

Aplikasi Teknologi Ekstraksi Fasa Padat-GC/MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) pada Preparasi Analisis Senyawa Atsiri dalam Darah Mencit

Muchtaridi

Lab. Kimia Farmasi Jurusan Farmasi FMIPA UNPAD

ing_muchtar@yahoo.com

ABSTRACT

*Sample preparation is one of the step in analysis wich able to determine efficacy of analysis, because it can establish reproducibility and recovery of the matrix interference. SPE (Solid Phase Extraction) is recent trends in sample preparation for reduction solvent volume and time. In tis research, application of SPE has carried out in determination mysristisin and linalool in blood plas of mice after inhalation essential oil. Recovery of analysis myristicin in blood plasma of mice after inhalation essential oil of nutmeg seeds (*Myristica fragrans* Houtt) increase up to 90 %, after be used SPE C-18 in preparation. On the other hand, linalool could be detected in blood plasma of mice after inhalation essental oil of kemangi leaf (*Ocimum formacitratum* Linn) with application of SPE in preparation analysis .*

Key words : SPE, C-18, myristicin, linalool, nutmeg, kemangi

ABSTRAK

Preparasi sampel merupakan salah satu tahap dalam analisis yang dapat menentukan efisiensi dalam analisis, karena preparasi analisis dapat menentukan kelayakan dan

reproduksibilitas suatu analisis dalam matrik pengotor. SPE merupakan metode terbaru dalam preparasi analisis yang dapat meminimalisir banyaknya pelarut dan lamanya waktu analisis. Aplikasi SPE dalam menentukan linalool dan miristisin dalam plasma darah mencit setelah inhalasi minyak atsiri telah dilakukan dalam penelitian ini. *Recovery* pada analisis miristisin dalam plasma darah mencit setelah inhalasi minyak biji pala (*Myristica fragrans* Houtt) mencapai hingga 90 %, setelah digunakan SPE C-18 dalam preparasi. Selain itu, linalool dapat terdeteksi dalam plasma darah mencit setelah inhalasi minyak daun kemangi dengan aplikasi SPE dalam preparasi analisis.

Kata kunci : SPE C-18, miristisin, linalool, biji pala dan daun kemangi.

PENDAHULUAN

Preparasi analisis (penanganan sampel) merupakan salah satu tahap dalam analisis yang dapat menentukan keberhasilan suatu analisis, karena preparasi analisis dapat menetapkan *recovery* dan *reproducibility* suatu analisis, terutama pada analisis yang bersifat rutin (Teranishi, 1993). Analisis senyawa dalam cairan biologis memerlukan preparasi dengan ketelitian yang tinggi, sebab senyawa pengganggu dalam cairan biologis seperti hormon, protein, karbohidrat dan lemak sangat banyak (Kataoka, 2003).

Identifikasi dan kuantifikasi senyawa atsiri dalam darah sangat dibutuhkan preparasi yang tepat, sebab senyawa atsiri sangat mudah menguap pada suhu kamar sehingga sangat berpengaruh dalam menentukan metode analisis yang akan digunakan untuk kebutuhan identifikasi (Linkens dan Jackson, 1997).

Oleh karena itu, untuk menganalisa senyawa atsiri dalam darah harus digunakan metode analisis yang dapat mengoptimalkan hilangnya komponen-komponen pengganggu

(*interference*) pada preparasi analisis (Sostaric *et al.*, 2000). Ekstraksi fasa padat atau *Solid Phase Extraction* (SPE) merupakan metode ekstraksi yang berkembang saat ini dengan menggunakan kolom yang berbasis kromatografi (Masque *et al.*, 2001). Aplikasi menggunakan ekstrak fasa padat dalam identifikasi dan kuantifikasi senyawa atsiri dalam darah diharapkan lebih efisien dengan *recovery* tinggi dan sangat *reproducible* (Ferreira *et al.*, 2004).

Pada penelitian ini akan dilakukan analisis senyawa miristisin dalam darah mencit setelah diberi minyak biji pala (*Myristica fragrans* Houtt) secara inhalasi atau oral dan senyawa linalool dalam darah mencit setelah diberi minyak daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) secara inhalasi atau oral

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

BAHAN

Bahan Tanaman dan Hewan percobaan : bahan yang digunakan adalah minyak atsiri biji pala (*Myristica fragrans* Houtt) dan minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum formacitratum* Linn) yang diambil dari Balitro, Monaco, Lembang. Hewan yang digunakan adalah mencit putih jantan galur ddY, dengan berat badan 25-32 gram, berumur 2-3 bulan.

Bahan Kimia : metanol *p.a* (Merck) sebagai eluen SPE, Heparin (Merck) sebagai koagulan darah, standar alkana C₈-C₂₀ dan standar alkana C₂₁-C₄₀ (Sigma), dan 1,4-diklorobenzena (Sigma). **Alat-alat** : Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat distilasi uap, Inhalator, *Wheel Cage*, pipa kapiler heparin (Merck) tabung heparin (Boehringer Ingelheim), Mikropipet (Clinipipet) 0,05-0,1 ml, Sentrifugator (Hettich-EBA 8), Kolom C-18 (SEP-PAK Waters), *Syringe* SPE kaca 10 ml, GC-MS (Schimadzu-QP-5050A).

METODE

Identifikasi Senyawa dari Plasma Darah : Pengumpulan plasma darah mencit didasarkan pada metode yang dilakukan Jirovetz *et al.* (1992) dan Kovar *et al.* (1987). Darah dari mencit yang telah diinhalasi diambil dari bagian ujung mata mencit menggunakan pipa kapiler sebanyak 300-400 μL . Darah ditampung dalam tabung heparin dan disentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit, kemudian metanol sebanyak 500 μL dialirkan ke *Cartridge* C-18, plasma yang diperoleh diinjeksikan ke dalam *Cartidge* C-18, aqua bidestilata sebanyak 400 μL dialirkan ke dalam kolom *Cartridge* C-18 dilanjutkan dengan elusi menggunakan 600 μL metanol. Senyawa dari plasma darah dianalisis dengan Kromatografi Gas-Spektometri Massa (GC-MS), di Lab. Kimia Instrumen, Jurusan Kimia, UPI Bandung dengan menggunakan kolom kapiler DB5MS (dimensi 30mx0,32mmx0,25 μm), laju alir 1,8 ml/menit, injeksi split-splitless, split rasio 1:20, gas pembawa Helium tekanan 100 kPa, suhu *injector* 250 °C, suhu *interface* 280 °C, program suhu: 60°C ditahan 5 menit hingga 330°C ditahan 1 menit (laju kenaikan 10°C/ min).

Penentuan LRI dan Konsentrasi : Konfirmasi identitas hasil identifikasi dilakukan dengan menentukan nilai Linear Retention Index (LRI). Nilai LRI dihitung berdasarkan waktu retensi standar alkana (C₈-C₄₀) yang disuntikan pada GC-MS dengan kolom dan kondisi yang sama. Komponen yang teridentifikasi dikuantifikasi dengan menggunakan standar internal 1,4-diklorobenzena yang ditambahkan sebelum bahan diisolasi. Penentuan konsentrasi dilakukan pada sampel plasma darah. **Recovery** dihitung berdasarkan

perbandingan antara konsentrasi 1,4-diklorobenzena yang terdapat dalam plasma darah dan konsentrasi 1,4-diklorobenzena dalam methanol (balnko) dengan jumlah ulangan 2.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Senyawa Atsiri dalam Plasma darah Mencit Setelah Inhalasi Minyak Biji

Pala

Recovery pada analisis miristisin dalam plasma darah mencit setelah inhalasi minyak biji pala dengan menggunakan C₁₈ (Sep Pak Waters) mencapai 90 %, dibandingkan dengan tanpa perlakuan SPE, selain itu senyawa-senyawa volatil lain lebih banyak terdeteksi seperti terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Senyawa atsiri yang teridentifikasi dalam plasma darah mencit setelah inhalasi minyak biji pala dengan preparasi SPE C-18 dan dianalisis dengan GC-MS

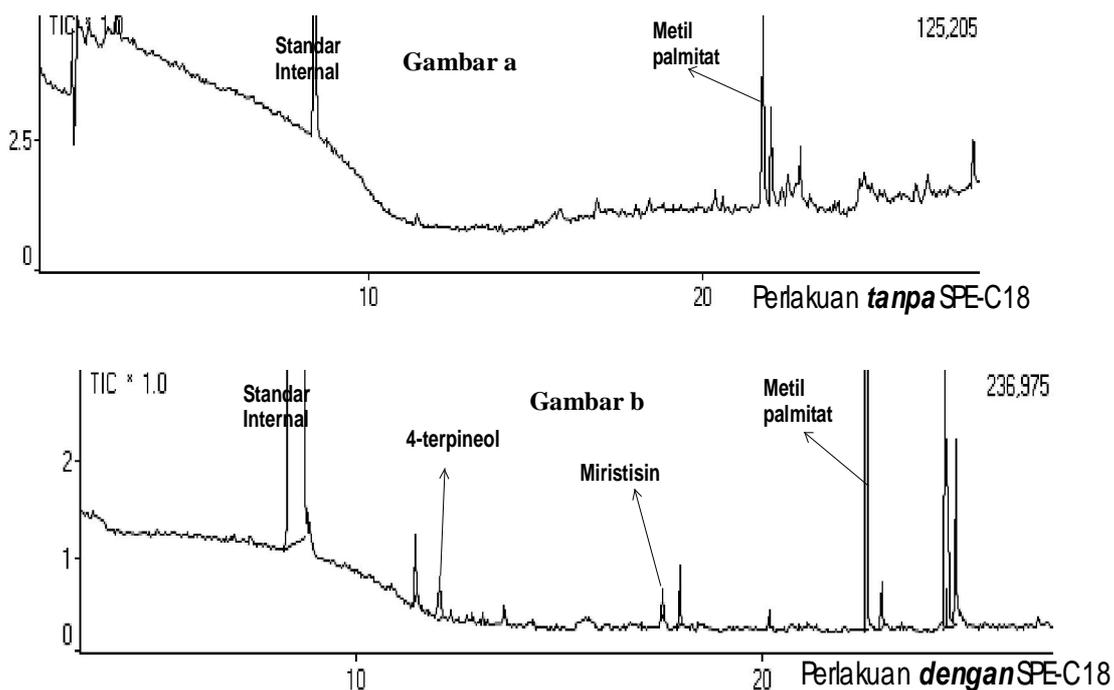
Senyawa	Lama Inhalasi						LRI Ref ^a
	¹ / ₂ jam (R ^d = 84 %)		1 jam (R ^d = 90 %)		2 jam (R ^d = 86 %)		
	LRI Eksp ^b	Kons. µg/mL	LRI Eksp ^b	Kons. µg/mL	LRI Eksp ^b	Kons. µg/mL	
4-Terpineol	1181	1.5	1181	2.9	1183	6.3	1177
Safrol	<i>td</i>	<i>td</i>	<i>td</i>	<i>td</i>	1292	1.3	1285
Miristisin	1521	3.8	1521	5.2	1523	7.1	1520
Metil miristat	1718	1.6	1719	1.4	1720	1.2	1726
Metil palmitat	1919	67.8	1920	72.2	1922	58.7	1927
Asam Palmitat	1952	2.8	<i>td</i>	<i>td</i>	<i>Td</i>	<i>Td</i>	1961 ^c
Metil oktadeka-10-olat	2094	23.3	2096	24.7	2097	18.9	-
Metil oleat	2100	12.1	2102	13.8	2105	10.7	-
Metil stearat	2129	13.1	2132	13.2	2134	10.8	2128

Penjelasan dari Tabel 1.

td = tidak terdeteksi, **a** : LRI *reference* dalam Adams (1995) dengan kolom DB5, **b** : LRI eksperimen dengan kolom DB5-MS, **c** : LRI *reference* dalam King *et al.* (1993) dengan kolom HP5, **d** : *Recovery*.

Pada Gambar 1 terlihat bahwa dengan penggunaan SPE, senyawa-senyawa pengotor menjadi berkurang. Tanpa perlakuan SPE (**a**), senyawa miristisin tidak terlihat, namun

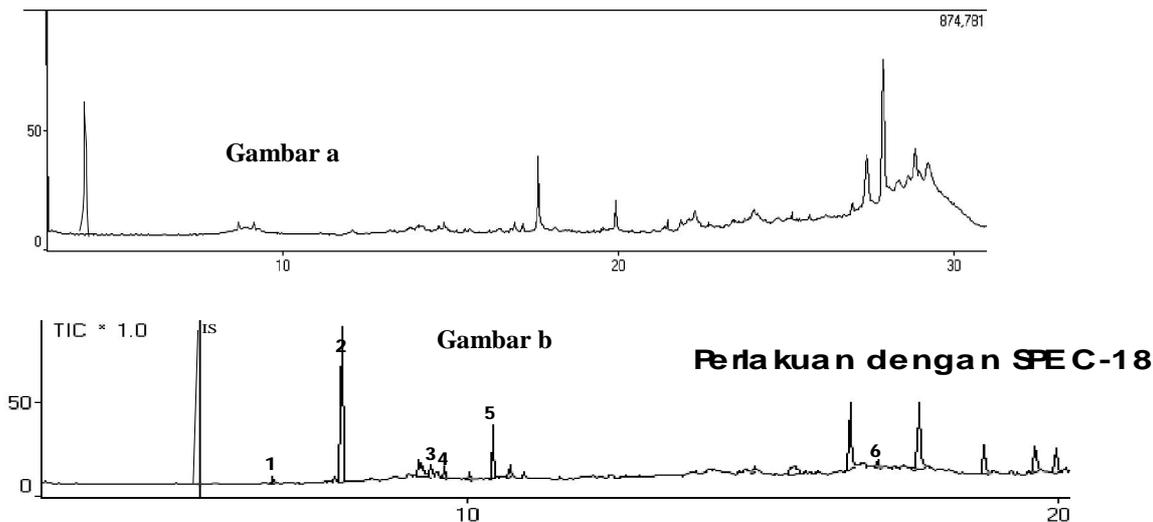
senyawa miristisin dan senyawa atsiri lain menjadi muncul setelah penggunaan SPE, selain itu kadar standar internal 1,4-diklorobenzen lebih besar dibandingkan dengan Gambar a..



Gambar 1. Kromatogram ion total senyawa miristisin dalam plasma darah mencit setelah inhalasi minyak biji pala. Gambar (a) analisis tanpa preparasi dengan SPE-C18 (b) analisis dengan preparasi SPE C18.

Analisis Senyawa Atsiri dalam Plasma darah Mencit Setelah Inhalasi Minyak Daun Kemangi

Pada Gambar 1 ditunjukkan bahwa dengan penggunaan SPE, linalool pada plasma darah mencit yang menginhulasi minyak daun kemangi dapat terdeteksi secara signifikan, selain itu senyawa 1,8-sineol juga terlihat muncul



Gambar 2. Kromatogram total ion senyawa minyak atsiri dalam plasma darah mencit setelah inhalasi minyak atsiri kemangi. Gambar **a**: Analisis tanpa preparasi dengan SPE setelah inhalasi 1 jam, Gambar **b**: kromatogram dengan preparasi menggunakan SPE C-18 senyawa minyak atsiri setelah inhalasi 1 jam. **IS** : Internal standar, 1: 1,8-sineol, 2: linalool, 3: 4-terpineol, 4 : α -terpineol, 5 : linalilil asetat, 6: α -Humulena, A: asam 2-propenoat, B: ergosterol, C: Phtalat, dan D: D-silitol asetat.

Pada Gambar **a**, analisis senyawa atsiri dalam darah setelah inhalasi minyak daun kemangi selama 1 jam tidak ditemukan satu pun senyawa atsiri, tetapi lebih banyak ditemukan senyawa-senyawa yang terdapat dalam darah dan pengotor lain. Namun, setelah penggunaan SPE dengan kolom C-18, senyawa linalool, dan senyawa atsiri lain terdeteksi dalam plasma darah mencit setelah inhalasi minyak atsiri selama 1 jam, dan senyawa pengotor dari darah secara signifikan berkurang. Selain itu, *recovery* analisis dengan menggunakan SPE meningkat hingga 82 %, seperti yang terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Senyawa atsiri yang teridentifikasi dalam plasma darah mencit setelah inhalasi minyak daun kemangi dengan preparasi SPE C-18 dan dianalisis dengan GC-MS

No. puncak ^c	Nama	LRI Eksp ^b	Kadar (µg/ml)		LRI Ref ^a
			R ^d = 76 % Inhalasi 1 jam	R ^d = 82 % Inhalasi 2 jam	
1.	1,8-sineole	1035	0,8	<i>td</i>	1033
2.	Linalool	1090	25,8	5,9	1098
3.	4-Terpineol	1166	3,9	1,9	1177
4.	α-Terpineol	1178	2,6	1,3	1189
5	Linalil asetat	1216	9,6	0,6	1257
6.	α-Humulena	1446	<i>Td</i>	2.2	1454

Hasil penelitian ini, sejalan dengan yang telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya. Kovar *et al.* (1987) menganalisis senyawa aktif aromaterapi pada minyak atsiri *Rosemary* setelah diberikan secara oral dan inhalasi pada mencit. Kovar *et al.* mengembangkan analisisnya dengan mengidentifikasi komponen volatil yang ada dalam plasma darah. Setelah diberi minyak atsiri *rosemary*, plasma darah mencit diambil, dan dipisahkan dari serumnya, kemudian serumnya disuntikan pada GC-FID. Identifikasi dan kuantifikasi menggunakan standar eksternal 1,8-sineole, sedangkan senyawa atsiri yang ada di permukaan inhalator diisolasi dengan menggunakan *headspace*. Penelitian Kovar *et al.* (1987) dikembangkan oleh Buchbauer (1991) dan Jirovetz *et al.* (1991 dan 1992). Jirovetz dan Buchbauer memodifikasi metode Kovar *et al.* dengan melakukan preparasi terlebih dahulu terhadap plasma darah. Plasma darah dipreparasi dengan SPE menggunakan kolom C-18 dengan eluen metanol, supaya komponen-komponen pengganggu dapat direduksi dari sampel, sehingga kadar senyawa atsiri yang didapatkan lebih banyak dibandingkan dengan metode sebelumnya. Pada penelitian Kovar *et al.* diperoleh konsentrasi senyawa atsiri dalam plasma darah sebesar 1-20 ng/l darah tikus yang diberikan minyak atsiri 0,1-0,6 ml/inhalalator, sedangkan hasil modifikasi Buchbauer dan Jirovetz pada tikus yang diberikan

minyak atsiri 2 % (0,02 ml) per inhalator diperoleh konsentrasi minyak atsiri 1-10 µg/ml atau 10-100 ng/l darah.

KESIMPULAN

Aplikasi SPE dalam preparasi analisis senyawa atsiri dalam darah mencit dapat membantu efisiensi analisis dengan meningkatkan *recovery* analisis dan mereduksi zat-zat pengotor dalam analisis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan kepada Ketua Lembaga Penelitian dan Rektor UNPAD yang telah menyetujui pendanaan penelitian ini melalui DIK dan DIKS. Dan terima kasih pula disampaikan untuk Dr. Ir. Anton A, Dr. Anas S, MSc, dan Dr. Slamet B, M.Agr yang telah membimbing penulis dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ferreira V., I. Jarauta, L. Ortega, J. Caho. **2004**. Simple strategy for the optimization of solid-phase extraction procedures through the use of solid liquid distribution coefficient application to determination of aliphatic lactones in wine. *Journal of Chromatography A*, 1025 147–156.
- Kataoka H. **2003**. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 22(4): 232-243.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Jager W., Woidich, A., and Nikiforov, A.. 1992. Analysis of fragrance compound in blood samples of mice by Gas Chromatography,

Mass Spectrometry, GC/FTIR, & GC/AES after inhalation of s&alwood oil.

J. Bio. Chrom., 6, 133-134.

Kovar, K. A., B. Grooper, D. Fries and H. P. T. Ammon. 1987. Blood levels of 1,8-cineole & locomotor activity of mice after inhalation & oral administration of rosemary oil. *J.Planta Medicinal*; 53: 315-318.

Masque Ë N., R.M. MarceË, F. Borrull. **2001**. Molecularly imprinted polymers: new tailor-made materials for selective solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry*. 20(9): 477-486.

Linkens H.F., J.F.Jackson **1999**. Plant Volatile Analysis. Berlin: Springer-Verlag

Sostaric T, M.C. Boyce, E. Spickett. **2000**. Analysis of the Atsirie Components in Vanilla Extracts and Flavorings by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography. *J. Food Agri. Chem.* 48: 5802-5807

Teranishi R., S. Kint. **1993**, Sample Preparation. In T.E. Acree and R. teranishi, eds. Flavor Science Sensible Principles and Techniques. *American Chemistry Society* Professional Reference Book, Washington DC.