

UJI TOKSISITAS RADIOFARMAKA ^{99m}Tc - ETAMBUTOL PADA MENCIT (*Mus musculus*)

Rizky Juwita Sugiharti dan Nanny Kartini

Pusat Teknologi Nuklir Bahan dan Radiometri, BATAN, Jl Tamansari 71, Bandung, 40132

ABSTRAK

UJI TOKSISITAS RADIOFARMAKA ^{99m}Tc -ETAMBUTOL PADA MENCIT (*Mus musculus*). Radiofarmaka ^{99m}Tc -Etambutol adalah sediaan berbentuk senyawa kompleks antara etambutol dengan radionuklida teknesium-99m dan digunakan sebagai penyidik infeksi tuberculosis. Telah dilakukan uji toksisitas radiofarmaka ^{99m}Tc -Etambutol dengan menggunakan hewan percobaan mencit putih jantan. Uji ini bertujuan untuk mengetahui efek samping radiofarmaka ^{99m}Tc -Etambutol tersebut dengan mengamati kondisi hewan percobaan yang diobservasi selama 2-4 minggu. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa radiofarmaka ^{99m}Tc -Etambutol sebanyak $\pm 17,3 \mu\text{Ci}/0,5 \text{ mL}$ yang disuntikkan secara intravena pada mencit tidak menimbulkan abnormalitas. Demikian pula, setelah diamati selama 2 sampai 4 minggu mencit memperlihatkan keadaan yang normal. Dosis ini setara dengan dosis tunggal yang direncanakan akan diberikan pada manusia normal sebesar $10 \text{ mCi}/1,5 \text{ mL}$. Dari pengujian toksisitas akut dengan cara peningkatan dosis pada beberapa kelompok hewan percobaan didapatkan bahwa pada dosis $2 \text{ mCi}/0,5 \text{ mL}$ radiofarmaka ^{99m}Tc -Etambutol menimbulkan kematian pada mencit, dosis ini setara dengan 115,6 kali pada manusia normal.

Kata kunci: tuberculosis, ^{99m}Tc -Etambutol, toksisitas

ABSTRACT

TOXICITY TEST OF RADIOPHARMACEUTICAL ^{99m}Tc -ETHAMBUTOL IN MICE (*Mus musculus*). ^{99m}Tc -Ethambutol radiopharmaceutical is complexes between ethambutol and technetium-99m radionuclide and used for tuberculosis infection detection. Toxicity test of radiopharmaceutical ^{99m}Tc -Ethambutol has been conducted by using white male mice. The aim of this study was to comprehend the adverse effect of radiopharmaceutical ^{99m}Tc -Etambutol on mice during 2-4 weeks after being intravenously injected. The results of animal study indicated that the injection by radiopharmaceutical ^{99m}Tc -Etambutol at a dose of $\pm 17,3 \mu\text{Ci}/0,5 \text{ mL}$ gave no abnormalities symptoms. Moreover, after 2-4 weeks observation, the condition of mice still shown normally. This dose was equal with single dose planned to human i.e. about $10 \text{ mCi}/1,5 \text{ mL}$. The acute toxicity test was conducted by injecting increasing doses of radiopharmaceutical into several groups of mice. It was found that a dose of $2 \text{ mCi}/0,5 \text{ mL}$ caused death to mice. This dose was equivalent to $\pm 115,6$ times to normal human.

Key words: tuberculosis, ^{99m}Tc -Ethambutol, toxicity

1. PENDAHULUAN

Teknik deteksi infeksi tuberculosis (TB) menggunakan teknik nuklir merupakan sebuah kebutuhan, karena teknik ini dapat mendeteksi infeksi TB pada tahap paling awal, mulai dari munculnya penyakit didasarkan pada

perubahan fisiologi organ di tempat terjadinya infeksi tuberculosis [1-4].

Pembuatan radiofarmaka ^{99m}Tc -Etambutol di PTNBR telah dimulai dari tahun 2004. Etambutol merupakan suatu turunan etilendiamin yaitu N,N'-diisopropil etilendiamin yang berkhasiat spesifik

membunuh *Mycobacteria tuberculosis*. Obat ini berinteraksi spesifik dengan asam mikolat dinding dari bakteri TB dan telah banyak digunakan untuk mengobati penderita TB bersama-sama dengan obat utama TB yaitu Isoniazid dan Rifampisin [5,6].

Toksikologi adalah ilmu yang mempelajari efek samping dan efek toksik suatu bahan kimia terhadap mahluk hidup, merupakan bagian dari tahapan penelitian dan pengembangan radiofarmaka baru. Penentuan keamanan pada manusia, yang mencakup jenis senyawa yang dibuat, rute pemberian, dan dosis yang akan diberikan adalah sangat penting sebelum radiofarmaka baru tersebut disetujui untuk penggunaannya pada manusia. Seperti halnya obat-obat lain, efek toksik dan dosis aman harus ditetapkan terhadap radiofarmaka baru. Pengamatan mencakup efek toksik selama pemberian radiofarmaka termasuk perubahan pada histologi atau fungsi fisiologi dari beberapa organ dalam tubuh dan kematian. Uji toksisitas akut menggambarkan efek yang diberikan dalam dosis tertentu yang menyebabkan 50% kematian pada hewan percobaan. Toksisitas akut atau yang dikenal dengan satuan LD₅₀ dilakukan dengan menginjeksikan suatu sediaan dalam dosis meningkat pada beberapa kelompok hewan percobaan seperti mencit, tikus, kelinci dan anjing yang diamati selama 2-4 minggu [7-10].

Toksisitas radiofarmaka ^{99m}Tc-etambutol sebagai sediaan radiofarmaka baru harus diuji untuk mengetahui keamanan dan efek sampingnya pada manusia [4]. Uji toksisitas dilakukan dengan mengamati jumlah kematian setelah 24 jam pemberian bahan uji, serta mengamati gelagat atau perilaku hewan uji yang diobservasi selama 2-4 minggu. Uji toksisitas dilakukan menggunakan dosis dan rute pemberian seperti yang akan diberikan pada manusia. Untuk mengetahui toksisitas akut (LD₅₀) dilakukan dengan cara meningkatkan dosis radiofarmaka ^{99m}Tc-etambutol sampai ditemukan hewan uji mati.

2. TATA KERJA

2.1. Bahan dan Peralatan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah kit kering radiofarmaka Etambutol buatan PTNBR [4], larutan radionuklida Tc-99m perteknetat (PT. BATAN Teknologi) Aseton, Asetonitril (Merck), kertas ITLC-SG dan Whatman-1 untuk kromatografi. Hewan yang digunakan dalam penelitian ini

adalah mencit (20-30g). *Single Channel Analyzer* (Ortec) dan *Dose calibrator* (Victoreen) digunakan sebagai pencacah radioaktivitas.

2.2. Penyiapan Radiofarmaka ^{99m}Tc-Etambutol.

Akuabides steril diambil sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam vial yang berisi kit kering SnCl₂.H₂O 0.7 mg dan Na-pirofosfat 35 mg, dikocok perlahan sampai larut baik dan homogen. Sebanyak 0,5 mL larutan diambil lalu dimasukkan ke dalam vial yang berisi kit kering Etambutol 3.5 mg dan manitol 5 mg secara aseptis, dikocok sampai tercampur sempurna kemudian diletakkan dalam wadah Pb yang sesuai. Sebanyak 1 mL larutan radioisotop Na-^{99m}TcO₄ diambil dari generator ⁹⁹Mo-^{99m}Tc, kemudian dimasukkan ke dalam vial yang telah ada di *container* Pb. Kocok sempurna dan biarkan pada temperatur kamar selama 5-10 menit sambil sekali-kali dikocok, sehingga dihasilkan radiofarmaka ^{99m}Tc-etambutol.

2.3. Penentuan Kemurnian Radiokimia ^{99m}Tc-Etambutol

Kemurnian radiokimia dari sediaan radiofarmaka ^{99m}Tc-Etambutol ditentukan dengan kromatografi kertas menggunakan kertas Whatman 31ET /Asetonitril 50%, untuk memisahkan pengotor radiokimia ^{99m}Tc-tereduksi bebas, dan ITLC-SG/Aseton untuk memisahkan pengotor ^{99m}Tc-perteknetat bebas. Setiap potongan ITLC-SG dan kertas Whatman 31ET dicacah menggunakan alat pencacah saluran tunggal.

Perhitungan :
Kertas kromatografi Whatman 31ET dengan larutan pengelusi asetonitril 50%

$$\begin{aligned} Rf^{99m}TcO_2 &= 0,00 \\ Rf^{99m}TcO_4^- + ^{99m}Tc-Etambutol &= 0,8 - 1,0 \end{aligned}$$

$$\% ^{99m}TcO_2 = \frac{\text{cacahan pada } Rf^{99m}TcO_2 - \text{cacahan latar belakang}}{\text{total cacahan} - \text{total cacahan latar belakang}} \times 100\%$$

Kertas kromatografi ITLC SG dengan larutan pengelusi aseton p.a

$$\begin{aligned} Rf^{99m}TcO_2 + ^{99m}Tc-Etambutol &= 0,00 \\ Rf^{99m}TcO_4^- &= 0,8 - 1,0 \end{aligned}$$

$$\% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_4 = \frac{\text{cacahan pada Rf } ^{99m}\text{TcO}_4 - \text{cacahan latar belakang}}{\text{total cacahan} - \text{total cacahan latar belakang}} \times 100\%$$

$$\% \text{ } ^{99m}\text{Tc-Etambutol} = 100\% - (\% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_2 - \% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_4)$$

2.4. Uji Toksisitas

Uji Toksisitas terhadap sediaan ^{99m}Tc -Etambutol dilakukan menggunakan prosedur yang tercantum dalam Farmakope Indonesia yaitu dengan menyuntikkan secara intravena kepada 5 ekor mencit masing-masing 0,5 mL sediaan uji. Sediaan uji dinyatakan memenuhi syarat, kecuali dinyatakan lain, jika tidak seekor mencit pun mati dalam waktu 24 jam. Hewan Uji yang tidak memperlihatkan gejala abnormalitas kemudian diobservasi selama 2-4 minggu [11,12].

Uji toksisitas akut dilakukan dengan menyuntikkan secara intravena kepada beberapa kelompok mencit (n=5) masing-masing 0,5 ml sediaan uji, dimulai dengan dosis 67,5 μCi kemudian ditingkatkan dua kali lipat secara berkesinambungan sampai didapati hewan percobaan menunjukkan perilaku abnormal [8,9].

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan data yang telah dilaporkan sebelumnya [5], radiofarmaka ^{99m}Tc -Etambutol hasil penandaan memberikan kemurnian radiokimia 83-86% dan dapat digunakan untuk pengujian berikutnya.

Tabel 1. Hasil uji kromatografi radiofarmaka ^{99m}Tc etambutol

No	Whatman 31 ET /Asetonitril 50% ($^{99m}\text{TcO}_2$)	ITLCSG/ Aseton ($^{99m}\text{TcO}_4$)	Kemurnian ^{99m}Tc Etambutol
1	8,09 %	8,44 %	83,47%
2	6,54 %	6,85%	86,61%
3	11,52 %	4,73%	83,75%
Rata-rata + SD			84,61 % \pm 1,73

Dari suatu radiofarmaka, untuk memperoleh efek farmakologis yang setara pada setiap spesies hewan percobaan diperlukan data mengenai penggunaan penerapan dosis secara kuantitatif. Hal demikian sangat diperlukan bila obat tersebut akan dipakai pada manusia, dan pendekatan terbaik adalah dengan menggunakan

perhitungan perbandingan luas permukaan tubuh. Namun demikian yang paling praktis dan banyak digunakan adalah cara perhitungan berdasar bobot badan [13].

Tabel 2. Perbandingan luas permukaan tubuh hewan percobaan untuk konversi dosis

	Mencit (20 g)	Tikus (200g)	Kelinci (1.5 g)	Manusia (70 kg)
Mencit (20 g)	1,0	7,0	27,8	387,9
Tikus (200 g)	0,14	1,0	3,3	56,0
Kelinci (1.5 kg)	0,04	0,25	1,0	14,2
Manusia (70 kg)	0,0026	0,018	0,07	1,0

Faktor konversi manusia ke mencit adalah sebesar 0,0026. Dosis yang direncanakan akan diberikan pada manusia normal (70 kg BB) adalah sebesar 10 mCi/1,5 mL

Perhitungan konversi

$$\frac{10\text{mCi}}{1,5\text{mL}} \times 0,0026 = 0,0173\text{mCi} \sim 17,3\mu\text{Ci}$$

Tabel 3. Uji Toksisitas dalam dosis $\pm 17,3 \mu\text{Ci}$

No Hewan	24 jam	2 minggu	4 minggu
1	Hewan normal	Hewan hidup	Hewan hidup
2	Hewan normal	Hewan hidup	Hewan hidup
3	Hewan normal	Hewan hidup	Hewan hidup
4	Hewan normal	Hewan hidup	Hewan hidup
5	Hewan normal	Hewan hidup	Hewan hidup

Uji Toksisitas dengan dosis $\pm 17,3 \mu\text{Ci}$ pada mencit setara dengan dosis tunggal untuk manusia (10 mCi/1,5 mL) memberikan hasil yang membuktikan bahwa radiofarmaka ^{99m}Tc -Etambutol tersebut adalah aman.

Uji toksisitas akut (LD_{50}) dilakukan dengan menyuntikkan radiofarmaka ^{99m}Tc -Etambutol pada beberapa kelompok mencit dalam dosis yang ditingkatkan dari 67,5 μCi sampai dengan 2 mCi, yaitu 3,6 kali sampai 115,6 kali untuk sekali pemakaian (dosis tunggal).

Tabel 4. Hasil Uji Toksisitas Akut

Dosis/0,5 mL /ekor mencit	Peningkatan dosis	No Hewan	Sesaat setelah diinjeksi	Setelah 24 jam
62,5 μ Ci	3,6 kali	1	Hewan normal	Hewan hidup
		2	Hewan normal	Hewan hidup
		3	Hewan normal	Hewan hidup
		4	Hewan normal	Hewan hidup
		5	Hewan normal	Hewan hidup
125 μ Ci	7,2 kali	1	Hewan normal	Hewan hidup
		2	Hewan normal	Hewan hidup
		3	Hewan normal	Hewan hidup
		4	Hewan normal	Hewan hidup
		5	Hewan normal	Hewan hidup
250 μ Ci	14,4 kali	1	Hewan normal	Hewan hidup
		2	Hewan normal	Hewan hidup
		3	Hewan normal	Hewan hidup
		4	Hewan normal	Hewan hidup
		5	Hewan normal	Hewan hidup
500 μ Ci	28,9 kali	1	Hewan normal	Hewan hidup
		2	Hewan normal	Hewan hidup
		3	Hewan normal	Hewan hidup
		4	Hewan normal	Hewan hidup
		5	Hewan normal	Hewan hidup
1000 μ Ci (1 mCi)	57 kali	1	Hewan abnormal	Hewan hidup
		2	Hewan kejang-kejang	Hewan hidup
		3	Hewan normal	Hewan hidup
		4	Hewan meloncat	Hewan hidup
		5	Hewan normal	Hewan hidup
2000 μ Ci (2 mCi)	115,6 kali	1	Hewan mati	-
		2	Hewan mati	-
		3	Hewan mati	-
		4	Hewan mati	-
		5	Hewan mati	-

Dari uji toksisitas akut diketahui bahwa pemberian radiofarmaka ^{99m}Tc -Etambutol sampai dosis 500 μ Ci/ekor mencit masih memperlihatkan keadaan normal. Sedangkan, pada dosis 1 mCi beberapa ekor mencit menunjukkan perilaku yang abnormal, akan tetapi setelah diamati selama 2 sampai 4 minggu mencit tersebut masih tetap hidup. Pada peningkatan dosis selanjutnya yaitu 2 mCi/ekor mencit didapati mencit tersebut mati, sesaat setelah disuntikkan radiofarmaka ^{99m}Tc -Etambutol yang diawali dengan meloncat-loncat kemudian kejang-kejang.

Dari hasil percobaan ini dapat diketahui bahwa dosis aman pada mencit adalah sampai

dengan 500 μ Ci apabila dikalikan dengan faktor konversi 387,9 pada manusia adalah sama dengan 193,95 mCi/0,5mL. Radiofarmaka ^{99m}Tc -Etambutol tidak boleh digunakan sampai dengan 387,9 mCi/0,5 mL pada manusia (setara dengan 1 mCi pada tikus) karena akan menimbulkan efek samping yang tidak diharapkan. Selanjutnya dari percobaan toksisitas akut diperoleh angka LD₅₀ sebesar 2 mCi/ekor mencit atau sebesar 115,6 kali dosis pemakaian normal.

4. KESIMPULAN

Hasil percobaan memperlihatkan bahwa radiofarmaka ^{99m}Tc -Etambutol sebagai pendeteksi tuberkulosis dapat digunakan pada dosis 10 mCi/1,5 mL dan dapat sampai 193,95 mCi/0,5mL pada manusia. LD₅₀ diperoleh sebesar 2 mCi/ekor mencit atau sebesar 115,6 kali dosis pemakaian normal. Dari hasil beberapa pengujian tersebut diharapkan radiofarmaka ^{99m}Tc -Etambutol dapat merupakan radiofarmaka alternatif untuk diagnosis secara dini penyakit TB.

5. TERIMA KASIH

Terima kasih yang tulus kami ucapkan kepada Sdr. Iswahyudi, Sdr Kustiwa, Sdri. Yetti Suryati dan Sdr. Ahmad Sidik yang telah membantu kami dengan sepenuh hati menyelesaikan penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

1. **GNANASEGARAN G., CROASDALE J., BUSCOMBE JR.,** Nuclear Medicine in Imaging Infection and Inflammation: Part –I. Radiopharmaceutical. World Journal of Nuclear Medicine.(2), (2004, April), pp.155-165.
2. **SATYA S. DAS, ANNE V. HALL., DAVID W. WAREHAM. AND KEITH E. BRITTON,** Infection Imaging with Radiopharmaceutical in 21st Century.Brazilian Archives Of Biology and Technology. (45), (2002, September), pp. 25-37.
3. **IMAM S.K., LIN, P.,** Radiotracers for imaging of infection and inflammation-A Review. World Journal of Nuclear Medicine. 5(1),(2006, January), pp , 40-55
4. **VERMA, J., A.K. SINGH, A. BHATNAGAR, S. SEN, M.BOS.**

7. DISKUSI

Darlina – PTKMR – BATAN :

1. Apakah uji toksisitas yang dilakukan pada penelitian ini sudah cukup banyak untuk menilai agm TC – etambutol sudah layak / aman diterapkan ke manusia.
2. Apakah ada uji toksisitas lain yang dapat dilakukan untuk melengkapi uji toksisitas pada penelitian ini ?

Rizky Juwita S :

1. Kami menyimpulkan untuk sementara sudah layak, karena dari data yang kami peroleh tidak ada perubahan / perilaku yang abnormal dari hewan uji setelah diinjeksi secara intravena sesuai dengan dosis dan aktivitas yang direncanakan akan diberikan pada manusia.

Radiolabeling of ethambutol with technetium-99m and its evaluation for detection of Tuberculosis. World Journal of Nuclear Medicine. 4 (1), (2005,January), pp. 35-46

5. **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
6. **KARTINI, N. O., KUSTIWA, SUSILAWATY, E.** Pengembangan senyawa bertanda ^{99m}Tc -Etambutol untuk diagnosis tuberkulosis ; 1. Karakterisasi Fisiko-Kimia dan Mikrobiologis., Jurnal Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia.VIII (1), (2007, Februari), Hal. 17-28
7. **GOODMAN and GILMAN,** “The Pharmacological Basis of Theurapeutics”, 6th ed, Macmillan Publishing, New York, (1980), Chapter 68
8. **SAHA, GOPAL B.,** “Fundamentals of Nuclear Pharmacy”, 2nd ed, Springer-Verlag, New York, (1984), page 146
9. **TUBIS M., WOLF W.,** “Radiopharmacy, A Wiley Interscience publication”, New York, (1976), pp 573-575
10. **HENKIN R.E.,** “Nuclear Medicine”, 2nd ed, Elsevier, Philadelphia, (2006); Vol I, Chapter 24
11. **DEPARTEMEN KESEHATAN RI,** Farmakope Indonesia, Ed IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. (1995)
12. **BRITISH PHARMACOPOEIA,** Crown, (2003)
13. **LAURENCE, BACHARACH, A.L.,** Evaluation of Drug Activities : Pharmacometris”, (1964)

2. Tahapan uji toksisitas sesuai dengan FDA adalah sebagai berikut :
 1. Acute toxicity testing untuk menentukan NOEL (No Observable Effect).
 2. Maximal lethal dose
 3. Sub acute toxicity testing
 4. Chronic toxicity testing
 5. Carcinogenicity test jika senyawa yang digunakan secara struktur bersifat carsinogen
 6. Teratology, secara umum tidak diperlukan.Yang kami lakukan hanya tahap 1 dan 2

Rochestri Sofyan – PTNBR – BATAN :

Mengapa tidak dipilih / dicoba juga pada hewan yang lebih besar agar perbandingan luas permukaan dengan manusia tidak terlalu jauh, sehingga kesalahan dapat diperkecil ?

Rizky Juwita S :Memang seharusnya uji toksisitas dilakukan kepada dua jenis hewan uji yaitu hewan uji yang kecil, misal mencit / tikus dan hewan uji yang lebih besar, misal kelinci / anjing. Karena pada saat penelitian ini berjalan yang tersedia hanya mencit dan tikus. Maka hanya dilakukan pada mencit saja (tikus memiliki fisiologi yang sama dengan mencit) sedangkan pada hewan yang lebih besar belum dilakukan.

Zulfakhri – PTNBR – BATAN :

Apakah dosis pada manusia akan mengalami yang sama bila 1000 mCi akan mematikan mencit dengan catatan 1000 mCi x faktor ? karena faktor konversinay cukup besar, mohon penjelasannya.

Rizky Juwita S :

Diasumsikan akan menimbulkan efek yang sama karena dosis yang diberikan sesuai dengan tabel perbandingan luas permukaan tubuh. Jadi apabila pada dosis 1 mCi pada mencit menimbulkan abnormalitas, maka diduga akan menimbulkan abnormalitas juga pada manusia.

Adang H G – PRR – BATAN :

Dengan bertambahnya dosis ^{99m}Tc -ethambutol, hewan percobaan yang mati lebih banyak. Apakah penyebabnya oleh ^{99m}Tc -ethambutol atau akibat dosis radiasi yang tinggi ?

Rizky Juwita S :

Telah dilakukan uji coba dengan ^{99m}Tc sampai 2 mCi, tidak ada kematian. LD50 dari ethambutol HCl untuk tikus yang diberikan per oral sebesar 6800 mg/KgBB. Jadi disimpulkan sementara bahwa kematian yang terjadi adalah dari senyawa kimia ^{99m}Tc -ethambutol sendiri.