

[REVIEW] METODE ANALISIS *S-PHENYL MERCAPTURIC ACID (S-PMA)* DALAM URIN SEBAGAI *BIOMARKER* PAPARAN BENZENA

Sri Gustini Husein<sup>1,2</sup>, Muchtaridi<sup>2</sup>, Mulyana<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia, Bandung  
<sup>2</sup>Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, Jatinangor  
<sup>3</sup>Prodia IndTox, Cikarang, Bekasi

---

**Abstrak**

*s-Phenyl Mercapturic Acid (s-PMA)* merupakan salah satu *biomarker* spesifik yang diusulkan untuk pemantauan biologis terhadap paparan benzena dalam konsentrasi rendah. *American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)* juga mengharuskan perusahaan industri untuk mengevaluasi tingkat *s-PMA* pada pekerja yang bekerja terkait dengan benzena. *ACGIH BEI (Biological Exposure Limit)* menetapkan nilai normal *s-PMA* dalam urin maksimal 25 µg/g kreatinin (25 ppb) (*ACGIH*, 2012). Beberapa metode telah dikembangkan untuk mendapatkan kesesuaian prosedur dalam penetapan kadar *s-PMA* dalam urin. Metode yang digunakan untuk analisis *s-PMA* sampai saat ini adalah *High Performance Liquid Chromatografi (HPLC)* dengan detektor fluoresens, *HPLC* dengan detektor *DAD*, *HPLC-MS-MS*, *GC-MS*, dan *ELISA* (Wang. Z, et al, 2013). Preparasi terhadap sampel dilakukan beberapa tahap, menggunakan teknik *liquid-liquid extraction (LLE)*, *solid-phase extraction (SPE)* dan derivatisasi analit menjadi senyawa fluoresens terkonjugasi (Buratti M, 2001).

Kata kunci: *Biomarker*, *s-Phenyl Mercapturic Acid (s-PMA)*, Benzena, *HPLC*

**Abstract**

*s-Phenyl Mercapturic Acid (s-PMA)* is one of the specific biomarkers purposed for biological monitoring of benzene exposure in low concentrations. The *American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)* also requires industrial companies to evaluate the level of *s-PMA* who works working with benzene. *ACGIH BEI (Biological Exposure Limit)* determines the normal value of *s-PMA* in urine to a maximum of 25 µg/g creatinine (25 ppb) (*ACGIH*, 2012). Several methods have been developed to obtain the suitability of procedures in the determination of *s-PMA* levels in the urine. The recently of analysis methods used for *s-PMA* are *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* with fluoresens detector, *HPLC* with *DAD* detector, *HPLC-MS-MS*, *GC-MS*, and *ELISA* (Wang. Z, et al, 2013). Sample preparation was performed in several stages using *liquid-liquid extraction (LLE)*, *solid-phase extraction (SPE)* and analytical derivatization into conjugated fluorescence (Buratti M, 2001).

Keywords: *Biomarker*, *s-Phenyl Mercapturic Acid (s-PMA)*, Benzene, *HPLC*

---

## PENDAHULUAN

Pertumbuhan penduduk yang diikuti dengan perkembangan dunia industri yang sangat pesat dengan beraneka ragam penggunaan bahan kimia, dan kebutuhan transportasi masyarakat yang semakin meningkat, telah membawa dampak yang buruk terhadap udara di sekitar lingkungan kita (Karimi, *et al.*). Salah satu bahan kimia tersebut adalah senyawa benzena. Senyawa benzena sering dijumpai sebagai produk sampingan produksi bahan bakar minyak pada saat penyulingan bertingkat (Littlejohns & Daugulis, 2009). Selain itu, senyawa ini juga merupakan salah satu senyawa kimia penting yang banyak digunakan dalam pembuatan polimer, plastik, karet, pewarna, deterjen dan produk lainnya (Purwanto, dkk, 2014). Benzena berpotensi karsinogenik, khususnya bagi setiap individu yang terlibat langsung dengan senyawa kimia tersebut, seperti pekerja di industri plastik, karyawan SPBU, dan perokok (Rothman, *et al*, 1998).

Paparan benzena yang berulang dan terus-menerus dapat meningkatkan kemungkinan berkembangnya kanker. Beberapa studi menunjukkan korelasi antara benzena dengan leukemia (Khalade, *et al*, 2010). Telah dilaporkan juga penyebab depresi sumsum tulang dan leukemogenesis disebabkan oleh kerusakan beberapa fungsi sel hematopoietik (David L D and Margaret B, 2008). Analisis kadar benzena dalam urin dapat digunakan sebagai acuan biomonitoring keselamatan

dalam industri, misalnya dengan menyelenggarakan pelatihan keselamatan pada bahaya paparan benzena, dan pentingnya alat pelindung diri (APD) seperti masker dan sarung tangan bagi mereka yang kontak langsung dengan benzena (Kusuma Aa, dkk, 2006).

Metode standar untuk pengukuran s-PMA urin yang ada saat ini adalah dengan alat LC-MS-MS (C.B 'Hymer, 2011). Metode yang dipublikasikan oleh CDC ini sangat akurat, namun tentunya memerlukan biaya yang tinggi. Prosedur analisis yang tersedia untuk penentuan asam mercapturat yang berasal dari hidrokarbon aromatik sering tidak sensitif, memakan waktu atau memiliki tingkat kerumitan yang tinggi. Wang *et al.* (2013) melaporkan beberapa metode telah dikembangkan untuk penentuan s-PMA, seperti LCQ3, LC-MS / MS, LC-MS tandem, dan ELISA.

## BENZENA

Benzena merupakan senyawa hidrokarbon aromatik paling sederhana yang banyak digunakan dalam berbagai industri, baik dalam bentuk senyawa tunggal atau campuran sebagai pelarut atau sebagai reaktan dalam sintesis kimia (Pudyoko.S, 2010). Benzena dikenal dengan rumus kimia  $C_6H_6$ , PhH dan benzol merupakan salah satu komponen dalam minyak bumi dan pelarut yang penting dalam dunia industri (Harrison R, *et al*, 2010). Karena memiliki bilangan oktan yang tinggi, maka benzena dijadikan

sebagai salah satu campuran penting pada bensin. Pada umumnya benzena digunakan sebagai bahan dasar dalam produksi obat-obatan, plastik, karet buatan, pewarna, pewangi, deterjen, zat aditif makanan, pestisida, bahan peledak dan produk lainnya (Kent and Riegel's, 2007).

Benzena juga digunakan sebagai bahan dasar senyawa kimia lainnya. Sekitar 80% benzena yang sering digunakan, terbagi dalam 3 senyawa kimia utama yaitu etilbenzena, kumena dan sikloheksana. Etilbenzena merupakan bahan baku stirena yang nantinya diproduksi menjadi plastik dan polimer lainnya. Kumena digunakan sebagai bahan baku resin dan perekat. Sikloheksana digunakan dalam pembuatan nilon. Pada penelitian laboratorium, saat ini toluena sering digunakan sebagai pengganti benzena. Sifat kimia toluen mirip dengan benzena, tetapi toluen lebih tidak beracun dari benzena (Kolmetz G, 2007).

### **Paparan senyawa benzena**

Senyawa benzena memiliki sifat racun atau karsinogenik, yaitu zat yang dapat membentuk kanker dalam tubuh manusia jika konsentrasinya dalam tubuh berlebih. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa benzena merupakan salah satu penyebab leukemia, penyakit kanker darah yang telah banyak menyebabkan kematian (Faiola, *et al*, 2014). Dampak kesehatan akibat paparan benzena berupa depresi pada sistem saraf pusat hingga kematian. Paparan benzena antara 50-150 ppm dapat

menyebabkan sakit kepala, kelesuan dan perasaan mengantuk. Konsentrasi benzena yang lebih tinggi dapat menyebabkan efek yang lebih parah, termasuk vertigo dan kehilangan kesadaran. Paparan benzena sebesar 20.000 ppm selama 5-10 menit bersifat fatal, dan paparan sebesar 7.500 ppm dapat menyebabkan keracunan jika terhirup selama 0,5-1 jam. Dampak yang ringan dapat berupa euphoria, sakit kepala, muntah, gaya berjalan terhuyung-huyung, dan pingsan (ATSDR, 2007).

Paparan benzena kronis yang berulang dan lama pada tempat kerja, meskipun dalam konsentrasi yang rendah, dapat menimbulkan bermacam kelainan darah yang bervariasi dari anemia, *thrombocytopenia*, anemia aplastik, *pancytopenia*, dan leukemia akut. Paparan kronis pada anak-anak akan lebih berbahaya karena mereka memiliki periode laten yang lebih lama (Hays M S, *et al*, 2012). Benzena bersifat mengiritasi kulit. Kontak langsung dengan kulit dapat menimbulkan eritema. Kontak berulang dan menahun dapat menimbulkan dermatitis yang kering dan berskuama atau terjadinya infeksi kulit sekunder. Benzena juga menimbulkan gangguan kesehatan pada ginjal, hati, dan otot, dan juga menyebabkan kerusakan pada sistem *cardiovascular*, *neurological*, *immunological*, dan reproduksi (WHO, 1996).

Jalur absorpsi benzena adalah melalui pernafasan/inhalasi, kulit atau

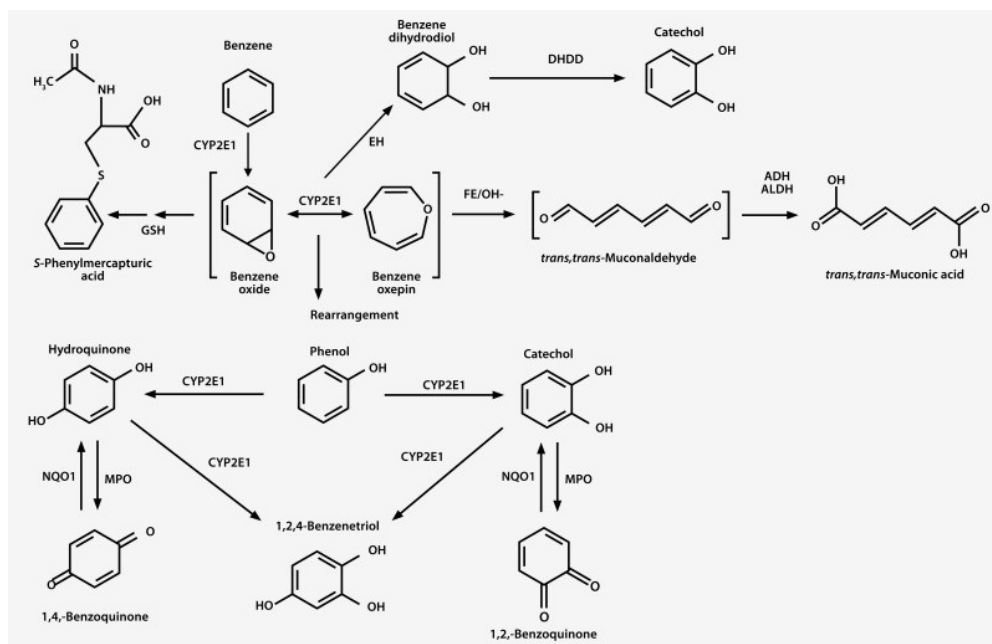
mukosa mata. Paparan tersebut dapat menyebabkan keracunan yang bersifat akut maupun kronik. Efek paparan benzena secara kronis yaitu kerusakan pada sistem pembentukan darah (sumsum tulang) yang dapat menimbulkan risiko terjadinya penurunan jumlah elemen sel darah secara progresif yang meliputi penurunan kadar Hb, jumlah eritrosit, trombosit, dan leukosit yang kemungkinan disebabkan oleh metabolit benzena epoksida. Penderita keracunan benzena secara kronik hanya mempunyai 50% jumlah eritrosit dari keadaan normal (Mahawati M, 2005).

### Metabolisme Benzena

Metabolisme benzena dapat terjadi hampir di seluruh jaringan tubuh, namun tempat penyimpanan metabolit benzena yang paling utama adalah pada hati. Metabolit yang dihasilkan hati selanjutnya

dibawa ke sumsum tulang. Metabolit utama benzena adalah fenol, hidroquinon (HQ), katekol (CAT) dan 1,2,4-benzenetriol, tt-muconaldehyde, dan tt-muconic asam (tt-MA). Benzena oksida dapat bereaksi lebih lanjut dengan glutathione yang diekskresikan dalam urin sebagai s-PMA (Purwanto, 2014). Jalur metabolisme benzena ini ditunjukkan pada Gambar 1.

Setiap metabolit fenolik dari benzena dapat mengalami konjugasi sulfonat ataupun glukonat. Hasil konjugasi dari fenol dan hidrokuinon merupakan metabolit yang paling banyak ditemukan di urin. Asam trans-trans mukonat, fenol, katekol, hidrokuinon dan benzokuinon dapat merangsang enzim sitokrom p-450 pada sistem sel darah manusia. Enzim ini mengkatalisis reaksi metabolisme benzena pada sumsum tulang, karena itu benzena



**Gambar 1. Jalur metabolisme senyawa benzena**

Keterangan: ADH: alcohol dehydrogenase; ALDH: aldehyde dehydrogenase; CYP 2E1: cytochrome P450 2E1; DHDD: dihydrodiol dehydrogenase; EH: epoxide hydrolase; GSH: glutathione; MPO: myeloperoxidase; NQO1: NAD(P)H:quinone oxidoreductase.  
sumber: *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

dapat menyebabkan toksisitas pada sel darah (*hematoxicity*), tt-MA dan s-PMA merupakan dua metabolit yang dapat digunakan sebagai biomarker untuk menentukan tingkat kerja dari paparan benzena (Rappaport, *et al*, 2009).

Saat ini di seluruh dunia s-PMA digunakan sebagai biomarker dari paparan benzena. *American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)* juga mengharuskan perusahaan industri untuk mengevaluasi tingkat S-PMA pada pekerja terkait dengan benzena. Analisis metabolit benzena dalam urin manusia yang terpapar benzena dapat berguna dalam upaya pencegahan kanker dan deteksi dini risiko kanker. Hasil analisis dapat digunakan sebagai acuan biomonitoring keselamatan dalam industri, misalnya dengan menyelenggarakan pelatihan keselamatan pada bahaya paparan benzena, pergantian posisi kerja, serta pentingnya masker dan sarung tangan bagi mereka yang kontak langsung dengan benzena (Kusuma, dkk, 2006).

*Human biomonitoring* merupakan suatu cara untuk mempelajari tentang perilaku dan pengukuran bahan-bahan beracun (xenobiotik) yang masuk ke dalam tubuh dengan menggunakan suatu indikator yang disebut biomarker. Manusia mudah terpapar bahan kimia berbahaya melalui makanan, udara dan kontak kulit dengan sumber paparan. Jaringan tubuh atau specimen yang kemungkinan dapat

digunakan untuk penetapan biomarker ini adalah urin, darah, rambut, dan lainnya.

#### **Aplikasi analisis s-PMA urin sebagai biomarker paparan benzena tingkat konsentrasi rendah dalam industri**

N J van Sittert *et al* (1993) melaporkan analisis s-PMA dalam urin diusulkan sebagai biomarker yang cocok untuk pemantauan paparan benzena tingkat rendah. Dalam studi yang dilaporkan disini telah divalidasi di 12 studi terpisah pada pabrik kimia, kilang minyak dan pabrik gas alam. Parameter yang diteliti adalah karakteristik ekskresi s-PMA, kekhususan dan sensitivitas uji, dan hubungan antara paparan benzena ke udara dengan konsentrasi s-PMA kemih, dan antara fenol urin dan konsentrasi s-PMA. Kisaran paparan untuk benzena tertinggi ditemukan pada pekerja di pabrik kimia dan pekerja yang membersihkan tangki atau instalasi yang mengandung benzena sebagai komponen kondensat gas alam. Konsentrasi s-PMA kemih diukur hingga 543 µg/g kreatinin. Paparan pekerja untuk benzena yang terendah di kilang minyak dan konsentrasi s-PMA sebanding dengan mereka yang merokok atau kontrol orang yang merokok (sebagian besar di bawah batas deteksi 1 sampai 5 µg/g kreatinin). Dalam kebanyakan pekerja s-PMA yang dikeluarkan dalam fase tunggal dan konsentrasi s-PMA tertinggi adalah pada akhir pergeseran benzena setelah delapan jam. Rata-rata waktu paruh eliminasi adalah

9,0 (SD 4,5) jam (pada 31 pekerja). Sementara, lima pekerja tahap kedua yang tereliminasi ditemukan dengan waktu paruh rata-rata 45(SD 4) jam. Korelasi kuat ditemukan antara delapan jam paparan benzena udara dari  $0,3\text{mg}/\text{m}^3$  (0,3 ppm) dan konsentrasi s-PMA lebih tinggi pada urin di akhir pergeseran shift. Ini dihitung bahwa paparan benzena delapan jam  $1\text{ mg}/\text{m}^3$  (1 ppm) sesuai dengan konsentrasi s-PMA rata-rata  $46\mu\text{g}/\text{g}$  kreatinin (95% confidence interval 41-50  $\mu\text{g}/\text{g}$  kreatinin) (Ghittori S, *et al*, 1999). Sebuah korelasi yang kuat juga ditemukan antara fenol urin dan konsentrasi s-PMA. Pada konsentrasi fenol urin 50  $\text{mg}/\text{g}$  kreatinin, sesuai dengan paparan benzena delapan jam  $10\text{ mg}/\text{m}^3$  (10 ppm), konsentrasi s-PMA rata-rata urin adalah  $383\mu\text{g}/\text{g}$  kreatinin. Kesimpulannya, dengan sensitivitas saat tes, dalam waktu delapan jam terpapar benzena, kadar rata-rata s-SPMA yang dapat di ukur adalah  $0,3\text{mg}/\text{m}^3$  (0,3 ppm) atau lebih tinggi (C B'Hymer, *et al*, 2005).

### Metode Analisis s-PMA

#### a. Metode analisis s-PMA dengan HPLC-FLD

Penetapan *phenylmercapturic acid* dan *benzyl mercapturic acid* dalam urin yang diderivatisasi dengan senyawa *monobrombimane* dilaporkan oleh Buratti, *et al*, (2001). s-PMA dan s-BMA dalam urin, masing-masing merupakan metabolit benzena dan toluen, ditentukan dengan cara menghidrolisis senyawa tersebut dalam basa kemudian menderivatisasi senyawa

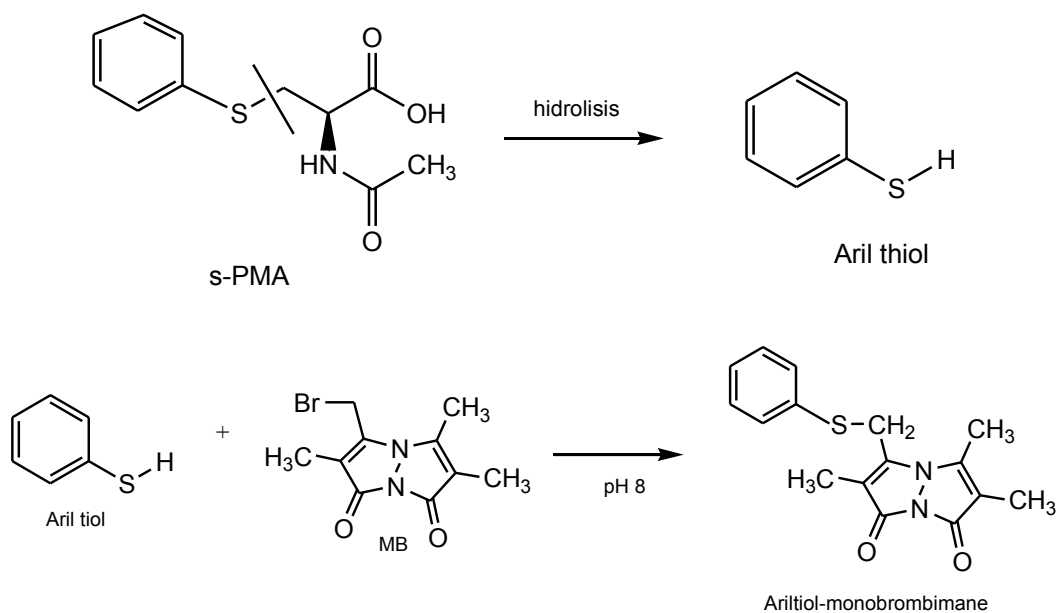
tiol tersebut dengan monobrombimane sehingga terbentuk senyawa fluoresens terkonyugasi. Selanjutnya dibaca melalui HPLC dengan kolom difenil-silica (100x4,6 mm I.D., ukuran partikel 5 $\mu\text{m}$ ) dan detektor fluorometri (C B'Hymer, *et al*, 2003). Panjang gelombang eksitasi 375 nm dan emisi pada 480 nm.

Untuk mendapatkan s-PMA dan s-BMA dari matriks urin, Buratti *et.al* (2001) melakukan preparasi sampel dengan *liquid-liquid extraction* (LLE). 2 mL urin ditambah 100  $\mu\text{L}$  HCl 12 N dan diekstraksi dengan kloroform-aseton (2;1), kemudian dikocok selama 1 menit, sentrifuga pada 1200 rpm, ke dalam campuran ditambahkan 2 mL kloroform pada fase organik, kemudian ditambahkan 200 mg  $\text{MgSO}_4$ , pindahkan ke dalam vial gelas 4 mL bertutup gasket dan diuapkan dengan Nitrogen  $50^\circ\text{C}$ ; residu dilarutkan dalam 500  $\mu\text{L}$  NaOH 2M yang mengandung 2 mM EDTA $\text{Na}_2$ ; kemudian dihidrolisis dalam penangas uap kering selama 25 menit pada suhu  $95^\circ\text{C}$ , kemudian didinginkan dalam air es selama 5 menit. Reagen untuk derivatisasi disiapkan dengan menambahkan 90  $\mu\text{L}$   $\text{H}_3\text{PO}_4$  5 M, 200  $\mu\text{L}$  ammonium karbonat 0,5 M (untuk menjaga pH antara 7,5-8,5) dan 50  $\mu\text{L}$  Monobrombiman (2 mM dalam asetonitril), melalui tutup gasket. Derivatisasi dilakukan pada suhu ruang selama 15 menit hingga terjadi reaksi seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2. Aril tiol-MB derivatif yang terbentuk diekstraksi dengan ekstraksi fase

padat (Solid Phase Extraction, SPE) menggunakan SPE Cartridge Oasis HLB-1cc.Cartridge dikondisikan dengan 1mL metanol dan 1 mL air, masukkan sampel hasil reaksi derivatisasi, dimasukkan dan dicuci dengan 1 mL air dan 8 mL larutan air-metanol 50%v/v. MB derivate di elusi dengan 200  $\mu$ L acetonitril, eluat diuapkan dengan nitrogen 50°C, residu di larutkan dengan 50  $\mu$ L aceonitril dan tambahkan air sampai volume 250  $\mu$ L. 50  $\mu$ L alikuot di injeksikan pada sistem HPLC. Kurva kalibrasi dibuat untuk masing-masing konsentrasi asam mercapturat.

awali dengan 100% larutan A dengan laju alir 2,0 mL/menit selama 15 menit, dan tekanan 1900 p.s.i . Laju alir ditingkatkan menjadi 4 mL/menit dan 100% larutan B running selama 3 menit. Tekanan kembali meningkat menjadi 2800 p.s.i. Elusi gradien ini ditujukan untuk mempercepat waktu analisis. Elusi di monitor dengan detektor fluoresens (panjang gelombang eksitasi 375 nm, panjang gelombang emisi 480 nm) (Buratti, *et al*, 2001).

Profil kromatogram ditunjukkan oleh Gambar 3. Pada Gambar 3(A) menunjukkan kalibrasi larutan standar



Gambar 2. Reaksi derivatisasi s-PMA menjadi aril-thiol monobromobimane

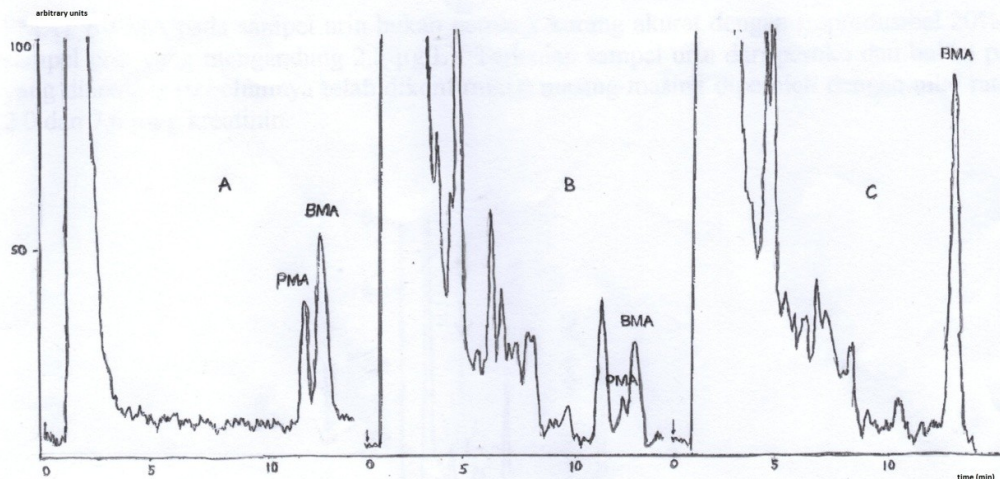
### Kondisi Kromatografi

Pemisahan dilakukan dengan sistem elusi gradien pada suhu 35°C dengan kolom fase terbalik. Eluen yang sesuai untuk kedua senyawa ini adalah: Larutan A (air-Tetrahydrofuran-asam trifluoroasetat, 85;15;0,1) dan Larutan B (acetonitril-air-asam trifluoroasetat, 60; 40; 0,1). Elusi di

untuk urin dengan konsentrasi PMA 20  $\mu$ g/L , dan BMA 15  $\mu$ g/L, Gambar 3(B) urine dari seorang perokok, dan gambar 3(C) kromatogram dari pekerja pengeboran minyak yang terpapar toluene (konsentrasi toluene udara=35 mg/m<sup>3</sup>). PMA dan BMA terelusi dengan puncak yang tajam dan simetri terpisah dari kontaminannya

dan senyawa derivat MB yang lainnya. Waktu retensi dari PMA dan BMA masing-masing 11,8 dan 12,8 menit. Waktu yang diperlukan untuk elusi sampel dari injeksi sampel ke sampel selanjutnya adalah 20 menit (Buratti, *et al*, 2001).

dilakukan melalui HPLC dengan detektor fluoresens setelah urine di ekstraksi menggunakan SPE C18 dan dihidrolisis kemudian diderivatisasi dengan monobrombimane. Untuk memperoleh hasil yang spesifik mereka mensintesis s-



**Gambar 3. Kromatogram dari asam fenil merkapturat dan asam benzyl merkapturat (A) Kalibrasi larutan (PMA = 20 µg/L, BMA = 15 µg/L). (B) Urin seorang perokok (PMA = 4,6 µg/L, BMA = 8,1 µg/L). (C) Urin dari pekerja pengeboran minyak yang terpapar toluene (BMA = 30,3 µg/L).**

Penelitian yang dilaporkan oleh Buratti *et al*, (2001) menunjukkan hasil yang baik dengan *recovery* PMA dan BMA dari urin yang dispike tercapai > 90% dengan rentang 10-500 µg/L, LOQ = 1 dan 0,5 µg/L, presisi antar hari mencapai 42 µg/L dengan *c.v.* < 7%. Kesesuaian prosedur ini dapat diterima untuk monitoring biologi terhadap paparan benzena dan toluen di udara dalam konsentrasi rendah.

Sebuah metode analisis penetapan s-PMA dalam urin sebagai metabolit benzena yang spesifik telah dilaporkan juga oleh T.Einig dan W. Dehnen (1995). Menurutnya penetapan kadar analit dapat

Asetil-4-metiltiofenol dengan mereaksikan 0,5 g 4-metiltiofenol dalam 20 mL asetonitril dengan 1 mL asam asetat anhidrid dan 1 mL N,N-dimetil-4-aminopiridin dalam asetonitril (0,5 mol/L) ditambahkan sebagai katalis. Tujuan dari sintesis ini sebagai standar internal s-PMA untuk memperoleh suatu metode analisis s-PMA dengan sensitivitas yang tinggi (LOD 1µg/L) sehingga dapat mengukur dengan tepat konsentrasi s-PMA pada urin yang tidak terpapar.

Pada penelitian ini dibedakan tiga jenis SPE C-18 dan memberikan *recovery* ekstraksi urin yang berbeda. Ekstrak urin yang di spike dengan 250 µg/L s-PMA

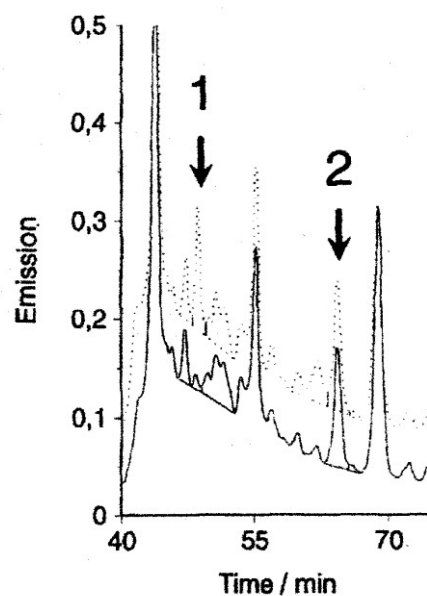


diperoleh 45% bila digunakan cartridge SPE BondElut, 82% pada SPE Bakerbond, dan 103% dengan SPE Sep-Pak. Cartridge Sep-Pak menunjukkan *recovery* yang lebih tinggi, dan kemudian digunakan untuk ekstraksi sampel urin. Hasil dibandingkan dengan standar internal dan diperoleh LOD 1 µg/L yang cukup rendah dari analisis sampel orang yang tidak terpapar, kromatogram ditunjukkan pada Gambar 4. Linieritas kurva kalibrasi menunjukkan terukur pada rentang 1 dan 200 µg/L sehingga perlu dikonfirmasi dengan standar internal. Presisi analisis menunjukkan reproduibilitas dengan RSD < 5% dan presisi antar hari < 10% (pengukuran terhadap sampel yang mengandung 15 µg/L s-PMA). S-PMA pada sampel urin bukan perokok kurang akurat (reproduibilitas 20% pada sampel urin yang mengandung

2,5 µg/L). Terhadap sampel urin dari perokok dan bukan perokok yang dianalisis (sebelumnya telah dikonfirmasi) masing-masing diperoleh dengan nilai rata-rata 2,0 dan 7,6 µg/g kreatinin.

#### b. Metode analisis s-PMA dengan HPLC-MS-MS

B'Hymer (2011) melaporkan bahwa High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometric (HPLC-MS-MS) ditujukan dan dievaluasi untuk penentuan s-PMA dan s-BMA dalam urin manusia. Kedua senyawa ini merupakan *biomarker* dari paparan Benzena dan Toluen, yang sangat penting dan merupakan indikator kesehatan bagi pekerja yang terlibat langsung dengan kedua senyawa tersebut. Sampel urin dioptimasi,



**Gambar 4. Kromatogram sampel urin yang tidak terpapar benzena**

Keterangan : Peak 1= s-PMA, Peak 2 = standar internal, garis tegas = kromatogram dari urin tanpa s-PMA, garis putus-putus = kromatogram sampel urin setelah di tambah 40 ng s-PMA dalam 2 mL sampel urin.

dengan SPE Obligasi Elut C-18, pencucian aliquot dengan aseton. Analisis kromatografi terdiri dari sistem gradien fase terbalik menggunakan ionisasi electrospray dalam mode ion-negatif dengan triplequadropole (sebuah detector spektromassa). Akurasi dan presisi dari metode ini ditunjukkan melalui penelitian terhadap urin dan urin sintesis. Pada urin yang di spike dengan 1, 2, 6, 8 dan 30 ng/mL menunjukkan recovery akurasi dari 99-110 %. Pengukuran presisi terhadap 9 sampel mencapai RSD 5,3% dan kurang baik untuk analit dalam urin. LOD yang dicapai sekitar 0,2 ng/mL untuk s-PMA dan s-BMA.

### **c. Metode analisis s-PMA dengan HPLC-DAD**

Metode ini telah dilaporkan juga oleh Purwanto *et al.* (2014), yang bertujuan untuk mendapatkan kondisi optimum metode HPLC untuk penentuan metabolit benzena yaitu s-PMA dalam urin. Metode ekstraksi cair-cair atau LLE digunakan sebagai metode preparasi sampel urin. HPLC menggunakan kolom Hypersil ODS 125x4 mm ID, ukuran partikel 5 $\mu$ m, suhu kolom 25°C dan detector DAD ditetapkan pada panjang gelombang 205 nm. Pemisahan optimum dicapai dengan menggunakan sistem gradien dengan eluen terdiri dari methanol dan dapar fosfat pH 3. Hasilnya menunjukkan korelasi dengan  $r=0,994$ . LOD s-PMA 0,7832 mg/mL dan LOQ = 2,6108 mg/mL. Pemulihan metode 88,34-117,16% dengan rata-rata 99,96% dan koefisien variasi (CV)

= 8,98%. Metode ini diusulkan memenuhi kriteria penerimaan untuk validasi. Metode ini sederhana dan cepat namun tingkat analisis masih di level ppm, sehingga tidak tepat untuk analisis rutin s-PMA sebagai biomarker paparan benzena tingkat konsentrasi rendah.

### **SIMPULAN**

Dari beberapa laporan yang telah dipaparkan, bahwa penetapan kadar s-PMA dalam urin sangat penting untuk mengetahui seberapa besar telah terjadi paparan benzena terhadap para pekerja yang terlibat langsung dengan senyawa tersebut, sehingga dapat mencegah atau mengurangi efek atau risiko yang buruk terhadap kesehatannya. Beberapa metode analisis s-PMA yang telah dilaporkan masih cukup rumit dalam hal preparasi sampel urin (sebagai matriks cairan biologis) dan hasil yang diperoleh pun masih belum maksimal. Oleh karena itu metode analisis s-PMA yang spesifik, sensitif, efisien dan ekonomis masih perlu dikembangkan, untuk dapat digunakan dalam analisis rutin dari sampel urin.

### **UCAPAN TERIMA KASIH**

Diucapkan terimakasih kepada T. Einig, N J van Sitter dan M Buratti (University of Milan, Italy) yang telah memberikan publikasi-publikasi penelitiannya, juga pada Dr. Mulyana, M.Kes., Apt (Prodia IndTox) dan Muchtaridi, PhD (UNPAD), atas bimbingannya.

#### DAFTAR PUSTAKA

- American Conference Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). 2012. *Threshold Limit Value for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices*. Cincinnati, Ohio, USA.
- Anonim. 2005. *SNI no. 19-0232-2005 tentang ambang batas zat kimia lingkungan kerja*.
- Arnold, Angerer J, Boogard Pj, Hughes Mf, O'lonc Rb, Robinson Sh, Schnatter Ar. 2013. The Use Of Biomonitoring Data In Exposure And Human Health Risk Assessment: Benzene Case Study. *Critical Review In Toxicology* (2): 119-153.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ASTDR)., 2005. *Toxicological Profile For Benzene*, U.S. Department Of Health And Human Service, Public Health Service, Atlanta, Georgia, USA.
- AR Bahrami, Jw Edwards. 2006. Evaluation of Benzene Exposure in Adults and Urinary s-Phenylmercapturic acid in Children Living in Adelaide South Australia. *International Journal of Environmental Science Technology*; 3(2);113-117.
- Basset W.H. 1992. *Clay's Handbook Of Environmental Health*. New York: Chapman And Hall Medical.
- Boogaard, P.J., Van Sittert, N.J. 1996. Suitability Of S-Phenyl Mercapturic Acid And Trans-Trans-Muconic Acid As Biomarkers For Exposure To Low Concentrations Of Benzene, Environmental Health Perspective. *Shell Research And Technology Centre*, 104 (6).
- Buha, S.M., Panchal, A., Pachal, H., Chanbhare, R., Kumar, S., Jain, M., Pater, P.R. 2011. Hplc-Fld For The Simultaneous Determination Of Primary And Secondary Amino Acid From Complex Biological Sample By Pre-Column Derivatization. *J. Chromatogr Sci*, 49(2):18-23.
- Buratti, M., Brambilla, G., Fustinoni, S., Pellegrino, O., Pulvirenti, S. & Colombi, A. 2001. Determination Of Monobromobimane Derivatives Of Phenylmercapturic And Benzylmercapturic Acids In Urin By High-Performance Liquid Chromatography And Fluorimetry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 751, 305-13.
- Buratti M, Fustinoni S, Columbi A. 1996., Fast liquid chromatographic determination of urinary trans,trans-muconic acid. *J Chromatography B Biomed Sci Appl*; 677:257-63.
- C.B'Hymer., 2011. Validation of an HPLC-

- MS-MS Method for the Determination of Urinary s-Benzilmercapturic acid and s-Phenyl mercapturic acid. Centers for Disease Control. *Journal of Chromatography Science*; Vol.49: 547-535.
- C. B' Hymer, M.A. Butler, and KL Cheever, 2005. A comparison and evaluation of analysis procedures for the quantification of 2-methoxyethoxy acetic acid in urine. *Anal.Bioanal.Chem*; 383: 201-209.
- C. B' Hymer, KL Cheever, M.A. Butler, and K.K. Brown 2003. Procedure for the quantification of the biomarker 2-ethoxyethoxy acetic acid in human urine samples. *J. Chromatography B*; 795: 145-150.
- Chan C C, Lam H, Lee Y C, and Zhang X M,. 2004. *Analytical Method validation and instrument Performance Verification*. John Wiley and Soon. Inc.Hoboken, New Jersey. ISSN 0-471-259535-5; 105.
- David L D And Margaret B. 2008. Solvent And Industrial Hygiene, In Principles And Methods OPf Toxicology, A. Wallace H, Editor.5<sup>th</sup>ed. New York: *Informa Healthcare*, 713-714.
- European Medicines Agency (Ema). 2011. *Guidline On Bioanalytical Method Validation*, Committee For Medicinal Product For Human (Chmp), 30 Churchill Place, Canari Wharf, London.
- Ermer And J H Mc.B Miller. 2005. *Method Validation In Pharmaceutical Analysis*, Willey Vch, Verlag Gmbh And Co. K Go.A, Weinheim.
- Failola, B., Fuller, E.S., Wong, V.A., Pluta, L., Abetnethy D.,J., Rose, J., Recio, L. 2014. Exposure Of Hematopoietic Stem Cells To Benzena Or 1,4-Benzoquinone Induces Gender Specific Gene Exposure. *J. Stem Cells*, 22(5): 750-758.
- Ferraira V, I.Jarauta, L.Ortega, J.Caho. 2004. *Journal of Chromatography A*. 1025; 147-156.
- Ghittori s, Imbriani M, Maestri L, Capodaglio E, Cavalleri A,. 1999. Determination of s-Phenylmercapturic acid in urine as an indicator of exposure to benzena. *Toxicol Lett*; 108:329-34.
- Harrison R, Saborit J M D, Dor F, And Henderson R. 2010. *Who Guidelines For Indoor Air Quality: Selected Pollutans*, Bookshelf Id Nbk 138708.
- Hamilton, R.J., Phillips, S.D., McCluskey, G.J. 2003. *Occupational, Industrial, And Enviromental Toxicology*, 2<sup>nd</sup> Ed. Pensylvania: Mosby Inc.
- Hays, M.S., Pyatt, D.W., Kirman, C.R., Aylward, L.L. 2012. Bioavailability Equivalents For Benzena. *Regul*

- Toxico Pharmacol*, 62(1): 62-73.
- International Conference On Harmonisation (ICH). 1995. Guideline For Industry Q2a, *Text On Validation Of Analytical Procedure*.
- International Agency for Research on Cancer (IARC).1989. IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *Occupational exposure in petroleum refining; crude oil and major petroleum fuels*. Lyons, France: IARC, 45.
- Ibrahim, S. 1998. Pengembangan Metode Analisis Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Seminar on HPLC Application for Analysis of Drug, Food, and Environment*. Bandung: Penerbit ITB. Hal.2-8.
- John A. 1999. *Lange's Handbook Of Chemistry*, Universitas Of Tennessee Knoxville, Fifteenth Edition, Mc.Graw Hill Inc, New York.
- Karimi, A., Golbabaie, F., Neghab, M., Pourmand, M. R., Nikpey, A., Mohammad, K. & Mehrnia, M. R. 2013. Biodegradation Of High Concentrations Of Benzene Vapors In A Two Phase Partition Stirred Tank Bioreactor. *Iranian J Environ Health Sci Eng*, 10, 10.
- Kolmetz, G. 2007. *Guidelines For Btx Revamps*, Alch E.Spring Conference, ???
- Khalade, A., Jaakkola, M.S., Pukkala, E., And Jaakkola, J.J. 2010. Exposure To Benzene At Work And The Risk Of Leukemia: A Systematic Review And Meta-Analysis. *Environmental Health*, 9:31.
- Kent And Riegel's. 2007. *Handbook Of Industrial Chemistry And Biotechnology* Vol.1, 11<sup>th</sup> Ed., Springer Science+Business Media, Llc, New York, Usa.
- Kusuma A A, Setiani O, Joko T. 2006. Analisis Pemajanan Benzene Terhadap Kadar Fenol Dalam Urin Dan Status Anemia Pada Pekerja Sektor Industri Pengelolaan Petroleum, *Jurnal Kes.Ling.Indonesia*, Vol.5, No.2.
- Little Johns, J. V. & Daugulis, A. J. 2009. A Two-Phase Partitioning Airlift Bioreactor For The Treatment Of BTEX Contaminated Gases. *Biotechnol Bioeng*, 103, 1077-86.
- Mahawati, M. 2006. *Hubungan Antara Kadara Fenol Dalam Urin Dengan Kadar Hb, Eritrosit, Trombosit, Dan Leukosit, Studi Pada Tenaga Kerja Di Industri Karoseri*, Cv. Laksana. Universitas Diponegoro.
- Maestrii, L., Ghittori, S., Imbriani, M. 1997. IRCCS, *Medical Center Of Pavia*, Via S.Boezio 24, 27100 – Pavia, Italy.
- Muchtaridi, Hasanah, A.N., Musfiroh, I. 2015. *Ekstraksi Fasa Padat*.

- Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Material Safety Data Sheet. 2007. *Gasoline All Grades*. Hess Company.
- Martin B.W Hocking.1998. *Handbook Of Chemical Technology And Pollution Control*, Departmen Of Chemistry University Of Victoria, Akademic Press, Sandiago, London, P: 638-641.
- National Institure For Occupational Health And Safety (Niosh). 2005. *Niosh Pocket Guide To Chemical Hazards*. Departement Of Health And Human Service. Centers For Diases Control And Prevention (CDC). Cincinnati: National Institure For Occupational Health And Safety.
- Paci, E., Pigin, D., Cialdella, A. M., Faranda, P. & Tranfo, G. 2007. Determiration Of Free And Total S-Phenylmercapturic Acid By Hplc/Ms/Ms In The Biological Monitoring Of Benzena Exposure. *Biomarkers*, 12, 111-22.
- Pudyoko, S. 2010. Hubungan Pajanan Benzena Dengan Kadar Fenol Dalam Urin Dan Gangguan Sistem Hematopoietic Pada Pekerja Instalasi Bbm, *Tesis*, Magister Kesehatan Lingkungan Program Pascasarjana, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Purwanto, D.A., Sitti, R.P., Annuryanti, F. 2014. Development and Validation of HPLC method for Determiration of s-Phenylmercapturic acid (s-PMA) in Urine. *International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Scinces*, Vol.6, Issue 5, Issn-0975-1491.
- Prapin Tharnpoophasiam, Pornpimol Kongtip, Waranya Wongwit, Wijitr Fungladda and Dwip Kitayaporn. 2004. *Simultaneous Determiration of trans,trans-muconic acid and s-Phenylmercapturic acid by High Pressure Liquid Chromatography and its application*. Faculty of public Health, Mahidol University, Bangkok, Thailand; vol.35;3.
- Pieter J Boogaard and Nico J van Sittert. 1996. Suitability of s-Phenylmercapturic acid and trans,trans-muconic acid as Biomarkers for exposure to Low Concentration of Benzena. Shell Research and Technology Centre, Amsterdam, *Environmental Health Prespectives*; vol.104:6.
- Rappaport, Stephen M, Kim S K, Lan Q, Vermeulen R, Waidyanatha S, Zhang L, Li G, Yin S, Hayes Rb, Rothman N, Smith M T. 2009. Evidence That Humans Metabolize Benzena Via Two Pathways, *Environmental Health Prespective Journal*, Vol. 117, No.6.
- Ruppert T, Scherer G, Tricker A R, Adlkofer F,1997. trans,trans-muconic acid a biomarker of non occupational environmental

- exposure to benzena. *Int Arch Occup Environ Health*; 69:247-51.
- Rothman N, Bechtold WE, Yin SN, *et al.*, 1998. Urinary excretion of phenol, catechol, hydroquinone, and muconic acid by workers occupationally exposed to benzena. *Occup Environ Med*; 55:705-11.
- Sauer, M., Kens, J.H., Amd Enderlein, J. 2011. *Handbook Of Fluorescence Spectroscopy And Imaging*. Weinheim: Wiley Vch Verlag Gmbh & Co Kгаа.
- Simeonov, A., Jhadav, A., Thomas, C.J., Wang, Y., Huang, R., Southall, N.T. Shinn, P., Smith, J., Austin, C.P., Auld, D.S. 2008. Fluorescence Spectroscopic Profiling Of Coumpound Libraries. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 51(8):2363-2371.
- Soemarko, D.S. 2010. Faktor Resiko Terjadinya Patahan Kromosom Limfosit Pada Pekerja Dengan Paparan Benzena Rendah. *Disertasi*. Fkui. Jakarta.
- T. Einig, W.Dehnen,. 1995. Sensitive determination of the benzene metabolite s-Phenylmercapturic acid in urine by high performace liquid chromatography with fluorescence detection. Medizinisches Institut fur Umwelthhygiene, Abteilung Biochemie, Germany. *Journal of Chromatography A*, 697: 371-375.
- Torowati dan S.G. Banawa. 2014. Penentuan nilai Limit Deteksi dan Kuantisasi alat titrasi Potensiometri untuk analisis Uranium. *Pusat Teknologi Bahan-bahan Nuklir kawasan Puspitek*, Serpong. ISSN 1979-2409; 9-15.
- Van Sitter, N.J, Boogaard P.J, Beulink G.D.J. 1993. Application Of The Urinary S-Phenylmercapturic Acid Test As A Biomarker For Low Levels Of Exposure To Benzena In Industry, , *British Journal Of Industrial Medicine*, 50:460-469.
- Wang, Z., Zhao, B., Liu, X., Zheng, Y., Wang, J., Zhang, R., Abliz, Z. 2013. A Rapid And Sensitive Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method For The Quantitation Of S-Phenylmercapturic Acid In Human Urin, *Anal.Methods*, 5:6081-6085.
- Watson, D.G. 2005. *Pharmaceutical Analysis*, Second Edition. London: Elsevier Churchill Livingstone.
- World Health Organization (WHO). 1996. *Biological Monitoring Of Chemical Exposure In Theworkplace Guidelines*, Volume 2. Geneva.