

UJI SKRINING DAN DETERMINASI KODEIN DENGAN TLC SPEKTROFOTODENSITOMETRI

Pande Made Nova Armita Sari¹, Ni Putu Eka Leliqia²

¹UPT Forensik Sains dan Kriminologi Universitas Udayana

²Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana
Bukit Jimbaran Badung, 80363, Indonesia (e-mail: nova_blumchen@yahoo.com)

ABSTRACT

A current research of screening and determination of codeine using Al-TLC Spectrophotodensitometry has been carried out. The separation was performed using TAEA mobile phase. Screening and confirmation were investigated by comparing hRfc of the analyte and hRfc those on data library. Combination hRfc vs correlation also been used as confirmation method, which can be enhanced by spectrum shift reaction using HCl 10% and KOH 0,1 M. The validation parameters were precision, linierity, limit of detection and quantitation (LOD & LOQ) and recovery.

TAEA mobile phase performed a good separation among morphine, codeine, caffeine, papaverine and bromhexine standards, which gave Rs value > 1. Test of linierity using regression gave correlation value > 0,99 . LOD and LOQ of Al-TLC were 137.85 ng and 459.63 ng. The recovery of codeine in human plasma using isopropanol as the precipitating agent was 77.1% ± 4.9 (6.5%).

Keywords: kodein; TLC/HPTLC; spektrofotodensitometri; skrining; determinasi

PENDAHULUAN

Analisis toksikologi memiliki keterkaitan dengan deteksi, identifikasi dan penetapan kadar dari senyawa obat-obatan dan berbagai komponen asing lainnya di dalam spesimen biologis serta sampel lainnya yang berhubungan (Flanagan *et al.*, 2007). Analisis toksikologi atau toksikologi forensik ini memiliki tiga langkah utama, yaitu preparasi sampel, diferensiasi (skrining dan konfirmasi), identifikasi serta determinasi. Preparasi sampel bertujuan untuk mengurangi keberadaan senyawa pengganggu yang terdapat pada matriks sampel. Sementara itu, diferensiasi bertujuan untuk mengidentifikasi komponen yang sesuai dalam jumlah yang minimum. Metode yang paling mudah untuk digunakan adalah *immunoassay* dan *thin layer chromatography* (TLC). TLC merupakan metode analitik yang relatif murah dan mudah pengerjaannya.

Uji skrining dan determinasi senyawa dengan menggunakan TLC yang dihubungkan dengan

spektrofotodensitometri memungkinkan untuk dilakukannya identifikasi analit berdasarkan kesesuaian nilai hRfc terkoreksi (hRfc) dan bentuk spektrum analit dengan senyawa yang terdapat pada

data library. hRfc merupakan suatu parameter yang memiliki nilai yang konstan untuk masing-masing senyawa pada tiap sistem TLC. Penggunaan hRfc ini pertama kali diperkenalkan oleh Zeeuw yang kemudian dikembangkan oleh *Deutsche Forschungsgemeinschaft* (DFG) dan *The International Association of Forensic Toxicologist* (TIAFT). Pengembangan metode hRfc ini diinisiasi karena adanya perubahan nilai Rf dan hRf suatu senyawa yang sama karena adanya faktor-faktor tertentu yang meliputi: jumlah analit yang ditotolkan pada plat, jarak elusi, tingkat kejenuhan bejana pengembang, suhu analisis serta kelembaban. Untuk mereduksi terjadinya kesalahan dalam uji skrining, konfirmasi dan determinasi suatu senyawa, maka digunakanlah metode hRfc. Konfirmasi dapat

dilakukan dengan penentuan hR_{fc} dan bentuk spektrum UV *in situ* senyawa analit.

Senyawa uji yang digunakan adalah kodein. Kodein merupakan alkaloid yang diperoleh dari opium atau disiapkan dari proses metilasi dari morfin. Kodein dapat ditemukan pada penggunaan heroin ilegal, yang mana heroin ilegal biasanya mengandung 3-asetilkodein. Selanjutnya di dalam tubuh asetilkodein akan dimetabolisme menjadi kodein (Flanagan *et al.*, 2007), dengan demikian senyawa kodein dapat digunakan sebagai salah satu marker dalam kasus penggunaan heroin, yang mana pengembangan uji skrining dan determinasi kodein dengan metode TLC-spektrofotodensitometri akan sangat berguna dalam bidang forensik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan metode yang efisien dan selektif untuk uji skrining dan determinasi kodein dengan metode TLC-spektrofotodensitometri.

BAHAN DAN METODE

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari: alat-alat gelas, bejana kromatografi, timbangan analitik (AND GR-200), pH-meter, TLC-Scanner 3 (CAMAG TLC Scanner 3-CAMAG-Muttenz-Switzerland), alat sentrifugasi (Clements), *Microsyringe* 100 μ L (CAMAG), Linomat V (CAMAG-Muttenz-Switzerland-131210), oven (Memmert), ultrasonik (Quigg) dan shaker (IKA).

Bahan

Bahan yang digunakan adalah morfin hidroklorida dan kodein fosfat diperoleh dari Kimia Farma. Pelarut dan pereaksi yang digunakan dalam penelitian ini merupakan pelarut standar pro analisis dari Merck-Germany yang terdiri atas: metanol, kloroform, isopropanol, toluen, aseton, etanol, ammonia pekat (25%). Fase diam (plat) kromatografi lapis tipis adalah Silika gel 60 F₂₅₄ dengan penyangga aluminium Silika gel 60 F₂₅₄ ukuran 10 x 10 cm dari Merck-Germany.

Prosedur

1. Pembuatan Larutan Standar

Larutan standar pembanding yang dibuat adalah larutan standar kodein fosfat. Sebanyak 10,0 mg standar kodein fosfat dilarutkan dengan metanol

dalam labu ukur 10 mL. Larutan diocok hingga terlarut sempurna. Konsentrasi larutan kodein fosfat adalah 1,0 mg/mL.

Larutan kerja kodein dibuat dengan konsentrasi 50 ng/ μ L. Senyawa standar yang digunakan adalah campuran yang terdiri morfin-kodein-kafein-papaverin-bromheksin yang dilarutkan dalam metanol, dengan konsentrasi masing-masing komponen zat aktif dalam campuran adalah 200 ng/ μ L.

2. Pemisahan Senyawa Standar dengan Fase Gerak dan Panjang Gelombang Maksimum

Sampel yang terdiri atas larutan standar morfin-kodein-kafein-papaverin-bromheksin ditotolkan dengan Linomat V pada plat aluminium TLC dengan jarak antar pita adalah 10 mm. Jumlah sampel yang ditotolkan pada plat secara berturut-turut adalah 100, 200, 400, 800, dan 1600 ng. Plat dielusi dengan fase gerak TAEA dengan pengembangan menaik, penjenuhan dilakukan selama 30 menit. Pengembangan dilakukan sampai tanda batas, plat kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 60⁰ C selama 5 menit. Plat dirajah dengan TLC-Scanner 3 dengan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}). Dilakukan pemindaian terhadap masing-masing puncak senyawa, lalu spektrum untuk masing-masing puncak dibaca secara *in situ* pada rentang panjang gelombang 190 s/d 400 nm.

Keterpisahan masing-masing senyawa standar dilihat dari nilai daya resolusinya, yang digunakan untuk mengukur kelayakan fase gerak yang digunakan dalam pengujian. Sementara itu pemilihan panjang gelombang dilakukan berdasarkan profil absorpsi senyawa kodein pada panjang gelombang tertentu. Panjang gelombang terpilih adalah panjang gelombang yang memberikan serapan terbesar dengan gangguan pengganggu yang minimum.

3. Pemastian Identitas

A. Penentuan hR_{fc} dan Bentuk Spektrum

Sampel yang merupakan larutan standar kodein fosfat ditotolkan dengan jumlah sampel yang ditotolkan pada plat secara berturut-turut adalah 100, 200, 400, 800, dan 1600 ng. Plat dielusi seperti pada prosedur sebelumnya. Plat dirajah dengan

TLC-Scanner 3 dengan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}). Spektrum untuk masing-masing puncak dibaca secara in situ pada rentang panjang gelombang (190 s/d 400 nm).

Uji penapisan dilakukan dengan menandai puncak-puncak analit, kemudian dilakukan penentuan hR_{fc} , perbandingan spektrum dan penentuan koefisien korelasi senyawa analit terhadap senyawa pembanding pada *data library* menggunakan program WinCATS dengan *error window* ± 7 dan ± 3 .

B. Pemanfaatan Reaksi Geseran Spektrum (HCl 10% dan KOH 0,1 M) untuk Uji Konfirmasi

Uji pemanfaatan reaksi geseran spektrum (HCl 10% dan KOH 0,1 M) untuk uji konfirmasi dilakukan dengan perlakuan asam dan basa pada plat kromatografi (Al-TLC) yang telah ditotolkan dengan standar kodein dengan jumlah kodein pada masing-masing totolan adalah 100 ng, 500 ng dan 1000 ng. Plat dielusi dengan sistem fase gerak TAEA, dikeringkan kemudian dirajah.

Plat disemprot dengan HCl 10%, dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C selama 5 menit, dirajah. Berikutnya plat yang sama disemprot dengan KOH 0,1 M selanjutnya diperlakukan sama seperti sebelumnya.

4. Uji Validasi Linomat (Presisi)

Standar kodein ditotolkan pada plat AL-TLC silica gel GF₂₅₄ dengan sepuluh kali pengulangan, kemudian dielusi seperti prosedur sebelumnya. Plat dirajah dengan TLC-Scanner 3 dengan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}). Masing-masing AUC dicatat dan diolah secara statistik untuk dihitung nilai simpangan baku relatifnya (koefisien variansi/KV).

5. Linieritas/Rentang, Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Sampel yang merupakan larutan standar kodein fosfat ditotolkan dengan seperti pada penentuan hR_{fc} dan bentuk spektrum dan dilakukan elusi. Plat dirajah dengan TLC-Scanner 3 dengan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}). Masing-masing AUC dari masing-masing sampel diplot dengan konsentrasi untuk memperoleh persamaan regresi dan nilai koefisien korelasinya.

Sementara itu penentuan LOD dan LOQ dilakukan dengan cara yang sama. Plat dirajah dengan TLC-Scanner 3 dengan panjang gelombang

maksimum (λ_{maks}). Masing-masing AUC dari masing-masing sampel dan konsentrasi diplot, dihitung batas deteksi dan kuantitasnya.

6. Ketepatan (Perolehan Kembali) Simulasi Ekstraksi Dalam Plasma Manusia

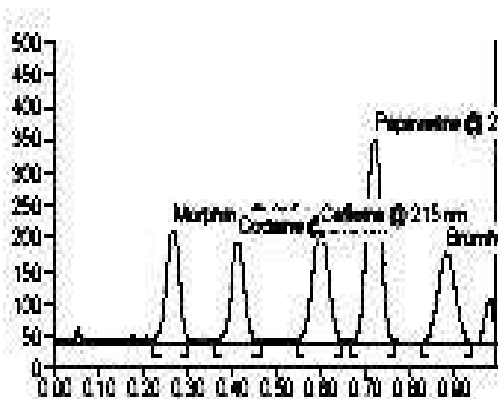
Sebanyak 0,5 mL sampel plasma manusia mengandung 2000 ng standar kodein dalam bentuk base-nya, ditampung dalam eppendorf 1,5 mL. Sampel plasma manusia ini ditambah dengan 1,0 mL pengendap protein berupa isopropanol, dimikrosentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 2000 rpm. Sebanyak 0,5 mL supernatan kemudian diambil, dan ditampung ke dalam tabung *screw cap*. Supernatan tadi ditambah 0,5 mL buffer Natrium Bikarbonat pH 9,3, serta 3,0 mL pelarut kloroform. Campuran dikocok dengan *shaker* selama 30 menit pada kecepatan 3000 rpm, dan diultrasonik selama 15 menit, sampai terbentuk emulsi yang sempurna. Kemudian dilakukan makrosentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm, sampai terbentuk dua lapisan yang terpisah dengan jelas. Fase pelarut organik (lapisan bagian bawah) diambil sebanyak 3,0 mL lalu dimasukkan ke dalam eppendorf, dan diuapkan pada suhu 60°C , sampai terbentuk ekstrak kering.

Ekstrak kering dilarutkan dengan 25 μL metanol, ditutup rapat, kemudian diultrasonik sampai sampel terlarut dengan sempurna. Sampel ditotolkan, kemudian dielusi seperti prosedur sebelumnya. Plat dirajah dengan TLC-Scanner 3 dengan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}). Konsentrasi dan % perolehan kembali kodein dihitung secara statistika.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sistem fase gerak TAEA dapat memisahkan dengan baik standar morfin-kodein-kafein-papaverin-bromheksin yang dibuktikan dengan nilai resolusi (R_s) senyawa standar lebih dari 1,0.

Hasil ini menandakan bahwa fase gerak TAEA dapat digunakan untuk pemisahan simultan kelima senyawa standar tersebut.



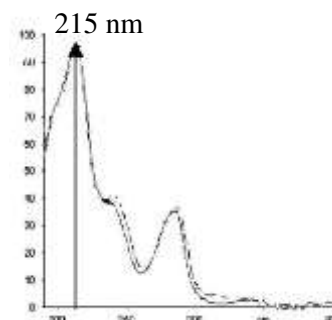
Gambar 1. Pemisahan-morfin-kodein-kafein-papaverin-bromheksin pada plat Al-TLC

Tabel 1. Daya resolusi standar kodein, morfin, kafein, papaverin dan bromheksin pada plat Al-TLC dan HPTLC

Lajur	Daya resolusi (Rs)
Morfin-Kodein	1,9
Kodein-Kafein	1,7
Kafein-Papaverin	1,2
Papaverin-Bromheksin	1,6

Pengujian pemilihan panjang gelombang maksimum dengan pemindaian diperoleh hasil λ_{maks}

untuk plat Al-TLC adalah 215, sebab pada panjang gelombang ini masing-masing noda senyawa kodein setelah dilakukan beberapa kali pengulangan pengukuran memberikan absorbansi maksimum.



Gambar 2. Profil absorpsi dan kodein pada plat AL-TLC

Keterangan : _____ = spektrum senyawa
----- = spektrum senyawa kodein

Uji pemastian identitas dilakukan dengan penandaan puncak-puncak analit dan penentuan hRfc menggunakan program WinCats. Pemastian analit ini dilakukan dengan memilih senyawa di *data library* dengan *error window* (rentang jendela) ± 3 dan ± 7 . Data hasil uji pemastian identitas kodein dengan TLC-Densitometri pada rentang jendela ± 3 dan ± 7 tersaji dalam tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji pemastian identitas kodein dengan TLC-Densitometri pada rentang jendela ± 3 & ± 7

Lajur	hRfc	Hit factor			
		± 7	± 3	± 7 vs r (>0,90)	± 3 vs r (>0,90)
1	19	65	29	3	4
2	19	64	29	5	2

Keterangan: hRfc = hRf terkoreksi; r = koefisien korelasi; *hit factor* = jumlah senyawa yang memiliki kedekatan spektrum dengan analit.

Tabel di atas menunjukkan bahwa pengujian dengan menggunakan *error window* ± 7 dan ± 3 .

Error window ± 7 menghasilkan *hit factor* yang lebih banyak dibandingkan dengan *error window* ± 3 . Hal ini disebabkan karena *error window* ± 7 memiliki jangkauan yang lebih luas dibandingkan dengan *error window* ± 3 , sehingga lingkup senyawanya juga akan semakin banyak. Jika parameter pengujian ditambahkan dengan penentuan korelasi r ($>0,90$), *hit factor* yang dihasilkan akan mengalami penyempitan. Meskipun demikian, *hit factor* yang dihasilkan masih lebih dari 1. Dengan demikian perlu digunakan metode tambahan untuk meningkatkan ketajaman uji pemastian identitas senyawa kodein, yaitu dengan reaksi geseran spektrum (HCl 10% dan KOH 0,1 M). Hasil pengujian pergeseran spektrum kodein ditampilkan pada tabel 3.

Tabel 3. Nilai koefisien korelasi spektrum kodein pada plat Al-TLC setelah perlakuan HCl 10 % dan KOH) 0,1 M

Jumlah dalam penotolan (ng)	r (<i>Street Drug</i>)	
	HCl 10 %	KOH 0,1 M
100	-	0,766
500	0,982	0,982
1000	0,974	0,982

Keterangan: r = koefisien korelasi; (-) = tidak terdapat senyawa yang memiliki kesesuaian bentuk spektrum dengan analit; *street drug* = *data library* senyawa dari program Camag

Metode ini merupakan suatu metode pengembangan untuk menguji kemurnian suatu senyawa. Keberadaan suatu pengotor dalam suatu senyawa tertentu akan menyebabkan terjadinya pergeseran spektrum dan perubahan koefisien korelasi setelah pemaparan dengan asam (HCl 10%) ataupun basa (KOH 0,1 M). Plat Al-TLC yang telah dielusi disemprot dengan HCl 10%, dikeringkan. Spektrum yang dihasilkan ditentukan nilai korelasinya (r) dengan senyawa yang terdapat pada *data library*. Setelah itu plat disemprot kembali dengan KOH 0,1 M. Tabel 3 menunjukkan

nilai koefisien korelasi standar kodein pada plat Al-TLC sebelum dan setelah perlakuan dengan asam-basa $> 0,95$ kecuali pada konsentrasi 100 ng. Ini menunjukkan bahwa dengan derajat bebas 5% dan aras kepercayaan 95% nilai korelasi spektrum kodein tidak mengalami pergeseran setelah dilakukan perlakuan dengan HCl 10% ataupun dengan KOH 0,1 M. Hal ini bersesuaian dengan penelitian sebelumnya dimana dikatakan bahwa baik morfin ataupun kodein dikatakan tidak mengalami geseran spektrum setelah perlakuan asam-basa (HCl 10% dan KOH 0,1 M). Sementara itu adanya penyimpangan hasil pada konsentrasi 100 ng dapat disebabkan karena pada penotolan konsentrasi seri pertama jumlah kodein dalam totalan sangat rendah, sehingga pada kondisi ini noda cenderung akan diganggu atau ditutupi oleh pengotor, sehingga spektrumnya akan berubah dan koefisien korelasinya akan menurun.

Uji presisi penotolan Linomat 5 dilakukan dengan menotolkan standar kodein (konsentrasi 50 ng/ μ L) pada volume yang sama yaitu 12 μ L sebanyak 10 noda. Senyawa kodein pada pengujian presisi dengan sepuluh kali pengulangan memiliki rerataan luas puncak (AUC) sebesar 105,9. Simpangan baku (SD) 6264,7 dan nilai koefisien variansi (KV) sebesar 1,7. Suatu metode yang menggunakan senyawa standar dalam penetapan presisi dikatakan memenuhi persyaratan validitas apabila mempunyai KV kurang dari 2 % (Harmita, 2004). Dengan demikian KV sebesar 1,7% menunjukkan bahwa Linomat 5 dan plat kromatografi yang digunakan memenuhi persyaratan keseksamaan.

Penentuan rentang dan linieritas dilakukan dengan menotolkan standar pada berbagai rentang konsentrasi, kemudian luas puncak kromatogram (AUC) diplot dengan kadar standar kodein dalam totalan sehingga diperoleh suatu kurva kalibrasi dengan persamaan regresi dan harga koefisien korelasi tertentu. Selanjutnya dilakukan penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi pada plat Al-TLC. Penentuan rentang dan linieritas menghasilkan persamaan yang linier dengan koefisien korelasi 0,998. Ini berarti bahwa terdapat hubungan yang linier antara konsentrasi dengan respon detektor yang dihasilkan pada rentang pengukuran yang

Pande Made Nova Armita Sari, Ni Putu Eka Leliqia

UPT Forensik Sains dan Kriminologi Universitas Udayana

Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

digunakan. Pengukuran dengan Al TLC memberikan LOD sebesar 102,3 ng dan LOQ 341,1 ng. Tabel 4 menunjukkan persamaan regresi, koefisien korelasi, batas deteksi dan batas kuantitasi kodein pada plat Al-TLC.

Tabel 4. Persamaan regresi, koefisien korelasi, batas deteksi dan batas Kuantitasi kodein pada plat Al-TLC

Persamaan Regresi	r	LOD (ng)	LOQ (ng)
$y = 2,598x + 154,13$	0,998	102,3	341,1

Keterangan: r = koefisien korelasi; LOD = batas deteksi; LOQ = batas kuantitasi

Simulasi kodein secara *in vitro* dilakukan melalui tahapan ekstraksi, pemisahan dengan metode kromatografi serta penghitungan kadar dan perolehan kembali (*recovery*). Simulasi kodein dari plasma manusia dengan pengembangan seri pengendap isopropanol dan pendapar pH 9,3 dengan pelarut pengekstraksi kloroform, menghasilkan rerataan % perolehan kembali yang baik, yaitu sebesar 77,13%. Sementara itu KV dengan pengendap isopropanol adalah 6,4%. Dari nilai % perolehan kembali dan KV yang dihasilkan dapat dikatakan bahwa seri pengendap isopropanol memiliki ketepatan dan kecermatan yang cukup baik.

SIMPULAN

Uji skrining, konfirmasi dan determinasi kodein dapat dilakukan dengan metode TLC spektrofotodensitometri. Konfirmasi dapat dilakukan dengan penentuan hRfc dan bentuk spektrum UV *in situ* dan ketajamannya dapat ditingkatkan dengan reaksi geseran spektrum.

DAFTAR PUSTAKA

- Flanagan, R. J., A. Taylor, I. D. Watson, R. Whelpton. 2007. *Fundamentals of Analytical Toxicology*. John Wiley and Sons Ltd: West Sussex.
- Harmita. 2004. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*, *Majalah Kefarmasian*. Jakarta: Departemen FMIPA UI.