

**ANALISIS FATTY ACID ETHYL ESTER DENGAN INFRA RED DALAM DARAH TIKUS WISTAR SETELAH MINUM ALKOHOL SECARA AKUT**

**Ni Made Suaniti**

*Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran*

---

**ABSTRAK**

*Fatty acid ethyl ester* (FAEE) merupakan hasil reaksi biokimia dalam tubuh setelah minum alkohol secara akut. Pada umumnya minuman beralkohol mengandung etanol, yang secara kimia dapat dianalisis sebagai etanol dan dalam bentuk metabolitnya. Metabolit etanol adalah hasil reaksi oksidasi etanol dan juga reaksi antara etanol dengan senyawa endogen dalam tubuh. Salah satu metabolit etanol adalah suatu senyawa ester yang merupakan hasil reaksi etanol dengan asam lemak. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan adanya gugus fungsi FAEE yang merupakan salah satu marka biokimia setelah minum alkohol secara akut dalam darah tikus Wistar. Tikus Wistar yang digunakan akuades sebagai kontrol dan alkohol 20% sebagai perlakuan setiap hari selama 1 minggu (akut). Marka biokimia yang dianalisis adalah FAEE karena merupakan marka biokimia dari etanol yang sensitif dan spesifik setelah pemberian alkohol. Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap; yang pertama; merupakan perlakuan tikus dengan minum alkohol secara akut. Tahap kedua; analisis senyawa kimia: FAEE dengan Spektra *Infra Red* (IR). Sampel darah tikus Wistar yang diambil 6 dan 24 jam setelah minum alkohol secara akut dianalisis secara kualitatif untuk menentukan adanya senyawa atau gugus fungsi senyawa tersebut. Adanya gugus fungsi FAEE sebagai marka biokimia baru yang baik dalam darah tikus Wistar untuk menilai adanya etanol setelah minum alkohol secara akut. Gugus Fungsi FAEE adalah C-H muncul di daerah  $3600-2500\text{ Cm}^{-1}$ , gugus keton (C=O) muncul di daerah  $1870-1540\text{ Cm}^{-1}$ , getaran ulur C-O atau C-C(=O)-O di daerah  $1190-1140\text{ Cm}^{-1}$ .

Kata kunci : Fatty Acid Ethyl Ester, alkohol, tikus Wistar, Infra Red

**ABSTRACT**

Fatty acid ethyl esters (FAEE) are the result of biochemical reactions in the body after drinking alcohol acutely. In general, alcoholic drinks contain ethanol, which can be analyzed chemically as ethanol and its metabolites. Metabolite of ethanol are the result of ethanol oxidation reaction and the reaction of ethanol with endogenous compounds in the body. One of the metabolites of ethanol is an ester compound resulted from the reaction of ethanol with fatty acids. This study aims to prove the existence of FAEE functional group as one of biochemical markers in acute alcohol consumers. Two groups of wistar rats were given distilled water (control group) and 20% alcohol (treated group) every day for 1 week. Biochemical markers analyzed are FAEE. This research was conducted in two phases: the first phase, is the treatment of rats with acute alcohol. The second phase, analysis of chemical compounds: FAEE with Infra Red Spectrophotometer. Wistar rat blood samples taken 6 and 24 hours after drinking alcohol acutely were analyzed qualitatively. Functional Groups indicating the presence of FAEE are C-H ( $3600-2500\text{ cm}^{-1}$ ), the ketone group (C = O) appears at  $1870-1540\text{ cm}^{-1}$ , stretching vibration of CO or C-C (=O)-O at  $1190-1140\text{ cm}^{-1}$ .

Keywords : Fatty Acid Ethyl Esters, alcohol, Wistar rats, Infra Red

## PENDAHULUAN

Minum alkohol secara terus menerus dapat menyebabkan enzim pencernaan yang mengoksidasi alkohol akan menjadi jenuh, sehingga akan dapat menyebabkan penyakit alkoholik pada manusia. Analisis alkohol setelah minum-minuman beralkohol dapat dianalisis sebagai etanol dan dalam bentuk metabolit. Salah satu metabolit yang dapat dianalisis adalah *fatty acid ethyl ester* (FAEE) yang terjadi dari reaksi etanol dengan asam lemak di dalam tubuh. Hal ini diperlukan untuk membuktikan ada metabolit alkohol (analisis kualitatif) saat etanol tidak dapat dideteksi di dalam tubuh.

Di Swis dan Inggris seseorang dilarang mengendarai mobil di jalan raya bila mempunyai KAD 80 mg/100ml atau lebih dan Kadar Alkohol Urin (KAU) 107 mg/100ml (Sutter, 2002; Shepherd, 2003). Di Indonesia, tingkat konsumsi alkohol terus meningkat dari tahun ke tahun, namun belum ditetapkan batas KAD dan KAU yang diperbolehkan bagi seseorang untuk mengendarai mobil di jalan raya. Namun sebelum menentukan kadar etanol perlu dianalisis lebih awal ada penanda etanol, berupa gugus fungsi etanol ataupun metabolit etanol dalam tubuh.

Etanol yang dikonsumsi sebagian besar dimetabolisme dalam hati untuk menghasilkan *fatty acid ethyl ester* (Wurst *et al.*, 2003 (c); Skipper *et al.*, 2004; Weinmann *et al.*, 2004; Costantino *et al.*, 2006; Dahl, 2006). FAEE juga disimpan dalam rambut sehingga dapat dideteksi dalam rambut (Andreas, *et al.*, 2000; Kintz *et al.*, 2008; Pragst dan Yegles, 2008), karena itu FAEE merupakan salah satu metabolit etanol yang spesifik dan dapat dilacak dalam kurun waktu yang lebih panjang dari kadar etanol.

Enzim esterase yang ada dalam otak, hati, pankreas, dan jaringan adipose dapat menyebabkan etanol bereaksi dengan asam-asam lemak untuk membentuk FAEE (Aydin *et al.*, 2005; Stephanson, 2007). FAEE merupakan metabolit etanol non-oksidatif yang toksik terhadap sel, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Akumulasi FAEE dalam jaringan otot juga berperan pada terjadinya miopati karena alkohol. Kelainan otot ini terjadi karena otot mengandung FAEE dalam jumlah yang banyak yang disintesis

dalam tubuh setelah terekspos alkohol (Salem *et al.*, 2006; Kulaga *et al.*, 2006). FAEE juga merupakan marka yang spesifik dan sensitif dari alkohol dalam tubuh dan dapat dilacak dalam rambut (Pragst dan Yegles, 2008). FAEE dapat dideteksi dalam serum lebih dari 24 jam setelah minum alkohol (SOASAS, 2006).

Di Indonesia penentuan tingkat konsumsi alkohol pada seseorang umumnya dilakukan dengan pemeriksaan etanol dalam darah. Selain itu, jika konsumsi alkohol menimbulkan kerusakan hati maka penentuan tingkat konsumsi alkohol dilihat dari hasil rasio SGPT dan SGOT di dalam darah (Wallach, 2004 dan POA, 2006). Namun, pemeriksaan FAEE dengan IR tampaknya dapat membuktikan gugus fungsi sebagai penanda etanol, sehingga perlu dilakukan penelitian tentang analisis FAEE dengan IR dalam darah tikus Wistar setelah minum alkohol secara akut.

## MATERI DAN METODE

### Bahan

Hewan coba yang digunakan adalah tikus sehat, putih, galur Wistar jantan sebanyak 30 ekor, berat badan  $\pm$  200 g, dan usia 8-9 minggu. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah FAEE standar, aseton, diklorometana.

### Peralatan

Alat yang digunakan yaitu: kandang tikus, sonde, pipet kapiler, sentrifuge, Infra Red.

### Cara Kerja

#### *Persiapan Sampel*

Tiga puluh ekor tikus Wistar dipelihara dan diadaptasikan dengan standar perawatan hewan percobaan, di kandang bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana. Persiapan peralatan untuk pemberian alkohol dan pengambilan sampel darah dengan sterilisasi. Persiapan sentrifuge dan wadah untuk transportasi lengkap dengan es. Tikus Wistar diambil secara random dibagi menjadi dua kelompok yaitu kontrol dan perlakuan alkohol 20%. Kemudian tikus kontrol diberikan 1,0 mL akuades, tikus perlakuan diberikan 1,0 mL

alkohol 20% setiap hari selama satu (1) minggu. Pengambilan sampel darah dilakukan di kandang Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana Denpasar. Sampel darah segera disentrifuge 1000 x g selama 15 menit kemudian serum diencerkan 10 kali dengan akuades. Selanjutnya segera disimpan pada suhu -20°C sebelum dilakukan analisis.

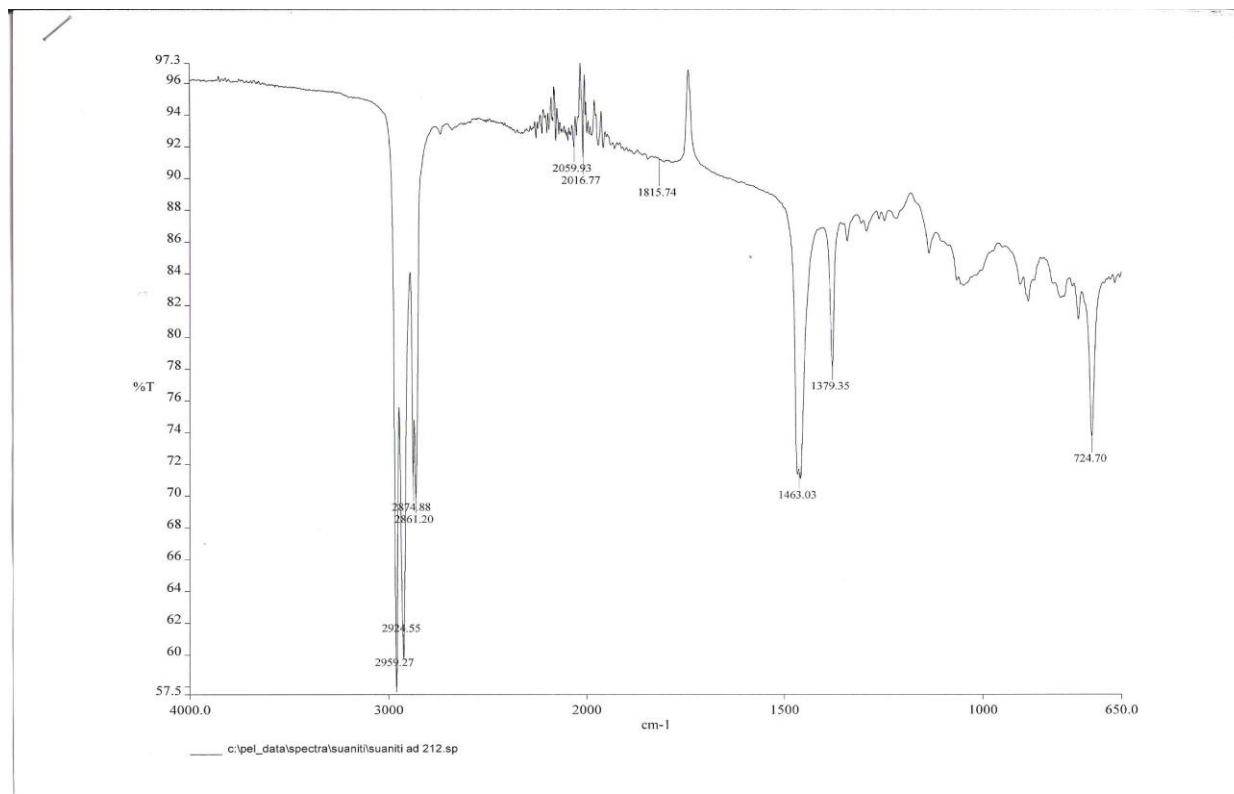
**Uji Laboratorium**

Analisis FAEE melalui tahap isolasi dan ekstraksi fase padat dengan kolom *solid fase extraction* (SPE) kemudian dianalisis dengan IR.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Hasil**

FAEE dalam darah tikus Wistar dianalisis dengan IR untuk menentukan adanya gugus fungsi spesifik FAEE yang merupakan hanya sebagai analisis kualitatif dalam ilmu kimia. FAEE adalah termasuk ke dalam kelompok senyawa organik yaitu senyawa golongan ester (R-COOR). Gugus fungsi spesifik FAEE dalam darah tikus Wistar yang dianalisis dengan IR adalah Gugus C-H, C=O, dan C=C dan C-H seperti yang diperlihatkan dalam Gambar 1.



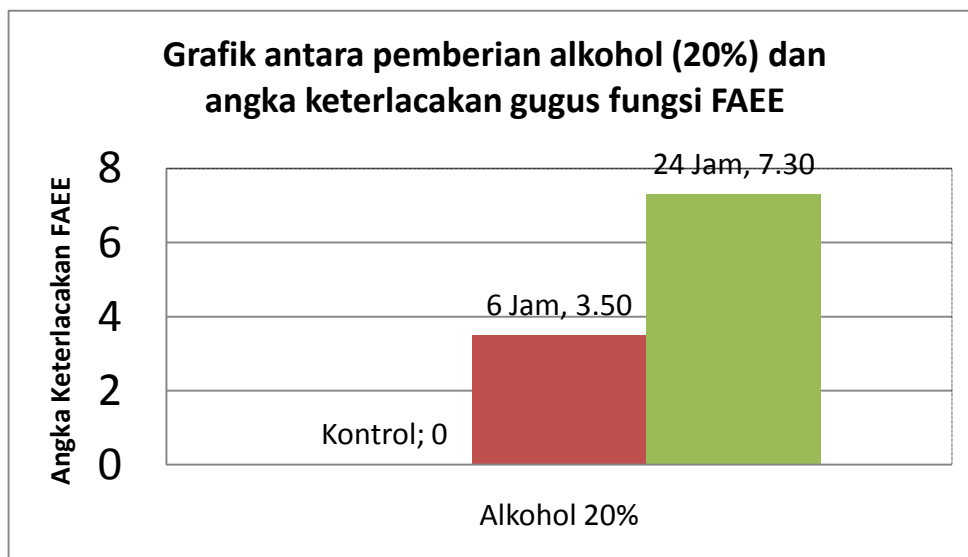
Gambar 1. Gugus Fungsi FAEE dalam darah tikus Wistar setelah pemberian alkohol 20% secara akut

Secara statistik, data gugus fungsi spesifik tersebut dikategorisasi berdasarkan adanya gugus FAEE dalam darah tikus Wistar antara kontrol dan pemberian alkohol 20%

secara akut diperoleh hasil berbeda secara bermakna ( $p < 0,05$ ). Demikian juga pada pemeriksaan darah yang dilakukan 6 dan 24 jam setelah pemberian alkohol, gugus fungsi FAEE

24 jam lebih terdeteksi daripada gugus fungsi FAEE 6 jam ( $p < 0,05$ ). Keberadaan FAEE dalam waktu 24 jam secara nyata lebih terlacak daripada pemeriksaan 6 jam, hal ini terlihat dengan rata-rata *rank* FAEE berturut-turut sebesar 3,50 dan 7,30 masing-masing untuk

darah 6 dan 24 jam seperti dipperlihatkan dalam Gambar 2. Dengan demikian pemberian alkohol 20% ( $p = 0,041$ ) akut dinyatakan bahwa FAEE 24 jam berbeda secara bermakna (terdeteksi) dengan FAEE 6 jam ( $p < 0,05$ ).



Gambar 2. Angka keterlacakan FAEE dalam darah tikus Wistar setelah 6 dan 24 jam pemberian alkohol 20%

### Pembahasan

Analisis FAEE dalam sampel biologis seperti darah diisolasi dan dimurnikan dengan metode SPE dan kemudian dianalisis dengan spektroskopi infra merah (*infra red spectroscopy/IR*). Instrumen IR adalah suatu analisis senyawa kimia untuk melihat gugus-gugus fungsi spesifik suatu senyawa. Gugus FAEE yang terdeteksi dalam darah tikus Wistar sesuai dengan Silverstein, 1991. Gugus C-H muncul pada daerah serapan  $3600-2500\text{ cm}^{-1}$  C=O kuat pada  $1870-1540\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya gugus keton dari senyawa karboksilat, aldehyd, keton, dan ester karboksilat; C=C dan C-H dari aldehyd  $1455$  dan  $1390\text{ cm}^{-1}$ ; dan C-O pada  $1190-1140\text{ cm}^{-1}$ . Metode SPE telah dipakai oleh beberapa peneliti sebelumnya (Chaterine *et al.*, 2003; Caprara *et al.*, 2006) untuk sampel biologis seperti darah, jaringan,

*meconium* dan rambut manusia dengan tingkat efisiensi ekstraksi yang mencapai 40 sampai 73 % dan batas deteksi (*limit of detection/LOD*) mencapai 0,008 sampai 0,084 pmol/mg.

Kadar FAEE juga dapat ditentukan dengan mengikat albumin yang membawa asam lemak (Best *et al.*, 2006). Dengan metode ini diperoleh kadar FAEE 0,1 dan 2,0 mol per mol protein menggunakan sampel rambut. Penggunaan sampel rambut semacam ini untuk mendeteksi FAEE telah pula dilakukan oleh Pragst dan Yegles, 2008 dan merupakan salah satu teknik untuk mendeteksi penyalahgunaan alkohol secara retrospektif pada saat kehamilan. FAEE merupakan marka metabolit etanol yang spesifik dan sensitif yang dapat diperoleh dengan mikroekstraksi fase padat campuran n-heptana/dimetil sulfoksida. Namun, Wurst *et al.*, 2006 menyebutkan bahwa FAEE merupakan

marka baru yang sensitif dan spesifik untuk mengetahui penyalahgunaan alkohol jika dibandingkan dengan metabolit alkohol lainnya. Keberadaan FAEE dalam rambut telah dipakai sebagai marka biologis pada masa prenatal untuk mendiagnosis tingkat kelainan fetus akibat alkohol (*Fetal Alcohol Spectrum Disorder/FASD*) pada wanita hamil yang menderita alkoholik (Kulaga *et al.*, 2009). Moore *et al.*, 2003 menyatakan bahwa total konsentrasi FAEE >10.000 ng/g di dalam spesimen *meconium* cukup kuat menunjukkan bahwa kelahiran baru telah terekspose sejumlah alkohol selama kehamilan.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

*Analisis Fatty Acid Ethyl Ester* dalam darah tikus Wistar dengan IR dapat dibuktikan ada gugus fungsi FAEE spesifik baik pada darah 6 jam maupun 24 jam setelah minum alkohol 20% selama 1 minggu. Gugus fungsi FAEE yang muncul adalah Gugus C-H, C=O, C=C dan C-H.

### Saran

Disarankan perlu dilakukan penelitian pada sampel aplikasi ke kasus pada orang pada penyalahgunaan alkohol.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Yth, Prof. Dr. dr. A. A. Gede Sudewa Djelantik, Sp.PK.(promotor); Prof. Dr. dr. Ketut Suastika Sp.PD(KE). (kopromotor I); dan Prof. Drh. Nyoman Mantik Astawa, Ph.D. (kopromotor II); serta Dikti atas Program Sandwich di Flinders University Adelaide Australia dalam analisis FAEE dengan IR.

## DAFTAR PUSTAKA

- Andreas A, Janda I, Seidl S, and Wurst FM., 2000, Determination of Ethyl Glucuronide in Hair Samples, *J Alcohol and Alcoholism*, 35 : 313-314
- Aydin HH., Celik HA., Deveci R., Karacali S., Saydam G., Omay SB., and Batur Y., 2005, Induction of Apoptosis by Fatty Acid Ethyl Esters in HepG2 Cells, *Abstract food and Chemical Toxicology*, 43 : 139-145
- Best CA., Laposato M., Proios VG., and Szczepiorkowski ZM., 2006, Method To Asses Fatty Acid Ethyl Ester Binding To Albumin. *J Alcohol and Alcoholism*, 41 : 240-246
- Caprara DL., Klein J., and Koren G., 2006, Diagnosis of Fetal Alcohol Spectrum Disorder (FASD) : Fatty Acid Ethyl Esters and Neonatal Hair Analysis, *J. Ann Ist Super Sanita*, 42 : 39-45
- Chaterine AB., Joanne E., Cluette-Brown, Teruya M., Teruya, A., and Laposato M., 2003, Red Blood Cell fatty Acid Ethyl Esters : A significant Component of Fatty Acid Ethyl Esters in the Blood, *J. of Lipid Research*, JLR Papers in Press, Published on January 1, 2003 as Manuscript M200398-JLR200. Division of Laboratory Medicine, Departement of Pathology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts USA, [02114.mlaposato@partners.org](mailto:02114.mlaposato@partners.org).
- Costantino A., Digregorio EJ., Korn W., Spayd S., and Rieders F., 2006, The effect of the Use of Mouthwash on Ethylglucuronide Concentrations in Urine, *J. of Analytical Toxicology*, 30 : 659-662
- Dahl H., 2006, Ethyl glucuronide, a new biochemical marker for acute alcohol intake : Studies on possible causes for false-negative or false-positive results, *Departement of Clinical Neuroscience section of Alcohol and Drug Dependence Research*, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden
- Kintz P., Villain M., Vallet E., Etter M., Salquebre G., and Cirimele V., 2008, Ethyl Glucuronide : Unusual Distribution between Head Hair and Pubic Hair, *J. Forensic Science. ScienceDirect*, 176 : 87-90

- Kulaga V., Caprara D., Iqbal U., Kapur B., Klein J., Reynolds J., Brien J., and Koren G., 2006, Fatty Acid Ethyl Esters (FAEE): Comparative Accumulation in Human and Guinea Pig as a Biomarker for Prenatal Alcohol Exposure, *J Alcohol and Alcoholism*, 41 : 534-539
- Kulaga V., Pragst F., and Koren G., 2009, The Fatty Acid Ethyl Esters (FAEE) Hair Test: Emerging Technology for the Diagnosis of Fetal Alcohol Spectrum Disorders (FASD), *Annales of Toxicologie Analytique*, 21 : 61-65
- Moore C , Jones J , Lewis D , and Buchi K., 2003, Prevalence of Fatty Acid Ethyl Esters in Meconium Specimens, *Clinical Chemistry, Drug Monitoring and Toxicology*, 49 : 133-136
- POA (Pathology of Alcohol). 2006. Pathology of Alcohol: The legs go before the Liver. *The Biomedical Sciencest*, January 2006, p. 48-49
- Pragst F. and Yegles M., 2008, Determination of Fatty Acid Ethyl Esters (FAEE) and Ethyl Glucuronide (EtG) in Hair: A Promising Way for Retrospective Detection of Alcohol Abuse During pregnancy, *Therapeutic Drug Monitoring*, Proquest, April, 30 : 255
- Salem RO., Laposato M., Rajendram R., Cluettle-Brown, JE., and Preedy VR., 2006, The Total Body Mass of Fatty Acid Ethyl Esters in Skeletal Muscles Following Ethanol Exposure Greatly Exceeds that found in the Liver and the Heart, *J. Alcohol & Alcoholism*, 41 : 598-603, Advance Access publication 16 September 2006,
- Shepherd R., 2003, Simpson's Forensic Medicine, 12<sup>th</sup> Ed., London : Arnold. [http://www.ArnoldPublisher, Com](http://www.ArnoldPublisher,Com).
- Silverstein RM., Bassler GC., and Morrill TC., 1991, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 5<sup>th</sup> Ed. John Wiley & Sons, INC
- Skipper GE., Weinmann W., Thierauf A., Schaefer P., Wiesbeck G., Allen JP., Miller M., and Wurst FM., 2004, Ethyl Glucuronide : A Biomarker To Identify Alcohol Use By Health Professionals Recovering From Substance Use Disorders, *J Alcohol and Alcoholism*, 39: 445-449
- SOASAS (State Office of Alcoholism and Substance Abuse Services), 2006, Addiction Medicine Unit knowledge Workbook IV : The Assessment of Alcohol use Utilizing Biomarkers. New York State Office of Alcoholism and Substance Abuse Services 1450 Western Avenue Albany, New York 12203, <http://www.oasas.state.ny.us/AsMed/>
- Stephanson NN., 2007, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Study of Two Biochemical Alcohol Markers, *Thesis for Doctoral Degree (Ph.D)*, Karolinska Institutet
- Sutter K., 2002, Determination of ethanol in Blood : Analytical Aspects, Quality Control, and Theoretical Calculation for Forensic Applications, Abstract Ingentaconnect, *Chimia International J. for Chemistry*, 56 : 59-62
- Wallach J., 2004, *Interpretation of Diagnostic Tests*, 8<sup>th</sup> Ed., Lippincott Williams & Wilkins,.
- Weinmann W., Schaefer P., Thierauf A., Schreiber A., and Wurst FM., 2004, Confirmatory Analysis of Ethylglucuronide in Urine by Liquid-Chromatography/ Electrospray ionization/Tandem Mass Spectrometry According to Forensic Guidelines, *J. of The American Society for Mass Spectrometry, Science Direct*, 15 : 188-193
- Wurst FM., Vogel R., Jachau K., Varga A., Alling C., Andreas A., and Skipper GE., 2003 (c), Ethyl Glucuronide Discloses Recent Covert Alcohol Use Not Detected by Standard Testing in Forensic Psychiatric Inpatients, *J. Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 27 : 471-476
- Wurst FM., Tabakoff B., Alling C., Aradottir S., Wiesbeck GA., Muller-Spahn F., Pragst F., Johnson B., Javors M., Aillt-Daoud N., Skipper GE., Spies C., Nachbar Y., Lesch O., Ramskogler K., Hartmann S., Wolfersdorf M., Dresen S., Weinmann

W., Hines I., Kaiser A., Lu RB., Ko HC., Huang SY., Wang TJ., Wu YS., Whitfield J., Snell LD., Wu C., and Hoffman PL., 2006, World Health Organization/International Society for Biomedical Research on Alcoholism Study on State and Trait Markers of Alcohol Use and Dependence : back to

the Future, Abstract Alcoholism : Clinical and Experimental Research, Research Society on Alcoholism, Psychiatric University Hospital Basel Switzerland-Sweden-Germany-Austria-Taiwan-Australia, Published on line : 3 May 2006, 29 (7) : 1268-1275