

## SCREENING AND DETERMINATION OF OPIATES IN HUMAN URINE SAMPLES BY IMMUNOASSAY AND TLC - SPECTROPHOTODENSITOMETRY

Ni Putu Diah Kusuma Dewi<sup>1</sup>, Ni Wayan Intan Indayanti<sup>1</sup>, I Komang Niko Sanjaya<sup>1</sup>,  
Anak Agung Intan Kharisma Dewi<sup>1</sup>, Ni Putu Linda Laksmiani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Udayana, Bali, 80361  
E-mail : kusumadewidiah1@gmail.com

### ABSTRAK

Opiat merupakan golongan zat, baik alamiah maupun semisintetik yang memiliki khasiat menghilangkan rasa nyeri (analgesik), menidurkan (hipnotik), dan menimbulkan perasaan gembira (euforik). Penggunaan berulang akan menimbulkan toleransi (kekebalan tubuh terhadap zat) dan ketergantungan. Oleh karena itu senyawa golongan opiate selain dapat digunakan dalam pengobatan, juga sangat rentan untuk disalahgunakan. Sehingga diperlukan suatu metode untuk mendeteksi keberadaan senyawa golongan opiat dalam spesimen biologis, salah satunya adalah di dalam urin. Pada penelitian ini dilakukan pengujian terhadap sampel simulasi yang telah ditambahkan dengan senyawa narkotika tertentu. Proses skrining golongan senyawa dalam urin dapat dilakukan dengan menggunakan teknik *immunoassay* dengan *strip test*. Hasil pengujian menunjukkan positif terhadap golongan senyawa opiat. Uji konfirmasi dengan menggunakan KLT Spektrofotodensitometri pada sistem fase gerak TE (etil asetat : metanol : ammonia 85 : 10 : 5% v/v/v) dan fase gerak TAE (metanol 100% v/v) menunjukkan terkonfirmasinya kandungan senyawa opiat dalam sampel urin simulasi adalah morfin. Tahap selanjutnya adalah dengan uji determinasi dengan KLT Spektrofotodensitometri pada sistem gerak TE (etil asetat : metanol : ammonia 85 : 10 : 5% v/v/v) menggunakan enam larutan seri dengan konsentrasi berbeda (100, 300, 500, 700, 900, dan 1100 ng/ $\mu$ L). Koefisien korelasi yang dihasilkan yaitu 0,9762, LOD sebesar 493,24 ng, dan LOQ sebesar 1494,66 ng. Pada sampel urin simulasi diperoleh kadar morfin sebesar 25,55  $\mu$ g/mL, 17,56 25,55  $\mu$ g/mL, dan 14,96 25,55  $\mu$ g/mL pada tiga kali replikasi.  
**Kata kunci:** Opiat, Morfin, KLT-Spektrofotodensitometri

### ABSTRACT

Opiates are a class of substances, both natural and semisynthetic that have the ability to relieve pain (analgesics), put to sleep (hypnotics), and cause feelings of joy (euphoric). Repeated use will lead to tolerance (immunity to substances) and dependence. Therefore opiate class compounds besides can be used in medicine, are also very vulnerable to abuse. So that we need a method to detect the presence of opiates in biological specimens, one of which is in the urine. In this study, testing of simulated samples that have been added with certain narcotic compounds. The process of screening of compounds in the urine can be done using the immunoassay technique with a strip test. The test results showed positive for opiates. Confirmation test using TLC Spectrophotodensitometry in the TE mobile phase system (ethyl acetate: methanol: ammonia 85: 10: 5% v/v/v) and the mobile phase TAE (methanol 100% v / v) shows the confirmation of the content of opiate compounds in urine samples simulation is morphine. The next step is the determination test with TLC Spectrophotodensitometry in the TE motion system (ethyl acetate: methanol: ammonia 85: 10: 5% v/v/v) using six series solutions with different concentrations (100, 300, 500, 700, 900, and 1100 ng /  $\mu$ L). The resulting correlation coefficient is 0.9762, LOD is 493.24 ng, and LOQ is 1494.66 ng. In the simulation urine sample morphine levels were 25.55  $\mu$ g / mL, 17.56 25.55  $\mu$ g / mL, and 14.96 25.55  $\mu$ g / mL at three replications.  
**Keywords:** Opiate, Morphine, TLC-Spectrophotodensitometry

## PENDAHULUAN

Ilmu toksikologi forensik adalah bagian dari ilmu forensik yang mempelajari tentang racun dan senyawa berbahaya bagi tubuh yang ada kaitannya dengan peradilan [1]. Ilmu toksikologi forensik mencakup beberapa bidang kerja salah satunya adalah analisis obat terlarang dalam darah dan urin pada kasus penyalahgunaan narkotika, psikotropika dan obat terlarang lainnya [2]. Berdasarkan data dari Badan Narkotika Nasional, pengguna narkotika diperkirakan mengalami peningkatan mencapai 2,21% dari jumlah penduduk Indonesia dan sebagian besar penyalahgunaan narkotika didominasi oleh kalangan remaja sebesar 24-28% [3]. Salah satu jenis golongan narkotika yang sering disalahgunakan adalah opiat. Opiat merupakan golongan zat, alamiah, semi sintetik, maupun sintetik yang memiliki khasiat analgesik, hipnotik, dan menimbulkan rasa gembira dalam waktu yang lama. Pemakaian opiat yang dilakukan secara berulang akan menimbulkan kekebalan tubuh dan dapat mengakibatkan ketergantungan [4]. Efek yang diberikan dari penggunaan golongan opiate didasarkan pada dosis yang digunakan. Pada anak-anak, dosis letal golongan opiat sebesar 10 mg, dan pada orang dewasa sebesar 30-50 mg Dosis minimal yang mampu menyebabkan toksik pada anak-anak sebesar 10 mg telah memberikan efek yang sangat fatal, dosis letal untuk dewasa sebesar 30-50 mg [5]. Oleh

sebab itu penting dilakukan analisis toksikologi terhadap golongan opiat. Dalam melakukan analisis toksikologi, dilakukan penyiapan sampel, uji skrining, uji konfirmasi, uji identifikasi dan interpretasi data [2].

Pada penelitian ini, dilakukan uji skrining dengan metode *immunoassay* menggunakan strip test yang spesifik terhadap senyawa golongan opiat. Sampel urin yang positif mengandung golongan opiate dikonfirmasi dan identifikasi dengan metode KLT-Spektrofotodensitometri. Kelebihan metode ini yaitu dengan instrument sederhana, dan harga yang relatif murah, tetap dapat menjadi metode analisis kualitatif yang akurat. Uji konfirmasi dengan KLT-Spektrofotodensitometri dilakukan berdasarkan parameter  $hRf$  dan korelasi spektrum analit dengan spektrum pustaka. Pada penelitian ini digunakan nilai  $hRf$  terkoreksi ( $hRf^c$ ) untuk menghilangkan pengaruh tipe bajana pengembang, arah elusi, fase gerak, kondisi chamber, dan metode preparasi sampel. Nilai  $hRf$  terkoreksi ( $hRf^c$ ) yang diperoleh dari penotolan senyawa standar bersama analit dalam satu plat, kemudian dielusi dengan dua sistem fase gerak yang telah ditetapkan [6].

Berdasarkan hal tersebut, tujuan dari penelitian ini adalah untuk melaksanakan uji skrining dan determinasi senyawa golongan opiat dalam sampel urin dengan menggunakan teknik *immunoassay* dan KLT-spektrofotodensitometri

## **METODE PENELITIAN**

### **Bahan dan Peralatan**

Sampel urin; plat KLT silika gel GF<sub>254</sub>; akuades, methanol, Etil asetat : metanol : amonia (85:10:5 v/v); metanol (100 %v); baku standar morfin; baku standar *reference* sistem TE (teofilin, phenobarbital, chlordiazepam, diazepam) dan sistem TAE (trimetoprim, papaverin, phenobarbital); HCl; buffer borat pH 10; Kloroform:isopropanol (4:1 v/v); Densitometer CAMAG TLC Scanner 4; Chamber; timbangan analitik, *strip* pH, dan *strip test*.

### **Metode**

#### **Uji Skrining**

##### **Uji Organoleptis Sampel**

Warna, bau, dan pH dari sampel urin diamati.

##### **Uji Skrining dengan Teknik Immunoassay (Strip test)**

Strip test dicelupkan ke dalam sampel urin pada botol vial dengan arah panah menunjuk tegak lurus pada sampel. Proses deteksi ditunggu selama  $\pm$  4-6 menit. Strip lalu diletakkan dipermukaan datar yang bersih dan tidak menyerap. Hasil dapat dibaca antara 10-30 menit setelah pencelupan dalam sampel.

##### **Ekstraksi Cair-cair**

1 mL sampel urin ditambahkan 0,05 mL HCl. Sampel dipanaskan pada suhu 100°C (15 menit) untuk mempercepat hidrolisis. Didinginkan pada suhu ruangan dan pH sampel dipertahankan pada pH 10 dengan

penambahan amonia atau dengan penambahan dapar asam borat pH 10 sebanyak 1 mL. Sampel kemudian ditambahkan dengan 0,75 mL kloroform:isopropanol (4:1). Sampel kemudian di *vortex* (2500 rpm)  $\pm$  5 menit. Disentrifugasi (3000 rpm) selama 5 menit. Fase organik ditampung di vial.

##### **Uji Konfirmasi**

Disiapkan fase gerak sistem TE (Etil asetat - metanol - amonia pekat (85:10:5) v/v) dan TAE (metanol) v/v) masing-masing 10 mL. Plat KLT (10 cm x 6 cm) dicuci dengan metanol, diaktivasi pada suhu 110°C selama 10 menit. Sampel hasil ekstraksi cair-cair dan senyawa standar *reference* (1 mg/mL dalam metanol) ditotolkan pada kedua plat KLT sebanyak 6 $\mu$ L. Dielusi pada chamber TE dan TAE yang telah dijenuhkan. Plat KLT diangin-anginkan, lalu dideteksi dengan *TLC-visualizer* pada sinar UV 210 nm. Dilakukan pencocokan spektrum sampel pada *library*. Dihitung harga *hRf* dan *hRf<sup>c</sup>* dari masing-masing

##### **Uji Determinasi**

Disiapkan fase gerak sistem TE (Etil asetat - metanol - amonia pekat (85:10:5) v/v) 10 mL. Plat KLT (10cm x 10 cm) dicuci dengan metanol, kemudian diaktivasi pada suhu 110°C selama 10 menit. Dibuat larutan seri standar morfin 100  $\mu$ g/ $\mu$ L, 300  $\mu$ g/ $\mu$ L, 500  $\mu$ g/ $\mu$ L, 700  $\mu$ g/ $\mu$ L, 900  $\mu$ g/ $\mu$ L, dan 1100  $\mu$ g/ $\mu$ L. Sampel hasil ekstraksi cair-cair dan larutan

seri ditotolkan pada plat KLT sebanyak 20  $\mu$ L dan 2  $\mu$ L. Dielusi pada chamber sistem TE yang telah dijenuhkan. Plat KLT dianginkan, lalu dideteksi dengan TLC-*visualizer* pada sinar UV 210 nm. Dilakukan perhitungan kadar senyawa dalam sampel urin.

### HASIL dan PEMBAHASAN

Penyalahgunaan narkotika dan psikotropika di masyarakat semakin mengalami peningkatan. Berdasarkan data Survey BNN pada tahun 2014 setidaknya 3,8 sampai 4,1 juta masyarakat Indonesia merupakan pengguna narkoba [7]. Pemeriksaan senyawa narkotika dapat dilakukan dilaboratorium untuk kepentingan analisis toksikologi [8]. Analisis toksikologi forensik dapat dilaksanakan untuk mengetahui senyawa yang dikonsumsi seseorang untuk suatu kasus penyalahgunaan [9].

Tahapan analisis toksikologi forensik diawali dengan pemeriksaan pendahuluan (*screening test*), apabila memberikan hasil positif maka dapat dilaksanakan uji lanjutann yaitu uji konfrimasi dan uji determinasi [10]. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah urin karena mudah untuk diperoleh dan stabil dalam pemeriksaan [11]. Penanganan sampel dalam analisis dengan materi biologis perlu memperoleh perhatian khusus karena ada kemungkinan terjadinya penguraian analit [2].

Tahapan awal analisis toksikologi forensik yaitu uji organoleptis dan uji skrinig. Hasil uji organoleptis

menunjukkan bahwa urin yang digunakan memiliki volume 5 mL dengan warna kuning jernih dan pH 6. Karakteristik urin dari hasil uji organoleptis yang diperoleh sesuai dengan karakteristik urin orang normal [12]. Kemudian, dilanjutkan uji konfirmasi dengan menggunakan teknik *immunossay* dengan *strip test* tunggal yaitu opiat dan amfetamin. Hasil menunjukkan bahwa senyawa yang terdapat pada sampel positif mengandung senyawa golongan opiat karena memberikan satu garis pada zona T pada *strip test* opiat [10].

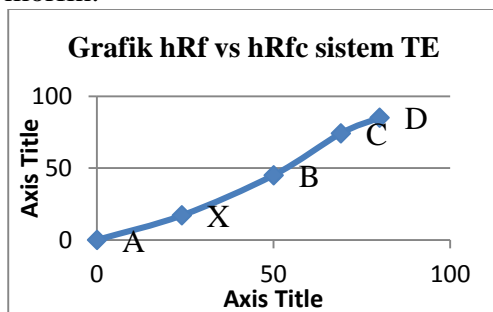
Opiat merupakan zat yang memiliki khasiat analgesik, hipnotik, dan euforia (Dwi, 2001). Opiat memiliki karakteristik pKa cenderung basa sehingga pelarut ekstraksi yang digunakan agar memperoleh nilai fraksi tak terionkan diatas 95% [14].

Sampel yang sudah positif dengan uji skrining kemudian diekstraksi dengan menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan menggunakan pelarut ekstraksi kloroform:isopropanol (8:2 v/v) yang sebelumnya dihidrolisis dengan HCl dan dibasakan dengan dapar borat pH 10 . Sampel selanjutnya divorteks dan sentrifugasi masing-masing 5 menit [15].

Tahapan selanjutnya adalah uji konfirmasi. Uji konfirmasi dengan menggunakan metode KLT minimal menggunakan dua fase gerak berbeda agar dapat memperkecil senyawa yang masuk dalam uji skrining. Fase gerak yang dipilih diusahakan dapat memberikan nilai  $R_f^c$  yang terpaut

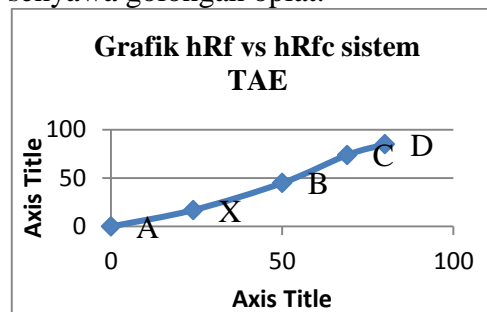
jauh untuk senyawa dalam satu golongan senyawa [9]. Sistem fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini adalah TE dan TAE karena dapat memberikan sebaran nilai  $hRf^c$  cukup jauh untuk senyawa golongan opiat [16]. Harga  $hRf$  yang diperoleh pada uji konfirmasi harus dihitung dengan menggunakan metode korelasi poligonal menggunakan empat senyawa standar pembanding [17] karena hasil analisis kualitatif dengan KLT dipengaruhi oleh banyak faktor.

Sistem fase gerak TE menggunakan fase gerak etil asetat:metanol:amonia (85:10:5 v/v/v) dengan standar teofilin, phenobarbital, clordiazepam, dan diazepam. Berdasarkan hasil perhitungan diketahui nilai  $hRf^c$  yang diperoleh adalah 8,5-19,5, sehingga selanjutnya didata senyawa yang masuk dalam rentang  $hRf^c$ . Senyawa yang termasuk dalam rentang tersebut adalah morfin dan hydromorphone. Selanjutnya, dilaksanakan korelasi spektrum dengan standar, diperoleh nilai korelasi dengan morfin sebesar 0,99518. Sehingga, dalam sistem TE diduga senyawa dalam sampel adalah morfin.



Gambar 1. Grafik Poligonal Sistem TE

Fase gerak kedua yang digunakan adalah sistem fase gerak TAE yang terdiri atas metanol 100% dengan standar trimetoprim, papaverin, dan phenobarbital. Senyawa golongan opiat yang didata berada pada rentang hasil perhitungan  $hRf^c$  yaitu 12,6-30,6, senyawa tersebut diantaranya adalah morfin, kodein, heroin, methadone, oxymorphone, hydromorphone, oxycodone, dan hydrocode. Hasil spektrum selanjutnya dikorelasi dengan standar morfin diperoleh nilai korelasi 0,99458. Hasil kedua sistem fase gerak menunjukkan positif senyawa morfin sehingga hasil uji terkonfirmasi senyawa golongan opiat.



Gambar 2. Grafik Poligonal Sistem TAE

Uji determinasi dilaksanakan dengan menggunakan sistem TE. Hasil pemisahan TE lebih baik dengan nilai resolusi 1,6 yang lebih tinggi dibanding 1,5 [18]. Adapun data determinasi yang diperoleh dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Determinasi

Larutan	Kons. (ng/ $\mu$ L)	AUC
Seri 1	100	3218.9
Seri 2	300	6643.7
Seri 3	500	11798.3

Seri 4	700	10927.6
Seri 5	900	11697.8
Seri 6	1100	14172.2
Sampel 1	-	5542.7
Sampel 2	-	4712.3
Sampel 3	-	4441.8

Hasil korelasi dengan menggunakan data seri 1,2,4,5, dan 6 dengan  $r^2$  yang diperoleh adalah 0,9762, dengan nilai LOD dan LOQ dengan masing-masing 493,238 ng dan 1494,66 ng. Konsentrasi senyawa morfin dengan replikasi 3 kali diperoleh data kadar rata-rata adalah 19,36  $\mu\text{g/mL}$ . Kadar tersebut masih dibawah dosis letal morfin pada urin yaitu 50-200  $\mu\text{g/mL}$  [9].

## KESIMPULAN

Senyawa yang terdapat dalam urin berdasarkan uji skrining dengan *immunoassay*, uji konfirmasi dan determinasi dengan KLT-Spektrofotodensitometri diperoleh bahwa senyawa yang terdapat pada sampel urin adalah morfin dengan kandungan 19,36  $\mu\text{g/mL}$  yang masih dibawah dosis letal pada urin.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Karmakar, R.N. Forensic Medicine and Toxicology. 3rd ed. India: Academic Publishers Kolkata; 2010.
- [2] Wirasuta, I M. A. G. Analisis Toksikologi Forensik dan Interpretasi Temuan Analisis. Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences 2008; 1: 47 – 55.
- [3] Bnn.go.id [homepage on the internet]. Indonesia: BNN [cited 2020 Jan 10. Available from: <https://bnn.go.id/penggunaan-narkotika-kalangan-remaja-meningkat/>.
- [4] Brunton, L.L., Chabner, B.A., Knollmann, B.C. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th ed. USA: The McGraw-Hill Companies; 2011.
- [5] Wolff K. Characterization of methadone overdose: clinical considerations and the scientific evidence. Ther Drug Monit 2002; 24:457-470.
- [6] Wirasuta, I. M. A. G, I. A. S. Primaningrum, and K.W. Astuti. Uji Konfirmasi dan Penetapan Kadar Morfin dengan KLT-Spektrofotodensitometri. Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences 2014; 4: 5-7
- [7] Henridrasti, V.L.S. Drug-free ASEAN 2025: Tantangan Indonesia dalam Penanggulangan Penyalahgunaan Narkoba. Jurnal Hubungan Internasional 2018; 7: 19-33.
- [8] Butar, D.. Kondisi Narkoba di Indonesia Pada Akhir Tahun 2011. Jakarta : Badan Narkotika Nasional Republik Indonesia; 2011.
- [9] Moffat, A. C., M. D. Osselton and B. Widdo. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. 4th ed. USA: Pharmaceutical Press; 2011.

- [10] Badan Narkotika Nasional. Pedoman Pemeriksaan Laboratorium Narkotika, Psikotropika dan Obat Berbahaya. Jakarta : Badan Narkotika Nasional; 2008.
- [11] Manela, C. Pemilihan, Penyimpanan dan Stabilitas Sampel Toksikologi pada Korban Penyalahgunaan Narkotika, *Jurnal Kesehatan Andalas* 2015; 4:338-345 cit. Kerrigan, S. Sampling, Storage and Stability in : Clarke's Analytical Forensic Toxicology. 2<sup>nd</sup> ed. Cornwall: Pharmaceutical Press; 2008.
- [12] Widyastuti, N., Sulchan, M., Johan, A. Asupan Makan, Sindrom Metabolik, dan Status Keseimbangan Asam-Basa pada Lansia. *Jurnal Gizi Klinik Indonesia* 2013; 9:179-187.
- [13] Dwi, L.Y. Narkoba Pencegahan dan Penanganannya. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo; 2001.
- [14] Gandjar, I. G. dan A. Rohman. Analisis Obat secara Spektrofotometri dan Kromatografi. Yogyakarta: Pustaka Pelajar; 2012.
- [15] Ahadi, A., Partoazar, A., Abedi-Khorasgani, M. H., Shetab-Boushehri, S. V. Comparison of Liquid-Liquid Extraction-Thin Layer Chromatography with Solid-Phase Extraction-High Performance Thin Layer Chromatography in Detection of Urinary Morphine, *Journal of Biomedical Research* 2011; 25(5):362-367.
- [16] Sherma, J. and Fried, B.. Thin Layer Chromatography. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 1994.
- [17] Zeeuw, R.A., J.P. Franke, F. Degel, G. Machbert, H. Schutz, dan J. Wijsbeek. Thin Layer Chromatographic Rf Values of Toxicologically Relevant Substances on Standardized Systems. Jerman: VHC Verlagsgesellschaft; 1992.
- [18] Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. Principles of Instrumental Analysis. Seventh Edition. USA: Cengage Learning; 2018.