



RESEARCH ARTICLE

VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR METFORMIN DALAM PLASMA DARAH YANG DIBERIKAN BERSAMAAN DENGAN PEMBERIAN SARI BUAH PARE (*Momordica charantia* L.) SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

Armon Fernando^{1*}, Nurafika Kurniawan Putri¹, Haiyul Fadhli¹

¹Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau; Jalan Kamboja, Kelurahan Simpang Baru, Pekanbaru, 28293

*e-mail korespondensi: armonfernando@stifar-riau.ac.id

Article History

Received:

12 April 2023

Accepted:

8 Agustus 2024

Published:

9 Agustus 2024

ABSTRAK

Pada penelitian ini telah dilakukan validasi metode penetapan kadar metformin dalam plasma darah manusia yang diberikan bersamaan dengan sari buah pare (*Momordica charantia* L.) secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Sari buah pare juga memiliki senyawa mebalit sekunder yang dapat mempengaruhi analisis metformin di dalam darah. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan metode yang valid untuk penetapan kadar metformin terhadap pemberian sari buah pare dalam plasma manusia secara *in vitro* menggunakan KCKT dengan detektor UV menggunakan glibenklamid sebagai *internal standard*. Sistem KCKT menggunakan fase terbalik dengan kolom VP-ODS C-18, panjang kolom 5 μ m, 4,6 x 150 mm. Fase gerak yang di gunakan dengan komposisi metanol:air (SDS 3 mM) pH 3 dengan *phosporic acid* (60:40) dengan kecepatan alir 1 mL/menit dan dideteksi pada panjang gelombang 226 nm. Berdasarkan hasil penelitian didapat nilai LOD sebesar 0,24 ppm dan nilai LOQ sebesar 0,8 ppm dari persamaan regresi $y=0,0184x+0,0726$ dengan koefisien korelasi (R^2) 0,9979. Hasil uji akurasi tidak memenuhi persyaratan yaitu persen uji perolehan kembali tidak kurang dari 80% dan tidak lebih dari 120%, sedangkan hasil uji presisi telah memenuhi persyaratan dengan nilai persen koefisien variasi tidak lebih dari 20%.

Kata kunci: KCKT, metformin, *Momordica charantia* L., validasi metode

ABSTRACT

In this study, validation of method for determining metformin levels in human blood plasma given together with bitter melon juice (*Momordica charantia* L.) has been performed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Bitter melon juice also has secondary metabolites which can affect the analysis of metformin in the blood. The aim of this research is to obtain a valid method for determining metformin levels when administering bitter melon juice in human plasma *in vitro* using HPLC with a UV detector using glibenclamide as an internal standard. The HPLC system uses reverse phase with a VP-ODS C-18 column, column length 5 μ m, 4.6 x 150 mm. The mobile phase used was a composition of methanol: water (SDS 3 mM) pH 3 with phosphoric acid (60:40) with a flow speed of 1 mL/minute and detected at a wavelength of 226 nm. The research results obtained an LOD value of 0.24 ppm and a LOQ value of 0.8 ppm from the regression equation $y=0.0184x+0.0726$ with a correlation coefficient (R^2) of 0.9979. The results of the accuracy test do not meet the requirements, namely the percent recovery test is not less than 80% and not more than 120%, while the precision test results meet the requirements with a percent coefficient of variation value of not more than 20%.

Keywords: HPLC, metformin, *Momordica charantia* L., validation method

©Fernando *et al.*

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

PENDAHULUAN

Diabetes Mellitus (DM) merupakan sekelompok gangguan heterogen yang ditandai oleh kelainan dalam metabolisme karbohidrat, protein dan lemak (Nugroho, 2006). Obat oral diabetes yang bekerja tanpa mempengaruhi kadar insulin dalam plasma yaitu metformin. Metformin menurunkan kadar glukosa dengan menurunkan resistensi insulin, terutama di hati

dan otot, serta menurunkan absorpsi glukosa di dalam usus (Marić, 2010). Selain dengan obat-obatan konvensional seperti metformin, diabetes melitus juga dapat diatasi dengan pengobatan alami yang memanfaatkan tanaman berkhasiat obat (Wijayakusuma, 2004).

Salah satu jenis tanaman yang banyak digunakan sebagai herbal adalah buah pare

(*Momordica charantia* L.) yang tidak asing di kalangan masyarakat awam, dapat dimanfaatkan dan harganya yang relatif murah. Di wilayah Asia dan Afrika, pare banyak dimanfaatkan sebagai anti diabetes (Sayoeti, 2015). Pare secara tradisional dikenal sebagai obatnya sifat-sifat seperti antidiabetik, antikanker, antiinflamasi, antivirus, dan efek penurun kolesterol. Pare mengandung banyak senyawa fenolik yang mungkin memiliki potensi sebagai antioksidan dan antimutagen. Senyawa aktivitas pada pare yang bertanggung jawab atas efek antidiabetik adalah triterpen, protein, steroid, alkaloid, lipid, dan senyawa fenolik (Saeed *et al.*, 2010; Budrat and Shotipruk, 2008). Senyawa utama yang telah diisolasi dari pare yang diidentifikasi sebagai agen hiperglikemik adalah saponin, charantin, polipeptida-p dan vicine (Joseph and Jini, 2013).

Pada penelitian yang dilakukan oleh (Surawan and Efendi, 2012) mengatakan bahwa pare memiliki kemampuan untuk mengembalikan berat badan dan mengatur kadar glukosa darah tikus diabetes. Dimana jus buah pare lebih efektif dalam mengurangi kadar glukosa darah. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Prameshti, Ardana and Indriyanti, 2019) menyatakan bahwa penggunaan pare bersamaan dengan metformin sekali dalam sehari merupakan pilihan yang baik. Namun pada penggunaan dua kali sehari dapat menginduksi hipoglikemik pada tikus bahkan menyebabkan kematian.

Berbagai kendala sering terjadi saat melakukan penetapan kadar obat didalam sampel biologis, sehingga diperlukan suatu metode analisis yang memiliki selektifitas dan sensitifitas yang tinggi (Rusmalina and Lukitaningsih, 2014). Validasi adalah suatu proses dokumentasi atau pembuktian bahwa metode analisis menghasilkan data analitik yang dapat diterima untuk tujuan penggunaannya. Langkah awal untuk pengembangan suatu metode dan validasinya yaitu penentuan standar minimum yang merupakan spesifikasi dari metode untuk tujuan yang ingin dicapai (Christian, 2004).

Validasi metode pada penetapan kadar metformin secara *in vitro* menggunakan matriks plasma darah manusia terhadap pemberian sari buah pare perlu dilakukan untuk mendapatkan metode valid yang dapat dipercaya, pada penetapan kadar metformin secara *in vitro* terhadap pemberian sari buah pare (*Momordica charantia* L.) menggunakan alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Sari buah pare juga memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder yang dikawatirkan dapat mengganggu proses pemisahan senyawa metformin dari dalam plasma darah. Sehingga perlu serangkaian proses pemisahan senyawa mulai dari preparasi sampel di dalam plasma hingga dapat dianalisis menggunakan KCKT. KCKT merupakan metode yang sering digunakan untuk menganalisis senyawa obat yang memiliki beberapa

kelebihan diantaranya, kecepatan waktu analisis, daya pisahnya baik dan selektif, kepekaan yang tinggi, kolom dapat digunakan kembali (Gandjar and Rohman, 2007).

Pada penelitian yang dilakukan oleh (Asniwati, 2016) menunjukkan bahwa validasi metode penetapan kadar metformin gabungan sediaan herbal antidiabetes dalam plasma darah manusia secara *in vitro* telah memenuhi persyaratan validasi dengan nilai LOD 1,14 ppm, LOD sebesar 0,34 ppm dan nilai regresi $y=0,111+0,1113x$ serta koefisien korelasi (r) 0,9994. Perolehan kembali yang didapat tidak kurang dari 88% dan tidak lebih dari 112% serta nilai koefisien variasi yang didapat $\leq 15\%$ pada semua konsentrasi uji. Sistem KCKT yang digunakan yaitu fase terbalik dengan kolom C-18, panjang kolom 150 x 4,6 dengan kecepatan alir 1 mL/menit dengan panjang gelombang 230 nm. Volume penyuntikan yang digunakan yaitu 20 μ L pada komposisi fase gerak metanol : air (SDS 3 mM) pH 3 dengan *orthophosphoric acid* (60:40).

Dalam proses validasi ini digunakan *internal standard* glibenklamid untuk mencegah kesalahan dalam pengukuran karena proses metode yang cukup panjang dengan sampel uji yang cukup kecil konsentrasinya. Pemilihan glibenklamid sebagai *internal standard* mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh (Naveed *et al.*, 2011) bahwa glibenklamid dapat terpisah baik dengan metformin.

Berdasarkan uraian diatas, dirasa perlu melakukan validasi metode penetapan kadar metformin dalam plasma darah terhadap pemberian sari buah pare (*Momordica charantia* L.) secara kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Penelitian ini diharapkan dapat memberikan sebuah metode yang valid untuk penetapan kadar metformin terhadap pemberian sari buah pare (*Momordica charantia* L.) dalam plasma manusia secara *in vitro* menggunakan KCKT dengan detektor UV.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah blender (Philips® HR2223), penyaring sampel PTFE 0,45 μ m (CNW® Technologies), *pH-indikator strips* (MColorpHast®), timbangan analitik (Shimadzu® ATY-224), sentrifugator (Centrifuge PLC Series®), vortex (IKA®), pipet mikro (Scorex® Acura-825), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu® UV-1900i), seperangkat alat kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu® 02793), dan alat-alat gelas lainnya..

Bahan

Bahan yang digunakan adalah sari buah pare (*Momordica charantia* L.), aquabidest, *sodium deodecyl sulfate* (SDS) (Merck®), metformin (Badan

POM), glibenklamid (Badan POM), *Buffer fosfat* 0,05 M pH 6,8 (kalium hidrogen fosfat 0,2 M (Merck®) dan natrium hidroksida 0,2 N (Jatibeker®), metanol for HPLC (Merck®), asetonitril for HPLC (Merck®), dan plasma darah manusia (PMI Pekanbaru).

Prosedur

Pembuatan Sari Buah Pare

Sari buah pare dibuat dari \pm 75 gram daging buah pare (*Momordica charantia* L.) yang dipisahkan dari bijinya, kemudian dihaluskan menggunakan alat blender tanpa penambahan air, kemudian diperas dan disaring dengan kertas saring untuk diambil sarinya, sehingga diperoleh sari pare sebanyak \pm 30 mL. Sari pare yang digunakan adalah sari segar yang dibuat setiap hari selama intervensi (Asniwati, 2016).

Pembuatan Larutan Air (SDS 3 mM) pH 3 dengan Phosphoric Acid

Larutan air (*sodium deodecyl sulfat* (SDS) 3 mM) pH 3 dengan *phosphoric acid* dibuat dengan melarutkan *sodium deodecyl sulfat* (SDS) sebanyak 0,8651 gram dengan aquabidest hingga 1000 mL, kemudian pH larutan diukur menggunakan pH indikator dan ditambahkan *phosphoric acid* hingga pH larutan menjadi pH 3 (Asniwati, 2016).

Pembuatan Larutan Metformin dan Glibenklamid (Internal Standard) 100 ppm, 10 ppm dan 1 ppm

Metformin dan glibenklamid (*internal standard*) masing-masing sebanyak 10 mg dilarutkan dalam masing-masing 10 mL metanol for HPLC hingga diperoleh larutan 1000 ppm. Selanjutnya dibuat konsentrasi 100 ppm, konsentrasi 10 ppm dan konsentrasi 1 ppm dibuat dengan cara mengencerkan dari larutan induk 1000 ppm kedalam labu ukur 10 mL dengan metanol for HPLC sampai tanda batas. Masing-masing larutan diberi label penanda perhitungan (Asniwati, 2016).

Penetapan Panjang Gelombang Analisis Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Diukur masing-masing panjang gelombang metformin dan glibenklamid (*internal standard*) konsentrasi 10 ppm dengan spektrofotometer UV-Vis. Setelah diperoleh spektrum metformin dan glibenklamid (*internal standard*) gabungkan kedua spektrum tersebut sehingga terlihat garis perpotongan antara metformin dan glibenklamid (*internal standard*), karena pada perpotongan garis tersebut dapat memberikan serapan maksimal dari kedua senyawa (Asniwati, 2016).

Optimasi Kondisi Analisis KCKT

Pemilihan Komposisi Fase Gerak

Larutan gabungan metformin konsentrasi 1 ppm dan glibenklamid konsentrasi 10 ppm disaring dengan

PTFE 0,45 μ m dan diinjeksikan 20 μ L melalui injektor KCKT dengan menggunakan beberapa komposisi fase gerak:

- Asetonitril : Metanol : Buffer fosfat 0,05 M pH 6,8 (60:20:20) dan (60:30:10) (Wulandari, 2018)
- Asetonitril : Air (SDS pH 3) variasi konsentrasi SDS (1 ; 2 ; dan 3 mM) dengan *phosphoric acid*
- Metanol : Air (SDS 3 mM) variasi pH (3 ; 4 ; dan 5) dengan *phosphoric acid*
- Metanol : Air (SDS 3 mM) pH 3 dengan *phosphoric acid* (70:30), (75:25), dan (80:20) (Asniwati, 2016)

Pemilihan Kecepatan Alir

Larutan metformin 1 ppm dan glibenklamid (*internal standard*) 10 ppm diinjeksikan ke kolom KCKT dengan fase gerak terpilih. Pemilihan laju alir dipilih berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Asniwati(2016), yang menyatakan bahwa kondisi optimum laju air pada penetapan kadar campuran metformin dan glibenklamid (*internal standard*) menggunakan KCKT adalah 1 mL/menit. Kemudian divariasikan menjadi 0,8 mL/menit dan 1,2 mL/menit. Dicatat waktu retensi, faktor ikutan (Tf), jumlah plat teoritis (N), HETP dan resolusi. Kemudian dipilih kecepatan alir terbaik untuk digunakan pada prosedur selanjutnya.

Optimasi Ekstraksi Plasma

Pada proses ekstraksi plasma kondisi awal yang dilakukan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Asniwati(2016), plasma yang mengandung metformin 1 ppm, glibenklamid (*internal standard*) 1 ppm dan pare yang divortex selama 20 detik dan disentrifus 4.000 RPM dengan penambahan asetonitril for HPLC 6 mL. Dilakukan beberapa modifikasi optimasi yaitu optimasi berdasarkan lama waktu vortex, penambahan pelarut, kekuatan sentrifus dan konsentrasi glibenklamid (*internal standard*) yang digunakan untuk mendapatkan proses ekstraksi yang paling optimal.

Validasi Metode Analisis

Uji Spesifisitas

Berdasarkan hasil optimasi ekstraksi plasma yang telah dilakukan, supernatan (cairan bening pada lapisan atas dan berwarna bening) diambil kemudian disaring dengan penyaring PTFE 0,45 μ m dan diinjeksikan sebanyak 20 μ L ke dalam kolom KCKT pada kondisi terpilih, amati adanya gangguan pada kromatogram disekitar waktu retensi metformin dan glibenklamid sebagai *internal standard*. Selanjutnya metformin 1 ppm sebanyak 0,25 mL ditambah glibenklamid (*internal standard*) 100 ppm sebanyak 0,25 mL dikocok homogen, lalu ditambahkan 0,25 mL plasma dikocok homogen. Begitu juga pada plasma yang mengandung metformin, glibenklamid (*internal standard*) dan sari segar pare di tambahkan sebanyak 0,1 mL.

Pembuatan Kurva Kalibrasi

a. Pembuatan Larutan Deret Metformin

Dalam Asniwati (2016), deret konsentrasi metformin yang digunakan yaitu 0,5; 1; 2,5; 5; dan 10 ppm. Modifikasi deret konsentrasi dilakukan untuk melihat selektifitas dan spesifisitas pembacaan konsentrasi metformin dalam konsentrasi yang diperkecil yaitu pada konsentrasi 0,1 ; 0,5 ; 1,5 ; 3 dan 6 ppm dari larutan induk metformin 100 ppm dalam labu ukur 5 mL.

b. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi dibuat berdasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Asniwati (2016) dan dimodifikasi. Sebanyak 0,25 mL dari masing-masing seri konsentrasi larutan metformin 0,1 ; 0,5 ; 1,5 ; 3 dan 6 ppm yang ditambah 0,25 mL glibenklamid (*internal standard*) konsentrasi 100 ppm dan ditambah plasma sebanyak 0,25 mL serta sari buah pare sebanyak 0,1 mL. Ekstraksi dilakukan seperti pada cara penyiapan sampel spesifisitas. Sebanyak 20 µL dari masing-masing konsentrasi yang telah diekstraksi diinjeksikan ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Kemudian dari data pengukuran dibuat kurva kalibrasi dengan menggunakan persamaan garis regresi ($y=a+bx$) dimana y adalah pembagian antara luas area metformin dan glibenklamid (*internal standard*) dan x adalah konsentrasi metformin.

Uji Linearitas

Dari data pengukuran pada pembuatan kurva kalibrasi, linearitas diperoleh dengan menghitung koefisien korelasi (r) dari persamaan garis regresi menggunakan perangkat lunak komputer *microsoft office excel*.

Uji Limit Deteksi dan Limit Kuantitasi

LOQ dihitung melalui persamaan garis regresi linier dari kurva kalibrasi dengan rumus:

$$LOQ = \frac{10 (Sy/x)}{b} \quad (1)$$

Nilai batas deteksi (LOD) diperoleh dengan rumus:

$$LOD = \frac{3 (Sy/x)}{b} \quad (2)$$

Dimana (Sy/x) adalah standar error dari intersep, b adalah koefisien slope dari persamaan regresi menggunakan perangkat lunak komputer *microsoft office excel*.

Uji Akurasi dan Presisi

Sebanyak 20 µL dari larutan metformin dalam plasma pada konsentrasi rendah (0,24 ppm), sedang (0,8 ppm) dan tinggi (3 ppm) dengan penambahan 0,25 mL glibenklamid (*internal standard*) konsentrasi 100 ppm pada masing-masing konsentrasi diinjeksikan ke

dalam kolom KCKT pada kondisi terpilih. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing konsentrasi. Kemudian hitung %UPK (%Uji Perolehan Kembali) dan KV (Koevisien Variasi) pada masing-masing konsentrasi. Uji akurasi dan presisi ini dilakukan secara *intraday* dan *interday* selama 3 hari.

Analisis Data

- Analisis menggunakan program *microsoft excel* dengan data analisis regresi dimana diperoleh 3 keluaran, yaitu *summary output*, ANOVA (*Analysis of Variance*) dan *residual output*. Data tersebut digunakan untuk mendapatkan kurva kalibrasi metformin dan glibenklamid (*internal standard*) sehingga diperoleh persamaan regresi $y = a + bx$ serta koefisien korelasi (r). Persamaan regresi yang didapat akan menghasilkan nilai limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ).
- Analisis limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ) diperoleh dari hasil kali 3 (LOD) dan 10 (LOQ) dengan standar error (Sy/x) dari intersep yang dibagi dengan nilai koefisien slope (b).

Analisis akurasi dan presisi didapatkan dari hasil perhitungan data analisis regresi dan menggunakan *microsoft excel* sehingga diperoleh % uji perolehan kembali (% UPK), standar deviasi (SD), dan koefisien variasi (KV).

$$\% \text{UPK} = \frac{B}{A} \times 100 \% \quad (3)$$

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \% \quad (4)$$

Dimana B adalah konsentrasi sampel hasil penyuntikan setelah luas area diplotkan pada kurva kalibrasi, A adalah konsentrasi sampel yang ditimbang, n adalah jumlah data, sedangkan \bar{x} adalah rata-rata konsentrasi data.

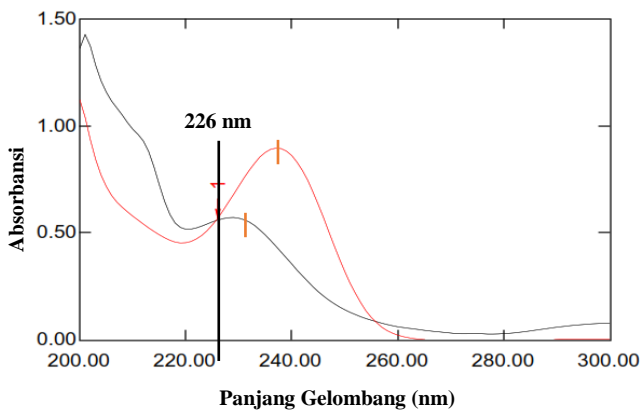
HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan mengenai validasi metode penetapan kadar metformin dalam plasma darah yang diberikan bersamaan dengan pemberian sari buah pare (*Momordica charantia* L.) secara kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), maka diperoleh hasil identifikasi sampel tanaman dilakukan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Riau menunjukkan bahwa sampel yang digunakan adalah buah pare atau (*Momordica charantia* L.).

Penetapan Panjang Gelombang Analisis Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Hasil pada penetapan panjang gelombang maksimum yang dipilih untuk analisis metformin dan

glibenklamid (*internal standard*) yaitu pada panjang gelombang maksimum 226 nm, Dapat dilihat pada **Gambar 1, Tabel 1.**



Gambar 1. Spektrum UV panjang gelombang maksimum metformin dan glibenklamid (*internal standard*) dalam pelarut metanol dengan perpotongan spektrum pada panjang gelombang maksimum 226 nm yang digunakan untuk deteksi

Tabel 1. Data Absorbansi Baku Metformin dan Glibenklamid (*Internal Standard*)

Keterangan	Panjang Gelombang	Absorbansi
Metformin 10 ppm	237 nm	0,896
Glibenklamid 10 ppm	229 nm	0,571
Titik Potong	226 nm	0,559

Panjang gelombang metformin dan glibenklamid sebagai *internal standard* di tumpang tindihkan (*overlay*) sehingga diperoleh titik potong. Panjang gelombang maksimum dari kedua senyawa yaitu 226 nm, karena terjadi tumpang tindih kurva absorbansi pada titik tersebut yang masih dapat memberikan serapan maksimal.

Penentuan panjang gelombang maksimum dari suatu senyawa bertujuan untuk memberikan kepekaan sampel yang mengandung metformin dan glibenklamid (*internal standard*) dengan maksimal, sehingga memungkinkan untuk menganalisis metformin didalam matriks biologi dengan konsentrasi terkecil dengan penyerapan yang maksimal (Asniwati, 2016).

Panjang gelombang maksimum yang diperoleh terdapat perbedaan dengan literatur lain yaitu 230 nm (Asniwati, 2016). Hal ini dapat disebut sebagai pergeseran panjang gelombang, yang dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti kondisi instrumen dan perbedaan peralatan yang digunakan (Romdhoni and

Mufid, 2017). Perbedaan sampel yang digunakan juga dapat mempengaruhi panjang gelombang maksimum. Alat-alat penunjang seperti alat gelas dan lainnya pada penelitian ini juga dapat mengakibatkan terjadinya pergeseran panjang gelombang.

Optimasi Kondisi Analisis KCKT

Salah satu jenis silika termodifikasi adalah silika oktadesil (ODS atau C18), yang merupakan fasa diam yang paling banyak digunakan karena dapat memisahkan senyawa-senyawa yang polaritasnya rendah, sedang, dan tinggi (Rohman, 2009). Sistem elusi yang digunakan yaitu sistem elusi isokratik, elusi isokratik adalah sistem elusi dengan komponen fase gerak tidak berubah selama masa analisis (Harvey, 2000).

Penambahan glibenklamid (*internal standard*) diperlukan untuk mencegah terjadinya kesalahan dalam analisis yang akan berdampak besar pada hasil analisis, seperti kesalahan dalam proses preparasi atau penyiapan sampel dan injeksi sampel yang akan mempengaruhi hasil dari analisis. *Internal standard* yang digunakan dalam penelitian ini adalah glibenklamid. Penggunaan glibenklamid sebagai *internal standard* karena glibenklamid merupakan senyawa yang berbeda dengan analit dan mampu terpisah dengan baik selama proses pemisahan. Hal ini telah dibuktikan oleh penelitian yang dilakukan oleh Asniwati (2016) dan Muadifah (2017).

Hasil pada optimasi kondisi analisis KCKT diperoleh dari 2 cara, yaitu pemilihan komposisi fase gerak dan pemilihan kecepatan alir. Hasil dari pemilihan komposisi fase gerak dari berbagai pelarut elusi menggunakan kolom VP-ODS C-18 berukuran 5 µm, 4.6 x 150 mm yang dianalisis pada panjang gelombang maksimum 226 nm, dengan kecepatan alir 1 mL/menit dan volume injeksi 20 µL.

Setelah dilakukan beberapa percobaan untuk mendapatkan fase gerak dan laju alir yang tepat, maka diperoleh fase gerak yang digunakan yaitu metanol : air (SDS 3 mM) pH 3 komposisi 60 : 40 diperoleh waktu retensi metformin dalam plasma manusia secara *in vitro* t_R 8,122 menit dan glibenklamid (*internal standard*) t_R 20,374 menit. Hasil pada pemilihan kecepatan alir yang terpilih yaitu 1 mL/menit, hasil yang diperoleh telah sesuai dengan parameter yang telah ditentukan. Luas area yang diperoleh 8,122, jumlah N 43927, HETP 3,415, Tailing Factor 0,962 dan resolusi 33,778. Hasil dapat dilihat pada **Gambar 2, Tabel 2.**

Metformin adalah senyawa yang memiliki kelarutan sangat polar sehingga analisis dengan kondisi ini akan menyebabkan metformin muncul di waktu retensi yang cepat. Penentuan kadar metformin dalam plasma akan sulit karena tumpang tindih atau *overlapping* antar puncak metformin dan senyawa lain

yang terdapat dalam plasma pada kromatogram (Asniwati, 2016).

Fase gerak yang digunakan dengan penambahan *Sodium Deodecyl Sulfate* (SDS), SDS adalah senyawa yang bersifat sebagai surfaktan yang dapat menurunkan tegangan permukaan yang membuat kepolaran dari fase gerak menjadi berkurang (Rusmalina and Lukitaningsih, 2014; Asniwati, 2016).

Fungsi dari penambahan *phosporic acid* adalah untuk menurunkan pH fase gerak yang akan mempengaruhi waktu retensi dari analit. pH sangat mempengaruhi kelarutan zat yang memiliki sifat asam maupun basa lemah. Zat yang bersifat basa lemah akan lebih mudah larut apabila berada pada suasana asam, sedangkan zat yang bersifat asam lemah akan lebih mudah larut apabila berada pada suasana basa (Sinala, 2016). Metformin merupakan senyawa obat yang memiliki sifat asam lemah sehingga metformin akan muncul pada waktu retensi yang lebih cepat dan glibenklamid (*internal standard*) dapat tertahan sedikit lebih lama dibandingkan metformin.

Optimasi Ekstraksi Plasma

Ekstraksi cair-cair adalah pemisahan satu atau lebih komponen campuran yang dipisahkan dengan bantuan pelarut (Rahayu, 2009) dalam (Rizalina et al., 2018). Prinsip pada ekstraksi ini adalah satu atau lebih bahan komponen suatu campuran dipisahkan berdasarkan kelarutan suatu pelarut “like dissolve like”. Ekstraksi ini digunakan untuk memisahkan analit dari komponen pengotor atau impuritis dalam suatu sampel (Tarigan, 2012).

Hasil optimasi ekstraksi plasma yang akan digunakan pada analisis yaitu menggunakan plasma yang mengandung metformin 1 ppm, glibenklamid (*internal standard*) 100 ppm dan sari buah pare yang divortex selama 20 detik dan disentrifus dengan kekuatan 4.000 RPM dengan penambahan asetonitril for HPLC sebanyak 6 mL. Hasil dapat dilihat pada **Gambar 3**.

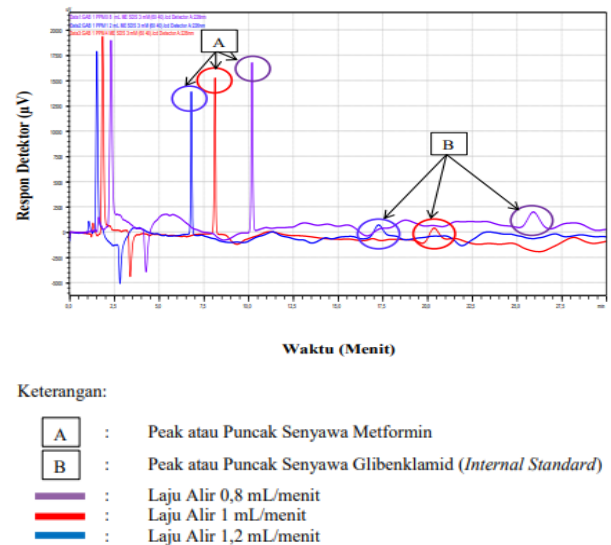
Pelarut organik yang digunakan yaitu asetonitril for HPLC, penambahan asetonitril pada larutan yang mengandung protein dalam air akan menyebabkan penurunan KD (Konstanta Dielektrik) pelarut atau air, sehingga akan meningkatkan penarikan antara molekul-molekul bermuatan dan memberikan interaksi elektrostatik protein. Asetonitril juga akan menggantikan beberapa molekul air disekitar daerah hidrofob dari permukaan protein yang berikatan dengan protein sehingga menurunkan konsentrasi air dalam larutan sehingga kelarutan protein akan menurun dan memungkinkan terjadinya pengendapan (Evans, 2004).

Pada konsentrasi glibenklamid (*internal standard*) 10 ppm peak atau puncak senyawa glibenklamid tidak dapat terbaca dan peak atau puncak

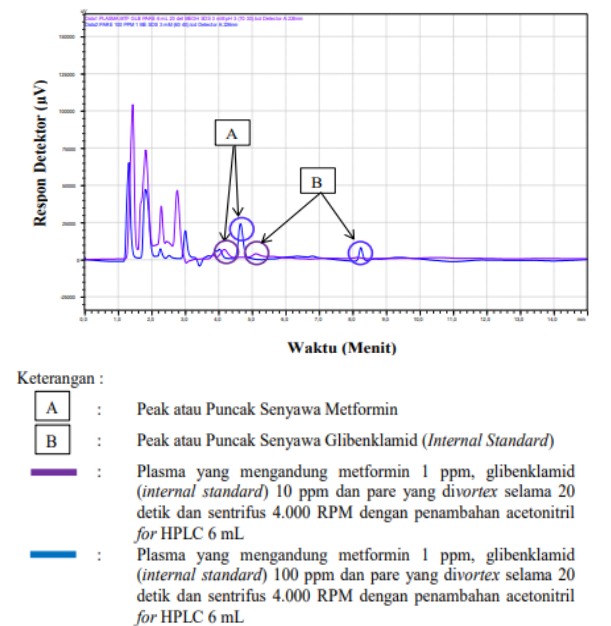
senyawa terlalu melebar sehingga luas area tidak terbaca. Sehingga pada penelitian ini dipilih menggunakan glibenklamid (*internal standard*) dengan konsentrasi 100 ppm.

Validasi Metode

Hasil validasi metode analisis dapat dilihat dari hasil uji spesifisitas, kurva kalibrasi, uji limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ), serta uji akurasi dan presisi.






Gambar 2. Pemilihan fase gerak dan laju alir metanol : air (SDS 3 mM) pH 3 dengan *phosporic acid* (60:40)



Gambar 3. Kromatogram optimasi ekstraksi plasma

Tabel 2. Data pemilihan fase gerak dan laju alir metanol : air (SDS 3 mM) pH 3 dengan *phosporic acid* (60:40)

Ket.	Laju Alir (mL/menit)	Waktu Retensi (Menit)		Luas Area		Jumlah N		Faktor Ikutan		HETP		Resolusi	
		Mtf	Glb	Mtf	Glb	Mtf	Glb	Mtf	Glb	Mtf	Glb	Mtf	Glb
	0,8 mL/menit	10,107	25,918	104239	71262	54486	7382	1,004	1,072	2,753	20,319	37,252	22,762
	1 mL/menit	8,122	20,374	83410	42454	43927	7501	0,962	1,05	3,415	19,998	33,778	22,357
	1,2 mL/menit	6,805	17,269	67692	35642	38097	6378	1,065	1,004	3,937	35642	32,741	20,837

Keterangan: Mtf = Metformin, Glb = Glibenkamid (*internal standard*)

Tabel 3. Data Hasil Uji Akurasi dan Presisi, didapatkan nilai akurasi melebihi nilai persyaratan dan presisi yang sudah memenuhi persyaratan

Konsentrasi Uji	Luas Area		PAR	Konsentrasi Terukur (ppm)	%UPK	SD	KV
	Mtf	Glb					
0,24 ppm	80351	463410	0,1733	5,461	2275,5	±169,4460	7,54
	82587	461831	0,1788	5,755	2398,1		
	77518	472741	0,1639	4,951	2063,2		
	Rata-rata			5,389	2245,6		
0,8 ppm	78264	464850	0,1683	4,951	618,9	±99,6732	19,7
	65472	464079	0,1410	3,712	464,0		
	63419	463584	0,1368	3,462	432,8		
	Rata-rata			4,042	505,2		
3 ppm	92711	473289	0,1958	6,679	222,6	±15,9669	6,72
	99253	464967	0,2134	7,630	254,3		
	92632	456617	0,2028	7,056	235,2		
	Rata-rata			7,122	237,3		

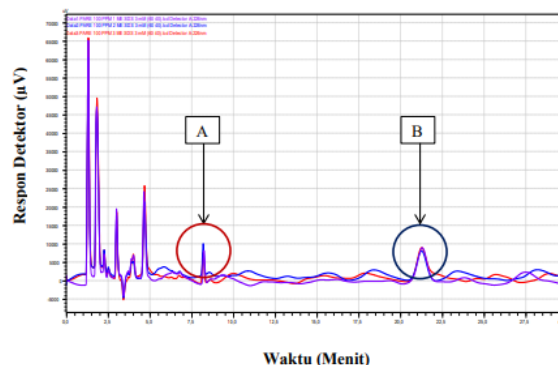
Keterangan: Mtf = Metformin, Glb = Glibenkamid (*internal standar*) 100 ppm, PAR = peak area ratio, %UPK = uji perolehan kembali (80-120%), SD = standar deviasi, KV = koefisien variasi (KV ≤20%)

Hasil uji spesifisitas menunjukkan bahwa penambahan metformin dan glibenkamid (*internal standard*) serta sari buah pare dalam plasma tidak menunjukkan adanya gangguan disekitar waktu retensi (menit) metformin dan glibenkamid (*internal standard*), hasil dapat dilihat pada **Gambar 4**. Spesifisitas ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung senyawa lain maupun pengotor atau perbandingan hasil analisis sampel tanpa penambahan bahan lain (Harmita, 2004).

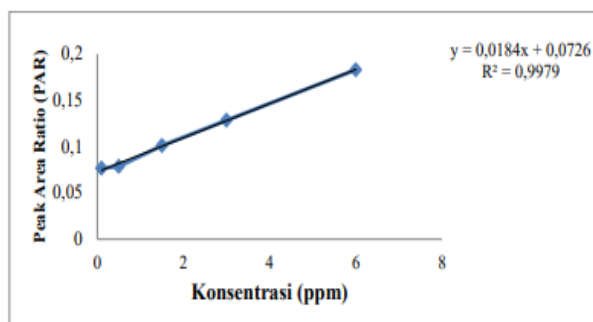
Linieritas merupakan kemampuan suatu metode analisis yang menghasilkan gambaran hubungan antara respon instrumen terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Linearitas ditentukan dari nilai koefisien korelasi (r^2) persamaan regresi kurva kalibrasi hubungan antara luas area dengan konsentrasi standar metformin (Harmita, 2004). Untuk mendapatkan persamaan regresi dapat menggunakan program pada Microsoft Excel dengan data analisis regresi (Junaidi, 2014).

Hasil dari pengukuran kurva kalibrasi pada rentang konsentrasi metformin dalam plasma, yaitu 0,1; 0,5; 1,5; 3 dan 6 ppm dengan penambahan glibenkamid (*internal standard*) 100 ppm. Persamaan regresi yang didapatkan dari perhitungan analisis

regresi menggunakan program microsoft excel, sehingga diperoleh persamaan regresi linier yaitu $y = 0,0184x + 0,0726$ dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9979. Adapun (x) menunjukkan konsentrasi metformin dan (y) menunjukkan rasio puncak metformin dengan glibenkamid (*internal standard*), dapat dilihat pada **Gambar 5**.



Gambar 4. Kromatogram uji spesifisitas campuran metformin dan glibenkamid (*internal standard*) dalam matriks plasma dan sari pare diketahui tidak ada gangguan di sekitar puncak senyawa metformin dan glibenkamid.



Gambar 5. Kurva kalibrasi metformin dan glibenklamid (*internal standard*) dalam plasma darah manusia *in vitro*

Hasil uji LOD dan LOQ diperoleh dari perhitungan fungsi regresi menggunakan Microsoft Excel (Rumus 1 dan 2) yaitu LOD sebesar 0,24 ppm dan LOQ sebesar 0,8 ppm. Selanjutnya ditentukan konsentrasi rendah, sedang dan tinggi sebagai larutan yang digunakan untuk uji akurasi, sehingga diperoleh konsentrasi rendah (0,24 ppm), konsentrasi sedang (0,8 ppm), dan konsentrasi tinggi (3 ppm).

Hasil dari uji akurasi dan presisi yang dilakukan selama satu hari (*intraday*) dan 3 hari (*interday*) pada konsentrasi rendah (0,24 ppm), sedang (0,8 ppm) dan tinggi (3 ppm) memperoleh hasil persen uji perolehan kembali (%UPK) rata-rata yang diperoleh yaitu pada konsentrasi rendah (0,24 ppm) didapat %UPK \pm 170,7-2245,6%, konsentrasi sedang (0,8 ppm) didapat %UPK \pm 142,6-1183,4%, dan konsentrasi tinggi didapat %UPK \pm 110,5-945,5%. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pengujian dengan konsentrasi tinggi (3 ppm) pada hari ke-3 yang memiliki hasil uji perolehan kembali (%UPK) paling baik dan memenuhi persyaratan untuk sampel biologis yaitu 80-120%. Hasil dari uji presisi yang dinyatakan dengan nilai persen koefisien variasi (%KV) diperoleh selama *intraday* pada konsentrasi rendah (0,24 ppm) adalah 7,54%, konsentrasi sedang (0,8 ppm) adalah 19,7%, dan konsentrasi tinggi (3 ppm) adalah 6,72%. Hasil yang diperoleh dari uji presisi menunjukkan bahwa uji presisi selama *intraday* dan *interday* telah memenuhi persyaratan yaitu nilai KV tidak boleh lebih dari 20%, dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Hasil uji akurasi ini dapat dikatakan tidak memenuhi persyaratan, karena hasil yang menunjukkan akurasi sesuai persyaratan hanya pada sekali pengulangan di hari ke-3, sehingga tidak bisa mewakili hasil dari uji akurasi secara keseluruhan. Hal ini dapat disebabkan oleh analit yang diekstraksi tidak terekstraksi secara maksimal. Hal ini kemungkinan bisa di sebabkan oleh pengaruh komponen matrik plasma yang tidak dapat terpisah dengan baik dan ikut terbaca pada kromatogram hasil HPLC. Karena waktu retensi

metformin yang terlalu pendek dan lebih dekat dengan komponen protein yang ada dalam plasma sehingga menyebabkan luas area metformin menjadi lebih tinggi dari yang seharusnya.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa metode penetapan kadar metformin dalam plasma darah yang diberikan bersamaan dengan pemberian sari buah pare (*Momordica charantia* L.) secara *in vitro* mendapatkan hasil uji akurasi tidak memenuhi persyaratan yaitu nilai persen uji perolehan kembali tidak kurang dari 80% dan tidak lebih dari 120%, sedangkan hasil presisi telah memenuhi persyaratan dengan nilai persen koefisien variasi tidak lebih dari 20%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan banyak terima kasih kepada pimpinan STIFAR Riau dan kepala laboratorium kimia farmasi STIFAR Riau atas sarana dan prasarana untuk terlaksananya penelitian ini.

CONFLICT OF INTEREST

Penelitian ini dilakukan semata-mata hanya untuk pengembangan ilmu pendidikan dan penelitian saja tanpa ada kepentingan bagi pihak lain di luar perguruan tinggi STIFAR Riau.

REFERENSI

- Asniwati. 2016. Validasi Metoda Penetapan Kadar Metformin Gabungan Sediaan Herbal Antidiabetes dalam Plasma Darah Manusia secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Skripsi*. Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau.
- Budrat, P. and Shotipruk, A. 2008. Extraction of Phenolic compounds from fruits of bitter melon (*Momordica charantia*) With subcritical water extraction and antioxidant activities of these extracts. *Chiang Mai Journal of Science*, **35(1)**: 123-130.
- Christian, G. D. 2004. *Analytical Chemistry*. Danvers: John Wiley and Sons, Inc.
- Evans, G. 2004. *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism*. CRC PRESS. doi: <https://doi.org/10.1021/jm040168l>.

- Gandjar, I. G. and Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan validasi dan cara penggunaannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, **1(3)**: 117-135.
- Harvey, D. DePauw, U. 2000. *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill Higher Education, p. 816.
- Joseph, B. and Jini, D. 2013. Antidiabetic effects of *Momordica charantia* (bitter melon) and its medicinal potency. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **3(2)**: 93-102.
- Junaidi, J. 2014. Konversi Sistem Pengukuran dengan Microsoft Office Excel. *Fakultas Ekonomi dan Bisnis Universitas Jambi: Regresi dengan Microsoft Office Excel*, pp. 1-3.
- Saeed, M. K. Shahzadi, I., Ahmad, I., Ahmad, R., Shahzad, K., Ashraf, M., Nisa, V. 2010. Nutritional analysis and antioxidant activity of bitter melon (*Momordica charantia*) from Pakistan. *Pharmacologyonline*, **1**: 252-260.
- Marić, A. 2010. Metformin - more than 'gold standard' in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia Croatica*, **39(3)**: 95-104.
- Muadifah, A. 2017. Ekstraksi Metformin dari Undur-Undur (*Myrmeleon* sp.) dan Analisis Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). *Thesis*, Magister Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, pp. 6-18.
- Naveed, S., Sultana, N. and Arayne, M. S. 2011. simultaneous determination of enalapril with hypoglycemics (metformin, glibenclamide, glimepirid) in bulk, formulation in human serum by RP-HPLC. *IJPRD*, **3(24)**: 1-13.
- Nugroho, A. E. 2006. Hewan percobaan diabetes mellitus: patologi dan mekanisme aksi diabetogenik. *Biologi*, **7**: 378-382.
- Pramesthi, A. D. E. D., Ardana, M. and Indriyanti, N. 2019. Drug-Herb Interaction between Metformin and *Momordica charantia* in Diabetic Mice. *Molecular and Cellular Biomedical Sciences*, **3(2)**: 81-87.
- Rahayu, S. 2009. Pengaruh perbandingan berat bahan dan waktu ekstraksi terhadap minyak biji pepaya terambil. *Jurnal Industri dan Informasi*, **4(5)**: 147-151.
- Rizalina, H., Cahyono, E., Mursiti, S., Burcahyo, B., and Supartono. 2018. Optimasi penentuan kadar metanol dalam darah menggunakan gas chromatography. *Indonesian Journal of Chemical Science*, **7(3)**: 254-261.
- Rohman, A. 2009. *Kromatografi untuk Analisis Obat*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Romdhoni and Mufid, A. 2017. Optimasi dan Formulasi Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Glimepirid Menggunakan Fase Minyak Myritol 318, Surfaktan Tween 80, dan Ko-Surfaktan PEG 400. *Skripsi, Universitas Islam Indonesia*, pp. 10-16.
- Sayoeti, A. Z. 2015. Effect of decocta in bitter melon fruit (*Momordica charantia* L.) for decrease blood glucose levels. *Medis*, **4**.
- Sinala, S. 2016. *Farmasi Fisik*. Jakarta Selatan: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Rusmalina, S and Lukitaningsih, E. 2014. Pengembangan dan Validasi Metode Penetapan Metformin Hidroklorida Secara KCKT Dalam Spiked Plasma Manusia dan Pada Sediaan Tablet. *Tesis*, Farmasi Universitas Gadjah Mada.
- Surawan, F. E. D. and Efendi, Z. 2012. Pengaruh ekstrak jus segar dan rebusan pare (*Momordica charantia* L.) terhadap tikus diabetes. *Agroindustri*, **2(1)**: 28-33.
- Tarigan, E. Y. 2012. Optimasi dan Validasi Metode Analisis Rabepazol dalam Plasma in Vitro secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Skripsi*, Universitas Indonesia, Depok.
- Wijayakusuma, H. 2004. *Bebas Diabetes Mellitus Ala Hembing*. Edited by D. Cazarez. Jakarta: Puspa Swara.
- Wulandari, M. 2018. Pengembangan Metode Analisis Penetapan Kadar Metformin HCl dan Glibenklamid dalam Sediaan Tablet Kombinasi menggunakan Metode KCKT. *Skripsi*. Poltekkes Kemenkes Bandung.