa mulai dengan kadar inulin 125 mg memberikan hasil penandaan yang berbeda nyata dari pada sebelumnya (kadar inulin <100 mg).

Tabel 2. Pengaruh kadar inulin terhadap hasil penandaan (Kadar timah(II) klorida = 75 µg; pH = 7,5).

No.	Inulin (mg)	Hasil penandaan dalam persen (%)
1	25	14,6 ± 3,0
2	50	25,0 ± 3,7
3	75	34,3 ± 3,1
4	100	49,7 ± 1,8
5	125	61,9 ± 2,0
6	150	64,2 ± 1,3
7	200	64,6 ± 1,5

Hasil diperoleh dari empat kali pengulangan

Ini dibuktikan dengan uji statistik, ternyata harga F percobaan lebih besar dari F tabel pada derajat kepercayaan α=0,05. (F_{exp} 13,00 > F_{tabel} 7,67). Sedangkan dengan kenaikan kadar inulin sampai 200 mg kenaikan hasil penandaan tidak berbeda nyata (F_{exp} 1,35 < F_{tabel} 7,67) pada nilai α yang sama. Dari percobaan ini dapat disimpulkan walaupun jumlah inulin diperbesar lebih dari 125 mg tidak akan mempengaruhi hasil penandaan.

Hasil dari percobaan berikutnya yaitu mencari pengaruh pH terhadap penandaan diterakan pada Tabel 3 (halaman berikut). Penandaan terbaik diperoleh pada pH 6,5, di atas dan di bawah pH itu memberikan hasil yang lebih kecil. Hal ini menunjang pendapat pustaka [6]

Tabel 3. Pengaruh pH terhadap hasil penandaan. (Kadar timah(II)klorida = 75 µg; kadar inulin = 125 mg)

Nomor	pH	Hasil penandaan dalam persen (%)		
		^{99m} Tc-Inulin	^{99m} Tc-tereduksi	^{99m} TcO ₄
1	5,5	63,7 ± 1,9	18,5 ± 1,8	18,5 ± 1,9
2	6,5	84,8 ± 4,9	7,3 ± 2,0	7,1 ± 2,9
3	7,5	75,4 ± 1,4	12,1 ± 1,7	12,4 ± 2,1
4	8,5	56,3 ± 3,8	13,1 ± 2,7	30,7 ± 2,2

Hasil diperoleh dari empat kali pengulangan.

yang menyatakan bahwa larutan inulin paling stabil pada pH 4,5 - 7, sehingga hampir semua sediaan injeksi inulin dibuat pada pH 5-7 (USP) dan 5,5-6,5 (BP).

Walaupun Richards dan Steigman [3] menunjukkan bahwa afinitas dari senyawa-senyawa gula terhadap ^{99m}Tc sangat tinggi pada pH 10-12 dan lemah pada pH netral, tapi pada percobaan ini memberikan hasil yang agak bertentangan dengan pendapat tersebut. Hal ini diduga karena Sn²⁺ pada pH basa akan segera mengendap menjadi Sn(OH)₂ sehingga sifatnya sebagai reduktor berkurang, dan menyebabkan penghambatan dalam proses penandaan.

Penentuan hasil penandaan dengan cara elektroforesa kertas memberikan hasil yang baik, karena selain diketahui besarnya hasil penandaan juga sekaligus mengetahui kemurnian radiokimia dari senyawa tersebut. Hasil penandaan terbaik diperoleh sebesar 84,8 ± 4,9% de-

ngan pengotor berupa ^{99m}Tc-tereduksi 7,3 ± 2,0% dan ^{99m}Tc-perteknetat 7,1 ± 2,9% (Tabel 3).

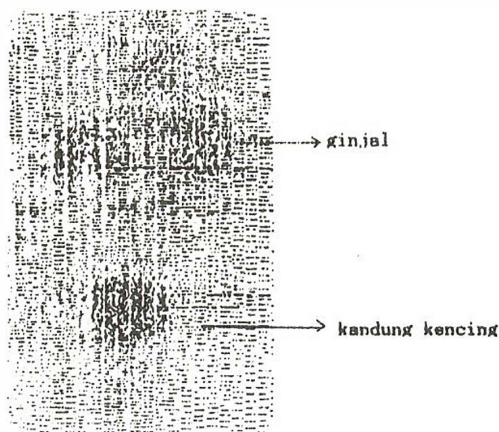
Hasil penyidikan sediaan ^{99m}Tc-inulin pada hewan percobaan tikus putih jenis Wistar dapat dilihat pada Gambar 1.

Setelah 10-30 menit penyuntikan secara intravena diperoleh gambaran ginjal dan kandung kencing yang sangat jelas.

Biodistribusi ^{99m}Tc-inulin dalam tubuh binatang mencit putih jenis Swiss setelah penyuntikan intravena menunjukkan bahwa hampir

Tabel 4. Biodistribusi sediaan ^{99m}Tc-Inulin dalam mencit putih

No.	Organ	Persentase relatif per gram organ		
		15 menit	30 menit	45 menit
1	Otot	0,0	0,0	0,0
2	Kulit	0,0	0,0	0,0
3	Tulang	0,0	0,0	0,0
4	Darah	0,4	0,1	0,1
5	Usus	0,4	0,8	0,0
6	Hati	0,2	0,1	0,0
7	Limpa	0,0	0,0	0,0
8	Ginjal	98,9	99,0	99,9
9	Jantung	0,0	0,0	0,0
10	Otak	0,0	0,0	0,0
11	Paru-paru	0,1	0,0	0,0
12	Tiroid	0,0	0,0	0,0



Gambar 1. Hasil penyidikan sediaan ^{99m}Tc-Inulin pada tikus putih (Wistar) 10-30 menit pasca injeksi. Kemurnian sediaan = 84,7 %, konsentrasi penyuntikan = 2,7 mCi.

semua (berkisar sekitar 99 %) masuk ke dalam ginjal baik pada waktu 15, 30 maupun setelah 45 menit. Pada organ-organ kritis lainnya seperti darah, usus, hati dan tiroid tidak menunjukkan adanya penimbunan aktivitas (Tabel 4).

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil percobaan dapat disimpulkan bahwa penandaan inulin dengan radionuklida teknesium-99m dapat dilakukan dengan menggunakan inulin sebanyak 125 mg, timah(II) klorida sebagai reduktor sebanyak 75 µg dan pH = 6,5. Walaupun hasil penandaan yang diperoleh hanya sekitar 85% tetapi ternyata pada penyidikan dan percobaan biodistribusi di da-

lam tubuh hewan percobaan tidak menunjukkan aktivitas latar belakang (back ground) yang dapat mengganggu penyidikan.

Disarankan agar sediaan ini dibuat dalam bentuk kit kering, kemudian dilakukan studi perbandingan dengan sediaan ^{99m}Tc-DTPA dalam menentukan uji laju filtrasi glomerulus (LFG).

DAFTAR PUSTAKA

1. BARBOUR, G.R., CRUMB, C.K. and BOYD, C.M. Comparison of Inulin, Iothalamate and ^{99m}Tc-DTPA for measurement of glomerular filtration rate, *J.Nucl.Med.* 16 (1976) 317-320.
2. SAHA, G.M. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, Springer Verlag, New York (1979) 117-139.
3. RUSSELL, C.D., BISCHOFF, P.G. and KONTZEN, F.N. et.al., "Measurement of glomerular filtration rate," *Single Injection Plasma Clearance Method without Urine Collection*, *J.Nucl.Med.* 26 (1985) 1243-1247.
4. WINCHELL, H.S., *Radiopharmaceuticals in evaluation of Kidneys*, *Proceeding 2 International Symposium on Radiopharmaceuticals*, Seattle, Washington (March 1979) 19-22.
5. ECKELMAN, W.E., S.M. LEVENSON, *Radiopharmaceuticals labelled with Technetium*, *International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, 28 (1977) 67-82.
6. MARTINDALE, W. *The extra pharmacopoeia*, The Pharmaceutical Press, XXVIII (1982) 520.

DISKUSI

Swasono R. Tamat :

Karena judul mengenai GFR, mohon dijelaskan berapa GFR normal dalam kaitan pengamatan *scanning* dengan tikus (satu gambar pada menit) dan tabel biodistribusi 15, 30 dan 45 menit.

Barangkali topik GFR kurang tepat.

Nanny Kartini H.:

GFR pada orang dewasa normal laki-laki = 125 - 130 ml/menit, wanita = 108 - 110 ml/menit.

Pengamatan *scanning* pada tikus dilakukan pada 15 menit setelah penyuntikan, dan pada kenyataannya bila melakukan uji LFG (GFR) dilakukan mulai saat penyuntikan sampai 17 - 20 menit setelah itu. Jadi menurut kami bahwa percobaan ini masih cukup relevan kalau di lihat dari waktu. Tapi walaupun demikian, masukan itu akan kami perhatikan untuk penelitian selanjutnya yang akan dilakukan pada volunter (manusia).

Sukiyati Dj. :

1. Dari penayangan senyawa ^{99m}Tc-inulin dapat digunakan untuk uji fungsi dan penatahan ginjal ?

2. Apakah ada perbedaan pada penggantian radionuklida ⁹⁹Tc pada ^{99m}Tc-inulin dengan ⁵¹Cr dalam kegunaannya untuk penatahan.

Nanny Kartini H. :

1. Ya, senyawa ^{99m}Tc-inulin dapat digunakan untuk uji fungsi ginjal, terutama untuk melihat laju filtrasi glomerulus. Jadi seandainya dokter merasa perlu untuk melajukan uji GFR (laju filtrasi glomerulus), maka diharapkan mereka dapat menggunakan senyawa ini sebagai radiofarmakanya.

2. Perbedaan penggunaan *in vivo* dari ^{99m}Tc dan ⁵¹Cr ini adalah perbedaan yang umum, yaitu ⁵¹Cr selalu memberikan resiko radiasi yang tinggi untuk penderita, karena selain memancarkan

γ juga sinar β . Selain itu juga ^{51}Cr -Inulin memberikan *back ground* yang tinggi. Tetapi percobaan yang benar-benar membedakan antara $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Inulin dengan ^{51}Cr -Inulin belum ada yang melakukan.

Gunandjar :

Pada penambahan SnCl_2 lebih dari 75 μg justru % penandaan turun. Pada hal mestinya proses reduksi Tc justru akan tetap terjaga jika SnCl_2 berlebih. Mohon dijelaskan mengapa justru % penandaan turun !

Nanny kartini H. :

Seperti telah diterangkan, bahwa SnCl_2 disini berfungsi selain sebagai reduktor untuk menurunkan tingkat valensi teknesium dari Tc(VII) ke tingkat yang lebih rendah (bentuk tereduksi), tetapi juga Sn ini akan ikut dalam pembentukan kompleks antara Tc dengan inulin membentuk senyawa Tc-Sn-Inulin. Jadi dari hasil tersebut, kami menduga bahwa setelah jumlah Sn ini cukup untuk mereduksi Tc dan turut membentuk kompleks, dia sebagai reduktor kuat akan merusak inulinnya sendiri, sehingga menyebabkan penurunan % penandaan.