



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI METODE ANALISIS GLIBENKLAMID DALAM
PLASMA *IN VITRO* DENGAN GLIMEPIRID SEBAGAI BAKU
DALAM SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA
TINGGI**

SKRIPSI

MADE MIRA MIASARI

0806364630

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
DESEMBER 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI METODE ANALISIS GLIBENKLAMID DALAM
PLASMA *IN VITRO* DENGAN GLIMEPIRID SEBAGAI BAKU
DALAM SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA
TINGGI**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

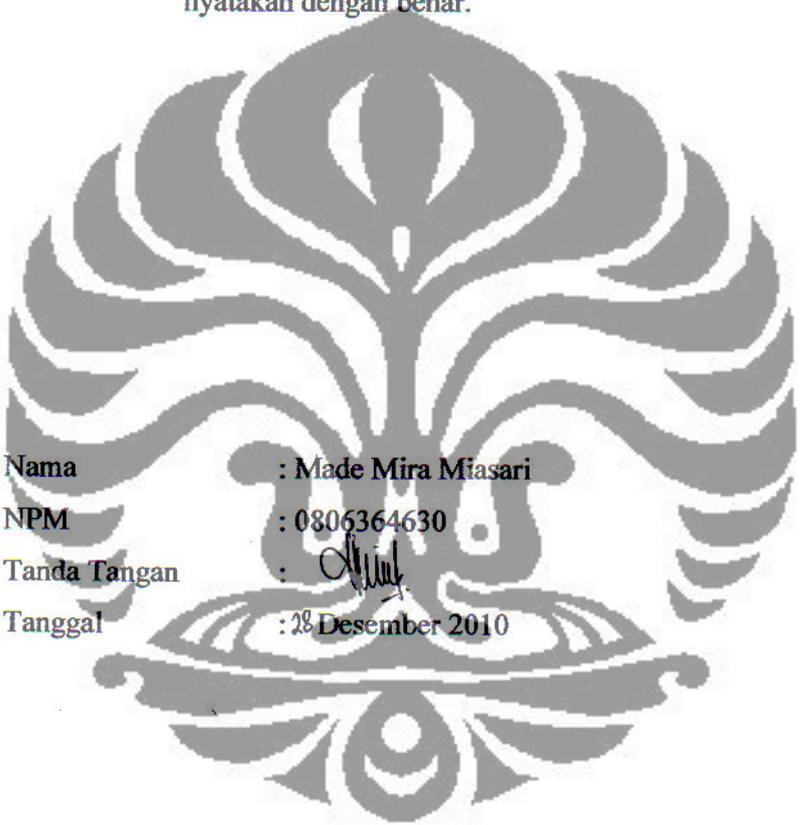
MADE MIRA MIASARI

0806364630

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
DESEMBER 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.



Nama : Made Mira Miasari
NPM : 0806364630
Tanda Tangan : 
Tanggal : 28 Desember 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Made Mira Miasari
NPM : 0806364630
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Optimasi Metode Analisis Glibenklamid Dalam
Plasma *In Vitro* Dengan Glimepirid Sebagai Baku
Dalam Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

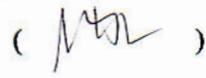
DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Yandiana Harahap, MS. ()

Pembimbing II : Dra. Maryati K, MSi. ()

Penguji I : Dra. Rosmaladewi ()

Penguji II : Dr. Maksum Radji, MS ()

Penguji III : Dr. Nelly D Leswara ()

di : Depok

Tanggal : 28 Desember 2010

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Skripsi dengan judul Optimasi Metode Analisis Glibenklamid dalam Plasma *In Vitro* Dengan Glimepirid Sebagai Baku Dalam secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi Program Studi Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Dalam kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini, antara lain:

1. Prof. Dr. Yehdiana Harahap, M.S., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI dan pembimbing I atas segala bimbingan, saran, bantuan, serta dukungan moril selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Dra. Maryati, M.Si., selaku pembimbing II atas segala bimbingan, saran, dan bantuan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
3. Dr. Silvia Surini M.Pharm.Sc. selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di program Ekstensi Farmasi UI.
4. Seluruh dosen, laboran, dan staf karyawan di Departemen Farmasi FMIPA UI, atas segala ilmu, dukungan, dan saran kepada penulis selama masa pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Rina Rahmawati, S.Farm, Apt. selaku Manajer Teknis, Krisnasari Dianpratami, S.Farm, Apt. selaku Manajer Administrasi, dan Utami Pravitasari, S.Si selaku Supervisor Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi Departemen Farmasi FMIPA UI; Pak Rustam atas saran, bantuan, arahan, bimbingan, dan perhatian yang diberikan kepada penulis selama penelitian.
6. PT. Indofarma yang telah memberikan bantuan bahan baku zat kepada

penulis.

7. Keluarga tercinta yaitu Ibu, Bapak, K'Lina, bang giri dan dhe Lia atas segala kasih sayang, do'a, semangat, dukungan moril dan materil, dan pengorbanan yang tiada terkira kepada penulis.
8. Siska, Erlinda, Anita, Engga, Neneng Devy, Ima, Amel, Yudo, Sony, Ase. Terima kasih untuk segala dukungan, bantuan, kerjasama, semangat, dan kenangan yang telah diberikan kepada penulis.
9. Teman-teman Farmasi Ekstensi angkatan 2008, rekan-rekan penelitian di Laboratorium Analisis Instrumen Departemen Farmasi FMIPA UI, dan Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi Departemen Farmasi FMIPA UI. Terima kasih untuk segala dukungan, bantuan, kerjasama, dan semangat yang telah diberikan kepada penulis.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang telah memberikan dukungannya selama penelitian dan penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari dalam penelitian dan penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Akhir kata, penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Penulis
2010

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Made Mira Miasari
NPM : 0806364630
Program Studi : Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (Non-exclusive Royalty Free Right) atas karya ilmiah saya yang berjudul :
Optimasi Metode Analisis Glibenklamid dalam Plasma *In Vitro* Dengan Glimepirid Sebagai Baku Dalam secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada Tanggal : Desember 2010
Yang menyatakan



(Made Mira Miasari)

ABSTRAK

Nama : Made Mira Miasari
Program studi : Farmasi
Judul : Optimasi Metode Analisis Glibenklamid dalam Plasma *In Vitro*
Dengan glimepiride Sebagai Baku Dalam secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Glibenklamid merupakan obat hipoglikemik oral yang digunakan dalam pengobatan diabetes tipe II. Glibenklamid adalah salah satu obat yang masuk dalam kategori obat wajib uji Bioekivalensi (BE), sehingga kadarnya di dalam darah perlu dipantau. Metode analisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan detektor *photodiode array* telah dikembangkan dan dioptimasi untuk analisis glibenklamid dalam plasma manusia *in vitro*. Glibenklamid diekstraksi dari plasma dengan metode ekstraksi pengendapan protein menggunakan metanol. Kromatografi dilaksanakan menggunakan teknik isokratik pada kolom fase-terbalik Lichrospher® 100 RP-18 (5µm, Merck), fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM pH 3,5 (55:45) pada kecepatan alir 1,0 mL/menit dan dideteksi pada panjang gelombang 229 nm. Glimepirid digunakan sebagai baku dalam. Kondisi optimum ini membutuhkan waktu analisis 7,691 menit. Pada rentang konsentrasi 50,2-502,0 ng/mL dihasilkan kurva kalibrasi yang linier dengan koefisien korelasi (r) 0,9999. Akurasi (% *diff*) dari metode ini antara -8,40% sampai 9,69% dengan presisi (KV) antara 4,04% sampai 6,35%, dan uji perolehan kembali relatif antara 91,23% sampai 109,25%.

Kata kunci: Glibenklamid, Glimepirid, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, Optimasi, Plasma *in vitro*.
xiii+57 halaman: 10 gambar; 9 tabel; 7 lampiran
Daftar acuan: 24 (796-799)

ABSTRACT

Name : Made Mira Miasari
Program study : Pharmacy
Title : Analytical Method Optimization of Glibenclamide with
Glimepiride as Internal Standard in Plasma *In Vitro* using High
Performance Liquid Chromatography

Glibenclamide is oral hypoglycemic drug which is used in treatment of type II diabetes. Glibenclamide is one of the drug in category of mandatory drug testing bioequivalence (BE), so the levels in the blood need to be monitored. The method of analysis using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with *photodiode array* detector has been developed and optimized for analysis of glibenclamide in human plasma *in vitro*. Glibenclamide was extracted from plasma by protein precipitation extraction method using methanol. Chromatography performed using the isocratic technique on reverse-phase column Lichrospher ® 100 RP-18 (5µm, Merck), mobile phase of acetonitrile-potassium dihydrogen phosphate buffer 25 mM pH 3.5 (55:45) at flow rate 1.0 mL / min and detected at a wavelength of 229 nm. Glimepiride was used as internal standard. The optimum conditions of analysis takes 7.691 minutes. In the concentration range of 50.2 to 502.0 ng / ml produced a linear calibration curve with correlation coefficient (*r*) of 0.9999. Accuracy (% diff) of this method was between -8.40% to 9.69% with precision (CV) between 4.04% to 6.35%, and test the relative recovery between 91.23% to 109.25% .

Keywords: glibenclamide, Glimepiride, High Performance Liquid Chromatography, Optimization, Plasma *in vitro*.

xi +57 pages; 10 images; 9 tables, 7 appendix

List of references: 24 (796-799)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR.....	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Glibenklamid	4
2.2 Glimepirid	6
2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	7
2.4 Analisis Obat dalam Plasma	12
2.5 Validasi Metode Analisis	14
2.6 Metode Analisis Glibenklamid	16
BAB 3 METODE PENELITIAN.....	18
3.1 Lokasi.....	18
3.2 Alat.....	18
3.3 Bahan	18
3.4 Cara Kerja	18
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	23
4.1 Pencarian Kondisi Analisis Optimum Glibenklamid	23
4.2 Validasi Parsial Metode Analisis Glibenklamid dalam Plasma <i>In Vitro</i>	26
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	29
5.1 Kesimpulan	29
5.2 Saran.....	29
DAFTAR ACUAN.....	30

DAFTAR GAMBAR

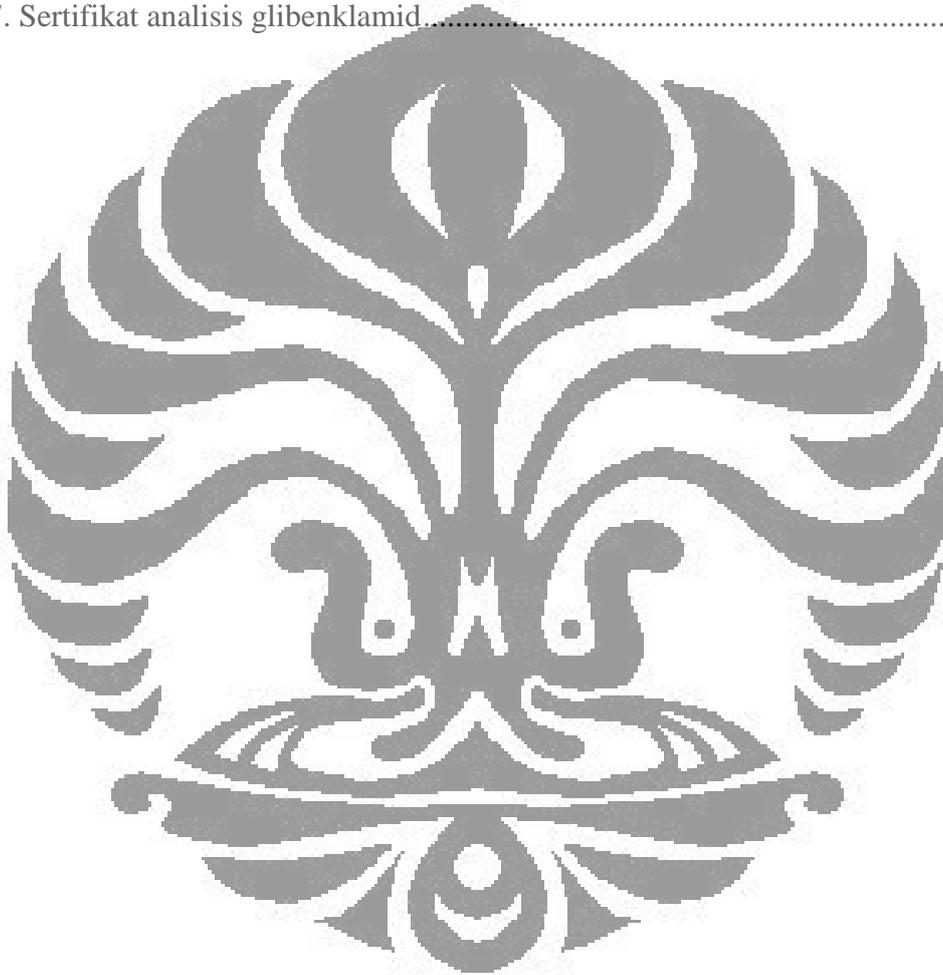
Gambar	Halaman
2.1 Rumus struktur glibenklamid	4
2.2 Rumus struktur glimepirid	6
3.1 Peralatan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	33
4.1 Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung glibenklamid konsentrasi 50,0 µg/mL dan baku dalam glimepirid konsentrasi 10 µg/mL	34
4.2 Kromatogram campuran larutan standar glibenklamid dan glimepirid (baku dalam) dengan konsentrasi masing-masing 10 µg/mL	35
4.3 Kromatogram campuran larutan standar glibenklamid dan glimepirid (baku dalam) dengan konsentrasi masing-masing 10 µg/mL	36
4.4 Kromatogram campuran larutan standar glibenklamid dan glimepirid (baku dalam) dengan konsentrasi masing-masing 10 µg/mL	37
4.5 Kromatogram ekstrak plasma tanpa penambahan glibenklamid dan baku dalam glimepirid (plasma blanko)	38
4.6 Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung glibenklamid konsentrasi 500,0 µg/mL dan baku dalam glimepirid konsentrasi 10 µg/mL	39
4.7 Kurva kalibrasi glibenklamid dalam plasma dengan penambahan baku dalam	40

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram baku dalam (glipizid, glikazid, glimepirid)	41
4.2 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram glibenklamid terhadap perubahan komposisi fase gerak.....	42
4.3 Data uji kesesuaian sistem.....	43
4.4 Data kurva kalibrasi glibenklamid dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam.....	44
4.5 Data pengukuran <i>lower limit of quantitation</i> (LLOQ) glibenklamid dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam.....	45
4.6 Data uji akurasi dan presisi glibenklamid dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam, Hari ke-1 (<i>intra-day</i>).....	46
4.7 Data uji perolehan kembali (% <i>recovery</i>) glibenklamid dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam.....	47
4.8 Data optimasi waktu pengocokan dengan vorteks untuk ekstraksi glibenklamid dalam plasma.....	49
4.9 Data hasil optimasi metode analisis.....	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Cara perhitungan Nilai N, HETP, dan Tf.....	51
2. Cara memperoleh regresi linear	52
3. Cara perhitungan koefisien variasi dari fungsi.....	53
4. Cara perhitungan presisi.....	54
5. Cara perhitungan akurasi.....	55
6. Cara perhitungan uji perolehan kembali	56
7. Sertifikat analisis glibenklamid.....	57



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Glibenklamid atau glyburide atau (1-{4-[2-(5-kloro-2-metoksi-benzamida)etil]benzenosulfonil}-3-siklohesilurea) adalah golongan arilsulfonilurea tersubstitusi pada posisi para dari cincin benzena (Dale, et al., 2001; Davis & Granner., 1996). Glibenklamid adalah derivat sulfonilurea tersubstitusi generasi kedua antidiabetik oral dan merupakan hipoglikemik oral yang digunakan untuk pengobatan diabetes tipe II (*non-insulin dependent diabetes mellitus*) (Katzung, MD., 2002).

Mekanisme kerja glibenklamid adalah dengan bekerja secara aktif menurunkan kadar gula darah. Glibenklamid bekerja dengan merangsang sekresi insulin dari sel-sel β -Langerhans, oleh karena itu glibenklamid hanya bermanfaat pada penderita diabetes dewasa yang pankreasnya masih mampu memproduksi insulin (Anonim, 1995).

Dosis yang disarankan untuk glibenklamid adalah 2,5 mg dan 5 mg. Obat ini memiliki durasi aksi yang panjang (*long acting*) dan cukup dengan dosis 5-15 mg/hari. Glibenklamid juga mempunyai efek hipoglikemik yang cukup kuat (Anonim, 1995). Pada penggunaan per oral glibenklamid diabsorpsi sebagian secara cepat dan tersebar ke seluruh cairan ekstrasel, dan sebagian besar terikat pada protein plasma sekitar 99% (Ernst, 1991).

Berdasarkan *Food and Drug Administration* (FDA), glibenklamid merupakan obat yang wajib untuk uji bioekivalensi (FDA, 2007). Di Indonesia glibenklamid juga termasuk obat yang wajib untuk uji bioekivalensi karena termasuk dalam *critical use*. Untuk uji bioekivalensi diperlukan suatu metode analisis yang sensitif dan akurat. Sehingga dapat diperoleh tingkat sensitivitas dan selektivitas yang tinggi, nilai akurasi dan presisi yang tinggi, serta sedikit kemungkinan adanya gangguan. Metode

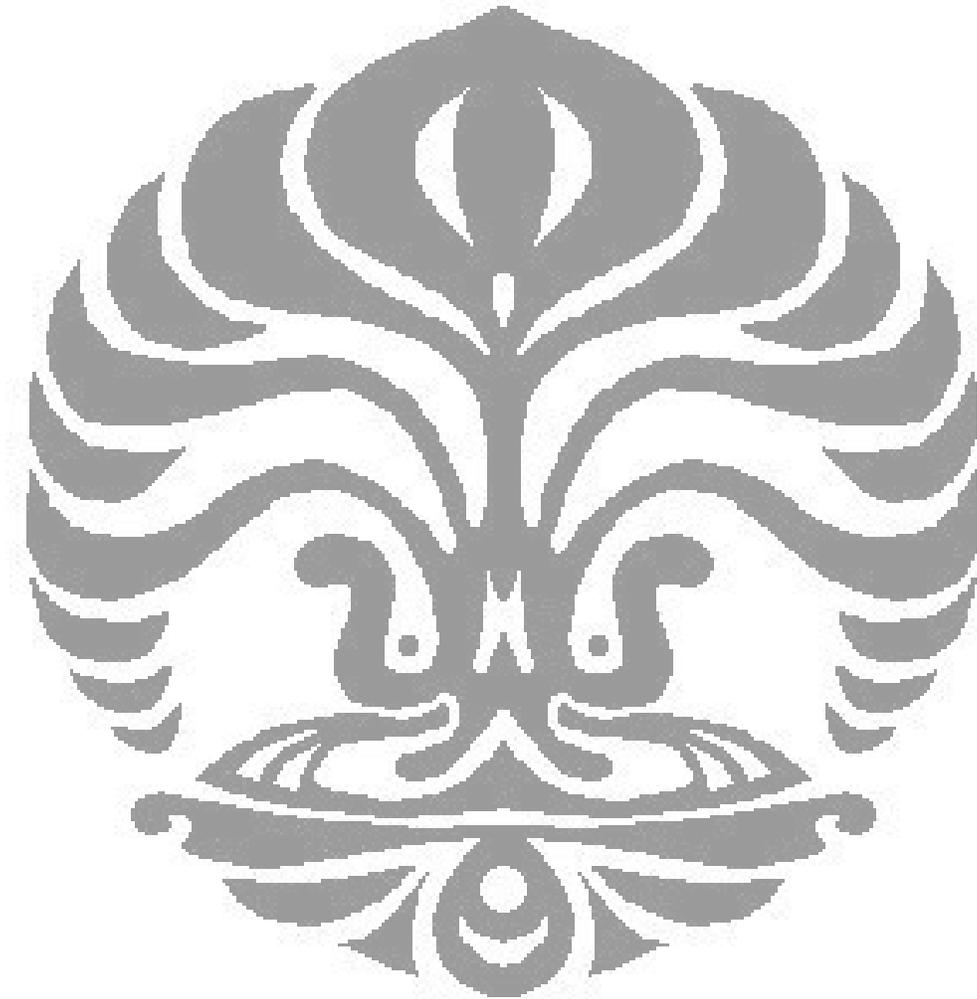
analisis yang selektif dan sensitif untuk penilaian secara kuantitatif suatu obat dan metabolitnya penting agar berhasil menuntun uji preklinik dan/atau biofarmasetik dan uji farmakologi klinik. Pengukuran analit atau metabolit dalam matriks biologis harus divalidasi. Validasi metode bioanalisis mencakup semua prosedur yang menunjukkan bahwa metode khusus yang digunakan untuk pengukuran kuantitatif analit yang berasal dalam matriks biologis, seperti darah, plasma, serum, atau urin, dapat dipercaya dan dapat dilakukan ulang (*reproducible*) untuk penggunaan yang diinginkan (Guidance, 2001).

Saat ini, analisis glibenklamid menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) telah banyak dikembangkan, yaitu metode KCKT digabungkan dengan deteksi UV, deteksi fluoresensi, LC-ESI-MS, LC-APCI-MS, LC-ESI-MS-MS atau LC-APCI-MS-MS. Dengan metode KCKT saja tidak cukup spesifik dan sensitif, tetapi dengan metode *liquid chromatography – mass spectrometry* (LC-MS) memungkinkan waktu analisis kromatografi yang lebih cepat dan membutuhkan alat yang khusus dan biaya yang relatif mahal (Wang, J, G, et al., 2007).

Metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) saat ini paling banyak dilakukan untuk analisis glibenklamid. Pada penelitian ini, dilakukan pengembangan metode analisis glibenklamid dalam plasma manusia secara *in vitro* dengan metode KCKT menggunakan internal standar yaitu glimepirid. Metode yang digunakan adalah dengan teknik ekstraksi yang lebih sederhana, yaitu teknik pengendapan protein, sehingga diperoleh suatu metode yang lebih sederhana dan sensitif, karena kehilangan obat dapat diminimalisasi.

1.2 Tujuan Penelitian

1. Memperoleh kondisi optimum untuk analisis glibenklamid dan glimepirid sebagai baku dalam dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi.
2. Menentukan baku dalam yang sesuai untuk analisis glibenklamid dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi.



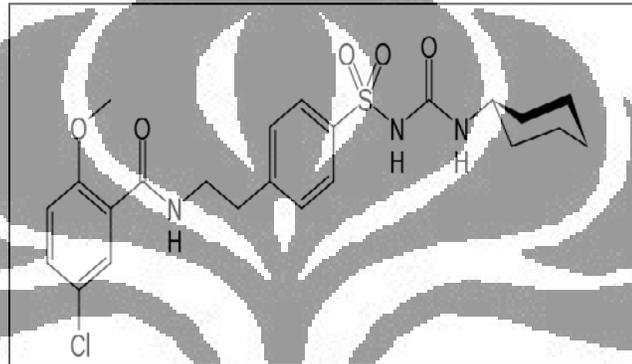
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Glibenklamid

2.1.1 Monografi (United States Pharmacopoeia 26th edition, 2007; Pharmacope Indonesian, 4th edition, 1995; Martindale 35th edition, 2007; Glibenklamid, n.d.)

Struktur Kimia



[Sumber: *Pharmacope Indonesian*, 1995]

Gambar 2.1 Rumus struktur glibenklamid

- Rumus Molekul : $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$
- Nama Kimia : (1-{4-[2-(5-kloro-2-metoksi-benzamida)etil]benzenosulfonil} 3-sikloheksilurea)
- Bobot Molekul : 494,0
- Nomor CAS : 10238-21-8
- Sinonim : Gliburid atau glibenklamid
- Pemerian : Serbuk hablur, putih atau hampir putih, tidak berbau atau hampir tidak berbau.
- Kelarutan : Praktis tidak larut dalam air dan eter, larut dalam etanol 96% (1:330), dalam kloroform (1:36), dan dalam methanol (1:250).
- Titik Leleh : 172 - 174°C
- Nama Paten : Daonil® dan Semi-Daonil® (Sanofi Aventis), Glidanil® (Mersifarma TM), Glimel® (Merck), Gluconic® (Nicholas),

Glulo® (Eisai), Glyamid® (Alpharma), Latibet® (Ifars), Libronil® (Hexpharm), Prodiabet® (Bernofarm), Prodiamel® (Corsa), Renabetic® (Fahrenheit), Tiabet® (Tunggal Idaman Abdi), Troder® (Tropica Mas Pharma).

2.1.2 Aktivitas Farmakologi (Anonim, 1995)

Glibenklamid adalah hipoglikemik oral derivat sulfonilurea yang bekerja aktif menurunkan kadar gula darah. Glibenklamid bekerja dengan merangsang sekresi insulin dari sel-sel β -Langerhans. Oleh karena itu, glibenklamid hanya bermanfaat pada penderita diabetes dewasa yang pankreasnya masih mampu memproduksi insulin.

2.1.3 Farmakokinetika (Gerald, Mc Evoy, 1995)

Mula kerja (onset) glibenklamid: kadar insulin serum mulai meningkat 15-60 menit setelah pemberian dosis tunggal. Kadar puncak dalam darah tercapai setelah 2-4 jam. Setelah itu kadar mulai menurun, 24 jam setelah pemberian kadar dalam plasma hanya tinggal sekitar 5%. Masa kerja sekitar 15 - 24 jam.

Absorpsi (Ernst, 1991)

Glibenklamid diabsorpsi dengan cepat dan baik. Setelah diabsorpsi, obat ini tersebar ke seluruh cairan ekstra sel. Dalam plasma sebagian besar terikat pada protein plasma terutama albumin (70-99%).

Eliminasi (Anonim, 1995)

Waktu paruh eliminasi sekitar 15-16 jam, dapat bertambah panjang apabila terdapat kerusakan hati atau ginjal. Semua metabolit tidak ada yang diakumulasi. Hanya 25-50 % metabolit diekskresi melalui ginjal, sebagian besar diekskresi melalui empedu dan dikeluarkan bersama tinja. Glibenklamid efektif dengan pemberian dosis tunggal. Bila pemberian dihentikan, obat akan bersih keluar dari serum setelah 36 jam. Glibenklamid tidak diakumulasi di dalam tubuh, walaupun dalam pemberian berulang.

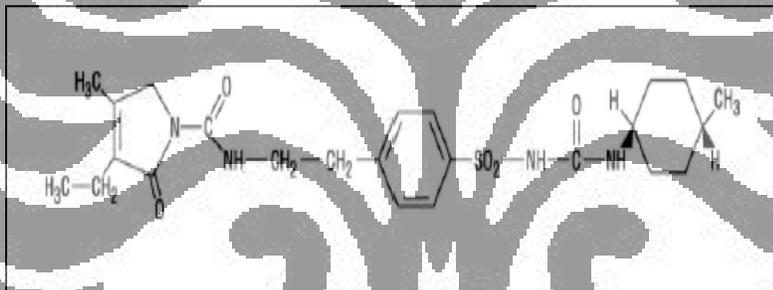
Metabolisme (Gerald, Mc Evoy, 1995)

Metabolisme glibenklamid sebagian besar berlangsung dengan jalan hidroksilasi gugus sikloheksil pada glibenklamid, menghasilkan satu metabolit dengan aktivitas sedang dan beberapa metabolit inaktif. Metabolit utama (M1) merupakan hasil hidroksilasi pada posisi 4-trans, metabolit kedua (M2) merupakan hasil hidroksilasi 3-cis, sedangkan metabolit lainnya belum teridentifikasi.

2.2 Glimepirid

2.2.1 Monografi ((*United States Pharmacopoeia 26th edition, 2007*;
Pharmacope Indonesian, 4th edition, 1995; *Martindale 35th edition, 2007*;
Glimepirid, n.d.)

Struktur Kimia



[Sumber: *Pharmacope Indonesian, 1995*]

Gambar 2.2 Rumus struktur glimepirid

Rumus Molekul : $C_{24}H_{34}N_4O_5S$

Nama Kimia : 1-[[p-[2-(3-ethyl-4-methyl-2-oxo-3-pyrrolidine-1-carboxamido)ethyl]phenyl]sulfonyl]-3-(trans-4-methylcyclohexyl)urea

Bobot Molekul : 490,62

Nomor CAS : 93479-97-1.

Pemerian : serbuk kristal putih atau putih kekuningan, tak berbau

Kelarutan : praktis tidak larut dalam air dan methanol, sedikit larut dalam etanol dan metilen klorida

2.2.2 Aktivitas Farmakodinamik (Anonim, 1995)

Mekanisme kerja utama glimepirid adalah merangsang sekresi insulin dari sel-sel beta-Langerhans kelenjar pancreas yang masih berfungsi. Oleh sebab itu masih adanya sel-sel-Langerhans yang masih berfungsi merupakan persyaratan terapi dengan glimepirid. Glimepirid juga meningkatkan sensitivitas sel-sel beta-Langerhans terhadap stimulus glukosa fisiologis, menyebabkan sekresi insulin seirama dengan waktu makan.

2.2.3 Sifat Farmakokinetika

Absorpsi (Anonim, 1995; Gerald, Mc Evoy, 1995)

Absorpsi glimepirid melalui usus sangat baik sehingga dapat diberikan per oral. Hampir seluruh glimepirid diserap ke dalam darah setelah pemberian per oral. Konsentrasi serum puncak (C_{max}) tercapai dalam waktu 2,5 jam. Terdapat hubungan langsung antara dosis dan C_{max} . Makanan umumnya tidak mempengaruhi absorpsi glimepirid.

Setelah absorpsi, obat ini tersebar ke seluruh cairan ekstra sel. Volume distribusi setelah pemberian intra vena pada subyek normal lebih kurang 8,8 liter (113 ml/kg). Hampir seluruh glimepirid yang dikonsumsi terikat pada protein plasma (> 99%). Glimepirid tidak diakumulasi di dalam tubuh.

Eliminasi (Gerald, Mc Evoy, 1995)

Waktu paruh eliminasi terminal dari M1 adalah 3 – 6 jam setelah pemberian per oral, sedangkan waktu paruh eliminasi terminal M2 sekitar 5 – 6 jam. Setelah pemberian per oral, 58% glimepirid atau metabolitnya diekskresikan melalui urin dan 35% melalui feses.

2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

2.3.1 Teori Dasar

Kromatografi adalah istilah umum untuk berbagai cara pemisahan berdasarkan partisi cuplikan antara dua fase, yakni fase gerak, dapat berupa gas atau zat cair, dan fase diam, dapat berupa zat cair atau zat padat (Johnson & Stevenson, 1991).

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan suatu teknik pemisahan sampel dalam fase diam berupa zat padat dan fase gerak berupa zat cair dimana pompa KCKT dilengkapi dengan suatu tekanan tinggi untuk menghantarkan eluen pada kecepatan optimal (Poole & Poole, 1991).

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) atau KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) merupakan teknik analisis yang paling cepat berkembang dalam kimia analitik (Harmita, 2006). Keuntungan dari KCKT yaitu waktu analisis cepat (waktu yang diperlukan biasanya kurang dari satu jam, seringkali hanya 15 menit hingga 30 menit), daya pisahnya baik, peka (kepekaannya sangat tergantung pada jenis detektor dan eluen yang digunakan), pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi, kolom dapat dipakai kembali, dapat digunakan untuk molekul besar dan kecil, mudah untuk memperoleh kembali cuplikan (tidak seperti kebanyakan detektor dalam kromatografi gas, detektor KCKT tidak merusak komponen zat yang dianalisis, sehingga zat yang telah dielusi dapat dikumpulkan dengan mudah setelah melewati detektor), dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah (hal ini sangat bergantung kepada detektor yang digunakan, namun detektor KCKT dapat mendeteksi zat sampai kadar ppt (*part per trillion*) (Harmita, 2006).

2.3.2 Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Alat KCKT terdiri dari beberapa bagian, yaitu pompa, injektor, kolom, detektor, dan integrator.

1. Pompa

Pompa berfungsi untuk mengalirkan eluen dari wadah ke dalam kolom pada laju alir yang terkontrol (Harmita, 2006).

2. Injektor

Injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan ke dalam kolom.

3. Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen yang terdapat dalam sampel yang tersedia. Kolom yang ada telah tersedia dalam berbagai macam

ukuran. Kolom merupakan bagian penting dalam KCKT, karena ikut menentukan keberhasilan analisis (Harmita,2006).

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam memilih kolom antara lain (Harmita,2006) :

a) Panjang kolom

Panjang kolom biasanya berkisar antara 5-100 cm. Bertambahnya panjang kolom akan mengakibatkan waktu retensi bertambah, dan pemisahan yang semakin baik.

b) Diameter kolom

Dapat dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kolom analitik (diameter dalam 2-6 mm) dan kolom preparatif (diameter dalam 6 mm atau lebih).

c) Pengisi kolom

Kolom yang berisi partikel bulat cenderung sedikit lebih mantap terhadap guncangan mekanis dan tekanan pelarut yang tinggi. Ukuran bahan pengisi sangat berpengaruh pada resolusi kolom. Ukuran dan bentuk partikel akan mempengaruhi kepadatan kolom dan hal ini akan mempengaruhi aliran fase gerak secara langsung dan pemisahan atau efisiensi kolom secara tidak langsung.

d) Fase gerak

Harus selektif terhadap komponen yang dikehendaki dan tidak kental agar dapat memperkecil penurunan tekanan.

e) Tekanan kolom

Tekanan kolom timbul akibat hambatan terhadap eluen. Partikel yang berdiameter lebih kecil, dan menggunakan eluen dengan viskositas rendah dapat menurunkan tekanan kolom.

Kemampuan kolom untuk memisahkan senyawa yang dianalisis merupakan ukuran kinerja kolom. Dasar yang banyak digunakan untuk pengukuran kinerja kolom adalah resolusi (R) dan efisiensi kolom. Resolusi didefinisikan sebagai jarak antara dua puncak dibagi rata-rata lebar (W) dua puncak yang diukur pada alas puncak. Bila nilai resolusi lebih besar dari 1,5 maka pemisahan yang dihasilkan baik

atau lebih dari 99,7%. Sedangkan bila nilai resolusi kurang dari 1,5 maka pemisahan yang dihasilkan tidak baik (Harmita,2006).

Efisiensi menunjukkan kemampuan kolom untuk menghasilkan puncak sempit dan perbaikan pemisahan. Efisiensi kolom dapat dihitung sebagai jumlah pelat teoritis atau *Height Equivalent to Theoretical Plate* (HETP). HETP adalah panjang kolom yang diperlukan untuk tercapainya keseimbangan komponen sampel antara eluen dengan kolom (Harmita,2006).

Pemisahan berbagai komponen sampel oleh kolom tergantung kepada daya pisah kolom terhadap komponen tersebut. Daya pisah ini sangat dipengaruhi oleh faktor kapasitas tiap komponen sampel. Faktor kapasitas (K') didefinisikan sebagai waktu tambahan yang diperlukan oleh zat terlarut untuk terelusi dibandingkan dengan zat yang tidak tertahan ($k' = 0$), dibagi dengan waktu elusi dari zat yang tidak tertahan tersebut. Faktor kapasitas merupakan ukuran kekuatan kolom untuk menahan molekul sampel pada suatu kondisi isokratik (Harmita,2006).

4. Detektor

Detektor berfungsi untuk mendeteksi atau mengidentifikasi komponen-komponen sampel di dalam fase gerak dan mengukur jumlahnya (Johnson & Stevenson, 1991).

5. Integrator

Integrator berfungsi untuk menghitung luas puncak.

2.3.3 Fase Gerak

Fase gerak pada KCKT merupakan salah satu pengubah yang mempengaruhi pemisahan. Variasi fase gerak pada KCKT sangat beragam dalam hal kepolaran dan selektivitasnya terhadap komponen dalam sampel (Harmita,2006).

Secara umum fase gerak yang baik harus mempunyai sifat sebagai berikut (Johnson & Stevenson, 1991) :

1. Murni
2. Tidak bereaksi dengan kolom
3. Sesuai dengan detektor

4. Dapat melarutkan cuplikan
5. Selektif terhadap komponen
6. Viskositasnya rendah
7. Memungkinkan dengan mudah untuk memperoleh cuplikan kembali jika diperlukan
8. Harganya wajar
9. Dapat memisahkan zat dengan baik

2.3.4 Analisis Kuantitatif dengan KCKT

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya. Ada beberapa metode yang dapat digunakan, yaitu (Harmita,2006):

1. Penggunaan baku luar

Larutan baku dengan berbagai konsentrasi disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Buat kurva kalibrasi antara luas puncak terhadap konsentrasi. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot luas puncak sampel pada kurva kalibrasi baku atau dengan perbandingan langsung. Kekurangan metode ini adalah diperlukan baku yang murni serta ketelitian dalam pengenceran dan penimbangan(Harmita,2006).

2. Penggunaan baku dalam

Sejumlah baku dalam ditambahkan pada sampel dan standar. Kemudian larutan campuran komponen standar dan baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikkan dan hitung perbandingan luas puncak kedua zat tersebut. Buat kurva baku antara perbandingan luas puncak terhadap konsentrasi komponen standar. Kadar sampel diperoleh dengan memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar. Keuntungan menggunakan cara ini adalah kesalahan volume injeksi dieliminir. Kesulitan cara ini adalah diperlukan baku dalam yang tepat (Harmita,2006).

Ada beberapa persyaratan yang harus dipenuhi oleh senyawa baku dalam, yaitu (Johnson & Stevenson, 1991) :

- a. harus terpisah sama sekali dari puncak cuplikan

- b. harus terelusi dekat dengan puncak yang diukur
- c. konsentrasi dan tanggapan detektornya harus sama dengan konsentrasi dan tanggapan detektor puncak yang diukur.
- d. tidak boleh bereaksi dengan komponen cuplikan
- e. tidak terdapat dalam cuplikan asal
- f. harus sangat murni dan mudah diperoleh

2.4 Analisis Obat dalam Plasma

Plasma darah merupakan komponen terbesar dalam darah, karena lebih dari separuh jumlah darah mengandung plasma darah. Plasma darah merupakan bagian cair dari darah yang berwarna kuning muda, mengandung protein, sel darah dan platelet yang tersuspensi di dalamnya (Sherwood, 2001).

Konsentrasi obat dalam plasma umumnya rendah pada dosis terapi. Oleh karena itu diperlukan persiapan sampel khusus untuk analisis obat dalam plasma. Dalam plasma, obat terikat pada permukaan protein sehingga obat harus dibebaskan terlebih dahulu. Beberapa cara yang bisa dilakukan untuk mencapai tujuan di atas diantaranya ialah dengan :

1. Pengendapan protein

Pada pengendapan protein, biasanya digunakan asam atau pelarut organik yang dapat bercampur dengan air untuk memisahkan protein dari plasma. Pelarut organik seperti metanol, asetonitril, aseton dan etanol, meskipun memiliki efisiensi yang relatif rendah dalam memisahkan protein, tetapi pelarut ini telah digunakan secara luas dalam bioanalisis karena kompatibilitasnya dengan fase gerak KCKT.

Setelah dicampur (biasanya menggunakan bantuan vorteks), sampel disentrifugasi untuk menghasilkan supernatan yang jernih, berisi komponen yang diinginkan. Larutan yang telah bebas protein mungkin perlu diekstraksi lebih lanjut dengan teknik ekstraksi cair-cair dengan pelarut organik yang tidak bercampur, atau dapat langsung disuntikkan pada sistem analisis yang akan digunakan, bila diyakini obat sepenuhnya larut dalam supernatan (Evans, 2004).

2. Ekstraksi Cair-cair

Ekstraksi cair-cair adalah proses pemindahan suatu komponen dari satu fase cair ke fase cair lainnya yang tidak saling bercampur sesamanya. Prosesnya disebut partisi atau distribusi. Jika suatu zat yang terlarut terdistribusi antara dua cairan atau pelarut yang tidak saling bercampur, maka dalam sistem akan terjadi keseimbangan.

Umumnya, salah satu fasenya berupa air atau larutan air. Cara paling umum yang sering digunakan untuk pemisahan parsial adalah metode ekstraksi dengan pelarut organik. Agar obat dapat terekstraksi dalam pelarut organik, maka obat itu harus dalam bentuk tidak terionisasi. Oleh karena itu, pH fase air harus dioptimasi agar diperoleh bentuk tidak terionisasi dengan sempurna. Optimasi dapat dilakukan dengan menghitung atau menentukan pKa obat.

Setelah dipisahkan dari fase air, fase organik harus benar-benar bebas air. Untuk mempercepat penguapan, dapat ditambahkan beberapa tetes etanol, dan air dapat dihilangkan dari fase organik dengan penambahan sedikit natrium sulfat anhidrat pada saat penyaringan. Penguapan dapat dilakukan dengan alat evaporator vakum atau diuapkan pada temperatur kamar (Chamberlain, 1985).

3. Ekstraksi Fase Padat

Ekstraksi fase padat adalah suatu teknik yang dapat mengatasi beberapa masalah yang ditemui pada ekstraksi cair-cair. Pada ekstraksi fase padat, analit ditahan oleh fase padat saat sampel dilewatkan, kemudian dilanjutkan dengan elusi analit oleh pelarut yang sesuai. Pada teknik ini digunakan kolom berukuran kecil dengan adsorben yang mirip dengan yang digunakan pada saat analisis. Metode ekstraksi fase padat ini berdasarkan prinsip dari kromatografi, yaitu adsorpsi obat dari larutan ke dalam adsorben atau fase diam (Evans, 2004).

Pemilihan cara isolasi obat dalam plasma harus dilakukan karena akan memberikan nilai perolehan kembali (*recovery*) yang maksimum dari obat yang dianalisis. Selain itu, untuk memperbaiki ketelitian, maka penggunaan baku dalam dapat ditambahkan pada sampel.

2.5 Validasi Parsial Metode Analisis

Parameter yang paling pokok untuk validasi metode bioanalitik meliputi akurasi, presisi, selektivitas, sensitivitas, reproduibilitas, dan stabilitas. Pengembangan metode dan pengukuhan suatu metode bioanalitik mencakup penentuan selektivitas, akurasi, presisi, perolehan kembali, kurva kalibrasi, dan stabilitas analit dalam sampel.

1. Akurasi

Akurasi suatu metode analisis yang menggambarkan kedekatan hasil pengujian dengan kadar sebenarnya. Akurasi dilakukan pada sampel yang mengandung jumlah analit yang diketahui. Akurasi dilakukan minimal 5 replikat untuk tiap kadar yaitu pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Pengukurannya dapat dilakukan *intra assay* (dalam satu kali analisis) dan *inter assay* (dilakukan analisis selama 5 hari). Pengukuran akurasi memenuhi syarat jika nilai % diff tidak menyimpang $\pm 15\%$, kecuali jika pengukuran dilakukan pada kadar LLOQ maka tidak boleh menyimpang $\pm 20\%$. Penyimpangan (deviasi) rata-rata dari nilai sebenarnya merupakan penilaian terhadap akurasi.

2. Presisi

Presisi merupakan suatu metode analisis yang menggambarkan kedekatan antara hasil pengujian yang satu dengan hasil pengujian lainnya. Pada pengukuran presisi dilakukan minimal 5 replikat untuk tiap kadar yaitu pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Pengukurannya dapat dilakukan *intra assay* (dalam satu kali analisis) dan *inter assay* (dilakukan analisis selama 5 hari). Penentuan presisi pada tiap konsentrasi memenuhi syarat jika koefisien variasi (KV) tidak menyimpang $\pm 15\%$, kecuali jika pengukuran dilakukan pada kadar LLOQ maka tidak boleh menyimpang $\pm 20\%$. Pengukuran presisi dapat disubdivisikan menjadi pengukuran presisi atau keterulangan dan intrabatch, yang mengukur presisi terhadap waktu, dan dapat melibatkan analisis, peralatan, reagen, dan laboratorium yang berbeda.

3. Uji perolehan kembali (% recovery)

Perolehan kembali suatu analit adalah perbandingan antara respon detektor yang diperoleh dari sejumlah analit yang ditambahkan dan diekstraksi dari matriks

biologis dengan respon detektor yang diperoleh untuk kadar sebenarnya dari standar murni. Perolehan kembali analit tidak harus 100%, tetapi tingkat perolehan kembali analit dan baku dalam harus konsisten, presisi, dan dapat dihasilkan kembali (*reproducible*). Uji perolehan kembali harus dilakukan dengan membandingkan hasil analisis sampel pada tiga rentang kadar (rendah, sedang, dan tinggi) dengan standar murni yang tidak diekstraksi yang mewakili perolehan kembali 100%.

4. Kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi merupakan hubungan antara respon instrumen dengan konsentrasi analit yang diketahui. Kurva kalibrasi harus terdiri dari 1 sampel blanko (matiks tanpa baku dalam), 1 sampel zero (matriks dengan baku dalam) dan 6-8 sampel yang mencakup kisaran konsentrasi pengukuran (termasuk konsentrasi pada LLOQ). Standar terendah dari kurva kalibrasi yang dapat diterima sebagai LLOQ jika kondisi berikut, yaitu : respon analit pada LLOQ sedikitnya lima kali respon blanko dan respon analit (puncak analit) dapat diidentifikasi, terpisah, dan dapat terulang dengan presisi 20% dan akurasi 80-120%.

5. Linearitas dan rentang

Linearitas suatu metode bioanalisis harus diuji untuk mengetahui adanya hubungan yang linear antara kadar zat dengan respon detektor. Linearitas diperoleh dari koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier 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 linier dari konsentrasi yang telah dilakukan. Rentang metode adalah pernyataan konsentrasi terendah dan tertinggi analit yang dianalisis memberikan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima.

6. Batas kuantisasi (LOQ)

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 criteria cermat dan seksama. 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 linear $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x). Cara lain yang dapat digunakan untuk menentukan LOD dan LOQ yaitu melalui penentuan ratio S/N (*signal to noise*) dengan harga S/N sama dengan tiga cukup untuk menentukan batas deteksi dan untuk batas kuantitasi diharapkan harga S/N sama dengan 10.

2.6 Metode Analisis Glibenklamid

Terdapat beberapa studi yang berkaitan dengan metode analisis glibenklamida dalam plasma yang sudah dipublikasikan diantaranya yaitu:

1. Metode kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor fluoresensi untuk menentukan gliburide dalam plasma manusia : Aplikasi untuk sebuah studi bioekuivalensi (Jayantial, Qassim, Abraham, Al-Lami, Ali & Masood, 2001).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan KCKT detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 235 nm dan panjang gelombang emisi 354 nm. Menggunakan kolom kungsorb reverse C8 (15 cm x 4,6 mm) dengan ukuran partikel 3 μ m dan bekerja pada suhu 22°C. Fase gerak yang digunakan adalah campuran larutan buffer (0,05 M $NH_4H_2P_4$) : asetonitril : larutan ammonia encer disesuaikan dengan pH 5,7 (45 : 40 : 15). Kecepatan alir 1,0 ml/menit. Baku dalam yang digunakan adalah ketokonazol. Kurva kalibrasi linear pada rentang konsentrasi 5-400 ng/ml. Koefisien variasi (CV) berkisar dari 6,52-12,35%, dan dengan batas LOQ adalah 5 ng/ml.

2. Pengembangan metode analisis untuk gliklazid dalam plasma manusia dengan kromatografi cair kinerja tinggi (Obaid, Ahmed, Ali, Obaid, Noor & Syed Waseemuddin, 2002).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi LC-5A, system 6A Shimadzu Jepang dengan detector ultraviolet. Menggunakan kolom C18 (300

mm x 3,9 mm) dengan diameter dalam dilindungi oleh oktadecylsilan, dan bekerja pada suhu lingkungan. Fase gerak yang digunakan adalah campuran kalium dihidrogen fosfat (dijaga pada pH 2,5) : asetonitril (30 : 70). Kecepatan alir 1,0 ml/menit dengan panjang gelombang 229 nm. Baku dalam yang digunakan adalah glikazid. Kurva kalibrasi linear pada rentang konsentrasi 0,625-10 ng/ml ($r=0,9996$).

3. Metode kromatografi cair kinerja tinggi untuk perkiraan glibenklamid dalam serum manusia (Rajendran, Philip, Gopinant, & Suresh, 2007).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi pompa shimadzu LC-10 AT, injektor manual dan SIL 10A SPD UV/vis UV detektor absorptansi (Shimadzu, Jepang). Menggunakan kolom analitis C18 (250 mm x 4,6 mm i.d., 0,22 μ m). Fase gerak yang digunakan adalah campuran asetonitril : 25 mM buffer fosfat (dijaga pada pH 3,5) dengan perbandingan 60 : 40 v/v. Kecepatan alir 1,0 ml/menit. Baku dalam yang digunakan adalah glimepride. Kurva kalibrasi linear pada rentang konsentrasi 50-500 ng/ml.

4. Metode kromatografi cair kinerja tinggi dan studi farmakokinetik glibenklamid pada tikus setelah pemberian per oral (administrasi pada pil KB Xiaoke) (Lin, Qiu-chen, Zai-xing, dan Fan-hao, 2009).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan KCKT-Elite (Dalian-Cina) terdiri dari 2 bagian yaitu pompa P230 dan detector DAD. Menggunakan kolom Sinochrom BP DDS-C18 (200 mm x 4,6 mm, 5 μ m). Fase gerak yang digunakan adalah campuran asetonitril : asam asetat 0,1% (44 : 56, v/v). Kecepatan alir 1,0 ml/menit dengan panjang gelombang 230 nm. Baku dalam yang digunakan adalah glipizide. Kurva kalibrasi linear pada rentang konsentrasi 10,2 ng/ml – 306,0 ng/ml.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi

Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

3.2 Alat

Alat yang digunakan adalah kromatografi cair kinerja tinggi model Alliance Waters 2695 Separations Module (Waters), sistem integrasi menggunakan perangkat lunak Empower Pro, dilengkapi dengan detektor *Photodiode Array* Waters 2996 (Waters), kolom Lichrospher® 100 RP-18 (5 µm, Merek) dengan dimensi kolom 250 x 4 µm, sentrifugator (DSC-300SD), *vortex* (Maxi Mix II-Barnstead), *shaker* (JANKE & KUNKEL IKA Labor Technik KS 501 D), pipet mikro (Socorex Acura 825), *ultrasonic* (Elma S40H Elmasonic), tabung sentrifus, *blue tip*, *yellow tip*, timbangan analitik (Analytical Balance AND GR-202), pH meter (Eutech Instruments pH 510), alat-alat gelas.

3.3 Bahan

Glibenklamid (Indofarma), glimepirid, asetonitril pro HPLC (Merck), metanol pro HPLC (Merck), aquabidest (PT. Ikapharmindo Putramas Pharmaceutical Laboratories), kalium dihidroksi fosfat (Merck), dan plasma darah (PMI).

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan Larutan

3.4.1.1 Pembuatan Larutan Induk Glibenklamid dan Larutan Uji

Ditimbang secara seksama lebih kurang 10,04 mg glibenklamid, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 50,0 ml dan dilarutkan dalam metanol sampai tanda batas labu ukur. Diperoleh konsentrasi larutan glibenklamid lebih kurang 0,208

mg/mL (208, $\mu\text{g/mL} = 208$, ppm). Lakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

3.4.1.2 Pembuatan Larutan Induk Glimepirid dan Larutan Uji

Ditimbang secara seksama lebih kurang 10,04 mg glimepirid, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 50,0 ml dan dilarutkan dalam metanol sampai tanda batas labu ukur. Diperoleh konsentrasi larutan glimepirid lebih kurang 0,208 mg/mL (208 $\mu\text{g/mL} = 208$ ppm). Lakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

3.4.1.3 Pembuatan Larutan Dapar Kalium Dihidrogen Fosfat 25 mM pH 3,5

Ditimbang secara seksama lebih kurang 1,7011 gram natrium dihidrogen fosfat kemudian dilarutkan dalam aquabidest hingga 500,0 ml kemudian ditambahkan asam fosfat hingga pH larutan 3,5.

3.4.2 Pencarian kondisi analisis optimum untuk metode analisis glibenklamid

3.4.2.1 Pemilihan Baku Dalam untuk Analisis Glibenklamid secara KCKT

Masukkan 500,0 μL plasma ke dalam tabung sentrifuge yang mengandung glibenklamid dengan konsentrasi tertentu, kemudian ditambahkan baku dalam (glipizid 50,0 $\mu\text{L/ml}$, glikazid 50,0 $\mu\text{L/ml}$ atau glimepirid 50,0 $\mu\text{L/ml}$ lalu ditambahkan dengan metanol sebanyak 1,0 ml, kemudian dikocok dengan vorteks selama 1 menit. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 5 menit. Masing-masing sebanyak 50,0 μL disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak asetonitril dan dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM pH 3,5 dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit.

3.4.2.2 Pemilihan Komposisi Fase Gerak untuk Analisis Glibenklamid secara KCKT.

Larutan induk glibenklamid dilarutkan dan diencerkan dengan metanol dan glimepirid dilarutkan dan diencerkan dengan metanol hingga diperoleh konsentrasi lebih kurang 10,0 ppm, kemudian masing-masing larutan standar dan campuran larutan

standar disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan komposisi fase gerak sebagai berikut :

- 1) asetonitril dan dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM pH 3,5 (60 : 40)
- 2) asetonitril dan dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM pH 3,5 (55 : 45)
- 3) asetonitril dan dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM pH 3,5 (50 : 50)

Kecepatan aliran yang digunakan 1,0 mL/menit dan dideteksi pada panjang gelombang 229 nm Diperoleh waktu retensi, lalu dihitung faktor ikutan, jumlah plat teoritis dan HETP.

3.4.2.3 Pemilihan waktu pengocokan dengan vorteks untuk ekstraksi glibenklamid dalam plasma

Plasma yang mengandung glibenklamid dengan konsentrasi tertentu sebanyak 500,0 μL dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge lalu ditambahkan glimepirid sebanyak 25,0 μL (glimepiride konsentrasi 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) lalu ditambahkan dengan metanol sebanyak 1,0 ml, kemudian dikocok dengan vorteks masing-masing selama 0,5, 1 dan 5 menit. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 5 menit. Masing-masing larutan yang diperoleh disuntikan sebanyak 50,0 μL ke alat KCKT. Dicatat waktu retensi, lalu dihitung jumlah lempeng teoritis, HETP dan faktor ikutan.

3.4.2.4 Uji Kesesuaian Sistem

Larutan campuran glibenklamid dengan konsentrasi 10,0 ppm dan glimepirid dengan konsentrasi 10,0 ppm disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Kemudian dicatat waktu retensi (t_R), dihitung faktor ikutan (T_f), jumlah lempeng teoritis (N), HETP, dan presisi pada lima kali penyuntikan.

3.4.3 Validasi Parsial Metode Analisis Glibenklamid dalam Plasma *In Vitro*

3.4.3.1 Penyiapan Sampel Glibenklamid dalam Plasma

Plasma yang mengandung Glibenklamid dengan konsentrasi tertentu sebanyak 500,0 μL dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge lalu ditambahkan 25,0 μl baku

dalam (50,0 µg/mL) dan 1,0 ml metanol, lalu dikocok dengan vorteks selama 1 menit dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10000 rpm. Ambil bagian cair, sebanyak 50,0 µl larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih.

3.4.3.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi

Dibuat 1 sampel blanko (plasma tanpa baku dalam), 1 sampel zero (plasma dengan baku dalam), dan larutan glibenklamid dalam plasma dengan konsentrasi lebih kurang 50,2; 100,4; ; 200,8; 301,2; 401,6 dan 502,0 ng/mL dengan penambahan 25,0 µL baku dalam (glimepirid 10,0 µg/mL). Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 50,0 µL masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Dari data pengukuran dibuat kurva kalibrasi dengan menggunakan persamaan garis regresi linear ($y = a + bx$), dimana x adalah konsentrasi glibenklamid dan y adalah perbandingan luas puncak glibenklamid dan baku dalam.

3.4.3.3 Uji Linearitas

Dari data pengukuran pada pembuatan kurva kalibrasi, kemudian dianalisis dengan regresi luas puncak terhadap konsentrasi glibenklamid dalam plasma dan diperoleh koefisien korelasi (r) yang menunjukkan linearitasnya.

3.4.3.4 Batas Kuantitasi Terendah (LLOQ)

Dibuat larutan glibenklamid dalam plasma dengan konsentrasi lebih kurang 50,3 ng/mg dan 25,15 ng/mL dengan penambahan 25,0 µL baku dalam (glimepirid 10,0 µg/mL). Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 50,0 µL masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih sebanyak lima kali pada masing-masing konsentrasi. Dari data pengukuran kemudian dihitung nilai % *diff* dan koefisien variasinya (KV). LLOQ adalah kondisi terendah yang menunjukkan akurasi (nilai % *diff*) tidak menyimpang dari -20% dan +20%, serta presisi (koefisien variasi) tidak kurang dari 20%.

3.4.3.4 Uji Presisi

Dibuat larutan glibenklamid dalam plasma dengan konsentrasi 150,9; 281,68; dan 402,4 ng/mL dengan penambahan 25,0 μ L baku dalam (glimepirid 10,0 μ g/mL). Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 50,0 μ L masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih, diulang sebanyak lima kali untuk masing-masing konsentrasi dan dilakukan selama 1 hari. Presisi dihitung sebagai nilai simpangan baku relatif atau koefisien variasi dari masing-masing konsentrasi.

3.4.3.5 Uji Akurasi

Dibuat larutan glibenklamid dalam plasma dengan konsentrasi 150,9; 281,68; dan 402,4 ng/mL dengan penambahan 25,0 μ L baku dalam (glimepirid 10,0 μ g/mL). Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 50,0 μ L masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih, diulang sebanyak lima kali untuk masing-masing konsentrasi dan dilakukan selama 1 hari. Akurasi dihitung sebagai perbedaan nilai terukur dengan nilai yang sebenarnya (% *diff*).

3.4.3.6 Uji Perolehan Kembali (% *recovery*)

Larutan glibenklamid dalam plasma dengan konsentrasi 150,9; 281,68; dan 402,4 ng/mL dengan penambahan 25,0 μ l baku dalam (glimepirid 10,0 μ g/mL). Kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 50,0 μ l aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih sebanyak 5 kali. Dihitung % *recovery*.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pencarian Kondisi Analisis Optimum Glibenklamid

4.1.1 Pemilihan Baku Dalam untuk Analisis Glibenklamid dalam Plasma

Pada analisis glibenklamid dalam plasma digunakan tiga jenis baku dalam yaitu glipizid, glikazid dan glimepirid dengan menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM pH 3,5 (55:45) dan kecepatan alir 1,0 mL/menit. Pada analisis menggunakan glipizid sebagai baku dalam diperoleh waktu retensi 3,848 menit, area 5.756.329, plat teoritis 5416,00, HETP $4,616 \times 10^{-3}$, Tf 1,360, sedangkan pada analisis menggunakan glikazid sebagai baku dalam diperoleh waktu retensi 6,132 menit, area 3672717, plat teoritis 7047,65, HETP $3,547 \times 10^{-3}$, Tf 1,337, dan pada analisis menggunakan glimepirid sebagai baku dalam diperoleh waktu retensi 9,172 menit, area 6365716, plat teoritis 6811,25, HETP $3,670 \times 10^{-3}$, Tf 1,285. Dari ketiga baku dalam yang dianalisis, yang digunakan sebagai baku dalam yaitu yang mempunyai plat teoritis yang besar, nilai HETP yang kecil dan nilai Tf yang mendekati 1,000. Sehingga dapat dilihat dari data tersebut glikazid yang mempunyai nilai plat teoritis yang paling besar, tetapi ketika di dalam plasma puncak kromatogram glikazid terganggu oleh pengotor dari plasma. Karena pada kromatogram ekstrak plasma kosong pada waktu retensi glikazid keluar masih terdapat pengotor dari plasma, yang menyebabkan hasilnya tidak akurat. Sedangkan pada pemilihan baku dalam glipizid waktu retensi yang dihasilkan terlalu cepat sehingga pada waktu tersebut masih banyak terdapat pengotor dari plasma yang dapat mengganggu hasil kromatogram. Untuk baku dalam glimepirid walaupun waktu retensinya lebih lama tetapi hasil kromatogram pada plasma terpisah dari pengotor-pengotor yang terdapat dalam plasma. Oleh karena itu, dari percobaan yang dilakukan dipilih glimepirid sebagai baku dalam karena terekstraksi dengan baik dan puncaknya terpisah dari puncak plasma. Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung glibenklamid konsentrasi 100,0 ng/mL dan baku dalam glimepirid

konsentrasi 10 µg/mL dapat dilihat pada Gambar 4.1. Data lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Baku dalam digunakan untuk mengurangi kesalahan selama proses analisis, khususnya kesalahan saat melakukan ekstraksi obat dari plasma dan kesalahan dalam volume suntikan, yang akan mempengaruhi luas puncak yang dihasilkan. Caranya adalah dengan menambahkan senyawa baku yang diketahui jumlahnya pada senyawa uji, kemudian campuran itu dibuat untuk disuntikkan ke KCKT dan dianalisis pada kondisi terpilih.

4.1.2 Pemilihan Komposisi Fase Gerak untuk Analisis Glibenklamid

Berdasarkan literatur acuan (SD Rajendran, BK Ohilip, R Gopinath, B Suresh, 2007) dilakukan analisis glibenklamid dengan komposisi fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM pH 3,5 (60:40), lalu divariasikan dengan perbandingan (55:45), dan (50:50) masing-masing dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit. Pada fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM pH 3,5 (60:40) diperoleh waktu retensi 5,741 menit, dengan jumlah lempeng teoritis (N) 5278,857; nilai HETP $4,7359 \times 10^{-3}$; faktor ikutan 1,3418 dan resolusinya sebesar 2,249. Pada fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM pH 3,5 (55:45) diperoleh waktu retensi 7,691 menit, dengan jumlah lempeng teoritis (N) 4884,353; nilai HETP $5,1184 \times 10^{-3}$; faktor ikutan 1,3083; dan resolusinya sebesar 2,551. Pada fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM pH 3,5 (50:50) diperoleh waktu retensi 11,061 menit, dengan jumlah lempeng teoritis (N) 3480,57; nilai HETP $7,1827 \times 10^{-3}$; faktor ikutan 1,839 dan resolusinya sebesar 1,980. Data lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Pada penelitian ini dipilih fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM pH 3,5 karena dengan menggunakan dapar dapat mempertahankan pH sehingga analit tetap berada dalam bentuk molekul. Berdasarkan literatur, konsentrasi dapar yang digunakan adalah 25 mM. Konsentrasi tersebut adalah wajar karena jika konsentrasinya lebih besar akan berisiko adanya pengendapan garam sehingga dapat

menyumbat kolom, mempengaruhi tekanan, efisiensi, dan bentuk puncak kromatogram. Dari hasil percobaan dipilih komposisi fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM pH 3,5 (55:45) karena memberikan waktu retensi yang singkat (7,691 menit), jumlah lempeng teoritis yang besar, nilai HETP yang kecil, dan dengan kondisi fase gerak ini pada kromatogram plasma blanko tidak ada puncak yang mengganggu pada waktu retensi glibenklamid. Tetapi berdasarkan literatur acuan untuk pemilihan komposisi fase gerak yang digunakan berbeda yaitu pada fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM pH 3,5 (60:40).

4.1.4 Pemilihan waktu pengocokan dengan vorteks untuk ekstraksi glibenklamid dalam plasma

Untuk memperoleh glibenklamid dari plasma lebih optimal, dilakukan optimasi lama waktu pengocokan dengan vorteks. Waktu pengocokan dicobakan pada tiga variasi waktu yaitu 30, 60 dan 90 detik. Dari hasil yang diperoleh, pada waktu pengocokan 30 detik % *recovery* paling kecil, sedangkan pada pengocokan 60 dan 90 detik % *recovery* yang diperoleh tidak terlalu jauh berbeda hasilnya, sehingga untuk analisis diperlukan waktu yang lebih cepat dan yang lebih baik hasilnya. Sehingga dipilih waktu pengocokan 1 menit karena menghasilkan % *recovery* yang paling besar. Data uji waktu pengocokan dengan vortex dapat dilihat pada Tabel 4.8.

4.1.5 Uji Kesesuaian Sistem

Dari hasil analisis sebanyak 5 kali penyuntikan, diperoleh nilai koefisien variasi dari waktu retensi glibenklamid adalah sebesar 0,00725% dengan nilai HETP 4,5883 x 10⁻³, jumlah lempeng teoritis (N) 5448,615, dan faktor ikutan (Tf) 1,3183; serta nilai koefisien variasi dari PAR adalah sebesar 0,000923%. Data uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Uji kesesuaian sistem ini perlu dilakukan sebelum metode analisis terpilih dilaksanakan. Secara normal terdapat variasi dalam peralatan dan teknik analisis sehingga uji kesesuaian sistem perlu dilakukan untuk memastikan sistem operasional akhir adalah efektif dan memberikan hasil yang sesuai dengan tujuan analisis.

4.2 Validasi Parsial Metode Bioanalisis Glibenklamid dalam Plasma *In Vitro*

4.2.1 Penyiapan Sampel glibenklamid dalam Plasma

Sebelum disuntikkan ke KCKT, glibenklamid perlu diekstraksi terlebih dahulu dari komponen plasma yang mengganggu, khususnya protein. Ekstraksi glibenklamid dari plasma dilakukan dengan cara ekstraksi pengendapan protein menggunakan metanol dan asetonitril. Dengan pengendapan protein menggunakan asetonitril tidak terekstraksi sehingga area yang dihasilkan terlalu kecil. Tetapi dengan metanol menghasilkan ekstraksi yang lebih baik. Dipilihnya metode ekstraksi tersebut dengan pertimbangan bahwa glibenklamid larut dalam metanol. Pertama-tama, plasma yang mengandung glibenklamid dengan konsentrasi tertentu dan baku dalam (25,0 μ L 10,0 μ g/mL), ditambahkan metanol sebanyak 1,0 mL. Hal ini bertujuan untuk mengubah glibenklamid menjadi bentuk molekulnya. Kemudian dikocok menggunakan vortek selama 1,0 menit agar keduanya bercampur sempurna sehingga glibenklamid akan tertarik ke dalam metanol. Setelah itu disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10000 rpm untuk mengendapkan protein ke bagian bawah sample cup. Selanjutnya fase air dianalisis menggunakan alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Kromatogram plasma blanko dapat dilihat pada Gambar 4.5 dan kromatogram glibenklamid dengan penambahan glimepirid (baku dalam) dalam plasma dapat dilihat pada Gambar 4.6.

4.2.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi

Berdasarkan hasil perhitungan statistik regresi linear diperoleh persamaan garis kurva kalibrasi $y = 0,0005 + 0,0024x$; dimana x adalah konsentrasi glibenklamid dan y adalah perbandingan luas puncak glibenklamid dengan baku dalam. Kurva kalibrasi glibenklamid dalam plasma dapat dilihat pada Gambar 4.7. Data kurva kalibrasi dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Kurva kalibrasi glibenklamid dalam plasma dibuat dengan rentang konsentrasi lebih kurang 50,20 - 502,00 ng/mL. Untuk analisis glibenklamid dalam plasma, kurva kalibrasi terdiri dari plasma blanko (plasma tanpa penambahan glibenklamid dan baku dalam), plasma *zero* (plasma dengan penambahan baku dalam) dan 6 larutan

glibenklamid dalam plasma dengan penambahan baku dalam. Dari hasil analisis, diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,0005 + 0,0024x$

4.2.3 Uji Linearitas

Linearitas didapat dari kurva kalibrasi glibenklamid dalam plasma. Linearitas glibenklamid dalam plasma dapat dilihat pada Gambar 4.7. Data hasil pengujian linearitas dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Dari pembuatan kurva kalibrasi, diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,0005 + 0,0024x$ dengan koefisien korelasi $r = 0,9999$. Maka dapat disimpulkan bahwa metode analisis glibenklamid dalam plasma dengan rentang konsentrasi lebih kurang 50,20 - 502,00 ng/mL memenuhi kriteria uji linearitas dan dapat diterima untuk suatu metode analisis yang *valid*.

4.2.4 Batas Kuantitasi Terendah (LLOQ)

Pada pengukuran LLOQ, dibuat larutan glibenklamid dalam plasma dengan konsentrasi 50,30 dan 25,15 ng/mL. LLOQ yang diperoleh adalah 50,30 ng/mL. Data lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Dari data dapat dilihat bahwa % *diff* yang didapat dari konsentrasi 50,30 ng/mL ini memenuhi persyaratan yaitu tidak menyimpang lebih dari -20% dan +20%. Nilai % *diff* antara -8,65% sampai 1,31%.

4.2.5 Uji Presisi

Pada uji presisi glibenklamid dalam plasma, dilakukan selama 1 hari yang diharapkan dapat mewakili untuk optimasi glibenklamid. Untuk konsentrasi rendah (150,90 ng/mL) memberikan nilai koefisien variasi (KV) 4,04%. Konsentrasi sedang (281,68 ng/mL) memberikan nilai koefisien variasi (KV) 5,65%. Konsentrasi tinggi (402,40 ng/mL) memberikan nilai koefisien variasi (KV) 6,35%.

Dari hasil percobaan, uji keterulangan (presisi) yang telah dilakukan untuk analisis glibenklamid dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan. Data yang diperoleh menunjukkan bahwa metode analisis memiliki keterulangan

yang baik untuk mewakili optimasi glibenklamid karena nilai koefisien variasi yang dihasilkan tidak lebih dari 15%. Data hasil uji presisi dapat dilihat pada Tabel 4.6.

4.2.6 Uji Akurasi

Pada uji akurasi glibenklamid dalam plasma, dilakukan selama 1 hari yang diharapkan dapat mewakili untuk optimasi glibenklamid. Untuk konsentrasi rendah (150,90 ng/mL) memberikan nilai % *diff* sebesar -6,45 sampai -4,15%. Konsentrasi sedang (281,68 ng/mL) memberikan nilai % *diff* sebesar -8,40 sampai 5,78%. Konsentrasi tinggi (402,40 ng/mL) memberikan nilai % *diff* sebesar -7,32 sampai 9,69%. Data hasil uji akurasi dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Dari hasil percobaan, uji akurasi yang telah dilakukan untuk analisis glibenklamid dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan. Berdasarkan hasil perhitungan, untuk uji akurasi diperoleh % *diff* tidak menyimpang lebih dari -15% dan +15% untuk masing-masing konsentrasi selama satu hari (*intra-day*).

4.2.7 Uji Perolehan Kembali (% *recovery*)

Dari uji perolehan kembali glibenklamid dalam plasma dilakukan selama 1 hari diperoleh % *recovery* untuk konsentrasi rendah (150,90 ng/mL) sebesar 93,18 sampai 103,73%, untuk konsentrasi sedang (281,68 ng/mL) sebesar 91,23 sampai 105,36%, dan untuk konsentrasi tinggi (402,40 ng/mL) sebesar 92,31 sampai 109,25%. Data hasil uji perolehan kembali dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Untuk, secara keseluruhan nilai persen perolehan kembali berada dalam rentang 90-120%. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi kriteria untuk uji akurasi, presisi, dan perolehan kembali

Dari hasil percobaan, nilai persen perolehan kembali yang telah dilakukan untuk analisis glibenklamid dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan yaitu berada dalam rentang 80-120%.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kondisi optimum untuk analisis glibenklamid dalam plasma *in vitro* dengan glimepirid sebagai baku dalam menggunakan KCKT, kolom Lichrospher® 100 RP-18 (5 µm, Merck) dengan dimensi kolom 250 x 4 µm, menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM (55:45) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang 229 nm, waktu retensi glibenklamid adalah 7,691 menit dan waktu retensi glimepirid adalah 9,172 menit.

Dari kondisi optimum didapatkan nilai LLOQ sebesar 50,20ng/mL, pada rentang konsentrasi 50,20 - 502,00 ng/mL dihasilkan kurva kalibrasi glibenklamid yang linear dengan koefisien korelasi (r) 0,9999, akurasi (% diff) dari metode ini antara -8,65 hingga 1,31% dengan presisi antara (KV) antara 4,04 hingga 6,35%, dan nilai uji perolehan kembali antara 93,18 hingga 109,25%.

5.2 Saran

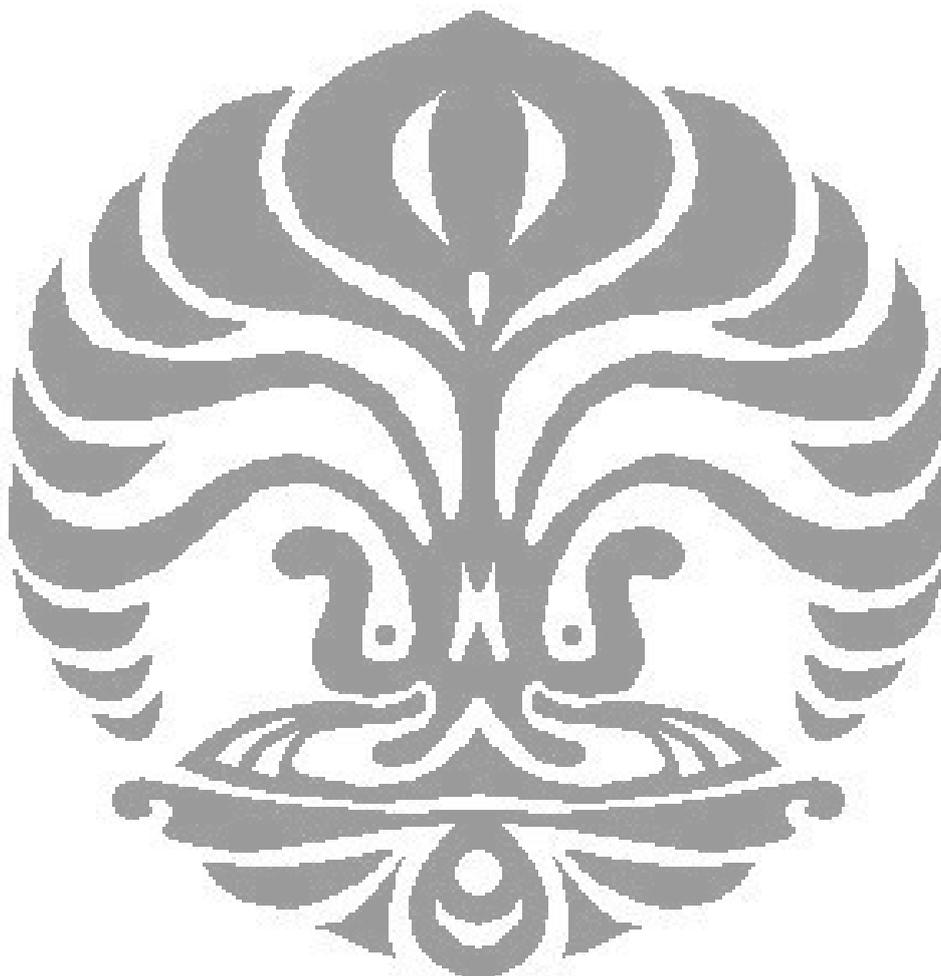
Untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan validasi metode analisis glibenklamid yang lengkap (full validation) dalam plasma *in vitro* yang mengacu pada FDA (Food Drug Administration).

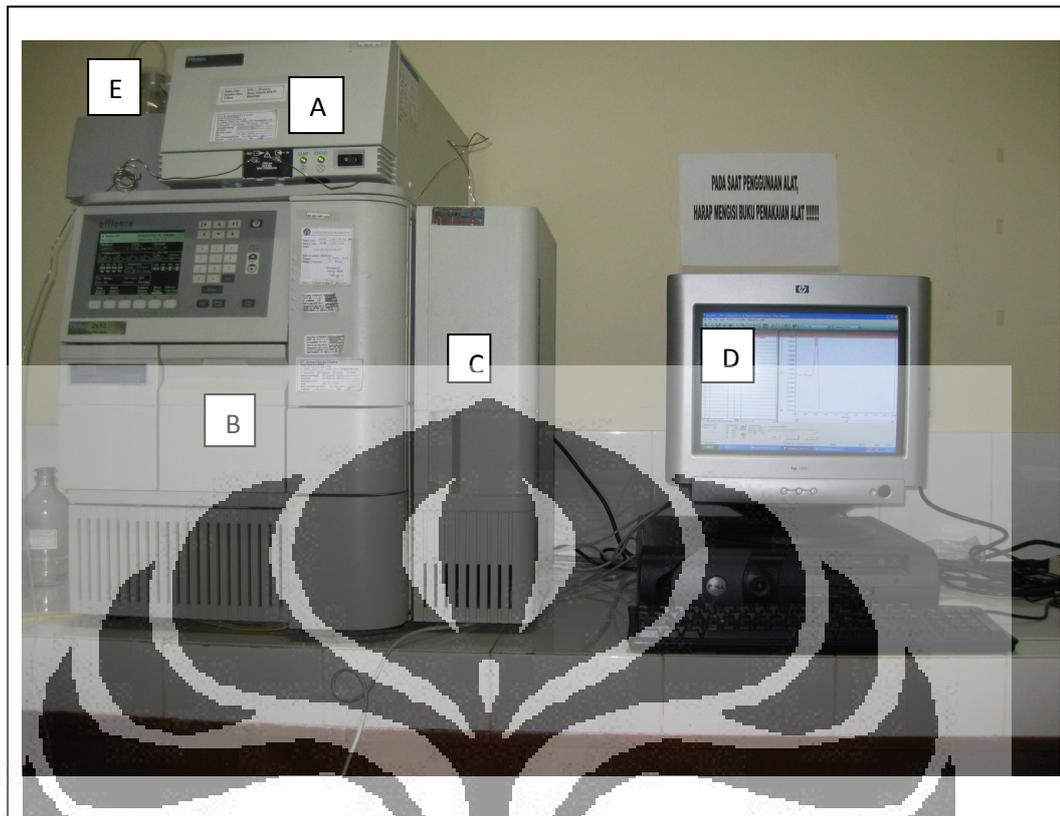
DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. *Farmakope Indonesia*, edisi IV. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. 1995: 410.
- Anonim. 1995. *Farmakologi dan Terapi edisi 4*. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta: 477.
- Anonim. *Martindale: The Complete Drug Reference, 35th edition*. The Pharmaceutical Press. 2007.
- Anonim. *United States Pharmacopoeia 26*. United States Pharmacopoeia Convention Inc. 2003: 866-867, 858-859.
- Anonim. *Martindale: The Complete Drug Reference, 35th edition*. The Pharmaceutical Press. 2007.
- Dale, M.M., H.P. Rang, J.M. Rutter & P. Gardner. 2001. *Pharmacology*. Churchill Livingstone, New York: 650.
- Davis, S.N. & D.K. Granner. 1996. Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw Hill, New York: 1487.
- Evans, G. *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism*. CRC Press, Inc., USA. 2004: 32-36.
- Glibenklamid. Index Informasi Obat. Agustus 11, 2010. <http://www.diskes.jabarprov.go.id/index.php>
- Glimepiride. Index Informasi Obat. Agustus 11, 2010. <http://www.diskes.jabarprov.go.id/index.php>
- Guidance for Industry: *Bioanalytical Method Validation*. 2001. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. Tanggal 8 Agustus 2008 pukul 10.20.
- Guidance for Industry: *Individual Product Bioequivalence Recommendations*. 2007. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). <http://www.fda.gov/cder/guidance/bioequivalence/default.htm>. Tanggal 10 Agustus 2010 pukul 21.05.

- Guyton MD, Arthur C. *Human Physiology and Mechanisms of Disease*, Edisi III. Buku Kedokteran : 699-709.
- Harmita. 2006. *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok : 101-126.
- Johnson E.L. dan R. Stevenson. 1991. *Dasar kromatografi cair*. Terjemahan dari Basic Liquid Chromatography oleh Padmawinata K. Penerbit ITB, Bandung : 1-51, 230-255, dan 278-301
- Katzung, MD, PhD. Bertram, G. *Farmakologi Dasar dan Klinik edisi III*. Buku Kedokteran EGC. Jakarta: 588.
- Khatri, Jayantial., Qassim, Sami., Abraham, Boby., Al-Lami, Ali., dan Masood, Syed. 2001. *A Novel Extractionless HPLC Fluorecence Method for the Determination of Glyburide in the Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study*. *Journal of Pharmaceutical Science*, 4(2): 201-206.
- Li, Y, X., Wang, J, G., Sun, G, J., Zheng, T, Y., Yan, B., Xie, T, H., dan Wang, X. 2007. *LC-MS Determination and Pharmacokinetic Study of a Novel Sulfonylures: Potensial Hypoglycemic Agent in rat Plasma*. 65: 13-18.
- Mutschler, Ernst. 1991. *Dinamika Obat*. Buku Ajar Farmakologi dan Toksikologi Edisi 5. ITB. Bandung: 349.
- Obaid, Roohi., Ahmed, Tasneem., Ali. Obaid., Kamil, Noor., dan Ahmed, Syed Waseemuddin. 2002. *Method Development For Analysis Of Glivlazide In Human Plasma By Using High-Performance Liquid Chromatography*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*. Vol.15 (2): 51-56.
- Rajendran, SD., Philip, BK., Gopinant, R., dan Suresh, B. 2007. *RPHPLC Method For The Estimation Of Glibenclamide In Human Serum*. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*. Vol. 69: 796-799.
- Richards, Duncan and Jeffery Aronson. 2005. *Oxford Handbook of Practical Drug Therapy. 1st Edition*. Oxford University Press. UK: 390.
- Sherwood, Lauralee. 2001. *Fisiologi Manusia Dari Sel Ke Sistem edisi II*. Buku Kedokteran. 345-347.

Wang, Lin., Chen, Qiu-chen., Chen, Zai-xing., dan Meng, Fan-hao. 2009. *High performance liquid chromatographic determination and pharmacokinetics study of Glibenclamide in rats after oral administration of XiaoKe Pill*. Scholars Research Library. 1(2): 278-284.

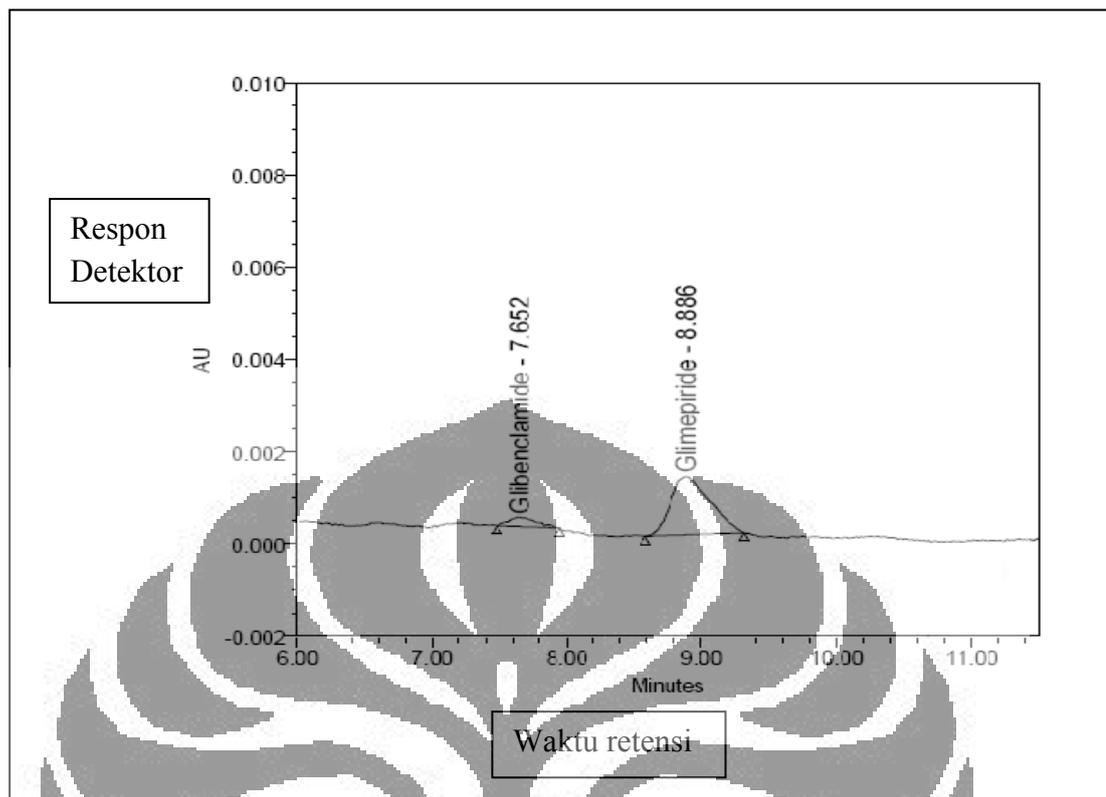




Keterangan gambar :

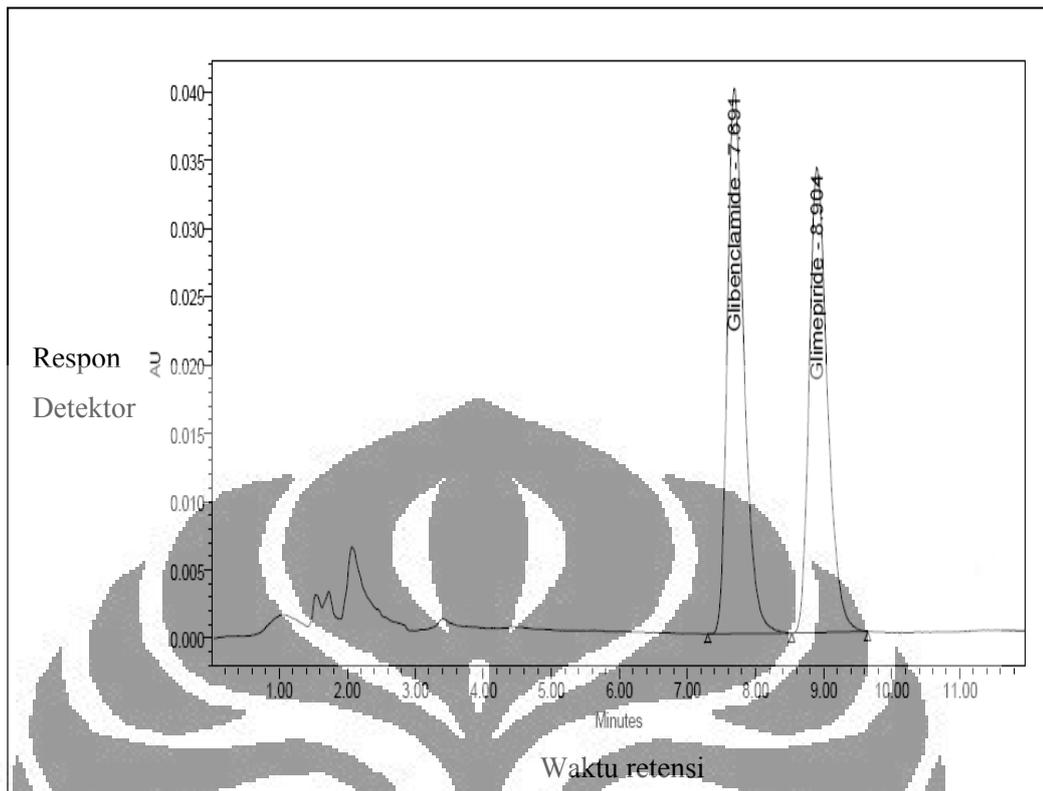
- A. Detektor *Photodiode Array* Waters 2996 (Waters)
- B. Alliance Waters 2695 Separations Module (Waters)
- C. Oven kolom (Waters)
- D. Sistem integrasi Empower Pro
- E. Fase gerak (eluen)

Gambar 3.1 Peralatan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)



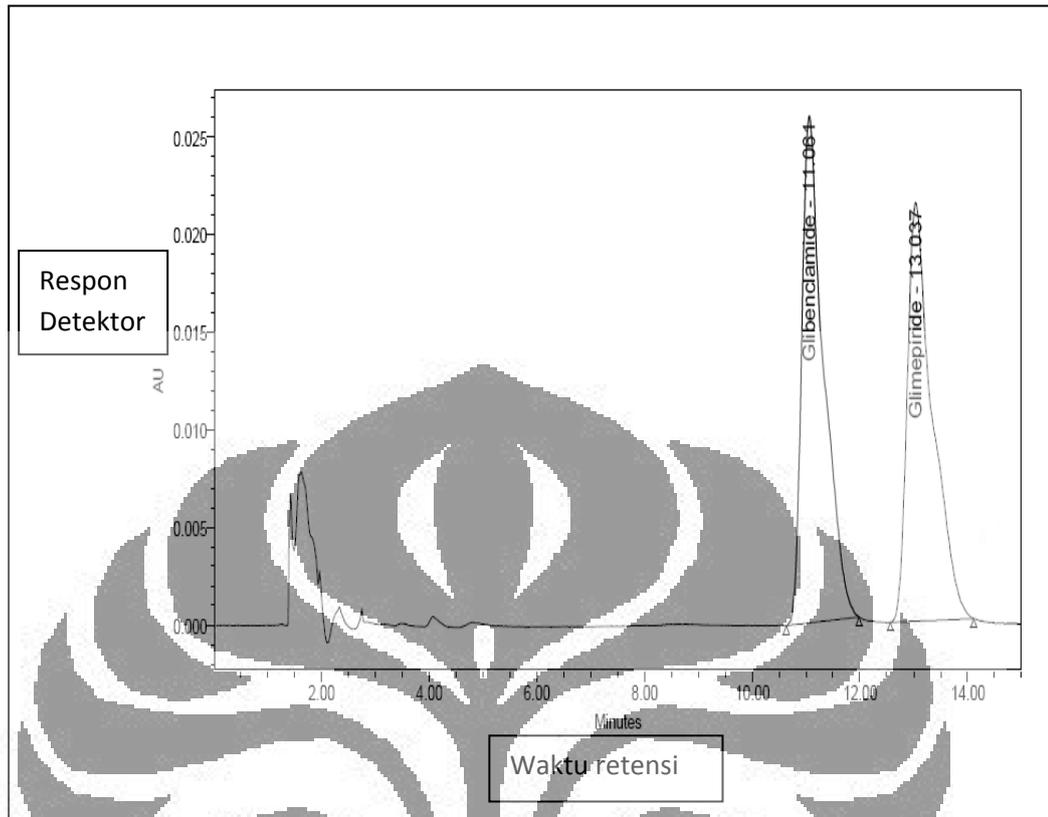
Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5 μ m, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 μ m, menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM (55:45) dengan kecepatan alir 1,0 mL/merit pada panjang gelombang 229 nm; volume penyuntikan 50,0 μ l

Gambar 4.1 Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung glibenklamid konsentrasi 50,0 ng/mL dan baku dalam glimepiride konsentrasi 10 μ g/mL



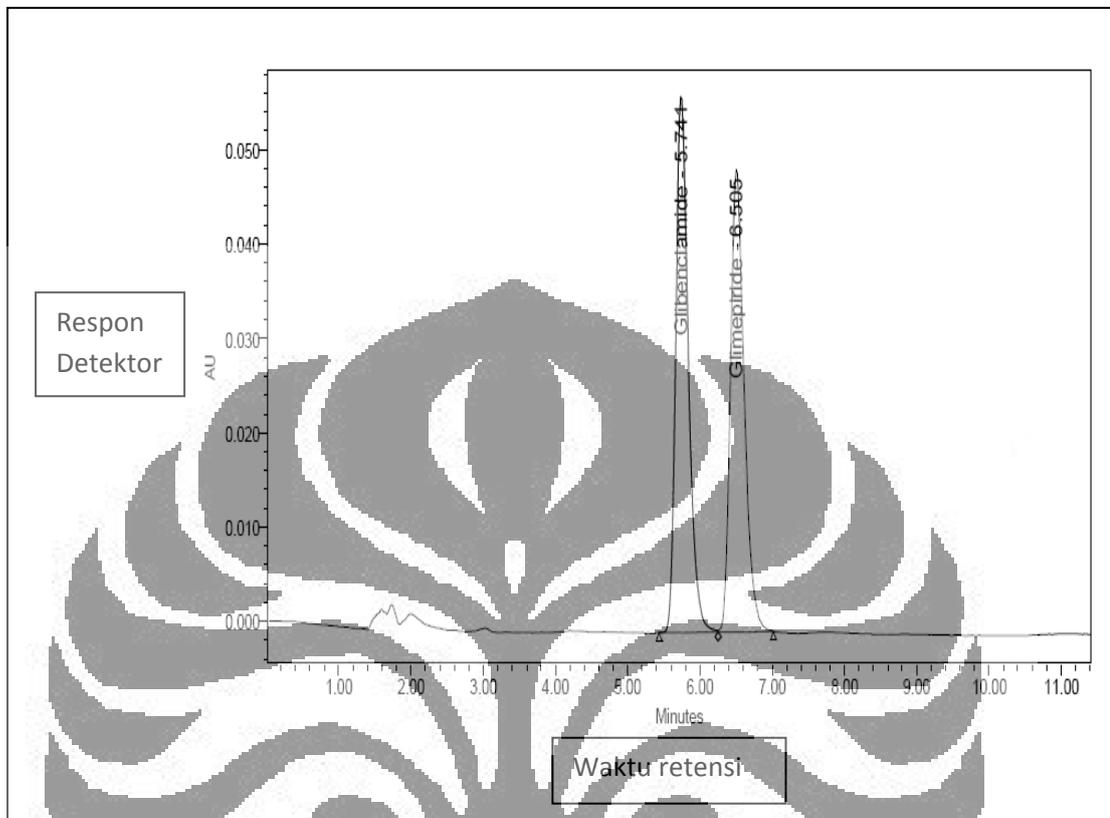
Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5 μm , Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 μm , menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM (55:45) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang 229 nm; volume penyuntikan 50,0 μl

Gambar 4.2 Kromatogram campuran larutan standar glibenklamid dan glimepirid (baku dalam) dengan konsentrasi masing-masing 10 $\mu\text{g/mL}$



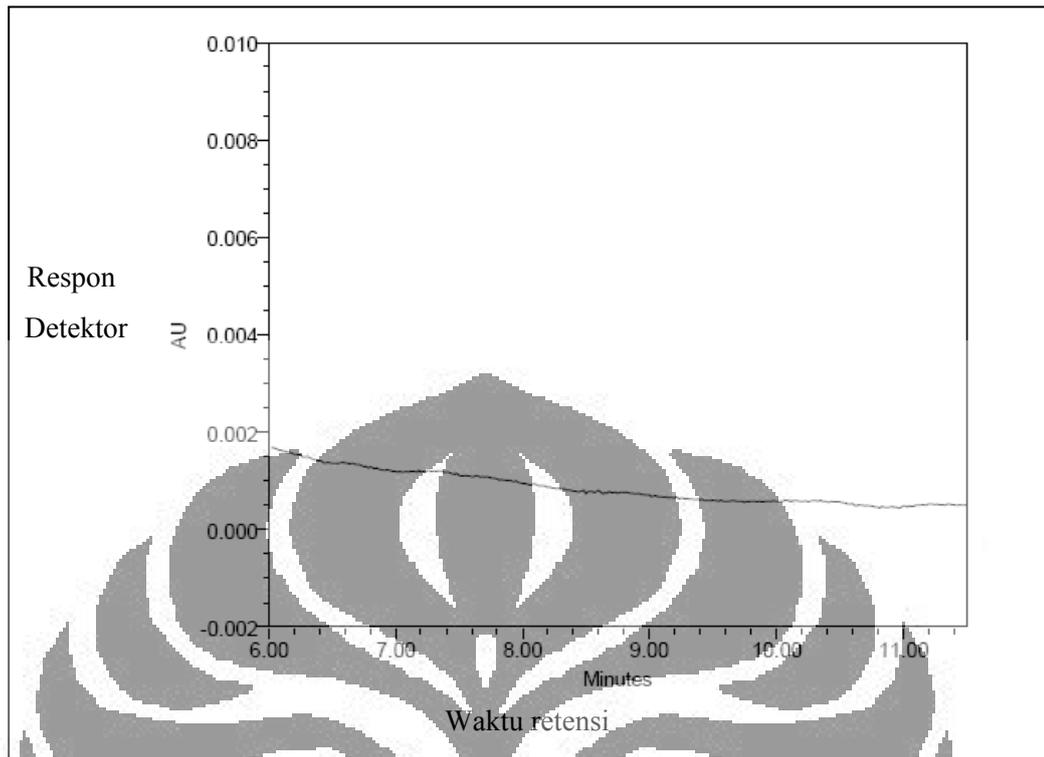
Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5- μ m, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 μ m, menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM (50:50) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang 229 nm; volume penyuntikan 50,0 μ l

Gambar 4.3 Kromatogram campuran larutan standar glibenklamid dan glimepirid (baku dalam) dengan konsentrasi masing-masing 10 μ g/mL



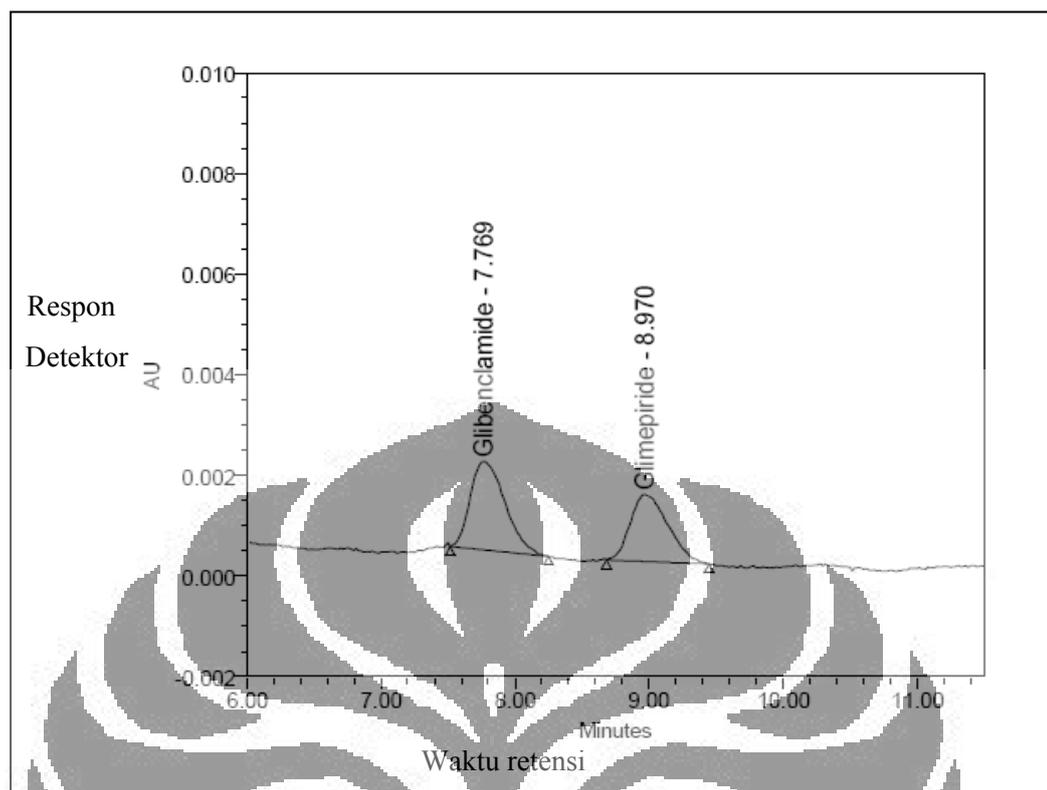
Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5 μm , Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 μm , menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM (60:40) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang 229 nm; volume penyuntikan 50,0 μl

Gambar 4.4 Kromatogram campuran larutan standar glibenklamid dan glimepirid (baku dalam) dengan konsentrasi masing-masing 10 $\mu\text{g/mL}$



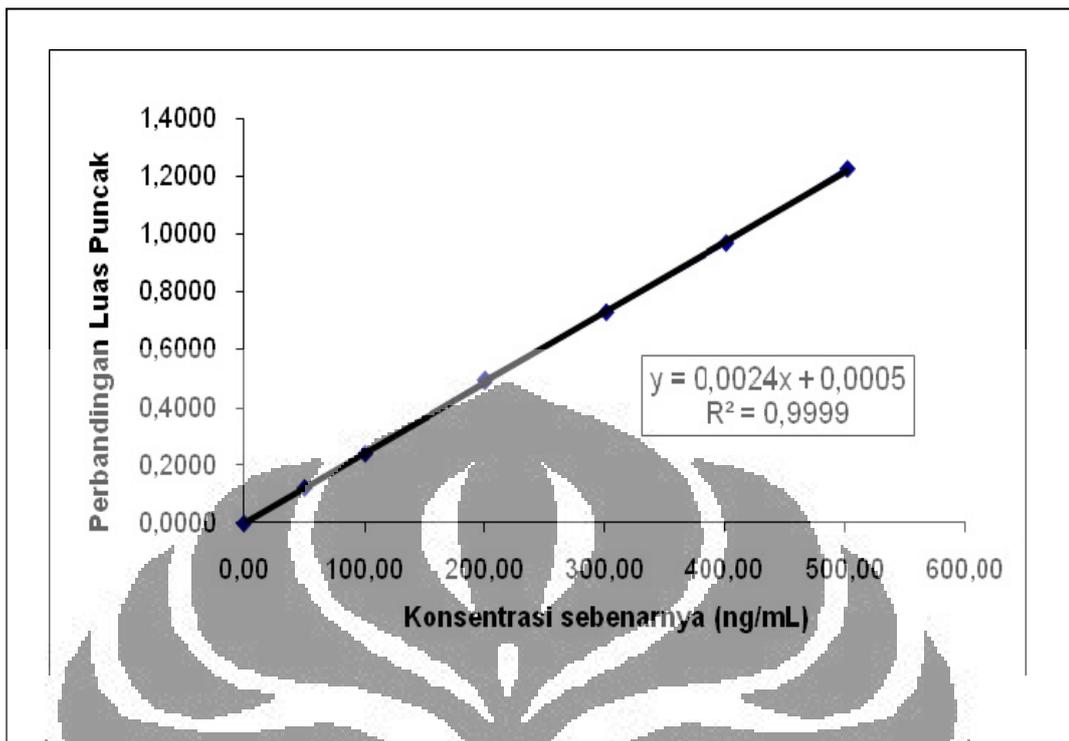
Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e ($5\ \mu\text{m}$, Merck) dengan panjang kolom $250 \times 4\ \mu\text{m}$, menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat, 25 mM (55:45) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang 229 nm; volume penyuntikan $50,0\ \mu\text{l}$

Gambar 4.5 Kromatogram ekstrak plasma tanpa penambahan glibenklamid dan baku dalam glimepirid (plasma blanko)



Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5 μm , Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 μm , menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM (55:45) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang 229 nm; volume penyuntikan 50,0 μl

Gambar 4.6 Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung glibenklamid konsentrasi 500,0 ng/mL dan baku dalam glimepirid konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$



Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5 µm, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 µm, menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM (55:45) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang 229 nm; volume penyuntikan 50,0 µl

Gambar 4.7 Kurva kalibrasi glibenklamid dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Tabel 4.1 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram baku dalam (glipizid, glikazid, dan glimepirid)

Baku Dalam	Waktu Retensi	Area	N	HETP	Tf
Glipizid	3,848 menit	5756329	5416,00	$4,616 \times 10^{-3}$	1,360
Glikazid	6,132 menit	3672717	7047,65	$3,547 \times 10^{-3}$	1,337
Glimepirid	9,172 menit	6365716	6811,25	$3,670 \times 10^{-3}$	1,285

Tabel 4.2 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram glibenklamid terhadap perubahan komposisi fase gerak

Komposisi fase gerak	Waktu retensi (menit)	Jumlah lempeng (N)	HETP	Faktor ikutan (Tf)
Asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM pH 3,5 (55:45, v/v)	7,691	4884,353	$5,1184 \times 10^{-3}$	1,3083
Asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM pH 3,5 (50:50, v/v)	11,061	3480,57	$7,1827 \times 10^{-3}$	1,839
Asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM pH 3,5 (60:40, v/v)	5,741	5278,857	$4,7359 \times 10^{-3}$	1,3418

Tabel 4.3 Data uji kesesuaian sistem

Luas puncak glibenklamid	Luas puncak glimepirid	Waktu retensi (t_R) glibenklamid	KV (t_R) (%)	PAR	KV PAR (%)	N	HETP	Tf
677328	632272	7.691	0,00725	1,0713	0,000923	5448,615	$4,5883 \times 10^{-3}$	1,3183
687803	642688	7.824		1,0702				
690908692235	644923	7.822		1,0713				
692355	647622	7.818		1,0689				
	647812	7.819		1,0687				

Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5 μ m, Merek) dengan panjang kolom 250 x 4 μ m, menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM (55:45) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang 229 nm; volume penyuntikan 50,0 μ l

Tabel 4.4 Data kurva kalibrasi glibenklamid dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi glibenklamid (ng/mL)	Luas puncak glibenklamid	Luas puncak glimepirid	PAR
0,00	0	25602	0,0000
50,20	3288	26486	0,1241
100,40	6712	27670	0,2426
200,80	12179	24601	0,4951
301,20	17412	23876	0,7293
401,60	26111	26929	0,9696
502,00	31844	25951	1,2271

Persamaan regresi linier : $y = 0,0005 + 0,0024x$ $r = 0,9999$

Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5 µm, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 µm, menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM (55:45) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang 229 nm; volume penyuntikan 50,0 µl

Tabel 4.5 Data pengukuran *lower limit of quantitation* (LLOQ) glibenklamid dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi glibenklamid (ng/mL)	Luas puncak glibenklamid	Luas puncak glimepirid	PAR	Konsentrasi terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
50,30	2906	24417	0,1190	48,73	47,89	2,03	4,24	-3,13
	2891	25752	0,1123	45,95				-8,65
	3685	29613	0,1244	50,96				1,31
	2868	25350	0,1131	46,31				-7,93
	2893	24935	0,1160	47,50				-5,57

Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5 µm, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 µm, menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM (55:45) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang 229 nm; volume penyuntikan 50,0 µL

Tabel 4.6 Data uji akurasi dan presisi glibenklamid dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam, 1-Hari (*intra-day*)

Konsentrasi glibenklamid/glimepirid (ng/mL)	Luas puncak glibenklamid/glimepirid	PAR	Konsentrasi glibenklamid terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
150,90/10040,0	9225 25146	0,3669	150,65	148,62	6,01	4,04	-0,16
	9142 23890	0,3827	157,16				4,15
	9103 25103	0,3626	148,91				-1,32
	9050 26324	0,3438	141,17				-6,45
	9207 26041	0,3536	145,18				-3,79
281,68/10040,0	16107 23838	0,6757	277,66	282,86	15,97	5,65	-1,43
	16491 26263	0,6279	258,02				-8,40
	18970 27251	0,6961	286,06				1,56
	18188 25085	0,7251	297,96				5,78
	17372 24235	0,7168	294,57				4,58
402,40/10040,0	26611 24782	1,0738	441,39	418,15	26,55	6,35	9,69
	23954 23432	1,0223	420,20				4,42
	25879 24621	1,0511	432,05				7,37
	25764 24965	1,0320	424,20				5,42
	23832 26266	0,9073	372,93				-7,32

Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5 µm, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 µm, menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM (55:45) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang 229 nm; volume penyuntikan 50,0 µl

Tabel 4.7 Data uji perolehan kembali (% *recovery*) glibenklamid dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi glibenklamid/glimepirid (ng/mL)	Luas puncak glibenklamid/glimepirid		PAR	Konsentrasi glibenklamid terukur (ng/mL)	% <i>recovery</i>
150,90/10040,0	9225	25146	0,3669	150,05	99,44
	9142	23890	0,3827	156,53	103,73
	9103	25103	0,3626	148,32	98,29
	9050	26324	0,3438	140,61	93,18
	9207	26041	0,3536	144,61	95,83
281,68/10040,0	16107	23838	0,6757	276,55	98,18
	16491	26263	0,6279	256,99	91,23
	18970	27251	0,6961	284,92	101,15
	18188	25085	0,7251	296,78	105,36
	17372	24235	0,7168	293,40	104,16

Konsentrasi glibenklamid/glimepirid (ng/mL)	Luas puncak glibenklamid/glimepirid		PAR	Konsentrasi glibenklamid terukur (ng/mL)	% recovery
402,40/10040,0	26611	24782	1,0738	439,63	109,25
	23954	23432	1,0223	418,52	104,01
	25879	24621	1,0511	430,33	106,94
	25764	24965	1,0320	422,51	105,00
	23832	26266	0,9073	371,44	92,31

Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5 µm, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 µm; menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 25 mM (55:45) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang 229 nm; volume penyuntikan 50,0 µl

Tabel 4.8 Data optimasi waktu pengocokan dengan vorteks untuk ekstraksi glibenklamid dalam plasma

Vortex (detik)	Konsentrasi Sebenarnya (ng/mL)	Area		PAR	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	% Recovery
		Glibenclamid	Glimepirid			
30,00	150,90	9414	28745	0,3275	134,47	89,11
	281,68	21533	28084	0,7667	315,11	111,87
	402,40	17210	25249	0,6816	280,10	69,61
60,00	150,90	8807	25252	0,3488	143,21	94,91
	281,68	20928	26316	0,7953	326,83	116,03
	402,40	26611	24782	1,0738	441,39	109,69
90,00	150,90	8393	24066	0,3487	143,21	94,90
	281,68	20613	26198	0,7868	323,36	114,80
	402,40	27201	26983	1,0081	414,36	102,97

Tabel 4.9 Data hasil optimasi metode analisis

Parameter analisis	KV (%)	Syarat	% diff	Syarat	% recovery	Syarat
LLOQ	4,24	≤ 20%	-8,65 s/d 1,31	-20% s/d +20%		
Akurasi						
150,90/10040,0			-6,45 s/d 4,15	-15% s/d +15%		
281,68/10040,0			-8,40 s/d 5,78			
402,40/10040,0			-7,32 s/d 9,69			
Presisi						
150,90/10040,0	4,04	≤ 15%				
281,68/10040,0	5,65					
402,40/10040,0	6,35					
% recovery						
150,90/10040,0					93,18 s/d 103,73	80-120 %
281,68/10040,0					91,23 s/d 105,36	
402,40/10040,0					92,31 s/d 109,25	

Lampiran 1 Cara perhitungan nilai N, HETP, dan Tf

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

$$\text{HETP} = \frac{L}{N}$$

$$T_f = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

$$R = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

Keterangan :

N = jumlah lempeng teoritis

t_R = waktu retensi (menit)

W = lebar puncak

HETP = ukuran efisiensi kolom

L = panjang kolom (cm)

Tf = faktor ikutan

$W_{0.05}$ = lebar puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar

Lampiran 2 Cara memperoleh regresi linear

Persamaan garis $y = a + bx$

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

$$a = \frac{(\sum yi)(\sum xi^2) - (\sum xi)(\sum xi.yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

$$b = \frac{N(\sum xi.yi) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{[N(\sum x^2) - (\sum x)^2 \times N(\sum Y^2) - (\sum y)^2]^{1/2}}$$

Lampiran 3 Cara perhitungan koefisien variasi dari fungsi

$$V_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{\bar{X}}$$

$$S_{y/x} = \frac{\sum(Y - Y_1)^2}{N - 2}$$

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b}$$

Keterangan ;

$S_{y/x}$ = simpangan baku residual

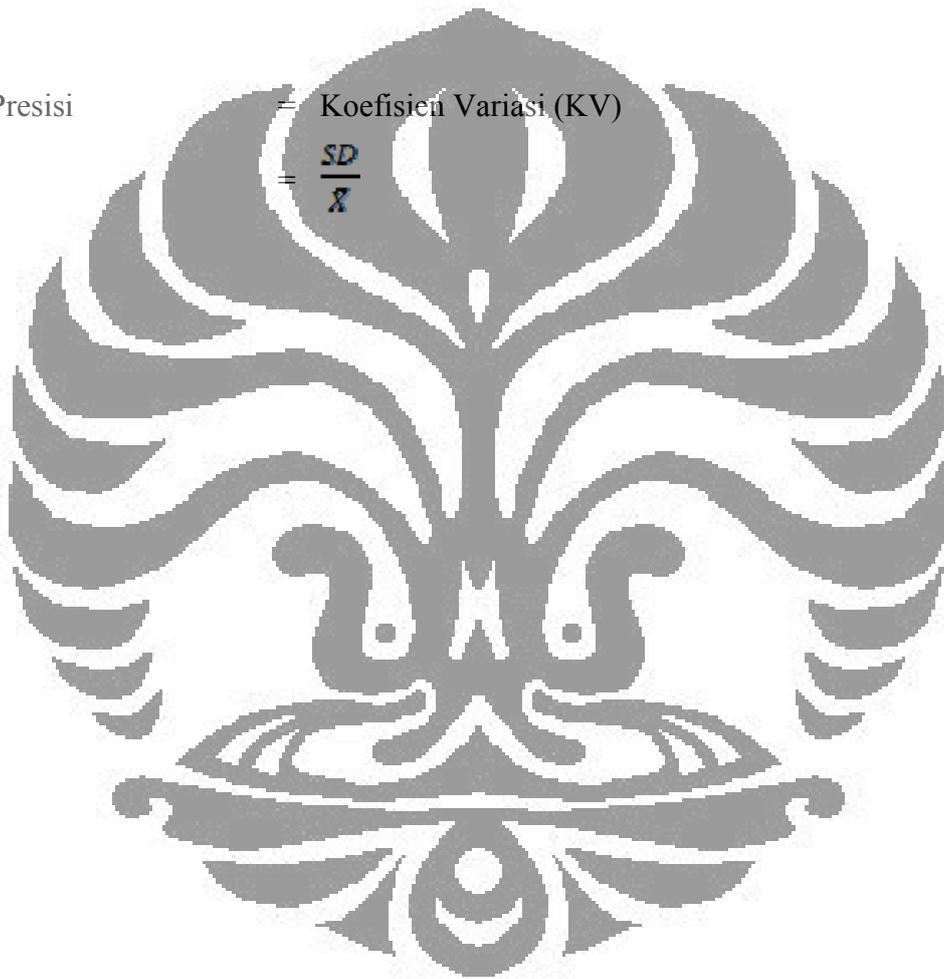
S_{x_0} = standar deviasi fungsi

b = arah garis linear dari kurva kalibrasi

Lampiran 4 Cara perhitungan presisi

$$\text{Simpangan baku (SD)} = \left(\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{N - 1} \right)^{1/2}$$

$$\begin{aligned} \text{Presisi} &= \text{Koefisien Variasi (KV)} \\ &= \frac{SD}{\bar{x}} \end{aligned}$$

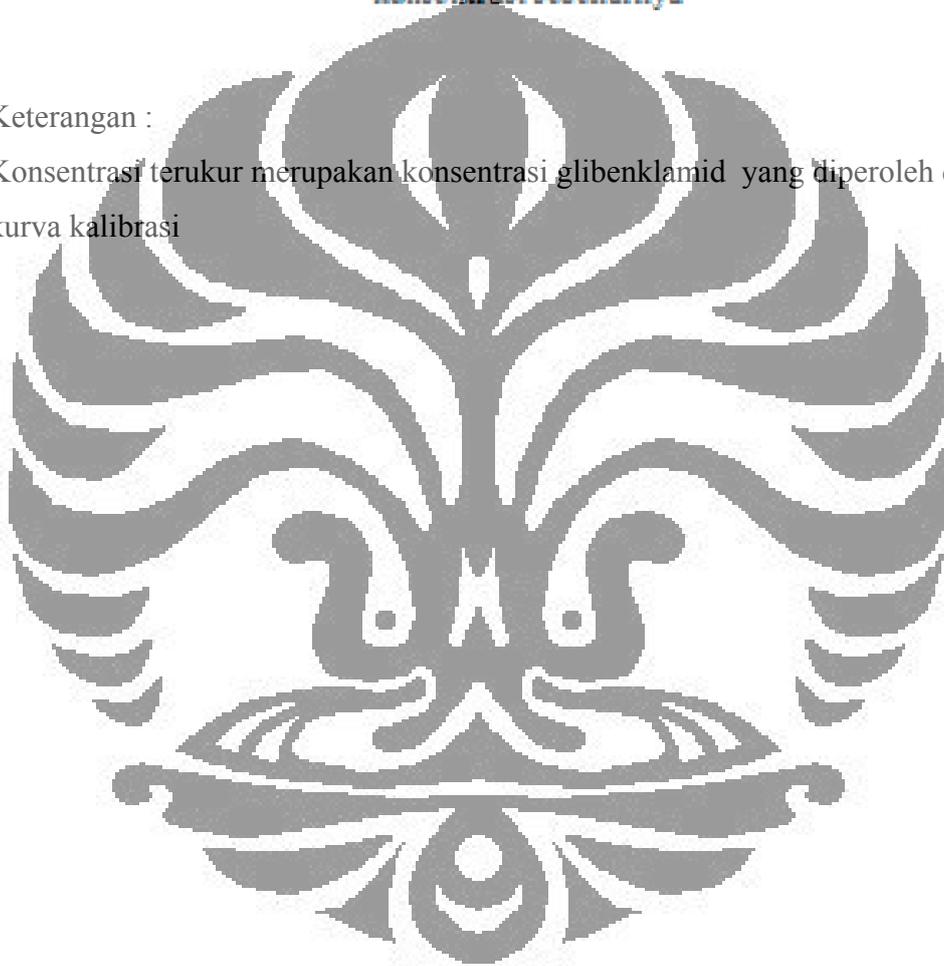


Lampiran 5 Cara perhitungan akurasi

$$\begin{aligned} \text{Akurasi} &= \% \text{ diff} \\ &= \frac{(\text{konsentrasi terukur} - \text{konsentrasi sebenarnya})}{\text{konsentrasi sebenarnya}} \times 100\% \end{aligned}$$

Keterangan :

Konsentrasi terukur merupakan konsentrasi glibenklamid yang diperoleh dari plot kurva kalibrasi



Lampiran 6 Cara perhitungan uji perolehan kembali

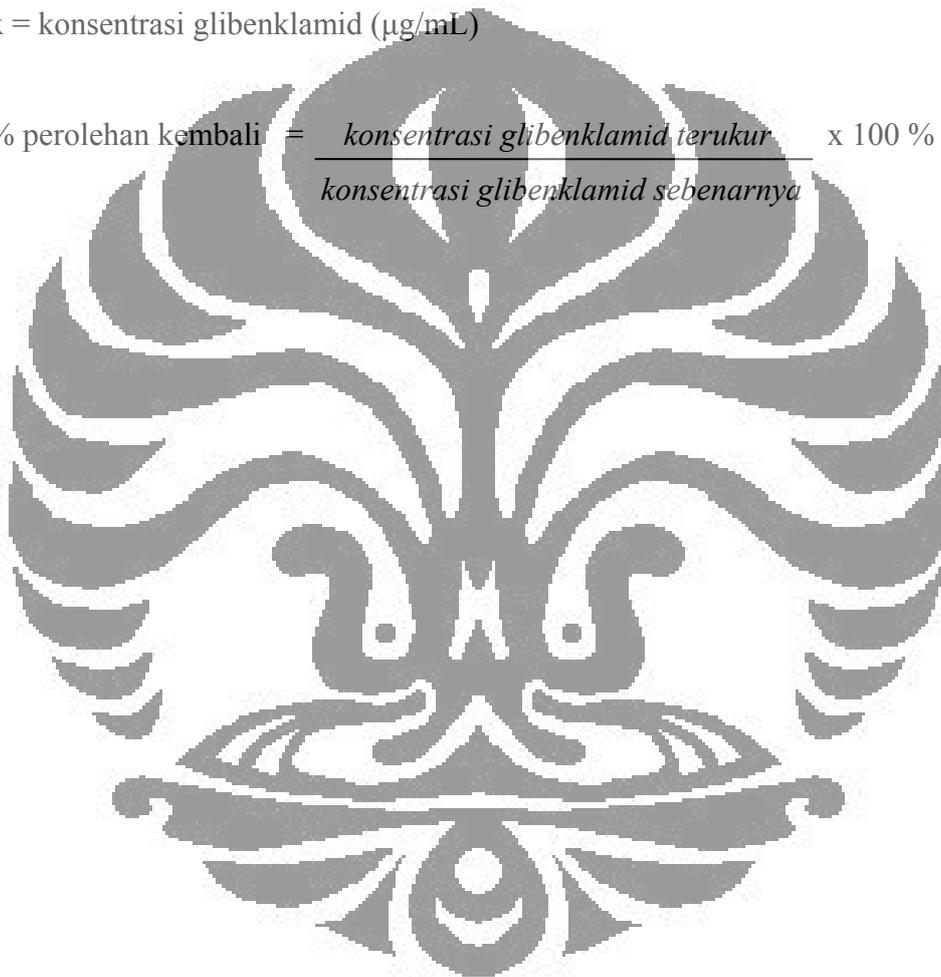
Persamaan kurva kalibrasi

$$y = a + bx$$

y = perbandingan luas puncak

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

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{\textit{konsentrasi glibenklamid terukur}}{\textit{konsentrasi glibenklamid sebenarnya}} \times 100 \%$$



Lampiran 7. Sertifikat analisis glibenklamid

Cadila Healthcare Limited		ZYDUS Cadila Healthcare Limited (API Division)	
291, G.I.D.C. INDUSTRIAL ESTATE ANKLESH WAR - 393002 Gujarat (INDIA) Phone : +91 - 2646 110719/110711 Fax : 91-2646 150071			
QUALITY ASSURANCE DEPARTMENT CERTIFICATE OF ANALYSIS			
Product Name	GLIBENCLAMIDE BP		
Batch Number	GC/008/0059	Q.C.A.R. No.	QGC/0060
Batch Quantity	300 Kg	Sample Quantity	100 gm
Mfg. Date	AUG-2010	Exp. Date	JUL-2015
		Release Date	16.08.2010
Storage	Store in tightly closed container at 25°C ± 2°C		
TEST	SPECIFICATIONS	OBSERVATIONS	
Description	A white or almost white crystalline powder,	White or crystalline powder	
Solubility	Practically insoluble in water, sparingly soluble in methylene chloride, slightly soluble in alcohol and in methanol, practically insoluble in ether. It dissolve in dilute solution of alkali hydroxides.	Complies	
Identification	Test A, B, C, D and E	Complies	
Appearance of solution	1% w/v solution in alcohol is clear and colourless	Complies	
Heavy metals	Not more than 20 ppm	Less than 20 ppm	
Related substances by TLC	1) Impurity A : Not more than 0.40% 2) Secondary impurities : Not more than 0.20%	Less than 0.40% Less than 0.20%	
Loss on drying	Not more than 1.0 % w/w	0.40 % w/w	
Sulphated ash	Not more than 0.10 % w/w	0.05% w/w	
Assay on dried basis	Not more than 99.0 % w/w and not more than 101.0 % w/w	99.79% w/w	
Residual solvents by HSGC	Methanol : Not more than 3000ppm Acetone : Not more than 500ppm 2-Butanone : Not more than 2000ppm Dichloromethane : Not more than 600ppm	778ppm 49ppm BQL[LOQ-0.31ppm] BQL[LOQ-0.76ppm]	
Particle size	95 % less than 10 micron	7.37micron	
Report	Product complies with the above said specification		
Prepared by	Approved by		

Corporate Office : 'Zydus Tower', Satellite Cross Roads Ahmedabad 380 015, Gujarat (INDIA)
Phone : +91-79-6868100 (20 Lines). Fax : +91-79-6862365/66 Website : www.zyduscadila.com