# Optimasi Kondisi Pemisahan Glibenklamid Kombinasi Metformin dalam Plasma Darah Menggunakan KCKT

**Astri Rohayati, Aliya N. Hasanah, Nyi M. Saptarini, Anisa D. Aryanti** Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Jawa Barat, Indonesia

#### Abstrak

Glibenklamid merupakan obat antidiabetika golongan sulfonilurea yang umumnya dianalisis dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), kromatografi cair-spektrometri massa, elektroforesis kapiler dan spektrofotometri ultraviolet-visibel. Analisis menggunakan instrumen membutuhkan pretreatment sampel, diantaranya dengan ekstraksi cair-cair dan ekstraksi fase padat atau Solid Phase Extraction (SPE). Salah satu kekurangan SPE yaitu selektivitas metode ini tergantung dari pemilihan penjerap yang didasarkan pada kemampuannya berikatan dengan analit. Kekurangan SPE tersebut diperbaiki dengan teknik Molecularly Imprinted Polymer (MIP). SPE-MIP glibenklamid telah dibuat dengan menggunakan monomer fungsional, asam metakrilat (MAA). Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk optimasi kondisi pemisahan glibenklamid menggunakan SPE-MIP dengan monomer asam metakrilat yang telah dibuat pada penelitian sebelumnya. Penelitian dilakukan melalui tahapan penyiapan alat dan bahan, optimasi kondisi dan uji kesesuaian sistem KCKT, optimasi kondisi ekstraksi, validasi metode analisis, serta analisis data statistik. Hasil analisis glibenklamid kombinasi metformin yang dipreparasi dengan SPE-MIP monomer asam metakrilat memberikan hasil yang memenuhi persyaratan seperti analisis glibenklamid kombinasi metformin yang dipreparasi dengan SPE C-18. SPE C-18 dan SPE-MIP MAA berbeda nyata dalam memperoleh kondisi optimum ekstraksi glibenklamid.

Kata kunci: Asam metakrilat, glibenklamid, KCKT, SPE-MIP

# Optimization of Separation Condition of Glibenclamide and Metformin in Blood Plasma Using HPLC

#### Abstract

Glibenclamide was an antidiabetic sulfonylureas drug that usually analyzed by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), liquid chromatography-mass spectrometry, capillary electrophoresis, and ultraviolet-visible spectrophotometry. Analysis using these instruments required sample pre treatments such as liquid-liquid extraction and Solid Phase Extraction (SPE). one of the SPE weakness was the selectivity that depends on the selection of adsorbent which was based on its ability to bind with the analyte. SPE deficiency was corrected with Molecularly Imprinted Polymer (MIP) techniques. SPE-MIP glibenclamide has been made using a variety of functional monomers, such as methacrylic acid (MAA). This research objectives were optimize the separation condition of glibenclamide using SPE-MIP MAA that already made. The research was conducted through the stages of preparation tools and materials, optimization of conditions and the HPLC system suitability test, optimization of extraction conditions, validation of methods of analysis, and statistical data analysis. The results of analysis of combination metformin glibenclamide were prepared with methacrylic acid monomer MIP SPE deliver results that meet the requirements of such a combination metformin glibenclamide analysis prepared by SPE C18. SPE C-18 and SPE-MIP MAA were significantly different in obtaining the optimum extraction conditions of glibenclamide.

Keywords: Glibenclamide, HPLC, methacrylic acid, SPE-MIP

#### Pendahuluan

Glibenklamid adalah obat antidiabetika golongan sulfonilurea yang sukar dalam air. 1 Analisis glibenklamid dalam cairan biologi dilaporkan dapat dilakukan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), spektrofotometri ultraviolet-visibel. elektroforesis kapiler, kromatografi cair spektrometri massa.<sup>2-7</sup> Analisis menggunakan instrumen perlu dilakukan pretreatment pada sampel. Metode *pretreatment* sampel vang umum digunakan adalah ekstraksi cair-cair dan ekstraksi fase padat.<sup>4</sup>

Ekstraksi fase padat (SPE) adalah salah satu teknik ekstraksi paling sukses karena kemampuannya untuk memperkaya dan memurnikan analit dari matriks sampel cairan secara efisien. Kekurangan SPE konvensional yaitu keselektifan metode ini tergantung dari pemilihan penjerap yang didasarkan pada kemampuannya berikatan dengan analit, di mana ikatan antara analit dengan penjerap harus lebih kuat daripada ikatan antara analit dengan matriks sampel, sehingga analit tertahan pada penjerap.<sup>8</sup>

Dalam upaya memperbaiki kekurangan digunakan *Molecularly* SPE, teknik Imprinted Polymer (MIP). MIP adalah membuat teknik untuk sisi template menjadi selektif mengikat dalam polimer dengan menggunakan template sintetik molekul. Teknik MIP memiliki selektifitas terhadap molekul target.9 tinggi Teknik SPE-MIP glibenklamid telah dibuat berbagai jenis menggunakan monomer fungsional, salah satunya adalah asam metakrilat (MAA). SPE-MIP glibenklamid asam metakrilat yang dibuat perlu dioptimasi kondisinya agar menghasilkan metode analisis yang sesuai.

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh kondisi optimum ekstraksi gibenklamid dari sampel cairan plasma darah menggunakan kolom SPE-MIP monomer asam metakrilat yang telah dibuat untuk kemudian dilakukan analisis dengan KCKT. Penelitian ini dilakukan dengan tahapan optimasi kondisi ekstraksi,

uji kesesuaian sistem KCKT dan validasi metode analisis. Hasil validasi metode menggunakan SPE-MIP monomer asam metakrilat kemudian dibandingkan dengan hasil validasi dengan menggunakan kolom SPE C18.

#### Metode

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi, seperangkat alat KCKT yang dilengkapi dengan detektor ultravioletvisibel (UV-Vis) (Dionex Ultimate 3000), kolom KCKT (Shimadzu) dengan panjang 150 mm dan diameter dalam 4,6 mm, SPE cartridge (Chromabond Macherey-Nagel), seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis (Analytic Jena Specord 200), pH meter (Mettler Toledo), ultrasonic bath (Ney 1510 dan Branson), timbangan analitik dengan kepekaan 0,1 mg (Sartorius), membrane filter 0,45 µm (Sartorius), dan alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium analitik.

Dalam penelitian ini terdapat beberapa bahan yang digunakan, yaitu glibenklamid (PT Hexpharm), metformin HCl (PT Kalbe Farma Tbk.), gliklazid (PT Dexa Medica), asetonitril (JT Baker), metanol pro HPLC (JT Baker), asam trifloro asetat (TFA) (Merck Schuchardt), akuabides (IPHA Laboratories), dan plasma darah manusia (Palang Merah Indonesia, Bandung).

Prosedur dalam penelitian ini diawali dengan pembuatan larutan TFA 0,1%, pembuatan fase gerak, pembuatan larutan baku glibenklamid, pembuatan larutan baku metformin HCl, dan pembuatan larutan baku gliklazid untuk baku internal.

Selanjutnya dilakukan optimasi kondisi KCKT dan uji kesesuaian sistem yang dimulai dengan penentuan ekstingsi molar (ε) dan panjang gelombang maksimum  $(\lambda_{\text{maks}})$  glibenklamid. Penentuan panjang gelombang maksimum dan ekstingsi molar glibenklamid dilakukan dengan sebanyak 1 mL baku glibenklamid ug/mL ditambahkan fase gerak hingga 10 Penentuan gelombang panjang maksimum dilakukan dengan cara

scanning pada panjang gelombang 200-400 nm dengan alat spektrofotometer UV-Visibel kemudian ditentukan panjang gelombang yang memberikan serapan maksimum. Dipipet sebanyak 0,5; 1; dan 1,5 mL larutan glibenklamid dari larutan baku glibenklamid dengan konsentrasi 100 μg/mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, diencerkan dengan fase gerak sampai 10 mL, hingga diperoleh konsentrasi akhir 5, 10, dan 15 µM. Ketiga larutan diukur panjang gelombang maksimum glibenklamid dan ditentukan nilai ekstingsi molarnya.

Optimasi kondisi sistem KCKT digunakan fase gerak campuran asetonitril dan dapar fosfat dengan perbandingan 20:80; 30:70; 40:60; 50:50; 55:45 v/v, serta campuran asetonitril:TFA 0,1% 55:45 v/v. Kecepatan alir adalah 1 mL/menit dan dideteksi menggunakan UV 227 nm.

Uji kesesuaian sistem dilakukan pada sampel glibenklamid konsentrasi 1 µg/mL dan metformin 2 µg/mL dengan standar internal gliklazid 1 μg/mL dalam plasma darah manusia. Ekstraksi analit dilakukan menggunakan asetonitril dalam tube eppendorf, divortex selama 1 menit, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan membrane penyaringan dengan 0,45 um. Analit disuntikkan ukuran sebanyak 20 µL ke dalam KCKT pada kondisi optimum. Percobaan diulang tiga kali (n=3).Keterulangan penyuntikan larutan baku ditentukan dengan koefisien variasi (KV) dari waktu retensi, rasio luas area, asimetri puncak kromatogram, dan tailing factor.

Optimasi ekstraksi dengan kondisi SPE-MIP MAA dilakukan dengan membuat variasi pelarut untuk eluting, yaitu asetonitril dan asetonitril 20%: TFA 0,1% serta dua SPE, vaitu SPE C-18 dan SPE Hydrophilic Lipophilic Balanced (HLB). Cartridge SPE ditempatkan pada penyangga, lalu dilakukan pengondisian cartridge SPE dengan menambahkan 1 mL metanol dan 1 mL akuabides. Sebanyak 1 mL sampel plasma darah manusia yang

telah ditambah glibenklamid, metformin HCl, dan gliklazid dimasukkan ke dalam *cartridge* SPE tetes demi tetes. Pencucian dilakukan dengan menambahkan 1 mL metanol 5%. Analit dielusi dengan 1 mL larutan *eluting* dan 20 µL larutan hasil elusi disuntikkan ke dalam KCKT.

Validasi metode analisis SPE C-18 dan SPE-MIP MAA dilakukan dengan cara pembuatan kurva baku dan uji linieritas, uji akurasi, uji presisi, uji selektivitas atau spesifisitas, serta batas deteksi (LOD) dan batas kuantisasi (LOQ).

Lima seri campuran glibenklamid konsentrasi 0,5; 1; 2; 4; dan 8 µg/mL dengan standar internal gliklazid 1 µg/mL dan metformin HCl 2 µg/mL dalam plasma (pada setiap konsentrasi glibenklamid) disiapkan dengan membuat pengenceran dari stok larutan baku glibenklamid dengan plasma darah dari manusia yang tidak mengandung analit. Kemudian diekstraksi menggunakan SPE C-18 dengan tahapan pengondisian cartridge SPE seperti hasil optimasi. Sejumlah 20 uL analit hasil SPE C-18 disuntikkan ke dalam alat KCKT pada kondisi optimum.

Penentuan linieritas dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Kurva kalibrasi yang telah diperoleh digunakan untuk penetapan kadar sampel. Persamaan garis lurus (regresi linier) digambarkan sebagai hubungan antara konsentrasi glibenklamid dari rasio luas area kromatogram terhadap gliklazid, kemudian dihitung koefisien korelasinya (r).

Uji akurasi metode analisis dilakukan dengan menetapkan kadar dari tiga larutan glibenklamid yaitu 1 μg/mL, 2 μg/mL, dan 4 μg/mL. Setiap larutan ditentukan kadarnya dengan pengulangan sebanyak lima kali (n=5). Persen akurasi diperoleh dengan cara melihat kedekatan hasil dari sampel terhadap nilai nominal.

% akurasi = 
$$\frac{cT}{CA}$$
 x 100%

CT adalah konsentrasi glibenklamid hasil pengukuran, CA adalah konsentrasi nominal (glibenklamid yang ditambahkan ke dalam plasma darah manusia). Penentuan presisi dilakukan dengan penetapan kadar tiga larutan glibenklamid yaitu 1 μg/mL, 2 μg/mL, dan 4 μg/mL. Setiap larutan ditentukan kadarnya dengan pengulangan sebanyak lima kali (n=5). Presisi dinyatakan dengan KV (%) dengan persamaan:

% KV = 
$$\frac{SD}{x}$$
 x 100 %

KV adalah koefisien variasi, SD adalah standar deviasi, dan X adalah rata-rata.

Penetapan selektivitas atau spesifisitas dinyatakan dengan nilai resolusi atau daya pisah (Rs) dan nilainya di atas 1,5 dari kromatogram hasil pemisahan pengujian secara KCKT. Plasma darah yang telah ditambah dengan glibenklamid 2 μg/mL, metformin 2 μg/mL dan standar internal 1 μg/mL. Kemudian dipreparasi dengan SPE C-18 dan dilihat hasil pemisahan pengujian KCKT.

Nilai batas deteksi dan batas kuantitasi metode analisis glibenklamid dihitung secara statistik melalui regresi linier dan kurva kalibrasi, *limit of detection* (LOD) dinyatakan dengan:

$$LOD = \frac{3.5b}{b}$$

atau dinyatakan lain sebagai rasio *signal* terhadap *noise* dengan perbandingan (3:1). *Limit of quantitation* (LOQ) dihitung dengan persamaan:

$$LOQ = \frac{10 \ Sb}{b}$$

atau dinyatakan lain sebagai rasio *signal* terhadap *noise* (10:1). 10

## Hasil

Larutan baku glibenklamid 500 µg/mL dan gliklazid 500 µg/mL dibuat dengan melarutkan masing-masing sebanyak 50 mg glibenklamid dan gliklazid dalam 100 mL metanol. Larutan baku metformin HCl 500 µg/mL dibuat dengan melarutkan 50 mg dalam 100 mL akuabides. Fase gerak yang digunakan adalah TFA 0,1% dalam akuabides dengan penambahan asam.

Penetapan nilai ekstingsi molar (ε) glibenklamid dilakukan dari tiga variasi

konsentrasi, yaitu 5 µM, 10 µM, dan 15 uM dalam fase gerak pada panjang gelombang maksimum glibenklamid, yaitu 227 nm. Nilai ekstingsi molar dihitung dari nilai serapan glibenklamid terhadap tebal (umumnya adalah1 cm) dan kuvet konsentrasi glibenklamid yang diukur. Hasil menunjukkan nilai ekstingsi molar glibenklamid adalah 34.473,33 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>; 55.913.33 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>; dan 82.166.67 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

Optimasi awal dilakukan dengan dapar fosfat, perbandingan komposisi fase gerak asetonitril:dapar fosfat pH 6,5 (20;80; 40:60; 45:55; 50:50; 55:45; 60:40; 70:30). Dari hasil optimasi menggunakan kolom panjang 250 mm, puncak glibenklamid sebagai senyawa utama tidak memenuhi kriteria waktu retensi dan *peak* yang dihasilkan tidak simetris.

Campuran glibenklamid, metformin, dan gliklazid pada komposisi fase gerak 55:45 memiliki waktu retensi dan resolusi yang baik, tetapi puncaknya tidak simetris.

Optimasi dilanjutkan menggunakan kolom dengan panjang 150 mm dan fase gerak TFA 0,1% dalam akuabides sebagai pengganti dapar fosfat. Fase gerak yang digunakan asetonitril:TFA (55:45) dengan kecepatan alir 1 mL/menit.

Uji kesesuaian sistem dilakukan tiga kali penyuntikan sampel glibenklamid 1 μg/mL dan metformin 2 μg/mL yang mengandung standar internal gliklazid 1 μg/mL, kemudian diamati waktu retensi dan rasio luas area. Dapat diketahui %KV dari rasio luas area kromatogram 1,5%.

Tahapan pertama ekstraksi dengan SPE adalah pengondisian (conditioning) yang dilakukan dengan menambahkan 1 mL metanol dan 1 mL akuabides. Lalu sampel plasma yang telah ditambah glibenklamid, metformin, dan gliklazid dimasukkan ke dalam cartridge SPE sebanyak 1 mL (loading sample).

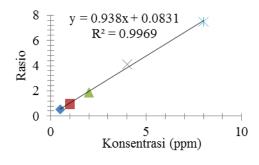
Proses pencucian pada tahapan SPE dilakukan dengan menambahkan 1 mL metanol 5% dalam akuabides. Proses elusi (*eluting*) dilakukan dengan penambahan 1 mL asetonitril. Analit yang keluar ini

ditampung dalam wadah lalu disentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit dan disaring dengan *membrane filter* 0,45 µm. Analit dalam *tube eppendorf* disiapkan untuk dianalisis lebih lanjut dengan KCKT. Kondisi ekstraksi SPE yang digunakan yaitu SPE C-18 dengan elusi asetonitril dan %*recovery* 101,2%.

Validasi metode analisis dari SPE C-18 dan SPE-MIP MAA adalah meliputi pembuatan kurva baku serta linieritas, akurasi atau ketepatan, presisi, selektivitas atau spesifisitas, serta batas deteksi (LOD) dan batas kuantisasi (LOQ).

Persamaan garis regresi linier dibuat berdasarkan rasio luas area kromatogram terhadap gliklazid (sumbu y) digunakan untuk menetapkan kadar glibenklamid (sumbu x) dengan SPE C-18 adalah y=0,938x+0,083 dengan r=0,996 (Gambar 1) sedangkan dengan SPE-MIP MAA adalah y=1,202x+3,025 dengan r=0,998 (Gambar 2).

Perhitungan kadar glibenklamid SPE C-18 berdasarkan perbandingan luas area kromatogram memberikan nilai presisi yang dinyatakan sebagai KV (%) dari konsentrasi 1, 2, dan 4 µg/mL berturutturut adalah 16,90%; 10,92%; dan 4,91% sedangkan untuk SPE-MIP MAA adalah 1,95%; 4,54%; dan 4,56%. Untuk nilai akurasi yang dinyatakan dalam rata-rata %recovery sampel dengan SPE C-18 konsentrasi 1, 2, dan 4 µg/mL berturutturut adalah 95,99% ± 10,20%; 99,2% ± 9.31%; dan  $105.17\% \pm 5.34\%$  sedangkan untuk SPE MIP MAA adalah 92,28% ± 18,35%;  $106,02\% \pm 8,33\%$ ; dan  $97,39\% \pm$ 15,25%.

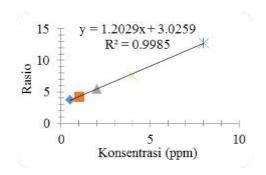


Gambar 1 Kurva Kalibrasi SPE C-18

Selektivitas dari metode tersebut dapat dilihat melalui daya keterpisahan (resolusi) kedua puncak. Pada SPE C-18 puncak glibenklamid dengan waktu retensi 6,54 menit terpisah dari puncak gliklazid dengan waktu retensi 4,33 menit dengan Rs=2,35 dan terpisah dari nilai resolusi puncak metformin dengan waktu retensi 1,14 menit dengan nilai resolusi Rs=5,89, sedangkan pada SPE-MIP MAA puncak glibenklamid dengan waktu retensi 6,49 terpisah dari puncak dengan waktu retensi 4,38 menit dengan Rs=2,5 dan terpisah dari nilai resolusi puncak metformin dengan waktu retensi 1,15 menit dengan nilai resolusi Rs=3,56, sesuai persyaratan untuk nilai resolusi yaitu >1,5.<sup>11</sup> Dengan nilai resolusi tersebut, dapat disimpulkan bahwa metode KCKT ini dapat digunakan untuk menganalisis glibenklamid dengan standar internal gliklazid.

Hasil uji LOD dan LOQ dihitung berdasarkan kurva kalibrasi glibenklamid dari persamaan yang mempunyai koefisien korelasi (r) terbaik. Nilai LOD yang telah diperoleh dengan SPE C-18 adalah sebesar 0,589583 μg/mL sedangkan dengan SPE-MIP MAA adalah 0,519972 μg/mL. Nilai LOQ yang diperoleh dengan SPE C18 adalah 1,965277 μg/mL sedangkan dengan SPE MIP MAA adalah sebesar 1,733239 μg/mL.

Hasil dari analisis perhitungan secara manual analisis varian ranking dua arah Friedman dan uji lanjut, dapat disimpulkan bahwa untuk preparasi menggunakan SPE C-18 dengan SPE-MIP monomer MAA memberikan perbedaan secara nyata.



Gambar 2 Kurva Kalibrasi SPE-MIP MAA

#### Pembahasan

Larutan baku glibenklamid dan glikazid dibuat dalam pelarut metanol karena glibenklamid dan gliklazid tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik seperti metanol dan asetonitril, 12 sedangkan larutan baku metformin HCl dibuat dalam pelarut air karena metformin larut dalam air. 13,14 Fase gerak yang digunakan TFA 0,1 % dalam akuabides, fase gerak dengan penambahan dikarenakan glibenklamid sebagai asam lemah dengan pKa 5,3 kelarutannya sangat tergantung dengan pH media uji dan ukuran partikel.<sup>15</sup>

Hasil penetapan nilai ekstingsi molar glibenklamid menunjukan bahwa nilai ekstingsi molar atau absorptivitas molar glibenklamid lebih besar dari 10.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, sehingga akan mudah dideteksi dan ditentukan kadarnya. 16

Optimasi awal dilakukan dengan dapar fosfat, perbandingan komposisi fase gerak asetonitril:dapar fosfat pH 6.5 (20:80; 40:60; 45:55; 50:50; 55:45; 60:40; 70:30). menggunakan Hasil optimasi kolom panjang 250 mm, puncak glibenklamid sebagai senyawa utama tidak memenuhi waktu retensi dan *peak* yang kriteria simetris. dihasilkan tidak Glibenklamid sebagai asam lemah dengan pKa 5,3 kelarutannya sangat tergantung dengan pH media uji dan ukuran partikel.<sup>17</sup> Sampel campuran glibenklamid, metformin dan gliklazid pada komposisi fase gerak 55:45 memiliki waktu retensi dan resolusi yang baik, namun puncak tidak simetri. Hal ini diduga karena stabilitas kolom yang kurang sehingga mengganggu pemisahan.

Optimasi dilanjutkan menggunakan kolom dengan panjang 150 mm dan fase gerak TFA 0,1% dalam akuabides sebagai pengganti dapar fosfat. Fase gerak dengan komposisi asetonitril:TFA (55:45) dengan kecepatan alir 1 mL/menit dipilih karena menghasilkan nilai resolusi (Rs) 2,66 (>1,5).

Uji kesesuaian sistem menggunakan kolom dengan panjang 150 mm dilakukan

tiga kali penyuntikan sampel glibenklamid 1 μg/mL dan metformin 2 μg/mL yang mengandung standar internal gliklazid 1 ug/mL. Konsentrasi tersebut dipilih untuk mewakili konsentrasi rendah, diasumsikan jika hasil konsentrasi rendah sudah dapat memberikan nilai yang baik, maka pada konsentrasi tinggi diharapkan memberikan nilai yang baik pula. Dapat diketahui %KV dari rasio luas area kromatogram adalah ini menunjukkan 1.5%. nilai bahwa analisis yang digunakan metode memenuhi kriteria kesesuaian sistem yaitu KV <15% untuk analisis sampel cairan hayati.18

Tahapan pertama ekstraksi dengan SPE adalah pengondisian menggunakan 1 mL metanol dan 1 mL akuabides. Hal tersebut untuk membersihkan cartridge SPE dari pengotor selama penyimpanan dan untuk membasahi cartridge SPE. konsistensi plasma darah yang agak kental, untuk efisiensi waktu maka penambahan sampel dilakukan sambil dialiri tekanan udara negatif dengan bantuan vakum. Hal ini untuk mempercepat proses ekstraksi dan mencegah tersumbatnya cartridge SPE. Proses pencucian pada tahapan SPE dilakukan menggunakan 1 mL metanol 5% dalam akuabides sehingga pengotor (zat endogen) dalam plasma darah dapat terbuang dan tidak mengganggu puncak glibenklamid dan gliklazid pada saat analisis dengan KCKT.

Diharapkan glibenklamid dan gliklazid yang tertinggal dalam cartridge SPE dapat terelusi atau terdorong keluar seluruhnya akibat proses pencucian. Analit yang telah disentrifugasi dan disaring hingga jernih dan tidak ada plasma yang menyumbat kolom KCKT kemudian disiapkan untuk dianalisis lebih lanjut dengan KCKT. Kondisi ekstraksi SPE yang digunakan yaitu SPE C-18 dengan eluting asetonitril %recovery 101,2%. Glibenklamid dan tidak larut dalam air, melainkan larut dalam pelarut organik seperti metanol dan asetonitril. 12 Asetonitril merupakan salah satu komposisi dari fase gerak, sehingga membantu dalam proses analisis KCKT.

Validasi metode analisis SPE C-18 dan SPE-MIP MAA meliputi pembuatan kurva baku dan linieritas, akurasi atau ketepatan, presisi, selektivitas atau spesifisitas, serta batas deteksi (LOD) dan batas kuantisasi (LOQ).

Uji linieritas dilakukan untuk melihat kemampuan metode analisis memberikan respon yang baik pada berbagai macam konsentrasi analit suatu pada kalibrasi untuk menghasilkan garis lurus. Parameter adanya hubungan yang linier dengan koefisien korelasi. dinyatakan Suatu metode analisis dikatakan valid bila mempunyai harga koefisien korelasi lebih dari 0,98.<sup>17</sup> Persamaan garis regresi linier dibuat berdasarkan rasio antara luas area kromatogram terhadap gliklazid (sumbu y) yang digunakan untuk menetapkan kadar glibenklamid (sumbu x) dengan SPE C-18 adalah y=0,938x+0,083 dengan r=0,996 (Gambar 1) sedangkan dengan SPE-MIP adalah y=1,202x+3,025r=0,998 (Gambar 2).

Penentuan akurasi ditentukan dengan metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau cara *absolute*. Pada metode ini, sejumlah analit bahan murni (senyawa pembanding kimia) ditambahkan ke dalam campuran, lalu dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya).<sup>2</sup>

Untuk mengetahui presisi dan akurasi, dibuat tiga variasi konsentrasi sampel glibenklamid kadarnya ditetapkan yang berdasarkan kurva kalibrasi glibenklamid. Perhitungan kadar sampel glibenklamid SPE C-18 berdasarkan perbandingan luas dari area kromatogram memberikan nilai presisi yang dinyatakan sebagai KV (%) dari konsentrasi 1, 2, dan 4 µg/mL berturut-turut adalah 16,90%; 10,92%; dan 4,91% sedangkan untuk SPE-MIP MAA adalah 1,95%; 4,54%; dan 4,56%. Untuk nilai akurasi yang dinyatakan dalam ratarata %recovery sampel dengan SPE C-18 konsentrasi 1, 2, dan 4 ug/mL berturutturut adalah 95,99%; 99,2%; dan 105,17% sedangkan untuk SPE-MIP MAA adalah 92,28%; 106,02%; dan 97,39%.

Nilai akurasi yang diperoleh dengan SPE C-18 dan SPE-MIP MAA sesuai dengan persyaratan, yaitu 80–120% untuk analisis cairan hayati. Nilai presisi yang diperoleh dengan SPE C-18 dan SPE-MIP MAA sesuai dengan persyaratan, yaitu dinyatakan dengan nilai KV <15% untuk konsentrasi tengah dan <20% untuk LLOQ. 17

Untuk mengetahui selektivitas metode yang digunakan, dapat dilihat dari daya keterpisahan (resolusi) kedua puncak. Pada SPE C-18 puncak glibenklamid dengan waktu retensi 6,54 menit terpisah dari puncak gliklazid dengan waktu retensi 4,33 menit dengan nilai resolusi Rs=2,35 dan terpisah dari puncak metformin dengan waktu retensi 1,14 menit dengan nilai resolusi Rs=5,89, sedangkan pada SPE-MIP MAA puncak glibenklamid dengan waktu retensi 6,49 menit terpisah dari puncak gliklazid dengan waktu retensi 4,38 menit dengan nilai resolusi Rs=2,5 dan terpisah dari puncak metformin dengan waktu retensi 1,15 menit dengan nilai resolusi Rs=3,56, sesuai persyaratan untuk nilai resolusi yaitu >1,5.11 Dengan nilai resolusi tersebut, dapat disimpulkan bahwa metode KCKT ini dapat digunakan untuk menganalisis glibenklamid dengan standar internal gliklazid.

LOD dan LOQ mutlak ditentukan jika analit yang dianalisis konsentrasinya relatif kecil seperti dalam matrik biologis. 17 Hasil uji LOD dan LOQ dihitung dari kurva kalibrasi glibenklamid dengan persamaan yang mempunyai koefisien korelasi (r) terbaik. Nilai LOD dan LOQ ditetapkan dari kurva kalibrasi glibenklamid terhadap rasio luas area kromatogram. Nilai LOD yang diperoleh dengan SPE C-18 adalah 0,589583 µg/mL sedangkan dengan SPE-MIP MAA adalah 0,519972 µg/mL. Nilai LOQ yang diperoleh dengan SPE C-18 adalah 1,965277 µg/mL sedangkan dengan SPE-MIP MAA adalah 1,733239 µg/mL.

Hasil analisis perhitungan manual analisis varian ranking dua arah Friedman dan uji lanjut, dapat disimpulkan bahwa untuk preparasi menggunakan SPE C-18 dengan SPE-MIP monomer MAA memberikan perbedaan secara nyata.

# Simpulan

Kondisi optimum untuk pemisahan glibenklamid menggunakan SPE-MIP MAA dari plasma darah manusia yaitu fase gerak asetonitril:TFA 0,1% (55:45 v/v) dengan laju alir 1 mL/menit dan panjang gelombang maksimum 227 nm. **Analisis** glibenklamid dengan teknik preparasi SPE-MIP MAA memenuhi persyaratan validasi bioanalisis dan sebanding dengan metode preparasi SPE C-18.

## **Daftar Pustaka**

- 1. Dora CP, Singh SK, Kumaar S, Datusalia AK, Deep A. Development and characterization of nanoparticles of glibenclamide by solvent displacement dethod. Acta Poloniae Pharmaceutica. 2010;(67)3:283–290.
- 2. Lakhsmi KS, Rajesh T. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of glipizide, rosiglitazone, pioglitazone, glibenclamide glimepiride and in pharmaceutical dosage forms and human plasma. Journal of The Iranian Chemical Society. 2011;8(1):31-37.
- 3. Gedeon C, Kapur B, Aleksa K, Koren G. A simple and rapid HPLC method for the detection of glyburide in plasma original research communication (analytical). Clin Biochem. 2008;41(3): 167–173.
- 4. Rajendran SD, Philip BK, Gopinath R, Suresh B. RPHPLC method for the estimation of glibenclamide in human serum. Ind J Pharm Sci. 2007;69(6): 796–799.
- 5. Albu F, Georgita C. David V. Medvedovici A. Determination of glibenclamide in human plasma by chromatography liauid and atmospheric chemical. pressure ionization/MS-MS detection. J

- Chromatogr B. 2007;846(1-2):222-229.
- Naraharisetti SB, Kirby BJ, Hebert MF, Easterling TR, Unadkat JD. Validation of a sensitive LC-MS assay for quantification of glyburide and its metabolite 4-transhydroxy glyburide in plasma and urine. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007; 860(1):4–34.
- 7. Georgita C, Albu F, David V, Medvedovici A. Simultaneous assay of metformin and glibenclamide in human plasma based on extraction-less sample preparation rocedure and LC/(APCI)MS. J Chromatogr. B. 2007; 854(1–2):211–218.
- 8. Fontanals N, Marce RM, Borrull F. Overview of the novel sorbents available in solid-phase extraction to improve the capacity and selectivity of analytical determinations. Institut d'Estudis Catalans, Barcelon. 2010;6 (2):199–213.
- 9. Qiao F, Sun H, Yan H, Row KH. Moleculary imprinted polymers for solid phase extraction. chromatographia. 17 November 2006; 64(11):625–634.
- 10. Haq N, Alanazi FK, Alsarra IA, Shakeel F. Rapid analysis of glibenclamide using an stabilityenvironmentally benign indicating rp-hplc method. [diunduh 5 Desember 2015]. Tersedia dari: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/artic les/PMC4177646/.
- GK. 11. Webster Supercritical fluid chromatography: advances and applications pharmaceutical in Pan analysis. The United State: Standford Publishing; 2014:241.
- 12. Lakhsmi, Karunanidhi S, Tirumala Rajesh. Separation and quantification of eight antidiabetic drugs on a high performance liquid chromatography: its application to human plasma assay. International Scholarly Research Network. ISRN Pharmaceutics. 2011; 2011(3):7.

- 13. Ankit A, Govind RS, Raju S, Mithilesh. Dev JA. Gastroretentive system of metformin: an approach to enhance its oral bioavailability. International Journal of Research in Pharmacy and Science (IJRPS). 2013; 3(2):7-59.
- 14. Gabr QR, Padwal RS, Brocks DR. Determination of metformin in human plasma and urine by high performance liquid chromatography using small sample volume and conventional cctadecyl silane column. J Pharm Pharmaceut Sci. 2010;13(4):486–494.
- 15. Mohd AB, Swathimutyam P, Rao AP, Shastri N, Diwan PV. Development and validation of glibenclamide in nanoemulsion formulation by using

- RP-HPLC. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences (JPBMS). 2011;8(08):1–5.
- 16. Colclough N, Hunter A, Kenny PW, Kittlety RS, Lobedan L, Tam KY, Timms MA. High throughput solubility determination with application to selection of compounds for fragment screening. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2008;16(13):6611–6616.
- 17. Naha A, Rai I, and Kamath V. Development and validation of bioanalytical method for estimation of glibenclamide. Universal Journal of Pharmacy. 2014;3(5):42–45.