

## Preliminary content of glibenclamide and its metabolite 4-trans-hydroxyglibenclamide using Uv-Vis spectrophotometry method

## Preliminary kandungan glibenklamid dan metabolitnya 4-trans-hydroxyglibenklamid menggunakan metode spektrofotometri Uv-Vis

Aida Apriani <sup>a</sup>, Tajul Muna <sup>a</sup>, Saiful Azhari <sup>a</sup>

<sup>a</sup>STIKes Assyifa Aceh, Banda Aceh, Aceh, Indonesia.

\*Corresponding Authors: [aidaapriani@gmail.com](mailto:aidaapriani@gmail.com)

### Abstract

Glibenclamide, another name for glyburide, is one of the antidiabetic drugs oral (ADO) which works by closing the K<sup>+</sup>-ATP channels in pancreatic beta cells thereby increasing insulin release. 4-trans-hydroxyglibenclamide is the main metabolite of glibenclamide which also has hypoglycemic effects. This study aims to determine the maximum wavelength of glibenclamide and its metabolite 4-trans-hydroxyglibenclamide. The results showed that the maximum wavelength of glibenclamide was at 300.60 nm, while 4-trans-hydroxyglibenclamide was at 299.50 nm and the glibenclamide calibration curve was obtained using the regression equation  $Y = Y = 0.010x + 0.001$  with a correlation coefficient of 0.998, while 4-trans-hydroxyglibenclamide  $Y = 0.0102x - 0.0098$  with a correlation coefficient of 0.99

**Keywords:** Glibenclamide, 4-trans-hydroxyglibenclamide, oral antidiabetic (ADO)

### Abstrak

Glibenklamid nama lain dari gliburid adalah salah satu dari obat antidiabetes oral (ADO) yang bekerja dengan cara menutup saluran K<sup>+</sup>-ATP di sel beta pankreas sehingga meningkatkan pelepasan insulin. 4-trans-hydroxyglibenklamid adalah metabolit utama glibenklamid yang juga memiliki efek hipoglikemik. Penelitian ini bertujuan mengetahui panjang gelombang maksimum glibenklamid dan metabolitnya 4-trans-hydroxyglibenklamid. Hasil penelitian menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum glibenklamid berada pada 300,60 nm, sementara 4-trans-hydroxyglibenklamid berada pada 299,50 nm dan kurva kalibrasi glibenklamid diperoleh dengan persamaan regresi  $Y = Y = 0,010x + 0,001$  dengan koefisien korelasi 0,998, sementara 4-trans-hydroxyglibenklamid  $Y = 0,0102x - 0,0098$  dengan koefisien korelasi 0,992.

**Kata Kunci:** Glibenklamid, 4-trans-hidroksiglibenklamid, antidiabetes oral (ADO)



Copyright © 2020 The author(s). You are free to : **Share** (copy and redistribute the material in any medium or format) and **Adapt** (remix, transform, and build upon the material) under the following terms: **Attribution** – You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; **NonCommercial** – You may not use the material for commercial purposes; **ShareAlike** – If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original. Content from this work may be used under the terms of the [a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International \(CC BY-NC-SA 4.0\) License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

#### Article History:

Received: 26/05/2024,  
Revised: 27/08/2024  
Accepted: 27/08/2024  
Available Online : 27/08/2024.

#### QR access this Article



<https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v7i3.545>

## Pendahuluan

Glibenklamid atau 1-[4-(2-(5-kloro-2-metoksibenzamido)etil} benzene sulfonil]3-sikloheksilurea merupakan turunan sulfonilurea generasi kedua yang tersubsitusi pada posisi para [1]. Glibenklamid atau gliburid adalah salah satu dari obat antidiabetes oral (ADO) dengan menutup saluran $K^+$ -ATP di sel beta pankreas sehingga membuat pelepasan insulin [2]. Meningkatkan. 4-*trans*-hydroxyglibenklamid merupakan metabolit utama glibenklamid dan aktif secara farmakologis memiliki aktivitas hipoglikemik rendah dengan mekanisme sekresi insulin. Obat dan metabolitnya sama-sama memiliki efek hipoglikemik, Oleh sebab itu, memiliki kemungkinan menimbulkan hipoglikemik yang tinggi sehingga penting untuk memantau kadar obat di darah atau *Therapeutic Drug Monitoring* (TDM) [3-5]. TDM adalah kegiatan pemantauan obat dalam darah yang merupakan pekerjaan kefarmasian klinik di Rumah sakit [6]. Obat dan metabolitnya memiliki struktur kimia yang mirip sehingga sering berada dalam keadaan tumpang tindih [7-8]. Glibenklamid dapat ditentukan kadarnya dengan spektrofotometri ultraviolet pada pelarut metanol p.a pada panjang gelombang 225 nm [9].

Beberapa penelitian telah menggunakan HPLC hingga LC-MS [4-7]. Namun, biaya yang diperlukan sangat besar. Selain itu, mengingat pentingnya dan sering dilakukannya pengukuran tersebut, sangat diperlukan suatu metode yang dapat dilakukan secara berulang dan sederhana, hemat waktu dan biaya. Metode spektrofotometri dapat menjadi alternative untuk estimasi waktu, biaya dan sensitifitas pengukuran [10]. Metode spektrofotometri bekerja dengan melewati berkas cahaya melalui suatu objek dan panjang gelombang cahaya yang mencapai detektor diukur. Panjang gelombang yang diukur memberikan informasi penting tentang struktur kimia dan jumlah molekul. Dengan demikian, informasi kuantitatif dan kualitatif dapat dikumpulkan. Informasi dapat diperoleh sebagai transmitansi, absorbansi atau reflektansi radiasi dalam rentang panjang gelombang 300-700 nm. Penyerapan energi mendorong elektron ke keadaan tereksitasi atau orbital anti-ikatan. Agar transfer ini terjadi, energi foton harus sesuai dengan energi yang dibutuhkan oleh elektron untuk dinaikan ke tingkat energi berikutnya yang lebih tinggi. Proses ini membentuk prinsip operasi dasar spektroskopi absorpsi [11].

Metode spektrofotometri diawali dengan mengetahui panjang gelombang maksimum masing-masing campuran, kemudian dilakukan kurva kalibrasi dari beberapa konsentrasi obat dan metabolitnya [12]. Penelitian ini merupakan awal dari penetapan kadar glibenklamid dan metabolitnya 4-*trans*-hydroxyglibenklamid dalam darah untuk keperluan TDM.

## Metode Penelitian

### Alat dan Bahan

Penelitian ini mempergunakan alat Spektrofotometri ultraviolet-visible yang lengkap (Shimadzu 1800) dengan Personal Computer (PC) yang dilengkapi dengan software UV Probe 2,42, neraca analitik (Boeco Germany), alat-alat gelas, dan alat lain yang dibutuhkan ketika persiapan.

Penelitian ini juga menggunakan bahan baku glibenklamid (PT. Indofarma), 4 *trans*-hydroxy glibenklamid (Sigma) methanol p.a, dan aqua bidestilata.

### **Pembuatan Larutan Induk Baku (LIB) glibenklamid dan 4-trans-hydroxyglibenklamid**

Diawali dengan pembuatan larutan dengan konsentrasi 100,2 µg/ml (LIB I). Diawali larutan LIB I diencerkan menjadi larutan dengan konsentrasi 10,02µg/ml(LIB IIA). Ditimbang seksama 10,02 mg baku glibenklamid, kemudian dimasukkan kedalam labu tentukur 100 ml, dilarutkan dalam pelarut Metanol p.a hingga larut, Dicapai volume dengan pelarut yang sama sampai garis tanda sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 100,2 µg/ml (LIB I). Dari larutan LIB I Dipipet 10 ml LIB dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 ml dicukupkan volume dengan pelarut yang sama sampai garis tanda sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 10,02µg/ml (LIB II A).

Selanjutnya ditimbang seksama 10,02 mg baku 4-trans-hydroxyglibenklamid, kemudian dimasukkan kedalam labu tentukur 100 ml, dilarutkan dalam pelarut Metanol p.a hingga larut, Dicapai volume dengan pelarut yang sama sampai garis tanda sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 100,2 µg/ml (LIB I). Dari larutan LIB dipipet 10 ml LIB I dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 ml dicukupkan volume dengan pelarut yang sama sampai garis tanda sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 10,02µg/ml (LIB IIB).

### **Pembuatan spektrum serapan maksimum glibenklamid dan 4-trans-hydroxyglibenklamid**

Masing- masing dipipet 5 ml larutan induk baku (LIB II) glibenklamid, masukkan kedalam labu tentukur 10ml kemudian Dipipet 4,5ml larutan induk baku (LIB IIB) 4-trans-hydroxyglibenklamid, dimasukkan kedalam labu tentukur 10ml. kemudian masing-masing labu tentukur tersebut dilakukan pengenceran menggunakan pelarut metanol hingga garis tanda, dilakukan pengocokan hingga homogeny supaya didapatkan larutan dan konsentrasi glibenklamid 50µg/ml dan konsentrasi 4-trans-hydroxy glibenklamid 45µg/ml. Ukur serapannya dengan rentang gelombang sepanjang 200-400 nm.

### **Pembuatan spektrum serapan baku glibenklamid dan 4-trans-hydroxyglibenklamid**

Dibuat glibenklamid dengan 5 konsentrasi berbeda 20µg/ml; 30µg/ml; 40µ/ml; 50µg/ml; dari Larutan standar glibenklamid (LIB II) dan 4-trans-hydroxyglibenklamid dan konsentrasi 25 µg/ml; 30 µg/ml; 35 µ/ml; 40 µg/ml; dan 45µg/ml dari (LIB IIB) 4-trans-hydroxyglibenklamid, dibuat spektrum serapannya dan dilakukan selama 6 kali pengulangan.

Pembuatan Larutan standar glibenklamid (LIB II) diencerkan dalam pelarut metanol 10ml untuk membuat konsentrasi 20µg/ml; 30µg/ml; 40µ/ml; 50µg/ml; dan 60µg/ml, dengan cara memipet dari LIB II 2ml, 3ml, 4ml; 5ml, dan 6ml. Dibuat spektrum serapannya, dilakukan selama 6 kali pengulangan. Pembuatan Larutan standar 4-trans hydroxyglibenklamid (LIB II) diencerkan dalam pelarut metanol 10ml untuk membuat konsentrasi 25 µg/ml; 30 µg/ml; 35 µ/ml; 40 µg/ml; dan 45µg/ml, dengan cara memipet dari LIB II 2,5ml, 3ml, 3,5ml; 4ml, dan 4,5ml. Dibuat spektrum serapannya, dilakukan selama 6 kali pengulangan.

### **Pembuatan kurva kalibrasi glibenklamid dan 4-trans-hydroxyglibenklamid**

Absorbansi dari spectrum serapan baku glibenklamid dan 4-trans hydroxyglibenklamid dengan gelombang memiliki panjang maksimal yang didapatkan, dihitung, maupun diplot melalui konsentrasi supaya persamaan garis regresi didapatkan.

## **Hasil Dan Pembahasan**

Glibenklamid memberikan aktivitas farmakologis berupa sekresi langsung pada sel beta pankreas. Saluran kalium sensitif ATP (K<sup>+</sup> + ATP) dari sel beta mempunyai pengatur subunit yaitu Sulfonilurea Reseptor-1 (SUR-1). Sulfonilurea meningkatkan kepekaan dari sel beta menjadi sensitive glukosa dan, ketika obat sulfonilurea terikat ke transmembrane SUR-1, maka akan tertutup saluran ATP peka kalium pada membran sel. Kalium berkurang dan depolarisasi membran terjadi. Depolarisasi membuka saluran kalsium berpintu voltase dan menyebabkan influx kalsium (Ca<sup>2+</sup>) dan pelepasan insulinyang sebelumnya telah dibentuk berdekatan dengan membran plasma [13]. Glibenklamid mengikat reseptor dengan afinitas tinggi 140 kDa. Pemberian jangka panjang Glibenklamid kepada pengidap diabetes tipe 2 juga menurunkan kadar glucagon serum, yang ikut berperan dalam efek hipoglikemik. Mekanisme tersebut belum begitu jelas, tetapi tampaknya melibatkan inhibisi tak langsung karena meningkatnya pelepasan insulin, dan somastatin, yang menghambat sekresi alfa [13].

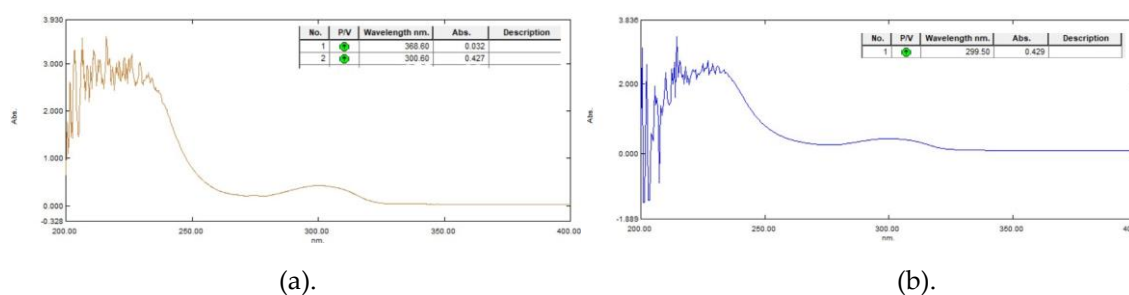
Glibenklamid mempunyai dua metabolit utama dan aktif secara farmakologi yakni 4-*trans*-hydroxyglibenklamid (M1) dan 3-*cis* hydroxyglibenklamid (M2b). Metabolit ini memiliki aktivitas hipoglikemik yang nyata; meskipun 6-7 kali lebih rendah dari obat glibenklamid [14]. Kedua metabolit memiliki profil farmakokinetik yang sangat mirip, kecuali volume distribusi dan klirens ginjal. Pada manusia, 4-*trans*-hydroxyglibenklamid dan 3-*cis* hydroxyglibenklamid terbentuk kira-kira dalam proporsi 3:1 hingga 6:1 [3].

Penelitian biotransformasi in vitro glibenklamid menemukan pembentukan empat metabolit lain yang mewakili 50% dari total metabolit yang terbentuk yaitu 4-*cis*-hydroxyglibenklamid (M2a), 3-*trans*-hydroxyglibenklamid (M3), 2-*trans*-hydroxyglibenklamid (M4) dan etil hydroxyglibenklamid (M5) [15]. Selanjutnya telah ditemukan beberapa metabolit baru yakni M6, M7, M8 dan M9. Metabolit M7-M9 hanya ditemukan pada manusia melalui biotransformasi mikrosom hati secara in vitro [16]. 4-*trans*-hydroxyglibenklamid (M1) adalah metabolit utama glibenklamid yang ditemukan pada plasma dan urin. Metabolit ini memiliki aktivitas hipoglikemik yang lebih rendah dari glibenklamid karena dapat meningkatkan sekresi insulin [3]. Pada manusia kadar metabolit 4-*trans*-hydroxyglibenklamid ditemukan lebih banyak dari metabolit lainnya. Sedaangkan pada beberapa hewan kuantitasnya berbeda-beda [16].

Spektroskopi UV/VIS adalah teknik yang didasarkan pada penyerapan cahaya oleh zat yang tidak diketahui atau oleh sampel yang tidak diketahui. Sampel disinari dengan sinar elektromagnetik dari berbagai panjang gelombang. Cahaya yang tersisa, yaitu cahaya yang ditransmisikan, dicatat sebagai fungsi panjang gelombang oleh detektor yang sesuai, yang menyediakan spektrum UV/VIS sampel. Karena setiap zat menyerap cahaya dengan cara yang berbeda, ada hubungan yang unik dan spesifik antara zat dan spektrum UV/VIS-nya. Spektrum kemudian dapat digunakan untuk mengidentifikasi atau mengukur suatu zat. Spektroskopi UV/VIS biasanya diterapkan pada molekul organik, ion anorganik atau kompleks dalam larutan. Konsentrasi analit dalam larutan dapat ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu. Dari nilai absorbansi sampel dapat dihitung konsentrasinya [11].

### Spektrum serapan maksimum glibenklamid dan 4-*trans*-hydroxyglibenclamid

Panjang gelombangnya digunakan dalam analisis kuantitatif yakni panjang gelombangnya memiliki absorbansi maksimum. Hal tersebut disebabkan (1) panjang gelombangnya maksimum, kepekaan juga maksimal; (2) di sekeliling panjang gelombang maksimum, kurva absorbansi berbentuk datar dan akan terpenuhinya kondisi hukum Lambert-Beer; (3) apabila diukur ulang kesalahannya akan kecil sekali [17]. Spektrum serapan maksimum glibenklamid dan 4-*trans*-hydroxyglibenklamid masing-masing bisa diketahui melalui Gambar 1.



**Gambar 1.** (a) Spektrum serapan maksimum glibenklamid konsentrasi 50 µg/ml, (b) Spektrum serapan maksimum 4-*trans*-hydroxyglibenklamid konsentrasi 45 µg/ml.

Pengukuran spektrum serapan maksimum diukur pada rentang panjang gelombang 200-400 nm. Pemilihan panjang gelombang maksimum didasarkan dari data nilai  $A_1^1$  yang mana digunakan untuk mengetahui berapa besar konsentrasi senyawa yang harus disiapkan, sehingga diperoleh absorbansi kisaran 0,2-0,8 agar kesalahan fotometrik kecil [18]. Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh serapan maksimum glibenklamid (konsentrasi 50 µg/ml) pada panjang gelombang 300,60 nm dan 4-*trans*-hydroxyglibenklamid (konsentrasi 45 µg/ml) pada panjang gelombang 299,50 nm. Hasil yang diperoleh sesuai dengan ketentuan Clark, dimana menurut Clark panjang gelombang maksimum glibenklamid dalam pelarut metanol berada pada 272 dan 300 nm dengan nilai  $A_1^1 = 63a$  [17]. Glibenklamid dan 4-*trans*-hydroxyglibenklamid mempunyai

panjang gelombang yang sangat dekat, hal ini karena glibenklamid dan metabolitnya memiliki struktur kimia yang sangat mirip dan massa relative yang sangat berdekatan.

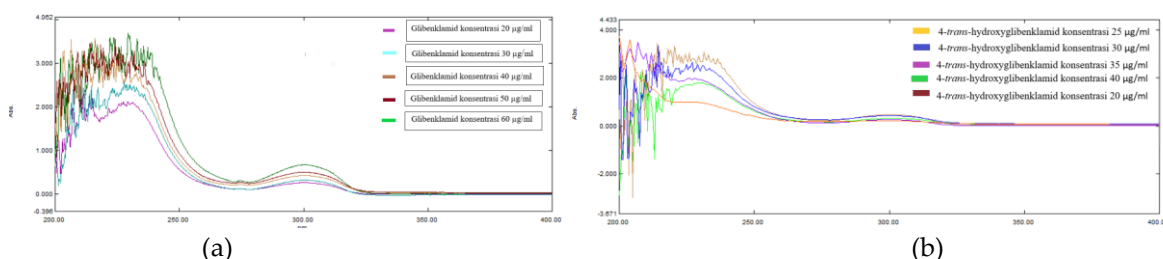
### Spektrum serapan baku glibenklamid dan 4-*trans*-hydroxyglibenklamid

Berdasarkan Gambar 2 spektrum glibenklamid dibuat dalam konsentrasi 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, dan 60 µg/ml. Sementara diatas menunjukkan glibenklamid dan 4-*trans* hydroxyglibenklamid 4-*trans* hydroxyglibenklamid dibuat dalam dalam konsentrasi 25 µg/ml, 30µg/ml, 35 µg/ml, 40 µg/ml, dan 45µg/ml. Nilai absorbansinya sekitar 0,2-0,6. Dapat dilihat bahwa panjang gelombang kedua senyawa tersebut tidak berubah, hanya absorbansi nya saja yang meningkat seiring bertambahnya konsentrasi. Hal tersebut memiliki kesesuaian dengan hukum Lambert-Beer yang menyatakan nilai absorbansi menjadi berbanding lurus dari konsentrasi, penyebabnya b memiliki harga 1cm bisa diabaikan dan ε menjadi ketetapan. Maka konsentrasi yang semakin tinggi membuat absorbansi menjadi tinggi juga, begitu pun sebaliknya. Terjadi hubungan yang linier dalam absorbansi dan konsentrasi, jika nilai absorbansinya larutan antara 0,2-0,8 [18,19].

### Kurva kalibrasi glibenklamid dan 4-*trans*-hydroxyglibenklamid

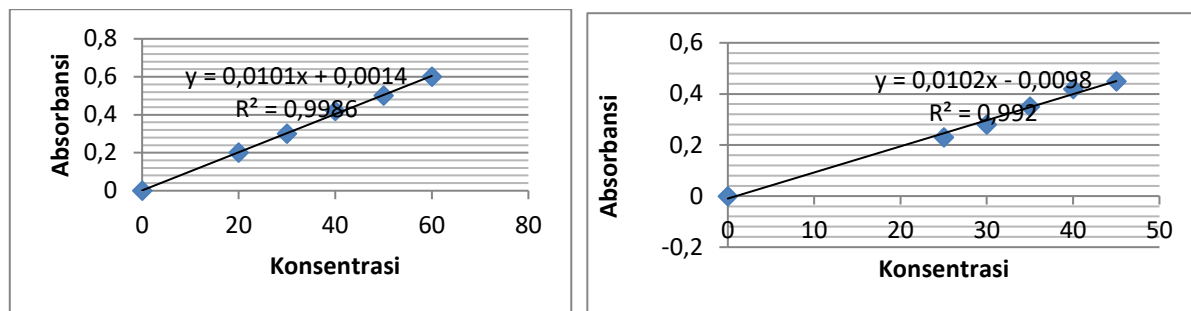
Kurva kalibrasi adalah hubungan yang diketahui dalam respons instrumen dan konsentrasi analit. Kurva kalibrasi diharuskan minimal enam titik standar [20]. Masing-masing kurva kalibrasi glibenklamid dan 4-*trans*-hydroxyglibenklamid dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan hasil penelitian, persamaan regresi glibenklamid yang diperoleh adalah  $Y=0,010x+0,001$  dimana koefisien korelasinya 0,998. Sementara persamaan regresi 4-*trans*-hydroxyglibenklamid yang didapatkan adalah  $Y=0,0102x-0,0098$  di mana koefisien korelasinya 0,992. Koefisien korelasi dari kurva kalibrasi glibenklamid dan 4-*trans*-hydroxyglibenklamid mendekati angka 1 dengan nilai  $b = 0$ . Koefisien korelasi  $r$  digunakan menjadi parameter untuk melihat hubungan linier yang muncul. Hubungan linier tercapai apabila nilai  $b=0$  dan  $r = +1$  ataupun  $-1$  bergantung pada arah garisnya. Melalui hubungan positif (korelasi) dalam konsentrasi dengan absorbansi, yakni semakin bertambahnya konsentrasi glibenklamid maupun 4-*trans*-hydroxyglibenklamid, maka semakin meningkat pula absorbansinya [20].

Spektrum serapan maksimum glibenklamid dan 4-*trans*-hydroxyglibenklamid dapat dilihat pada sesuai pada Gambar 1 yang terjadi adalah panjang gelombang yang sangat berdekatan. Dalam pengukuran (penetapan kadar) akan sangat sulit ditetapkan secara simultan karena terjadi tumpang tindih dua cara yakni tidak ada panjang gelombang dimana salah satu komponen dapat diukur tanpa gangguan oleh komponen yang lain, karena kedua spektrum saling tumpang tindih secara keseluruhan [21]. Hal ini dapat dilihat dengan panjang gelombangnya yang sangat berdekatan. Artinya, pada absorbansi maksimum dari glibenklamid pada panjang gelombang 300,60 nm, 4-*trans*-hydroxyglibenklamid juga mempunyai absorbansi tersendiri. Demikian juga pada absorbansi maksimum 4-*trans*-hydroxyglibenklamid pada panjang gelombang 299,50 nm, glibenklamid juga mempunyai absorbansi tersendiri. Oleh sebab itu, untuk menetapkan kadar kedua campuran tersebut secara simultan dalam aplikasi TDM sulit dilakukan, sehingga mungkin untuk selanjutnya dapat dilakukan penelitian secara analisis multikomponen.



**Gambar 2.** (a) Spektrum serapan glibenklamid dalam konsentrasi 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, dan 60 µg/ml, (b) Spektrum serapan 4-*trans* hydroxyglibenklamid dalam konsentrasi 25 µg/ml, 30µg/ml, 35 µg/ml, 40 µg/ml, dan 45µg/ml.





Gambar 3. (a) Kurva kalibrasi glibenklamid, (b) Kurva kalibrasi 4-*trans*-hydroxyglibenklamid

## Kesimpulan

Panjang gelombang maksimum glibenklamid dan 4-*trans*-hydroxyglibenklamid adalah 300,6 nm dan 299,5 nm. Kurva kalibrasi glibenklamid diperoleh dengan persamaan regresi  $Y = Y=0,010x+0,001$  disertai koefisien korelasi 0,998. Sementara 4-*trans*-hydroxyglibenklamid  $Y= 0,0102x-0,0098$  disertai koefisien korelasi 0,992.

## Conflict of Interest

Penulis menyatakan tidak ada konflik berkepentingan dalam penelitian ini.

## Acknowledgment

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada STIKes Assyifa Aceh yang telah memfalisitasi pelaksanaan penelitian ini.

## Referensi

- Haring., Ammon., M. Kellerer. *Anti Diabetic Agent Recent Advances in their Molecular and Clinical Pharmacology*.1969; Academic Press
- Katzung, B.G., Masters, S.B. dan Trevor, A.J. *Farmakologi Dasar & Klinik, Vol.2, Edisi 12*, Editor Bahasa Indonesia Ricky Soeharsono. Jakarta: EGC; 2011
- Rydberg T., Jonsson A., Roder, and M., Melander A. *Hypoglycemic Activity of Glyburide (Glibenclamide) Metabolites in Humans : Diabetes Care*. 1994
- Gedeon, Christelle, Bhushan Kapur, Katarina Aleksa, and Gideon Koren. *A Simple and Rapid HPLC Method for the Detection of Glyburide in Plasma Original Research Communication (Analytical)*. 2008; *Clinical Biochemistry* 41(3): 167–73: Elsevier.
- Rydberg., Jonsson, A., & Melandert, A. *Comparison of the kinetics of glyburide and its active metabolites in humans*. 283–295. 1995
- Menteri Kesehatan RI. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No 72 Tahun 2016 Tentang Standar Pelayanan Kefarmasiandi Rumah Sakit. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2016
- Albu F, Georgita C, David V, and Medvedovici A. *Determination of glibenclamide in human plasma by liquid chromatography and atmospheric pressure chemical ionization/MS-MS detection*. 2007; *Journal of Chromatography B*. 846:222–229: Elsevier.
- Zhang, Xing., Xiaoming Wan., Daria I. Vernikovskaya., Valentina M. Fokina., Tatiana N. Nanovskaya., Gary D.V. Hankins., Mahmoud S, Ahmed. *Quantitative determination of metformin, glyburide and its metabolites in plasma and urine of pregnant patients by LCMS/MS*. 2016; HHS Public Acces
- Ditjen POM R. I. *Farmakope Indonesia. Edisi Kelima*. Jakarta; Dapertemen Kesehatan RI; 2012
- Apriani, aida. *Maximum Wavelength And Overlay of Glibenclamide and Its Metabolits 4-trans-Hydroxyglibenclamide by Uv-Vis Spectrophotometry*. 2022
- Caro, Cosimo A De, and Haller Claudia. *UV / VIS Spectrophotometry*. 2017; ResearchGat
- Food and Drug Administration. *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*. 2018; *FDA Guidance*

13. Bosenberg, L. H., and D. G. Van Zyl. 2008. *The Mechanism of Action of Oral Antidiabetic Drugs: A Review of Recent Literature*. *Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa* 13(3): 80–89. 2018; *Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa*
14. Mansour, Oussama. *Sulfonylurea Review Human Journals* 11, issue (february). 2018; *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research (IJPPR)*
15. Zarikova, Olga L., Fokina, Valentina., Nanovskaya, Tatiana., Hill, Ronald A., Mattison., Hankin., Ahmed. *Identification of Mayor Human hepatic and Placental Enzyme Responsible for The Biotransformation of Glyburide*. 2009; Elsevier.
16. El-haj, Babiker M, and Samrein B M Ahmed. *Alkyl Moieties in Drug Molecules : Prediction of Structure Influence and Pharmacologic Activity*. 2020; MDPI
17. Moffat, A.C., dkk. *Clarke's Analysis Of Drug And Poisons*. 2005; Pharmaceutical Press Electronic version
18. Gandjar, IG & Abdul rohman. *Spektroskopi Molekuler untuk Analisis farmasi*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press; 2015
19. Harmita. *Analisis Fisikokimia potensiometridan spektroskopi*. Jakarta: EGC; 2009
20. Harmita. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. 2004; Majalah Ilmu Kefarmasian
21. Day, R.A dan A.L, Underwood. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta: Erlangga; 1986