

## UJI PENAPISAN DAN PENETAPAN KADAR MORFIN DAN KODEIN DALAM PLASMA MENGGUNAKAN *HIGH-PERFORMANCE THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY*-SPEKTROFOTODENSITOMETRI

I Made Agus Gelgel Wirasuta<sup>1,2</sup>, Dewa Ayu Swastini<sup>1</sup>, Ni Made Pitri Susanti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Jurusan Farmasi-Fakultas MIPA, Universitas Udayana, Bali-Indonesia

<sup>2</sup> UPT Laboratorium Forensik – Universitas Udayana, Bali-Indonesia

[mngelgel@yahoo.de](mailto:mngelgel@yahoo.de)

**ABSTRAK:** Uji skrining dan konfirmasi kandungan morfin dan kodein dalam plasma telah dikembangkan menggunakan *high-performance thin-layer chromatography* (HPTLC)-Spektrofotodensitometri. Penetapan kadar morfin dan kodein pada plat HPTLC dideteksi pada panjang gelombang 212 nm. Ekstraksi morfin dan kodein dari plasma menggunakan campuran kloroform dan isopropanol, dengan menggunakan metanol atau isopropanol sebagai pengendap protein. Uji konfirmasi dengan teknik di atas belum memberikan hasil yang kurang tajam. Batas deteksi morfin adalah 48,8 ng dan kodein 70,2 ng. Diperoleh variasi batas deteksi dan batas kuantisasi analit yang sangat besar antar plat HPTLC walaupun memberikan persamaan regresi yang hampir sama.

**Kata Kunci:** Uji skrining, Konfirmasi, morfin, kodein, HPTLC

**ABSTRACT:** Screening and confirmation test for morphine and codeine by high-performance thin-layer chromatography-densitometry technique has been carried out. The determination test consist of limit detection (LOD) and limit quantification (LOQ) of the analyte using HPTLC scanned on wave length of 212 nm. The morphine and codeine were extracted by liquid-liquid extraction using mixture of chloroform and isopropanol from plasma. The screening and confirmation test based on corrected  $hR_f$  – value and insitu UV-spectrum of analyte delivered a not convenient result. The LOD of morphine and codeine was 48,8 and 70,2 ng. The determination of opiate by HPTLC-densitometry was obtained a great range of LOD and LOQ between plat of HPTLC, although had a fast equal of linear regression-coefficient.

**Keywords:** Screening test, confirmation, morphine, codein, HPTLC

### 1. PENDAHULUAN

*High performance thin layer chromatography* (HPTLC) adalah metode pemisahan kromatografi datar dengan berbagai keunggulan, seperti: kesederhanaan dalam pengerjaannya, rendahnya biaya operasional, ketangguhan, dan kinerja tinggi. Pembacaan kromatogram hasil pemisahan dengan spektrofotodensitometri diperoleh parameter kromatogram, seperti  $hR_f$ , in-situ spectrum dari analit dan luas puncak dari masing-masing analit yang terpisahkan. Informasi ini sangatlah bermanfaat dalam

analisis toksikologi forensik, khususnya dalam uji skrining, konfirmasi, dan determinasi.

HPTLC-skrining didasarkan pada nilai  $hR_f$  terkoreksi ( $hR_{fc}$ ) dibandingkan dengan data-data nilai  $hR_{fc}$  literatur pada sistem fase diam dan fase gerak yang sama [1]. Kedekatan nilai  $hR_{fc}$  pada rentang *error window* ( $\pm 7$ ) dijadikan dasar untuk menduga analit. Kemiripan in-situ spektrum UV digunakan untuk memastikan identitas analit [2].

Pada penelitian ini dilaporkan uji skrining morfin dan kodein di dalam plasma dan

penetapan kadarnya menggunakan HPTLC-spektrofotodensitometri. Metode analisis yang dikembangkan diharapkan dapat digunakan dalam analisis toksikologi forensik.

## 2. PERCOBAAN

### 2.1. Bahan dan Alat

Morfin HCl, kodein fosfat, kafein HCl, papaverine HCl diperoleh dari Kimia Farma. Standard baku pembanding, seperti morfin HCl, kafein HCl, bromheksine HCl diperoleh dari PPOM-BPOM RI di Jakarta. Bahan-bahan kimia yang digunakan terdiri dari metanol, kloroform, isopropanol, toluene, aseton, etanol, ammonia pekat yang kesemuanya derajat pro analisis (MERCK). Plat Al-TLC si 60 GF<sub>254</sub> dan pelat HPTLC si 60 GF<sub>254</sub> (MERCK) ukuran 10x10 cm.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas, timbangan analitik (AND GR-200), micro syringe 100 $\mu$ L (Camag), Linomat 5 (Camag-131210), pH meter (Hanna), TLC Scanner 3 (Camag-Muttenz-Zweitzerland), Sentrifuga (Clements), oven (mimmert), ultrasonik (Quigg) dan shaker (IKA).

### 2.2. Metode

#### Uji Penapisan dan konfirmasi:

Morfin HCl, bromheksin HCl, papaverin HCl, kafein HCl dan Kodein HCl dibuat satu campuran dengan konsentrasi masing-masing 200 ng/ $\mu$ L., Nilai  $hRf_c$  dari masing-masing senyawa pembanding pada fase gerak tersebut adalah: morfin= 8, bromheksin= 83, papaverin= 55, kafein= 48 dan kodein= 16. Fase gerak yang digunakan adalah campuran pelarut toluen:aseton:etanol:amonia pekat (45:5:7:3 v/v). Sebelum penotolan plat HPTLC si 60 GF<sub>254</sub> ukuran 10x10 cm terlebih dulu dicuci dengan metanol dan kemudian dikeringkan pada suhu 120 °C selama 20 menit. Penotolan sampel pada plat menggunakan Linomat 5-Camag, dengan jarak masing-masing 10 mm dari tepi

bawah dan dari samping kiri plat, lebar pita 6 mm, jarak antar pita 10 mm. Sampel uji ditotolkan pada jalur no 1 s/d no 5 sehinggalan diperoleh jumlah penotolan secara berturut-turut: 100, 200, 400, 800, 1600 ng, sedangkan senyawa pembanding ditotolkan pada jalur no 9 (track 9). Plat dilusi dengan campuran fase gerak yang sebelumnya telah dijenuhkan selama 30 menit, jarak pengembangan 9 cm dari tepi bawah plat, plat dikeringkan di dalam oven pada 60° C selama 5 menit. Kromatogram dibaca dibawah TLC-Scanner 3, dengan sistem reflaktan pada celah sinar datang 6 x 0,3 mm, panjang gelombang  $\lambda_{max}$  212 nm, masing-masing puncak kromatogram dirajah spektrum UV insitu pada rentang panjanggelombang (190 s/d 400 nm).

Uji Penapisan dilakukan dengan menandai puncak-puncak senyawa pembanding, perhitungan  $hRf_c$  dari analit menggunakan program WinCats 1.4.2 (Camag-Muttenz-Switzerland), skrining analit dilakukan dengan pembandingan data dipustaka dengan rentang ( $hRf_c \pm 7$  dan  $hRf_c \pm 3$ ), sedangkan uji konfirmasi menggunakan kombinasi rentang  $hRf_c$  dan pembandingan spektrum UV insitu analit dengan spektrum UV pustaka dengan batas harga koefisien korelasi antar spektrum ( $r > 0,9$ ).

#### Penetapan kadar

##### a) Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Penotolan morfin HCl dan kodein fosfat dirancang seperti pada prosedur uji penapisan dan kofirmasi. Penghitungan batas deteksi dan batas kuantisasi didasarkan pada pembacaan luas area puncak-puncak morfin dan kodein pada pembacaan kromatogram di panjang gelombang  $\lambda_{max}$  212 nm. Pengitungan menggunakan program software Microsoft exel 2003. Penetapan batas deteksi dan kuantisasi ini dilakukan pengulangan sebanyak 7 kali pada plat HPTLC yang berbeda.

Tabel 1. Hasil Skrining Analit Berdasarkan Nilai hRfc pada Rentang ( $hRfc \pm 7$  dan  $hRfc \pm 3$ ).

Track	Sampel	Berat (ng)	Rfc analit	Hit factor	
				$hRfc \pm 7$	$hRfc \pm 3$
1	morfin HCl	100	8	61	27
	kodein fosfat	100	18	65	25
2	morfin HCl	200	9	61	27
	kodein fosfat	200	19	65	29
3	morfin HCl	400	9	61	27
	kodein fosfat	400	19	65	29
4	morfin HCl	800	9	62	27
	kodein fosfat	800	20	64	27
5	morfin HCl	1600	9	62	27
	kodein fosfat	1600	19	64	27

### b) Keseksamaan

Penotolan analit pada uji keseksamaan menggunakan prosedur yang sama pada penetapan batas deteksi dan kuantisasi, hanya saja jumlah analit yang ditotolkan pada setiap noda adalah sama yaitu 2400 ng.

### c) Perolehan Kembali

Plasma manusia untuk uji simulasi didapatkan dari PMI Denpasar. Prosedur ekstraksi morfin dan kodein menggunakan metode ekstraksi cair-cair, dimana pengendapan protein dicoba menggunakan pelarut metanol dan isopropanol. Setengah milliliter (darah/plasma) ditambah 1 ml (metanol atau isopropanol), diaduk hingga homogen, protein terdenaturasi diendapkan dengan sentrifuga pada (1500 rpm) selama 5 menit. Masing-masing 0,5 ml supernatan pada pengendapan dengan metanol dan 1 ml supernatan pada pengendapan protein isopropanol dipindahkan ke dalam tabung sentrifuga, kemudian ditambahkan dapar natrium bikarbonat pH 9,3 sebanyak 0,5 ml, dan 3 ml kloroform. Campuran dikocok dengan pengocok horizontal "shaker-IKA" pada 3000 rpm selama 20 menit, emulsi yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifuga pada 2500 rpm selama 5 menit. Sejumlah 2,5-3 ml kloroform dipindahkan

ke dalam tabung sentrifuga lain, dikeringkan dalam tangan air mendidih. Ke dalam ekstrak kering ditambahkan 25  $\mu$ L metanol, campuran dilarutkan dengan ultrasonik, kemudian semua ekstrak ditotolkan pada plat HPTLC 10x10 cm, dengan jarak dan lebar pita penotolan seperti pada prosedur sebelumnya, pada setiap plat ditotolkan 5 sampel ekstraksi dan 4 standar morfin HCl dan kodein fosfat dengan jumlah penotolan masing-masing: 100, 250, 500, dan 1250 ng.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### Uji penapisan dan konfirmasi

Tabel 1 menampilkan jumlah senyawa (*hit factor*) yang berada pada rentang ( $hRfc \pm 7$  dan  $hRfc \pm 3$ ), sedangkan table 2 menunjukkan jumlah senyawa (*hit factor*) uji konfirmasi menggunakan nilai hRfc dan kemiripan spektrum analit dan pustaka ( $r > 0,9$ ). Tabel 3 menggambarkan senyawa-senyawa hasil uji konfirmasi dan nilai hRfc analisis. Uji skrining dan konfirmasi dengan HPTLC-spektrofotodensitometri adalah prosedur uji yang relatif sederhana jika dibandingkan dengan teknik GC-MS. Skrining HPTLC-spektrofotodensitometri didasarkan pada nilai hRfc dan kemiripan bentuk spektrum UV in-situ analit dengan

Tabel 2. Hasil Uji Konfirmasi Berdasarkan Nilai hRfc dan Kemiripan Spektrum

Track	Sampel	Berat (ng)	hRfc analit	Hit factor	
				hRfc $\pm 7$ vs $r > 0,9$	hRfc $\pm 3$ vs $r > 0,9$
1	morfin HCl	100	8	6	2
	kodein fosfat	100	18	7	6
2	morfin HCl	200	9	4	1
	kodein fosfat	200	19	5	4
3	morfin HCl	400	9	4	1
	kodein fosfat	400	19	3	2
4	morfin HCl	800	9	11	4
	kodein fosfat	800	20	5	1
5	morfin HCl	1600	9	11	4
	kodein fosfat	1600	19	5	1

Tabel 3. Senyawa-senyawa Hasil Uji Konfirmasi Pada Celah hRfc  $\pm 7$  dan Dengan Kemiripan Spektrum ( $r > 0,9$ ).

Konfirmasi morfin				Konfirmasi kodein			
No	Senyawa	r	hRfc	No	Senyawa	r	hRfc
1	Normorphine	0,92449	2	1	Strychnine	0,92513	11
2	Azacynolol	0,90567	3	2	Hydrocone	0,9289	15
3	Azacynolol	0,90571	3	3	Codein	0,90979	16
4	Losartan	0,96041	3	4	Antazoline Nordoxephine	0,95701	17
5	Norcodein	0,94482	4	5	Ethylmorphine	0,96264	17
6	Xylometazoline	0,91127	5	6	Sufpiride	0,90037	17
7	Orciprenoline	0,91508	6	7	Despramine	0,92072	20
8	Morphine	0,92501	8	8	Norcitalopram	0,93075	20
9	Terbutaline	0,91122	8	9	Mescaline	0,9233	26
10	Fenoterol	0,91563	11	10	TMA,3,4,5-	0,92772	26
11	Maproptiline	0,92426	11				
12	Norcitalopram	0,91979	11				
13	Hydrocone	0,95579	15				
14	Strychnine	0,9029	15				

membandingkan terhadap data pustaka. Pada penyempitan celah perbandingan hRfc dari  $\pm 7$  menjadi  $\pm 3$ , di satu sisi dapat meningkatkan ketajaman hasil uji konfirmasi namun disisi lain karena variasi nilai hRfc analisis menyebabkan kodein tidak teridentifikasi. Variasi nilai hRfc dapat disebabkan oleh beberapa faktor,

seperti tingkat kejenuhan fase gerak dalam tabung benjana selama elusi, perbedaan komposisi campuran pelarut dalam fase gerak, dan perbedaan penguapan salah satu komponen pelarut [3]. Kelemahan muncul dalam uji ini adalah tidak mampu memastikan analit (*unkown substance*), ditunjukkan oleh hasil uji konfirmasi masih memberikan lebih dari satu senyawa.

Tabel 4. Variasi Batas Deteksi dan Kuantisasi Penetapan Morfin dan Kodein pada HPTLC Si 60 GF<sub>254</sub> Pengulangan

Senyawa	Koefisien regresi	Batas deteksi (ng)	Batas kuantitasi (ng)
	r ± RSD (KV%)	LOD ± RSD (KV%)	LOQ ± RSD (KV%)
Morfin base	0,998 ± 0,002 (0,22)	48,8 ± 16,6 (33,9)	162,6 ± 55,3 (34,0)
Kodein base	0,995 ± 0,004 (0,5)	70,2 ± 42,9 (61,1)	233,9 ± 143,1 (61,2)

Tabel 5. Prosen Perolehan Kembali Ekstrak Morfin dan Kodein dari Plasma Manusia dengan Isopropanol atau Metanol sebagai Pengendap Protein

Morfin (rerata ± RSD (KV))	Kodein (rerata ± RSD (KV))
<i>Prosen perolehan kembali seri isopropanol</i>	
106,33 ± 0,1 (10)	77,13 ± 0,05 (6,4)
<i>Prosen perolehan kembali seri metanol</i>	
113,6 ± 0,6 (48,4)	79,38 ± 0,4 (55,2)

Campuran pelarut dalam penelitian ini salah satunya mengandung amonia pekat, selama pengerjaan amonia akan lebih mudah menguap dari pada pelarut yang lain, penguapan amonia akan berakibat pada penurunan tingkat kebasaaan dari campuran fase gerak, dan akhirnya akan berpengaruh pada nilai hRfc dari analit. Yonamine [4] melakukan pemastian/konfirmasi kokain dan metabolitnya dengan menggunakan reaksi penampak noda. Untuk meningkatkan hasil uji konfirmasi HPTLC-Spektrofotodensitometri dapat dikombinasi dengan suatu reaksi penampak noda yang spesifik untuk turunan opiat, dimana reaksi warna diharapkan dapat membedakan senyawa yang muncul dalam uji konfirmasi berdasarkan hRfc dan spektrum UV insitu anallit. Ketepatan uji konfirmasi juga dipengaruhi oleh perubahan bentuk spektrum analit pada plat HPTLC. Perubahan bentuk spektrum analit telah dilaporkan dipengaruhi oleh: *co-eluting substance* yaitu senyawa yang terelusi bersama dan tidak terpisahkan, tingkat pengeringan dari plat setelah dielusi, dan perbedaan pH pelarut pengelusi [5].

#### Uji Determinasi / Penetapan kadar

Batas deteksi dan kuantitasi morfin dan kodein ditetapkan dalam bentuk basenya ditampilkan dalam tabel 4: Pengulangan pengukuran LOD dan LOQ ini menunjukkan variasi data yang sangat besar. Hal ini ditunjukkan oleh harga koefisien variansi (KV) lebih besar dari 2%, meskipun semua perhitungan diberikan oleh persamaan regresi yang linier ( $r > 0,995$ ). Penetapan kadar morfin dan kodein dengan HPTLC dengan pembacaan pada panjang gelombang 212 nm memberikan batas deteksi sekitar 48,8 ng untuk morfin dan 70,2 ng untuk kodein. Batas deteksi ini sangat cukup tinggi digunakan untuk analisis penyalahgunaan opiat dalam darah. Namun baik batas deteksi maupun kuantisasi pada pengulangan 7 plat HPTLC yang berbeda memberikan variasi data yang sangat besar, ditunjukkan oleh besarnya nilai koefisien variansi (KV >> 2%) walaupun tidak memberikan perbedaan persamaan regresi yang signifikan. Perbedaan ini kemungkinan oleh perbedaan distribusi sebaran ukuran partikel silika antar plat. Hal ini akan berpengaruh pada perbedaan nilai luas puncak antar analit pada plat yang berbeda. Untuk menghindari kesalahan dalam penetapan kadar berdasarkan nilai KV ini, disarankan menggunakan kurva kalibrasi standard yang diperoleh dari plat yang

sama. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variansi). Dari data percobaan didapat nilai luas puncak kromatogram (AUC) rata-rata adalah 105,9. Simpangan baku (SD) bernilai 6264,7. Nilai Simpangan baku relatif atau koefisien variansi (KV) didapatkan 1,7 %. Hal ini menunjukkan metode yang diuji seksama, karena nilai KV analisis < 2%. Perhitungan prosen perolehan kembali ekstraksi cair-cair dengan perbedaan pengendap protein ditampilkan dalam Tabel 5.

#### 4. SIMPULAN

Uji konfirmasi morfin dan kodein berdasarkan perbandingan nilai  $R_{f,c}$  dan bentuk spektrum UV insitu, kurang memberikan ketajaman hasil. Terdapat variasi yang dinggi dari nilai batas deteksi dan kuantisasi antar plat HPTLC.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] De Zeeuw RA, et al. *Thin-Layer Chromatographic R<sub>f</sub> Values of Toxicologically Relevant Substances on Standardized Systems*, 2<sup>nd</sup> Revised and Enlarged Edition, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- [2] Hahn-Deinstrop, (2007), *Applied Thin-Layer Chromatography Best Practice and Avoidance of Mistakes*, 2<sup>nd</sup> ed., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [3] Ojanpera I. and E. Vuori (1994), Identification of drugs in autopsy liver samples by instrumental qualitative thin-layer chromatography, *J. Chromatogr. A.* 674: 147-152
- [4] Yonamine, M. and M.C. Sampaio, (2006), A high-performance thin-layer chromatographic technique to screen cocaine in urine samples, *Legal Medicine* (8), 184-187
- [5] Wirasuta I MAG, 2008, Analisis toksikologi forensik dan interpretasi temuan analisis, *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences*, 1(1):47-55.