



## Analysis and Validation of Metformin in Human Plasma Using the HPLC Method

### Analisis dan Validasi Obat Metformin Dalam Plasma Manusia Menggunakan Metode HPLC

**Mulidini<sup>1\*)</sup>, Asri Yuniar Dwi Nanda<sup>1)</sup>, Nissa Khalida Hanum<sup>1)</sup>, Lina Nurfadhila<sup>1)</sup>, Marsah Rahmawati Utami<sup>1)</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Singaperbangsa Karawang, ,  
Karawang, Jawa Barat, Indonesia.

e-mail Author: [mulidini1405@gmail.com](mailto:mulidini1405@gmail.com)

#### ABSTRACT

Analytical method validation is a process that ensures accurate, specific, reproducible and stable analysis of the analytical range appropriate to the intended use. Analytical method validation include all procedur for that demonstrate quantitative measure of analytes such as from plasma. Determination of the concentration of a drug in plasma is complex because plasma is a complex matrix. The drug identified was metformin. Metformin is a drug orally antihyperglycemic agent used in the management of type II diabetes mellitus. Methods for quantitation of metformin in human plasma or in pharmaceutical form, one of which uses High Performance Liquid Chromatography (HPLC). HPLC is a liquid chromatography technique used to process various mixture components. This article review aims to make it easier for readers and future researchers to determine the presence of metformin in human plasma by using the HPLC analysis method accurately. This research method uses the literature review method using national journals and international journals through the google scholar database. Methods by KCKT or HPLC that can be used to validate the determination of metformin levels in plasma include RP-HPLC, HPLC, HPLC-UV, and U-HPLC. The most commonly used method with the best validity, efficiency and time estimation is RP-HPLC..

**Keywords:** Analysis; Validation; Metformin; Plasma; HPLC.

#### ABSTRAK

Validasi metode analisis adalah suatu proses dalam menjamin akurasi analisis, reproduibel, spesifik dan stabil dari kisaran analisis sesuai dengan tujuan penggunaan. Validasi metode analisis mencakup semua prosedur yang menunjukkan pengukuran kuantitatif analit dari matriks biologis seperti plasma. Penentuan konsentrasi suatu obat dalam plasma merupakan hal yang kompleks karena plasma merupakan matriks yang kompleks. Metformin adalah agen antihiperlipidemia oral yang digunakan dalam pengelolaan diabetes mellitus tipe II. Metode untuk kuantisasi metformin dalam plasma manusia atau dalam bentuk farmasi, salah satunya menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). HPLC adalah teknik kromatografi cair yang digunakan untuk mengolah berbagai komponen campuran.

Review artikel ini bertujuan untuk mengetahui, memastikan, dan mengkonfirmasi metode analisis keberadaan metformin dalam plasma manusia dengan menggunakan metode analisis HPLC secara akurat untuk pembaca dan peneliti selanjutnya. Tujuan validasi metode analisis untuk memastikan dan menjamin bahwa metode analisis tersebut sudah sesuai dan memenuhi persyaratan. Metode penelitian ini menggunakan metode *literature review* dengan menggunakan jurnal nasional dan jurnal internasional melalui basis data *google scholar*. Metode secara KCKT atau HPLC yang dapat digunakan untuk validasi penetapan kadar metformin dalam plasma diantaranya RP-HPLC, HPLC, HPLC-UV, dan U-HPLC. Metode yang paling umum digunakan serta validitas, efisiensi dan estimasi waktu yang paling baik adalah RP-HPLC.

**Kata kunci:** Analisis; Validasi; Metformin; Plasma; HPLC.

## PENDAHULUAN

Proses dalam menjamin suatu analisis menjadi lebih spesifik, akurat, reproduibel, serta stabil dari kisaran analisis yang sesuai dengan tujuan penggunaan merupakan pengetahuan umum dari validasi metode analisis. Parameter analisis yang harus dipertimbangkan saat memvalidasi metode analisis dijelaskan dan ditentukan bagaimana caranya. Parameter tersebut meliputi presisi, akurasi, selektif, batas kuantitas (LOQ), batas seleksi (LOD), linearitas dan jangkauan, kekuatan metode, serta kekuatan metode (Franciska *et al.*, 2022). Sebelum melakukan studi farmakologi praklinis dan klinis, metode analisis terlebih dahulu harus divalidasi agar mendapatkan metode yang sesuai untuk analisis obat dalam matriks biologi (Fauziah *et al.*, 2017).

Validasi tersebut mencakup berbagai prosedur untuk menunjukkan metode spesifik pengukuran dari kuantitatif analit berdasarkan matriks biologis yaitu urin, serum, plasma atau darah yang mampu diandalkan dan reproduibel untuk tujuan penggunaan yang dimaksud (Fauziah *et al.*, 2017). Plasma merupakan suatu cairan yang kompleks bertindak sebagai media transport yang membawa zat-zat didalam aliran darah. Penentuan konsentrasi merupakan hal yang kompleks dalam matriks biologis seperti plasma karena plasma termasuk matriks yang kompleks (Lestari, 2014). Uji bioekivalensi terkait jaminan mutu plasma obat penting bagi pasien untuk menilai efikasi dan keamanan obat yang diuji. Pemeriksaan konsentrasi obat pada plasma adalah salah satu metode akurat dalam memastikan mutu obat serta mengoptimalkan terapi untuk pelayanan medis (Tania *et al.*, 2016). Sebagian besar sel jaringan dialiri dengan plasma atau cairan jaringan. Oleh

karena itu penggunaan matriks plasma dalam pengukuran kadar obat merupakan metode yang praktis dan nyaman untuk peninjauan farmakokinetik klinis (Fauziah *et al.*, 2017).

Metformin (CAS: 657-24-9) [N,N Dimethylimidodicarbonimide diamide] adalah agen antihiperlikemik oral yang digunakan dalam pengelolaan diabetes mellitus tipe II. Ketersediaan hayati oralnya sekitar 50-60%, dengan konsentrasi plasma puncak rata-rata  $1,73 \pm 0,54 \mu\text{g/ml}$  pada sekitar  $2,6 \pm 1,2$  jam setelah dosis oral tunggal 850 mg (Yusuf *et al.*, 2010). Metformin adalah agen antihiperlikemia oral dari kelas biguanid. Mekanisme aksi utama adalah menurunkan kadar glukosa untuk mengurangi glukoneogenesis di hati. Fosforilasi protein CREB menyebabkan penurunan dalam ekspresi gen untuk proses glukoneogenesis serta asam lemak bebas ikut mengalami penurunan akibat substrat glukoneogenesis. Disisi lain, metformin dapat meningkatkan penyerapan glukosa yang dimediasi insulin di daerah jaringan perifer. Senyawa metformin diserap atau mengalami absorpsi di daerah saluran pencernaan. Optimalisasi penyerapan metformin tidak dapat bekerja dengan baik apabila dikonsumsi bersamaan dengan makanan. Metformin tidak berubah setelah dieksresi dan tidak menghasilkan metabolit dalam urin maupun ASI (Gumantara *et al.*, 2017). Obat yang lebih dari 70% berikatan dengan protein plasma dapat mempengaruhi efek terapeutik dari obat tersebut (Fauziah *et al.*, 2017).

Banyak metode tersedia untuk kuantisasi metformin dalam plasma manusia, salah satunya menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Teknik KCKT atau HPLC sering diaplikasikan dalam analisis konsentrasi obat

pada plasma karena kemampuannya untuk memisahkan zat yang dapat mempengaruhi analisis dan untuk mendeteksi serta menentukan konsentrasi obat dalam yang sangat kecil (Tania *et al.*, 2016). HPLC adalah metode kromatografi cair, biasa digunakan dalam pengolahan berbagai komponen-komponen campuran. Selain itu HPLC juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan mengukur senyawa pada langkah pengembangan obat serta telah digunakan di berbagai negara dalam beberapa tahun terakhir. Karakteristik HPLC adalah kecepatan, efisiensi dan biaya analisis yang lebih rendah. Tujuan dari HPLC yaitu pemisahan molekul dalam waktu sesingkat mungkin. Sebab peningkatan hasil analisis serta meminimalisir waktu analisis sangat penting (Annisia *et al.*, 2020). Dengan adanya kajian artikel ini diharapkan pembaca dan penelitian selanjutnya menjadi lebih mudah dalam mengetahui keberadaan metformin dalam plasma manusia dengan menggunakan metode analisis HPLC secara akurat.

## METODE

Metode penelitian ini memakai metode *literature review* yang diawali dengan pengumpulan berbagai jurnal yang akan ditinjau. *Literature review* adalah suatu metode yang sistematis dalam pengkajian topik tertentu yang serupa dari berbagai jurnal agar menghasilkan suatu tulisan berisi topik tersebut. Jurnal-jurnal yang akan digunakan dalam *literature review* adalah jurnal terakreditasi yang terbit dari tahun 2010 sampai tahun 2023, yang berasal dari jurnal nasional dan jurnal internasional melalui basis data *google scholar*. Peneliti mencari dengan kata kunci “analisis dan validasi”, “metformin”, “plasma”, dan “HPLC”. Secara keseluruhan, sumber pustaka jurnal yang digunakan sebanyak 23 jurnal. Jurnal-jurnal yang akan di *review* disaring berdasarkan judul dan abstrak sehingga didapatkan hasil jurnal sebanyak 19 jurnal.

## HASIL DAN DISKUSI

Penelusuran jurnal dengan rentang tahun 2010 sampai tahun 2023 dengan kriteria perbedaan metode yang ditinjau mengenai analisis dan validasi metformin pada plasma, disajikan dalam tabel 1. Pada dasarnya RP-HPLC merupakan metode pengembangan dari HPLC, terdapat perbedaan pada kedua metode tersebut seperti fase gerak yang digunakan pada RP-HPLC lebih polar

daripada fase diam. Terdapat perbedaan yang signifikan terhadap metode HPLC dengan RP-HPLC (Tabel 2) seperti pada penelitian Magdy *et al.*, 2023 yang menggunakan metode HPLC dan Shakoora *et al.*, 2018 untuk metode RP-HPLC dalam analisis metformin pada plasma darah.

Berdasarkan hasil tabel 1, data-data yang diperoleh metode yang dapat digunakan untuk validasi penetapan kadar metformin dalam plasma secara HPLC sangatlah beragam diantaranya RP-HPLC, HPLC, HPLC-UV, dan U-HPLC. Dalam *review article* ini terdapat 10 artikel menggunakan metode RP-HPLC, 4 artikel menggunakan metode HPLC, 4 artikel menggunakan metode HPLC-UV, 1 artikel menggunakan metode U-HPLC. RP-HPLC telah banyak dilaporkan dalam penentuan metformin sendiri atau dalam kombinasi dengan obat lain. Metode RP-HPLC yang sensitif dan selektif telah divalidasi untuk penentuan metformin dan vildagliptin dalam formulasi farmasi dan sampel biologis. Dari 8 artikel tersebut, menunjukkan ketika metformin dikombinasikan dengan obat lain dalam plasma darah memperoleh hasil yang dapat diterima, spesifisitas tinggi, presisi yang akurat, sederhana, cepat yang dapat direproduksi dengan metode RP-HPLC dalam berbagai kondisi. Stabilitas ini menunjukkan metode HPLC sepenuhnya divalidasi sesuai dengan pedoman ICH dan FDA. Metode ini memberikan waktu pemulihan berkisar antara 100, 13 -100,29%, dan telah dikembangkan pemisahan dan estimasi yang cepat dari 3 obat antidiabetes, dalam plasma manusia dalam waktu 3 menit. Metode ini divalidasi dalam kisaran 0,05 – 5 µg/ml. Selain itu efektivitas biaya adalah keuntungan yang dikembangkan dari metode ini.

HPLC menjadi metode analisis yang umum digunakan dalam analisis kuantitatif dalam produk obat-obatan. HPLC memiliki prinsip injeksi sampel ke dalam kolom yang berisi fase diam, kemudian fase gerak akan dipompa menggunakan tekanan yang tinggi menuju kolom. Adanya pemisahan sampel berdasarkan pada suatu partisi sampelnya yaitu antara fase gerak dan fase diam. Fase gerak bertujuan agar mampu melulusi sampel sehingga dapat sampai kepada detektor. HPLC fase terbalik atau *reversed phase HPLC* menggunakan fase gerak yang nonpolar. Adapun pKa dan pH dari analit tersebut bertujuan untuk menentukan dan memastikan waktu retensi dan juga bentuk dari puncak kromatogram. Penambahan dapar dan fase gerak dapat mempengaruhi bentuk dari puncak

kromatogram. Hasil review menunjukkan rata-rata penelitian sebelumnya banyak menggunakan fase gerak yang merupakan campuran asetonitril dengan dapar fosfat yang memiliki variasi dalam perbandingannya. Adapun fase gerak yang umum digunakan dalam analisis metformin pada plasma darah dengan menggunakan metode RP-HPLC dan HPLC yaitu asetonitril sebagai pelarut non polar dan untuk pelarut polar menggunakan dapar fosfat. Asetonitril merupakan senyawa dengan sifat polar aprotik, sedangkan untuk metanol sendiri bersifat polar protik untuk fase gerak pada penelitian lain. Asetonitril memiliki lebih banyak kelebihan dibandingkan dengan metanol seperti dalam segi elusi yang lebih tinggi, cut off UV yang rendah, serta memiliki titik didih yang tinggi.

Dalam metode HPLC, terdapat 2 jenis sistem elusi yaitu *isocratic system* dan juga *gradient system*. Sistem isokratik dalam proses pemisahannya menggunakan pelarut dengan komposisi yang sama (perbandingannya tetap) dan konstan setiap waktunya. Sedangkan sistem gradien, dalam prosesnya fase gerak (*mobile phase*) dipompa dengan perbandingan setiap pelarut yang berbeda dalam kurun waktu tertentu. Sistem isokratik memiliki kemampuan pemisahan yang kurang signifikan dibandingkan dengan sistem gradien. Hal ini mengakibatkan sistem isokratik memiliki puncak kromatogram yang lebih lebar dibandingkan gradien (Vidushy et al., 2017). Diketahui bahwa dari 19 penelitian 15 diantaranya menerapkan elusi dengan sistem isokratik dan 4 sisanya memilih sistem gradien. Kemasan kolom pada kromatografi fase balik yang banyak digunakan adalah jenis *octadecylsilane* (C18) dan *octylsilane* (C8). Beberapa penelitian terkait lebih menggunakan kolom C18. Digunakannya kolom C18 fase terbalik (250 mm × 4,6 mm id, ukuran partikel 5 µm) dan fase gerak terdiri dari metanol dengan penyangga kalium dihidrogen fosfat berfungsi untuk pemisahan campuran terner. Eksperimen pendahuluan menunjukkan bahwa konsentrasi dapar fosfat, pH, suhu, dan laju aliran adalah faktor penting yang akan dipelajari untuk menentukan kromatogram yang paling optimum pada kondisi kromatografi.

Sedangkan pada metode HPLC-UV sampel plasma diencerkan minimal selama *pre-treatment* sampel sehingga sedikit volume sampel yang dibutuhkan. Sampel plasma hanya membutuhkan satu langkah presipitasi protein yang membuat metode lebih cepat dan lebih mudah.

Pemisahan pasangan ion diikuti dengan deteksi UV dilakukan pada sampel plasma manusia yang di deproteinisasi. Pemisahan dilakukan pada kolom *Discovery Reversed Phase C-18* (250 × 4,6 mm, 5 µm) dengan deteksi UV pada 233 nm. Fase gerak yang terkandung 34% asetonitril dan 66% fase air. Adapun lain, fase gerak yang terdiri dari 0,1% asam fosfat (pH 3,0) dan asetonitril dalam mode gradien dengan suhu oven kolom dipertahankan pada 30 °C dan elusi dipantau oleh detektor UV pada 227 nm. Pada 4 artikel tersebut didapatkan metode HPLC-UV tervalidasi untuk kuantisasi polar dan analit non-polar, secara simultan secara teratur, dalam jumlah sampel kecil dengan akurasi dan presisi yang cukup. Metode ini menggunakan fase gerak sederhana dengan lebih sedikit fase diam non polar sehingga prosedur ekstraksi menjadi sederhana, ekonomis dan efisien.

Terdapat pembahasan lain mengenai metode bioanalisis untuk menentukan materi metformin dalam perkembangan manusia, Berbagai metode bioanalitik telah dikembangkan antara lain kromatografi gas (KG) dengan spektrometri massa dan kromatografi cair (KC) dengan deteksi UV atau spektrometri massa metode GC dengan prosedur derivatisasi kompleks. Metode KC yang dilaporkan dengan deteksi UV telah menunjukkan tingkat konsentrasi spesifitas batas terbawah dari kuantifikasi/*lower limit of quantification* (LLOQ). Selain itu, spektrometri massa tandem-LC mengalami beberapa kekurangan, seperti membutuhkan waktu kromatografi yang lama, kurangnya sensitivitas dan penggunaan prosedur persiapan sampel yang rumit termasuk mengekstraksi plasma. Di antara studi analisis kuantitatif sebelumnya untuk metformin dalam plasma manusia, nilai LLOQ berkisar dari 1 ng/mL sampai 50 ng/mL. Dari jumlah tersebut, penelitian yang digunakan LC-MS/MS dengan konsentrasi LLOQ 1 ng/mL, dan rasio S/N adalah 20. Meskipun konsentrasi LLOQ lebih tinggi, waktu analisis dipersingkat menjadi 2 menit dengan mengubah kondisi fase gerak A dan B dengan menambahkan 0,1% asam format. Dalam studi lain, metode analisis linier dalam kisaran 2–2000 ng/mL, dengan total waktu pengoperasian 3,4 menit. Sehingga pada studi ini, bahwa UHPLC-HRMS dapat digunakan dalam deteksi dan analisis kuantitatif metformin plasma pada manusia. Metode analisis yang dikembangkan menunjukkan linieritas yang baik, sensitivitas, akurasi dan presisi, dan pengulangan.

Metode analisis ini dengan UHPLC-HRMS dapat diterapkan untuk studi farmakokinetik berbagai obat. Pada fase gerak RP-HPLC Berbagai komposisi dan rasio fase gerak digunakan untuk penentuan sensitifitas dan selektifitas metformin dan vildagliptin dengan metode kromatografi cair, sebelumnya metanol dan asetonitril digunakan dalam berbagai rasio dengan *buffer* fosfat. Pada HPLC-UV fase gerak mengandung asetonitril 34% dan fase air 66%. Beberapa penelitian yang dilaporkan menggunakan metode fase gerak gradien, menggunakan fase teknik ekstraksi padat atau dengan metode yang sangat kompleks dan

beberapa metode teknik ekstraksi protein yang membuat jumlah sampel analisis besar, sulit, mahal, dan memakan waktu. Oleh karena itu perlu adanya metode yang sensitif, cepat dan mudah untuk menentukan metformin dalam plasma. pH fase berair diatur menjadi 5,2 dengan menggunakan asam ortofosfat encer dan fase gerak dijalankan secara isokratik. Laju aliran fase gerak dipertahankan pada 1,3 ml/menit dengan volume injeksi adalah 20 mL. Sebelum digunakan, fase gerak dihilangkan gasnya dengan menggunakan gas helium.

**Tabel 1.** Hasil Review Metode analisis obat metformin pada plasma darah manusia

No.	Metode	Fase Gerak	Kolom	Elusi	Laju Alir (mL/min)	Detektor	LOQ	Pustaka
1.	RP-HPLC	MeOH: ACN: dapar fosfat (5:30:65, v:v) pada pH 3,5	Thermo Hypersil ODS C18 (5µm, 4.6 mm × 250 mm)	Isokratik	0,8	PC220 UV-Vis (212 nm)	2.18 µg/mL	Shakoor A et al., 2018
2.	RP-HPLC	MeOH : 0,025 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 3,20 (85:15 v/v)	MAGELLE N C18 (5 µm, 150 mm × 4.60 mm)	Isokratik	1	DAD (235 nm)	0.18 µg/mL	Sebaiy e al., 2018
3.	RP-HPLC	MeOH: ACN: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 4±0,5) (33,9:10:56, 1)	Onyx Monolithc C18 (100 mm, 5µm)	Isokratik	0,4	PDA (220 nm)	0.373 ug/m µg/mL I	Balamurugan et al., 2018
4.	RP-HPLC	MeOH : 0,05 M buffer KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + TEA 0,05% (78:22, v/v)	Thermostat ed RS Column Compartment	Isokratik	1,2	RS DAD (227 nm)	0.136 µg/mL	marie A et al., 2023
5.	HPLC	MeOH :0,05 M buffer KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7 (67:33% v/v)	Hypersil BDS C18 (250 mm × 4.6 mm)	Isokratik	0.814	DAD (235 nm)	0.50 µg/mL	Magdy et al., 2023
6.	HPLC-UV	ACN : fase air (10 mM	Discovery Reversed	Isokratik	1.3	UV (233 nm)	0.125 µg/mL	Chheri, 2014

		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 10 mM sodium lauril sulfat) (34:66 v/v) pH: 5.2	Phase C18 (250 · 4.6 mm)					
7.	RP-HPLC	0,03 M amonium fosfat (pH 7) : ACN (28:72, v/v)	Resolve CN (8 × 100 mm, 4-µm) - Guard Pak CN 4- µm	Isokratik	2,0	PDA (240 nm)	0.05 µg/mL	Yusuf et al., 2015
8.	HPLC	ACN : KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (34:66)	Alltima C18 (250 mm×4.6 mm, 5 µm)	Isokratik	0,7	UV-Vis Waters 486 (236 nm)	7.8 µg/mL	Gabr et al., 2010
9.	HPLC- UV	0.1% Asam fosfat (pH 3) : ACN	Phenyl (150 mm 4.6 mm, 5.0 µm)	gradien	1.0-1.5	UV (227 nm)	0.01 µg/mL	Pawan et al., 2017
10.	RP-HPLC	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 4.0) : ACN (70:30 v/v)	X-Terra C18 (4,6 x 15 mm, 3,5 µm)	Isokratik	1.0	UV (235 nm)	5.936 µg/mL	Ashutosh et al., 2015
11.	RP-HPLC	ACN : buffer KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (adj pH 7.0) (72:25)	Grace vyadyec genesis CN (150 × 4.6 mm, 4 µm)	Isokratik	1.0	LC-100 UV (237 nm)		Pandya R et al., 2014
12.	HPLC- UV	air : dapar fosfat (ad pH 3.2) (10:90)	S5W Symmetry C8 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Isokratik	0.8	UV (232 nm)	0.1 µg/mL	Abdessadek M et al., 2015
13.	RP-HPLC	ACN : buffer fosfat dan ACN : TFA 0,1%	Dionex C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	gradien	1	UV (227 nm)	1,96 µg/mL	Hasanah et al., 2016
14.	RP-HPLC	dapar fosfat (pH 3,0) : metanol (30 : 70, v/v )	C18 (4,6 x 250 mm, 5µm)	Isokratik	1	238 nm	0.45 µg/mL	Nilesh et al., 2019
15.	UHPLC	asam format 0,1%, asetonitril + asam format 0,1%	BEH HILIC (100×2,1 mm, 1,7µm)	gradien	0,4 mL/menit	HRMS (130-71 nm)	5 ng/ml	Kang et al.. 2020
16.	HPLC	ACN : dapar fosfat (55:45) dan	SPE-MIP MAA (150 x 4,6 mm)	gradien	1	UV-Vis (227 nm)	1,733 µg/mL	Rohayati et al., 2015

		ACN : TFA 0,1% (55:45)						
17.	HPLC	ACN: 0,01 M dapar fosfat + 0.3% SDS (adj pH=6.0) (32.5:67.5 v/v) dan	100 RP C18 (125 x 4.0 mm i.d., 5 µm)	Isokratik	1.25	UV-Vis	50 ng/mL	Troja E et al., 2016
18.	HPLC-UV	ACN : 20mM dapar monobasic fosfat : TEA (20:80:0,1 v/v)	Sherisorb C1 (250 x 4.6 mm, 10 µm)	Isokratik	1.5	UV-Vis (235 nm)	1.4 µg/mL	Alshishani A et al., 2016
19	RP-HPLC	0.05 M dapar KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 4.5) : MeOH: ACN (60:20:20)	Enable C18 G (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Isokratik	0.6	UV (220 nm)	0.373 µg/mL	Prasad P et al, 2015

Keterangan : ACN= Asetonitril; TFA = Trifluoro Acid; MAA = Asam Metakrilat; PDA= Photodiode Array; DAD = Diode array detector; HRMS = High Resolution Mass Spectrometry

**Tabel 2.** Perbandingan metode HPLC dengan RP-HPLC

Karakteristik	Metode	
	HPLC	RP-HPLC
Temperatur kolom	45°C [5]	35°C[1]
Ukuran partikel	5 µm	5 µm
Volume injeksi	20 ul	10 ul
Dimensi kolom	250 mm x 4.6 mm	150 mm x 4.6 mm
Laju alir	0.814 ml/menit	1 ml/menit

## KESIMPULAN

Berdasarkan review artikel diatas, dapat disimpulkan masing-masing metode bionalisis dalam menguji penetapan kadar metformin dalam plasma darah secara KCKT memiliki berbagai keuntungan yang beragam. Metode yang paling umum digunakan serta validitas, efisiensi dan

estimasi waktu yang baik adalah RP-HPLC, dibandingkan bioanalisis yang menggunakan metode HPLC-UV dan UHPLC.

## REFERENSI

Abdessadek, M., Tadmori, A. E., Ahmed, E. A., Diarra, M., Magoul, R., Ajdi, F., & Khabbal, Y.

- (2015). Simple HPLC-UV Method For Determination Of Metformin In Human Plasma And Erythrocytes Application To Therapeutic Drug Monitoring. *International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 35-39.
- Alshishani, A., Makahleh, A., Yap, H. F., Gubartallah, E. A., Salhimi, S. M., & Saad, B. (2016). Ion-Pair Vortex Assisted Liquid-Liquid Microextraction With Back Extraction Coupled With High Performance Liquid Chromatography-UV For The Determination Of Metformin In Plasma. *Talanta*, 161, 398-404.
- Annissa, S., Musfiroh, I., & Indriati, L. (2020). Perbandingan Metode Analisis Instrumen HPLC dan UHPLC. *Article Review, Farmaka*, 17(3), 189-196.
- Ashutosh, K. S., Manidipa, D., Seshagiri, R. J. V. L. N., & Gowri, S. D. (2015). New Validated Stability Indicating RP-HPLC Method For Simultaneous Estimation Of Metformin And Alogliptin In Human Plasma. *J Chromatogr Sep Tech*, 6(6), 1-6.
- Balamurugan, K., Mishra, K., & Suresh, R. 2018. Optimization and Validation of the Simultaneous Determination of Vildagliptin and Metformin, in Bulk and Formulation by A Reverse Phase HPLC Method Using D-Optimal Experimental Design. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 12 (8), 1-12.
- Brocks, D., Gabr, R. Q., & Padwal, R. S. (2010). Determination Of Metformin In Human Plasma And Urine By High-Performance Liquid Chromatography Using Small Sample Volume And Conventional Octadecyl Silane Column. *Journal Of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 13(4), 486-494.
- Chhetri, H. P., Thapa, P., & Van Schepdael, A. (2014). Simple HPLC-UV Method For The Quantification Of Metformin In Human Plasma With One Step Protein Precipitation. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 22(5), 483-487.
- Fauziah, F., Kardela, W., Rasyid, R., & Silvi, M. (2017). Validasi Metode Analisis A-Mangostin Dalam Plasma Darah Manusia Secara In Vitro Dengan Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri. *Jurnal Farmasi Higea*, 9(2), 96-102.
- Fransiska, A. N., Masyrofah, D., Putri, G. K., Malik, L. H., Wulan Birru, P., & Putri, T. R. (2022). Analisis Senyawa Obat dalam Sampel Biologis Plasma Darah. *Syntax Idea*, 4(5), 905-912.
- Hasanah, A. N. (2016). Optimasi Kondisi Pemisahan Glibenklamid Kombinasi Metformin Dengan KCKT-SPE MIP Akrilamid. *Indonesian Journal Of Pharmaceutical Science And Technology*, 3(2), 38-46.
- Kang, Y. J., Jeong, H. C., Kim, T. E., & Shin, K. H. (2020). Bioanalytical Method Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled With High-Resolution Mass Spectrometry (UHPL-CHRMS) For The Detection Of Metformin In Human Plasma. *Molecules*, 25(20), 4625.
- Lestari, S. W. (2014). Validasi Metode Penetapan Kadar Aliskiren dalam Plasma Darah secara In Vitro menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).
- Magdy, G., Al-Enna, A. A., Belal, F., El-Domany, R. A., & Abdel-Megied, A. M. (2023). Analytical Quality-By-Design Approach For Development And Validation Of HPLC Method For The Simultaneous Estimation Of Omarigliptin, Metformin, And Ezetimibe: Application To Human Plasma And Dosage Forms. *BMC Chemistry*, 17(1), 1-10.
- Nikam, N., Maru, A., Jadhav, A., & Malpure, P. (2019). Analytical Method Development and Validation of Metformin Hydrochloride by using RP HPLC with ICH Guidelines. *International Journal of Trend in Scientific Research and Development*, 3(3), 415-419.
- Pandya, R. H., Rathod, R., & Maheswari, D. G. (2014). Bioanalytical Method Development And Validation For Simultaneous Determination Of Linagliptin And Metformin Drugs In Human Plasma By RP-HPLC Method. *Pharmacophore*, 5(2), 202-218.
- Patra, R., Kollati, Y., NS, S. K., & Dirisala, V. R. (2021). Valsartan In Combination With Metformin And Gliclazide In Diabetic Rat Model Using Developed RP-HPLC Method. *Future Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 7, 1-10.
- Porwal, P. K., & Talele, G. S. (2017). Development of validated HPLC-UV method for simultaneous determination of metformin, amlodipine, glibenclamide and atorvastatin in



- human plasma and application to protein binding studies. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 55(1), 129-139.
- Prasad, P. B. N., Satyanaryana, K., & Krishnamohan, G. (2015). Development And Validation Of A Method For Simultaneous Determination Of Metformin And Saxagliptin In A Formulation By RP-HPLC. *American Journal Of Analytical Chemistry*, 6(11), 841.
- Rohayati, A., Hasanah, A. N., Saptarini, N. M., & Aryanti, A. D. (2015). Optimasi Kondisi Pemisahan Glibenklamid Kombinasi Metformin Dalam Plasma Darah Menggunakan KCKT. *Indonesian Journal Of Pharmaceutical Science And Technology*, 2(3), 96.
- Sebaiy, M. M., El-Adl, S. M., Baraka, M. M., & Hassan, A. A. (2020). Rapid RP-HPLC Method For Simultaneous Estimation Of Metformin, Pioglitazone, And Glimepiride In Human Plasma. *Acta Chromatographica*, 32(1), 16-21.
- Shakoor, A., Ahmed, M., Ikram, R., Hussain, S., Tahir, A., Jan, B. M., & Adnan, A. (2020). Stability-Indicating RP-HPLC Method For Simultaneous Determination Of Metformin Hydrochloride And Vildagliptin In Tablet And Biological Samples. *Acta Chromatographica*, 32(1), 39-43.
- Sholikhah, A. I. (2019). Gambaran Pola Penggunaan Metformin Terhadap Kadar Kreatinin Serum Pada Pasien Diabetes Melitus Tipe 2 Di Rumah Sakit" X". *Social Clinical Pharmacy Indonesia Journal*, 4(2), 66-74.
- Troja, E., Deda, L., & Boçari, G. (2015). Ion-Pair HPLC Method For The Quantification Of Metformin In Human Plasma And Its Application To A Pharmacokinetic Study. *Methodology*.
- Yusuf, A., Alvi, S. N., & Hammami, M. M. (2015). Development and validation of RP-HPLC method for the determination of metformin in human plasma. *WJPPS*, 4(7), 128-38.