



Literature Review: Qualitative and Quantitative Identification Methods of Morphine in Urine Samples

Literatur Review: Metode Analisis Identifikasi Kualitatif dan Kuantitatif Morfin Dalam Sampel Urine

Nina Elyyana^{1*)}, Sepvia Putri Sukma Wibowo¹⁾, Tiara Nurayuni¹⁾, Marsah Rahmawati Utami¹⁾, Lina Nurfadhila¹⁾

¹Prodi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Singaperbangsa Karawang, Indonesia.

*e-mail author : 2010631210006@student.unsika.ac.id

ABSTRACT

Opioids are one type of narcotics that are depressant, function to reduce the functional activity of the body. Morphine is one of the classes of strong opioids that functions as a strong analgesic that is usually used in patients with severe pain such as postoperatively. Morphine has additive properties and can cause toxic effects, so it is necessary to analyze morphine in the sample. Morphine analysis is performed using biological samples such as urine. This study aims to provide an explanation of various methods in the analysis of morphine substances in urine samples both qualitatively and quantitatively. The method used in writing this scientific paper is in the form of a literature study conducted by collecting relevant journals in the period of February-June 2023. The databases used are Google Scholar and Pubmed. Based on the results of the journal review, morphine identification in biological urine samples can be done quantitatively and qualitatively by several methods, namely Rapid Diagnostic Test, Card Test, KLT, LC-MS, GC-MS, SPRI, CFIA, Spectrophotodensitometry, MS and HPLC. Methods can be adapted to each need and condition.

Keywords: *Method; Analysis; Morphine; Urine.*

ABSTRAK

Opioid merupakan salah satu jenis narkotika yang bersifat depresan, berfungsi mengurangi aktifitas fungsional tubuh. Morfin merupakan salah satu golongan opioid kuat yang berfungsi sebagai analgesik kuat yang biasanya digunakan pada pasien dengan nyeri hebat seperti pasca operasi. Morfin memiliki sifat aditif dan dapat menimbulkan efek toksik, maka perlu dilakukan analisis morfin dalam sampel. Analisis morfin dilakukan dengan menggunakan sampel biologi seperti urin. Literatur review ini bertujuan untuk memberikan penjelasan mengenai berbagai macam metode dalam analisis zat morfin dalam sampel urin baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Metode yang digunakan dalam penulisan karya ilmiah ini berupa studi literatur yang dilakukan dengan mengumpulkan jurnal-jurnal relevan dalam rentang waktu Februari-Juni 2023. Database yang digunakan berupa Google Scholar dan Pubmed. Berdasarkan hasil review jurnal identifikasi morfin pada sampel biologis urin dapat dilakukan secara kuantitatif dan kualitatif dengan beberapa metode yaitu Rapid Diagnostic Test, Card Test, KLT, LC-MS, GC-MS, SPRI, CFIA, Spektrofotodensitometri, MS dan HPLC. Metode dapat disesuaikan dengan kebutuhan dan kondisi masing-masing.

Kata kunci: *Metode; Analisis; Morfin; Urin.*

PENDAHULUAN

Toksikologi merupakan cabang ilmu yang mempelajari mengenai berbagai efek samping yang merugikan dari berbagai agen kimiawi terhadap semua sistem makhluk hidup. Pada bidang biomedis, ahli toksikologi akan menangani efek samping yang timbul pada manusia akibat pajanan obat dan zat kimiawi lainnya, serta pembuktian keamanan atau bahaya potensial yang terkait penggunaannya. Toksikologi forensik merupakan ilmu yang mempelajari tentang racun dan pengidentifikasian bahan racun yang diduga ada dalam organ atau jaringan tubuh dan cairan korban (Fitriana, 2015). Salah satu pemanfaatan dari toksikologi forensik yakni penegakan hukum dalam kasus narkoba. Berdasarkan UU No. 35 Tahun 2009, Narkoba adalah zat atau obat yang berasal dari tanaman atau bukan tanaman, baik sintetis maupun semi sintetis, yang dapat menyebabkan penurunan atau perubahan kesadaran, hilangnya rasa, mengurangi sampai menghilangkan rasa nyeri, dan dapat menimbulkan ketergantungan (Wirasuta, 2014).

Opioid atau opiat merupakan salah satu jenis narkoba yang bersifat depresan, yang berfungsi mengurangi aktifitas fungsional tubuh. Opioid ini dapat membuat pemakainya merasa tenang, pendiam, dan bahkan membuat tidur dan tidak sadarkan diri (Shives, 2005). Di dalam bidang kedokteran, opioda bermanfaat sebagai *analgesik* (Joewana, 2010). Mekanisme kerja dari Opiat/opioid adalah dengan mengikat reseptor opioid, yang ditemukan terutama di sistem saraf pusat, sistem *perifer* dan saluran cerna yang mengakibatkan depresi susunan saraf pusat (SSP), analgesik, dan euforia. Contoh obat yang termasuk dalam golongan opiat adalah morfin dan kodein (Sadock BJ, 2007).

Morfin merupakan salah satu golongan opioid kuat yang berfungsi sebagai *analgesik* kuat yang biasanya digunakan pada pasien dengan nyeri hebat seperti *pasca* operasi. Morfin memiliki struktur kimia $C_{17}H_{19}NO_3$. Morfin banyak digunakan dalam dunia kesehatan diantaranya untuk mengobati kanker, cedera serius, pembedahan besar, dan kondisi-kondisi kronis seperti *arthritis*. Selain itu, morfin juga dapat digunakan sebagai obat penenang atau untuk mengobati batuk berdarah yang parah. Selain manfaat yang banyak morfin juga memiliki efek samping yang serius dan memiliki potensi

kecanduan yang tinggi, penggunaannya harus diawasi dengan ketat oleh dokter dan pasien harus mengikuti instruksi dosis dengan teliti. Morfin bekerja pada saraf pusat yaitu dengan mengikat reseptor opioid sehingga dapat mengurangi rasa nyeri (Heri, A.A.P, 2020).

Dikarenakan morfin memiliki sifat aditif dan dapat menimbulkan efek toksik, maka perlu dilakukan analisis morfin dalam sampel. Analisis morfin dapat dilakukan secara kualitatif maupun kuantitatif. Analisis morfin secara kualitatif bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan morfin, sedangkan analisis morfin secara kuantitatif bertujuan untuk mengetahui konsentrasi morfin dalam sampel. Beberapa metode yang dapat digunakan untuk analisis morfin antara lain *High Performance Liquid Chromatography* (KLT), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dan *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS) (Pebe, 2022).

Analisis morfin dilakukan dengan menggunakan sampel biologi. Adapun macam macam sampel biologi antara lain darah, urin, saliva, feses, jaringan tubuh dan cairan spinal. Analisis morfin dilakukan menggunakan sampel urin. Urin merupakan sampel biologi yang paling sering digunakan untuk pemeriksaan narkoba rutin karena ketersediaannya dalam jumlah besar dan memiliki kadar obat dalam jumlah besar, sehingga lebih mudah mendeteksi obat dibandingkan sampel biologi lainnya. Kelebihan sampel urin adalah pengambilan sampel dapat dilakukan dengan mudah oleh petugas yang bukan medis. Urin merupakan matriks yang stabil dan dapat disimpan beku tanpa merusak konsistensinya. Obat-obatan dalam urin biasanya dapat dideteksi sesudah 1-3 hari (Putri, 2020). Berdasarkan hal tersebut dilakukan lah penelitian ini dengan tujuan untuk memberikan paparan mengenai berbagai macam metode dalam analisis zat morfin dalam sampel urin baik secara kualitatif maupun kuantitatif.

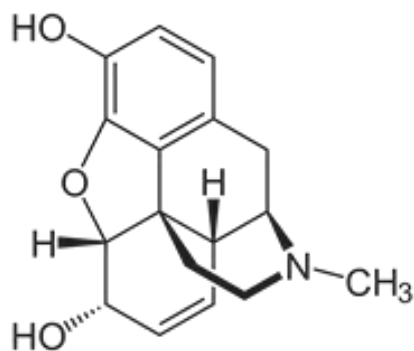
METODE PENELITIAN

Metode penelitian menggunakan metode studi literatur dengan mengumpulkan jurnal-jurnal yang relevan. Penulisan review ini diawali dengan mengumpulkan jurnal dari berbagai database seperti Google Scholar dan Pubmed dengan kata kunci "Metode analisis kualitatif dan kuantitatif

Morfin dalam sampel urine ” dengan tahun terbit jurnal yang dicari antara 2013-2023. Berdasarkan pencarian didapatkan sebanyak 277 jurnal, setelah dilakukan pengkajian terhadap judul, abstrak, dan hasil diskusi ditetapkan 15 jurnal yang sesuai dan relevan untuk menjelaskan kesesuaian dengan topik yang akan dibahas.

HASIL DAN DISKUSI

Identifikasi senyawa opiate morfin secara kualitatif dan kuantitatif dalam sampel urin dapat dilakukan dengan berbagai macam metode pengujian. Macam-macam metode pengujian yang dapat dilakukan dalam identifikasi senyawa morfin dalam urin ialah *Rapid Diagnostic Test*, *Card Test*, KLT, LC-MS, GC-MS, SPRi, CFIA, Spektrofotodensitometri, MS dan HPLC.



Gambar 1. Struktur Morfin

• *Rapid Diagnostic Test*

Rapid diagnostic test merupakan suatu metode kualitatif untuk mendeteksi suatu narkoba seperti morfin. *Rapid diagnostic test* bisa disebut sebagai uji pendahuluan dalam deteksi suatu narkoba sebelum dilakukan pemeriksaan lebih lanjut. Sampel yang digunakan dalam deteksi ini biasanya urine, karena urine mengandung konsentrasi obat, metabolit yang lebih tinggi dari pada sampel biologis lainnya. Kemudian, sebagian besar kadar obat di dalam urin bisa bertahan lebih lama dalam urine sekitar 1-3 hari dibandingkan dalam darah. Sehingga lebih efektif dalam skrining kualitatif (Yasa, I.K. B., et.al 2017).

Metode *rapid diagnostic test* berbentuk strip, strips test ini memiliki prinsip pemeriksaan reaksi antara antigen dengan antibodi yang berada dalam sampel urine dan bersaing melawan konjugat obat untuk mengikat antibodi.

Pemeriksaan ini menggunakan strip test yang dimasukkan ke dalam sampel urine secara vertikal sampai tanda panah yang kemudian tunggu beberapa saat yaitu 10-15 detik dan kemudian baca hasil pada strip test. Hasil positif morfin dapat ditandai dengan munculnya 1 garis merah pada wilayah kontrol. Kemudian, jika hasil test negatif maka akan muncul 2 garis merah pada wilayah kontrol dan test. Hasil test juga dapat dikatakan tidak valid jika hanya terdapat 1 garis merah pada wilayah test atau tidak terdapat garis merah sama sekali (Yasa, I.K.B., et.al 2017).

• *Card Test*

Metode *card test* merupakan suatu metode dengan prinsip imunokromatografi dengan kombinasi teknologi koloid emas terkonjugasi, hasil uji *card test* dapat dilihat dengan cepat melalui strip berwarna merah. Pada uji *card test* ini terdapat 6 strip yang berisi unit reaksi sampel dan koloid antibodi yang berwarna merah muda. Warna merah atau pita merah harus selalu ada di wilayah kontrol. Jika pita merah pada wilayah kontrol tidak ada maka tes akan gagal atau tidak berfungsi, karena pita kontrol ini berfungsi untuk melihat atau memverifikasi kandungan morfin. Jika hasil tes negatif maka terdapat 2 pita muda, satu di wilayah kontrol dan satu di wilayah test. Kemudian, jika hasil tes positif maka hanya terdapat satu pita merah pada wilayah kontrol. Hasil uji juga dapat dikatakan invalid jika tidak terdapat pita merah pada wilayah kontrol atau tidak terdapat pita merah pada kedua wilayah (Putri, M. P. et al, 2020).

Card test merupakan analisis kualitatif pada sampel urine yang mempunyai nilai ambang batas. Nilai ambang batas (*cut off*) dari morfin yang mampu mendeteksi sampel urine secara kualitatif yaitu 300 ng/ml. Jika kandungan morfin dibawah ambang batas (*cut off*) maka hasil test negatif, dan jika kandungan morfin diatas ambang batas (*cut off*) maka hasilnya positif dengan waktu tunggu 5 hingga 10 menit. Keuntungan dari metode *card test* yaitu uji dapat dilakukan secara mudah dan cepat serta biaya yang diperlukan terjangkau, dan hasil uji mudah dibaca. Kekurangan metode *card test* diantaranya sensitivitas yang terbatas karena tidak semua narkoba dengan kadar rendah dapat diuji menggunakan metode *card test*. Selain itu pada metode ini hanya bisa memberi informasi kualitatif saja dan tidak memberikan informasi tentang

jumlah zat yang terdeteksi (kuantitatif) dan metode *card test* rentan terhadap hasil positif palsu atau negatif palsu (Putri, M. P. et al, 2020).

- **KLT**

Analisis kualitatif dengan KLT Spektrofotodensitometri dilakukan dengan membandingkan parameter hRf. Dua senyawa murni diduga identik jika mempunyai nilai hRf yang sama jika diukur pada kondisi KLT yang sama. Untuk memastikan bahwa senyawa tersebut adalah sama, maka dilakukan pencocokan spektrum (Gandjar dan Rohman, 2007). Dalam melakukan uji konfirmasi dengan KLT dianjurkan untuk menggunakan lebih dari 1 sistem fase gerak yang berbeda, karena akan dapat memperkecil kemungkinan senyawa yang lolos dalam uji skrining (Moffat et al, 2005).

Dalam berbagai jurnal fase gerak yang digunakan banyak bervariasi atau menggunakan fase gerak yang berbeda sedangkan untuk fase diam yang digunakan adalah silika gel. Dikarenakan morfin memiliki kecenderungan larut dalam pelarut organik seperti etanol dan kloroform. Morfin Larut 1 bagian dalam 5000 bagian air, 1 bagian dalam 210 bagian etanol, 1 bagian dalam 1220 bagian kloroform, dan 1 bagian dalam 125 bagian gliserol; praktis tidak larut dalam eter (Kemenkes RI, 2014). Sehingga menggunakan fase diam yang cenderung polar agar analit dapat dibawa elusi oleh fase gerak yang cenderung nonpolar sehingga mendapatkan resolusi >1,5. Fase gerak yang digunakan memiliki kecenderungan bersifat nonpolar. Sesuai dengan sifat fisikokimia dari morfin yang lebih larut kedalam pelarut organik serta memiliki pKa 8 yang cenderung bersifat basa sehingga lebih larut ke pelarut organik (Ahadia, A, et al, 2011).

- **LC-MS**

Metode pengujian identifikasi dan kuantifikasi untuk senyawa opiate seperti urin manusia dengan instrumen *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS) dengan preparasi menggunakan metode *Solid Phase Extraction* (SPE) telah divalidasi sebagai prosedur konfirmasi dalam kombinasi dengan skrining imunokimia. Metode ini telah digunakan secara rutin sejak lama dan terbukti kuat dan andal. Keuntungan dari metode ini jika dibandingkan dengan GC-MS yakni langkah hidrolisis dan derivatisasi dapat dihilangkan,

memungkinkan prosedur yang lebih sederhana dan kuat yang membutuhkan volume sampel yang jauh lebih sedikit (Svensson J-O, 2007).

Metode LC-MS pertama yang dijelaskan untuk opiat dalam urin menggunakan ionisasi *thermo-spray* dan SPE dengan kartrid C18 (4). Hanya satu ion yang dipantau untuk setiap analit dan tidak ada perbandingan yang dilakukan dengan GC-MS. Dalam metode ini pemantauan dua ion digunakan untuk meningkatkan efektivitas dalam identifikasi. Salah satu kekurangan dari LC-MS dalam identifikasi senyawa opiate yakni tidak dapat memenuhi persyaratan pemantauan tiga ion. Seperti yang paling sering terjadi, hanya dua ion yang tersedia untuk dipantau (Maralikova B and Weinmann W, 2004).

Tiga analog berlabel deuterium digunakan sebagai standar internal: morfin-3-glukuronida-d3, kodein-d3, dan 6-asetilmorfin-d3. Lima puluh mikroliter alikuot urin disiapkan oleh SPE menggunakan kartrid Oasis HLB 30 mg. Sistem kromatografi terdiri dari kolom C18 2,0 x 100 mm dan buffer elusi gradien menggunakan asetonitril dan asam format 25 mmol/L. Ion molekul terprotonasi dipantau dalam mode pemantauan ion yang dipilih bersama dengan satu ion kualifikasi untuk setiap analit. *Variabilitas interassay* kurang dari 10% pada batas pelaporan 30 ng/mL untuk 6-asetil morfin dan 300 ng/mL untuk analit lainnya. Metode ini divalidasi dengan perbandingan dengan metode kromatografi gas (GC)-MS referensi menggunakan sampel urin asli (Bogusz M J, et al, 1997).

- **GC-MS**

Metode GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) merupakan suatu metode kuantitatif yang digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi suatu senyawa atau kadar obat dengan konsentrasi 1 ug/l. GC-MS merupakan suatu 2 metode dimana GC (*Gas Chromatography*) yang berfungsi untuk memisahkan senyawa-senyawa campuran atau senyawa kompleks seperti urine. Sedangkan MS (*Mass Spectrometry*) yang berfungsi untuk mengidentifikasi senyawa yang dianalisis. Senyawa atau obat dapat dianalisis dengan metode GC-MS dimana bahan tersebut harus mempunyai sifat mudah menguap (*volatile*). Jika suatu bahan atau obat tidak memiliki sifat menguap atau sulit menguap maka harus diderivatisasi terlebih dahulu. Tujuan dari

derivatisasi ini untuk meningkatkan volatilitas suatu senyawa, karena jika suatu senyawa memiliki molekul-molekul yang besar maka susah untuk menguap karena adanya gaya tarik-menarik antarmolekul. Metode GC-MS banyak digunakan dalam analisis suatu obat karena memiliki keunggulan yaitu pengerjaan yang cepat, produktivitas, efektivitas, sensitivitas dan selectivitas yang tinggi (Darmapatni, K.A.G, et.al. 2014).

Sebelum sampel dianalisis menggunakan metode kromatografi gas, sampel harus diekstraksi terlebih dahulu. Hal ini bertujuan untuk pemisahan senyawa target yang kompleks dari sampel yang diuji. Metode ekstraksi yang digunakan disesuaikan dengan jenis sampel dan senyawa yang akan diekstraksi. Tetapi pada umumnya metode GC-MS banyak menggunakan metode ekstraksi Fase Padat (*Solid-Phase Extraction*). Pada metode ekstraksi ini melibatkan penggunaan serat padat yang dilapisi oleh fase yang cocok untuk menahan senyawa target dari sampel. Senyawa tersebut kemudian dielusi menggunakan pelarut yang sesuai dan pelarut tersebut digunakan diupkan sebelum dilakukan analisis menggunakan GC-MS. Pada prosedur ekstraksi fase padat menggunakan kolom isolute dan membandingkan jumlah morfin (pengamatan akhir GC-MS) dalam dua sampel yang mengandung analit yang sama. Pada sampel 1 100 ul dimasukan ke dalam blanko urine bebas. Sedangkan pada sampel 2 dimasukan ke dalam tabung kosong. Pada sampel 1 mengalami proses ekstraksi fase padat hingga siap untuk derivatisasi. Sedangkan pada sampel 2 diupkan hingga kering dandiproses secara paralel untuk prosedur derivatisasi dan analisis GC-MS (A Mahmoud, 2021).

- **Surface Plasmon Resonance Imaging Immunoassay (SPRi)**

Surface Plasmon Resonance Imaging Immunoassay (SPRi) merupakan suatu metode analisis yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan senyawa biomolekul DNA (seperti antigen atau antibodi) pada sampel. Prinsip dari metode ini yaitu resonansi plasmon permukaan, yaitu ketika cahaya melintasi permukaan logam maka akan berinteraksi dengan indeks bias di sekitar permukaan. Ketika molekul target dalam sampel urine berikatan dengan biomolekul pada permukaan sensor terjadi perubahan indeks bias yang dapat diukur sebagai perubahan sinyal optik.

Gelombang surface plasmon dapat diilustrasikan seperti osilasi muatan bersama elektron pada interface logam dan dielektrik. Saat terjadi resonansi surface plasmon pantulan cahaya akan menurun ke lapisan logam. Resonansi terjadi ketika gelombang tangensial sama dengan gelombang real vektor *surface plasmon*. Kurva *surface plasmon resonance* terdapat 3 parameter yaitu: ketinggian puncak *dip*, lebar *dip* dan posisi *dip* (Ke Haokun, 2020).

Deteksi morfin metode *surface plasmon resonance* dapat dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Untuk morfin yang berat molekulnya rendah tidak dapat langsung dianalisis. Dalam Prosedur persaingan tidak langsung dilakukan pencakokan karboksil dan dilakukan *chip* pencangkakan morfin-BSA yang kemudian campuran antigen morfin dan morfin dialirkan dari atas permukaan *chip*. Melalui perubahan konsentrasi morfin dapat diperoleh nilai kurva kalibrasi. Jika semakin tinggi konsentrasi morfin akan semakin rendah nilai sinyalnya. Nilai sinyal ini akan digunakan sebagai standar untuk mengkalibrasi instrumen. Pada deteksi SPRi sampel bisa dibagi menjadi 2 langkah yaitu kombinasi dan disosiasi. Pada tahap kombinasi sampel digunakan sebagai fase gerak dengan laju alir 2 mL/s 300 detik. Sedangkan pada disosiasi fase gerak menggunakan buffer PBS dengan laju alir sama yaitu 2 mL/s 300 detik. Sensori SPRi dapat mendeteksi beberapa titik yang sama pada saat pengujian hal ini dapat menyebabkan terjadinya positif palsu pada sampel uji. Untuk menghindari positif palsu ini dapat menggunakan uji kromatografi lapis sederhana untuk memastikan kandungan dalam urine (Ke Haokun, 2020).

- **Competitive Fluorescence Immunoassay**

Competitive Fluorescence Immunoassay (CFIA) adalah metode analisis yang menggunakan prinsip imunoreaksi untuk mendeteksi dan mengukur keberadaan suatu molekul target dalam sampel. CFIA merupakan variasi dari *immunoassay* yang menggunakan sinyal fluoresensi untuk mendeteksi dan mengukur konsentrasi molekul target. Dalam CFIA, sampel yang mengandung molekul target diberi tanda dengan suatu penanda *fluoresen* yang terikat pada antibodi spesifik terhadap molekul target. Kemudian, sampel ini dicampur dengan antibodi spesifik yang juga terikat pada molekul target tetapi tidak memiliki penanda fluoresen

terikat. Keunggulan metode ini meliputi sensitivitas tinggi, kecepatan analisis yang relatif cepat, dan spesifisitas yang baik dalam mendeteksi molekul target tertentu (Miklos et al, 2020).

Pada penelitian digunakan metode *immunoassay fluoresensi* kompetitif untuk penentuan morfin dalam urin manusia. Untuk mendapatkan hasil analisis yang akurat, berikut beberapa faktor yang dapat mempengaruhi interaksi imunokimia spesifik, seperti waktu reaksi, suhu reaksi, pH lingkungan, dan kekuatan ionik. Analisis morfin dalam cairan biologis telah diterapkan dalam kasus forensik sebagai indikator penggunaan heroin dan dalam studi farmakokinetika rutin (R. Wasels and F. Belleville, 1994).

Karena struktur morfin memiliki molekul kecil, analisis imun harus dilakukan di bawah mekanisme kompetitif agar dapat diuji secara akurat. Dengan menggabungkan morfin dengan antibodi-FITC, metode analisis Fluoresensi kompetitif baru digunakan untuk merekam perubahan intensitas fluoresensi morfin. Antibodi berlabel FITC dicampur dengan larutan sampel atau berbagai larutan standar morfin ditambahkan ke pelat berlapis morfin hapten. Dalam *immunoassay*, semakin banyak morfin yang dicampur ke dalam larutan antibodi MOR-FITC, semakin sedikit antibodi MOR-FITC dapat bergabung dengan morfin hapten yang dilapisi pelat, dan semakin rendah intensitas *fluorescence* yang ditampilkan (Cao., Chen., & Zhao, 2019).

Untuk memilih konsentrasi Morfin hapten yang dilapisi optimal, konsentrasi Morfin hapten yang berbeda yang diencerkan dengan larutan *Citrate Buffer Saline* (CBS) pH 9,6 dilapisi pada pelat mikrotiter. Jumlah antibodi monoklonal anti-morfin yang sama yang diberi label FITC ditambahkan ke setiap sumur, dan intensitas fluoresensi diukur. Kurva titrasi dengan konsentrasi yang berbeda dari morfin hapten berlapis (0,3, 3, 6,25, 12,5, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, dan 400 µg / mL, masing-masing), dan intensitas fluoresensi yang diperoleh sesuai, yang merupakan nilai rata-rata pengukuran lima kali, dibuat. Konsentrasi kerja optimal pelapisan morfin hapten adalah titik belok kurva titrasi. Pada akhirnya, 50 µg / ml dipilih sebagai konsentrasi morfin hapten optimal (Cao., Chen., & Zhao, 2019).

Suhu pelapisan dan waktu pelapisan dipelajari oleh serangkaian data eksperimental. Hasil penelitian menunjukkan bahwa morfin hapten dilapisi selama 12 jam pada 4°C memiliki intensitas fluoresensi tertinggi di semua kondisi. Suhu rendah dapat meningkatkan fraksi pengikatannya, dan suhu tinggi dapat mempercepat reaksi. Waktu inkubasi untuk reaksi antigen-antibodi dipelajari dari 0,5 - 4 jam pada suhu 37°C. Intensitas fluoresensi dari reaksi antigen-antibodi telah meningkat dengan cepat sampai 2 jam pada suhu 37 °C, kemudian kekuatan perlahan melemah. Hasil ini menunjukkan bahwa waktu inkubasi optimal adalah 2 jam. Sensitivitas lebih rendah dalam kondisi asam dan basa. Oleh karena itu, kondisi pH untuk penelitian ini adalah 7,4 (Cao., Chen., & Zhao, 2019).

Di bawah kondisi yang dioptimalkan, *immunoassay* menghasilkan batas deteksi 1 ng/mL untuk morfin, dengan rentang kerja 0,2-2,5 µg/mL. Batas deteksi untuk morfin dalam metode ini 2 kali lebih rendah daripada metode GC-MS/MS konvensional. *Immunoassay* menunjukkan selektivitas tinggi terhadap morfin dan dapat membedakan tujuh obat yang memiliki struktur molekul serupa. Tingkat CR lebih rendah 10%. Hasil kuantifikasi dari *immunoassay* kami telah diverifikasi dengan metode GC-MS/MS. Secara khusus, dalam pemeriksaan morfin dalam sampel urin, deviasi relatif dari enam sampel aktual dengan dua metode ini lebih rendah 10%. Kelebihan metode ini yaitu proses *pretreatment* yang sederhana, cepat, dan bebas sampel, metode ini dapat digunakan untuk mendeteksi morfin dalam urin manusia secara akurat. Karena adanya berbagai metabolit obat dalam urin manusia, pengujian simultan dan multitarget sangat diharapkan. Karena pengujian ini didasarkan pada deteksi fluoresensi, pengujian ini dapat dengan mudah diintegrasikan ke dalam *platform microarray* (Cao., Chen., & Zhao, 2019).

• Spektrofotodensitometri

KLT Spektrofotodensitometri digunakan dalam uji konfirmasi dan penetapan kadar. Dalam deteksi senyawa secara spektrofotometri tidak dapat dilakukan pada satu panjang gelombang yang sama. Oleh karena itu, kromatografi lapis tipis (KLT) sangat memungkinkan untuk analisis kualitatif sekaligus analisis kuantitatif dengan spektrofotodensitometer. Adapun kelebihan metode KLT-Spektrodensitometri adalah biaya

relatif murah, instrumen yang digunakan lebih sederhana, namun metode ini menjadi metode analisis kualitatif yang paling banyak digunakan (Wirasuta, 2014).

Dipilih larutan pengembang yaitu *toluenen*: aseton: etanol: amonia (45:45:7:3) dan dipilih larutan pengestraksi yaitu etil asetat: isopropanol (9:1). Sampel urin sebanyak 5 mL ditambahkan asam fosfat hingga pH 3, setelah itu diekstraksi dengan 2x15 mL eter. Lapisan air tersebut ditambahkan ammonia sampai pH 8, kemudian diekstraksi dengan 2x5 mL kloroform. Lapisan air selanjutnya ditambah asam klorida pekat sampai pH 3, kemudian dipanaskan 100°C selama 30 menit. Setelah larutan dingin diekstraksi kembali dengan 2x5 mL eter. Lapisan air yang telah diekstraksi ditambah NaOH sampai pH 9, lalu diekstraksi dengan etilasetat-isopropanol dengan perbandingan 9:1. Lapisan organik hasil ekstraksi diuapkan sampai kering kemudian ditambah 5 mL metanol. Kemudian ditentukan kurva kalibrasi (Suaniti & Suryadhi, 2007).

Selanjutnya kurva kalibrasi ditentukan dengan perhitungan luas puncak yang dihasilkan dari penotolan baku morfin konsentrasi 5 g/mL pada satu seri jumlah baku morfin yaitu 20,40,60,80,100,120, dan 140 ng pada panjang gelombang maks 287 nm. Berdasarkan perhitungan diperoleh persamaan garis regresi $y = -69,21 + 8,06 x$, dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,992. Batas deteksi yang dihitung secara statistik pada taraf 95% tidak berbeda nyata dan dapat diterima. Berdasarkan hasil perhitungan, batas deteksi morfin yaitu 18,02 ng, sedangkan berdasarkan percobaan diperoleh batas deteksi sebesar 15 ng. Perolehan batas deteksi secara perhitungan maupun percobaan telah sesuai dengan literatur. Dimana pada literatur batas deteksi untuk KLT yang dianalisis dengan spektrodensitometer dengan sistem absorpsi berada pada rentang 10-100 ng (Moffat, 2002).

Didapatkan persentase perolehan kembali kadar morfin dalam urin yaitu 92,31; 93,14; dan 89,68 %, dengan simpangan baku 2,55 serta koefisien variasi 2,78 (Suaniti & Suryadhi, 2007).

• **Mass Spektrometri (MS)**

Spektrometri massa adalah suatu instrumen yang dapat menghasilkan berkas ion dari suatu sampel yang diuji, memilih ion tersebut menjadi spektrum sesuai dengan perbandingan massa

terhadap muatan (m/z) dan merekam kelimpahan relatif tiap jenis ion yang ada. Secara umum, spektrometer massa terdiri dari tiga komponen utama yaitu sumber ion yang berfungsi untuk menghasilkan ion berbentuk gas dari zat uji, penganalisis yang berfungsi untuk memisahkan ion menjadi komponen massa yang sesuai dengan perbandingan massa terhadap muatan dari ion yang ada dan sistem detektor untuk merekam kelimpahan relatif atau intensitas tiap jenis ion yang dipisahkan. Spektrometer massa juga dapat digunakan untuk mengukur perbandingan massa ion terhadap muatan ion serta untuk mempelajari proses ionisasi. Spektrometri massa memungkinkan untuk mempelajari reaksi ion dalam fase gas seperti proses dekomposisi unimolekuler dan reaksi ion molekul (Depkes RI, 2020).

Metode spektrometri massa (MS) biasanya digunakan untuk mengkonfirmasi keberadaan metode analitik standar yang umum digunakan di laboratorium. Metode MS mampu menyediakan hasil konfirmasi tentang keberadaan morfin dan senyawa lain dalam sampel urin, serta konsentrasinya yang akurat. Penting dilakukan pengembangan metode MS dengan kemampuan penyaringan cepat dan kuantisasi morfin yang akurat di tempat dalam sampel urin untuk tujuan mengurangi hasil negatif palsu atau positif palsu dan menghindari proses konformasi lama di laboratorium analitik (Coles et al, 2007).

Metode Mass Spektrometri dikembangkan lebih lanjut untuk penelitian kuantitatif morfin. Morfin berlabel isotop stabil (morfin-d3) digunakan sebagai standar internal (IS). Morfin d3 ditambahkan ke dalam sampel urin sebelum dilakukan analisis. Baik sampel morfin maupun morfin-d3 didegradasi dan dideteksi dengan baik pada proses clean-up, derivatisasi dansyl dan analisis PCS-MS. Fragmen prekursor dan diagnostik morfin-d3 diamati masing-masing pada m/z 522 dan m/z 288. Batas rendah deteksi ditentukan menjadi 50 ng/mL dan batas kuantitasi ditentukan menjadi 100 ng/mL. Untuk memastikan kinerja kuantitatif yang andal, kurva kalibrasi dibuat melalui spiking morfin ke dalam urin dalam kisaran konsentrasi 200–5000 ng/mL. Konsentrasi morfin-d3 adalah 500 ng/mL menunjukkan kurva kuantitatif morfin dalam urin, dengan koefisien (R^2) sebesar 0,9909 (Kang., Xue., Zhang et al, 2022).

Untuk mengevaluasi efektivitas dari metode MS miniatur cepat maka dilakukan perbandingan dengan metode LC-MS standar. Dengan memantau ion agnostik m/z 286 \ddot{y} 165 (morfin) dan 289 \ddot{y} 165 (morfin d3, IS, 500 ng/mL). Batas kuantitasi (LOQ) metode LC ditentukan sebesar 10 ng/mL, dan diperoleh kurva kuantitatif pada rentang konsentrasi 20 hingga 5000 ng/mL, dengan nilai R² sebesar 0,9980. Metode MS miniatur membutuhkan volume urin yang lebih kecil (200 L vs. 2000 L), dan sebagian besar kinerja kuantitatif dari metode tersebut, termasuk ketelitian, akurasi, dan reproduktifitas dapat dibandingkan dengan metode LC-MS standar. Meskipun sensitivitas metode MS miniatur tidak sebaik metode LC-MS standar, LOQ 100 ng/mL dapat memenuhi kebutuhan analisis morfin dalam urin di tempat, di mana cut-off konfirmasi adalah ditetapkan pada 300 ng/mL untuk penyaringan penggunaan opium dan produknya. Lebih penting lagi, seluruh proses metode analisis MS miniatur hanya membutuhkan waktu kurang dari 3 menit, yang lebih dari 20 kali lebih cepat daripada metode LC-MS biasa. Hasil ini menunjukkan bahwa metode ini menjanjikan

untuk kuantisasi morfin yang cepat dan di tempat dalam sampel urin (Kang., Xue., Zhang et al, 2022).

- **HPLC**

Metode kromatografi cair kinerja tinggi fase balik sederhana telah dikembangkan untuk penentuan morfin dalam urin manusia menggunakan kodein sebagai standar internal. Setelah ekstraksi fase padat (SPE), senyawa itu dipisahkan pada kolom Acentis Express C18 fase terbalik (150mm \times 4.6mm, 2.7 μ m) yang dilengkapi dengan kolom pelindung (2.7) μ m, 5 mm \times 4,6 mm). Saluran pada detektor UV dikonfigurasi untuk memperoleh data pada 285 nm. Fase cair terdiri dari asetonitril-natrium asetat (pH 4; 0,01M) (10:90, v / v). Studi stabilitas menunjukkan bahwa morfin stabil hingga satu bulan dalam urin. Metode ini diterapkan untuk menentukan konsentrasi morfin dalam urin manusia untuk analisis toksikologi (Bill L Posey et al, 1983).

Tabel 1. Hasil Literatur Review Metode Analisis Morfin Dalam Urin

Metode Analisis	Sampel	Jenis Analisis	Teknik Preparasi dan Analisis	Referensi
Rapid Diagnostic Test	Urine	Kualitatif	Preparasi Sampel : Dinilai karakteristik urine secara makroskopis (bau, warna dan kekeruhan). Kemudian buka bungkus strip test dan celupkan strip test ke dalam urine sampai tanda panah pada vertical sampai mengenai batas bawah, tunggu 10-15 detik dan baca hasil.	Yasa, I. K. B., et .al. (2017).
Card Test	Urine	Kualitatif	Preparasi Sampel : Sampel urine diambil dari kateter. Kemudian diidentifikasi menggunakan card dan diamati garis yang muncul pada card.	Putri, M. P, et.al (2020)
KLT	Urine	Kualitatif	Preparasi Sampel : Setiap sampel sebanyak 40 mL dibagi menjadi dua bagian yang sama sebanyak 20 mL. Setiap porsi diperiksa oleh petugas laboratorium tersendiri. Itu porsi pertama disiapkan untuk LLE diikuti oleh TLC dan yang kedua disiapkan untuk SPE diikuti oleh HPTLC. 20 mL dari masing- masing sampel ditambahkan 1 mL asam klorida pekat, yang kemudian dipanaskan selama 15 menit pada 100 $^{\circ}$ C untuk memecahkan konjugat	Basiri et. al. (2010) Ahadia, A., et al (2011)

			<p>glukoronida. Setelah dingin, pH campuran diatur 8-9 dengan amonia pekat.</p> <p>Teknik Analisis : Ekstrak hasil LLE dan SPE dilarutkan dalam 100 µl metanol kemudian dipipet 5 µl masing-masing ditotolkan pada plat fase diam silika gel Kemudian plat dikembangkan dalam fase gerak etil asetat: metanol:amonia (85:10:5). Sampel morfin diidentifikasi dengan plat yang telah disemprot reagen iodoplatinat yang telah diasamkan</p>	
LC-MS	Urine	Kualitatif & Kuantitatif	<p>Preparasi Sampel : Sampel urin 50 µl disiapkan untuk analisis dengan mencampurnya 200 µl larutan internal standar (IS) (mengandung 1 ug/ml morphin dalam 10 mmol buffer amonium asetat pH 4,5) dan 500 ul 0,5 mol/L buffer amonium sulfat pH 9,3. Sampel urin yang disiapkan dimasukkan dalam kartrid lalu dicuci dengan 1 ml air. Kartrid kemudian dielusi dengan 500 µL asetonitril 20% dalam asam format 25 mmol/L. Lalu eluat disentrifugasi dalam ruang hampa untuk menguapkan asetonitril, yang menghasilkan pengurangan sampel sebesar 60%, dan 100 µL dipindahkan ke 200 µL polipropilena dalam vial autosampler.</p> <p>Teknik Analisis : Ekstrak sampel (5 uL) disuntikkan ke kolom Phenomenex Luna C18. Temperatur dari kolom ialah 40°C dan laju alir 300 µL/menit. Elusi gradien dilakukan dengan buffer A menjadi 1% asetonitril dan buffer B menjadi 90% asetonitril, keduanya dengan asam format 25 mmol/L. Kuantifikasi dilakukan dengan menggunakan grafik kalibrasi yang dibuat dari rasio tinggi puncak antara analit dan masing-masing IS.</p>	J.-O. Svensson, et al (2007)
Surface Plasmon Resonance Imaging Immunoassay (SPRI)	Urine	Kualitatif & Kuantitatif	<p>Preparasi Sampel : Serpihan SPRI berlapis emas direndam dalam larutan Piranha (V(H₂SO₄) : V(H₂O) ¼ 7 : 3) selama 1 jam. Chip dicuci dengan air dan dikeringkan dengan gas nitrogen. Chip SPRI yang bersih ini direndam dalam 1 mmol L1 11-mercaptoundecanoic acid pada suhu kamar semalaman. Kemudian, serpihan dicuci secara bergantian dengan air deionisasi dan etanol anhidrat lalu dikeringkan dengan gas nitrogen Selanjutnya, 0,765 g EDC dan 0,115 g NHS</p>	Ke Haokun, et.al. (2020)

dilarutkan secara terpisah dalam 10 mL air deionisasi, dan kedua larutan dicampur. Chip SPRi ini dicelupkan ke dalam aktivator dan digetarkan dengan shaker. Setelah 5 jam dicuci dan dikeringkan dengan gas nitrogen.

Teknik Sampel :

Antigen (BSA) distabilkan dipasang pada chip dan dimasukkan ke dalam instrumen dan buffer PBS disuntikkan sebagai fase gerak dengan laju alir 2 mL selama 300 detik. Kemudian, sampel dibagi menjadi dua langkah : kombinasi dan disosiasi. Pada kombinasi, sampel sebagai fase gerak dengan laju alir 2 mL/ s1 selama 300 detik. Pada tahap disosiasi, buffer PBS sebagai fase gerak dengan laju alir 2 mL/ s1 selama 300 detik. Setelah langkah disosiasi, asam hidroklorat glisin digunakan sebagai fase gerak selama 180 detik dengan laju alir 2 mL/ s1.

GC-MS

Urine

Kuantitatif

Preparasi Sampel :

Sampel urin sebanyak 1 mL dipipet ke dalam tabung kaca dengan tutup ulir. Untuk urine *spike* (peningkatan konsentrasi zat tertentu dalam urin) 300 ng morfin/6-MAM (30 μ L dari 100 μ g/10 mL Metanol) ditambahkan ke sampel diikuti dengan 1 mL asetonitril dan kemudian 3 mL larutan 0,1 M phosphate buffer (pH 6). Kemudian divortex dan disentrifugasi selama 10 menit pada 3000 rpm.

A

Mahmoud & Alabdalla. (2021)

Teknik Analisis :

GC-MS Hewlett-Packard 5890 Seri II dihubungkan dengan 5972 MSD. Pemisahan kromatografi dicapai pada kolom kapiler silika terfusi HP-5MS(W&J 30m \times 0,25mm \times 0,5 μ m) dan helium 99,999 digunakan sebagai gas pembawa (1,0 ml/menit). Sampel (volume 1- μ L) diinjeksi dengan suhu 250 $^{\circ}$ C. Suhu oven kolom di program suhu awal 180 $^{\circ}$ C (ditahan selama 1 menit) pada 15 $^{\circ}$ C/menit hingga 270 $^{\circ}$ C (ditahan selama 11 menit). Suhu detektor 280 $^{\circ}$ C. Spektrometer massa dioperasikan dalam mode ionisasi elektron positif (EI) dan diperoleh pemindaian spektrum massa 50 - 500 m/z.

Competitive Fluorescence

Urine

kualitatif dan

Preparasi sampel :

Sampel urine (1 mL) dimasukkan ke dalam

Cao

J, Chen X, &

Immunoassay	kuantitatif	<p>tabung centrifuge (10 mL). 0,2 mL HCL diteteskan ke dalam sampel urin dan dipanaskan pada suhu 70°C selama 30 menit dan didinginkan. 8 mol/L NaOH ditambahkan untuk mengatur pH menjadi 9,0. Larutan buffer CBS (pH 8,9) (1 mL) ditambahkan dan dilarutkan dengan campuran kloroform dan isopropanol (3 mL, 9:1). Campuran disonikasi selama 10 menit, dan disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 3 menit. Proses ini diulang 2 kali, dan supernatan dikumpulkan dan digabungkan dalam tabung reaksi terpisah. 5 mg natrium sulfat anhidrat ditambahkan. Cairan supernatan dipindahkan ke tabung sentrifus lain dan dikeringkan dalam nitrogen pada suhu 40°C. Pelet dilarutkan dengan campuran etil asetat (200 µL) dan reagen derivatisasi (150 µL). Tabung reaksi ditutup dengan parafilm dan reaksi derivatisasi lanjutan selama 30 menit pada suhu 75°C. Dengan sentrifugasi, filtrasi, dan pengeringan pada suhu 40°C, produk akhir dilarutkan dalam etil asetat (200 µL) dan disuntikkan (1 µL) ke dalam GC-MS/MS untuk pengujian</p> <p>Teknik Analisis : Proses immunoassay dioperasikan pada 96-well microtiter immunoassay plate. <i>Phosphate-Buffered Saline with Tween</i> (PBS-T) digunakan sebagai larutan pembilas. Larutan konjugasi morfin hapten dilapisi ke permukaan lubang dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 12 jam, tempat pengikatan nonspesifik diblokir dengan ovalbumin (OVA) dalam PBS (350 µL, 1%) pada suhu 37° C selama 0,5 jam, kemudian <i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (FITC) 100 µL berlabel antibodi monoklonal anti-morfin (diencerkan dalam PBS) dicampur dengan larutan sampel atau larutan standar morfin (diketahui konsentrasinya, diencerkan dalam 0,01 mol/L PBS, pH 7,4). Diinkubasi pada 37°C selama 2 jam. <i>Plate</i> dibaca oleh <i>automatic microplate reader</i> yang dieksitasi pada 488 nm dan direkam pada 525 nm Semua nilai dirata-ratakan. setengah konsentrasi penghambatan maksimal (nilai IC50) terdeteksi oleh konsentrasi analit pada 50% dari pendinginan maksimal.</p>	Zhao W. 2019	
Spektrofotod	Urine	Kuantitatif	Preparasi Sampel :	Suaniti N

ensitometri			<p>Larutan baku morfin dibuat dengan 5µg/mL morfin dilarutkan dengan aquadest sampai 100 mL. Larutan tersebut ditotolkan 4,8,12,16,20, 24 dan 28 µL pada pelat kromatografi lapis tipis silica gel GF 254. Dan diperoleh jumlah penotolan larutan morfin berturut-turut 20, 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ng. Pelat di kembangkan dengan campuran larutan pengembang toluene -aseton -etanol-amonia dengan perbandingan 45 : 45 : 7 : 3 sampai mencapai batas dan dikeringkan.</p> <p>Teknik Analisis : Bercak diamati dengan spektrofotodensitometer pada panjang gelombang maks 287. Setelah sampel urin simulasi diekstraksi dengan pelarut terpilih, selanjutnya dianalisis dengan KLT- spektrofotodensitometer.</p>	M & mSuryadhi M A, 2007
Mass Spektrometri	Urine	Kuantitatif	<p>Preparasi sampel : morfin ditambahkan urin pada konsentrasi masing-masing 200, 500, 1000, 2000, dan 5000 ng/mL. Morfin digunakan sebagai standar internal pada konsentrasi 500 ng/mL. Kolom MCX SPE (60 mg) digunakan, yang dikondisikan dengan 100 mL MeOH dan 100 L HCl (0,1 M) sebelum digunakan. Prosedur optimal untuk proses pembersihan meliputi: Pemuatan 100 L sampel urin ke kolom, kemudian Cuci dengan 200 L larutan encer dengan 0,1 M HCl, Elusi dengan 100 L asetonitril dengan 5% ammonium hidroksida. Seluruh proses selesai dalam 90 detik. Eluen dicampur dengan larutan 50 L Na₂CO₃ (0,05 M) dan 100 L dansil klorida (0,5 mg/mL) kemudian direaksikan dalam penangas air pada suhu 60 °C selama 30 detik.</p> <p>Teknik Analisis : Campuran tersebut akhirnya dimasukkan ke dalam kartrid PCS untuk analisis MS langsung.</p>	Kang M dkk, 2022
HPLC	Urine		<p>Preparasi sampel : Ekstraksi fase padat dilakukan dengan Bond-Eluent Certify (50 mg) cartidges. Setiap kolom yang telah dilakukan pencucian dengan 2,0 ml metanol, 2 ml air deionisasi dan 2 ml 0,1 M buffer kalium fosfat (pH 6,0) pada laju aliran 3 ml/min. Setelah pengaplikasian sampel pada 1 ml / menit, kolom kemudian dicuci dengan 2 ml</p>	Bill L Posey et al, 1983

0,1 M kaliumbuffer asetat (pH 4,5) dan 2 ml metanol. Kolom dikeringkan secara menyeluruh di bawah vakum selama minimal 3 menit. Morfin dielusi dengan 2 ml larutan elusi yang baru disiapkan yang terdiri dari etil asetat, isopropil alkohol, diklorometana (18: 12: 4 v / v / v). Eluen gabungan diuapkan sampai kering di bawah aliran nitrogen pada 40°C dan residu dilarutkan dalam fase gerak. Lalu 20 µl sampel di injeksikan ke kolom HPLC

Teknik Analisis :
senyawa itu dipisahkan pada kolom Acentis Express C18 fase terbalik (150mm × 4.6mm, 2.7µm) yang dilengkapi dengan kolom pelindung (2.7) µm, 5 mm × 4,6 mm). Saluran pada detektor UV dikonfigurasi untuk memperoleh data pada 285 nm. Fase cair terdiri dari asetonitril-natrium. Waktu berjalan ditetapkan pada 10 menit. Waktu retensi untuk morfin dan kodein sekitar 3,4 menit dan 7,2 min, masing-masing.

KESIMPULAN

Identifikasi senyawa opiate morfin secara kualitatif dan kuantitatif dalam sampel urin dapat dilakukan dengan berbagai macam metode pengujian. Macam-macam metode pengujian yang dapat dilakukan dalam identifikasi senyawa morfin dalam urin ialah Rapid Diagnostic Test, Card Test, KLT, LC-MS, GC-MS, SPRI, CFIA, Spektrofotodensitometri, MS dan HPLC. Pemilihan metode pengujian dapat disesuaikan dengan kebutuhan dan kondisi. Metode tersebut memiliki kekurangan dan kelebihannya masing-masing.

REFERENSI

- Ahadia, A., A. Partoazarb, M. A. Khorasgani, S. V.S. Boushehid. 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
- A, Mahmoud and D, Alabdallah. P. (2021). Solid-Phase Extraction and GC/MS Confirmation of Heroin Abuse in Urine. *YJSE*, 1B (1), 33-36
- Basiri, R. M., M. Ghazi-khansari, A. Faghieh, M. Sadeghi, N. Lotfalizadeh, M. Eghba, A. Mohajell-Nayebi, H. Rezazadeh, M. Arshad Zadeh. Screening of Morphine & Codeine in Urine of Opioid Abusers by Rapid and TLC Analysis. *European Journal of General Medicine*. 2010; 7(2):192-196
- B. Maralikova and W. Weinmann. (2004). Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification. *J. Chromatogr. B* 811:21-30.
- Bill L. Posey, Sydney N. Kimble, Simultaneous Determination of Codeine and Morphine in Urine and Blood by HPLC, *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 7, Issue 5, September-October 1983, Pages 241–245, <https://doi.org/10.1093/jat/7.5.241>
- Cao, J., Chen, X. Y., & Zhao, W. R. (2019). Determination of morphine in human urine by the novel competitive fluorescence immunoassay. *Journal of Analytical*

- Methods in Chemistry, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7826090>
- Coles, R., Kushnir, M. M., Nelson, G. J., McMillin, G. A., & Urry, F. M. (2007). Simultaneous determination of codeine, morphine, hydrocodone, hydromorphone, oxycodone, and 6-acetylmorphine in urine, serum, plasma, whole blood, and meconium by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 31(1), 1–14. <https://doi.org/10.1093/jat/31.1.1>
- Damarpatni, K.A.G., Putra, A.A.B., Ariati, N.K and Suaniti, N.M. (2014). Analisis kualitatif senyawa parasetamol (acetaminophen) pada urin dan rambut menggunakan kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS). *Jurnal Kimia*, 8(2), 257-262.
- Depkes RI. (2020). Farmakope Indonesia edisi VI. In Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Fitriana A, N., (2015). *Forensic Toxicology*. J Majority; 4(4): 1-9.
- Gandjar, I. G. dan A. Rohman. *Kimia Analisis Farmasi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar. 2007.
- Heri, A.A.P and Subarnas, A. (2020). Morfin : Penggunaan Klinis Dan Aspek-Aspeknya. *Jurnal Farmaka*, 17(3), 134-141
- Kemenkes RI. *Farmakope Indonesia*. Edisi V. Jakarta: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2014.
- Kang, M., Xue, J., Zhang, Y., Ouyang, Z., & Zhang, W. (2022). On-site quantitation of morphine in urine by fast derivatization and miniature mass spectrometry analysis. *Green Analytical Chemistry*, 1(April), <https://doi.org/10.1016/j.greeac.2022.1000>
- Ke, Haokun., et.al. (2020). Detection of morphine in urine based on a surface plasmon resonance imaging immunoassay. *Journal The Royal Society of Chemistry, Swedia : Uppsala University*
- Miklós, G., Angeli, C., Ambrus, Á., Nagy, A., Kardos, V., Zentai, A., Kerekes, K., Farkas, Z., Józwiak, Á., & Bartók, T. (2020). Detection of Aflatoxins in Different Matrices and Food-Chain Positions. *Frontiers in Microbiology*, 11(August). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01916>
- M.J. Bogusz, R.D. Maier, M. Erkens, and S. Driessen. (1997). Determination of morphine and its 3- and 6-glucuronides, codeine, codeine-glucuronide and 6-monoacetylmorphine in body fluids by liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*703:115-127.
- Moffat, A.C., 2002, *Clark's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids and Post Mortem Material*, London: The Pharmaceutical Press, 2nd., 10,11,167
- Moffat, A. C., M. David, O., and Brian, W. Clarke's *Analysis of Drugs and Poisons*. Fourth Edition. London: Pharmaceutical Press. 2011.
- Pebe, M. A. P. (2022). Uji Konfirmasi Morfin dengan Metode KLT. *Jurnal Ilmiah Multi Disiplin Indonesia*, 1(7), 867–876.
- Putra, A.A.B .et.al. (2014). *Jurnal Kimia*.
- Putri, M. P., Shofi, M., Rahmania, A. S., & Purnadianti, M. (2020). Identifikasi Analgesik Narkotik pada Sampel Urin Pasien Pasca Bersalin Caecar di RSB Nirmala Kediri. *Sintesis*, 1(2), 60–66.
- R. Wasels and F. Belleville, "Gas chromatographic-mass spectrometric procedures used for the identification and determination of morphine, codeine and 6-monoacetylmorphine," *Journal of Chromatography A*, vol. 674, no. 1-2, pp. 225–234, 1994.
- Sadock BJ, Saddock VA. *Kaplan & Sadock's Synopsis of Psychiatric : Behavior Sciences/ Clinical Psychiatric*. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
- Suaniti, N. M., & Suryadhi, M. A. H. (2007). Penentuan Kuantitatif Morfin Dalam Urin Secara Spektrodensitometri. *Jurnal Kimia*, 1(1), 67–79.
- S. Strano-Rossi, AM Bermejo, X. De La Torre, F. Botrè, Metode Fast GC-MS untuk skrining simultan THC-COOH, kokain, opiat dan analog termasuk buprenorfin dan fentanil, dan metabolitnya dalam urin, *Anal. Bioanal. kimia* 399 (2011) 1623–1630.
- Wirasuta, I M. A. G., I. A. S. Primaningruma, K. W. Astutia. Uji Konfirmasi dan Penetapan Kadar Morfin dengan KLT-Spektrofotodensitometri. *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences*. 2014; 4:5-7

World Health Organization, Cancer Pain Relief,
World Health Organization, Geneva,
Switzerland, 2nd edition, 1986.

Yasa, I.K.B., Setiawan, D and Pamungkas, M.A.
(2017). Identifikasi amfetamine, marijuana
dan morfin pada urine siswa sma "X"
dengan rapid diagnostic test. *Journal
Chemistry*, 4(1), 23-28.