VERIFIKASI METODE ANALISIS METAMFETAMINA DAN AMFETAMINA DALAM MATRIKS URIN SECARA AUTOMATISASI DENGAN GERSTEL® DISPOSABLE PIPETTE EXTRACTION (DPX) MULTIPURPOSE SAMPLER (MPS)

Prisma Andini^{1*}, Sulaeman Mappasessu¹, Yuswardi¹, Triwidiastuti¹, Dwi Hernanto¹, Brahmantri
Adjiesaka², Muhammad Genta Zuan Nur²

¹Puslabfor Bareskrim Polri, Indonesia

²Sekolah Menengah Analis Kimia Bogor, Indonesia

*Correspondence E-mail: andin.a.prisma@gmail.com

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 August 2021

Revised 23 September 2021

Accepted 15 Oktober 2021

Available online 19 Oktober 2021

Keywords: verification, urine, methamphetamine, amphetamine, Gerstel® MPS DPX

Kata kunci: verifikasi, urin, metamfetamina, amfetamina, Gerstel® MPS DPX

DOI:

<https://doi.org/10.54579/jfe.v1i3.9>

How to Cite :

Andini, P., Mappasessu, S., Yuswardi, Triwidiastuti, Hernanto, D., Adjiesaka, B., Nur, M. G. Z. (2021). Verifikasi Metode Analisis Metamfetamina dan Amfetamina dalam Matriks Urin Secara Automatisasi Dengan Gerstel® Disposable Pipette Extraction (DPX) Multipurpose Sampler (MPS). *Journal of Forensic Expert*, 1(3), 31-38.

ABSTRACT

Method analytical validation and verification is crucial in routine qualitative and quantitative analysis. Analysis laboratory need objective evidences about specific parameters in their drugs/analytes or drugs metabolites in matrices biology. Urine is the most preferable matrix biology for determining drugs metabolites especially in drug abuses cases because urine's sampling process is not invasive. There are many methods extracting drugs in urine, especially methamphetamine and amphetamine as those two analytes are excreted via urine. This study presented method verification for determination of methamphetamine and amphetamine in urine using Gerstel® automated Disposable Pipette Extraction (DPX) Multipurpose Sampler (MPS). Result of this study showed that retention time of methamphetamine is in minute 6.21, and amphetamine is in minute 3.15. Methamphetamine's curve displayed a coefficient of determination $r^2=0,9999$ with the equation $y=170,19x+33183$. The equation of amphetamine showed $y=44390x - 17513$ with coefficient of determination $r^2= 0,9974$. Limit of detection (LOD) of methamphetamine in urine is 59,73 ppb, and LOD of amphetamine is 36 ppb.

ABSTRAK

Validasi atau verifikasi metode analisis bersifat krusial pada analisis kualitatif maupun kuantitatif. Suatu laboratorium analisis memerlukan bukti yang objektif terhadap parameter spesifik mengenai pemeriksaan obat maupun metabolit obat dalam matriks biologis. Urin merupakan matriks biologis yang seringkali dipilih untuk dianalisis mengingat untuk mendapatkan urin tidak memerlukan tindakan invasif, serta obat-obatan yang disalahgunakan seperti metamfetamina dan amfetamina terakresi pada urin. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode analisis secara otomatis serta verifikasi terhadap berbagai parameter analisis pada pemeriksaan metamfetamina dan amfetamina dalam urin menggunakan ekstraksi dengan Gerstel® disposable pipette extraction (DPX) yang dikombinasikan dengan GCMS. Berdasarkan hasil analisis didapatkan data rerata waktu retensi metamfetamina pada menit ke 6,21 dan rerata waktu retensi amfetamina yaitu pada menit ke 3,15. Persamaan regresi linear metamfetamina yang didapat yaitu $y=170,19x+33183$ dengan nilai regresi linear $r^2=0,9999$. Sementara untuk amfetamina menunjukkan persamaan $y=44390x - 17513$, nilai regresi linier $r^2= 0,9974$. LOD metamfetamina dalam urin yaitu sebesar 59,73 ppb serta LOD terhitung amfetamina dalam urin yaitu 36 ppb.

Pendahuluan

Validasi atau verifikasi metode menunjukkan keobjektifan bahwa suatu metode yang digunakan sesuai dengan tujuannya, mencapai nilai sesuai dengan syarat spesifik yang telah ditetapkan. Laboratorium yang terakreditasi mampu menunjukkan validitas terhadap parameter metode yang secara rutin digunakan dalam lingkup (National Association of Testing Authorities, 2012). Parameter dalam verifikasi dan validasi metode diantaranya akurasi, presisi, sensitivitas, limit of detection, dan lain-lain (European Medicine Agency, 2011; Food and Drug Administration (FDA), 2014). Apabila terjadi perubahan metode yang signifikan, diperlukan revalidasi atau verifikasi, tergantung pada jenis modifikasi dan situasi baru yang terjadi dalam laboratorium. Revalidasi dibutuhkan apabila metode sebelumnya diberlakukan misalnya untuk matriks biologis urin, akan tetapi akan diaplikasikan untuk matriks berupa darah. Verifikasi metode analisis biasanya memiliki parameter yang lebih sedikit dibandingkan dengan validasi metode karena dimplementasikan apabila terjadi pada perubahan sederhana terhadap suatu metode yang telah ada (Chan, 2015; Food and Drug Administration (FDA), 2014; United Nations Office on Drugs and Crime, 2009). Berdasarkan UNODC tahun 2009, implementasikan sistem manajemen kualitas pada laboratorium termasuk pemantauan kondisi sampel dan metode yang digunakan terhadap pemeriksaan senyawa narkotika dan obat-obatan berbahaya bersifat krusial dan wajib dilaksanakan (United Nations Office on Drugs and Crime, 2009).

Booklet Ketiga dari World Drug Report 2020 mengungkapkan bahwa jumlah sitaan global narkotika jenis metamfetamina pada tahun 2018 sebanyak 228 ton (UNODC, 2020a). Pada Booklet Kedua dari World Drug Report 2020 melaporkan pada tahun 2018 sebanyak 27 ribu pengguna amfetamin dan stimulan lain (UNODC, 2020b). Metamfetamina merupakan stimulan yang bersifat sangat adiktif dan kuat terhadap sistem saraf pusat. Metamfetamine dikembangkan pada awal abad 20 dari molekul induknya, yaitu amfetamina. Penyalahgunaan metamfetamina dapat dilakukan dengan cara *smoked* (dihirup asap hasil pembakaran), serbuk yang dihirup langsung melalui hidung, dan dikonsumsi secara oral (National Institute on Drug Abuse (NIDA), 2013). Pada manusia, metamfetamina akan dimetabolisme oleh CYP2D6 melalui hidrosilasi aromatik dan N-demetilasi menghasilkan metabolit utama berupa para-hidroksimetamfetamina (pOH-MA) dan amfetamin. Sementara dari hasil ekskresi urin ditemukan amfetamin dengan kadar sebesar 4-7% dan molekul induk metamfetamina sebesar 47% (Li et al., 2010). Pemeriksaan metabolit metamfetamin pada sampel biologis (rambut, plasma, serum, dan urin) dapat dilakukan dengan *liquid chromatography high resolution mass spectrometry* (LC-HRMS), *gas chromatography mass spectrometry* (GCMS), *gas chromatography-time-of-flight-mass spectrometry* (GC-TOFMS), *capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry* (CE-MS/MS), dan instrumen lain (Kim et al., 2019). Perlu diketahui bahwa urin merupakan matriks biologis yang mudah didapatkan mengingat pengambilannya tidak bersifat invasif serta telah dilakukan penelitian dengan menggunakan sampel urin. Telah dikembangkan berbagai proses ekstraksi metamfetamina dari urin diantaranya melalui *solid phase extraction* (SPE), *liquid-liquid extraction* (LLE), *solid-phase microextracton* (SPME), hingga *dispersive liquid-liquid microextraction* (DLLME). Ekstraksi konvensional dengan metode SPE dan LLE memerlukan jumlah sampel yang banyak sementara ketersediaan sampel urin pada kasus penyalahgunaan obat seringkali menjadi kendala (Xu & Liu, 2019). Penggunaan Gerstel® DPX MPS yang bersifat otomatis serta proses ekstraksi zat aktif membutuhkan sampel yang relatif sedikit yaitu di bawah 1 mL. Penelitian ini bertujuan untuk pengembangan metode analisis serta verifikasi metode yang dilaksanakan secara otomatis terhadap berbagai parameter pada pemeriksaan metamfetamina dan amfetamina dalam urin menggunakan ekstraksi dengan Gerstel® disposable pipette extraction (DPX) yang dikombinasikan dengan GCMS.

Metode

Certified reference material dan bahan kimia cair

(±)-Methamphetamine, 1.0 mg/mL dan (±)-Amphetamine, 1.0 mg/mL diperoleh dari Cerilliant. Asetonitril sebagai conditioning eluent, diklorometan, isopropanol, dan ammonia (78:20:2) didapatkan dari Merck. Tip DPX yang digunakan merupakan DPX tipe *reverse phase* (RP) yang didistribusikan oleh Gerstel®.

Kondisi instrumen GCMS

parameter	Kondisi
Kolom	HP-5MS, panjang 30 m, diameter 0,25 mm, ketebalan fasa diam 0,25 µm dengan fasa diam campuran 5% Diphenyl dan 95% Methylpolisiloxan, dan <i>Constant flow</i> 1 ml/min.
injektor	Temperatur 250 °C, Split 1 : 1, <i>gas saver</i> 30 mL/min setelah 4 menit, dan total <i>flow</i> 34 m/min
oven	Temperatur 100°C, kemudian 15°C/min sampai 290°C dan tahan selama 4 menit, dan <i>Run time</i> : 16.667 min
detektor MS	<i>Ion source Temperature</i> 230 °C, <i>quadrupole temperature</i> 290 °C, <i>Mode</i> El Full Scan Electron, <i>Solven delay</i> 1.50 min dan <i>Mass range</i> 40-400 dalton

Kondisi MPS DPX, *software* Maestro®

Parameter	Kondisi
Sistem	<i>Run time</i> 16.67 min, <i>GC Cool Down Time</i> 5.00 min, <i>Cyro Timeout</i> 15.00 min
MPS (Liquid;Liquid Injection Settings)	<i>Syringe</i> : 10µL 65mm USM, <i>Sandwich</i> : No Sandwich, <i>Inj. Volume</i> (µL): 2.0, <i>Air Volume below</i> (µL): 0.0, <i>Inj. Speed</i> (µL/s): 50.00, <i>Fill Volume</i> (µL): 2.0, <i>Fill Strokes for Sample</i> : 5, <i>Fill Speed</i> (µL/s): 5.00, <i>Eject Speed</i> (µL/s): 50.00 , <i>Viscosity Delay</i> (s): 0, <i>Pre Inj. Delay</i> (s): 0, <i>Post Inj. Delay</i> (s): 0, <i>Inj. Penetration</i> (mm): 40.00, <i>Sample Tray Type</i> : VT40g/2-CVM, <i>Vial Penetration</i> (mm): 30.00, <i>Fast Injection</i> : none
MPS (Liquid;Rinse Setting)	<i>Rinse</i> : 1. Wash1@Fast Wash 1, <i>Preclean</i> : 10, <i>Postclean</i> : 10. 2. Pos2@Solvent Module, <i>Preclean</i> : 0, <i>Postclean</i> : 0. <i>Sample</i> (2.0 µL): 1 1. <i>Rinse</i> / 2. <i>Rinse</i> : <i>Clean Volume</i> (%): 70, <i>Fill Speed</i> (µL/s): 5.00, <i>Viscosity Delay</i> (s): 0, <i>Eject Speed</i> (µL/s): 50.00
MPS (Sample Prep)	GET; conditioning dengan asetonitril, mixing udara dan air; washing; elusi urin; elusi urine dengan udara; PUT; wash syringe; evap+dissolve; add methanol; mix. Skema cara kerja dengan DPX ditunjukkan pada Gambar 1.
MPS (LVI Calc;Calculate Injection Speed)	<i>Solvent</i> : 1,4-Dioxane <i>Current Method Setting</i> : <i>CIS Initial Temp.</i> : 60, <i>Injection Speed</i> : 50.00. <i>Injection Parameters</i> : <i>Column Headpressure</i> : 100.0 kPa, <i>Total Flow</i> : 123, <i>CIS Temp</i> : 60, <i>Factor</i> : 0.80
MPS (LVI Calc;Edit Solvents)	<i>Solvent Name</i> : 1,4-Dioxane, <i>Mole Weight</i> (g/mol): 88.12, <i>Density</i> (g/mL): 1.034

Gambar 1. Skema cara kerja Gerstel® disposable pipette tips extraction

Parameter

- Selektivitas merupakan metode analisis untuk membedakan senyawa yang memiliki struktur molekul yang mirip. Rumus perhitungan resolusi antara dua analit yaitu:

$$R_s = \frac{2 \times (R_t 2 - R_t 1)}{W_1 + W_2}$$

Keterangan:

R_s = Resolusi

$R_t 1$ = waktu retensi area puncak senyawa 1 (menit)

$R_t 2$ = waktu retensi area puncak senyawa 2 (menit)

W_1 = lebar (*width*) area puncak senyawa 1 (menit)

W_2 = lebar (*width*) area puncak senyawa 2 (menit) (Harmita, 2004).

- Presisi berfungsi untuk mengetahui suatu metode bersifat konsisten ketika dilakukan analisis sampel tunggal secara berulang.
- Linearitas berfungsi untuk melihat respon detektor terhadap peningkatan konsentrasi analit. Berdasarkan Association of Official Analytical Chemist (AOAC), nilai regresi linear $r^2 > 0,9900$ adalah *acceptable* (dapat diterima) (AOAC, 2002). *Certified material standard* metamfetamina masing-masing dibuat menjadi konsentrasi 50; 100; 200; 300; 500; dan 1000 ppb dengan urin sebagai pelarut. Konsentrasi amfetamina dalam urin untuk parameter linearitas amfetamina yaitu 0,25; 0,5; 1; 2; 3; dan 5 ppm
- Limit of detection* merupakan konsentrasi analit terendah yang dapat dideteksi oleh sistem. Secara konvensional, LOD biasanya dikalkulasi dengan melihat perbandingan 3:1 *signal-to-noise* (S/N).

Formula yang digunakan untuk perhitungan sebagai berikut:

$S(y/x)$ = variasi variabel respon:

$$S(y/x) = \sqrt{\frac{\sum(Y - Y_i)^2}{N-2}}$$

Formula untuk mendapatkan S_b :

$$S_b = \frac{S(y/x)}{\sqrt{\sum(X - X_r)^2}}$$

Nilai LOD diperoleh dengan formula:

$$LOD = \frac{3 \times S_b}{b}$$

Keterangan:

S = variasi variabel respon

y = luas area puncak

x = konsentrasi

y_i = nilai yang didapatkan berdasarkan persamaan linear

N = jumlah titik/konsentrasi analit yang digunakan untuk mendapatkan persamaan linear

$\bar{X}_r$ = rerata dari penjumlahan konsentrasi terukur pada analit

b = nilai apabila $x=0$

Hasil dan Pembahasan

Selektivitas

- Parameter selektivitas pada metamfetamina dibandingkan dengan 3,4-metilendioksimetamfetamina (MDMA). Rerata waktu retensi metamfetamina pada menit ke 6,21 sementara rerata waktu retensi untuk MDMA yaitu pada menit 3,49. Lebar Puncak metamfetamina yaitu 0,259 menit, sementara lebar puncak MDMA yaitu 0,26 menit. Hasil perhitungan resolusi dua analit berdasarkan formula yaitu $R_s=10,47$.
- Parameter selektivitas pada amfetamina dibandingkan dengan metamfetamina. Rerata waktu retensi amfetamina yaitu pada menit ke 3,15 sementara rerata waktu retensi untuk metamfetamina yaitu pada menit 3,54. Puncak antara amfetamina dan metamfetamina ditunjukkan pada Gambar 2. Lebar puncak amfetamina yaitu 0,15 menit, sementara lebar puncak metamfetamina yaitu 0,15. Hasil perhitungan resolusi yaitu $R_s=2,59$.

Gambar 2. Puncak amfetamina dan metamfetamina

Presi

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan *relative standard deviation* (RSD) waktu retensi metamfetamina yaitu 0,25%, untuk nilai RSD waktu retensi adalah 0,09%.

Linearitas

- Linearitas metamfetamina
Gambar 3 menunjukkan respon antara konsentrasi dan luas area (AUC) metamfetamina dalam urin. Persamaan regresi linear yang didapat yaitu $y=170,19x+33183$ dengan nilai regresi linear $r^2=0,9999$.

Gambar 3. Respon antara konsentrasi versus luas area (AUC) metamfetamina dalam urin.

b. Linearitas amfetamina

Konsentrasi terukur amfetamina dalam urin berturut-turut 0,25; 0,5; 1; 2; 3; dan 5 ppm menunjukkan garis yang linear dengan persamaan $y = 44390x - 17513$, nilai regresi linier $r^2 = 0,9974$. Respon antara konsentrasi versus luas area (AUC) amfetamina dalam urin ditunjukkan pada Gambar 4.

Gambar 4. Respon antara konsentrasi versus luas area (AUC) amfetamina dalam urin.

Limit of detection (LOD)/batas deteksi

Berdasarkan formula dan respon (AUC) dan konsentrasi analit pada linearitas berdasarkan Gambar 3 dan Gambar 4, LOD metamfetamina dalam urin yaitu sebesar 59,73 ppb serta LOD terhitung amfetamina dalam urin yaitu 36 ppb.

Penutup

Keuntungan penggunaan sampel urin sebagai matriks biologis yang diperiksa dalam kasus penyalahgunaan obat khususnya metamfetamina diantaranya yaitu ketersediaan dalam jumlah yang memadai, tidak bersifat invasif, konsentrasi molekul induk lebih besar, dan metode/teknik pemeriksaan urin telah banyak dikembangkan. Kekurangan dari penggunaan sebagai matriks biologis yaitu detection window yang cukup pendek dengan mudah dapat dimanipulasi (Hadland & Levy, 2016). Penggunaan Gerstel® MPS dan tip pipet Gerstel® DPX juga telah dilakukan oleh peneliti lain dalam menganalisis obat golongan opiod dan benzodiazepin dalam darah dan urin serta penentuan nikotin, kokaina, dan metabolitnya dalam mekonium (Foster et al., 2008; Mozaner Bordin et al., 2014). Penggunaan Gerstel® DPX MPS memiliki keuntungan diantaranya sampel yang digunakan dalam jumlah kecil. Rata-rata penggunaan sampel urin yang dibutuhkan hanya sebanyak 0,5 mL setiap ekstraksi.

Analisis menggunakan Gerstel® MPS diatur secara keseluruhan pada Maestro® dengan penempatan tip DPX, vial, maupun analit yang akan diperiksa sesuai dengan tempat (tray) yang telah disediakan. Studi menggunakan Gerstel® MPS DPX yang dikombinasikan dengan GCMS terlihat pemisahan yang baik antara dua zat yang terdapat dalam analit yang sama, ditunjukkan dengan pemisahan puncak masing-masing zat serta nilai resolusi yang lebih dari 1,5 s.d. 2 (Harmita, 2004). Parameter presisi dengan *injecting* satu konsentrasi analit secara berulang mampu menunjukkan kemiripan waktu retensi dilihat dari RSD waktu retensi yaitu kurang dari 2%. Parameter linearitas dinyatakan dengan koefisien korelasi r dengan ketentuan nilai yang dipersyaratkan semakin mendekati -1 atau 1 tergantung pada arah garis. Kedua zat yang dianalisis yaitu metamfetamina dalam urin menunjukkan $r^2=0,9999$ sementara koefisien nilai regresi linear amfetamina $r^2=0,9974$. Studi ini berhasil menunjukkan bahwa dengan menggunakan proses otomatisasi dan dengan penggunaan jumlah urin yang relative sedikit, mampu memperoleh nilai limit deteksi untuk metamfetamina yaitu 59,73 ppb dan untuk LOD amfetamina yaitu 36 ppb. LOD kedua zat tersebut jauh di bawah LOD pada *strip test* urin amfetamina atau metamfetamina yang memiliki *cut off* di atas 500 ng/mL. Penggunaan Gerstel® MPS DPX dibandingkan dengan metode konvensional terutama pada penggunaan sampel yang lebih sedikit, proses evaporasi juga bersifat otomatis, kemungkinan kontaminasi bersifat minimal, bahan kimia yang dibutuhkan selama proses analisis sedikit, serta waktu analisis jauh lebih singkat dibandingkan konvensional. Penelitian ini menunjukkan bahwa metode pemeriksaan metamfetamina dan amfetamina dalam urin secara otomatis menggunakan Gerstel® MPS DPX terverifikasi ditandai dengan tercapainya parameter analisis seperti selektivitas, presisi, linearitas, dan LOD.

Daftar Pustaka

- Association of Official Analytical Chemist. (2002). AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods and Analysis. J AOAC Int.
- European Medicine Agency. (2011). ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology.
- Chan, K. W. (2015). Tutorial on method verification: A routine method for the determination of heroin. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 5(2), 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2014.07.001>

- Food and Drug Administration (FDA). (2014). Methods, Method Verification and Validation. *ORA Laboratory Procedure*, 1.7, 1–19.
- Foster, F., Pfannkoch, E. E., Stuff, J. R., & Whitecavage, J. A. (2008). Analysis of Drugs and Metabolites in Blood and Urine using Automated Disposable Pipette Extraction. *Global Analytical Solutions*, July, 1–9.
- Hadland, S. E., & Levy, S. (2016). Objective Testing: Urine and Other Drug Tests. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*, 25(3), 549–565. <https://doi.org/10.1016/j.chc.2016.02.005>
- Harmita. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. Departemen Farmasi, FMIPA, Universitas Indonesia.
- Kim, M., Jang, W. J., Shakya, R., Choi, B., Jeong, C. H., & Lee, S. (2019). Current understanding of methamphetamine-associated metabolic changes revealed by the metabolomics approach. *Metabolites*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/metabo9100195>
- Li, L., Everhart, T., Jacob, P., Jones, R., & Mendelson, J. (2010). Stereoselectivity in the human metabolism of methamphetamine. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 69(2), 187–192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2009.03576.x>
- Mozaner Bordin, D. C., Alves, M. N. R., Cabrices, O. G., De Campos, E. G., & De Martinis, B. S. (2014). A rapid assay for the simultaneous determination of nicotine, cocaine and metabolites in meconium using disposable pipette extraction and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Journal of Analytical Toxicology*, 38(1), 31–38. <https://doi.org/10.1093/jat/bkt092>
- National Association of Testing Authorities. (2012). Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. *Nata*, December 2006, 1–32. [http://www.demarcheiso17025.com/document/Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods.pdf](http://www.demarcheiso17025.com/document/Guidelines%20for%20the%20validation%20and%20verification%20of%20quantitative%20and%20qualitative%20test%20methods.pdf)
- National Institute on Drug Abuse (NIDA). (2013). Methamphetamine Research Report. *NIH Publication*, October. <https://d14rmgtrwzf5a.cloudfront.net/sites/default/files/methrrs.pdf>
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2009). A commitment to quality and continuous improvement. In *Unodc*.
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2020)a. *Drug supply: 2020 World Drug Report*.
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2020)b. *Drug use and health consequences*. <https://doi.org/10.18356/025e247e-en>
- Xu, F., & Liu, L. (2019). Simultaneous determination of free methamphetamine, pethidine, ketamine and tramadol in urine by dispersive liquid–liquid microextraction combined with GC–MS. *Forensic Sciences Research*, 4(2), 188–194. <https://doi.org/10.1080/20961790.2017.1377386>