

**VALIDASI METODE ANALISIS METFORMIN DALAM  
PLASMA *IN VITRO* SECARA KROMATOGRAFI CAIR  
KINERJA TINGGI**

**MARIA VALENTINE**

**0303050437**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN FARMASI  
DEPOK  
2007**

**VALIDASI METODE ANALISIS METFORMIN DALAM  
PLASMA *IN VITRO* SECARA KROMATOGRAFI CAIR  
KINERJA TINGGI**

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat  
untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

**Oleh:**

**MARIA VALENTINE**

**0303050437**



**DEPOK**

**2007**

**SKRIPSI : VALIDASI METODE ANALISIS METFORMIN DALAM  
PLASMA *IN VITRO* SECARA KROMATOGRAFI CAIR  
KINERJA TINGGI**

**NAMA : MARIA VALENTINE**

**NPM : 0303050437**

**SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI**

**DEPOK, 12 JUNI 2007**

**Drs. Hayun, MSi**

**PEMBIMBING I**

**Drs. Umar Mansur, MSc**

**PEMBIMBING II**

**Tanggal Lulus Ujian Sarjana : .....**

**Penguji I : Dr. Harmita, Apt .....**

**Penguji II : Dr. Effionora Anwar, MS .....**

**Penguji III : Fadlina Chany Saputri, MSi .....**

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Bapa di surga karena berkat rahmat dan anugerahNya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih dan rasa hormat kepada:

1. Bapak Drs. Hayun, M.Si selaku Pembimbing Pertama yang telah dengan sabar dan tulus memberikan bimbingan, saran, bantuan serta dukungan moril selama penelitian hingga tersusunnya skripsi ini.
2. Bapak Drs. Umar Mansur, M.Sc, selaku Pembimbing Kedua atas bimbingan, saran, dan bantuannya selama masa penelitian hingga tersusunnya skripsi ini.
3. Ibu Dra. Syafrida Siregar, selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingannya selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi.
4. Bapak Dr. Maksum Radji, M. Biomed, selaku Ketua Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia (FMIPA-UI).
5. Seluruh staff pengajar Departemen Farmasi FMIPA-UI atas segala ilmu, nasehat, dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis.
6. Seluruh laboran beserta segenap karyawan Departemen Farmasi FMIPA-UI
7. Perusahaan PT. Guardian Pharmatama, PT. Pharos Indonesia, PT. Pfizer Indonesia yang telah memberikan bantuan bahan baku dan

- sertifikat analisis kepada penulis serta untuk Brataco Chemika atas sertifikat analisisnya.
8. Seluruh rekan-rekan Departemen Farmasi FMIPA-UI angkatan 2003 khususnya teman-teman KBI Kimia Farmasi serta teman-teman ekstensi 2004 atas dukungan, bantuan dan dorongan semangatnya selama ini .
  9. Kak Ami, Kak Mahi, dan Kak Rina atas segala kebaikan dan pengetahuan yang telah diberikan kepada penulis.
  10. Secara khusus, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya untuk Mami, Papi, Adri, I wiwi, I kikok atas kasih sayang, bantuan baik moril dan materil, dukungan serta doa yang tak henti-hentinya kepada penulis hingga saat ini.
  11. Teman-teman kos Wisma Gardenia, Intan, Agnes, Clara, Vitha, Airin, Mellissa, Robin, Aghi, Adit, Ujay, Johanes Andria atas perhatian, semangat, dukungan, kebersamaan, canda tawa dan doa-doanya kepada penulis selama ini.
- Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan. Namun, penulis mengharapkan skripsi ini dapat berguna dan memberikan manfaat yang cukup berarti terhadap perkembangan ilmu pengetahuan.

Penulis

2007

## ABSTRAK

Metformin adalah antidiabetika oral yang banyak digunakan pada penderita diabetes yang *overweight*. Kadar metformin dalam darah harus selalu dipantau agar tidak menyebabkan laktasidosis. Pada penelitian ini, telah dilakukan validasi metode analisis metformin dalam plasma manusia *in vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pasangan ion dengan salbutamol sulfat sebagai baku dalam. Sampel plasma yang mengandung metformin HCl dan salbutamol sulfat diekstraksi menggunakan asetonitril sebagai pengendap protein. Metode KCKT menggunakan kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm. Fase gerak dan pelarut yang digunakan campuran asetonitril , dapat kalium dihidrogen fosfat 0,01 M dan natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5, v/v/v) pH 5,1 , dengan laju alir 1,0 mL/menit dan dideteksi dengan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 234 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode ini memberikan nilai linearitas pada rentang konsentrasi 0,05054-2,02 µg/mL dengan nilai koefisien korelasi (*r*) sebesar 0,9999, *Lower Limit of Quantitation* (LLOQ) 0,05054 µg/mL, presisi 4,31 hingga 4,83 % dan akurasi (% diff) -8,32 hingga 9,22 %. Uji perolehan kembali metformin berkisar antara 98,33 hingga 104,56 %. Hasil validasi metode memenuhi kriteria yang ditetapkan.

Kata Kunci: *in vitro*, KCKT, metformin HCl, salbutamol sulfat, validasi  
xii + 108 hlm; gbr; tbl; lamp

Bibliografi: 34 (1979-2006)

## **ABSTRACT**

Metformin is the oral antidiabetic agent that mostly used for overweight patient. Concentration of metformin in plasma used to be controlled to avoid the incidence of lactacidosis. In this research, validation of analytical method for metformin in human plasma *in vitro* by high-performance liquid chromatography (HPLC) method has been done. The plasma samples, recharged with metformin and in presence of salbutamol sulphate, were extracted using acetonitrile as deproteinization agent. The HPLC method used analytical 250 x 4,6 mm C18 column Kromasil ® (5 µm, Akzo Nobel) using mixture of acetonitrile , 0,01 M potassium dihydrogen phosphate and 0,01 M sodium dodecyl sulphate (30:70:0,5, v/v/v) pH 5,1 as the mobile phase, at the flow rate 1,0 mL/min and detection at 234 nm. Linearity was establish for range concentration of 0,05054 - 2,02 µg/mL with coefficient of corelation of 0,9999, lower limit of quantitation (LLOQ) 0,05054 µg/mL, precisions 4,31 - 4,83 % and accuracies (% diff) -8,32 - 9,22%. The metformin recovery percentage was between 98,33 - 104,56 %. The result of validation method fulfilled for the given criteria.

Key word : *in vitro*, HPLC, metformin HCl, salbutamol sulphate, validation

xii + 108 pages; pictures; table; enclosures

Bibliography: 34 (1979-2006)

## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan Penelitian.....	7
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Metformin.....	8
B. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	14
C. Validasi Metode Bioanalisis.....	21
D. Analisis Obat dalam Plasma.....	31
E. Metode Analisis Metformin dalam Plasma.....	32
BAB III. BAHAN DAN CARA KERJA	
A. Bahan.....	37

B. Alat.....	37
C. Lokasi.....	38
D. Cara Kerja.....	38
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
A. Hasil Percobaan.....	49
B. Pembahasan.....	56
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
A. Kesimpulan.....	64
B. Saran.....	64
<b>DAFTAR ACUAN.....</b>	<b>65</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Rumus bangun metformin hidroklorida.....	8
2. Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi .....	70
3. Spektrum serapan UV-Vis larutan metformin HCl, salbutamol sulfat, metil paraben, dan fenitoin natrium dalam fase gerak.....	71
4. Kromatogram larutan standar metformin 1,0 µg/mL dengan fase gerak asetonitril - diperlukan KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M – natrium dodesil sulfat 0,01 M (40:60:0,5 , v/v/v) pH 5,1 kecepatan alir 1,0 mL/menit.....	71
5. Kromatogram larutan standar metformin 1,0 µg/mL dengan fase gerak asetonitril-diperlukan KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M – natrium dodesil sulfat 0,01 M (35:65:0,5 , v/v/v) pH 5,1 kecepatan alir 1,0 mL/menit.....	72
6. Kromatogram larutan standar metformin 1,0 µg/mL dengan fase gerak asetonitril-diperlukan KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M – natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 kecepatan alir 1,0 mL/menit .....	72
7. Kromatogram ekstrak plasma (plasma blanko) tanpa penambahan metformin dan baku dalam salbutamol sulfat.....	73
8. Kromatogram larutan standar metformin 1,0 µg/mL dengan fase gerak asetonitril-diperlukan KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M – natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 kecepatan alir 0,5 mL/menit .....	73

9.	Kromatogram larutan standar metformin 1,0 µg/mL dengan fase gerak asetonitril-dapar KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M – natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 kecepatan alir 0,8 mL/menit .....	74
10.	Kromatogram larutan standar metformin 1,0 µg/mL dengan fase gerak asetonitril-dapar KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M – natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 kecepatan alir 1,2 mL/menit .....	74
11.	Kromatogram larutan standar metformin 1,0 µg/mL dengan fase gerak asetonitril-dapar KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M – natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 kecepatan alir 1,5 mL/menit .....	75
12.	Kromatogram larutan standar metformin 1,0 µg/mL dan baku dalam.....	75
13.	Kromatogram gabungan ( <i>multiview</i> ) dari plasma blanko, salbutamol, fenitoin, dan metil paraben.....	76
14.	Kromatogram metformin hasil ekstraksi dengan pelarut asetonitril.....	76
15.	Kromatogram metformin hasil ekstraksi dengan pelarut metanol.....	77
16.	Kurva hubungan waktu vorteks dengan perolehan kembali metformin dalam plasma.....	77
17.	Kurva hubungan waktu sentrifugasi dengan perolehan kembali metformin dalam plasma.....	78

18.	Kurva kalibrasi metformin dalam plasma untuk menghitung LOD dan LOQ.....	78
19.	Kurva kalibrasi metformin dalam plasma dengan penambahan baku dalam.....	79



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Panjang gelombang dan serapan metformin HCl, salbutamol sulfat, metil paraben dan fenitoin natrium.....	81
2. Hubungan antara waktu retensi, jumlah pelat teoretis dan faktor ikutan kromatogram metformin terhadap perubahan komposisi fase gerak.....	82
3. Hubungan waktu retensi, jumlah pelat teoretis dan faktor ikutan kromatogram metformin terhadap perubahan kecepatan alir fase gerak .....	83
4. Hubungan waktu retensi dan resolusi metformin terhadap baku dalam pada kondisi terpilih.....	83
5. Hubungan waktu retensi, jumlah pelat teoretis, faktor ikutan terhadap pemilihan metode ekstraksi.....	84
6. Hubungan waktu vorteks dengan perolehan kembali metformin.....	84
7. Hubungan waktu sentrifugasi dengan perolehan kembali metformin..	85
8. Data pengukuran Limit Deteksi dan Limit Kuantitasi metformin dalam plasma dengan penambahan baku dalam.....	86
9. Data <i>Lower Limit of Quantitation</i> (LLOQ) metformin dalam plasma.....	87
10. Data kurva kalibrasi dan linearitas metformin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam.....	88

11. Data uji akurasi dan presisi metformin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam.....	89
12. Data uji selektivitas metformin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam.....	90
13. Data uji perolehan kembali (% recovery) metformin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam.....	91
14. Data uji stabilitas larutan stok metformin dengan penambahan baku dalam.....	92
15. Data uji stabilitas jangka panjang metformin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam.....	93
16. Data uji stabilitas <i>freeze and thaw</i> metformin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam.....	94
17. Data uji stabilitas jangka pendek metformin dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam.....	95

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Cara memperoleh persamaan garis linier.....	97
2. Limit deteksi dan kuantitasi serta koefisien variasi dari fungsi.....	98
3. Cara perhitungan uji akurasi ( <i>% diff</i> ).....	100
4. Cara perhitungan uji perolehan kembali.....	101
5. Cara perhitungan presisi.....	102
6. Sertifikat analisis metformin HCl .....	103
7. Sertifikat analisis salbutamol sulfat.....	104
8. Sertifikat analisis fenitoin natrium .....	105
9. Sertifikat analisis metil paraben.....	108

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. LATAR BELAKANG**

Meningkatnya kesejahteraan dan ketersediaan pangan ternyata telah secara nyata menimbulkan sejumlah dampak negatif, termasuk melambungnya prevalensi penyakit degeneratif seperti penyakit jantung koroner, hipertensi, dan *diabetes mellitus*. Menurut laporan WHO, saat ini terdapat lebih dari 180 juta orang di seluruh dunia mengidap *diabetes mellitus* dan angka ini akan terus bertambah dari tahun ke tahun karena adanya perubahan gaya hidup dan pola makan yang tidak sehat. Menurut data Badan Kesehatan Dunia (WHO), jumlah diabetisi (penyandang *diabetes mellitus*) di Indonesia pada tahun 2005 mencapai 12 juta orang. Hal ini menempatkan Indonesia pada urutan ke-4 terbesar dalam jumlah penderita *diabetes mellitus* (DM) dengan prevalensi 8,6 % dari total penduduk di bawah India (31,77 juta), Cina (20,8 juta), dan Amerika Serikat (17,7 juta) (1,2).

Diabetes adalah penyebab utama kebutaan, amputasi, kanker pankreas, stroke, serangan jantung dan ginjal. Celakanya, diabetes tidak punya gejala fisik khusus, sehingga penderita tidak menyadari datangnya penyakit ini hingga saat terjadinya komplikasi yang berarti penyakit sudah dalam tahap lanjut. Selain obat, yang terpenting bagi pasien yakni merancang kembali pola hidup, terutama pola makan dan olahraga. Ada

pasien yang bisa mempertahankan kualitas hidup hanya lewat diet. Namun, tak sedikit pula yang bergantung pada obat-obatan antidiabetika oral maupun insulin sepanjang hidup (3).

Kegiatan analisis obat secara rutin dilakukan dalam lingkungan farmasi klinik, hal ini bermanfaat untuk banyak hal, seperti monitoring obat, kepentingan farmakokinetik, dan kegunaan lainnya, yaitu penetapan dosis regimen, dan laboratorium forensik .Kegiatan analisis obat semakin dikenal secara luas dan bahkan mulai dilakukan secara rutin dengan metode yang sistematis. Hal ini juga didukung oleh perkembangan yang pesat dari instrumen analisis yang mampu mendeteksi kadar obat dalam konsentrasi yang sangat rendah (mikro atau nano gram per mililiter) yang terdapat dalam matriks biologi (4).

Intensitas efek farmakologi suatu obat seringkali dikaitkan dengan dosis obat yang dikonsumsi. Namun sebenarnya konsentrasi obat bebas yang berikatan dengan reseptor yang menentukan besarnya efek farmakologi suatu obat. Reseptor sebagian besar terdapat dalam sel-sel jaringan. Oleh karena sebagian besar sel-sel jaringan diperfusi oleh darah, maka pemeriksaan kadar obat dalam darah merupakan suatu metode yang paling akurat untuk pemantauan pengobatan dan pengoptimalan manfaat terapi obat dalam pelayanan farmasi (5).

Analisis obat kebanyakan dilakukan terhadap cairan tubuh seperti plasma atau serum, hal ini karena adanya hubungan yang baik antara konsentrasi obat dalam plasma dengan efek terapi yang ditimbulkannya.

Metode analisis yang digunakan untuk menetapkan kadar obat mempunyai peran yang penting dalam hal evaluasi dan interpretasi bioavailabilitas dan bioekivalensinya (4).

Sampai saat ini, masalah utama pada analisis obat dalam plasma adalah rumitnya prosedur isolasi. Hal ini disebabkan karena adanya ikatan antara molekul obat dengan protein plasma sehingga memerlukan metode khusus untuk memisahkannya. Disamping itu, kompleksitas komponen dalam darah yang dapat ikut berinterferensi dalam analisis serta kecilnya konsentrasi obat yang dianalisis (6).

Untuk memperoleh kadar obat total dalam plasma diperlukan perlakuan khusus terhadap sampel plasma (*sample pretreatment*) sebelum diinjeksikan, yang meliputi isolasi obat dari matriks, pembebasan obat dari ikatannya dengan protein, dan pemisahan obat dari komponen lain atau metabolit. Upaya-upaya yang bisa dilakukan untuk mencapai tujuan di atas di antaranya dengan cara pengendapan protein, ultrafiltrasi, ekstraksi cair-cair, dan ekstraksi fase padat (SPE) (5).

Metformin merupakan obat antidiabetika oral dari golongan biguanida yang digunakan pada pengobatan diabetes *non-insulin-dependent* (diabetes tipe 2) dan merupakan obat pilihan pada pasien diabetes yang mengalami obesitas. Berbeda dengan golongan sulfonilurea, obat-obat golongan ini tidak menstimulasi pelepasan insulin dan tidak menurunkan gula darah pada orang sehat (7,8).

Metformin diabsorbsi secara lambat dan tidak sempurna dari *gastro-intestinal tract* (GIT) . Bioavailabilitas absolut dari dosis tunggal 500 mg dilaporkan sekitar 50-60 %. Untuk studi farmakokinetik, dibutuhkan suatu metode sensitif yang memungkinkan pengukuran konsentrasi rendah dari metformin dalam plasma (7, 8).

Metode-metode kuantifikasi metformin dalam cairan biologis yang dapat digunakan adalah Kromatografi Cair Gas penangkap elektron (*electron-capture GLC*) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Namun, metode *electron-capture GLC* menggunakan prosedur derivatisasi yang kompleks serta membutuhkan waktu yang panjang (9,10). Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi yang digunakan dibedakan dari modelnya, seperti penukar ion (*ion-exchange*), pasangan ion (*ion pair*), fase normal (*normal phase*) atau fase terbalik (*reverse phase*), serta preparasi sampelnya (11,12). Kebanyakan metode membutuhkan ekstraksi cair-cair dengan penguapan ekstrak, ekstraksi fase padat (13,14) atau ultrafiltrasi (15) dan karenanya preparasi sampel akan kompleks serta memakan banyak waktu (16,17,18).

Metformin adalah senyawa yang sangat polar sehingga sangat sulit untuk diekstraksi dari cairan biologis (koefisien partisi dalam oktanol-air adalah 0,01). Metformin juga memiliki waktu retensi yang sangat singkat jika dipisahkan dengan menggunakan kromatografi fase terbalik biasa (sehingga bisa mengganggu pengamatan karena kebanyakan senyawa endogen plasma juga mempunyai waktu retensi yang singkat) dan tidak bisa dielusi

menggunakan kromatografi fase normal karena retensinya yang sangat kuat (9,11).

Penetapan kadar obat dalam cairan biologis membutuhkan metode dengan selektivitas tinggi, sensitivitas sampai tingkat ppb (*part per billion*), dan gangguan yang sedikit mungkin dari zat pengganggu (4). Sejumlah metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi telah digunakan untuk penetapan kadar Metformin dalam cairan biologis. Namun, mereka menemukan beberapa kesulitan, di antaranya adalah sensitivitas yang rendah dengan LOQ di atas 50 ng/mL, penggunaan prosedur derivatisasi dan ekstraksi yang kompleks dan rumit (termasuk tahap evaporasi) dan memakan banyak waktu, membutuhkan sampel dalam jumlah besar, penggunaan ultrafiltrasi ataupun sistem pertukaran kolom (*column switching system*) yang membutuhkan tambahan alat (9).

Dari penelitian-penelitian yang sudah ada, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan fase terbalik merupakan metode yang banyak digunakan karena lebih sederhana, selektif dengan waktu analisis yang lebih singkat (19). Detektor yang biasa digunakan adalah detektor ultraviolet (10,11,12,14,15) dan *dioda array detector* (DAD) (9,17,18). Dari literatur diketahui bahwa konsentrasi metformin dalam plasma cukup besar yaitu sekitar 0,2-1,6 µg/ml (dicapai dalam waktu 2-4 jam setelah pemberian oral 0,5-1,5 g sediaan) sehingga metode KCKT dengan detektor ultraviolet dapat digunakan untuk menganalisisnya (7).

Suatu metode analisis baru dapat digunakan bila telah dilakukan validasi yang kondisinya disesuaikan dengan laboratorium dan peralatan yang tersedia, meskipun metode yang akan digunakan tersebut sudah dipublikasikan pada jurnal, buku teks atau buku resmi seperti farmakope. Metode validasi pada analisis kimia terdiri dari beberapa seri percobaan laboratorium yang bertujuan untuk memastikan bahwa metode analisis yang akan divalidasi, parameternya harus memenuhi persyaratan yang telah ditetapkan (20).

Metformin merupakan senyawa polar yang larut dalam media air dan praktis tidak larut dalam kebanyakan pelarut organik. Untuk *pretreatment* sampel plasma dapat digunakan metode pengendapan protein dengan pelarut organik atau asam, ekstraksi fase padat (SPE), atau dengan ekstraksi cair-cair (4,21). Ekstraksi fase padat mahal dan memerlukan lebih banyak pelarut untuk elusi. Pada ekstraksi fase padat dengan menggunakan air sebagai pengelusi, penguapan sulit dilakukan. Metode pengendapan protein dengan menggunakan asam dapat menyebabkan kerusakan kolom. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan metode pengendapan protein dengan pelarut organik yang lebih sederhana, murah, dan sensitif untuk menetapkan kadar obat dalam plasma secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

Dalam penelitian ini, akan dilakukan modifikasi terhadap salah satu metode KCKT untuk analisis metformin dalam plasma dengan detektor spektrofotometer UV-Vis. Kemudian dilakukan validasi terhadap metode ini

sehingga dapat diterapkan untuk pengujian biavailabilitas metformin pada masa yang akan datang.

## B. TUJUAN PENELITIAN

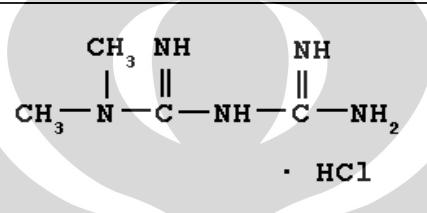
1. Memperoleh kondisi yang optimum untuk analisis metformin dalam plasma *in vitro* dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.
2. Melakukan validasi metode analisis metformin dalam plasma *in vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. METFORMIN

##### 1. Monografi



Gambar 1. Rumus bangun metformin hidroklorida (22)

Rumus molekul	: C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> . HCl
Bobot molekul	: 165,6
pKa	: 2,8 ; 11,5 (pada suhu 32°C) (7)
Sinonim	: 1,1-dimetilbiguanida hidroklorida
Pemerian	: serbuk hablur putih; tidak berbau atau hampir tidak berbau; higroskopik
Kelarutan	: mudah larut dalam air (1:2) ; sukar larut dalam etanol (1:100); praktis tidak larut dalam eter dan dalam kloroform. (23,24,25,26)
Suhu lebur	: sekitar 225 ° (7,23,24,26)
Indikasi	: antidiabetika oral

Metformin hidroklorida mengandung tidak kurang dari 98,5% dan tidak lebih dari 101,0 % C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>. HCl, dihitung terhadap zat anhidrat (26).

## 2. Farmakologi

Metformin merupakan suatu antidiabetika oral dari golongan biguanida yang dapat meningkatkan sensitivitas insulin periferal, menghambat glukoneogenesis hepatis, dan mengurangi produksi glukosa hepatis (27). Berbeda dengan sulfonilurea, obat-obat ini tidak menstimulasi pelepasan insulin dan tidak menurunkan gula darah pada orang sehat. Zat ini juga menekan nafsu makan (efek anoreksia) hingga berat badan tidak meningkat, sehingga layak diberikan pada penderita yang *overweight* (mengalami resistensi insulin, sehingga sulfonilurea kurang efektif) (28).

Mekanisme kerjanya hingga kini belum diketahui dengan pasti, tetapi bukan akibat stimulasi sekresi insulin. Mungkin berdasarkan peningkatan kepekaan reseptor insulin, sehingga absorpsi glukosa di jaringan perifer meningkat. Efeknya ialah turunnya kadar insulin yang terlalu kuat dan penurunan berat badan. Kemungkinan lain adalah penghambatan glukoneogenesis dalam hati dan peningkatan penyerapan glukosa di jaringan perifer. Pada penelitian *in vitro* ternyata bahwa biguanida merangsang glikolisis anaerob, dan anaerobiosis tersebut mungkin sekali berakibat lebih banyaknya glukosa memasuki sel otot (8).

Sediaan biguanida tidak boleh diberikan pada penderita dengan penyakit hati berat, penyakit ginjal dengan uremia dan penyakit jantung kongestif dimana pemberian biguanida dapat menyebabkan peningkatan kadar asam laktat dalam darah, sehingga hal ini dapat mengganggu keseimbangan elektrolit dalam cairan tubuh. Pada keadaan gawat sebaiknya juga tidak diberikan biguanid. Sedangkan pada kehamilan, seperti juga dengan sediaan AntiDiabetika Oral (ADO) lainnya, sebaiknya tidak diberikan biguanida, sampai terbukti bahwa obat ini tidak menimbulkan bahaya yang berarti (8).

### **3. Farmakokinetik**

#### **a. Absorpsi**

Metformin diabsorpsi lambat dan tidak sempurna di saluran pencernaan, melalui usus halus. Diabsorpsi secara lengkap dalam waktu kurang dari 6 jam. Bioavailabilitas oral absolut metformin di bawah kondisi puasa adalah 50-60% pada dosis 0,5-1,5 g. Konsentrasi puncak dalam plasma untuk dosis tunggal metformin 0,5-1,5 g adalah 0,4-3 µg/mL dalam 2-4 jam . Untuk pemberian oral dosis tunggal sebagai tablet "extended-release", konsentrasi puncak dalam plasma untuk 0,6-1,8 µg/mL dicapai rata-rata selama 7 jam.

Konsentrasi plasma *steady-state* pada dosis lazim metformin sebagai tablet konvensional (contoh : 1,5 - 2,55 g per hari dalam 1-3 dosis terbagi) dicapai dalam waktu 24-48 jam dan rata-rata sebesar 1 µg/mL atau kurang (7).

b. Distribusi

Metformin didistribusikan secara cepat ke jaringan perifer tubuh dan cairan perifer, terutama pada GIT. Metformin juga didistribusikan lambat menuju eritrosit dan menuju kompartemen jaringan dalam. Konsentrasi metformin tertinggi di jaringan berada pada GIT, dengan konsentrasi yang lebih rendah ditemukan pada ginjal, hati, dan jaringan kelenjar ludah.

Setelah pemberian oral dosis tunggal 850 mg metformin hidroklorida sebagai tablet konvensional, volume distribusi *apparent* adalah sebesar 654 L. Ikatan protein plasma dengan metformin sekitar 10 %. Metformin terikat pada eritrosit sekitar 5% dari konsentrasi total darah (7).

c. Eliminasi

Waktu paruh eliminasi plasma utama dari metformin berkisar antara 3-6 jam. Sekitar 90% obat dibersihkan dalam waktu kurang dari 24 jam pada pasien dengan fungsi ginjal normal.

Metformin tidak dimetabolisme di hati atau GIT dan tidak diekskresikan di empedu. Tidak ada metabolit dari metformin yang teridentifikasi pada

manusia. Setelah pemberian oral dosis tunggal dari metformin, ditemukan dalam urin 35-53% dari dosis total. Sekitar 20-33% dari dosis oral total yang diekskresikan di feses dalam waktu 4-7 hari. *Clearance* plasma total setelah pemberian oral dosis tunggal (0,5-1,5 g) memiliki kisaran 718-1552 mL/menit.

*Clearance* ginjal menurun pada pasien dengan kelainan ginjal terutama akibat pengaruh usia. Setelah pemberian oral dosis tunggal, *clearance* ginjal rata-rata 552 mL/menit untuk dewasa normal, 491 mL/menit untuk dewasa diabetes (7).

#### **4. Sediaan dan Indikasi**

Metformin hidroklorida tersedia sebagai tablet 500 dan 850 mg , dapat pula dalam bentuk tablet salut.

Metformin diindikasikan pada penderita diabetes dewasa yang tidak tertolong dengan tindakan diet dan terdapat alergi terhadap antidiabetika oral tipe sulfonamida. Selanjutnya pada penderita diabetes yang kadar gula darahnya tidak cukup diatur dengan turunan sulfonamida (dan diet) sendiri maka diberikan kombinasi metformin dan sulfonilurea (29).

#### **5. Efek Samping**

Efek samping yang paling sering terjadi berupa gangguan lambung-usus (mual, anoreksia, sakit perut, diare), tetapi umumnya bersifat

sementara, walaupun ini dapat pula merupakan manifestasi suatu laktasidosis awal. Karena itu penderita diminta untuk memberitahukan atau pergi ke dokter jika terjadi efek samping demikian. Efek samping yang lebih serius adalah asidosis asam laktat dan angiopati luas, terutama pada pasien lanjut usia dan insufisiensi hati atau ginjal. Karena efek samping ini, beberapa senyawa biguanida sejak tahun 1979 telah ditarik dari peredaran, antara lain : fenformin dan buformin. Metformin pada dosis normal hanya meningkatkan sedikit kadar asam laktat dalam darah sehingga masih aman digunakan selama masih dalam dosis yang dianjurkan (28).

## 6. Dosis

Metformin diberikan secara oral. Sebagai tablet konvensional dosisnya adalah 2 g / hari atau kurang, umumnya diberikan sebagai 2 dosis terbagi dalam sehari. Namun, untuk pasien yang membutuhkan lebih dari 2 g / hari, obat sebaiknya diberikan dalam 3 dosis terbagi (7).

Dosis yang seharusnya dikuti dengan penyesuaian adalah 1-3 kali 850 mg/hari (29). Dosis awal untuk pasien yang belum pernah diobati adalah 500 mg, dua kali sehari saat sarapan dan makan malam atau 850 mg sehari satu kali. Dosis dapat ditingkatkan 500 mg/minggu (atau 850 mg setiap 2 minggu) hingga total mencapai 2000 mg/hari. Dosis maksimum yang direkomendasikan adalah 2550 mg/hari (27)

Untuk penggunaan tablet metformin "extended-release" dapat diawali dengan dosis 500 mg setiap makan malam dan dapat ditingkatkan 500 mg tiap minggunya hingga dosis maksimum sebesar 2000 mg/hari (7, 27).

## B. KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

### 1. Teori

Kromatografi adalah suatu istilah umum yang digunakan untuk bermacam-macam teknik pemisahan yang didasarkan atas partisi sampel diantara suatu fase gerak yang bisa berupa gas ataupun cair dan fase diam yang juga bisa berupa cairan ataupun suatu padatan. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan salah satu metode kimia dan fisikokimia, serta termasuk teknis analisis obat yang paling cepat berkembang (19). KCKT ideal untuk analisis beragam obat dalam sediaan dan cairan biologi, karena sederhana, serta jenis dan kepekaannya tinggi (20).

Banyak kelebihan metode KCKT jika dibandingkan dengan metode lainnya. Kelebihan itu antara lain :

- a. Mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran
- b. Mudah melaksanakannya
- c. Kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi

- d. Dapat dihindari terjadinya dekomposisi / kerusakan bahan yang dianalisis
- e. Resolusi yang baik
- f. Dapat digunakan bermacam-macam detektor
- g. Kolom dapat digunakan kembali
- h. Mudah melakukan "sample recovery"

## 2. Komponen- komponen KCKT

Komponen-komponen penting dari KCKT adalah pompa, injektor, kolom, detektor dan integrator .

### a. Pompa (*Pump*)

Fase gerak dalam KCKT adalah suatu cairan yang bergerak melalui kolom. Pompa berfungsi untuk mendorong eluen melewati kolom. Ada dua tipe pompa yang digunakan, yaitu kinerja konstan (*constant pressure*) dan pemindahan konstan (*constant displacement*). Pemindahan konstan dapat dibagi menjadi dua, yaitu pompa *reciprocating* dan pompa *syringe*. Pompa *reciprocating* menghasilkan suatu aliran yang berdenyut teratur (*pulsating*), oleh karena itu membutuhkan peredam pulsa atau peredam elektronik untuk, menghasilkan garis dasar (*base line*) detektor yang stabil, bila detektor sensitif terhadap aliran. Keuntungan utamanya ialah ukuran reservoir tidak

terbatas. Pompa *syringe* memberikan aliran yang tidak berdenyut, tetapi reservoirnya terbatas (19).

### b. Injektor (*injector*)

Injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan ke dalam kolom. Ada empat tipe dasar injektor yang dapat digunakan :

- a. Aliran henti (*stop-flow*) : Aliran dihentikan, injeksi dilakukan pada kinerja atmosfir, sistem tertutup, dan aliran dilanjutkan lagi. Teknik ini bisa digunakan karena difusi di dalam cairan kecil dan resolusi tidak dipengaruhi.
- b. Septum : Septum yang digunakan pada KCKT sama dengan yang digunakan pada Kromatografi Gas. Injektor ini dapat digunakan pada kinerja sampai 60 - 70 atmosfir. Tetapi septum ini tidak tahan dengan semua pelarut-pelarut kromatografi cair. Partikel kecil dari septum yang terkoyak (akibat jarum injektor) dapat menyebabkan penyumbatan.
- c. Katup jalan kitar : Tipe injektor ini umumnya digunakan untuk menginjeksi volume lebih besar dari 10  $\mu\text{L}$  dan dilakukan dengan cara otomatis (dengan menggunakan adaptor yang sesuai, volume yang lebih kecil dapat diinjeksikan secara manual).
- d. Autoinjektor : dimana analit diinjeksikan ke dalam kolom secara otomatis.

### c. Kolom (*Column*)

Kolom adalah jantung kromatografi. Keberhasilan atau kegagalan suatu analisis tergantung pada pemilihan kolom dan kondisi percobaan yang sesuai. Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok :

- a. Kolom analitik : Diameter dalam 2 -6 mm. Panjang kolom tergantung pada jenis material pengisi kolom. Untuk kemasan *pellicular*, panjang yang digunakan adalah 50 -100 cm. Untuk kemasan poros mikropartikulat, 10 -30 cm. Dewasa ini ada yang berukuran 5 cm.
- b. Kolom preparatif : umumnya memiliki diameter 6 mm atau lebih besar dan panjang kolom 25 -100 cm.

Kolom umumnya dibuat dari *stainlesssteel* dan biasanya dioperasikan pada temperatur kamar, tetapi bisa juga digunakan temperatur lebih tinggi, terutama untuk kromatografi penukar ion dan kromatografi eksklusi.

Ukuran kinerja kolom dilihat dari kemampuan kolom untuk memisahkan komponen yang dianalisis. Dasar yang banyak digunakan untuk pengukuran kinerja kolom adalah resolusi, efisiensi kolom (HETP) serta faktor kapasitas (19).

### d. Detektor (*Detector*)

Suatu detektor dibutuhkan untuk mendeteksi adanya komponen sampel di dalam kolom (analisis kualitatif) dan menghitung kadanya (analisis kuantitatif). Detektor yang baik memiliki sensitivitas yang tinggi, gangguan (*noise*) yang rendah, kisaran respon linier yang luas, dan memberi respon

untuk semua tipe senyawa. Suatu kepekaan yang rendah terhadap aliran dan fluktuasi temperatur sangat diinginkan, tetapi tidak selalu dapat diperoleh. Detektor KCKT yang umum digunakan adalah detektor UV 254 nm. Variabel panjang gelombang dapat digunakan untuk mendeteksi banyak senyawa dengan kisaran yang lebih luas. Detektor refraksi indeks juga digunakan secara luas, terutama pada kromatografi eksklusi, tetapi umumnya kurang sensitif jika dibandingkan dengan detektor UV. Detektor-detektor lainnya antara lain (19,30) :

- a. Detektor fluoresensi
  - b. Detektor sinar tampak dan ultraviolet
  - c. Detektor ionisasi nyala (FID)
  - d. Detektor refraksi indeks (RID)
  - e. Detektor elektrokimia (ECD).
- e. Integrator**

Integrator berfungsi untuk menghitung luas puncak. Ada 2 macam integrator, yaitu :

- 1. Integrator piringan yang bekerja secara mekanik
- 2. Integrator digital yang dapat memberikan ketelitian tinggi dan waktu integrasi yang singkat.

### **3. Fase gerak**

Di dalam kromatografi cair komposisi dari fase gerak adalah salah satu dari variabel yang mempengaruhi pemisahan. Terdapat variasi yang sangat luas pada fase gerak yang digunakan untuk KCKT, tetapi ada beberapa sifat umum yang sangat disukai, yaitu fase gerak harus :

1. Murni, tidak terdapat kontaminan
2. Tidak bereaksi dengan wadah (*packing*)
3. Sesuai dengan detektor
4. Dapat melarutkan sampel
5. Memiliki viskositas rendah
6. Bila diperlukan, memudahkan "*sample recovery*"
7. Diperdagangan dapat diperoleh dengan harga murah (*reasonable price*).

Umumnya, semua fase gerak yang sudah digunakan langsung dibuang karena prosedur pemumiannya kembali sangat rumit dan mahal biayanya. Dari semua persyaratan di atas, persyaratan satu sampai dengan empat merupakan yang sangat penting (19).

### **4. Analisis kuantitatif dengan KCKT**

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncak kromatogramnya. Ada beberapa metode yang dapat digunakan, yaitu :

a. Metode Baku Luar (*External Standard Method*)

Larutan baku pembanding dengan berbagai konsentrasi disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Kurva kalibrasi dibuat dengan memplot antara luas puncak kromatogram yang dianalisis terhadap konsentrasi larutan baku pembanding. Larutan sampel yang akan dianalisis disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Kadar sampel diperoleh dengan cara memasukkan luas puncak sampel pada kurva kalibrasi atau dengan perbandingan langsung. Kekurangan metode ini adalah diperlukan baku murni serta ketelitian dalam pengenceran dan penimbangan (19).

b. Metode Baku Dalam (*Internal Standard Method*)

Sejumlah baku dalam ditambahkan ke dalam sampel dan baku pembanding. Kemudian larutan campuran komponen baku pembanding dan baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikkan. Kurva kalibrasi dibuat dengan menghubungkan perbandingan luas puncak terhadap konsentrasi komponen baku pembanding. Kadar sampel diperoleh dengan memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar. Keuntungan menggunakan cara ini adalah kesalahan pada volume injeksi dapat dieliminir. Kesulitan cara ini adalah menemukan baku dalam yang tepat (19).

Syarat-syarat baku dalam yang ideal adalah (30):

1. Baku dalam harus murni
2. Tidak terdapat dalam sampel atau cuplikan
3. Memiliki puncak terpisah baik dengan cuplikan
4. Tidak bereaksi dengan cuplikan atau fase gerak
5. Bukan merupakan metabolit dari senyawa cuplikan
6. Memiliki respon detektor yang hampir sama dengan cuplikan pada konsentrasi yang digunakan.

### C. VALIDASI METODE BIOANALISIS

Validasi metode adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan dalam penggunaannya. Tujuan utama validasi adalah untuk menjamin metode analitik yang digunakan mampu memberikan hasil yang cermat dan handal serta dapat dipercaya (31).

Validasi metode analisis pada matriks biologis yang biasanya disebut sebagai validasi metode bioanalisis. Validasi metode bioanalisis ini digunakan dalam pengujian bioavailabilitas dan bioekivalensi, serta dalam uji farmakokinetik. Proses bioanalisis seperti kromatografi gas (GC), kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC), spektrofotometri massa (MS), seperti GC-LC-MS, LC-MS, LC-MS-MS, GC-MS, dan GC-MS-MS ini digunakan

dalam penentuan kuantitatif obat atau metabolitnya dalam matriks biologis seperti serum, darah, urin, dan plasma. Validasi ini juga berlaku untuk metode bioanalisis lainnya seperti immunologikal dan mikrobiologi serta untuk matriks biologis lain seperti jaringan dan kulit. Validasi metode bioanalisis meliputi dua fase yaitu fase pre-studi yang terdiri dari enam sampel validasi dan fase studi yaitu validasi pada saat proses analisis (32).

Pada validasi metode bioanalisis terdapat tiga tipe dan tingkatan validasi yaitu sebagai berikut :

1. Validasi lengkap (*full validation*)

Validasi lengkap ini sangat penting apabila ingin mengembangkan metode dan mengimplementasikan metode bioanalisis untuk pertama kalinya. Validasi ini juga penting untuk obat baru dan untuk penentuan metabolitnya (32).

2. Validasi parsial (*partial validation*)

Validasi partial merupakan modifikasi dari metode bioanalisis yang sudah divalidasi. Beberapa tipe analisis yang termasuk dalam validasi parsial antara lain (32) :

- a. Metode bioanalisis yang ditransfer antar laboratorium atau analis.

- b. Ada perubahan pada metode analisisnya (misalnya ada perubahan pada sistem deteksi)
- c. Perubahan antikoagulan
- d. Perubahan matriks pada spesies yang sama (misalnya ada plasma manusia diganti urin)
- e. Perubahan prosedur proses sampling
- f. Perubahan spesies pada matriks yang sama (misalnya plasma mencit diganti plasma tikus)
- g. Perubahan kisaran konsentrasi
- h. Perubahan instrumen atau *platform software*
- i. Volume sampel terbatas
- j. Matriksnya jarang.

### 3. Validasi silang (*cross validation*)

Validasi ini dilakukan dengan membandingkan parameter-parameter validasi apabila digunakan dua atau lebih metode bioanalisis untuk mendapatkan data pada studi yang sama atau pada studi yang berbeda. Pada validasi ini digunakan metode validasi yang asli sebagai referensi dan metode bioanalisis lainnya sebagai pembanding (32).

Analisis obat dalam matriks biologis memerlukan standar acuan (*reference standard*) dan sampel yang digunakan sebagai kontrol kualitas (*quality control*). Baku standar acuan yang digunakan sebaiknya identik

dengan analit, apabila tidak bisa digunakan basa bebas atau asamnya, maka dapat digunakan garam atau ester dengan kemurnian yang diketahui (32).

Ada tiga macam standar acuan, antara lain :

- a. Standar acuan yang mempunyai sertifikat (misalnya *USP standard*)
- b. Standar acuan yang dijual secara komersial dari sumber yang mempunyai reputasi
- c. Standar acuan yang disintesis oleh laboratorium analit atau institusi non komersial lainnya.

Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode bioanalisis akan diuraikan di bawah ini :

#### 1. Selektivitas

Selektivitas adalah kemampuan metode analisis untuk mengukur kadar analit dengan adanya komponen-komponen lain dalam sampel (cairan biologis). Analisis terhadap matriks biologis dilakukan pada enam blanko yang berbeda sumbernya. Setiap blanko diuji terhadap adanya gangguan dan selektivitas pada batas kuantifikasi terkecil (LLOQ) (32).

#### 2. Akurasi

Akurasi suatu metode bioanalisis menggambarkan kedekatan hasil antara hasil pengujian dengan kadar yang sebenarnya. Akurasi diukur minimal lima replikat untuk tiap konsentrasi, yaitu pada konsentrasi rendah,

konsentrasi sedang, dan konsentrasi tinggi. Pengukuran dapat dilakukan *intra assay* (dalam satu run) dan *inter assay* (*day to day variation*). Pengukuran akurasi memenuhi syarat jika nilai rata-rata tidak menyimpang lebih kurang 15%, kecuali jika pada konsentrasi LLOQ maka tidak boleh menyimpang lebih kurang 20% (32).

### 3. Presisi

Presisi suatu metode bioanalisis menggambarkan kedekatan antara hasil pengujian satu dengan hasil pengujian lainnya. Presisi diukur minimal lima replikat untuk tiap konsentrasi, minimal digunakan tiga konsentrasi berbeda yaitu pada konsentrasi rendah, konsentrasi sedang, dan konsentrasi tinggi. Pengukuran presisi dilakukan secara *intra assay* (dalam satu run) dan *inter assay* (*day to day variation*). Suatu metode dikatakan presisi jika harga koefisien variasi (KV) untuk masing-masing tingkat konsentrasi tidak lebih dari 15%, kecuali jika pengukuran dilakukan pada konsentrasi LLOQ, maka koefisien variasi tidak boleh lebih dari 20% (32).

### 4. Kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi adalah hubungan antara respon instrumen dengan konsentrasi analit yang diketahui. Persiapan kurva kalibrasi dilakukan sama dengan sampel dalam matriks biologis yang diuji dengan mencampur matriks

dengan konsentrasi analit yang diketahui. Kurva kalibrasi harus terdiri dari satu sampel blanko (matriks tanpa baku dalam), satu sampel zero (matriks dengan baku dalam), dan enam sampai delapan sampel yang mencakup kisaran pengukuran (termasuk konsentrasi pada LLOQ). Standar terendah dari kurva kalibrasi yang dapat diterima sebagai LLOQ jika memenuhi kondisi sebagai berikut :

- a. Respon analit pada LLOQ sedikitnya lima kali respon blanko
- b. Respon analit (puncak analit) dapat diidentifikasi, terpisah, dan reproduksibel dengan koefisien variasi 20% dan akurasi 80-120% (32).

## 5. Linearitas dan rentang

Linearitas suatu metode bioanalisis harus diuji untuk mengetahui adanya hubungan yang linear antara kadar suatu zat dengan respon detektor. Linearitas diperoleh dari koefisien korelasi ( $r$ ) pada analisis regresi linear yang didapat dari kurva kalibrasi. Dengan dilakukan uji ini, maka dapat diketahui batas-batas konsentrasi dari analit yang memberikan respon detektor yang linear. Analisis harus dilakukan pada konsentrasi yang termasuk batas-batas linear dari konsentrasi yang telah dilakukan. Rentang metode adalah pernyataan konsentrasi terendah dan tertinggi analit yang dianalisis memberikan kecermatan, keseksamaan dan linearitas yang dapat diterima (31).

## 6. Batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi diartikan sebagai kuantitas terkecil sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (31).

Pada analisis instrumen, batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blanko dan formula di bawah ini dapat digunakan untuk perhitungan.

$$Q = \frac{K \times S_b}{S_I}$$

Q = LOD (batas deteksi) dan LOQ (batas kuantitasi)

k = 3 untuk LOD dan 10 untuk LOQ

S<sub>b</sub> = simpangan baku respon analitik dari blanko

S<sub>I</sub> = arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b pada persamaan garis  $y = a + bx$ )

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui persamaan garis regresi linear dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier  $y = a + bx$ , sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual ( $S_y/x$ )

a. Batas deteksi

$$LOD = \frac{3 Sy/x}{b}$$

b. Batas kuantitas

$$LOQ = \frac{10 Sy/x}{b}$$

Cara lain yang digunakan untuk menentukan LOD dan LOQ yaitu melalui penentuan rasio S/N (*signal to noise*) dengan harga S/N sama dengan tiga cukup memenuhi untuk menentukan batas deteksi dan untuk batas kuantitasi diharapkan harga S/N sama dengan 10 (31).

7. Uji perolehan kembali (% recovery)

Uji perolehan kembali merupakan perbandingan antara respon detektor analit yang diekstraksi dari sampel biologis dengan respon detektor kadar yang sebenarnya dari standar murni. Uji perolehan kembali dari analit tidak perlu 100%, tetapi perolehan kembali dari analit dan baku dalam harus konsisten, presisi, dan reproduksibel. Uji perolehan kembali dilakukan dengan membandingkan hasil analisis dari ekstraksi sampel pada tiga konsentrasi berbeda (konsentrasi rendah, sedang, tinggi) dengan standar yang tidak diekstraksi, dimana uji perolehan kembalinya 100%. Persyaratan uji

perolehan kembali adalah antara 80-115%, kecuali bila pengukuran pada LLOQ maka uji perolehan kembali antara 80-120% (32).

## 8. Stabilitas

Stabilitas obat dalam cairan atau matriks biologis tubuh dapat ditentukan dan bergantung pada kondisi penyimpanan, kandungan kimia dari obat, dan matriks serta wadah penyimpanan. Untuk menentukan stabilitas obat dalam cairan biologis tubuh maka analit harus dievaluasi kestabilannya mulai proses pengambilan sampel dan penanganannya, tempat, dan kondisi penyimpanan sampai proses analisisnya. Kondisi yang digunakan untuk penentuan stabilitas dari obat harus menggambarkan situasi yang akan dijumpai selama penanganan sampel dan analisisnya. Untuk menentukan stabilitas maka digunakan beberapa sampel yang dipersiapkan dari larutan induk analit yang dibuat segar dan analit dalam matriks biologis. Penetapan stabilitas menggunakan sampel yang dibuat baru dari larutan stok analit. Larutan stok yang dibuat untuk uji stabilitas harus diketahui konsentrasi (32).

Penentuan stabilitas obat dalam matriks biologis dapat dilakukan dengan lima cara, antara lain :

### a. Stabilitas beku dan cair (*Freeze and thaw stability*)

Stabilitas analit ditetapkan setelah tiga kali siklus pendinginan dan

pencairan. Paling sedikit tiga aliquot untuk setiap konsentrasi rendah dan tinggi disimpan pada temperatur penyimpanan yang ditetapkan selama 24 jam dan dibiarkan mencair pada temperatur kamar. Setelah pencairan sempurna, kemudian sampel didinginkan kembali selama 12 sampai 24 jam pada kondisi yang sama. Siklus pendinginan dan pencairan sebaiknya dilakukan dua kali atau lebih, kemudian dianalisis pada siklus ketiga. Jika analit tidak stabil pada temperatur penyimpanan, maka sampel diuji stabilitasnya pada temperatur -70 °C selama tiga kali siklus pendinginan dan pencairan (32).

b. Stabilitas jangka pendek (*Short-term stability*)

Pengujian dilakukan pada tiga aliquot dari masing-masing konsentrasi, yaitu konsentrasi terendah dan konsentrasi tertinggi. Sampel disimpan pada temperatur kamar selama 4 sampai 24 jam, kemudian dianalisis (32).

c. Stabilitas jangka panjang (*Long-term stability*)

Waktu penyimpanan dilakukan pada awal sampel dikumpulkan sampai terakhir sampel akan dianalisis (misal 0, 20, 60, 90 hari). Dilakukan pada tiga aliquot dari masing-masing konsentrasi, yaitu konsentrasi terendah dan konsentrasi tertinggi dengan kondisi penyimpanan yang sama (32).

d. Stabilitas larutan stok (*Stock solution stability*)

Stabilitas dari larutan stok dan baku dalam dievaluasi pada temperatur kamar selama paling sedikit enam jam (32).

e. Stabilitas setelah preparasi (*Post-preparative stability*)

Stabilitas dari pemrosesan sampel, termasuk waktu dalam *autosampler* harus ditetapkan. Stabilitas obat dan baku dalam dilakukan sebagai antisipasi terhadap pengujian *run time* pada suatu batch dalam validasi sampel dengan menetapkan kadar dengan kalibrasi standar murni (32).

## D. ANALISIS OBAT DALAM PLASMA

Plasma merupakan bagian cairan dari darah berupa cairan bening kekuningan yang didalamnya banyak mengandung ion, molekul anorganik, dan molekul organik. Volume plasma mencapai 55 % dari volume darah atau secara normal 5 % dari berat badan, secara kasar sekitar 3500 ml pada pria 70 kg. Plasma akan membeku bila dibiarkan, akan tetapi akan tetap mencair bila ditambahkan suatu antikoagulan (33).

Darah harus ditambahkan antikoagulan terlebih dahulu agar dapat dipisahkan plasmanyanya dengan cara sentrifugasi, namun harus dilakukan

dengan hati-hati karena sel darah merah mudah pecah yang mengakibatkan pemisahan plasma menjadi lebih sulit. Perlakuan seperti pemanasan, pembekuan, penggunaan alat-alat mekanik seperti pengocokan dengan *stirrer*, serta dengan penambahan air atau alkohol ke dalam sampel darah dapat menyebabkan pecahnya sel darah merah. Oleh karena itu, umumnya ekstraksi tidak dilakukan terhadap sampel darah melainkan terhadap plasma yang telah disiapkan terlebih dahulu (34).

Dalam KCKT, injeksi secara langsung dapat dilakukan jika sampel mengandung konsentrasi analit yang cukup tinggi. Injeksi dalam volume besar sejumlah serum atau darah dalam KCKT sering menimbulkan masalah karena komponen endogen di dalamnya dapat menghasilkan puncak-puncak dalam kromatogram, sehingga sampel plasma perlu diberikan perlakuan sebelum diinjeksikan. Beberapa prosedur secara umum berprinsip untuk mengisolasi obat dari pengaruh komponen matriks biologis, membebaskan obat dari ikatannya dengan protein, dan mendapatkan konsentrasi yang lebih tinggi untuk analisis yang sensitif. Kondisi tersebut dapat dilakukan dengan cara seperti pengendapan protein, ultrafiltrasi, dialisis, ekstraksi cair-cair, ekstraksi fase padat, dan *supercritical fluid extraction* (4).

## E. METODE ANALISIS METFORMIN DALAM PLASMA

Beberapa metode analisis metformin dalam plasma, yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti terdahulu yaitu :

1. Penetapan Kadar dengan Kromatografi Cair menggunakan Spot Darah Kering untuk pengawasan terapeutik obat metformin (9).

Kondisi : metode analisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), dengan *reverse phase* kolom (150 x 4,6 mm , 5  $\mu$ ).

Fase gerak yang digunakan adalah campuran antara 2 mM natrium dodesil sulfat, 37,5% asetonitril dan kalium dihidrogen fosfat hingga pH 7,3 dengan kecepatan aliran 0,5 mL/menit. Pada analisis ini digunakan "hole puncher" untuk menarik keluar suatu spot. Baku dalam yang digunakan adalah salbutamol. Detektor yang dipakai adalah detektor UV pada panjang gelombang 236 nm. Waktu retensi metformin adalah 5,414 menit dan waktu retensi salbutamol adalah 6,661 menit. Batas kuantitas yang diperoleh adalah 150 ng/mL sementara batas deteksinya adalah 90 ng/mL.

2. Penetapan Kadar metformin dalam plasma manusia menggunakan KCKT pasangan ion (10).

Kondisi : metode analisis menggunakan KCKT, dengan *reverse phase* kolom (150 x 4,6 mm i.d.  $\mu$ bondapak)

Fase gerak : 40 % asetonitril , natrium dodesil sulfat 0,001 M , natrium dihidrogen fosfat 0,01 M dan aquadest hingga pH 5,1 dengan kecepatan alir 1,5 mL/menit. Penyiapan sampel dilakukan dengan pengendapan protein. Baku dalam yang digunakan adalah fenitoin. Detektor yang digunakan adalah detektor ultraviolet dengan panjang

gelombang 235 nm. Semua analisis dilakukan pada temperatur kamar . Waktu retensi rata-rata dari metformin dan fenitoin masing – masing adalah 3,4 menit dan 4,5 menit. Kurva kalibrasi linear pada kisaran konsentrasi 0,2 – 2,5 µg/mL.

3. Metode tandem yang sensitif dan cepat antara kromatografi cair dengan spektrofotometri massa (11).

Kondisi : metode KCKT dengan kolom C18 Nucleosil pendek (5 µm, 50 x 4,6 mm i.d.)

Fase gerak : asetonitril - metanol - 10 mM amonium asetat pH 7,0 ( 20 : 20 : 60, v/v/v) dengan kecepatan alir 0,65 mL/menit. Penyiapan sampel melalui pengendapan protein dengan asetonitril dan pencucian dengan diklorometan. Baku dalam yang digunakan adalah fenformin. Waktu retensi metformin adalah 1,2 menit dan waktu retensi fenformin adalah 2,04 menit. Batas deteksi yang diperoleh adalah 250 pg/mL.

4. Metode KCKT yang sederhana dan cepat untuk penetapan kadar metformin dalam plasma dan air susu (12).

Kondisi : metode KCKT dengan kolom penukar kation Nucleosil 5 µm SA 100A (250 x 4,00 mm i.d.)

Fase gerak : campuran buffer tetrametil ammonium fosfat (tetrametil ammonium hidroksida yang diatur hingga pH 3,7 dengan asam fosfat) pH 3,7 dan asetonitril (80:20 ,v/v) dengan kecepatan alir 1 mL/menit. Baku

dalam yang digunakan adalah buformin. Detektor yang digunakan adalah detektor UV dengan panjang gelombang 236 nm. Penyiapan sampel dilakukan dengan pengendapan protein menggunakan asetonitril . Batas kuantitasi adalah 20  $\mu$ g/L. Linearitas baik pada konsentrasi 20,0-4000  $\mu$ g/L.

5. Penetapan Kadar metformin dalam plasma menggunakan teknik ekstraksi fase padat pasangan ion baru serta kromatografi cair pasangan ion (13).

Kondisi : metode KCKT dengan kolom C18 Supelco (250 x 4,6 mm,5  $\mu$ )  
Fase gerak : natrium dodesil sulfat 2mM, 37,5% asetonitril dan 62,5% kalium dihidrogen fosfat hingga pH 7,3 dengan kecepatan alir 1 mL/menit.  
Detektor yang digunakan adalah detektor UV pada panjang gelombang 236 nm. Baku dalam yang digunakan adalah fenformin HCl. Penyiapan sampel dilakukan dengan teknik ekstraksi fase padat pasangan ion yang dihubungkan dengan vakum ekstraksi Waters. Batas kuantitasi yang diperoleh adalah 5 ng/mL, sedangkan batas deteksinya adalah 3 ng/mL.

6. Penetapan Kadar metformin dalam plasma dengan KCKT setelah ultrafiltrasi (15).

Kondisi : metode KCKT dengan kolom analitik penukar kation (250 x 4,6 mm)

Fase gerak : amonium fosfat 0,4 mol/L dengan kecepatan alir 2,0 ml/menit. Penyiapan sampel dilakukan dengan ultrafiltrasi. Detektor yang

digunakan adalah detektor UV-Vis pada panjang gelombang 232 nm. Waktu retensinya sekitar 5 menit. Linearitas yang baik diperoleh pada konsentrasi 0,1- 40 mg/L. Batas kuantitasi 0,05 mg/L.



## **BAB III**

### **BAHAN DAN CARA KERJA**

#### **A. BAHAN**

Bahan-bahan yang digunakan adalah metformin HCl (Hildose), fenitoin natrium (Pfizer Inc), salbutamol sulfat (CO Farmaceutica Milanese S.P.A.), nipagin (Brataco Chemika), aquabidestilata (Ikapharmindo Putramas), asetonitril pro HPLC (Merck), metanol pro HPLC (Merck), kalium dihidrogen fosfat (Merck), natrium dodesil sulfat (Merck), asam fosfat (Merck), natrium hidroksida (Merck), plasma darah (Palang Merah Indonesia)

#### **B. ALAT**

Alat yang digunakan adalah alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merek Shimadzu model LC-10A sistem dua pompa yang dilengkapi dengan detektor UV (SPD-10A VP, Shimadzu), kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 mm x 4,6 mm, Integrator CBM (Communication Bus Module), Pemroses data Class LC-10A , spektrofotometer UV-Vis Jasco v-530, vortex, sentrifugator Kubota 5100 dan tabung sentrifugasi, timbangan analitik dan alat-alat gelas, transfer pet (*Effendorf*), lemari pendingin, syringe (Hamilton), pH meter (Eutech), ultrasonik (Ney)

## C. LOKASI

Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif , Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

## D. CARA KERJA

### D.1. Penyiapan bahan percobaan

#### 1. Pembuatan larutan induk metformin dan larutan uji

Ditimbang secara seksama lebih kurang 25,0 mg metformin, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL dan dilarutkan dalam fase gerak yang akan digunakan sampai batas. Diperoleh konsentrasi larutan metformin lebih kurang 0,5 mg/mL. Lakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

#### 2. Pembuatan larutan induk baku dalam dan larutan uji

Ditimbang secara seksama lebih kurang 25,0 mg salbutamol, metil paraben, dan fenitoin, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL dan dilarutkan dengan fase gerak yang akan digunakan

sampai batas. Diperoleh konsentrasi larutan salbutamol, metil paraben, dan fenitoin lebih kurang 0,5 mg/mL. Untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu, dilakukan pengenceran secara kuantitatif.

### 3. Pembuatan larutan kalium dihidrogen fosfat monohidrat 0,01 M

Ditimbang secara seksama lebih kurang 1,3609 gram kalium dihidrogen fosfat monohidrat, kemudian dilarutkan dengan air hingga 1000 mL.

### 4. Penyiapan sampel blanko dan sampel uji dalam plasma

Plasma blanko dan sampel plasma yang mengandung 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  metformin dengan penambahan 40,0  $\mu\text{L}$  baku dalam (salbutamol sulfat) dengan konsentrasi 500,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  masing-masing diambil 0,5 mL, dimasukkan dalam tabung sentrifus yang berbeda, divorteks lalu diekstraksi dengan 0,5 mL asetonitril kemudian tabung dikocok dengan vorteks selama 90 detik dan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Sebanyak 20,0  $\mu\text{L}$  disuntikkan ke alat KCKT.

## D.2. Pencarian kondisi analisis optimum untuk penetapan kadar metformin dalam plasma

## 1. Penetapan panjang gelombang analisis

Larutan induk metformin diencerkan dengan fase gerak yang akan digunakan hingga diperoleh konsentrasi lebih kurang 10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , kemudian dibuat kurva serapannya dengan spektrofotometer dan dicatat panjang gelombang maksimumnya. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh ditetapkan sebagai panjang gelombang analisis.

## 2. Pemilihan komposisi fase gerak untuk analisis metformin dalam plasma

Larutan metformin dengan konsentrasi lebih kurang 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  disuntikkan sebanyak 20,0  $\mu\text{L}$  ke alat KCKT dengan komposisi fase gerak asetonitril-larutan kalium dihidrogen fosfat 0,01 M – larutan natrium dodesil sulfat 0,01 M (40:60:0,5, v/v/v) pH 5,1 sebagai kondisi awal (10). Kemudian dibuat variasi fase gerak dengan komposisi sebagai berikut:

- a. Asetonitril – larutan kalium dihidrogen fosfat 0,01 M – larutan natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1
- b. Asetonitril – larutan kalium dihidrogen fosfat 0,01 M – larutan natrium dodesil sulfat 0,01 M (35:65:0,5 , v/v/v) pH 5,1

Kecepatan alir 1,0 mL/menit dan dideteksi pada panjang gelombang analisis yang diperoleh pada percobaan satu, dicatat waktu retensi ( $t_R$ ), dihitung faktor ikutan ( $T_f$ ), jumlah lempeng teoritis ( $N$ ) dan HETP. Komposisi

fase gerak yang menghasilkan kromatogram metformin terbaik dicobakan pada plasma blanko. Kromatogram plasma blanko yang dihasilkan dibandingkan dengan kromatogram metformin.

### 3. Pemilihan kecepatan aliran fase gerak untuk analisis metformin dalam plasma

Larutan metformin dalam plasma dengan konsentrasi 1,0 µg/ml diekstraksi dan disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan fase gerak terpilih dengan kecepatan alir 0,5 ; 0,8 ; 1,0 ; 1,2 ; 1,5 mL/menit. Kemudian dicatat waktu retensinya, dihitung faktor ikutan, resolusi dan jumlah lempeng teoritisnya.

### 4. Pemilihan baku dalam untuk analisis metformin

Larutan induk salbutamol, metil paraben, dan fenitoin diencerkan dengan fase gerak terpilih hingga konsentrasi lebih kurang 10,0 µg/mL, kemudian disuntikkan secara terpisah sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Dideteksi dengan panjang gelombang UV yang diperoleh dari percobaan satu. Dicatat waktu retensi ketiga zat tersebut, dan dibandingkan dengan waktu retensi metformin dan puncak kromatogram plasma blanko. Zat yang terpisah lebih baik dengan

metformin dan puncak kromatogram plasma blanko dipilih sebagai baku dalam.

#### 5. Pemilihan metode ekstraksi metformin dari plasma

Ke dalam tabung sentrifugasi dimasukkan 0,5 mL plasma yang mengandung 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  metformin dengan penambahan 40,0  $\mu\text{L}$  baku dalam terpilih dengan konsentrasi 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lalu diekstraksi dengan 0,5 mL metanol atau asetonitril. Kemudian tabung dikocok dengan vorteks selama 60 detik lalu disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Sebanyak 20,0  $\mu\text{L}$  supernatan disuntikkan ke alat KCKT. Kemudian dicatat waktu retensinya, dihitung faktor ikutan, resolusi dan jumlah lempeng teoritisnya.

#### 6. Pemilihan waktu vorteks untuk ekstraksi metformin dari plasma

Ke dalam tabung sentrifugasi dimasukkan 0,5 mL plasma yang mengandung 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  metformin dengan penambahan 40,0  $\mu\text{L}$  baku dalam terpilih dengan konsentrasi 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lalu diekstraksi dengan 0,5 mL asetonitril kemudian tabung dikocok dengan vorteks selama 30, 60 dan 90 detik kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Sebanyak 20,0  $\mu\text{L}$  supernatan disuntikkan ke alat KCKT. Kemudian dicatat

waktu retensinya, dihitung faktor ikutan, resolusi dan jumlah lempeng teoritisnya.

#### 7. Pemilihan waktu sentrifugasi untuk ekstraksi metformin dari plasma

Ke dalam tabung sentrifugasi dimasukkan 0,5 mL plasma yang mengandung 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  metformin dengan penambahan 40,0  $\mu\text{L}$  baku dalam terpilih dengan konsentrasi 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lalu diekstraksi dengan 0,5 mL asetonitril kemudian tabung dikocok dengan vorteks selama waktu terpilih kemudian disentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 5, 10, 15 menit. Supernatan hasil sentrifugasi dipisahkan, suntikkan 20,0  $\mu\text{L}$  supernatan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih lalu bandingkan luas puncak kromatogram metformin. Kemudian dicatat waktu retensinya, dihitung faktor ikutan, dan jumlah lempeng teoritisnya.

#### D.3. Validasi metode analisis metformin dalam plasma

##### 1. Pengukuran limit kuantitasi (LOQ) dan limit kuantitasi terendah (LLOQ)

Dibuat larutan metformin dalam plasma dengan konsentrasi lebih kurang 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ; 1,0 dan 2,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dengan penambahan baku dalam terpilih. Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0  $\mu\text{L}$  *aliquot* masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT . Dari data

pengukuran kemudian dihitung nilai LOQ. Nilai limit kuantitasi terendah (LLOQ) diperoleh dengan mengencerkan konsentrasi LOQ hingga setengah atau seperempatnya, kemudian diukur dengan menyuntikkannya ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih sebanyak lima kali pada masing-masing konsentrasi. Dari data pengukuran kemudian dihitung nilai % *diff* dan koefisien variasinya (KV).

## 2. Pembuatan kurva kalibrasi

Dibuat sampel blanko (plasma tanpa baku dalam) dan sampel zero (dengan baku dalam), serta larutan metformin dalam plasma dengan konsentrasi lebih kurang 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ; 1,0 dan 2,0  $\mu\text{g/mL}$  dengan penambahan baku dalam terpilih. Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0  $\mu\text{L}$  *aliquot* masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Dari data pengukuran dibuat kurva kalibrasi dengan menggunakan persamaan garis regresi linear.

## 3. Uji linearitas

Dari data pengukuran pada pembuatan kurva kalibrasi kemudian dianalisis dengan regresi luas puncak terhadap konsentrasi metformin dalam

plasma dan diperoleh koefisien korelasi (*r*) yang menunjukkan linearitasnya.

#### 4. Uji Presisi

Dibuat larutan metformin dalam plasma dengan konsentrasi lebih kurang 0,2 ; 0,9 ; dan 1,6  $\mu\text{g/mL}$  dengan penambahan baku dalam terpilih. Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0  $\mu\text{L}$  *aliquot* masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih, diulang sebanyak lima kali untuk masing-masing konsentrasi. Kemudian dihitung nilai simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) dari masing-masing konsentrasi.

#### 5. Uji Akurasi

Dibuat larutan metformin dalam plasma dengan konsentrasi lebih kurang 0,2 ; 0,9 dan 1,6  $\mu\text{g/mL}$  dengan penambahan baku dalam terpilih. Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0  $\mu\text{L}$  *aliquot* masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih, diulang sebanyak lima kali untuk masing-masing konsentrasi. Kemudian dihitung perbedaan nilai terukur dengan nilai yang sebenarnya (*% diff*).

## 6. Uji selektivitas

Konsentrasi pada LLOQ dibuat dengan menggunakan enam blanko plasma manusia yang berbeda, kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0  $\mu\text{L}$  *aliquot* masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Dihitung nilai koefisien variasi (KV).

## 7. Uji perolehan kembali (% recovery)

Dibuat larutan metformin dalam plasma dengan konsentrasi lebih kurang 0,2 ; 0,9 dan 1,6  $\mu\text{g/mL}$  dengan penambahan baku dalam terpilih. Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0  $\mu\text{L}$  *aliquot* masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih secara berulang pada masing-masing konsentrasi. Dihitung % recovery.

## 8. Uji stabilitas

### a. Uji stabilitas larutan stok

Dibuat larutan metformin dengan konsentrasi lebih kurang 0,2 ; 0,9

dan 1,6  $\mu\text{g/mL}$  dengan penambahan baku dalam terpilih. Kemudian masing-masing larutan disimpan pada lemari pendingin (temperatur 4°C) masing-masing pada rentang waktu 0 jam, 6 jam, 1 hari, 7 hari. Sebanyak 20,0  $\mu\text{L}$  disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih secara berulang. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung % diff.

b. Uji stabilitas jangka panjang metformin dalam plasma

Dibuat larutan metformin dalam plasma dengan konsentrasi lebih kurang 0,2 ; 0,9 dan 1,6  $\mu\text{g/mL}$  dengan penambahan baku dalam terpilih. Kemudian masing-masing larutan disimpan pada lemari pendingin (temperatur 4°C) dan masing-masing larutan diambil pada rentang waktu 0 hari, 1 hari, dan 7 hari. Kemudian diekstraksi dengan cara terpilih dan disuntikkan sebanyak 20,0  $\mu\text{L}$  ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih secara berulang. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung % diff.

c. Uji stabilitas beku dan cair (*freeze and thaw*)

Dibuat larutan metformin dalam plasma dengan konsentrasi lebih kurang 0,2 ; 0,9 dan 1,6  $\mu\text{g/mL}$  dengan penambahan baku dalam terpilih.

Kemudian dilakukan siklus *freeze and thaw* sebanyak 3 kali. Diekstraksi dengan cara terpilih dan disuntikkan sebanyak 20,0  $\mu\text{L}$  ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih secara berulang. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung % diff.

d.Uji stabilitas jangka pendek metformin dalam plasma

Dibuat larutan metformin dalam plasma dengan konsentrasi lebih kurang 0,2 ; 0,9 dan 1,6  $\mu\text{g/mL}$  dengan penambahan baku dalam terpilih. Disimpan pada suhu kamar selama 0 jam dan 12 jam, kemudian diekstraksi dengan cara terpilih dan disuntikkan sebanyak 20,0  $\mu\text{L}$  ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih secara berulang. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung % diff.

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. HASIL PERCOBAAN**

##### **A.1. Pencarian kondisi analisis metformin**

###### **1. Penetapan panjang gelombang analisis**

Panjang gelombang yang dipilih untuk analisis metformin adalah pada panjang gelombang maksimum metformin, yaitu 234 nm. Pada panjang gelombang ini, baku dalam yang akan digunakan juga memberikan serapan yang cukup besar. Spektrum serapan dari metformin dan baku dalam dapat dilihat pada Gambar 3. Data lengkap dapat dilihat pada Tabel 1.

###### **2. Pemilihan komposisi fase gerak optimum untuk analisis metformin**

Pada penelitian ini digunakan kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 X 4,6 mm , dan dicobakan komposisi fase gerak asetonitril-larutan kalium dihidrogen fosfat 0,01 M-larutan natrium dodesil sulfat 0,01 M (40:60:0,5, v/v/v) ; (30:70:0,5, v/v/v) ; (35:65:0,5, v/v/v) pH 5,1. Dari hasil percobaan dipilih fase gerak asetonitril-larutan kalium dihidrogen fosfat 0,01 M – larutan natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5,

v/v/v) pH 5,1. Kondisi ini dipilih karena jumlah lempeng teoritisnya paling besar, faktor ikutan yang paling mendekati satu (simetris) dan pada kromatogram plasma blanko tidak ada puncak yang mengganggu. Kromatogram metformin dengan variasi komposisi fase gerak dapat dilihat pada Gambar 4, 5 dan 6. Kromatogram plasma blanko dapat dilihat pada Gambar 7. Data lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 2.

3. Pemilihan kecepatan alir fase gerak untuk analisis metformin dalam plasma

Pada percobaan dengan mengubah kecepatan aliran fase gerak yaitu 0,5 ; 0,8 ; 1,0 ; 1,2 ; 1,5 mL/menit, ditetapkan kecepatan aliran fase gerak untuk analisis adalah 1 mL/menit. Dengan kondisi ini dihasilkan analisis dengan waktu retensi sekitar 6 menit dan faktor ikutan yang paling mendekati satu (simetris) serta jumlah lempeng teoritis yang besar. Kromatogram metformin dengan pengubahan kecepatan alir dapat dilihat pada Gambar 8, 9, 10 dan 11. Data lengkap dapat dilihat pada Tabel 3.

4. Pemilihan baku dalam untuk analisis metformin

Pemilihan baku dalam yang sesuai untuk analisis metformin dilakukan pada fase gerak asetonitril-larutan kalium dihidrogen fosfat 0,01 M-larutan natrium dodesil sulfat 0,01 M ( 30:70:0,5, v/v/v) pH 5,1 dengan kecepatan alir

1,0 mL/menit. Dari hasil percobaan dipilih salbutamol sulfat sebagai baku dalam karena mempunyai resolusi yang lebih besar dari 1,5 terhadap metformin dan terpisah baik dari gangguan yang ada dalam plasma serta memiliki waktu retensi yang paling singkat dibandingkan kedua baku dalam lainnya. Kromatogram baku dalam terpilih dapat dilihat pada Gambar 13. Data lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.

#### 5. Pemilihan metode ekstraksi metformin dari plasma

Pada pemilihan metode ekstraksi dilakukan dengan metode pengendapan protein, dimana pengekstraksinya dicoba dengan asetonitril dan metanol. Dari hasil yang diperoleh didapatkan metode ekstraksi dengan pengekstraksi asetonitril mendapatkan luas puncak dari metformin yang paling besar yaitu 55871. Sedangkan luas puncak dari metformin hasil ekstraksi dengan metanol hanya 42909. Kromatogram ekstraksi metformin dengan asetonitril dan metanol dapat dilihat pada Gambar 14 dan 15. Keterangan lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 5.

#### 6. Pemilihan waktu vorteks untuk ekstraksi metformin dari plasma

Pada penelitian ini untuk memperoleh metformin dari plasma secara optimal dicobakan tiga kondisi waktu vorteks yaitu selama 30, 60 dan 90 detik. Dari hasil percobaan dipilih waktu vorteks selama 90 detik karena

kondisi ini memberikan nilai % *recovery* yang paling besar yaitu sebesar 99,83 %. Kromatogram hubungan waktu vorteks dengan perolehan kembali dapat dilihat pada Gambar 16. Keterangan lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 6.

#### 7. Pemilihan waktu sentrifugasi untuk ekstraksi metformin dari plasma

Untuk memperoleh metformin secara optimal dicobakan tiga kondisi waktu sentrifugasi yaitu selama 5, 10 dan 15 menit. Berdasarkan hasil percobaan dipilih waktu sentrifugasi selama 15 menit karena pada kondisi ini diperoleh nilai % *recovery* yang paling besar yaitu 98,14 %. Kromatogram hubungan waktu sentrifugasi dengan perolehan kembali dapat dilihat pada Gambar 17. Keterangan lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 7

#### A.2. Validasi metode analisis metformin dalam plasma *in vitro*

##### 1. Batas deteksi (LOD), batas kuantitasi (LOQ) dan Lower Limit of Quantification (LLOQ)

Limit deteksi dari metformin adalah 0,0352 µg/mL , sedangkan limit kuantitasnya adalah 0,1174 µg/mL. Untuk LLOQ, hasil dari limit kuantitas kemudian dibagi 2 dan 4, lalu pada konsentrasi tersebut disuntikkan sebanyak 5 kali dan dihitung % *diff*-nya. Berdasarkan percobaan diperoleh

LLOQ sebesar 0,05054 µg/mL. Data dan gambar hasil pengujian limit deteksi, limit kuantitasi, serta LLOQ dapat dilihat pada Tabel 8 dan 9 serta Gambar 18.

## 2. Kurva kalibrasi

Berdasarkan perhitungan statistik regresi linier diperoleh persamaan regresi kurva kalibrasi adalah  $y = 0,2589 x + 0,0040$  ; dimana x adalah konsentrasi metformin dan y adalah perbandingan luas puncak metformin dan baku dalam salbutamol sulfat. Data dan gambar kurva kalibrasi dapat dilihat pada Tabel 10 dan Gambar 19.

## 3. Linearitas

Linearitas dari kurva kalibrasi metformin dalam plasma ditunjukkan dari nilai koefisien korelasi ( $r$ ) yaitu 0,9999 . Data dan gambar hasil pengujian linearitas dapat dilihat pada Tabel 10 dan Gambar 19.

## 4. Uji keterulangan (presisi)

Koefisien variasi untuk larutan metformin dalam plasma pada konsentrasi rendah (0,2008 µg/mL) adalah  $4,31 \pm 0,0085\%$  , konsentrasi sedang ( 0,9036 µg/mL) adalah  $4,83 \pm 0,0456\%$  , dan pada konsentrasi tinggi (1,6064 µg/mL) adalah  $4,75 \pm 0,0750\%$  . Dari hasil percobaan uji

keterulangan (presisi) yang telah dilakukan untuk analisis metformin dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan. Hasil data uji keterulangan (presisi) dapat dilihat pada Tabel 11.

### 5. Akurasi

Nilai akurasi ditunjukkan dengan perbedaan nilai persentase antara nilai terukur dengan nilai sebenarnya ( $\% \text{ diff}$ ). Pada konsentrasi rendah ( $0,2008 \mu\text{g/mL}$ ) diperoleh  $\% \text{ diff} -1,66 \pm 0,0085 \%$ . Pada konsentrasi sedang ( $0,9036 \mu\text{g/mL}$ ) diperoleh  $\% \text{ diff} 4,52 \pm 0,0456 \%$ . Pada konsentrasi tinggi ( $1,6064 \mu\text{g/mL}$ ) diperoleh  $\% \text{ diff} -1,74 \pm 0,0750 \%$ . Dari hasil pengujian akurasi yang telah dilakukan untuk analisis metformin dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan. Hasil data pengujian akurasi larutan metformin dalam plasma dapat dilihat pada Tabel 11.

### 6. Uji Perolehan Kembali ( $\% \text{ recovery}$ )

Uji perolehan kembali untuk larutan metformin dalam plasma pada konsentrasi rendah ( $0,2008 \mu\text{g/mL}$ ) adalah  $98,34 \pm 0,0085 \%$  ; pada konsentrasi sedang ( $0,9036 \mu\text{g/mL}$ ) adalah  $104,52 \pm 0,0456 \%$ ; dan pada konsentrasi tinggi ( $1,6064 \mu\text{g/mL}$ ) adalah  $98,26 \pm 0,0750 \%$  .Dari hasil percobaan uji perolehan kembali yang telah dilakukan untuk analisis metformin dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan. Hasil

data uji perolehan kembali larutan metformin dalam plasma dapat dilihat pada Tabel 13.

## 7. Uji selektivitas

Uji selektivitas ditunjukkan berdasarkan nilai akurasi dan presisi, dan dilakukan dengan pengukuran pada konsentrasi LLOQ yaitu 0,05054 µg/mL dengan menggunakan 6 blanko plasma manusia yang berbeda. Dari hasil pengukuran pada enam blanko plasma manusia yang berbeda diperoleh dari nilai presisi (koefisien variasi) berkisar antara 1,89 hingga 4,88 % dan nilai akurasi (% diff) berkisar antara 0,5548 hingga 12,42%. Hasil pengukuran uji selektivitas dapat dilihat pada Tabel 12.

## 8. Uji stabilitas

### a. Stabilitas larutan stok

Larutan stok metformin dan salbutamol sulfat yang disimpan pada temperatur kamar pada enam jam pertama masih diperoleh hasil yang memenuhi syarat. Hal ini terlihat dari nilai % diff yang tidak menyimpang lebih dari 15 %. Data hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 14.

b. Stabilitas jangka pendek dalam plasma

Dari hasil pengujian diperoleh bahwa luas puncak kromatogram dan % *diff* masih stabil hingga jam ke-12 dimana nilai % *diff* tidak menyimpang lebih dari 15 %. Data hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 15.

c. Stabilitas beku dan cair

Dari hasil pengujian diperoleh bahwa luas puncak kromatogram dan % *diff* masih stabil dimana nilai % *diff* tidak menyimpang lebih dari 15 %. Data hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 16.

d. Stabilitas jangka panjang dalam plasma

Dari hasil pengujian diperoleh bahwa luas puncak kromatogram dan % *diff* masih stabil dimana nilai % *diff* tidak menyimpang lebih dari 15 %. Data hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 17.

## B. PEMBAHASAN

Pada penelitian ini digunakan instrumen KCKT dengan detektor UV-Vis. Berdasarkan spektrum serapan yang diperoleh metformin memiliki panjang gelombang maksimum pada 234 nm. Pemilihan panjang gelombang

pada analisis ini penting untuk meningkatkan selektivitas dan sensitivitas. Berdasarkan literatur yang ada analisis metformin dilakukan pada panjang gelombang 235 nm (10).

Pada pencarian komposisi fase gerak dicoba dengan menggunakan fase gerak asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M pH 5,1 (40:60:0,5, v/v/v). Penambahan natrium dodesil sulfat dalam komposisi ini dimaksudkan untuk mencegah ionisasi dari metformin HCl agar didapatkan metformin HCl dalam bentuk molekul. Berdasarkan kondisi ini didapatkan waktu retensi metformin 4,156 menit. Selanjutnya dicobakan fase gerak yang sama dengan perbandingan yang berbeda yaitu asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M pH 5,1 (35:65:0,5, v/v/v) diperoleh waktu retensi 5,025 menit. Kedua perbandingan fase gerak pertama ini tidak dipilih karena masih adanya gangguan dari plasma pada waktu retensi metformin. Selanjutnya dicobakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M- natrium dodesil sulfat 0,01 M pH 5,1 (30:70:0,5, v/v/v) dari hasil ini diperoleh waktu retensi metformin adalah 6,020 menit. Dari percobaan dipilih fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M- natrium dodesil sulfat 0,01 M pH 5,1 (30:70:0,5, v/v/v) dengan waktu retensi 6,020 menit. Hal lain yang diperhatikan adalah jumlah pelat teoritis yang didapatkan pada fase gerak terpilih ini adalah jumlah pelat teoritis sebesar 10190 dengan nilai HETP  $2,4534 \times 10^{-3}$  dan faktor ikutan paling kecil yakni sebesar 1,24 bila dibandingkan dengan komposisi fase gerak lain yang dicoba.

Pada pencarian kondisi analisis kecepatan laju alir juga divariasikan. Pada kondisi awal kecepatan aliran 1,0 mL/menit diperoleh waktu retensi 6,020 menit dengan jumlah pelat teoritis 10190 dan faktor ikutan 1,24. Kemudian dicoba dengan mengubah kecepatan alirannya menjadi 0,5 mL/menit, 0,8 mL/menit , 1,2 mL/menit dan 1,5 mL/menit. Berdasarkan hasil percobaan yang diperoleh saat kecepatan laju alir 0,5 mL/menit diperoleh waktu retensi 8,380 menit dengan jumlah pelat teoritis 6740 dan faktor ikutan 1,27. Pada kecepatan laju alir 0,8 mL/menit diperoleh waktu retensi 7,274 menit dengan jumlah pelat teoritis 7557 dan faktor ikutan sebesar 1,41. Untuk kecepatan laju alir 1,2 mL/menit diperoleh waktu retensi 5,299 menit dengan jumlah pelat teoritis 5433 dan faktor ikutan sebesar 1,68. Sedangkan pada kecepatan laju alir 1,5 ml/menit diperoleh waktu retensi 4,216 menit dengan jumlah pelat teoritis 5061 dan faktor ikutan sebesar 1,71. Berdasarkan hasil yang diperoleh, dipilih kecepatan laju aliran sebesar 1,0 mL/menit karena waktu retensinya sudah cukup jauh untuk menghindari puncak-puncak pengganggu yang berasal dari komponen endogen plasma, seperti asam-asam amino, yang biasanya muncul pada menit-menit awal analisis. Alasan lainnya adalah tekanan kolom pada laju alir 1,0 lebih rendah bila dibandingkan dengan laju alir 1,2 dan 1,5 mL/menit, sehingga mengurangi resiko rusaknya kolom. Hal ini dikarenakan semakin tinggi kecepatan laju alir, tekanan kolom yang dihasilkan semakin tinggi dan dapat mengakibatkan umur kolom semakin pendek. Laju alir 0,5 dan 0,8 mL/menit tidak dipilih

untuk analisis karena memberikan waktu retensi yang panjang , dimana hal ini tidak efisien jika diterapkan dalam analisis rutin.

Pada pemilihan baku dalam, digunakan zat yang dipilih karena memiliki kepolaran yang hampir sama, memberikan serapan pada panjang gelombang analisis dan keterikatannya dengan protein plasma. Baku dalam yang dicobakan adalah metil paraben, salbutamol dan fenitoin. Penggunaan baku dalam untuk analisis obat dalam darah bertujuan untuk mengurangi kesalahan selama proses analisis, terutama untuk sampel yang mengalami *pretreatment* seperti ekstraksi, filtrasi, dan lainnya (19). Metode ini dilakukan dengan menambahkan senyawa baku yang jumlahnya diketahui dan kemudian campuran itu dibuat untuk disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Pemilihan baku dalam biasanya dipengaruhi oleh nilai resolusi yang dihasilkan oleh zat tersebut terhadap zat yang dianalisis karena resolusi merupakan parameter yang menunjukkan apakah dua zat terpisah dengan baik. Selain itu, adanya gangguan dari plasma menjadi pertimbangan untuk memilih baku dalam yang sesuai. Dari percobaan diperoleh waktu retensi metil paraben yaitu 12,045 dengan resolusi 4,14 terhadap metformin, sedangkan waktu retensi salbutamol yaitu 8,787 menit dengan resolusi 3,30 terhadap metformin dan waktu retensi fenitoin sebesar 19,983 dengan resolusi terhadap metformin sebesar 7,56. Pada kondisi terpilih, baku dalam terpilih salbutamol sulfat memiliki waktu retensi sekitar 8 menit dan puncak salbutamol sulfat terpisah baik dari puncak metformin (nilai resolusi diatas 3) serta tidak ada puncak plasma blanko yang mengganggu.

Untuk analisis metformin dalam plasma, maka metformin perlu diekstraksi terlebih dahulu dari komponen plasma yang cukup kompleks. Ekstraksi metformin dari plasma dilakukan dengan cara pengendapan protein menggunakan pelarut organik ke dalam plasma yang mengandung metformin dan baku dalamnya, kemudian divorteks dan disentrifugasi. Pada percobaan, dicoba pengendapan dengan dua macam pelarut organik yaitu asetonitril dan metanol. Dari percobaan, diperoleh hasil bahwa metode ekstraksi dengan pengekstraksi asetonitril memberikan hasil luas puncak yang lebih besar dibandingkan dengan pengekstraksi metanol. Pada ekstraksi dengan asetonitril, diperoleh luas puncak sebesar 55871. Sedangkan dari ekstraksi dengan metanol hanya diperoleh luas puncak sebesar 42909. Ikatan metformin dengan protein plasma, sekitar 10%, dapat diputus dengan penambahan asetonitril. Proteinnya akan mengendap dan kemudian dapat dipisahkan. Pengendapan protein dengan cara menambahkan asetonitril juga merupakan teknik yang sering dilakukan karena memberikan persentase pengendapan terbesar (4). Tujuan dari vorteks adalah untuk mencampur plasma dengan pelarut organik sehingga pengendapan protein terjadi dengan sempurna. Sedangkan tujuan dari sentrifugasi yaitu untuk mengendapkan protein sehingga protein terpisah dari supernatannya.

Pada penelitian ini, dilakukan modifikasi lamanya waktu vorteks yaitu dengan variasi 30,60 dan 90 detik. Ternyata dari percobaan diperoleh hasil bahwa plasma yang mengandung metformin yang divorteks selama lebih kurang 90 detik memberikan hasil luas puncak yang lebih besar dibandingkan

dengan plasma yang diekstraksi menggunakan waktu vorteks yang lebih singkat. Pertimbangan dalam memilih waktu vorteks selama lebih kurang kurang 90 detik adalah karena dengan waktu vorteks selama 30 detik memberikan perolehan kembali yang cukup baik, pada waktu vorteks 60 detik memberikan perolehan kembali yang lebih baik lagi. Ternyata, perolehan kembali yang paling baik diperoleh pada waktu vorteks selama 90 detik sehingga waktu vorteks 90 detik inilah yang dipilih sebagai waktu vorteks untuk ekstraksi metformin dari plasma.

Setelah diperoleh kondisi analisis metformin dalam plasma , selanjutnya dilakukan validasi metformin dalam plasma. Validasi ini diawali dengan pengukuran LOQ dan LLOQ. Rentang konsentrasi yang digunakan lebih kurang 0,1000-2,00  $\mu\text{g/mL}$  karena berdasarkan literatur disebutkan bahwa kisaran konsentrasi metformin dalam plasma sebesar 0,2000-1,60  $\mu\text{g/mL}$ . Berdasarkan perhitungan statistik, diperoleh nilai LOD 0,0352  $\mu\text{g/mL}$  dan nilai LOQ 0,1174  $\mu\text{g/mL}$ . Selanjutnya dihitung nilai LLOQ dengan melakukan pengenceran konsentrasi LOQ menjadi setengah atau seperempatnya. Berdasarkan pengukuran dan perhitungan diperoleh nilai LLOQ sebesar 0,05054  $\mu\text{g/mL}$ . LLOQ yang diperoleh lebih besar daripada yang tertera pada literatur yaitu sekitar 20  $\mu\text{g/mL}$ . Namun dengan segala keterbatasan peralatan yang digunakan pada penelitian ini, nilai LLOQ sebesar 0,05054  $\mu\text{g/mL}$  sudah menunjukkan bahwa metode yang digunakan cukup sensitif.

Selanjutnya dibuat kurva kalibrasi dan uji linearitas metformin dalam plasma dengan rentang konsentrasi lebih kurang 0,05054 - 2,02 µg/mL. Pemilihan rentang konsentrasi ini berdasarkan rentang konsentrasi metformin dalam plasma 0,2-1,6 µg/mL dan mencakup konsentrasi LLOQ yaitu 0,05054 µg/mL. Untuk analisis metformin dalam plasma, kurva kalibrasi terdiri dari sampel plasma blanko (plasma tanpa penambahan metformin dan baku dalam), plasma zero (plasma dengan penambahan baku dalam), dan 6-8 larutan metformin dalam plasma dengan penambahan baku dalam. Pada hasil perhitungan diperoleh persamaan regresi linear  $y = 0,2589 x + 0,0040$  dengan koefisien korelasi  $r = 0,9999$ . Sehingga dapat disimpulkan bahwa metode analisis metformin dalam plasma dengan rentang konsentrasi lebih kurang 0,05054 – 2,02 µg/mL memenuhi kriteria uji linearitas dan dapat diterima untuk suatu metode analisis yang *valid*.

Uji selektivitas metode analisis dalam plasma dengan menggunakan enam plasma yang berbeda yang mengandung metformin pada konsentrasi LLOQ yaitu 0,05054 µg/mL. Berdasarkan perhitungan, nilai koefisien variasi dan % *diff* dari masing-masing plasma kurang dari 20 %, sehingga metode yang digunakan memenuhi syarat uji selektivitas.

Untuk uji presisi, akurasi, dan % *recovery* digunakan larutan metformin dalam plasma dengan konsentrasi lebih kurang 0,2 ; 0,9 ; dan 1,6 µg/mL. Pengujian dilakukan dengan menyuntikkan larutan metformin dalam plasma secara berulang, minimal lima replikat pada tiga konsentrasi yang berbeda (tinggi, sedang dan rendah) dalam satu *run (intra assay)*. Berdasarkan hasil

perhitungan, untuk uji presisi diperoleh nilai koefisien variasi di bawah 15 % untuk masing-masing konsentrasi. Untuk uji akurasi diperoleh nilai % *diff* di bawah 15% untuk masing-masing konsentrasi. Untuk % *recovery* diperoleh nilai % *recovery* dalam rentang 80-120%. Dari hasil di atas terlihat bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi kriteria uji presisi, akurasi, dan % *recovery*.

Kestabilan metformin dalam plasma maupun larutan standarnya perlu diperhatikan. Pengujian kestabilan ini bertujuan untuk mengetahui batas waktu pemeriksaan setelah pengambilan sampel darah dan mengetahui waktu pembuatan kembali larutan stok. Uji stabilitas yang dilakukan yaitu stabilitas jangka pendek, stabilitas beku dan cair, stabilitas jangka panjang metformin dalam plasma, dan stabilitas larutan stok metformin. Untuk uji stabilitas metformin dalam plasma dilakukan pada konsentrasi 0,2 ; 0,9 ; dan 1,6  $\mu\text{g/mL}$ .

Berdasarkan hasil uji stabilitas larutan metformin dalam plasma *in vitro*, baik uji stabilitas jangka pendek, uji stabilitas beku-cair, stabilitas jangka panjang metformin dalam plasma, maupun stabilitas larutan stok metformin menunjukkan penurunan nilai % *diff* namun persentase tidak menyimpang lebih dari 15%.

Hasil yang diperoleh pada validasi metode bioanalisis metformin dalam plasma menunjukkan bahwa kriteria-kriteria dalam validasi terpenuhi sehingga metode ini dapat digunakan lebih lanjut untuk studi farmakokinetik.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. KESIMPULAN**

1. Kondisi optimum untuk analisis metformin dalam plasma *in vitro* menggunakan alat KCKT dengan detektor UV-Vis , kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) panjang 250 x 4,6 mm adalah menggunakan fase gerak asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat (30:70:0,5, v/v/v) pH 5,1, kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 234 nm dengan salbutamol sulfat sebagai baku dalam.
2. Hasil validasi dari metode bioanalisis yang digunakan menunjukkan bahwa kriteria validasi yaitu LLOQ, selektivitas, kurva kalibrasi, linearitas, stabilitas, presisi, akurasi, dan % recovery memenuhi syarat yang ditetapkan.

#### **B. SARAN**

Untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan analisis metformin dalam plasma manusia secara *in vivo* dengan menggunakan metode KCKT yang telah dilakukan.

## DAFTAR ACUAN

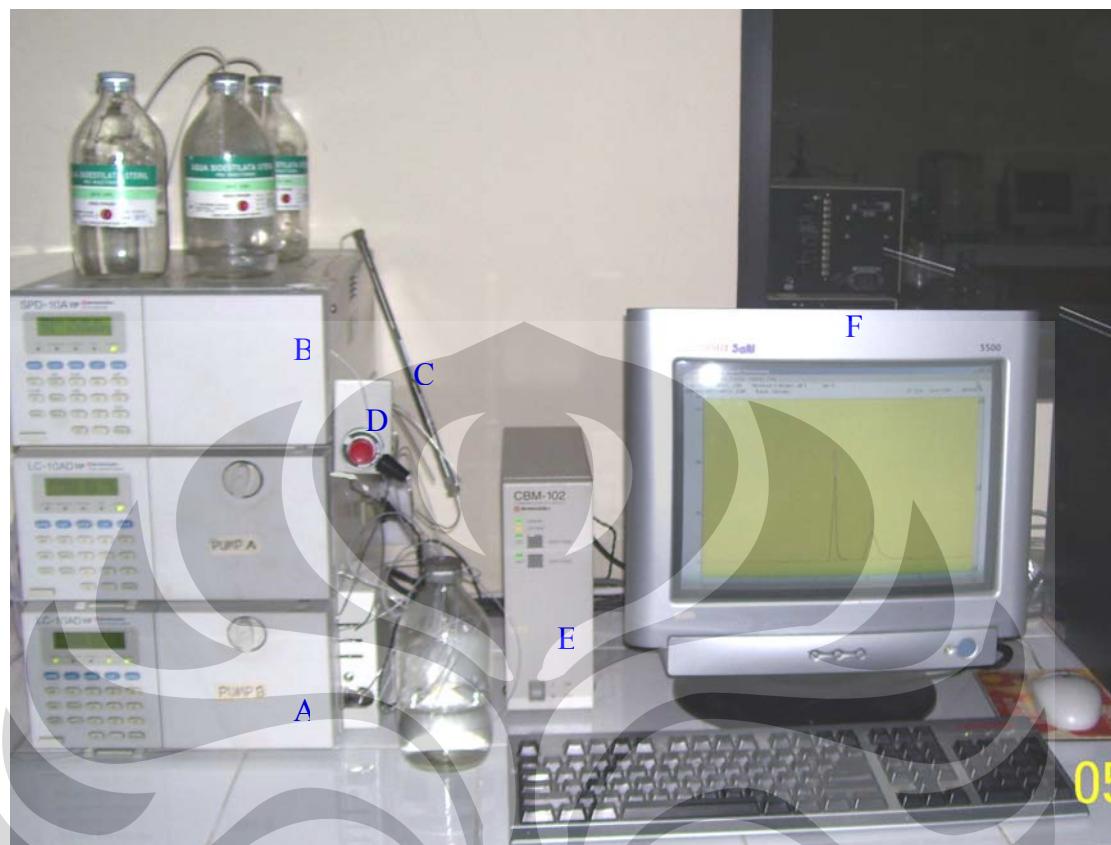
1. Anonim. Diabetes mellitus, dari Diabetisi Tetap Bisa Menikmati Hidup .[www.litbang.depkes.go.id/aktual/kliping/diabetes110406.htm](http://www.litbang.depkes.go.id/aktual/kliping/diabetes110406.htm). Tanggal 12 Desember 2006. pukul 15.34 WIB.
2. Anonim. Diabetes mellitus, dari Pahami Indeks Glikemik. [www.pikiran-rakyat.com/cetak/2006/092006/14/cakrawala/lain05.htm](http://www.pikiran-rakyat.com/cetak/2006/092006/14/cakrawala/lain05.htm). Tanggal 12 Desember 2006. pukul 16.04 WIB.
3. Anonim. Diabetes mellitus, dari Diabetes Bisa Sembuh?. [www.seniornews.co.id/modules.php?name=News&file=article&sid=58](http://www.seniornews.co.id/modules.php?name=News&file=article&sid=58). Tanggal 15 Desember 2006. pukul 16.23 WIB.
4. Kelly, M.T. Drugs Analysis in Biological Fluids. Dalam : *Chemical Analysis in Complex Matrices*. Dublin, Ireland. 1990 : 17-97.
5. Shargel, L and Andrew, B.C. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*, Second Edition. Appleton and Lange. 1988 : 33-110.
6. Kawira, J.A. Problems of Drug Analysis in Relation to Therapeutic Drug Monitoring. Dalam : *Abstracs, The 4<sup>th</sup> Pan Pacific Asian Congress on Clinical Pharmacy*. July 10-14, 1994. Horison Hotel, Jakarta-Indonesia. The Indonesian Pharmacist Association. 1994 : 18.
7. Anonim. *AHFS Drugs Information* Vol.III. American Society of Hospital Pharmacists. 2002 : 3052-3061.
8. Anonim. *Farmakologi dan Terapi*, Edisi IV. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 1995 : 479.
9. Aburuz, A. Millership, J., McElnay ,J. Dried Blood Spot Liquid Chromatography Assay for Therapeutic Drug Monitoring of Metformin. *Journal of Chromatography B*. 2006. **832** : 202-207.

10. Zarghi, A. Foroutan, S. M. Shafaati, A. Khoddam, A. Rapid Determination of Metformin in Human Plasma using ion-pair HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003. **31**: 197-200.
11. Wang, Yingwu. Tang, Yunbiao. Gu, Jingkai. Paul Fawcett, J. Bai, Xu. Rapid and Sensitive Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometric Method for The Quantitation of Metformin in Human Plasma. *Journal of Chromatography B*.2004. **808** : 215-219.
12. Zhang, Mei. A. Moore, Grant. Lever, Michael. J. Gardiner, Sharon. M.J. Kirkpatrick, Carl. J. Begg, Evan. Rapid and Simple High-Performance Liquid Chromatographic Assay for The Determination of Metformin in Human Plasma and Breast Milk. *Journal of Chromatography B* . 2002 . **766** : 175-179.
13. Aburuz, S. Millership, J. McElnay, J. Determination of Metformin in Plasma using a New Ion Pair Solid Phase Extraction Technique and Ion Pair Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography B* . 2003. **798** : 203-209.
14. Aburuz, S. Millership, J. McElnay, J. The Development and Validation of Liquid Chromatography Method For The Simultaneous Determination of Metformin and Glipizide, Glucazide, Glibenclamide or Glimperide in Plasma. *Journal of Chromatography B* . 2005 . **817** : 277-286.
15. Vesterqvist, Ole. Nabbie, Fizal. Swanson, Brian. Determination of Metformin in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography after Ultrafiltration. *Journal of Chromatography B* .1998. **716** : 299-304.
16. Koseki, Nozomu. Kawashita, Hiroto. Niina, Miyuki. Nagae, Yusuke. Masuda, Naoki. Development and Validation for High Selective Quantitative Determination of Metformin in Human Plasma by Cation Exchanging with Normal-Phase LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005. **36** : 1063-1072.
17. Vasudevan, M. Ravi, J. Ravisankar, S. Suresh, B. Ion-Pair Liquid Chromatography Technique for The Estimation of Metformin in Its

- Multicomponent Dossage Forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001. **25** : 77-84.
18. Tache, Florentin. David, Victor. Farca, Alexandru. Medvedovici, Andrei. HPLC-DAD Determination of Metformin in Human Plasma using Derivatization with p-nitrobenzoyl chloride in a Biphasic System. *Microchemical Journal*. 2001. **68** : 13-19.
19. Johnson, E.L, dan R. Stevenson. *Dasar Kromatografi Cair*. Terj. K. Padmawinata. Penerbit ITB Bandung. 1991 : 2-15 dan 213-321.
20. Putra de Lux, Effendi. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dalam Bidang Farmasi. <http://www.Infolab-online.com/VI/index.php?>. Tanggal 25 Maret 2007.pukul 10.34 WIB.
21. Indrayanto, G. Metode Validasi pada Analisis Dengan Kromatografi. Medika : *J. Kedokteran dan Farmasi*. 1994. **20(2)** : 49-51.
22. Struktur Metformin Hidroklorida, dari Ensiklopedia Online. <http://www.encyclopedia-online.info/Metformin> . Tanggal 16 Desember 2006. Pukul 17.35 WIB.
23. Anonim. *Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids and Post-mortem Material*. 2<sup>nd</sup> edition. London : The Pharmaceutical Press. 1986 : 740-741, 762, 897-898, 963-964.
24. Anonim. *The Pharmaceutical Codex*, 11<sup>th</sup> edition. London : The Pharmaceutical Press. 1979 : 544-545, 697-698, 799-800.
25. Anonim. *Martindale The Complete Drugs Reference* 32<sup>th</sup> Edition, Volume I. London : The Pharmaceutical Press. 1999 : 313-317, 330.
26. Anonim. *Farmakope Indonesia* Edisi IV. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995 : 534-535, 551, 670-671, 751.

27. G. Wells, Barbara. T. Dipiro, Joseph. L. Schwinghammer, Terry.W. Hamilton, Cindy. *Pharmacotherapy Handbook* . 5<sup>th</sup> edition. USA : Appleton & Lange . 2003 : 174-177.
28. Tan, Hoan Tjay, Rahardja Kirana. *Obat-obat Penting, Khasiat, Penggunaan dan Efek Sampingnya*. Penerbit PT. Alex Media Komputindo, Kelompok Gramedia. Jakarta . 2002 : 695-698, 702-704.
29. Schunack, W. Klaus M, Manfred H. Senyawa Obat, edisi kedua Diterjemahkan oleh Joke R. Wattimen, Sriwoelan Soebito. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press. 1990 : 561-562.
30. Snyder, L.R. Kirkland, J.J. Glajch, J.L. *Practical HPLC Method Development* 2<sup>th</sup> edition. John Willey and Sons, Inc.1997 : 686-706.
31. Duane B. Lankings. Bionalytical Chemistry Methods : Development and Validation, 9 hal. <http://www.pharmacology-toxicology.com>. Tanggal 16 Desember 2006. pukul 15.00 WIB.
32. Guidance for Industry. Bionalytical Method Validation. 2001. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). <http://www.fda.gov/cder/Guidance/index.htm>. Tanggal 20 Desember 2006. pukul 15.15 WIB.
33. Ganong, F.W. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Terjemahan oleh dr. M. Djauhari Widjaja Kusumah et.al. Jakarta : EGC. 1995 : 523-524.
34. Red Blood Cell-Wikipedia. The Free Encyclopedia. [http://en.wikipedia.org/wiki/Blood\\_plasma](http://en.wikipedia.org/wiki/Blood_plasma). Tanggal 19 Desember 2006. pukul 13.30 WIB.

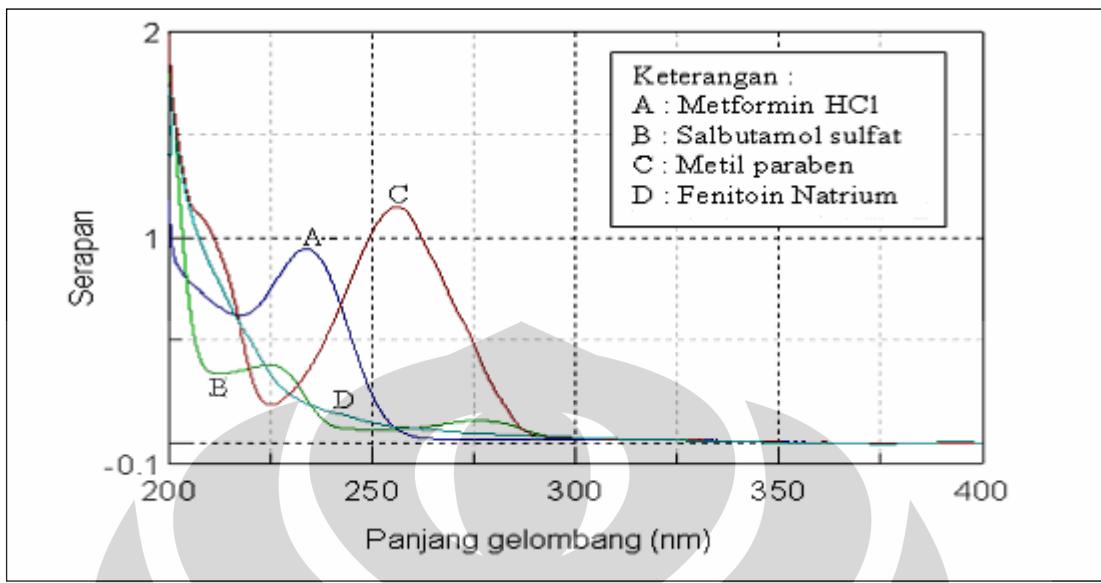




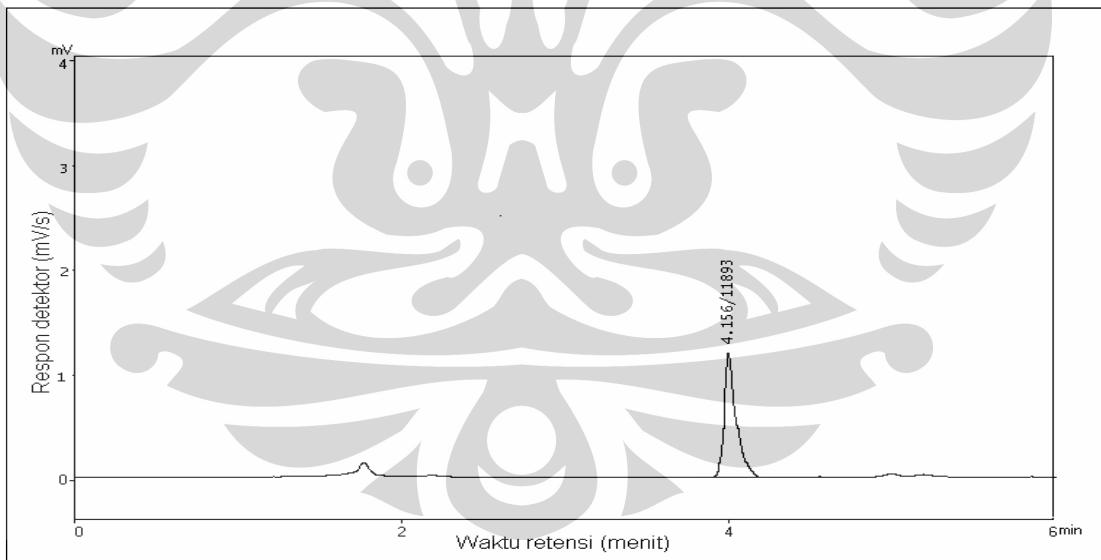
Gambar 2. Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Keterangan :

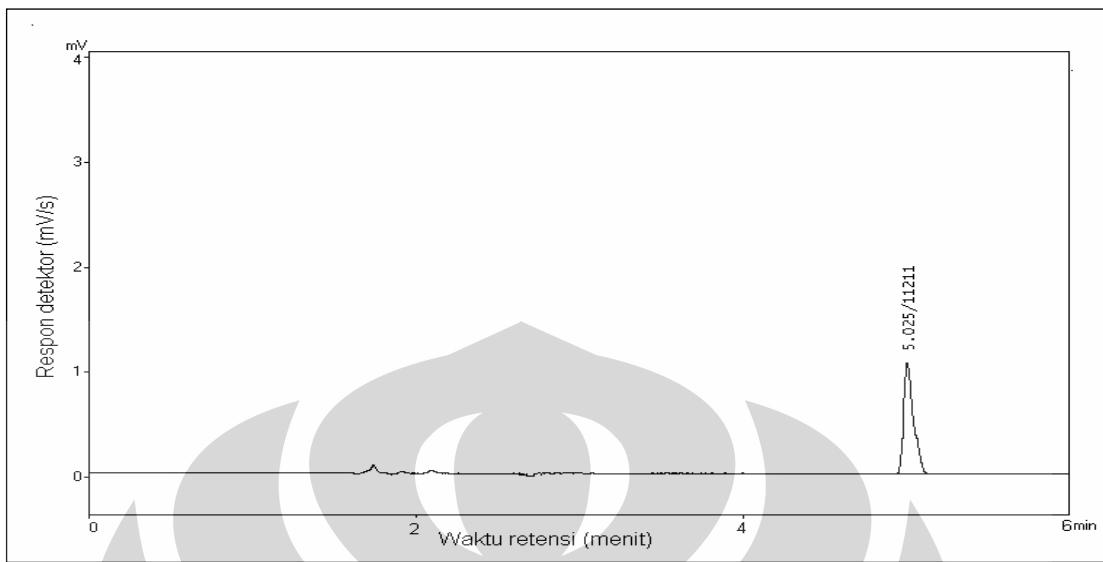
- A. Pompa model LC-10AD VP (Shimadzu)
- B. Detektor UV-Vis SPD-10A (Shimadzu)
- C. Kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm
- D. Injektor Rheodyne
- E. Integrator CBM (Communication Bus Module) Shimadzu
- F. Pemroses data Class LC-10A



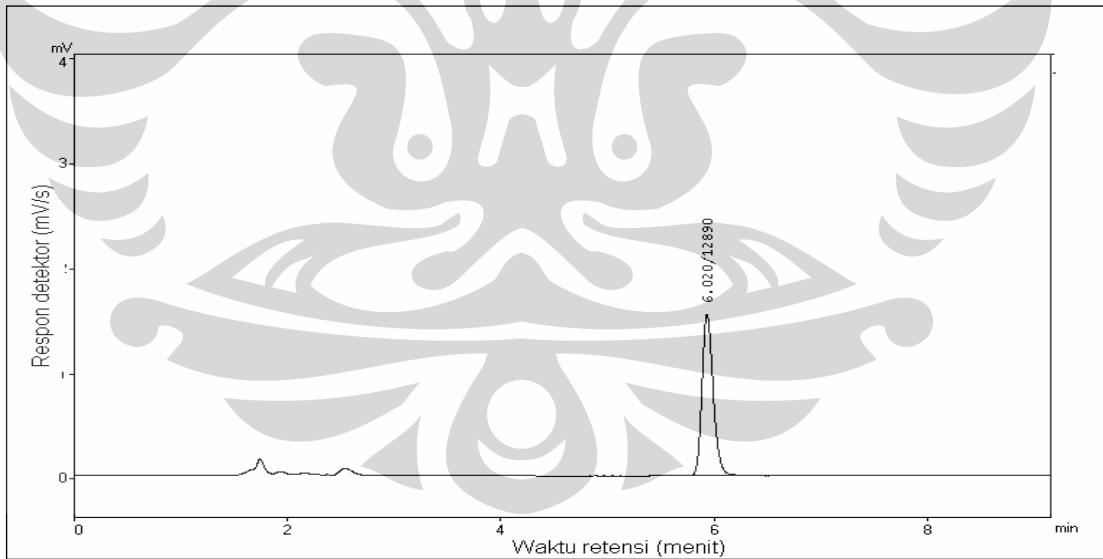
Gambar 3. Spektrum serapan larutan metformin (A), salbutamol sulfat (B), metil paraben (C), dan fenitoin natrium (D) dengan konsentrasi 10,0  $\mu\text{g/mL}$  dalam fase gerak asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1



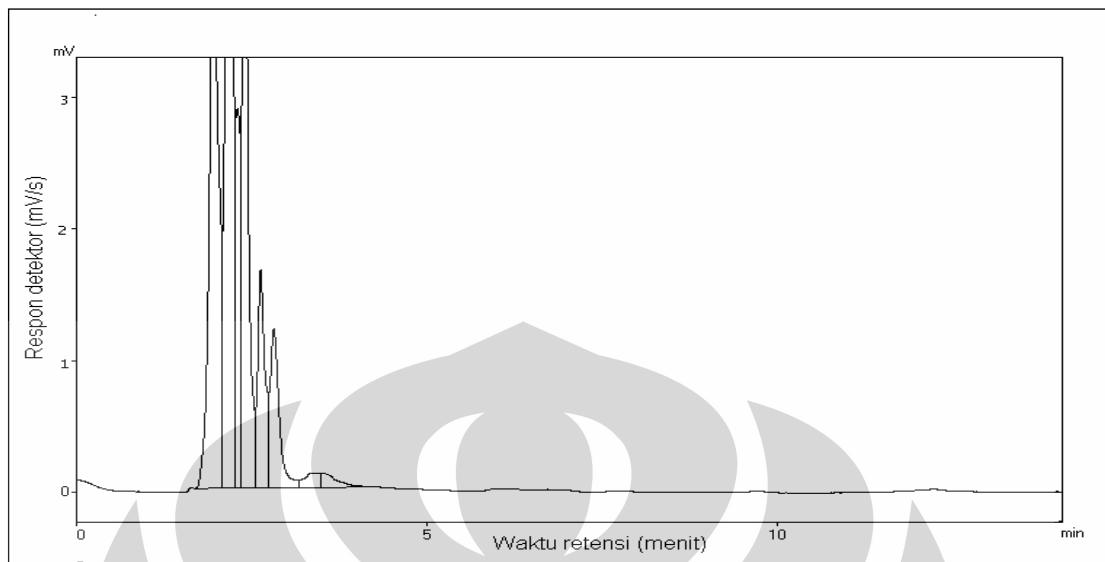
Gambar 4. Kromatogram larutan standar metformin konsentrasi 1,0  $\mu\text{g/mL}$ . Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5  $\mu\text{m}$ , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (40:60:0,5, v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikan 20,0  $\mu\text{L}$ .



Gambar 5. Kromatogram larutan standar metformin konsentrasi 1,0 µg/mL. Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (35:65:0,5, v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0 µL.



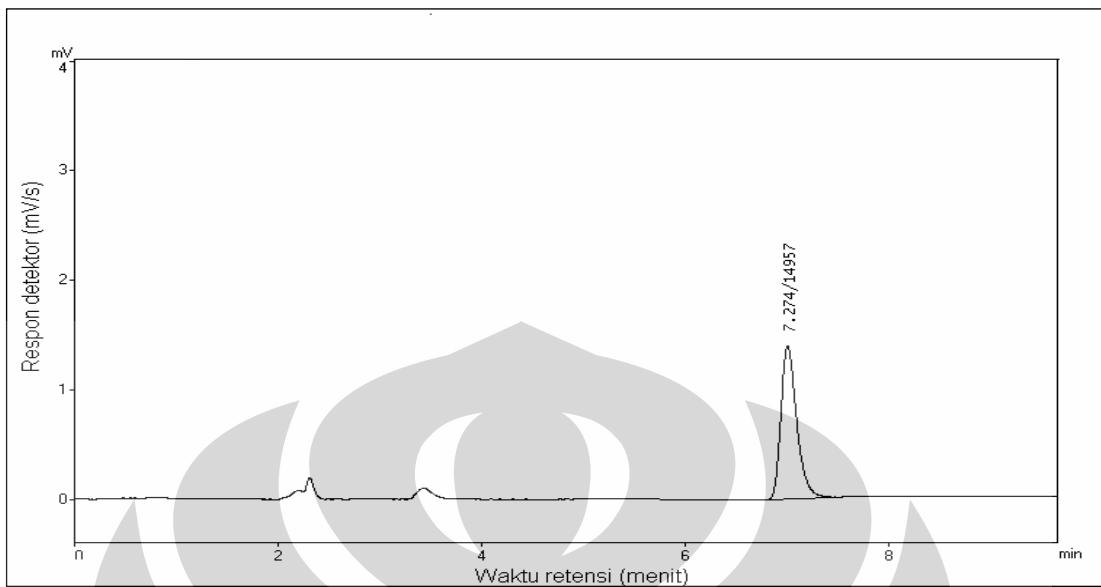
Gambar 6. Kromatogram larutan standar metformin konsentrasi 1,0 µg/mL. Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5, v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0 µL.



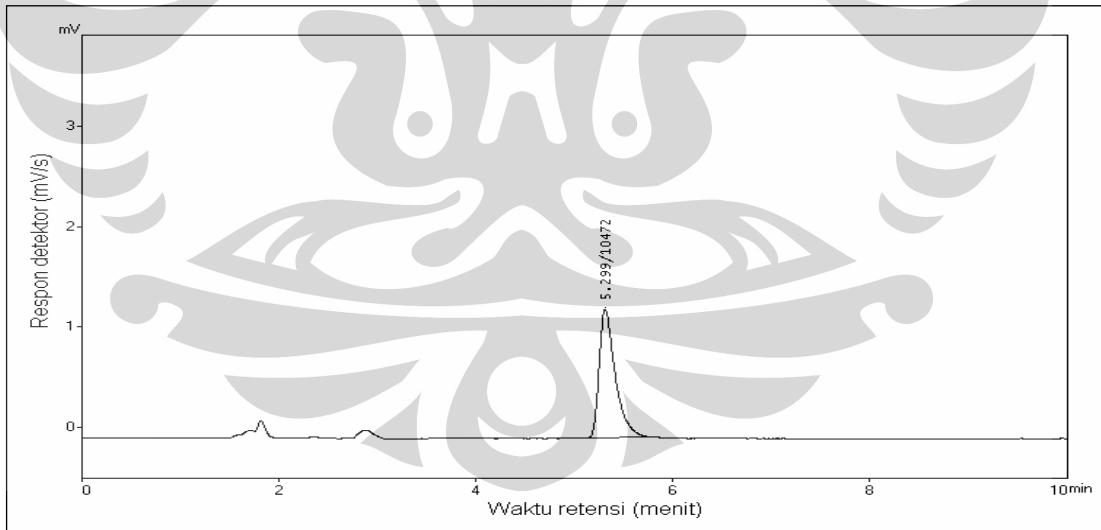
Gambar 7. Kromatogram plasma blanko. Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0 µL.



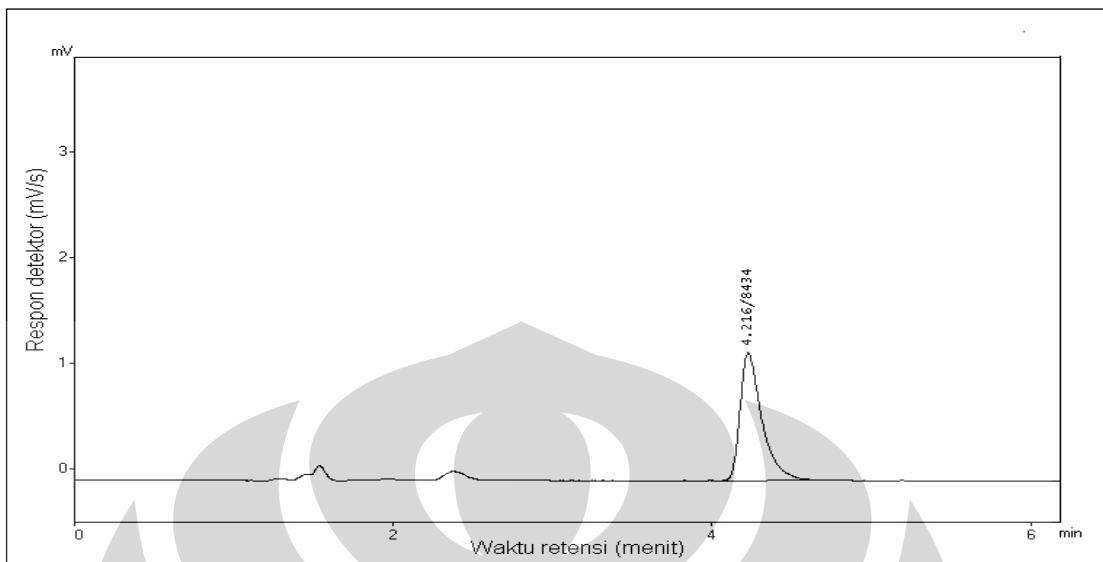
Gambar 8. Kromatogram larutan standar metformin konsentrasi 1,0 µg/mL. Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 0,5 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0 µL.



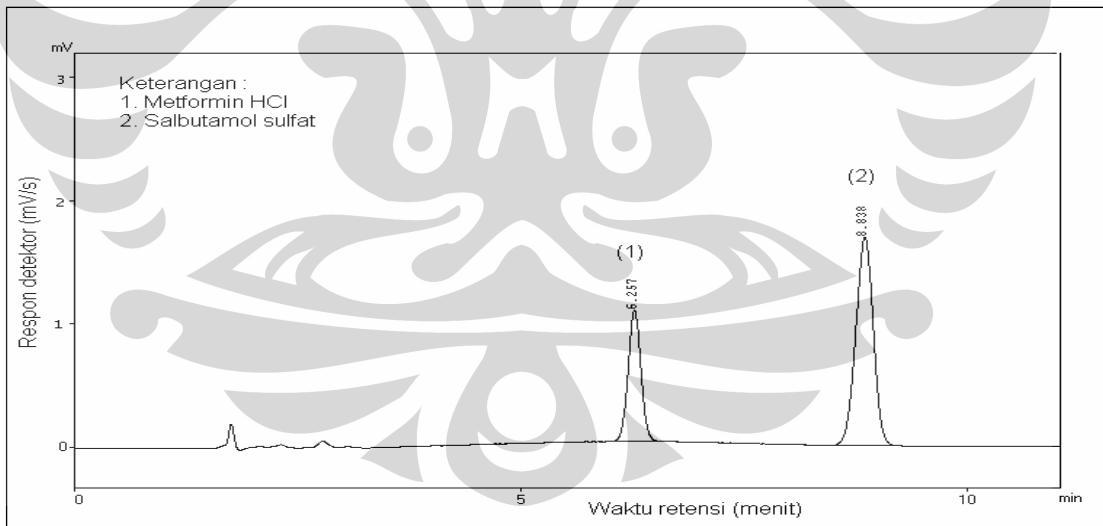
Gambar 9. Kromatogram larutan standar metformin konsentrasi 1,0 µg/mL. Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 0,8 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0 µL.



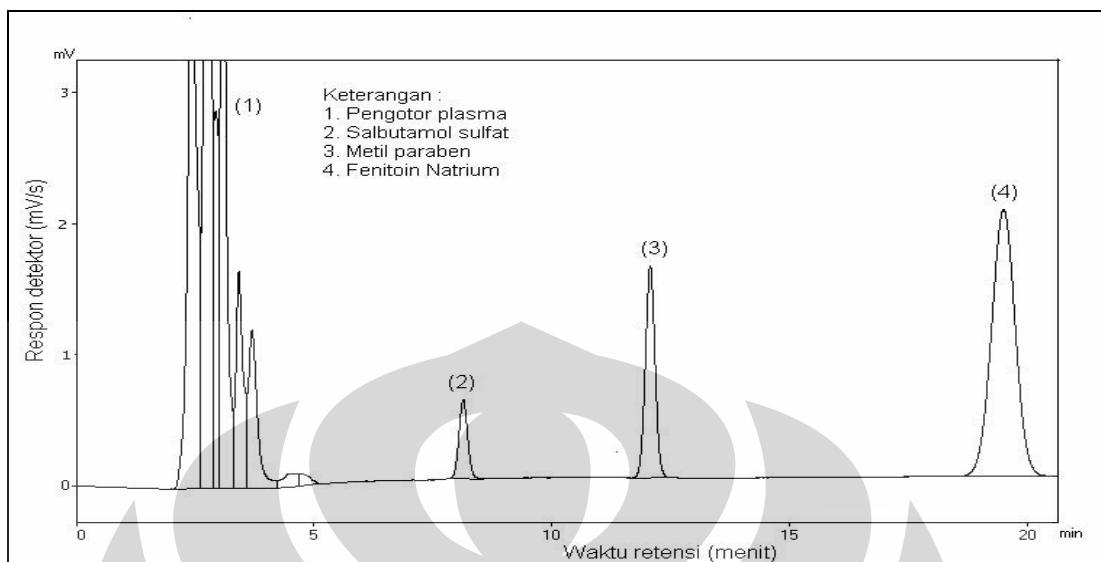
Gambar 10. Kromatogram larutan standar metformin konsentrasi 1,0 µg/mL. Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,2 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0 µL.



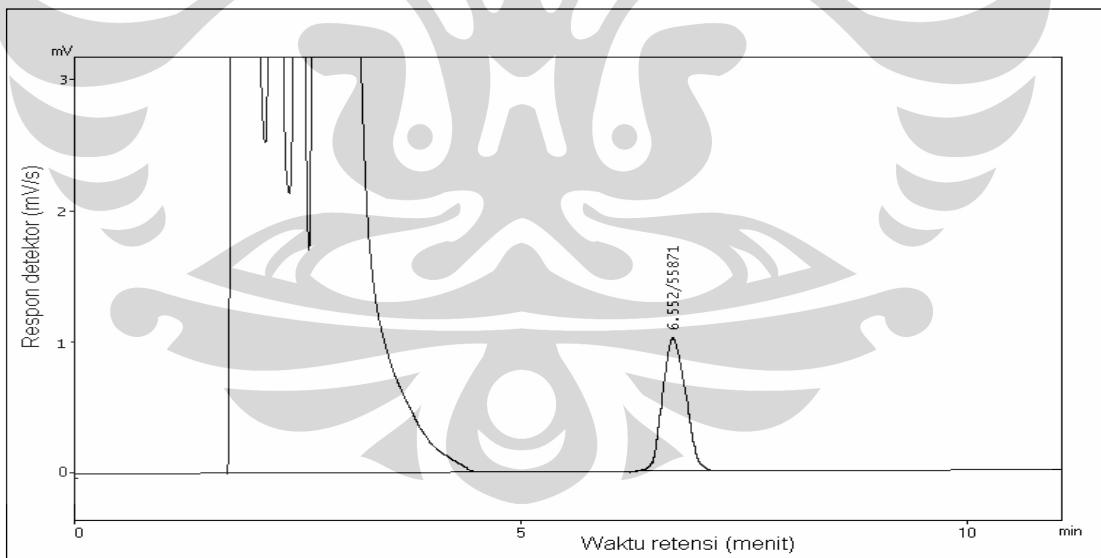
Gambar 11. Kromatogram larutan standar metformin konsentrasi 1,0  $\mu\text{g/mL}$ . Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5  $\mu\text{m}$ , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,5 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0  $\mu\text{L}$ .



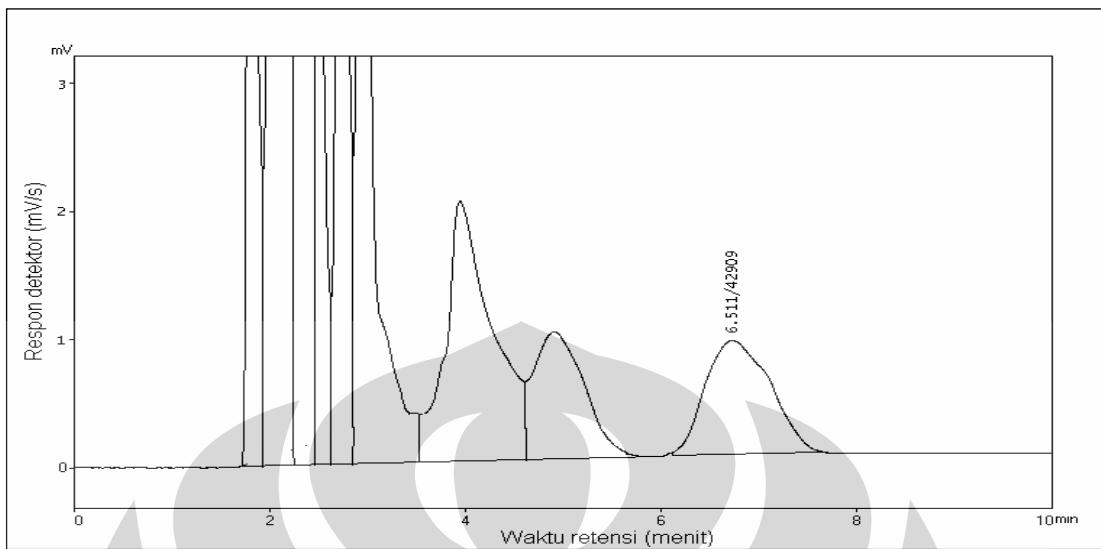
Gambar 12. Kromatogram larutan standar metformin 1,0  $\mu\text{g/mL}$  dan baku dalam salbutamol sulfat. Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5  $\mu\text{m}$ , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0  $\mu\text{L}$ .



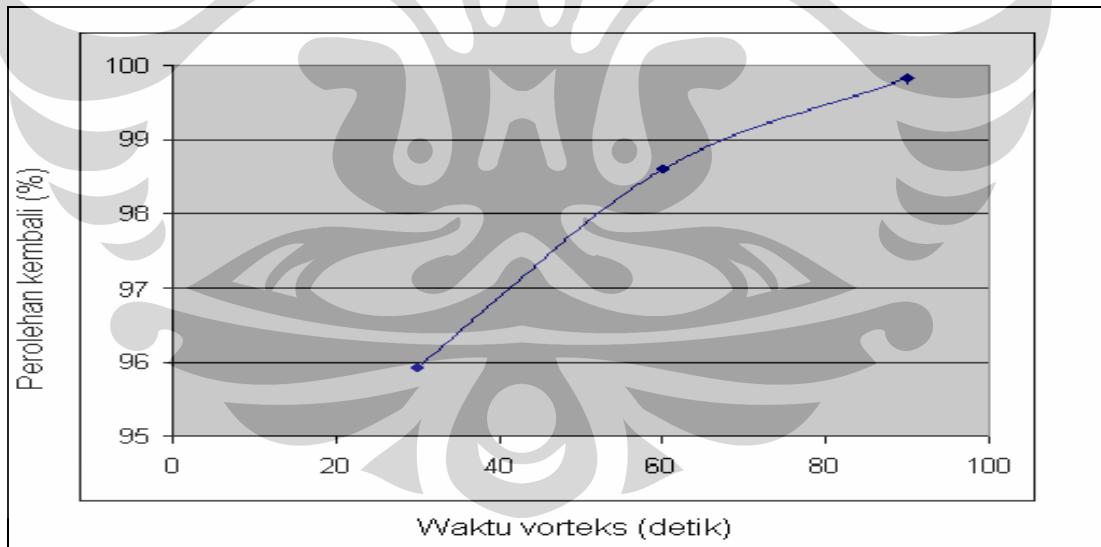
Gambar 13. Kromatogram gabungan (*multiview*) dari plasma blanko, salbutamol, fenitoin, dan metil paraben. Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0 µL.



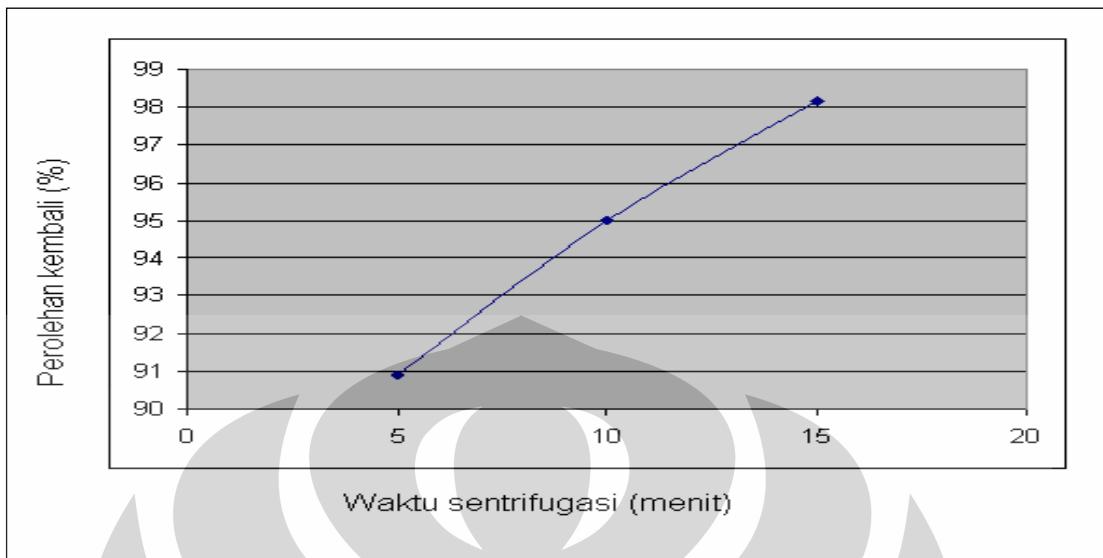
Gambar 14. Kromatogram metformin hasil ekstraksi dengan pelarut asetonitril. Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0 µL.



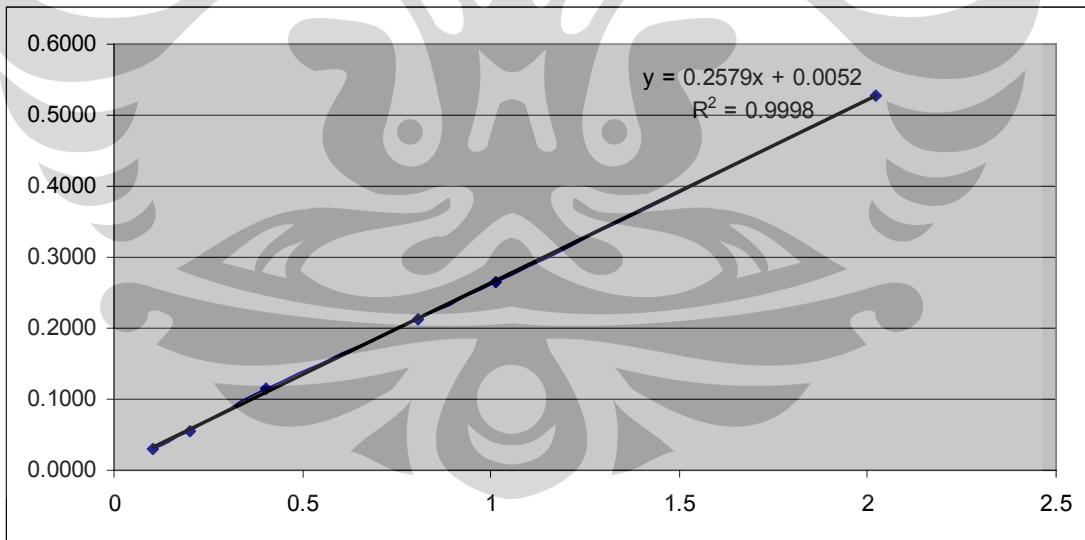
Gambar 15. Kromatogram metformin hasil ekstraksi dengan pelarut metanol. Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0 µL.



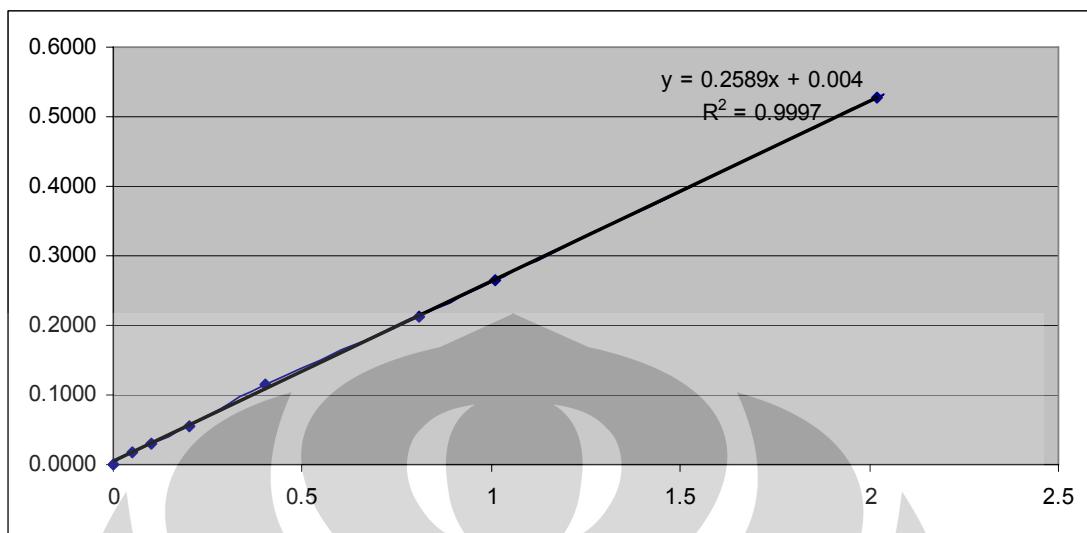
Gambar 16. Kurva hubungan waktu vorteks dengan perolehan kembali metformin dalam plasma. Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0 µL.



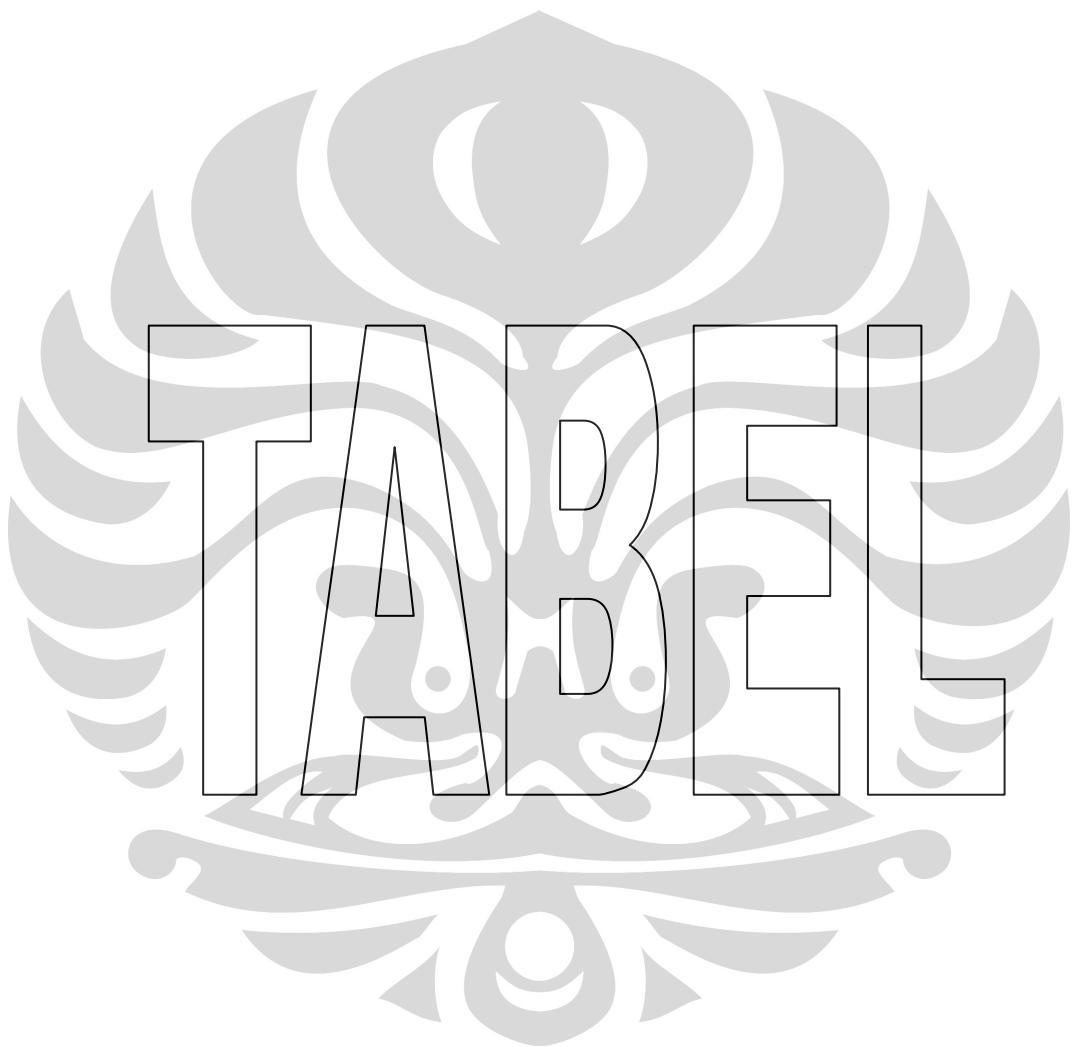
Gambar 17. Kurva hubungan waktu sentrifugasi dengan perolehan kembali metformin dalam plasma. Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0 µL.



Gambar 18. Kurva LOQ metformin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam. Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril - dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0 µL.



Gambar 19. Kurva kalibrasi metformin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam. Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5, v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0 µL.



Tabel 1

Panjang gelombang dan serapan metformin, salbutamol sulfat, metil paraben, dan fenitoin natrium

Nama zat	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Panjang gelombang (nm)	Serapan
Metformin HCl	10,0	234	0,83622
Salbutamol sulfat	10,0	225,5	0,30984
Metil paraben	10,0	256	1,13516
Fenitoin natrium	10,0	234	0,19042

Kondisi : alat spektrofotometer UV-Vis Jasco v-530 , pelarut fase gerak asetonitri l- dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1

Tabel 2  
Hubungan waktu retensi, jumlah pelat teoretis dan faktor ikutan metformin  
terhadap perubahan komposisi fase gerak

Fase gerak	Waktu retensi (menit)	Pelat teoretis	HETP	Faktor ikutan
Asetonitril - dapar KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M- natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:1,v/v) pH 5,1	6,020	10190	2,4534X10 <sup>-3</sup>	1,24
Asetonitril-dapar KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M – natrium dodesil sulfat 0,01 m (35:65:1, v/v) pH 5,1	5,025	6052	4,1309X10 <sup>-3</sup>	1,53
Asetonitril - dapar KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M- natrium dodesil sulfat 0,01 M (40:60:1,v/v) pH 5,1	4,156	5061	4,9397X10 <sup>-3</sup>	1,71

Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M - natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikan 20,0 µL.

Tabel 3

Hubungan waktu retensi, jumlah pelat teoretis dan faktor ikutan metformin terhadap perubahan kecepatan laju alir

Kecepatan (mL/menit)	Waktu retensi (menit)	Pelat teoretis	HETP	Faktor ikutan
0,5	8,380	6740	$3,7092 \times 10^{-3}$	1,27
0,8	7,274	7557	$3,3082 \times 10^{-3}$	1,41
1,0	6,020	10190	$2,4534 \times 10^{-3}$	1,24
1,2	5,299	5433	$4,6015 \times 10^{-3}$	1,68
1,5	4,216	5061	$4,9397 \times 10^{-3}$	1,71

Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M-natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0 µL.

Tabel 4

Hubungan waktu retensi dan resolusi metformin terhadap baku dalam pada kondisi terpilih

Baku pembanding	Baku dalam	Waktu retensi (menit)	Resolusi (R)
Metformin	Salbutamol sulfat	8,787	3,30
	Metil paraben	12,045	4,14
	Fenitoin natrium	19,983	7,56

Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M- natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0 µL.

Tabel 5

Hubungan waktu retensi, jumlah pelat teoretis, faktor ikutan terhadap pemilihan metode ekstraksi

Pengendap protein	Waktu retensi (menit)	Pelat teoretis	Luas puncak ( $\mu$ V/s)
Metanol	6,511	2896	42909
Asetonitril	6,552	7035	55871

Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5  $\mu$ m, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M-natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0  $\mu$ L.

Tabel 6

Hubungan waktu vorteks dengan perolehan kembali

Waktu vorteks (detik)	Luas puncak ( $\mu$ V/s) Metformin	Luas puncak ( $\mu$ V/s) Salbutamol	Perbandingan Luas Puncak	Perolehan kembali (%)
30	49480	194156	0,2548	95,93
60	51083	195104	0,2618	98,60
90	53079	200257	0,2650	99,83

Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5  $\mu$ m, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M-natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0  $\mu$ L.

Tabel 7

Hubungan waktu sentrifugasi dengan perolehan kembali

Waktu sentrifugasi (menit)	Luas puncak ( $\mu$ V/s) Metformin Salbutamol	Perbandingan Luas Puncak	Perolehan kembali (%)
5	48912      202364	0,2417	90,90
10	49738      197054	0,2524	95,00
15	51327      196932	0,2606	98,14

Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5  $\mu$ m, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M-natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0  $\mu$ L.

Tabel 8

Data Limit Deteksi dan Limit Kuantitasi metformin dalam plasma

Konsentrasi metformin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Luas puncak ( $\mu\text{V/s}$ )		PAR	PAR'	(PAR' - PAR)
	Metformin	Salbutamol			
0,1011	5546	182875	0,0303	0,0313	0,00094
0,2022	10453	188759	0,0554	0,0573	0,00177
0,4043	21058	183530	0,1147	0,1095	-0,00526
0,8086	38235	179450	0,2124	0,2137	0,00129
1,01	49673	188008	0,2642	0,2659	0,00168
2,02	97780	185217	0,5272	0,5268	-0,00067

$$S (y/x) = 3,03 \times 10^{-3}$$

Persamaan garis regresi linear untuk LOQ :

$$b = 0,2579$$

$$y = 0,0052 + 0,2579 x$$

$$\text{LOD} = 0,0352 \mu\text{g/mL}$$

$$r = 0,9999$$

$$\text{LOQ} = 0,1174 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{LLOQ} = 0,0587 \mu\text{g/mL}$$

Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5  $\mu\text{m}$ , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M-natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5, v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikan 20,0  $\mu\text{L}$ .

**Tabel 9**  
**Data Lower Limit of Quantitation (LLOQ)**

Konsentr asi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Luas puncak ( $\mu\text{V/s}$ ) Metformin Salbutamol	Perbanding -an Luas Puncak	Konsen- trasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata- rata	SD (%)	KV (%)	% diff
0,05054	3402	188313	0,0181	0,0499	0,0493	0,0018	3,57
0,05054	3272	188396	0,0174	0,0472			-6,65
0,05054	3437	184870	0,0186	0,0519			2,74
0,05054	3356	188751	0,0178	0,0488			-3,71
0,05054	3365	189575	0,0177	0,0487			-3,48

Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5  $\mu\text{m}$ , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M-natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0  $\mu\text{L}$ .

Tabel 10  
Data Kurva Kalibrasi Metformin dalam Plasma

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Luas Puncak ( $\mu\text{V/s}$ )		Perbandingan Luas Puncak
	Metformin	Salbutamol	
0	0	183350	0
0,05054	3283	183714	0,0179
0,1011	5546	182875	0,0303
0,2022	10453	188759	0,0554
0,4043	21058	183530	0,1147
0,8086	38235	179450	0,2124
1,01	49673	188008	0,2642
2,02	97780	185217	0,5272

Persamaan garis regresi linear :  $y = 0,2589 x + 0,004$

$$r = 0,9999$$

Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5  $\mu\text{m}$ , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M-natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikan 20,0  $\mu\text{L}$ .

Tabel 11

Data uji akurasi dan presisi metformin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Luas puncak ( $\mu\text{V/s}$ )		PAR	Konsen- trasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata- rata	SD (%)	KV (%)	% diff
	Metformin	Salbutamol						
0,2008/504,0	9975	182078	0,0548	0,1961	0,1975	0,0085	4,31	-2,31
	9757	188856	0,0517	0,1841				-8,32
	10420	189083	0,0551	0,1974				-1,69
	11023	193572	0,0569	0,2045				1,84
	11993	209958	0,0571	0,2052				2,18
0,9036/504,0	50366	201068	0,2505	0,9521	0,9444	0,0456	4,83	5,36
	49818	216837	0,2297	0,8719				-3,50
	51726	201219	0,2571	0,9774				8,17
	47803	194532	0,2457	0,9337				3,33
	51406	198080	0,2595	0,9869				9,22
1,61/504,0	77357	194147	0,3984	1,5235	1,58	0,0750	4,75	-5,16
	76635	187265	0,4092	1,5652				-2,56
	82829	197852	0,4186	1,6015				-0,3019
	87240	196992	0,4429	1,6951				5,52
	73217	185809	0,3940	1,5065				-6,22

Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5  $\mu\text{m}$ , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M-natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5, v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikan 20,0  $\mu\text{L}$ .

Tabel 12  
Data selektivitas

	Konsen-trasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Luas puncak ( $\mu\text{V/s}$ )		Perbandingan Luas Puncak	Konsen-trasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata	SD (%)	KV (%)	% diff
		Metformin	Salbutamol						
Plasma 1	0,05054 0,05054	3496 3517	193448 190590	0,0181 0,0184	0,0543 0,0558	0,0551	0,0010	1,89	7,54 10,46
Plasma 2	0,05054 0,05054	3322 3422	193619 192742	0,0172 0,0177	0,0508 0,0531	0,0520	0,0016	3,14	0,5548 5,12
Plasma 3	0,05054 0,05054	3697 3492	197596 196973	0,0187 0,0177	0,0568 0,0530	0,0549	0,0027	4,88	12,42 4,92
Plasma 4	0,05054 0,05054	3388 3547	195107 198071	0,0174 0,0179	0,0516 0,0537	0,0527	0,0015	2,81	2,14 6,29
Plasma 5	0,05054 0,05054	3479 3523	196760 194934	0,0177 0,0181	0,0528 0,0543	0,0536	0,0011	1,99	4,56 7,55
Plasma 6	0,05054 0,05054	3419 3567	191117 194354	0,0179 0,0183	0,0536 0,0554	0,0460	0,0134	2,92	6,15 9,69

Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5  $\mu\text{m}$ , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M-natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikan 20,0  $\mu\text{L}$ .

**Tabel 13**  
**Data uji perolehan kembali (% recovery) metformin dalam plasma in vitro**  
**dengan penambahan baku dalam**

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Luas puncak ( $\mu\text{V/s}$ )		PAR	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	% recovery	Rata-rata % recovery
	Metformin	Salbutamol				
0,2008/504,0	9975	182078	0,0548	0,1961	97,69	98,34
	9757	188856	0,0517	0,1841	91,68	
	10420	189083	0,0551	0,1974	98,31	
	11023	193572	0,0569	0,2045	101,84	
	11993	209958	0,0571	0,2052	102,18	
0,9036/504,0	50366	201068	0,2505	0,9521	105,36	104,52
	49818	216837	0,2297	0,8719	96,50	
	51726	201219	0,2571	0,9774	108,17	
	47803	194532	0,2457	0,9337	103,33	
	51406	198080	0,2595	0,9869	109,22	
1,61/504,0	77357	194147	0,3984	1,52	94,84	98,26
	76635	187265	0,4092	1,56	97,44	
	82829	197852	0,4186	1,60	99,70	
	87240	196992	0,4429	1,69	105,52	
	73217	185809	0,3940	1,51	93,78	

Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5  $\mu\text{m}$ , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M-natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0  $\mu\text{L}$ .

Tabel 14  
Data kestabilan larutan stok

	Konsen-trasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Luas Puncak ( $\mu\text{V/s}$ )		Perbandingan Luas Puncak	Konsentrasi terukur	% diff
		Metformin	Salbutamol			
Stabilitas jam ke-0	0,2012	11468	200487	0,0572	0,2055	2,13
	0,9054	48701	200669	0,2427	0,9219	1,83
	1,61	86286	196237	0,4397	1,68	4,55
Stabilitas jam ke-6	0,2012	11107	201347	0,0552	0,1976	-1,78
	0,9054	47775	201514	0,2371	0,9003	-0,5664
	1,61	85654	196707	0,4354	1,67	3,53
Stabilitas hari ke-1	0,2012	10482	195181	0,0537	0,1920	-4,58
	0,9054	46297	201736	0,2295	0,8710	-3,80
	1,61	84346	195119	0,4323	1,65	2,77
Stabilitas hari ke-7	0,2012	9776	200756	0,0487	0,1726	-14,20
	0,9054	44117	203415	0,2169	0,8222	-9,18
	1,61	82044	195680	0,4193	1,60	-0,3477

Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5  $\mu\text{m}$ , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M-natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0  $\mu\text{L}$ .

Tabel 15

Data uji stabilitas jangka panjang metformin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi metformin/salbutamol sulfat ( $\mu\text{g/mL}$ )	Hari ke-	Luas puncak ( $\mu\text{V/s}$ )		PAR	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	% diff
		Metformin	Salbutamol			
0,2012/502,0	0	10677	191283	0,0558	0,2001	-
	1	10264	195678	0,0524	0,1871	0,5238
	7	9361	199040	0,0470	0,1662	-6,98 -17,39
0,9054/502,0	0	48999	205072	0,2389	0,9074	0,2250
	1	48432	207478	0,2334	0,8862	-2,12
	7	45898	208880	0,2197	0,8333	-7,97
1,61/502,0	0	85206	200746	0,4244	1,6240	0,8930
	1	83056	200462	0,4143	1,5849	-1,54
	7	80975	202616	0,3996	1,5282	-5,06

Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5  $\mu\text{m}$ , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M-natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikan 20,0  $\mu\text{L}$ .

Tabel 16

Data uji stabilitas *freeze and thaw* metformin dalam plasma in vitro dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi metformin/salbutamol sulfat ( $\mu\text{g/mL}$ )	Siklus ke-	Luas puncak ( $\mu\text{V/s}$ )		PAR	Konsen-trasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	% diff
		Metformin	Salbutamol			
0,2012/502,0	0	10677	191283	0,0558	0,2001	-0,5238
	1	10411	192012	0,0542	0,1940	-3,59
	2	9984	199971	0,0499	0,1774	-11,83
	3	9361	205196	0,0456	0,1607	-20,10
0,9054/502,0	0	48999	205072	0,2389	0,9074	0,2250
	1	47706	205343	0,2323	0,8819	-2,59
	2	46796	206155	0,2270	0,8613	-4,87
	3	42622	205349	0,2075	0,7862	-13,16
1,61/502,0	0	85206	200746	0,4244	1,62	0,8930
	1	79440	193269	0,4110	1,57	-2,33
	2	78107	191627	0,4076	1,56	-3,15
	3	71093	184710	0,3849	1,47	-8,60

Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5  $\mu\text{m}$ , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M-natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5, v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikan 20,0  $\mu\text{L}$ .

Tabel 17

Data uji stabilitas jangka pendek metformin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi metformin/sal- butamol sulfat ( $\mu\text{g/mL}$ )	Jam ke-	Luas puncak ( $\mu\text{V/s}$ )	PAR	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	% <i>diff</i>
Metformin Salbutamol					
0,2012 / 502,0	0	10677	191283	0,0558	0,2001
	12	9888	191188	0,0517	0,1843
0,9054 / 502,0	0	48999	205072	0,2389	0,9074
	12	44846	192364	0,2331	0,8850
1,61 / 502,0	0	85206	200746	0,4244	1,62
	12	82086	199434	0,4116	1,57

Kondisi : Kolom Kromasil® C18 (5  $\mu\text{m}$ , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 0,01 M-natrium dodesil sulfat 0,01 M (30:70:0,5 , v/v/v) pH 5,1 ; kecepatan alir 1,0 mL/menit ; detektor UV-Vis (panjang gelombang 234 nm) ; volume penyuntikkan 20,0  $\mu\text{L}$ .



## Lampiran 1

### Cara Memperoleh Persamaan Garis Linier

Persamaan garis  $y = a + bx$

Untuk memperoleh nilai  $a$  dan  $b$  digunakan metode kuadrat terkecil (*least square*)

$$a = \frac{(\sum y_i)(\sum x_i^2) - (\sum x_i)(\sum x_i \cdot y_i)}{N(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

$$b = \frac{N(\sum x_i \cdot y_i) - (\sum x_i)(\sum y_i)}{N(\sum x_i^2) - (\sum x_i)(\sum x_i^2)}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi ( $r$ )

$$r = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[N(\sum x^2) - (\sum x^2) \times N(\sum y^2) - (\sum y^2)]}}$$

## Lampiran 2

### Limit Deteksi dan Kuantitasi serta Koefisien Variasi dari fungsi

Rumus :

a. Limit Deteksi

$$LOD = \frac{3 Sy / x}{b}$$

b. Limit Kuantitasi

$$LOQ = \frac{10 Sy / x}{b}$$

c. Koefisien Variasi dari fungsi ( $V_{xo}$ )

$$V_{xo} = \frac{S_{xo}}{x}$$

Keterangan:

B = arah garis linear dari kurva kalibrasi

Sy/x = simpangan baku residual

S<sub>xo</sub> = standar deviasi fungsi

**Rumus:**

$$S_{yx} = \frac{\sum (Y - Y_i)^2}{N - 2}$$

$$S_{xo} = \frac{S_{yx}}{b}$$



### Lampiran 3

#### Cara perhitungan uji akurasi (% diff)

Persamaan kurva kalibrasi :

$$y = a + bx$$

y = perbandingan luas puncak

x = konsentrasi metformin ( $\mu\text{g/mL}$ )

$$\% \text{ diff} = \frac{(b-a)}{a} \times 100 \%$$

(a)

a = konsentrasi metformin yang sebenarnya

b = konsentrasi metformin yang diperoleh (terukur)

Keterangan :

Konsentrasi metformin terukur merupakan konsentrasi yang diperoleh dari plot pada kurva kalibrasi

Perbandingan luas puncak = 0,0548

Konsentrasi metformin yang diperoleh = 0,1961  $\mu\text{g/mL}$

Konsentrasi metformin yang sebenarnya = 0,2008  $\mu\text{g/mL}$

$$\% \text{ diff} = \frac{(0,1961 - 0,2008)}{0,2008} \times 100 \% = -2,31\%$$

( 0,2008)

## Lampiran 4

### Cara perhitungan uji perolehan kembali

Persamaan kurva kalibrasi :

$$y = a + bx$$

y = luas puncak dari metformin

x = konsentrasi metformin ( $\mu\text{g/mL}$ )

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{\text{Konsentrasi metformin hasil ekstraksi}}{\text{Konsentrasi metformin standar}} \times 100 \%$$

Konsentrasi metformin hasil ekstraksi =  $0,1961 \mu\text{g/mL}$

Konsentrasi larutan metformin standar =  $0,2008 \mu\text{g/mL}$

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{0,1961}{0,2008} \times 100 \% = 97,69 \%$$

Lampiran 5

## Cara perhitungan presisi

$$\text{Simpangan baku (SD)} = \sqrt{\frac{\sum (X - X_1)^2}{N - 1}}$$

Presisi = koefisien variasi (KV atau CV)

$$= \frac{\text{SD}}{\text{X}} \times 100 \%$$

## Lampiran 6

### Sertifikat analisis metformin HCl

<b>HILDOS E</b>		
SHIVAM CHAMBERS, 106/108, 1 <sup>ST</sup> FLOOR, S.V. ROAD, GOREGAON (WEST), MUMBAI-400062 • TEL NOS.91-22-28758973/ 28765501/02 • FAX NO. 91-22-28755210		
DATE :-	01/02/2006	
ISO:9001-2000 CERTIFIED		
F/Q/02 ISSUE NO.: 01		
<u>CERTIFICATE OF ANALYSIS</u>		
ITEM	METFORMIN HCL BP 2003 (PARTICLE SIZE :- 60 MESH)	
MFG. DT.	JANUARY 2006	
EXP. DT.	DECEMBER 2010	
BATCH QTY.	1000 KGS. (TOTAL QTY. : 6000 KGS.)	
BATCH NO.	H/N103/05-06	
TEST	SPECIFICATIONS	RESULTS
DESCRIPTION	WHITE, CRYSTALLINE POWDER.	WHITE, CRYSTALLINE POWDER.
SOLUBILITY	FREELY SOLUBLE IN WATER, SLIGHTLY SOLUBLE IN ALCOHOL, PRACTICALLY INSOLUBLE IN ACETONE AND IN METHYLENE CHLORIDE	COMPLIES AS PER BP 2003
APPEARANCE OF SOLUTION	SOLUTION IS CLEAR AND COLOURLESS.	COMPLIES
IDENTIFICATION	EITHER TEST B, E OR TEST A, C, D, E MENTIONED OF BP 2003 SHALL BE POSITIVE	A - 223°C B - COMPLIES BY IR C - COMPLIES BY TLC D - BP TEST POSITIVE E - BP TEST POSITIVE
RELATED SUBSTANCES	SHALL MEET THE REQUIREMENTS SPECIFIED OF BP 2003	COMPLIES BY HPLC DCDA 36.795 PPM
HEAVY METALS	NOT MORE THAN 10 PPM	COMPLIES
LOSS ON DRYING	NOT MORE THAN 0.5%	0.088%
SULPHATED ASH	NOT MORE THAN 0.1% DETERMINED ON 1.0 GM.	0.029%
ASSAY	98.5 - 101.0%	99.476%
NOTE : THE ABOVE PRODUCT IS CONFORMING TO THE SPECIFIED LIMITS MENTIONED ABOVE.		
PREPARED BY :-	CHECKED BY :-	
Nama : M. Yanwar Paraf	QC Manager Responsible	D / 01/02/06

## Lampiran 7

### Sertifikat analisis salbutamol sulfat

C.F.M. CO FARMACEUTICA MILANESE S.P.A.		
Milano - Via L. Di Brème, 33 02 30 35 441/442/443/444 (ric aut.) 02 30 86 402 - 02 30 34 252 fax 02 38 00 10 28 Capitale Sociale Euro 1 040 256 (in vers.) <b>PRODOTTI CHIMICI PER L'INDUSTRIA FARMACEUTICA</b> <b>DIETETICA COSMETICA E TOILETRIES IMPORT-EXPORT</b> Iscritta al N. 63706 registro Società Partita IVA n Codice Fiscale 00724760163 C.C.I.A. Milano 381251 - C.C.P. 46625204		
CERTIFICATE OF ANALYSIS		
PRODUCT : SALBUTAMOL SULPHATE BP98	MFG. DATE : FEB. 2006	
BATCH NO. : SS60206124	EXP. DATE : JAN. 2011	
TEST	RESULTS	SPECIFICATION
DESCRIPTION	COMPLIES	A WHITE OR ALMOST WHITE CRYSTALLINE POWDER.
SOLUBILITY	COMPLIES	FREELY SOLUBLE IN WATER, SLIGHTLY SOLUBLE IN ETHANOL (96%), IN ETHER, VERY SLIGHTLY SOLUBLE IN DICHLOROMETHANE.
IDENTIFICATION	COMPLIES A (1%, 1CM) AT 276 NM IS 59	A) THE IR ABSORPTION SPECTRUM IS CONCORDANT WITH THE SPECTRUM OF REFERENCE STANDARD. B) UV: THE 0.008% W/W SOLUTION IN 0.1 M HCL HAS ABSORPTION MAXIMUM AT 276 NM AND A (1%, 1 CM) AT 276 NM, IS 55 TO 64 C) TLC, AS PER BP98 D) AS PER BP98 E) SULPHATES, AS PER BP98
ACIDITY OR ALKALINITY	02 ML OF 0.01M HCL IS CONSUMED	TO 10 ML OF 1% SOLUTION ADD 0.15 ML OF METHYL RED SOLUTION AND 0.2 ML OF 0.01 M SODIUM HYDROXIDE. THE SOLUTION IS YELLOW AND NOT MORE THAN 0.4 ML OF 0.01M HYDROCHLORIC ACID IS REQUIRED TO CHANGE THE COLOUR OF THE SOLUTION TO RED.
CLARITY AND COLOUR OF SOLUTION	SCOLUTION IS CLEAR AND LESS INTENSELY COLOURED THAN BY6	1% SOLUTION IN CARBON DIOXIDE FREE WATER IS CLEAR. AND NOT MORE INTENSELY COLOURED THAN REFERENCE SOLUTION BY6.
IRON	37 PPM	NOT MORE THAN 50 PPM
RELATED SUBSTANCES	SINGLE IMPURITY ABOUT 0.3%	ANY SINGLE IMPURITY NOT MORE THAN 0.5%
LOSS ON DRYING (AT 100-105°C)	0.31%	NOT MORE THAN 0.5%
SULPHATED ASH	0.06%	NOT MORE THAN 0.1%
ASSAY (DRY BASIS) (BY POTENTIOMETRIC TITRATION)	99.62%	NOT LESS THAN 98.0% AND NOT MORE THAN 101.0%
DATE : 23/02/06		C.F.M. S.P.A. TECHNICAL DIRECTOR DR. MARCO REBUZZINI
This analysis certificate is computer generated, thus no signature is required		

## Lampiran 8

### Sertifikat analisis fenitoin sodium

 Pfizer Inc 188 Howard Avenue Holland, MI 49424 Phone: 616-392-2375 Fax: 616-392-2405	<b>CERTIFICATE OF ANALYSIS</b> This material has been produced using current good manufacturing practices. <b>Product:</b> PHENYTOIN SODIUM USP <b>Lot Number:</b> 760085 PL3 <b>Specification No.</b> A11A095, Issue No. 30 <b>Effective Date:</b> 8/9/05	Page 1 of 3
<b>SPECIFICATIONS</b>		<b>RESULTS</b>
<b>DESCRIPTION</b> A white powder.		PASS
<b>CLARITY AND COLOR OF SOLUTION</b> Not more than 4.0 mL of the 0.10 N sodium hydroxide is required to produce a clear, colorless solution.		PASS
<b>IDENTIFICATION TEST A</b> IR - The infrared absorption spectrum exhibits maxima only at the same wavelengths as that of a similar preparation of Phenytoin Sodium Reference Standard.		PASS
<b>IDENTIFICATION TEST B</b> Sodium - Responds to the flame test for sodium <191>.		PASS
<b>HEAVY METALS</b> Heavy Metals NMT 20 ppm		<20 ppm
<b>CYANIDES</b> No precipitate of prussian blue is obtained.		PASS
<b>COLOR</b> WhitenessIndex(WIE313) NLT 85.0 YellownessIndex(YIE313) NMT 2.5		95.9 0.7
<b>LOSS ON DRYING</b> Loss on Drying NMT 0.5 %		<0.1 %
<b>ASSAY, PHENYTOIN SODIUM</b> Assay(Dried Basis) 98.0 to 102.0 %		100.4 %
<b>BENZOPHENONE</b> Benzophenone NMT 0.05 %		ND
<b>RELATED COMPOUNDS</b> Total Impurities NMT 0.9 %		0.1 %
<b>HPLC PURITY</b> 4-Methyl Phenyltoin NMT 0.2 % Diphenylglycine NMT 0.9 % Diphenylhydantoic Acid NMT 0.9 % Benzophenone NMT 0.05 % Total Impurities NMT 0.9 %		<0.1 % <0.1 % 0.1 % ND 0.1 %



Pfizer Inc

188 Howard Avenue  
Holland, MI 49424  
Phone: 616-392-2375  
Fax: 616-392-2405

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Page 2 of 3

This material has been produced using current good manufacturing practices.

Product: PHENYTOIN SODIUM USP

Lot Number: 760085 PL3  
Specification No. A11A095, Issue No. 30  
Effective Date: 8/9/05

**SPECIFICATIONS****RESULTS**

CLEANNESS		
Cleanliness	NMT 10 ppm	1 ppm
TITRATION FOR FREE PHENYTOIN ACID		
Titration	Report %	2.5 %
ORGANIC VOLATILE IMPURITIES		
Methylene Chloride	NMT 600 ppm	<600 ppm
Chloroform	NMT 60 ppm	<60 ppm
Trichloroethylene	NMT 80 ppm	<80 ppm
1,4-Dioxane	NMT 380 ppm	<380 ppm
ORGANIC VOLATILE IMPURITIES - PFIZER SPEC		
Methyl Alcohol	NMT 500 ppm	<500 ppm

**EXPORT SPECIFICATIONS****RESULTS**

IDENTIFICATION (EP) - IR	PASS
IR - Spectrum obtained agrees with that of similarly prepared reference material.	
IDENTIFICATION (EP) - SODIUM	PASS
Sodium - Positive test for Sodium.	
HEAVY METALS (EP)	PASS
Maximum 10 ppm	
APPEARANCE OF SOLUTION (EP)	PASS
Clear and colorless or Not more colored than BY6 (EP 2.2.2).	
CHLORIDES	PASS
Maximum 330 ppm	
SULFATES	PASS
Maximum 0.1%	
FREE PHENYTOIN (EP)	PASS
Meets EP requirements. Not more than 1.0 mL of 0.1 N sodium hydroxide is required.	
RELATED SUBSTANCES (EP) - BENZOPHENONE	PASS
Not more than 0.2%	



Pfizer Inc

188 Howard Avenue  
Holland, MI 49424  
Phone: 616-392-2375  
Fax: 616-392-2405

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

Page 3 of 3

This material has been produced using current good manufacturing practices.

Product: PHENYTOIN SODIUM USP

Lot Number: 760085 PL3  
Specification No. A11A095, Issue No. 30  
Effective Date: 8/9/05

## EXPORT SPECIFICATIONS

## RESULTS

RELATED SUBSTANCES (EP) - OTHER IMPURITIES	PASS	
Not more than 1.0% each		
<b>BULK VOLUME - EXPORT LIMIT</b>		
Tapped	65 to 110 mL	69 mL
<b>WATER (EP)</b>		
Water	NMT 3.0 %	0.1 %
<b>ASSAY (EP)</b>		
Assay(Dried Basis)	98.5 to 100.5 %	99.7 %

NMT=Not More Than NLT=Not Less Than LT=Less Than GT=Greater Than ND=None Detected

Date of Manufacture: 2/20/2006

Reevaluation Date: 2/20/2008

Storage Conditions: Store at less than 30 deg C (86 deg F). Protect from moisture.

Prepared By: S. JumahatDate: 4/11/06Reviewed By: R. D. SmiddeDate: 4/11/06

HOA0600716, HOA0600713, HOA0600716, HOA0601071, HOA0601065, HOA0601058  
4/11/2006  
Phenytoin Sodium USP C of A Report Version 1.0a

## Lampiran 9

### Sertifikat analisis metil paraben

SERTIFIKAT ANALISA		
BRATACO CHEMIKA		
Nama Bahan	Methyl Paraben Nipagin	
No Batch	Jt 500105 (050425 / B 2511)	
Ex	Ueno - Japan	
Jenis Pemeriksaan	Persyaratan	Hasil Pemeriksaan
Pemerian	Serbuk atau habut kecil, tidak berwarna, tidak berbau.	sesuai
Kelarutan	Sulur larut dalam air, benzen, mudah larut dalam etanol dan eter	sesuai
Identifikasi	Ditambah 10 mg dengan 10 ml air, dinginkan. Tambahkan 0,05 ml larutan besi(III)klorida P. Terjadi warna ungu kemerahan	positif
Kazaman	Panaskan 150 mg dalam 15 ml air pada suhu 80°C selama 1 menit, dinginkan dan saring, pada 10 ml filtrat, tambahkan 0,2 ml NaOH 0,1 N dan 2 butus merah metil LP. larutan berwarna kuning	sesuai
Sisa Pemijaran	Tidak lebih dari 0,1%	0,021%
Jarak lebar	125°C - 128°C	126,0°C
Kadar	99,4% - 100,5%	99,59%
Kesimpulan: Memenuhi Syarat		
Pemeriksa	Cikarang, 12 Oktober 2005	
<i>Harti</i>	Penanggung Jawab	
Yeyen Sri Dhamayanti	Dez. In. Riset	
Analis	Apteker SIDC 3536.B	
<b>KANTOR PUSAT</b> Jl. Cikung Barat No. 8 Jakarta Pusat 10110 Telp. (021) 3511318 (Hunting 3 Lines) Fax. (021) 3412424 E-mail: brataco@idweb.net.id		
<b>KANTOR CABANG</b> * JAKARTA 1. Jalan Besar V No. 6 Jakbar 11640 Telp. (021) 6120292 (Hunting 3 Lines) Fax. (021) 6236173 (Hunting 3 Lines) Fax. (021) 6292460 2. Jl. Mangga Besar V No. 6 Jakbar 11640 Telp. (021) 6120292 (Hunting 3 Lines) Fax. (021) 6236173 (Hunting 3 Lines) Fax. (021) 6292460		
<b>EAST JAVA</b> * SURABAYA 1. Perumnas Timur No. 476 Telp. (031) 414160, 412160 Fax. (031) 413300 2. Kedung No. 8 Telp. (031) 4271220, 421111225566 Fax. (031) 621979		
<b>SUMATERA</b> * SEMARANG 1. Jl. Klemis No. 22 B Telp. (024) 414160, 412160 Fax. (024) 413300 2. Kedung No. 8 Telp. (024) 4271220, 421111225566 Fax. (024) 621979		
<b>BANDUNG</b> 1. Kedung No. 8 Telp. (022) 7101327, 7101328 Fax. (022) 7101327		
<b>MEDAN</b> PALEMBANG, PADANG, LAMPUNG, GORONTALO, SALATIGA, UJUNG PANDANG, BANJARMASIN, MADIUN, DEPOK		
<b>KANTOR PERNIAGAAN</b> PALEMBANG, PADANG, LAMPUNG, GORONTALO, SALATIGA, UJUNG PANDANG, BANJARMASIN, MADIUN, DEPOK		