

VALIDASI PROSES PEMBUATAN KIT ETAMBUTOL KEMASAN TUNGGAL UNTUK RADIOFARMAKA DETEKSI TUBERKULOSIS

Anna R¹, Witarti¹, Enny L¹, Mujinah¹, Suharmadi¹, Maula Eka S², Widyastuti W¹¹PTRR-BATAN²PSTNT-BATAN¹Kawasan Puspiptek Gd.11, Serpong Tangerang Selatan 15314²Jl. Taman Sari No. 71 Bandung 40132¹PTRR-BATAN²PSTNT-BATAN¹Puspiptek Area B.11, Serpong South Tangerang 15314²Taman Sari Street No.71 Bandung 40132*Untuk korespondensi: e-mail: aroselliana@yahoo.com

ABSTRAK

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dapat menyerang berbagai macam organ tubuh dan dapat mengakibatkan kematian. Dengan menggunakan aplikasi teknologi nuklir saat ini di Batan sedang dilakukan pengembangan radiofarmaka bertanda ^{99m}Tc untuk deteksi tuberkulosis extra paru dengan hasil yang lebih sensitive dan akurat terutama pada organ-organ ekstra paru (organ selain paru) yang tidak mudah dideteksi dengan metode konvensional yang ada saat ini. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh protokol pembuatan kit kering (*lyophilized*) dalam kemasan satu (1) vial sebagai pengembangan kit etambutol dua (2) vial yang sudah ada sebelumnya. Pengujian kualitas dilakukan terhadap beberapa parameter uji diantaranya sterilitas, apirogenitas dan kemurnian radiokimia. Dari hasil penelitian diperoleh protokol pembuatan kit etambutol satu kemasan, steril, bebas pirogen dengan kemurnian radiokimia rata-rata >90 %.

Kata kunci: Radiofarmaka, Kit etambutol, Deteksi, Tuberkulosis.**ABSTRACT**

Tuberculosis (TB) is an infection disease caused by mycobacterium tuberculosis and can attack various organs of the body, which can lead to death. By using nuclear technology Batan has been developing ethambutol radiopharmaceutical labeled with ^{99m}Tc for detection of extra lung tuberculosis with more sensitive and accurate results especially in extrapulmonary that are not easily detected by existing conventional methods. The aim of this study is to obtain a protocol of one-vial lyophilized kit preparation as a development of two-vial kits which was previously exist. The Quality Control was performed by using several parameters including sterility, pirogenity and radiochemical purity. From this study was obtained a protocol of preparation of one vial packed ethambutol kits which was sterile and pyrogen free with radiochemical purity of more than > 90 %.

Key word: Pharmaceuticals, Etambutol kit, Detection, Tuberculosis

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi masih merupakan masalah yang serius di negara berkembang terutama daerah tropis seperti di negara kita, diantaranya adalah penyakit TB (Tuberkulosis) yaitu penyakit infeksi yang disebabkan oleh kuman *Mycobacterium tuberculosis* yang dapat menyerang siapa saja dari anak-anak sampai orang dewasa baik itu dari kalangan bawah sampai kalangan atas dan merupakan penyakit menular yang dapat menyebabkan kematian. Negara kita merupakan negara ketiga setelah Cina dan India dalam jumlah kasus penyakit TB. Angka kematian di Indonesia akibat TB mencapai 140 ribu pertahun, dan angka ini diperoleh dari angka kematian akibat TB-paru, padahal *M.tuberculosis* dapat menyerang berbagai macam organ tubuh manusia, seperti tulang, kelenjar getah bening, kulit, persendian, otak, usus, kelenjar tiroid dan lain-lain biasa disebut TB extra paru.^(7,8,9)

Berbagai macam metode telah dilakukan sebagai upaya menegakkan diagnosis penyakit TB-ekstra-paru secara dini dan tepat pada penderita TB tersebut. Metode yang dapat dilakukan dengan cara konvensional dan lazim dilakukan adalah seperti uji apus sputum, pemeriksaan darah di laboratorium dan *Rontgen*, tetapi kurang spesifik untuk penyakit TB-ekstra paru. Walaupun pemeriksaan lebih mudah dan cepat dilakukan (memakan waktu \pm 1 minggu) dan relatif non-invasif, tetapi hasilnya juga tidak menjanjikan dan kurang memberikan hasil yang dapat meyakinkan para dokter dalam menegakkan deteksi penyakit TB ekstra-paru oleh karena itu

diperlukan teknik lain yaitu menggunakan metode kedokteran nuklir.^(6,7,8)

Kedokteran nuklir merupakan salah satu bagian dalam ilmu kedokteran yang berbasis teknik nuklir baik untuk tujuan diagnosis maupun terapi suatu penyakit. Perkembangan radiofarmaka semakin pesat seiring dengan kemajuan teknologi kedokteran nuklir dan telah pula memberikan kontribusi yang cukup besar dalam mengatasi masalah kesehatan. Berbagai sediaan radiofarmaka telah dihasilkan yang digunakan untuk tujuan diagnosa maupun terapi diantaranya adalah radiofarmaka ^{99m}Tc-Etambutol yaitu suatu kit-diagnostik yang berbasis obat anti tuberkulosis etambutol yang ditandai dengan perunut radioaktif teknesium-99m, yang merupakan hasil inovasi yang telah dikembangkan di BATAN. Radiofarmaka ini memberikan hasil yang cepat, akurat dan spesifik, Tc-99m-etambutol ter-uptake oleh *Mycobacterium tuberculosis* dan terakumulasi pada organ tubuh yang terinfeksi oleh TB.^(4,5,6,7)

Radiofarmaka tersebut berupa sediaan steril kit-kering etambutol dan setelah ditandai dengan radionuklida ^{99m}Tc yang dilaksanakan di kedokteran nuklir kemudian disuntikkan ke tubuh pasien secara *intra vena*, dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan infeksi yang disebabkan oleh *M.tuberculosis* yang letaknya jauh di dalam tubuh (*deep seated infections*). Karena metode ini didasarkan pada reaksi antara obat dengan reseptor atau bakteri yang berada di dalam tubuh, maka deteksi TB akan memberikan hasil yang lebih akurat, spesifik dan cepat apabila

dibandingkan dengan metode diagnosis lain yang konvensional dan ini merupakan keunggulan dari metode diagnosis penyakit Tuberkulosis.^(3,4,5,6,7)

Radiofarmaka kit etambutol yang dibuat sekarang ini berupa kit kering (*lyophilized*) dalam kemasan satu vial yang merupakan hasil inovasi dari kegiatan penelitian sebelumnya yaitu kit etambutol 2 kemasan. Kelebihannya adalah lebih praktis, efisien dan ekonomis baik itu dalam proses pembuatan kit etambutol maupun pemakaiannya di rumah sakit. Untuk memenuhi pengguna di rumah sakit maka dilakukan proses pembuatan kit kering Etambutol satu kemasan menggunakan teknik aseptik untuk memperoleh produk steril dan bebas pirogen yang dilakukan di ruang steril yang tersertifikasi CPOB (Cara Pembuatan Obat yang Baik) yang dimiliki oleh BATAN. Kit Etambutol merupakan sediaan obat suntik harus memenuhi persyaratan sebagai sediaan radiofarmasi yang meliputi sterilitas, apirogenitas dan kemurnian radiokimia.^(1,2,3,4)

Rangkaian pengujian kualitas kit Etambutol telah dilakukan dan hasilnya memenuhi persyaratan ketetapan QC sebagai sediaan radiofarmaka sehingga produk kit Etambutol ini dapat digunakan di rumah sakit. Untuk mengetahui kestabilan kit Etambutol satu kemasan perlu dilakukan pengujian stabilitas radiofarmaka ^{99m}Tc -Etambutol dan sedang dalam proses penelitian. Harapan dari kegiatan penelitian ini adalah agar dapat dimanfaatkan oleh sebagian besar masyarakat Indonesia dan dikomersialkan oleh pihak industri farmasi karena belum ada dipasaran.

METODE PENELITIAN

1. BAHAN DAN PERALATAN

Bahan yang digunakan adalah natrium-pirofosfat (E.Merck), stannous klorida dihidrat (Aldrich), etambutol-HCl (Lupin), manitol (E.Merck), air steril untuk injeksi (IPHA) sebagai pelarut dan gas nitrogen untuk purging terhadap oksigen serta larutan perteknetat dari generator $^{99m}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ untuk penandaan.

Alat yang digunakan adalah peralatan gelas standar, syringe abocath berbagai ukuran, pipet eppendorf, timbangan (Metler Toledo), penyaring bakteri (Millipore), *freeze dryer* (LABCONCO), oven (Lab.Companion Model: OF-450), otoklaf (RAYPA), peralatan kromatografi dan *gamma counter* (Gamma TEC II The Nucleus Model 600B) dan gamma counter (Capract).

2. TATA KERJA

2.1. Preparasi

2.1.1 Penyiapan Fasilitas Proses

Kondisi *Clean room* yang sudah memenuhi persyaratan terhadap temperatur, kelembaban dan perbedaan tekanan akan digunakan sebagai ruangan proses dibersihkan terlebih dahulu kemudian didisinfeksi menggunakan larutan savlon steril dan disanitasi menggunakan larutan alkohol 70% steril kemudian lampu *Ultra Violet* (UV) dinyalakan selama ± 24 jam. Setelah itu dilakukan monitoring udara lingkungan *clean room*, sterilitas *clean room* dinyatakan dari hasil monitoring udara yaitu pemeriksaan terhadap mikroorganisme menggunakan *bioairsampler* dan partikel menggunakan *particle counter*. Setelah

ruang proses dinyatakan steril oleh bidang QC, maka *clean room* dapat digunakan.

2.1.2 Penyiapan Peralatan Steril

Peralatan gelas dan kemasan yang akan dipakai untuk proses pembuatan radiofarmaka dibersihkan terlebih dahulu kemudian disterilkan menggunakan otoklaf, vial kemasan disterilkan dan di bebas pirogenkan menggunakan oven dengan pemanasan 250 °C selama 2 jam.

2.2 Pembuatan kit Etambutol

Proses pembuatan kit kering Etambutol dilakukan secara aseptis di ruang steril yang tersertifikasi CPOB. Setiap kit etambutol mengandung campuran 3,5 mg etambutol, 5 mg manitol, 17,5 mg Na-pyrophosfat dan 1mg SnCl₂·2H₂O. Prosedur untuk pembuatan 50 vial kit etambutol yaitu: pertama melarutkan 175 mg Etambutol dengan 7,5 ml air steril p.i yang sudah dijenuhkan dengan N₂ dalam gelas piala 25 ml, ditambahkan kedalamnya 250 mg D-manitol, diaduk sampai larut dan homogen, kemudian aliri dengan gas N₂ selama ± 1 jam. Kedua, melarutkan 875 mg Na-pyrophosfat dengan 12,5 ml air steril p.i yang sudah dijenuhkan dalam vial 25 ml kemudian sambil dialiri gas nitrogen dituang kedalam gelas piala 30 ml berisikan 100 mg SnCl₂·2H₂O, diaduk sampai homogen. Ketiga, mencampurkan larutan etambutol dengan larutan SnCl₂·2H₂O dan diukur pH larutan diatur menjadi 8-9. Volume di tetapkan sampai 25 ml dengan menambahkan air steril p.i setelah itu larutan bulk di jenuhkan dengan gas N₂ selama ± 30 menit. Larutan bulk *difilling*

kedalam vial masing-masing 0,5 ml melalui filter bakteri dan di tutup dg posisi septa ½ terbuka. Kemudian di liofilisasi dengan teknik beku-kering menggunakan *freeze dryer*, proses liofilisasi dilakukan secara aseptis pada kondisi vakum dengan sistim beku- kering selama ± 2 x 24 jam, dengan pengaturan pada tahap pembekuan suhu - 30 °C selama ± 42 jam, pengeringan suhu 0 °C selama ± 3 jam dan suhu 15 °C selama ± 3,5 jam.

2.3. Pengujian Kualitas Radiofarmaka

2.3.1. Penentuan Kemurnian Radiokimia

Untuk uji kemurnian radiokimia harus dilakukan penandaan kit etambutol dengan larutan teknesium perteknetat dari Generator ^{99m}Mo/^{99m}Tc. Proses penandaan ^{99m}Tc-etambutol dilakukan dengan mencampurkan 1-2 ml larutan ^{99m}Tc aktivitas 10 mCi kedalam sebuah kit etambutol kemudian di kocok dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. Untuk mengetahui tingkat kemurnian ^{99m}Tc-etambutol di analisa menggunakan metode KLT (kromatografi lapis tipis) dan kromatografi kertas dengan dua sistim pelarut, yaitu kromatografi kertas dengan fasa diam Whatman-31 ET dengan eluen aseton nitril 50 % dan KLT menggunakan TLC silika dengan fasa gerak acetone. Whatman-31ET dalam acetone nitril 50 % berfungsi untuk memisahkan ^{99m}TcO₂ (pada Rf 0) dari campuran ^{99m}Tc-Etambutol dan ^{99m}TcO₄ pada Rf 0,8-1,0) sedangkan TLC silika dalam acetone berfungsi untuk memisahkan ^{99m}TcO₄ (Rf 0,8-1,0) dari campuran ^{99m}Tc-Etambutol dan ^{99m}TcO₄ (pada Rf 0,0). Setiap pengujian dilakukan

duplo dan sebagai kontrol dilakukan pengujian terhadap ^{99m}Tc . Elusi dilakukan hingga eluen / larutan pembawa naik sampai kurang lebih 10 cm dari permukaan pelarut, kemudian dikeluarkan dan dikeringkan. Masing-masing kromatogram tersebut diukur dengan *gamma counter* bisa juga dengan *radiochromatography scanner*. Dari kromatogram yang menggunakan acetone nitril diperoleh $^{99m}\text{TcO}_2$ dan dari kromatogram yang menggunakan acetone diperoleh $^{99m}\text{TcO}_4$ maka prosentase kompleks ^{99m}Tc -etambutol dapat dihitung. Hasil % kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -etambutol = $100\% - (\% ^{99m}\text{TcO}_2 + \% ^{99m}\text{TcO}_4)$

2.3.2. Pengujian fisik kejernihan dan pH larutan.

Pengujian fisik berupa pengamatan langsung terhadap larutan sediaan kit etambutol dari kemungkinan adanya partikel. pH larutan ditentukan dengan menggunakan kertas pH universal dan persyaratan pH larutan kit etambutol 8 – 9.

2.3.3. Uji Sterilitas.

Penentuan sterilitas kit Etambutol dilakukan menggunakan dua media cair yaitu FTG (*Fluid-Thio-Glycolate*) untuk mengetahui pertumbuhan bakteri dan TSB (*Trypto-Soy-Broth*) untuk mengetahui pertumbuhan jamur, sesuai dengan metode inokulasi langsung. Hasil sterilitas kit dinyatakan dengan tidak adanya kekeruhan yang timbul setelah 14 hari penyimpanan dalam inkubator pada suhu 30-35 °C (FTG) dan suhu 20-25 °C (TSB).

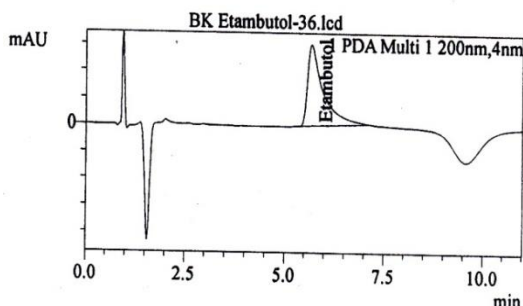
2.3.4. Uji Pirogenitas

Uji pirogenitas dilakukan menggunakan 3 ekor hewan kelinci. Sejumlah 1 ml larutan etambutol disuntikkan pada masing-masing kelinci kemudian diamati kenaikan suhu badan kelinci setelah ± 1 jam penyuntikan. Apabila pada setiap ekor kelinci kenaikan suhu badan $< 0,6$ °C dan total kenaikan suhu dari 3 kelinci $< 1,4$ °C maka dinyatakan kit etambutol bebas pirogen

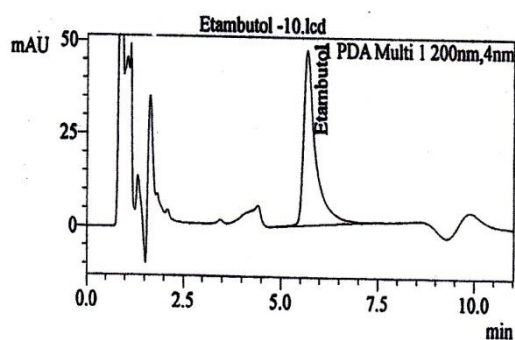
HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil pemeriksaan QC diperoleh bahwa ruangan proses/*clean room* dinyatakan steril dan memenuhi persyaratan CPOB, yaitu berdasarkan data hasil monitoring udara *clean room* (pengukuran jumlah partikel dan mikroorganisme) dan kondisi ruang proses (Suhu: 19 °C; kelembaban: 50% , beda tekanan antar ruang: 15 Pa) sehingga ruangan proses dapat digunakan untuk proses pembuatan radiofarmaka. Proses liofilisasi kit etambutol menggunakan teknik beku –kering (*freeze drying*) selama $\pm 2 \times 24$ jam dihasilkan kit kering steril etambutol bentuk powder warna putih agak kekuningan berbeda dengan kit etambutol yang dua kemasan yaitu bentuk powder warna putih. Walaupun secara visual berbeda tetapi keduanya mempunyai kualitas radiofarmaka yang sama. Hasil uji identifikasi yang diperoleh dari BPOM menyatakan bahwa kit etambutol yang satu kemasan, dua kemasan dan bahan baku etambutol-HCl (sebagai standard) sama-sama positif mengandung etambutol-HCl pada posisi *Retention Time* (RT) yang sama yaitu 5,6. (lihat gambar. 1,2,3 dan 4). Hal ini

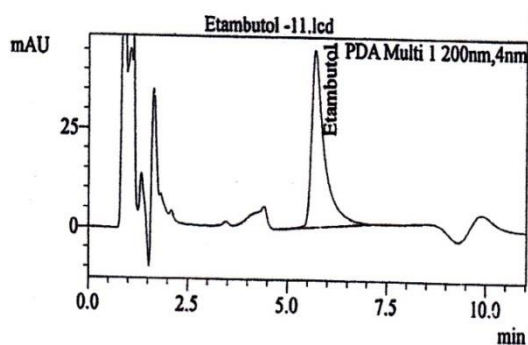
menunjukkan bahwa walaupun ada perbedaan warna tetapi kualitas kit etambutol satu kemasan memenuhi syarat sebagai sediaan kit etambutol.



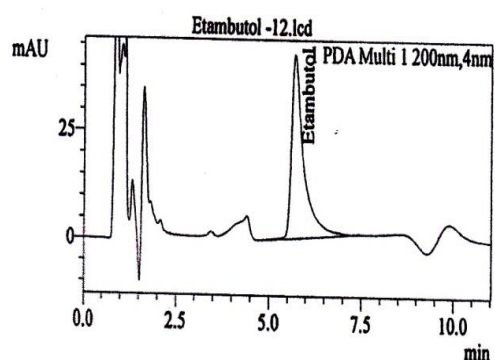
Gambar 1. Kromatogram bahan baku etambutol



Gambar 2. Kromatogram bahan baku + kit etambutol

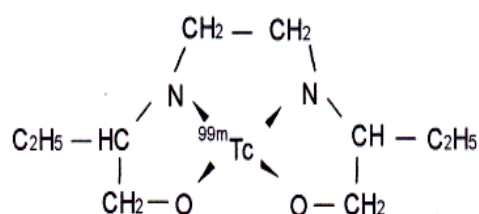


Gambar 3. Kromatogram kit etambutol 1 kemasan



Gambar 4. Kromatogram kit etambutol 2 kemasan

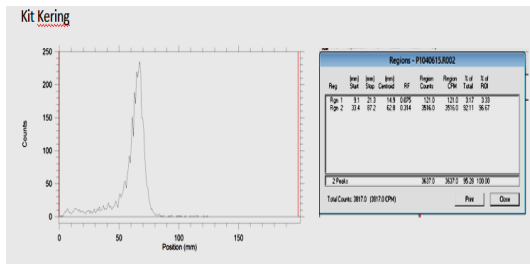
Proses penandaan pada kit etambutol satu kemasan dengan larutan ^{99m}Tc -perteknetat sangat praktis karena dapat langsung dicampurkan berbeda sekali dengan kit etambutol dua kemasan karena sebelum dicampurkan masing-masing kemasan kit tersebut harus dilarutkan terlebih dahulu dengan air steril p.i kemudian ditambahkan larutan ^{99m}Tc . Larutan ^{99m}Tc yang ditambahkan ke dalam kit etambutol dan diinkubasi pada suhu kamar selama ± 10 menit pada pH larutan 8 – 9 menghasilkan senyawa kompleks ^{99m}Tc -etambutol dengan struktur kimia sebagaimana ditunjukkan pada gambar 5.



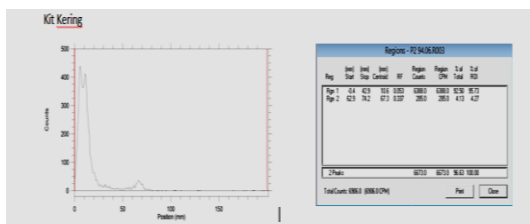
Gambar 5. Struktur kimia kompleks ^{99m}Tc – etambutol

Hasil analisa kemurnian radiokimia kit etambutol satu kemasan maupun dua kemasan diperoleh % kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -etambutol yang sama baiknya yaitu rata-rata $> 90\%$.

Pada kromatogram Whatman dalam acetonitril terdapat dua puncak yaitu puncak $^{99m}\text{TcO}_2$ pada (R_f 0,0) dan puncak campuran ($^{99m}\text{TcO}_4 + ^{99m}\text{Tc-etambutol}$) pada (R_f 8-10) dan diperoleh $^{99m}\text{TcO}_2$ sebesar 3,33 % (Gambar 6).



Gambar 6. Kromatogram ^{99m}Tc - etambutol (dalam acetonitril 50%)



Gambar 7. Kromatogram ^{99m}Tc –etambutol (dalam acetone)

Pada gambar 7. kromatogram silika dalam aseton juga terdapat dua puncak, yaitu puncak campuran ($^{99m}\text{TcO}_2 + ^{99m}\text{Tc-etambutol}$) pada (R_f 0,0) dan puncak TcO_4 pada (R_f 8-10) dan diperoleh TcO_4 sebesar

4,27 %. Dengan demikian % kemurnian radiokimia $^{99m}\text{Tc-etambutol}$ dapat dihitung dimana diperoleh sebesar 92,40 % yang memenuhi persyaratan radiofarmaka pada umumnya yaitu lebih besar dari 90 %.

Hasil pengujian visualitas pada larutan kit etambutol menunjukkan larutan jernih dan tidak ada partikel demikian juga hasil pemeriksaan pH larutan menggunakan indikator universal kertas pH diperoleh pH 8,5. Hasil pengujian sterilitas tidak menunjukkan adanya pertumbuhan mikroba (bakteri maupun jamur) dalam kit etambutol selama 14 hari pengamatan yang disimpan pada inkubator suhu 20-25 °C dan suhu 30-35 °C (kondisi larutan tetap jernih), demikian juga hasil pengujian pirogenitas setelah 1 jam penyuntikan pada tiga (3) ekor hewan kelinci menunjukkan bahwa kenaikan suhu per jam badan tiap kelinci < 0,6 °C dan total kenaikan suhu badan dari 3 kelinci 0,11 °C (<1,4 °C). Dari hasil uji sterilitas dan pirogenitas menunjukkan bahwa kit etambutol memenuhi syarat steril dan bebas pirogen (Tabel.1) sehingga kit tersebut dapat digunakan dirumah sakit.

Table 1. Data Pengujian Pirogen Pada Hewan Kelinci

Kelinci (No.)	Suhu Badan Kelinci (°C)				Rata-Rata	Rerata Kenaikan Suhu/jam
	Kontrol	ke 1	ke 2	ke 3		
1	39,27	39,30	39,30	39,30	39,30	0,03
2	39,03	39,10	39,00	39,10	39,07	0,04
3	38,93	38,90	39,00	39,00	38,97	0,04
Total Kenaikan Suhu 3 ekor kelinci						0,11

KESIMPULAN

Diperoleh produk kit kering etambutol satu kemasan bentuk liofilis warna putih agak kekuningan memenuhi syarat kualitas sebagai sediaan radiofarmaka antara lain steril, bebas pirogen, bebas partikel dengan hasil kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -etambutol rata-rata diatas 90 %. Dengan demikian kit kering etambutol satu kemasan dapat digunakan di rumah sakit dan kegiatan penelitian ini perlu dilanjutkan untuk mengetahui kestabilan radiofarmaka kit etambutol.

DAFTAR RUJUKAN

- [1] KEMENTERIAN KESEHATAN RI, *Farmakope Indonesia* Edisi V, Jakarta: 2014.
- [2] BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN RI, *Pedoman Cara Pembuatan Obat Yang Baik* , Edisi Jakarta 2012.
- [3] Rizky Juwita Sugiharti, Yana Sumpena, Maula Eka dan Nani Kartini, *Evaluasi Biologis Radiofarmaka ^{99m}Tc -Etambutol untuk Deteksi Dini Infeksi Tuberkulosis Pada Hewan Percobaan*, Majalah Farmasi Indonesia, 20(2)- 2009, Hal 55-8.
- [4] Kartini, N,dkk, *Kit-Diagnostik Berbasis Teknik Nuklir untuk Penatalaksanaan Penyakit Tuberkulosis (TBC)*, Majalah Kedokteran Indonesia, Vol. 58, No.10, Oktober 2008.
- [5] Rizky Juwita Sugiharti dan Nanny Kartini, *Uji Toksisitas Radiofarmaka ^{99m}Tc -Etambutol Pada Mencit (*Mus musculus*)*, Prosiding Semnas Saind dan Tekonologi PTNBR-BATAN Bandung 7-18 Juli 2007, Hal 334-339).
- [6] Kartini, N. O, Kustiwa, Susilawaty,E. *Pengembangan senyawa bertanda ^{99m}Tc - Etambutol untuk diagnosis tuberkulosis ; Karakterisasi Fisiko-Kimia dan Mikrobiologis.*, Jurnal Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia.VIII(1), (2007, Februari), Hal. 17-28.
- [7] Kartini, N.O., Kustiwa, Isabela,E, *Pengembangan senyawa bertanda ^{99m}Tc -Etambutol untuk diagnosis tuberkulosis ; 1. Penandaan etambutol dengan radionuklida teknesium-99m*, Prosiding Seminar Sains dan Teknologi Nuklir, Puslitbang Teknik Nuklir, BATAN, Bandung (2005), Hal. 137-145.
- [8] Verma, J., A.K. Singh, A. Bhatnagar, S. Sen, M.Bos. *Radiolabeling of ethambutol with technetium-99m and its evaluation for detection of Tuberculosis.* *World Journal of Nuclear Medicine.*4(1), (2005, January), 35-46.
- [9] Puri, MM, Douglas, P, Aroka, V.K, A *Case of tuberculosis of the thyroid gland*, *Med*, Youmal Malaysia 2003