

UJI KONFIRMASI DAN PENETAPAN KADAR MORFIN DENGAN KLT-SPEKTROFOTODENSITOMETRI

I Made Agus Gelgel Wirasuta^{a*}, Ida Ayu Shanti Primaningrum^a, Ketut Widyani Astuti^a

^a Jurusan Farmasi – Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam-Universitas Udayana

*Email: gelgel.wirasuta@unud.ac.id

ABSTRACT

Screening and determination test of morphine using TLC-Spectrophotodensitometry method have been studied. Screening test based on the hR_{fc} – value and the correlation value between detected spectrum and reference. The analysis results were improved by using the shift of spectrum reaction. The maximal result of screening test was obtained when determinate the hR_{fc} -value with error window of three and the spectrum correlation above 0.90. The reaction of spectrum shift showed that morphine spectrum was not significantly changed after plates sprayed with HCL 10% and KOH 0.1 M so that could be used to increasing the analysis result of substance identity determination.

Validation of method showed precision of method was 1.69%, the limit of detection 93.1 ng/spot and the limit of quantitation was 310,3 ng, percentage recovery of morphine from plasma was 106.34 ng \pm 10.79 (10.1%). TLC Spectrophotodensitometry could be used as simple and cheap method for screening and determination test of the morphine.

Keywords: *screening; determination; morphine; Al-TLC; spectrophotodensitometry*

PENDAHULUAN

Analisis toksikologi forensik secara umum meliputi uji penapisan dan pemastian. Uji penapisan adalah uji identifikasi analit berdasarkan golongan struktur senyawa menggunakan reaksi warna terhadap gugus fungsi, atau reaksi immono kimia. Uji ini seharusnya cepat, peka dan memiliki derajat kehandalan tinggi. Uji Pemastian, yang bersifat lebih spesifik daripada uji penapisan dan secara umum dilakukan dengan kromatografi [1].

KLT-Spektrofotodensitometri digunakan dalam uji konfirmasi dan penetapan kadar. Kelebihan metode ini yaitu biaya relatif murah dan menggunakan instrumen sederhana, namun tetap dapat menjadi metode analisis kualitatif yang andal bila dibantu dengan preparasi sampel yang tepat, misalnya dengan ekstraksi pelarut [2]. Uji konfirmasi dengan TLC-Spektrofotodensitometri dilakukan berdasar-kan parameter hR_f dan korelasi spektrum analit dengan spektrum pustaka (r -correl). Untuk menghilangkan pengaruh variasi nilai hR_f akibat berbagai faktor, antara lain tipe bejana pengembang, lapisan adsorben plat, arah pengembangan, fase gerak, kondisi penjuanan, kelembaban udara dan metode preparasi sampel [3], dinugakan nilai hR_f terkoreksi (hR_{fc}) yang diperoleh dari penotolan empat senyawa standar bersama analit dalam satu plat, kemudian dielusikan dengan sistem fase gerak yang telah ditetapkan. Penggunaan hR_{fc} mampu mereduksi pengaruh faktor-faktor tersebut [4]. Kombinasi antara hR_{fc} dengan spektrum UV-Vis insitu telah memanfaatkan untuk uji konfirmasi pada analisis toksikologi [5]. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan metode uji konfirmasi dan penetapan kadar morfin dengan KLT-Spektrofotodensitometri.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan pelarut dan pereaksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah standar pro analisis dari Merck-Germany, seperti: metanol, kloroform, isopropanol, toluen, aseton, etanol, ammonia pekat (25%). Plat Al-TLC Silica gel 60 F 254 dengan penyangga aluminium ukuran 10x10 cm dari Merck-Germany. Morfin HCl, kodein fosfat, kafein, papaverin dan bromheksin sebagai senyawa uji dan senyawa standar diperoleh dari Kimia Farma.

Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas, bejana kromatografi, timbangan analitik (AND GR-200), pH meter, micro syringe 100 μ L (Camag), Linomat V (Camag-Muttentz-Switzerland), TLC Scanner 3 (Camag TLC Scanner 3- Camag-Muttentz-Switzerland), sentrifuga (Clements), oven (memmert), ultrasonik (Quigg) dan *shaker* (IKA).

Cara Kerja

1. *Pembuatan larutan standar.* Dibuat larutan baku morfin konsentrasi 1,2 mg/mL dan larutan baku kodein fosfat dengan konsentrasi 1 mg/mL dalam metanol. Dari larutan baku dibuat larutan baku kerja campuran morfin dan kodein dengan konsentrasi masing-masing 50 ng/ μ L. Senyawa standar yang digunakan adalah campuran yang terdiri dari morfin-kodein- kafein- papaverin- bromheksin dengan konsentrasi masing-masing senyawa dalam campuran standar ini adalah 200 ng/ μ L dalam metanol.

2. Uji konfirmasi. a. Uji pemastian berdasarkan hRfc dan perbandingan spektrum pustaka. Analit ditotolkan pada plat Al-TLC Si 60 GF ukuran 10x10 cm yang sebelumnya telah dicuci dengan metanol dan diaktivasi pada suhu 120 °C selama 30 menit dengan linomat V dan jumlah penotolan 100, 200, 400, 800,1600 ng. Senyawa standar untuk penghitungan hRfc ditotolkan pada totolan terakhir. Pelat dielusi dengan fase gerak toluen: aseton: etanol: amonia pekat (45:5:7:3) (TAEA) pengembangan menaik, penjuanan dilakukan selama 30 menit, hingga 90 mm dari tepi bawah plat. Setelah batas pengembangan tercapai, plat dikeringkan pada oven bersuhu 60 °C selama 5 menit. Kromatogram dibaca dibawah TLC-Scanner 3, dengan *absorbance-reflectance mode* pada celah sinar datang 6x0,3 mm, masing-masing puncak dirajah spektrum insitu pada rentang panjang gelombang λ maks (190 s/d 400 nm). Uji konfirmasi dilakukan dengan menandai puncak-puncak senyawa pembanding, perhitungan hRfc dari analit menggunakan program WinCATS 4.24, konfirmasi analit dilakukan dengan memilih senyawa pustaka dengan rentang (± 7 dan ± 3), uji konfirmasi juga dilakukan menggunakan nilai hRfc \pm (error windos) dan kesesuaian spektrum ditunjukkan dengan besaran harga koefisien korelasi antar kedua spektrum.

b. Pemanfaatan reaksi geseran spektrum (HCl 10% dan KOH 0,1M) untuk uji konfirmasi. Sampel ditotolkan pada plat Al- TLC Si 60 GF 254 ukuran 5x10 cm, praperlakuan plat seperti pada percobaan sebelumnya pada jumlah penotolan 100, 500 dan 1000 ng, jarak dari tepi bawah 10 mm, dari samping kiri 15 mm, jarak antar pita 10 mm. Senyawa standar untuk penghitungan hRfc ditotolkan pada totolan terakhir dengan konsentrasi 400 ng. Pelarut pengelusi, metode elusi dan pengeringan plat dilakukan seperti percobaan sebelumnya. Plat yang telah dirajah kemudian disemprot dengan pereaksi HCl 10% dalam metanol setelah itu plat dikeringkan dalam oven suhu 60 °C selama 10 menit, lalu kembali dirajah spektrumnya menggunakan TLC scanner. Plat selanjutnya disemprot dengan KOH 0,1 M dalam metanol. Plat dirajah setelah dikeringkan dalam oven suhu 60 °C selama 10 menit.

3. Uji Penetapan Kadar

a. Keseksamaan. Penotolan dirancang seperti pada uji pemastian berdasarkan hRfc dan perbandingan spektrum pustaka, hanya jumlah penotolan dibuat sama yaitu 2400ng sebanyak 10 totolan. Plat dirajah pada panjang gelombang λ maks 215 nm. Data luas puncak kromatogram lalu diolah dengan software Microsoft Excel untuk dihitung nilai simpangan baku relatif.

b. Batas deteksi dan batas kuantitasi. Penotolan dirancang seperti pada uji pemastian berdasarkan hRfc dan perbandingan spektrum pustaka. Penghitungan batas deteksi dan batas kuantitasi dihitung berdasarkan data luas puncak kromatogram yang

dibaca pada panjang gelombang 215 nm. Penghitungan menggunakan software Microsoft Excel.

c. Perolehan kembali.

Perolehan kembali yang digunakan dalam percobaan ini menggunakan isopropanol sebagai pengendap protein plasma [6]. Dibuat larutan morfin 4000 ng/mL dalam plasma, lalu dari larutan tersebut dipipet sebanyak masing-masing sampel 0,5 mL plasma ditambah 1 mL isopropanol, diaduk hingga homogen, protein terdenaturasi diendapkan dengan sentrifuga pada (1500 rpm) selama 5 menit Sebanyak 1 mL supernatan yang didapat, dipindahkan ke dalam tabung sentrifuga. Sampel kemudian ditambahkan dapar natrium bikarbonat pH 9,3 sebanyak 1 mL, dan 4 mL kloroform. Campuran dikocok 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 kedalam tabung sentrifuga lain, kemudian dikeringkan dalam tangas air mendidih. Ekstrak kering ditambahkan 25 μ L metanol, campuran dihomogenkan/larutkan dengan ultrasonik, penotolan dan elusi noda dilakukan seperti pada percobaan sebelumnya. Data luas puncak kromatogram lalu diolah secara statistik untuk dihitung nilai perolehan kembali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Uji skrining

a. Pemilihan fase gerak

Tabel 1. Harga Rs masing-masing senyawa pada plat Al-TLC, fase gerak TAEA (45:45:7:3)

Senyawa	Rs
	Plat Al-TLC
Analit uji	
a. morfin-kodein	1,89
Campuran standar	
a. morfin-kodein	1,58
b. kodein-kafein	1,71
c. kafein-papaverin	1,20
d. papaverin-bromheksin	1,62

Tabel 1 menunjukkan pemisahan yang baik untuk analit uji maupun campuran senyawa standar dengan nilai Rs>1.

b. Uji konfirmasi berdasarkan hRfc dan perbandingan spektrum pustaka.

Penetapan rentang hRfc dari ± 7 menjadi ± 3 seperti dalam tabel 2 memperlihatkan penurunan jumlah senyawa yang diduga sebagai morfin. Penetapan hRfc saja tidak cukup mengkonfirmasi sebagai morfin, sehingga dilakukan pula perbandingan spektrum analit dengan spektrum pustaka. penetapan koefisien korelasi spektrum (r-corell) > 0.90 dan Rfc ± 3

mampu mengkonfirmasi puncak kromatogram sebagai morfin.

Tabel 2. Hasil uji skrining morfin dengan Al-TLC densitometri

Lajur	hRfc	Σsenyawa yang masuk kriteria			
		hRfc ±7	hRfc ±3	hRfc±7 vs r>0,90	hRfc±3 vs r>0,90
1	8	6	2	6	2
2	9	6	2	4	1
3	9	6	2	4	1

c. Pemanfaatan reaksi geseran spektrum (HCl 10% dan KOH 0,1M) untuk uji konfirmasi

Tabel 3. Nilai r-correl setelah disemprot HCl 10% dan KOH 0,1 M

Penotolan (ng)/spot	(r-correl)	
	HCl 10%	KOH 0,1 M
100	-	-
500	0,948	0,945
1000	0,969	0,965

Keterangan: (-) =senyawa tidak terdeteksi.

Terlihat dalam tabel 3 bahwa korelasi spektrum UV morfin setelah plat disemprot dengan HCl 10 % dan KOH 0,1M ternyata tidak menunjukkan perubahan korelasi spektrum yang signifikan ditandai dengan nilai korelasi diatas 0,90 sehingga dapat digunakan untuk meningkatkan ketajaman uji konfirmasi.

2. Uji Penetapan Kadar.

a. Keseksamaan

Rerataan luas puncak uji adalah $6264,72 \pm 105,88$ (AU) dengan koefisien variansi 1,69%. Nilai ini dapat dikatakan memenuhi persyaratan dalam penetapan kadar [7]

b. Batas deteksi dan batas kuantitasi

Tabel 4. Linearitas, batas deteksi dan batas kuantitasi morfin pada plat Al-TLC

Persamaan regresi (y=bx+a)	Nilai R	Batas deteksi (ng)	Batas kuantitasi (ng)
y= 5,598x+267,3	0,998	93,1	310,3

c. Perolehan kembali

Persen perolehan kembali morfin dari sampel plasma manusia dengan pengendap protein isopropanol didapatkan nilai $106,34 \pm 10,79$ dan koefisien variansi 10,1%.

SIMPULAN

Uji konfirmasi morfin dengan TLC- Spektrofotodensitometri menunjukkan hasil optimum ketika dilakukan penetapan hrfc±3 serta r-correl> 0,90. Morfin tidak mengalami perubahan spektrum yang

signifikan setelah penyemprotan dengan HCl 10% atau KOH 0,1 M sehingga dapat meningkatkan ketajaman hasil uji pemastian identitas. Penetapan kadar morfin pada plasma manusia memberikan hasil memuaskan menggunakan plat Al-TLC, fase gerak TAEA (45:45:7:3), pengendap protein isopropanol, pelarut pengestraksi kloroform dan dapar bikarbonat 0,1 M pH 9,3.

DAFTAR PUSTAKA

- [1]. United Nations. International Drug Control Programme, Recommended Methods for the Detection and Assay of Heroine, Cannabinoids, Cocaine, Amphetamine, Metamphetamine and Ring-substituted Amphetamine derivatives in Biological Specimens: Manual for Use by National Laboratories. New York: United Nations International Drug Control Programme. 1995. p.5-29,59-79
- [2]. Flanagan R.J., Braithwaite R.A., Brown S.S., Widdop B., de Wolff F.A. Basic Analytical Toxicology. Geneva: World Health Organization. 1995. p. 2-4
- [3]. Hahn,D. Applied Thin-Layer Chromatography. 2nd ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. 2007. p. 35,79.
- [4]. Zeeuw. Thin Layer Chromatographic Rf Values of Toxicologically Relevant Substances on Standarized Systems. 2nd revised and enlarged edition. Report XVII of the DFG commission for Clinically-Toxicologically Analysis and Special Issue of the TIAFT bulletin. Weinheim: VCH. 1992. p.19-20.
- [5]. Ojanpera I. and E. Vouri. Identification of Drugs in Autopsy Liver Samples by Instrumental Qualitative Thin Layer Chromatography. Jurnal of Chromatography A. 1994. (674). p.147-152.
- [6]. Wirasuta, I.M.A.G. Pemisahan Senyawa Turunan Morfin dan Penetapan Kadar Morfin dalam Urine Kelinci dengan cara KCKT (tesis). Bandung: ITB. 1997. p. 33-49.
- [7]. Wirasuta I M. A. G., N.M.A.R. Dewi, K.D. Cahyadi, L.P.M.K. Dewi, N.M.W.Astuti, I N.K. Widjaja, Studying Systematic Errors on Estimation Decision, Detection, and Quantification Limit on Micro-TLC, Chromatographia 2013: 76 (19): 1261-1269
- [8]. Wirasuta I M. A. G., Chemical profiling of ecstasy recovered from around Jakarta by High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)-densitometry, Egyptian Journal of Forensic Sciences (2012) 2, 97-104.