

PENGEMBANGAN METODE GC-MS UNTUK PENETAPAN KADAR ACETAMINOPHEN PADA SPESIMEN RAMBUT MANUSIA

Komang Ari Gunapria Darmapatni*, Achmad Basori dan Ni Made Suaniti

Program Studi Magister Ilmu Forensik, Sekolah Pascasarjana, UNAIR, Surabaya
Email : argun4sma@yahoo.com

ABSTRAK

Rambut dapat digunakan sebagai pilihan dalam melakukan analisis senyawa obat di dalam tubuh khususnya pada kasus-kasus penyalahgunaan obat atau keracunan yang bersifat kronik. Telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengembangkan metode untuk penetapan kadar *acetaminophen* pada spesimen rambut manusia menggunakan instrumen GC-MS. Sampel rambut diambil pada panjang 0-3 cm, 0-6 cm dan 0-10 cm pada 10 orang pasien yang mendapatkan terapi parasetamol. Preparasi sampel terdiri dari tahap dekontaminasi, destruksi, ekstraksi dan derivatisasi pada masing-masing spesimen rambut. Kemudian ekstrak diinjeksikan pada sistem GC-MS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *acetaminophen* dapat terdeteksi pada spesimen rambut dalam bentuk *acetaminophen-TMS* akibat adanya perlakuan derivatisasi menggunakan BSTFA yang mengandung TMCS 1%. Pada panjang spesimen rambut 0-3 cm diperoleh konsentrasi 0,1761-0,3392 ng/mg spesimen rambut, pada panjang spesimen rambut 0-6 cm diperoleh hasil 0,2081-0,4845 ng/mg spesimen rambut dan pada panjang spesimen rambut 0-10 cm konsentrasi *acetaminophen-TMS* dalam sampel adalah 0,2473-0,5782 ng/mg spesimen rambut.

Kata kunci : *acetaminophen*, rambut, *Gas Chromatography - Mass Spectrometry*

ABSTRACT

Hair can be used as an option in the analysis of drug compounds in the body, especially in cases of drug abuse or poisoning that is chronic. There are previous researches that have aimed to develop the method for the determination of acetaminophen levels in specimens of human hair using GC-MS. The data was taken from the hair samples that are 0-3 cm long, 0-6 cm long and 0-10 cm in 10 patients treated with paracetamol. Sample preparation consists of decontamination, destruction, extraction and derivatization processes on each hair specimen. Then the extract was injected into the GC-MS system. The results showed that *acetaminophen* can be detected in hair specimens in the form of *acetaminophen-TMS* as a result of the derivatization treatment using BSTFA containing 1% of TMCs. At the 0-3 cm long hair specimens, it was obtained the concentration of 0.1761 to 0.3392 ng/mg of hair specimens; at the 0-6 cm long hair specimens, it was obtained the concentration of 0.2081 to 0.4845 ng/mg of hair specimens; and at the 0-10 cm long hair specimens, *acetaminophen-TMS* concentration in the sample was 0.2473 to 0.5782 ng/mg of hair specimens.

Keyword : *acetaminophen, human hair, Gas Chromatography - Mass Spectrometry*

1. PENDAHULUAN

Pada tahun 2014 telah terjadi berbagai macam kasus keracunan dan penyalahgunaan obat-obatan. Berdasarkan data yang dikutip dari *website* Badan Pengawas Obat dan Makanan, pada tahun 2014 mengenai kasus keracunan diperoleh hasil bahwa keracunan disebabkan oleh beberapa salah satunya adalah penyalahgunaan obat-obatan selain NAPZA.

Monitoring senyawa obat dalam tubuh dapat dilakukan melalui cairan tubuh seperti urin, keringat, saliva dan darah. Rambut dalam berbagai kasus kriminal digunakan untuk mengetahui kecocokan *deoxyribonucleic acid* (DNA) namun rambut juga dapat digunakan sebagai pilihan dalam melakukan analisis senyawa obat didalam tubuh. Kelebihan penggunaan spesimen rambut dibandingkan urin dan darah untuk menganalisis obat adalah rambut memiliki informasi keberadaan obat yang lebih lama dengan rentang waktu minggu hingga bulan dibandingkan pada urin atau darah yang hanya mendeteksi dengan kisaran waktu beberapa jam hingga beberapa hari (Kintz, 2000). Han *et al.* (2012) menggunakan spesimen rambut dengan panjang rambut yang berbeda yakni 0-3 cm, 3-6 cm, 6-9 cm, 9-12 cm untuk menganalisis *Tetrahydrocannabinol* (THC). Berdasarkan penelitian ini diketahui bahwa konsentrasi rata-rata THC pada panjang 0-3 cm lebih besar dibandingkan 9-12 cm.

Di Inggris pada tahun 2000 hingga 2008 sebesar 90 hingga 155 orang meninggal akibat keracunan *acetaminophen* tiap tahunnya (Hawton *et al.*, 2011). *Acetaminophen* merupakan analgesik-antipiretik non opioid dan anti-inflamasi non-steroid (AINS). *Acetaminophen* dan metabolitnya memiliki sifat yang cenderung polar (Hansen *et al.*, 2012). *Acetaminophen* meniru cara kerja dari heroin (Aronson, 2014) sehingga sering digunakan secara bersama-sama dengan analgesik opioid untuk meningkatkan efektivitas analgesik dan menurunkan kebutuhan

akan analgesik opioid tersebut (Curatolo and Svetcic, 2002). Selain itu penggunaan *acetaminophen* dengan alkohol juga meningkatkan risiko nekrosis hati pada penggunaanya (Mozayani dan Raymond, 2002).

Konsentrasi obat dalam spesimen rambut relatif rendah sehingga diperlukan teknik ekstraksi yang tepat serta instrumen yang mendukung untuk menganalisis suatu senyawa dalam konsentrasi yang kecil salah satu instrument yang dapat mendeteksi suatu senyawa hingga < 1 ng/g adalah *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS). Selain instrumen yang tepat dibutuhkan juga teknik khusus sebelum sampel diinjeksikan ke dalam sistem GC-MS, salah satunya adalah teknik derivatisasi. Teknik ini digunakan apabila senyawa yang ingin diketahui keberadaannya cenderung sulit menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah senyawa *acetaminophen* dapat terdeteksi pada spesimen rambut pasien yang mendapatkan terapi parasetamol serta mengetahui pengaruh panjang spesimen rambut terhadap konsentrasi *acetaminophen* pada spesimen rambut manusia. Analisis dilakukan dengan menggunakan GC-MS dengan tambahan perlakuan derivatisasi menggunakan N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroasetamida (BSTFA) yang mengandung trimetilklorosilan (TMCS) 1%.

Upaya untuk menjamin bahwa prosedur analisis yang dipilih akan memberikan hasil yang valid dan dapat dipercaya maka harus dilakukan validasi metode. Adapun uji yang dilakukan dalam validasi metode antara lain : linieritas, batas deteksi/LoD (*Limit of Detection*), batas kuantitasi/LoQ (*Limit of Quantitation*), *accuracy* dan *precision*. Selain uji validasi dilakukan juga uji statistik untuk memastikan hasil yang diperoleh memiliki makna berdasarkan statistik.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rambut

Rambut merupakan salah satu bagian tubuh yang memiliki bentuk seperti benang yang tumbuh dari akar rambut yang ada dalam lapisan dermis dan melalui saluran folikel rambut ke luar dari kulit. Komponen kimia rambut terdiri atas 0.1-5 pigmen (melanin), 1-9% lemak, dan 65-95% protein serta komponen-komponen lainnya seperti polisakarida dan air (Kintz, 2007). Clay *et al.*, (1940) menemukan bahwa dalam rambut yang berwarna hitam mengandung lebih banyak kandungan protein sistein (Asquith, 1977)

Rambut kepala dihasilkan selama periode waktu 4-8 tahun sedangkan non rambut kepala dihasilkan selama periode kurang dari 12 bulan dengan pertumbuhan rata-rata 0,6-1,42 cm per bulan hal ini tergantung pada tipe rambut dan lokasi tumbuhnya (Saitoh, 1969). Tingkat pertumbuhan rambut kulit kepala manusia adalah sekitar 0,35 mm per hari pada pria dan wanita, namun hal ini sangat bervariasi (Kintz, 2007).

Berdasarkan penelitian Pötsch (1996) ditemukan beberapa variasi pertumbuhan rambut yakni 0,07 dan 0,78 mm per hari sedangkan 82% dari populasi penelitian mempunyai variasi antara 0,32 dan 0,46 mm per hari. Siklus pertumbuhan rambut manusia dimulai dengan fase *anagen* atau fase pertumbuhan, yaitu folikel berkembang dan rambut diproduksi. Durasi fase *anagen* sangat bervariasi dan biasanya berlanjut antara 7-94 minggu, namun dapat berlangsung selama beberapa tahun, tergantung pada daerah anatominya (Castanet and Ortonne, 1997). *Catagen* adalah fase regresi, yaitu ketika aktivitas bola folikel berhenti dan dermal papila mengkerut ketika folikel mendekati fase istirahat, *telogen*, kemudian setelah fase *telogen*, siklus pertumbuhan lain dimulai (Kintz, 2007). Gambar 2.1 Struktur folikel

rambut (Kintz, 2007) sedangkan Gambar 2.2 Fase pertumbuhan rambut (Kintz, 2007)

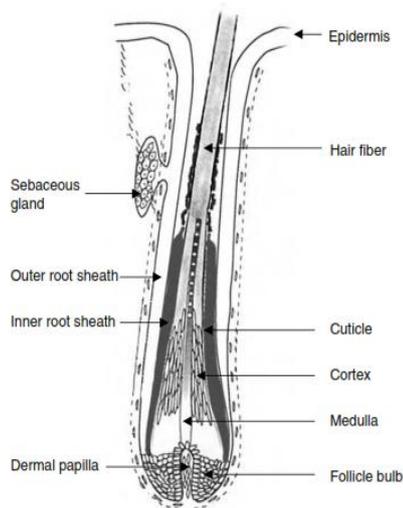
Baugartner (1979) melakukan penelitian keberadaan metabolit morfin pada sampel rambut yang berasal dari seorang pengguna heroin dengan metode radioimmunoassay (RIA), diperoleh hasil bahwa perbedaan konsentrasi morfin dalam sepanjang helai rambut tersebut berhubungan dengan waktu pemakaian. Terdapat tiga model penyatuan obat yang telah diteliti antara lain : obat bisa masuk ke dalam rambut melalui (1) difusi aktif atau pasif dari aliran darah yang memenuhi papila dermal, (2) difusi dari keringat dan sekresi lainnya membasahi serat rambut yang tumbuh atau yang sudah dewasa, atau (3) obat eksternal dari uap atau serbuk yang berdifusi ke dalam serat rambut dewasa (Kintz, 2007).. Gambar 2.3 menunjukkan mekanisme distribusi obat ke dalam rambut.

2.2 Parasetamol

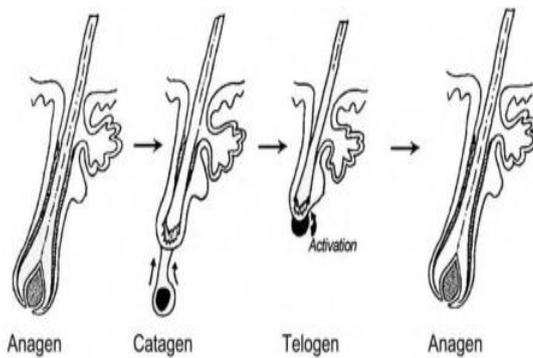
Parasetamol mempunyai rumus molekul $C_8H_9NO_2$ dengan berat molekul 151,16 g/mol. Nama lain dari parasetamol adalah *acetaminophen* atau 4-hidroksi asetilnida. Parasetamol memiliki kelarutan sangat rendah bila dilarutkan dalam pelarut nonpolar seperti toluena. Pada alkohol kelarutan parasetamol akan menurun dengan peningkatan panjang rantai karbon sedangkan dalam air kelarutan parasetamol jauh lebih rendah daripada di pelarut polar lainnya seperti alkohol (Granberg and Rasmuson, 1999). *Acetaminophen* dapat membentuk ikatan dengan gugus thiol pada sistein (Lemke *et al.* 2007).

Penelitian Saito (2008) telah berhasil melakukan analisis *acetaminophen* menggunakan spesimen rambut pada kasus keracunan dalam kondisi *overdose* (OD). Dari penelitian ini diketahui pula bahwa limit deteksi GC-MS adalah 0,1 ng/mg dengan

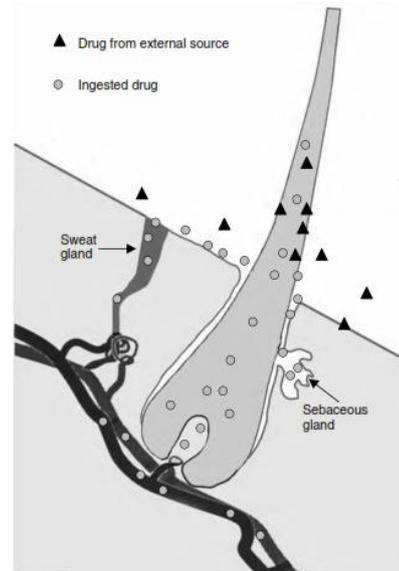
jumlah spesimen rambut yang digunakan sebanyak 20 mg.



Gambar 2.1 Struktur folikel rambut (Kintz, 2007)



Gambar 2.2 Fase pertumbuhan rambut (Kintz, 2007)



Gambar 2.3 Mekanisme distribusi obat ke dalam rambut (Kintz, 2007)

2.3 GC-MS

Teknik GC pertama kali diperkenalkan oleh James dan Martin pada tahun 1952 (Sparkman *et al.*, 2011). GC merupakan salah satu teknik kromatografi yang hanya dapat digunakan untuk mendeteksi senyawa-senyawa yang mudah menguap. Kriteria menguap adalah dapat menguap pada kondisi vakum tinggi dan tekanan rendah serta dapat dipanaskan (Drozd, 1985).

Dasar pemisahan menggunakan kromatografi gas adalah penyebaran cuplikan pada fase diam sedangkan gas sebagai fase gerak melulusi fase diam. Cara kerja dari GC adalah suatu fase gerak yang berbentuk gas mengalir di bawah tekanan melewati pipa yang dipanaskan dan disalut dengan fase diam cair atau dikemas dengan fase diam cair yang disalut pada suatu penyangga padat. Analit tersebut dimuatkan ke bagian atas kolom melalui suatu portal injeksi yang dipanaskan. Suhu oven dijaga atau diprogram agar meningkat secara bertahap. Ketika sudah berada dalam kolom, terjadi proses pemisahan antar komponen. Pemisahan ini akan bergantung pada lamanya waktu relatif yang dibutuhkan oleh komponen-

komponen tersebut di fase diam (Sparkman *et al.*, 2011).

Seiring dengan perkembangan teknologi maka instrument GC digunakan secara bersama-sama dengan instrumen lain seperti *Mass-Spectrometer* (MS).

Spektrometer massa diperlukan untuk identifikasi senyawa sebagai penentu bobot molekul dan penentuan rumus molekul. Prinsip dari MS adalah pengionan senyawa-senyawa kimia untuk menghasilkan molekul bermuatan atau fragmen molekul dan mengukur rasio massa/muatan. Molekul yang telah terionisasi akibat penembakan elektron berenergi tinggi tersebut akan menghasilkan ion dengan muatan positif, kemudian ion tersebut diarahkan menuju medan magnet dengan kecepatan tinggi. Medan magnet atau medan listrik akan membelokkan ion tersebut agar dapat menentukan bobot molekulnya dan bobot molekul semua fragmen yang dihasilkan (David, 2005). Kemudian detektor akan menghitung muatan yang terinduksi atau arus yang dihasilkan ketika ion dilewatkan atau mengenai permukaan, *scanning* massa dan menghitung ion sebagai *mass to charge ratio* (m/z). Terdapat 4 (empat) proses dalam spektrometri massa yakni ionisasi, percepatan, pembelokkan dan pendeteksian.

Derivatisasi merupakan proses kimiawi untuk mengubah suatu senyawa menjadi senyawa lain yang mempunyai sifat-sifat yang sesuai untuk dilakukan analisis menggunakan kromatografi gas atau menjadi lebih mudah menguap. Hal ini dilakukan jika suatu senyawa diketahui sulit menguap maka dilakukan derivatisasi terlebih dahulu sebelum dianalisis menggunakan GC. (Drozd, 1985).

Derivatisasi dilakukan karena terdapat senyawa-senyawa dengan berat molekul besar yang biasanya tidak mudah menguap karena adanya gaya tarik-menarik inter molekuler antara gugus-gugus polar atau yang mengandung hidrogen aktif seperti SH, -OH, -NH dan -COOH maka jika gugus-

gugus polar ini ditutup dengan cara derivatisasi akan mampu meningkatkan volatilitas senyawa. Selain itu beberapa senyawa volatil mengalami dekomposisi parsial karena panas sehingga diperlukan derivatisasi untuk meningkatkan stabilitasnya (Drozd, 1985).

Sililasi merupakan salah satu proses derivatisasi dengan menghasilkan produk berupa derivatif silil yang sangat volatil, dan lebih stabil pada suhu yang tinggi. Cara kerja dari penderivat tipe silil ini adalah dengan mengganti gugus hidrogen (H) dengan trimetilsilil atau TMS (Regis, 1998).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Bahan penelitian

Spesimen yang digunakan dalam penelitian ini adalah rambut. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah bahan kimia dalam derajat pro analisis (p.a) yang terdiri dari diklorometana (CH_2Cl_2), metanol (CH_3OH), standar pembanding *acetaminophen* dan N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroasetamida (BSTFA) yang mengandung trimetilklorosilan (TMCS) 1% yang diperoleh dari *Sigma Aldrich Chemical Singapore*.

3.2 Instrumen penelitian

Alat yang digunakan meliputi alat-alat gelas yang umum digunakan dalam laboratorium analisis, *box* es, pipet mikro dengan ukuran 1000 μL (200-1000 μL) dan 20 μL (2-20 μL), neraca analitik, gunting *stainless steel*, wadah plastik tertutup, *Gas Chromatography* (GC) tipe Agilent 6890N dengan kolom kapiler HP-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) dan detektor *Mass Spectrometry* (MS) tipe Agilent 5973.

3.3 Pengumpulan data

3.3.1 Preparasi Larutan Standar Parasetamol
Sebanyak 1 mg standar parasetamol ditimbang, kemudian

dilarutkan dengan metanol (98%) dalam labu ukur 10 mL hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan standar parasetamol dengan konsentrasi 100 ppm. Kemudian larutan standar parasetamol 100 ppm dipipet berturut-turut 0,3 mL; 0,7 mL; 1 mL; 1,5 mL dan 2 mL, dimasukkan masing-masing dalam labu 10 mL dan ditambahkan metanol 98% hingga tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar yakni 3 ppm, 7 ppm, 10 ppm, 15 ppm dan 20 ppm. Seluruh larutan standar diderivatisasi sebelum diinjeksikan ke sistem GC-MS.

3.3.2 Ekstraksi spesimen rambut simulasi

Spesimen rambut yang diperoleh dari orang sehat, 100 mg spesimen rambut didekontaminasi terlebih dahulu, dihomogenasi, dan diekstraksi dengan 1 mL larutan *acetaminophen* 10 ppm pada suhu 45°C selama 2 jam. Ekstrak cairnya di sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Ekstrak diuapkan hingga 990 µL. Kemudian sebanyak 10 µL BSTFA yang sudah mengandung TMCS 1 % ditambahkan ke dalam ekstrak. Tabung disegel dan dipanaskan pada 60°C selama 20 menit. Setelah derivatisasi, spesimen didinginkan sampai suhu kamar. Sebanyak 1 µL spesimen hasil derivatisasi disuntikkan ke dalam kondisi GC-MS terpilih.

3.3.3 Preparasi dan analisis spesimen rambut

Analisis pada rambut dilakukan pada 10 orang pasien (sukarelawan) yang mendapatkan terapi tablet parasetamol yang sama pada dosis terapi. Masing-masing spesimen rambut dipotong dengan panjang 0-3 cm, 0-6 cm dan 0-10 cm.

Setiap helai rambut diperoleh dengan cara rambut digunting menggunakan gunting *stainless steel*. Rambut diambil pada bagian depan, atas, samping kanan, samping kiri, dan

bagian belakang. Kemudian dimasukkan ke dalam wadah plastik dan disimpan pada suhu ruang (Wijayaputra, 2011).

Sebanyak 200 mg spesimen rambut ditimbang. Kemudian didekontaminasi dengan 5 mL diklorometana selama 2 menit pada suhu ruang, 5 mL air hangat selama 2 menit dan 5 mL diklorometana selama 2 menit (Saito, 2008). Setelah didekontaminasi, spesimen rambut digunting menjadi kecil dan diinkubasi pada 45°C selama 2 jam dalam 1 mL metanol. Kemudian lapisan air ditampung dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit (Wijayaputra, 2011). Supernatan yang diperoleh diambil dan diuapkan menggunakan nitrogen. Residu yang diperoleh kemudian diderivatisasi. Sebanyak 10 µL BSTFA dengan TMCS 1 % ditambahkan ke residu. Tabung disegel dan dipanaskan pada 60°C selama 20 menit. Setelah derivatisasi, spesimen didinginkan sampai suhu kamar. Sebanyak 1 µL spesimen hasil derivatisasi disuntikkan ke dalam sistem GC-MS.

3.3.4 Cara Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini akan berupa kromatogram dengan puncak (*peak*), waktu retensi (tR) dan luas puncak yang kemudian dilakukan perhitungan untuk validasi metode dan konsentrasi senyawa parasetamol. Konsentrasi senyawa *acetaminophen* dalam spesimen rambut diperoleh dengan cara luas puncak spesimen diplotkan dalam persamaan regresi linier standar sehingga diperoleh konsentrasi *acetaminophen* dalam spesimen rambut pasien. Kemudian dilakukan uji statistic regresi linier sederhana menggunakan *software IBM SPSS Statistics 24*.

4.4 Validasi metode

4.4.2 Linieritas

Uji linieritas dilakukan dengan cara membuat persamaan regresi linier

berdasarkan konsentrasi dan area, dengan rumus :

$$y = bx + a$$

dengan,

$$y = \text{luas puncak (peak area)}$$

$$x = \text{konsentrasi zat}$$

kemudian dihitung harga koefisien korelasi.

4.4.3 Penentuan batas deteksi (LoD) dan batas kuantitasi (LoQ)

Untuk menentukan LoD dan LoQ dapat digunakan rumus :

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S\left(\frac{y}{x}\right)}{\text{slope}} \quad S(y/x) = \sqrt{\frac{(Y-Y_i)}{n-2}}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times S\left(\frac{y}{x}\right)}{\text{slope}}$$

4.4.4 Akurasi (persen recovery)

Untuk menentukan akurasi maka dilakukan perhitungan persen *recovery* atau perolehan kembali menggunakan ekstrak cair spesimen rambut simulasi. Digunakan rumus nilai *recovery*:

$$\text{Recovery} = \frac{M2}{M1} \times 100\%$$

4.4.5 Presisi

Presisi diperoleh dengan menginjeksikan masing-masing standar *acetaminophen* sebanyak 3 (tiga) kali, kemudian dihitung nilai presisi berdasarkan harga koefisien variasi, dengan rumus :

$$\text{CV} = \frac{S_b}{\bar{X}}$$

dengan,

S_b : simpangan baku relatif

\bar{X} : harga rata-rata dari banyaknya pengukuran

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Validasi Metode Penelitian

Berdasarkan hasil analisis terlihat bahwa pada blanko tidak ditemukan puncak yang merupakan senyawa *acetaminophen*, sedangkan pada larutan standar terkonsentrasi menunjukkan puncak senyawa

acetaminophen dalam bentuk derivatnya yakni *acetaminophen-TMS* pada waktu retensi 18.10 pada mode Full Scan dan 18.09 pada mode SIM (*Selected Ion Monitoring*).

Mode Full Scan merupakan mode untuk menganalisis keseluruhan senyawa dalam sampel, sedangkan mode SIM merupakan mode operasi tanpa merekam keseluruhan spektra, namun hanya ion-ion tertentu (Moffat, *et al.*, 2004). Mode *Full Scan* dilakukan terlebih dahulu guna memastikan senyawa apa yang terdapat dalam sampel tersebut, kemudian jika senyawa yang dicari telah ditemukan maka dilakukan analisis dengan mode SIM, mode SIM relatif lebih peka dikarenakan dengan mode SIM senyawa-senyawa dengan ion-ion fragmentasi yang diinginkan atau dengan kelimpahan yang tinggi saja yang akan dideteksi walaupun konsentrasinya relatif rendah.

Pada penelitian ini digunakan ion fragmentasi 166, 181, dan 223 karena memiliki kelimpahan relative lebih tinggi dan spesifik. Hal ini terbukti bila ditinjau dan membandingkan hasil analisis full scan dan SIM. Pada mode full scan semua senyawa yang ada pada ekstrak terdeteksi oleh instrumen, namun pada mode SIM hanya terlihat 1 puncak yang merupakan *acetaminophen-TMS*.

4.1.1 Linieritas

Linieritas berfungsi untuk membuktikan hubungan linier antara konsentrasi dan *peak area*. Berdasarkan perhitungan diketahui bahwa nilai koefisien korelasi (r) = 0,9950. Nilai koefisien korelasi yang mendekati +1 menunjukkan adanya korelasi positif yang kuat antar variabel sedangkan berdasarkan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0.9901 yang menunjukkan bahwa variabel X (konsentrasi larutan standar) mempengaruhi variabel Y (luas area) sebesar 99,01%.

4.1.2 Presisi

Nilai presisi dihitung berdasarkan harga koefisien variasi. Tabel 4.1 menunjukkan harga koefisien variasi masing-masing larutan standar *acetaminophen*. Nilai presisi dihitung berdasarkan harga koefisien variasi. Nilai % RSD menyatakan tingkat ketelitian analisis, semakin kecil nilai % RSD maka makin teliti tingkat ketelitiannya, namun hal ini disesuaikan dengan konsentrasi komponen terukur dalam sampel. Semakin kecil konsentrasi komponen maka semakin besar nilai % RSD yang dihasilkan.

Tabel 4.2 menunjukkan tingkat presisi berdasarkan konsentrasi analit yang dianalisis yang dikutip dari *American pre-Veterinary Medical Assosiation* (2004) sedangkan berdasarkan *Association of Analytical Communities* (AOAC) tingkat presisi disesuaikan juga dengan konsentrasi komponen dalam sampel. Tabel 4.3 menunjukkan tingkat presisi disesuaikan juga dengan konsentrasi komponen dalam sampel berdasarkan AOAC.

Tabel 4.1 Harga koefisien variasi masing-masing larutan standar *acetaminophen*

No	Konsentrasi (ppm)	% RSD
1.	3	17.5%
2.	7	7.67%
3.	10	1.85%
4.	15	2.5%
5.	20	2.9%

Ditinjau berdasarkan APVMA metode uji yang digunakan dalam penelitian ini memenuhi syarat % RSD yang diterima karena konsentrasi komponen terukur $\leq 0.10\%$ atau ≤ 100 ppm dengan syarat keberterimaan $\leq 20\%$.

Tabel 4.2 Tingkat presisi berdasarkan konsentrasi analit yang dianalisis berdasarkan *American pre-*

Veterinary Medical Assosiation (2004)

Jumlah komponen terukur dalam sampel	Tingkat presisi
$\geq 10.00\%$	$\leq 2\%$
$1.00\% \leq x \leq 10.00\%$	$\leq 2\%$
$0.10\% \leq x \leq 1.00\%$	$\leq 10\%$
$\leq 0.10\%$	$\leq 20\%$

Tabel 4.3 Tingkat presisi disesuaikan juga dengan konsentrasi komponen dalam sampel berdasarkan AOAC.

Konsentrasi	Presisi
100%	$\leq 1\%$
10%	$\leq 1,5\%$
1%	$\leq 2\%$
0.1%	$\leq 3\%$
0.01% (100 ppm)	$\leq 4\%$
10 ppm	$\leq 6\%$
10 ppb	$\leq 15\%$

Bila digunakan acuan AOAC maka hanya konsentrasi 10, 15 dan 20 ppm yang memenuhi syarat keberterimaan yakni $\leq 4\%$ untuk konsentrasi 15 dan 20 ppm sedangkan $\leq 6\%$ untuk konsentrasi 10 ppm. Adanya variasi pada hasil presisi dapat disebabkan karena kesalahan acak. Kesalahan acak merupakan kesalahan dalam pengukuran karena gangguan dan perbedaan kondisi setiap pengukuran sehingga dihasilkan angka yang berbeda.

Tabel 4.4 Syarat keberterimaan % recovery disesuaikan dengan konsentrasi berdasarkan AOAC.

Konsentrasi	Batas Recovery
100%	98-101%
10%	95-102%
1%	92-105%
0.1%	90-108%
0.01% (100 ppm)	85-110%
10 ppm	80-115%
10 ppb	70-125%

4.1.3 Nilai LOD dan LOQ

Berdasarkan perhitungan diperoleh nilai LOD sebesar 2.31 mg/L sedangkan nilai LOQ sebesar 7.71 mg/L. Nilai LOD berguna untuk mengetahui jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat dideteksi oleh instrument sedangkan nilai LOQ menunjukkan jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih memenuhi kriteria presisi dan akurasi. Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh konsentrasi terkecil analit dalam sampel yang dapat terdeteksi adalah 2.31 mg/L dan konsentrasi terkecil analit dalam sampel yang memenuhi kriteria presisi dan akurasi namun masih dapat dideteksi adalah 7.71 mg/L.

Jika ditinjau berdasarkan hasil perhitungan LOQ maka hal ini sesuai dengan perhitungan presisi yang menunjukkan bahwa konsentrasi 3 dan 7 ppm menghasilkan nilai presisi yang kurang memenuhi kriteria jika menggunakan acuan keberterimaan presisi AOAC.

4.1.4 Akurasi

Hasil perhitungan terhadap larutan standar 10 dan 15 ppm diperoleh % recovery yakni 84,3% dan 87%. Berdasarkan AOAC syarat keberterimaan % recovery disesuaikan dengan konsentrasi yang digunakan. Tabel 4.4 menunjukkan syarat keberterimaan % recovery disesuaikan dengan konsentrasi berdasarkan AOAC.

Maka jika ditinjau berdasarkan tabel AOAC, hasil % recovery pada konsentrasi 10 dan 15 ppm telah memenuhi syarat keberterimaan.

4.2 Pengaruh Perlakuan Derivatisasi Terhadap Hasil Pengukuran Larutan Standar Acetaminophen

Dipilihnya BSTFA sebagai agen penderivat karena BSTFA mampu bereaksi dengan berbagai senyawa organik polar dengan menggantikan hidrogen aktif dengan trimetilsilil ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), selain itu BSTFA bereaksi

lebih cepat dibandingkan penderivat dengan prinsip sililasi lainnya seperti bis(trimetilsilil)asetamida atau BSA sedangkan TMCS berguna untuk meningkatkan reaktivitas BSTFA (Regis, 1998). BSTFA yang mengandung 1% TMCS merupakan reagen sililasi yang memiliki sifat pelarut yang baik serta dapat berfungsi tanpa melakukan penambahan pelarut lainnya (Knapp, 1979).

Pada larutan standar *acetaminophen* 20 ppm yang diinjeksikan ke dalam sistem GC-MS tanpa perlakuan derivatisasi, diperoleh hasil puncak yang tidak beraturan dan cenderung lebih dari 1 puncak. Hal ini dapat disebabkan senyawa *acetaminophen* tidak stabil pada suhu tinggi sehingga dapat terdekomposisi parsial yang menyebabkan terdapat beberapa puncak *acetaminophen* yang sama namun dengan waktu retensi yang berbeda, sehingga konsentrasi senyawa menjadi tidak dapat diketahui melalui *peak area*. Maka metode tanpa derivatisasi kurang laik digunakan dalam menganalisis senyawa *acetaminophen* menggunakan GC-MS. Gambar 4.2 menunjukkan kromatogram senyawa *acetaminophen* pada larutan standar tanpa derivatisasi sedangkan Gambar 4.3 merupakan kromatogram senyawa *acetaminophen* pada larutan standar (derivatisasi) menggunakan mode SIM

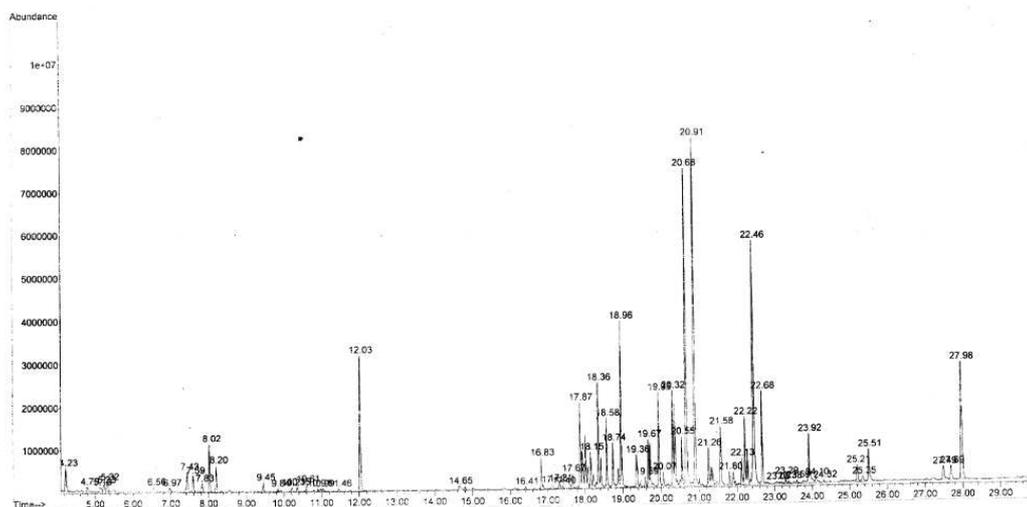
Pada larutan standar *acetaminophen* 20 ppm yang diinjeksikan ke dalam sistem GC-MS dengan perlakuan derivatisasi, diperoleh hanya 1 puncak untuk senyawa *acetaminophen*, yakni dalam bentuk *acetaminophen-TMS*. *Acetaminophen-TMS* ($\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_2\text{Si}$) merupakan derivat *acetaminophen* akibat pergantian gugus H dengan Trimetilsilil ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$) pada molekul NH. Perubahan senyawa menyebabkan terjadinya perubahan berat molekul (BM). Senyawa *acetaminophen-TMS* memiliki BM 223.34 g/mol dengan ion fragmentasi

yang memiliki kelimpahan tertinggi antara lain : 166, 181, dan 223.

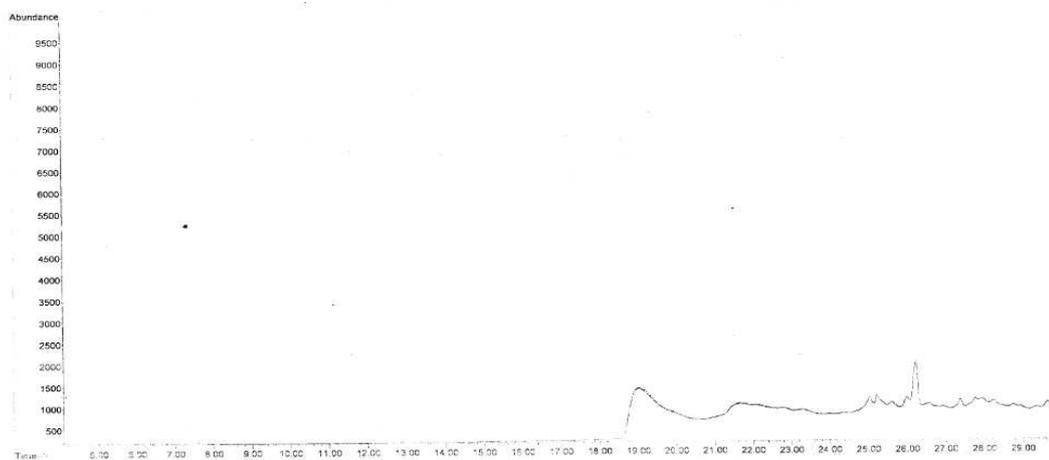
4.3 Analisis senyawa acetaminophen pada spesimen rambut

Analisis dilakukan pada 10 sukarelawan yang mendapatkan terapi *acetaminophen* kemudian diambil spesimen rambutnya pada panjang 0-3 cm, 0-6cm dan 0-10 cm untuk dianalisis. Dari 10 orang subyek penelitian, 2 diantaranya tidak terdeteksi senyawa

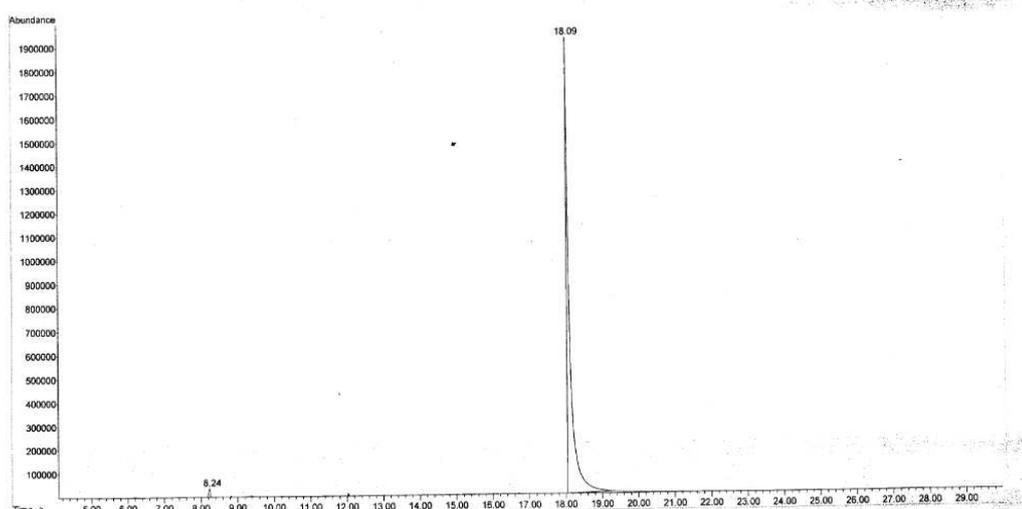
acetaminophen, sedangkan 8 lainnya terdeteksi senyawa *acetaminophen* dalam bentuk *acetaminophen-TMS*. Sebagai pembanding maka digunakan sampel blanko yang diperoleh dari sukarelawan yang tidak mendapatkan terapi *acetaminophen* dan dibuat larutan standar *acetaminophen* dengan konsentrasi tertentu. Gambar 4.1 merupakan kromatogram blanko (full scan)



Gambar 4.1 Kromatogram blanko (full scan)



Gambar 4.2 Kromatogram senyawa *acetaminophen* pada larutan standar (tanpa derivatisasi) menggunakan mode SIM.



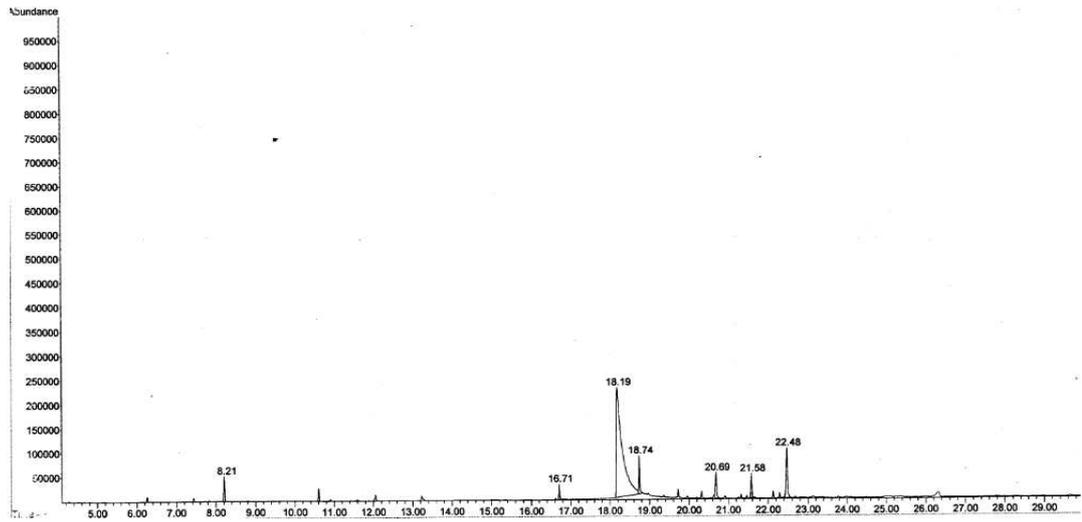
Gambar 4.3 Kromatogram senyawa *acetaminophen* pada larutan standar (derivatisasi) menggunakan mode SIM

Pada larutan standar dengan konsentrasi 20 ppm muncul 1 puncak pada waktu retensi 18.09 menit yang ditinjau berdasarkan Ion fragmentasi dan library C:\Database\wiley7n.l merupakan *acetaminophen-TMS* sedangkan pada blanko terdapat puncak dengan waktu retensi 18.15 menit namun berdasarkan Ion fragmentasi dan Library, senyawa tersebut adalah Piridinkarboksaldehid. Pada sampel muncul puncak pada waktu retensi 18.19 menit dan berdasarkan ion fragmentasi didukung Library senyawa tersebut merupakan *Acetaminophen-TMS*. Gambar 4.4 menunjukkan kromatogram senyawa *acetaminophen* pada sampel spesimen rambut. Terlihat beberapa puncak lain selain puncak *acetaminophen* karena spesimen rambut tersusun atas berbagai macam senyawa lain yang bersifat kompleks sehingga memungkinkan bagi senyawa lainnya ikut terekstraksi dan terdeteksi.

Terdapat 2 sampel yang menunjukkan hasil bahwa *acetaminophen* tidak terdeteksi pada spesimen rambut, hal ini disebabkan :

1. Faktor dosis obat yang pernah dikonsumsi sebelumnya.
2. Faktor rute perjalanan *acetaminophen* setelah dikonsumsi.
3. Konsentrasi *acetaminophen* pada spesimen rambut di bawah limit deteksi.
4. Jumlah spesimen rambut yang sedikit.
- 4.4 Pengaruh panjang spesimen rambut terhadap konsentrasi *acetaminophen* pada spesimen rambut

Dari 8 subyek yang terdeteksi senyawa *acetaminophen* maka dilakukan perhitungan untuk mengetahui kadar *acetaminophen*. Berdasarkan hasil perhitungan diketahui pada panjang spesimen rambut 0-3cm konsentrasi *acetaminophen* 0,1761-0,3392 ng/mg spesimen rambut, pada panjang spesimen rambut 0-6 cm diperoleh hasil 0,2081-0,4845 ng/mg spesimen rambut dan pada panjang spesimen rambut 0-10 cm konsentrasi *acetaminophen-TMS* dalam sampel adalah 0,2473-0,5782 ng/mg spesimen rambut. Kemudian dilakukan uji statistik regresi linier sederhana menggunakan software IBM SPSS Statistics 24.



Gambar 4.3 Kromatogram senyawa *acetaminophen* pada sampel spesimen rambut

Tujuan uji regresi linier sederhana ini adalah untuk mengetahui hubungan pengaruh signifikan variabel independen (panjang spesimen rambut) terhadap variabel dependen (konsentrasi senyawa *acetaminophen*). Berdasarkan hasil uji regresi linier sederhana diperoleh nilai $r = 0.535$ yang menunjukkan bahwa 53.5% dari varians konsentrasi senyawa *acetaminophen* dapat dijelaskan oleh perubahan dalam variabel panjang spesimen rambut sedangkan 46.5% sisanya dijelaskan oleh faktor di luar model. Diperoleh persamaan :

$$Y = 0.202 + 0.019 X + e$$

dengan nilai probabilitas (nilai signifikan) adalah 0,007. Nilai ini kurang dari 0.05 yang berarti variabel independen (panjang spesimen rambut) berpengaruh positif dan signifikan terhadap variabel dependen (konsentrasi senyawa *acetaminophen*). Makna berpengaruh positif artinya makin panjang spesimen rambut maka makin tinggi konsentrasi senyawa *acetaminophen* pada penelitian ini.

Pada panjang 0-10 cm diperoleh nilai konsentrasi tertinggi, dapat disebabkan karena dengan panjang spesimen rambut 10 cm maka dapat dikatakan bahwa usia rambut tersebut ≤ 10 bulan karena menurut Saitoh (1969) rata-rata 0,6-1,42 cm per bulan, sehingga memungkinkan untuk lebih banyak senyawa obat yang berikatan dengan spesimen rambut.

5. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa :

- Acetaminophen* dapat dideteksi pada spesimen rambut menggunakan GC-MS.
- Perlakuan derivatisasi dapat mengoptimalkan hasil analisis *acetaminophen* pada spesimen rambut menggunakan GC-MS.

- Terdapat pengaruh panjang spesimen rambut terhadap konsentrasi senyawa *acetaminophen* yang dianalisis menggunakan GC-MS.

5.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut terhadap senyawa golongan narkotika, psikotropika maupun doping pada spesimen rambut dengan memperhatikan waktu konsumsi dari obat-obatan tersebut. Selain itu perlu dilakukan kembali penelitian dengan menggunakan panjang spesimen rambut yang lebih dari 10 cm untuk membuktikan ketahanan masing-masing senyawa obat dalam spesimen rambut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Melalui kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada semua pihak atas saran dan kritiknya sehingga penelitian ini dapat terselesaikan

DAFTAR PUSTAKA

- APVMA, 2004, *Guidelines For The Validation Of Analytical Methods For Active Constituent, Agricultural And Veterinary Chemical Product*, Kingston APVMA, Australia.
- Aronson, J.K., 2014, *Side Effect of Drug Annual 35*, University of Oxford, Elsevier
- Asquith, R.S., 1977, *Chemistry of Natural Protein Fiber*, Plenum Press, New York and London
- Castanet, J. and Ortonne, J.-P., 1997, Hair melanin and hair color, *Formation and Structure of Human Hair*, pp. 209–225.
- David, G. W., 2005, *Analisis Farmasi*, Edisi kedua, EGC, Jakarta
- Drozd, J., 1985, Chemical Derivatization in Gas Chromatography, *Journal of Chromatography Library*, 19
- Forte, J.S., 2002, *Paracetamol : Safety Versus Toxicity*, (2)
- Granberg, R.A and Åke C. Rasmuson, A.C, 1999, Solubility of Paracetamol in

- Pure Solvents, *J. Chem. Eng.*, 44 (6) : 1391–1395
- Han, E., Chung, H., Soong, J.M., 2012, Segmental Hair Analysis for 11-Nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid and the Patterns of Cannabis Use, *Journal of Analytical Toxicology*, 32 : 195-200
- Hansen, S., Bjergaard, S.P., Rasmussen, K., 2012, *Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis*, Wiley, UK
- Kintz, P., 2000, Hair, In: Jay A. S. editors. *Encyclopedia of Forensic Sciences*, Vol II. UK : Academic Press. p. 598-640
- Kintz, P., 2007, *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair*, Taylor and Francis Group, CRC Press
- Knapp, D.R., 1979, *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*, New York
- Lamke, T.L., Williams, D.A., Roche, V.F., Zito, S.W., 2007, *Medicinal Chemistry Sixth Edition*, USA
- Moffat, C. A., M. D. Osselton, and B. Widdop. 2004. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Great Britain: Pharmaceutical Press
- Moffat, C. A., M. D. Osselton, and B. Widdop. 2005. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Great Britain: Pharmaceutical Press
- Mozayani, A., and Raymon, M.P., 2002, *Handbook of Drug Interactions A Clinical and Forensic Guide*, Humana Press
- Pötsch, L., A discourse on human hair fibers and reflections on the conservation of drug molecules, *Int. J. Legal Med.*, 108, 285–293, 1996.
- Saitoh, M., 1969, *Rate of Hair Growth in Advances in Biology of Skin*, Oxford, Pergamon Press p.183-201
- Saito, T., Morita, T., Inoue, S., Yamamoto, I., and Inokuchi, S., 2008, GC-MS assay for *acetaminophen* in human hair segments, *Forensic Toxicol* 26:27-30
- Sparkman, O.D., Penton, Z., Fulton, G., 2011, *Gas chromatography and mass spectrometry : a practical guide*, Elsevier
- Wijayaputra, N., 2011, Deteksi Senyawa Metamfetamin (MA) Pada Rambut dengan Metode SIM GC-MS, *Tesis*, Universitas Udayana, Denpasar