

SCREENING AND DETERMINATION OF CODEIN IN URINE SAMPLE

I Putu Priyasana¹, Gusti Ayu Dinda Mayagita¹, Vallina Rahmadinha¹, Kristina Megi Limba¹, Pande Made Nova Armita Sari¹

¹ Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Udayana, Bukit Jimbaran, Badung, 80361
Email : iputupriyasana@gmail.com

ABSTRAK

Senyawa opiat merupakan golongan narkotika yang sering disalahgunakan. Ahli forensik sangat berperan dalam penanganan hal ini. Tujuan penelitian ini yakni untuk memvalidasi metode KLT-spektrofotodensitometri secara kualitatif dan kuantitatif dalam melakukan uji konfirmasi hingga determinasi senyawa kodein pada sampel urin. Pengujian konfirmasi dilakukan menggunakan metode spektrofotodensitometri dengan fase gerak yakni sistem TE dan TAE. Nilai *windows error* yang diperoleh pada sistem TE dan TAE adalah 10 dan 8. Pendataan senyawa pada rentang hRf^c 16,09-36,09 pada sistem TE diperoleh dua senyawa yakni Morfin dan Kodein. Pendataan senyawa pada rentang hRf^c 25,1-9,1 juga ditemukan senyawa Morfin dan Kodein. Hasil korelasi spektrum sampel dan spektrum pada *library* menunjukkan nilai korelasi 0,99079 (sistem TE) dan 0,99477 (sistem TAE) terhadap senyawa Kodein. Pengujian determinasi dilakukan dengan menggunakan fase gerak TE. Pengujian ini diperoleh hasil bahwa konsentrasi senyawa Kodein adalah 20,88 ng/ μ L. Hasil ini menunjukkan bahwa sampel mengandung Kodein pada rentang dosis letalnya.

Kata kunci: *Opiat, uji skrining, sistem fase gerak, uji konfirmasi, uji determinasi.*

ABSTRACT

Opiates are a group of narcotics that are often abused. Forensic experts play crucial roles in handling this. The screening test results that the sample containing opiate compounds. The purpose of this research is to validate the TLC-spectrophotodensitometry method as qualitatively and quantitatively on confirmation to determine tests codeine in the urine sample. Confirmation testing is carried out by using TE and TAE mobile phase systems. The error window values obtained in the TE and TAE systems are 10 and 8. Data collection of compounds in the range of hRf^c 16.09 to 36.09 in the TE system obtained two compounds, Morphine and Codeine. And in the range of hRf^c 25.1-9.1 also found Morphine and Codeine compounds. The results of the correlation spectrum of the sample and spectrum in the library showed a correlation value of 0.99079 (TE system) and 0.99477 (TAE system) to the codeine compound. Determination testing is carried out using the TE mobile phase. This test results obtained that the concentration of codeine compounds is 20.88 ng / μ L. These results indicate that the sample contains codeine in the lethal dose range.

Keywords: *Opiate, mobile phase system, Screening test, Confirmation test, Determination test*

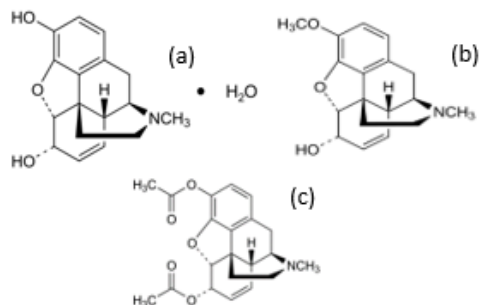
PENDAHULUAN

Penyalahgunaan obat golongan narkotika sudah sangat marak terjadi. Hal ini dikarenakan penyebarannya yang irasional. Penyalahgunaan penggunaan narkotika diatur pada Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 35 Tahun 2009 [7]. Salah

satunya adalah obat golongan opiat. Opiat adalah obat yang secara alami ditemukan pada *Opium poppy*, *Papaver somniferum* atau disintesis dari opiat alami. Opiat bekerja pada sistem saraf pusat yang menghasilkan efek analgesik, euforia, sedasi,

depresi pernapasan dan pengobatan batuk [3]. Maraknya penggunaan obat secara irasional mendorong ahli forensik untuk ikut serta dalam menanganinya. Ahli forensik berperan dalam tiga hal yakni proses preparasi sampel, skrining atau konfirmasi dan determinasi [9].

Preparasi sampel yang dilakukan menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Prinsip dasar ekstraksi cair-cair ini melibatkan pengontakan suatu larutan dengan pelarut (*solvent*) lain yang tidak saling melarut (*immisible*) dengan pelarut asal yang mempunyai densitas yang berbeda sehingga akan terbentuk dua fase beberapa saat setelah penambahan *solvent* [4].



Gambar 1. Struktur senyawa (a) morfin; (b) kodein; (c) Heroin

Uji skrining merupakan uji pendahuluan yang dilakukan guna mengetahui secara umum golongan senyawa yang terkandung di dalam sampel yang akan diuji. Uji ini dapat dilakukan dengan menggunakan *strip test*. Tes ini merupakan tes *Immunoassay* dimana penentuan zat tertentu yang terdapat dalam urin ditentukan secara *Rapid Immunoassay* (antigen-antibodi) [2].

Uji konfirmasi dan determinasi dilakukan dengan metode KLT-Spektrofotodensitometri. Prinsip kerja KLT-Spektrofotodensitometri adalah pemisahan suatu campuran komponen senyawa yang melibatkan adsorben atau fase diam yang dilapiskan pada suatu pelat dengan suatu pelarut (fase gerak) yang mengalir melewati adsorben (padatan penyerap) dan identifikasi berdasarkan interaksi yang dihasilkan antara sinar UV-Vis dengan analit, dimana analit merupakan noda yang ditotolkan pada plat [4]. Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi metode KLT-spektrofotodensitometri secara kualitatif dan kuantitatif dalam melakukan uji konfirmasi hingga determinasi senyawa kodein pada sampel urin.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Peralatan

Serbuk standar morfin, kodein, standar sistem TE (teofilin, allobarbital, nitrazepam, diazepam), standar sistem TAE (efedrin, trimetoprim, bromozepam, dan fenobarbital) digunakan dalam penelitian ini. Akuades dan pelarut berderajat analisis, serta peralatan berupa plat KLT, *chamber*, dan *TLC-visualizer*.

Metode

Penilaian Sampel

Diamati dan dicatat warna, bau, dan bentuk dari sampel sebagai uji organoleptis. Kemudian dilakukan uji pH dengan menggunakan strip pH dan dicatat hasilnya. Selanjutnya,

volume sampel urin diukur dengan menggunakan gelas ukur, setelah itu dicatat hasilnya.

Uji Skrining

Sampel urin diletakkan dalam wadah yang bersih dan kering. Kemudian disiapkan strip test untuk masing-masing golongan senyawa yang akan diujikan (opiat, benzodiazepine, barbiturat, dan amfetamin) atau dapat menggunakan multi strip tes. Strip tes dicelupkan ke dalam sampel urin dengan arah panah posisi tegak lurus pada sampel uji. Tinggi sampel yang terendam tidak boleh lebih dari batas tinggi maksimal pada strip. Kemudian proses deteksi ditunggu selama \pm 4-6 menit. Strip lalu diletakkan pada alas datar yang bersih dan tidak menyerap apapun. Hasil yang diperoleh dapat dibaca antara 10-30 menit setelah pencelupan dalam sampel.

Ekstraksi Sampel

Dipipet sampel urin sebanyak 1 mL serta ditambahkan sebanyak 0,05 mL HCl. Sampel dipanaskan selama 15 menit dengan suhu 100°C untuk mempercepat hidrolisis. Setelah itu dinginkan pada suhu ruang. pH sampel dipertahankan pada pH 10 dengan penambahan ammonia atau dengan penambahan dapar alkalin borat pH 10 sebanyak 1 mL. Sampel kemudian ditambahkan dengan 0,75 mL kloroform:isopropanol (4:1) [1]. Pencampuran dilakukan dengan menggunakan alat vortex mixer \pm 5 menit pada kecepatan 2500 rpm dan disentrifugasi pada kecepatan 3000

rpm selama 5 menit. Bagian fase organik diambil dan ditampung dalam botol vial.

Uji Konfirmasi

Proses pemisahan dilakukan dalam 2 *chamber* untuk 2 sistem fase gerak. *Chamber* 1 dijenuhkan dengan fase gerak sistem TE dan *chamber* 2 dijenuhkan dengan fase gerak sistem TAE. Sampel hasil ekstraksi cair-cair dan senyawa standar ditotolkan pada kedua plat KLT sebanyak 10 μ L. Dimasukkan plat KLT yang telah ditotolkan sampel ke dalam *chamber* serta dilakukan proses elusi. Setelah dilakukan elusi hingga batas atas, plat KLT diangin-anginkan hingga kering. Dideteksi dengan *TLC-visualizer* pada sinar UV 210 nm. Dilakukan pencocokan spektrum sampel pada *library*. Kemudian dihitung harga *hRf* dan *hRfc* dari masing-masing senyawa.

Uji Determinasi

Uji determinasi dilakukan dengan menggunakan fase gerak yang paling baik memisahkan senyawa pada saat uji konfirmasi. Fase gerak yang digunakan adalah sistem fase gerak TE. Seri yang digunakan pada uji determinasi adalah 25 ng/ μ L; 75 ng/ μ L; 125 ng/ μ L; 175 ng/ μ L; 225 ng/ μ L dan 275 ng/ μ L. Ditotolkan masing-masing seri 4 μ L dan sampel 16 μ L pada plat KLT. Setelah semua seri dan sampel ditotolkan dan dielusi, dideteksi pada *TLC-*

visualizer pada sinar UV 210 nm, kemudian dideteksi kembali pada panjang gelombang maksimum kodein yang diperoleh.

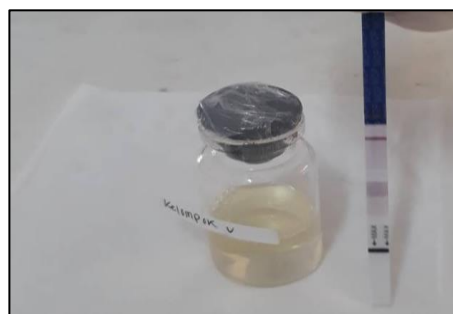
HASIL dan PEMBAHASAN

Tahap awal yang dilakukan pada pemeriksaan laboratorium yaitu uji skrining. Uji skrining berfungsi untuk mengetahui golongan senyawa apa yang terkandung di dalam sampel. Hasil dari uji skrining belum mampu dijadikan sebagai bukti yang kuat penggunaan narkoba, namun dapat dijadikan dasar untuk melakukan uji selanjutnya. Uji skrining dilakukan dengan menggunakan *strip test*. Tes ini merupakan tes *Immunoassay* dimana penentuan zat tertentu yang terdapat dalam urin ditentukan secara *Rapid Immunoassay* (antigen-antibodi). Apabila hasil dinyatakan negatif, maka akan menampilkan dua garis pada huruf C (zona kontrol validitas) dan T (zona tes/uji), sedangkan apabila hasil diperoleh positif, maka akan tampak satu garis pada huruf C (zona kontrol validitas) [2].

Sampel urin yang tidak mengandung narkoba, bila ditetaskan pada zone S, urin hanya mendifusikan IgG antinarkoba-substrat dan IgG *goat*-substrat dari zone S ke zone T dan zone C. Sehingga baik di zone T maupun zone C terjadi reaksi enzim-substrat berupa pita warna *pink*. Hal ini menunjukkan hasil negatif. Apabila sampel yang digunakan sampel positif, maka di zone S narkoba urin yang positif akan langsung berikatan dan menjenuhi

IgG anti-narkoba-substrat, sehingga waktu didifusikan ke zone T tidak bisa mengikat (bercelah) narkoba-enzimnya, tidak terjadi reaksi enzim-substrat dan karenanya tidak muncul reaksi warna. Sebaliknya di zone C tetap terjadi reaksi warna (pita *pink*) sebab narkoba urin tidak spesifik untuk dapat berikatan dengan IgG *goat*.

Hasil uji skrining menggunakan *strip test* pada sampel urin menunjukkan hasil positif untuk golongan opiat. Uji dikatakan memberikan hasil positif karena pada *strip test* tersebut muncul pita berwarna merah muda hanya pada zona C (tidak muncul pita berwarna merah muda pada zona T) [5].



Gambar 2. Hasil Uji Skrining dengan *Strip Test*

Sebelum dilakukan uji konfirmasi dari hasil yang didapat berdasarkan uji skrining, terlebih dahulu dilakukan preparasi sampel dengan menggunakan metode *liquid-liquid extraction* (LLE). Adapun hal yang perlu diperhatikan dalam tahap preparasi sampel yaitu sifat dan jenis biologis dari spesimen, fisikokimia dari spesimen, dan tujuan dari analisis. Penanganan sampel dalam

kepentingan analisis toksikologi forensik perlu diperhatikan sebab hampir sebagian besar adalah materi biologis sehingga mampu mencegah terjadinya penguraian analit. [11] Tujuan dilakukannya ekstraksi cair-cair dalam *clean up* sampel atau praperlakuan sampel yaitu untuk memisahkan analit atau kotoran dari komponen matriks yang dapat mengganggu pada proses kuantifikasi atau deteksi analit. Selain itu, ekstraksi cair-cair berfungsi untuk memekatkan analit dalam jumlah kecil pada sampel, sehingga tidak susah untuk dideteksi atau dikuantifikasi [11].

Proses ekstraksi cair-cair yang diadaptasi dari penelitian [1]. Proses pemanasan berfungsi untuk memecah konjugasi glukoronida dalam sampel. Kemudian penambahan dapar pH 10 yang berfungsi untuk mengkondisikan suasana basa selama proses ekstraksi. Hal ini dikarenakan seluruh golongan opiate yang diduga bersifat basa, sehingga diharapkan dengan adanya kondisi yang basa maka diperoleh fraksi tidak terionisasi dalam jumlah yang relatif besar ($\geq 95\%$) dalam fase organik. Setelah itu dilakukan ekstraksi cair-cair dengan menggunakan 15 mL kloroform:isopropanol (8:2).

Sampel yang telah berisi pelarut pengekstraksi kemudian divortex selama 15 menit untuk menghomogenkan sampel dengan memperbesar kontak antara analit dengan pelarut pengekstraksi. [8] Setelah itu sampel disentrifugasi selama 5 menit untuk mempercepat

distribusi analit pada fase organik dan fase air. Setelah disentrifugasi maka akan terbentuk 2 fase yaitu fase organik dan fase air. Fase organik (kloroform) berada pada bagian bawah dan fase air (isopropanol) berada pada bagian atas. Fase organik dipisahkan dari fase air kemudian diuapkan hingga sisa sedikit larutan lalu dipindahkan ke dalam botol vial dan biarkan hingga seluruh pelarut menguap.

Hasil uji konfirmasi dengan sistem TE ditampilkan pada tabel 1. Hasil yang diperoleh dilakukan pendataan senyawa golongan opiate yang mempunyai nilai hRfc antara rentang 16,09 – 36,09. Berdasarkan pustaka dinyatakan bahwa senyawa golongan opiate yang mempunyai hRfc diantara rentang tersebut adalah morfin dengan hRfc 20 dan kodein hRfc 35, sedangkan heroin dengan hRfc 49 tidak termasuk dalam rentang *windows error*. *Windows error* yang diterima pada sistem ini yakni 10.

Tabel 1. Hasil Uji Konfirmasi dengan Sistem TE

Senyawa Standar	hRfc	hRf
Teofilin	11	16
Allobarbital	34	48
Nitrazepam	64	64
Diazepam	76	73
Morfin	20	24
Kodein	35	36
Sampel	-	37

Hasil uji konfirmasi dengan sistem TAE ditampilkan pada tabel 2.

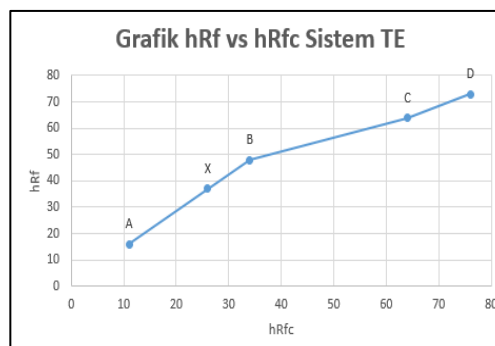
Pendataan dilakukan pada senyawa golongan opiate yang mempunyai nilai hRfc antara rentang 25,1 - 9,1. Pustaka menunjukkan bahwa senyawa golongan opiate yang mempunyai hRfc diantara rentang tersebut adalah morfin dengan hRfc 18 dan kodein dengan nilai hRfc 21. *Windows error* yang diterima pada sistem ini adalah 8

Tabel 2. Hasil Uji Konfirmasi dengan Sistem TAE

Senyawa Standar	hRfc	hRf
Efedrin	10	27
Trimetoprim	45	50
Bromocepam	73	70
Fenobarbital	85	80
Morfin	18	24
Kodein	21	23
Sampel	-	19

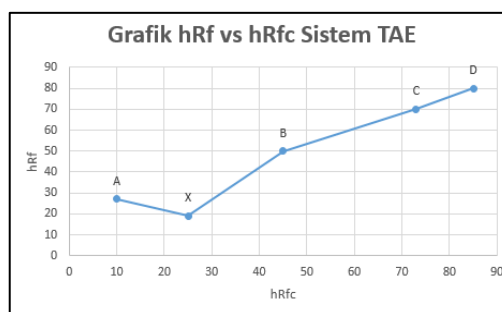
Sistem TE memberikan keterpisahan yang baik anatara morfin dan kodein dimana masing-masing Rf nya yakni 0,24 dan 0,36 serta sampel pada Rf 0,37. Hal ini didukung dengan nilai resolusi sistem TE yakni sebesar 1,6 dimana nilai ini sudah memenuhi syarat yang ditetapkan yaitu lebih dari 1,5. Nilai resolusi menggambarkan baik tidaknya keterpisahan suatu senyawa dalam metode KLT [10]. Akan tetapi pada sistem TAE keterpisahan kodein dan morfin tidak bagus dimana Rf morfin 0,24 dan Rf kodein 0,23 sedangkan sampel 0,19. Hasil resolusi yang diperoleh yakni 1, dimana nilai ini

berada di bawah nilai yang dipersyaratkan.



Gambar 3. Grafik pemisahan senyawa *reference* dan sampel sistem TE

Berdasarkan hasil resolusi tersebut maka dipilih sistem TE untuk uji determinasi selanjutnya karena keterpisahan komponen analit yang baik. Selanjutnya hasil uji konfirmasi dengan menggunakan nilai hRfc pada dua sistem fase gerak yang digunakan yakni TE dan TAE, maka terkonfirmasi morfin dan kodein pada kedua sistem tersebut yang masih masuk rentang *windows error*.



Gambar 4. Grafik pemisahan senyawa *reference* dan sampel sistem TAE

Selanjutnya untuk menentukan senyawa yang terkandung dalam sampel dapat melihat korelasi data spektrum sampel terhadap spektrum *library* atau spectrum senyawa standar. Hasil yang diperoleh yakni nilai korelasi 0,99079 pada sistem TE menunjukkan sampel pada Rf 0,37 adalah kodein dan nilai korelasi 0,99477 pada sistem TAE menunjukkan sampel pada Rf 0,19 adalah kodein. Hal ini didasarkan atas tingginya kedekatan korelasi spektra sampel dengan spektra standar kodein. Sehingga dapat ditentukan bahwa senyawa yang terkandung dalam sampel adalah kodein.

Lima konsentrasi yang menghasilkan nilai mendekati 1 dipilih untuk membentuk kurva kalibrasi dengan nilai r^2 0,999. Selanjutnya dihitung batas deteksi dan batas kuantifikasi (LOD dan LOQ) dari hasil yang diperoleh LOD sebesar 27.91 ng dan LOQ sebesar 93.04 ng. Setelah itu, dilakukan penetapan kadar kodein dalam sampel dengan replikasi tiga kali dan diperoleh nilai rata-rata sebesar 20.88 $\mu\text{g/mL}$ dengan RSD 1,89%. Validasi metode dari nilai LOD dan LOQ, linieritas, dan presisi sudah memenuhi persyaratan.



Gambar 5. Kurva kalibrasi larutan seri

Berdasarkan [6], kadar kodein yang ditemukan dalam urin dan dapat menjadi penyebab kematian adalah 3.2–229 mg/L. Dosis 3.2–229 mg/L dapat dikonversikan menjadi 3.2–229 $\mu\text{g/mL}$. Oleh karena itu, berdasarkan kadar sampel kodein yang diperoleh yakni 20,88 $\text{ng}/\mu\text{L}$, dapat disimpulkan bahwa sampel urine yang diteliti mengandung kodein dengan dosis letal.

KESIMPULAN

Uji skrining menunjukkan bahwa dalam sampel urin terdapat senyawa golongan opiat. Uji konfirmasi kemudian dilakukan dengan dua sistem TE dan TAE, dan menunjukkan bahwa senyawa dalam sampel urin adalah kodein. Validasi yang telah dilakukan menunjukkan hasil yang valid pada semua parameter uji. Kadar sampel kodein yang diperoleh yakni 20,88 $\text{ng}/\mu\text{L}$, dapat disimpulkan bahwa sampel urine yang diteliti mengandung kodein dengan dosis letal yakni antara 3.2–229 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan rasa terima kasih kepada dosen yang telah membimbing,

DAFTAR PUSTAKA

- [1] 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.
- [2] Badan Narkotika Nasional. Pedoman Pemeriksaan Laboratorium Narkotika, Psikotropika dan Obat Berbahaya. Jakarta: Badan Narkotika Nasional; 2008.
- [3] Berg H, Lunaden E, Christophersen AS, and Strand DH. Determination of Opiates and Cocaine in Urine by High pH Mobile Phase Reversed Phase UPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2009; 877(2009): 421-432.
- [4] Gandjar, I. B. and Rohman, A. Kimia Farmasi Analisis. Yogyakarta:Pustaka Pelajar; 2007.
- [5] Liu RH and Gadzala DE. Handbook of Drug Analysis. Washington DC: American Chemical Society; 1997.
- [6] Moffat AC, Osselton MD, and Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. Pharmaceutical Press; 2005
- [7] Presiden RI. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 35 Tahun 2009 tentang Narkotika. Jakarta: Presiden Republik Indonesia; 2009.
- [8] Rodrigues, A., M. Yegles, N. V. Elsie, and S. Schneider. Determination of Cannabinoid in Hair of CBD Rich Extracts Consumers using Gas Chromatography with Tandem Mass Spectrometry (GC/MS-MS). *Forensic Science International*; 2018.
- [9] Sari PMNA and Leliqia NPE. Uji Skrining dan Determinasi Kodein dengan TLC-Spektrofotodensitometri. *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences*. 2013; 3(1): 26-31.
- [10] Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Principles of instrumental analysis. 7th ed. USA: Cengage Learning; 2018
- [11] Wirasuta, I.M.A.G. Analisis Toksikologi Forensik dan Interpretasi Temuan Analisis. *Indonesian Journal of Legal and Forensic Science* 2008; 1(1):47-55.