

Literature Review: Validasi Metode Analisis Penetapan Kadar Metformin Dalam Plasma Dengan Berbagai Metode

Saeful Amin¹, Elsa Farhatunnisa^{2*}, Vera Nurviana³

^{1,2,3}Program Studi Farmasi, Universitas Bakti Tunas Husada, Tasikmalaya, Indonesia

*Corresponding author: farhatunnisaelsa@gmail.com

Abstract

Background: Metformin is the first-line drug for the treatment of type 2 Diabetes Mellitus, which requires monitoring of plasma levels for therapy optimization. The determination of metformin levels in plasma requires valid and reliable analytical methods. **Objective:** To identify and compare the validation parameters of analytical methods for determining metformin levels in plasma, including selectivity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), accuracy, and precision (intraday and interday), through a literature review. **Methods:** A descriptive literature study was conducted by searching articles in the Google Scholar, PubMed, and Semantic Scholar databases for the period 2015–2025. The inclusion criteria included journals discussing the validation of methods for determining plasma metformin levels, with full-text access, in Indonesian or English, and published in accredited/reputable journals. **Results:** Fourteen articles met the inclusion criteria. The methods used included RP-HPLC, HPLC-UV, LC-MS/MS, HILIC/ESI-MS, UHPLC-MS/MS, and UPLC-MS/MS. Validation parameters showed good selectivity in all 14 methods, linearity with $R^2 = 0.9913–0.9999$ accompanied by linear regression equations reflecting the characteristics of each detection system, Limit of Detection of 0.02–2.18 $\mu\text{g/mL}$ and Limit of Quantitation of 0.05–10.03 $\mu\text{g/mL}$, accuracy of 81–105.5% (11 of 14 methods met FDA criteria), and intraday precision RSD of 0.12–19.7% and interday precision RSD of 0.04–16.35%. **Conclusion:** The RP-HPLC method with the Analytical Quality by Design (AQbD) approach is the most optimal and balanced method for determining metformin levels in plasma in terms of linearity ($R^2 = 0.9999$), sensitivity (Limit of Detection 0.18 $\mu\text{g/mL}$; Limit of Quantitation 0.50 $\mu\text{g/mL}$), accuracy (97.2–101.21%), and precision (RSD < 2%), as well as being cost-effective for routine therapy monitoring. MS/MS-based methods are recommended for applications requiring very high sensitivity, such as pharmacokinetic studies.

Keywords: Assay, Metformin, Plasma, Method Validation.

Abstrak

Pendahuluan: Metformin merupakan obat lini pertama untuk pengobatan Diabetes Mellitus tipe 2, yang memerlukan pemantauan kadar plasma guna mengoptimalkan terapi. Penentuan kadar metformin dalam plasma memerlukan metode analitis yang valid dan andal. **Tujuan:** Mengidentifikasi dan membandingkan parameter validasi metode analitik dalam menentukan kadar metformin dalam plasma, termasuk selektivitas, linearitas, batas deteksi (LOD), batas kuantifikasi (LOQ), akurasi, dan presisi (intraday dan interday), melalui studi literatur. **Metode:** Studi literatur deskriptif dengan menelusuri artikel-artikel dalam basis data Google Scholar, PubMed, dan Semantic Scholar periode 2015–2025. Kriteria inklusi mencakup jurnal-jurnal yang membahas validasi metode untuk menentukan kadar metformin dalam plasma, dapat diakses teks lengkap, bahasa Indonesia atau Inggris, serta diterbitkan dalam jurnal-jurnal terakreditasi/bereputasi. **Hasil:** Empat belas artikel memenuhi kriteria inklusi. Metode yang digunakan meliputi RP-HPLC, HPLC-UV, LC-MS/MS, HILIC/ESI-MS, UHPLC-MS/MS, dan UPLC-MS/MS. Parameter validasi menunjukkan selektivitas yang baik pada ke-14 metode tersebut, linearitas dengan $R^2 = 0.9913–0.9999$ disertai persamaan regresi linier yang mencerminkan karakteristik masing-masing sistem deteksi, Batas Deteksi sebesar 0,02–2,18 $\mu\text{g/mL}$ dan Batas Kuantitasi sebesar 0,05–10,03 $\mu\text{g/mL}$, akurasi sebesar 81–105,5% (11 dari 14 metode memenuhi kriteria FDA), serta presisi intraday RSD sebesar 0,12–19,7% dan presisi interday RSD sebesar 0,04–16,35%. **Kesimpulan:** Metode RP-HPLC dengan pendekatan Analytical Quality by Design (AQbD) merupakan metode yang paling optimal dan seimbang untuk menentukan kadar metformin dalam plasma dalam hal linearitas ($R^2 = 0.9999$), sensitivitas (Batas Deteksi 0,18 $\mu\text{g/mL}$; Batas Kuantitasi 0,50 $\mu\text{g/mL}$), akurasi (97,2–101,21%), dan presisi (RSD < 2%), serta hemat biaya untuk pemantauan terapi rutin. Metode berbasis MS/MS direkomendasikan untuk aplikasi yang memerlukan sensitivitas sangat tinggi, seperti studi farmakokinetik.

Kata kunci: Penetapan Kadar, Metformin, Plasma, Validasi Metode.

PENDAHULUAN

Metformin (*N,N*-dimethylimidodicarbonimide diamide) merupakan obat oral yang digunakan sebagai obat lini pertama dalam menangani Diabetes Mellitus tipe 2 (DMT-2). Berdasarkan data *International Diabetes Federation* (IDF), pada 2024 prevalensi diabetes pada orang dewasa di Indonesia sebanyak 11,3 persen, yaitu 20.426.400 orang, naik dari tahun 2023 yang sebanyak 19,6 juta orang. Jumlah tersebut diprediksi akan melonjak mencapai 28,5 juta penduduk pada 2045 jika tidak ditangani. Diabetes dengan komplikasinya menjadi penyebab kematian ketiga di Indonesia.

Metformin adalah obat antidiabetes oral golongan biguanida yang mempunyai mekanisme kerja utama mengurangi glukoneogenesis di hati dengan menurunkan kadar glukosa darah. Ekspresi gen-gen yang terlibat dalam glukoneogenesis berkurang ketika protein CREB mengalami fosforilasi, dan substrat glukoneogenesis juga mengakibatkan peningkatan kadar asam lemak bebas. Pada daerah jaringan perifer, metformin dapat meningkatkan penyerapan glukosa yang dimediasi oleh insulin. Senyawa metformin diserap atau mengalami absorpsi di daerah saluran pencernaan. Metformin tidak diserap dengan baik jika dikonsumsi bersama makanan. Efek terapeutik metformin dapat dipengaruhi oleh obat-obatan yang lebih dari 70% terikat pada protein plasma.

Sebagai bagian dari pemantauan obat yang beredar atau sebagai syarat pendaftaran formulasi obat oleh otoritas pengatur, penentuan kadar obat merupakan salah satu parameter penting dalam monograf yang harus dilakukan untuk menjamin stabilitas formulasi obat selama masa simpannya saat berada di pasaran (Bajaj *et al.*, 2012). Tujuan dari penetapan kadar suatu obat adalah untuk memastikan bahwa kadar zat aktif obat tersebut telah memenuhi persyaratan Farmakope Indonesia serta untuk menjamin kualitas dan keamanan obat tersebut (Putra *et al.*, 2023). Spektrofotometri dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC) adalah instrumen yang dapat digunakan untuk menentukan kadar sediaan obat. Sebelum alat-alat ini dapat digunakan untuk menganalisis kadar zat aktif dalam obat, harus dilakukan validasi metode terlebih dahulu (Khodijah *et al.*, 2024).

Salah satu komponen terpenting dalam pengendalian mutu adalah validasi metode. Validasi adalah proses verifikasi suatu uji serta bukti objektif bahwa kondisi-kondisi tertentu telah terpenuhi untuk tujuan tertentu. Akurasi, presisi, spesifisitas, batas deteksi (LoD), dan batas kuantifikasi (LoQ) merupakan parameter yang digunakan untuk memvalidasi metode analitik (Sahumena *et al.*, 2020).

Cairan kompleks yang dikenal sebagai plasma berfungsi sebagai media untuk pengangkutan zat-zat di dalam aliran darah. Matriks biologis seperti plasma bersifat kompleks, oleh karena itu penentuan konsentrasi plasma dalam matriks biologis merupakan hal yang kompleks (Lestari, 2014). Uji bioekivalensi terkait jaminan kualitas plasma farmasi sangat penting bagi pasien, hal ini dilakukan untuk mengevaluasi keamanan dan efektivitas obat yang sedang diuji. Salah satu cara paling akurat untuk menjamin kualitas obat dan mengoptimalkan terapi dalam perawatan medis adalah dengan mengukur konsentrasi obat dalam plasma (Tania *et al.*, 2016).

Cairan jaringan atau plasma mengalir sebagian besar sel jaringan. Oleh karena itu, teknik yang berguna dan praktis untuk evaluasi farmakokinetik klinis adalah penggunaan plasma sebagai matriks untuk mengukur konsentrasi obat (Fauziah *et al.*, 2023). Untuk menjamin kualitas obat dan memaksimalkan terapi obat, konsentrasi obat dalam sampel biologis harus ditentukan menggunakan metode yang sesuai. Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Mariska *et al.*, (2025), setiap teknik analitik memiliki kelebihan dan kekurangan yang perlu disesuaikan dengan tujuan analisis dan berbagai kondisi teknis. Uraian tersebut memicu minat para peneliti untuk meninjau literatur guna mengidentifikasi teknik analitik terbaik dalam mengukur kadar metformin dalam plasma dengan berbagai metode. Berdasarkan uraian di atas, peneliti tertarik untuk melakukan studi literatur guna mengetahui validasi metode analisis yang paling tepat untuk menentukan kadar metformin dalam plasma menggunakan metode yang berbeda.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan pada penelitian ini menggunakan perangkat lunak *Microsoft Word*, *Microsoft Excel*, *Harzing's Publish or Perish*, *Mendeley Reference Manager* sebagai pengolah pustaka, dan artikel ilmiah yang membahas tentang Validasi Metode Analisis Penetapan Kadar Metformin Dalam Plasma Dengan Berbagai Metode yang diperoleh dari pencarian melalui database seperti Google Scholar, PubMed, dan Semantic Scholar.

Alat

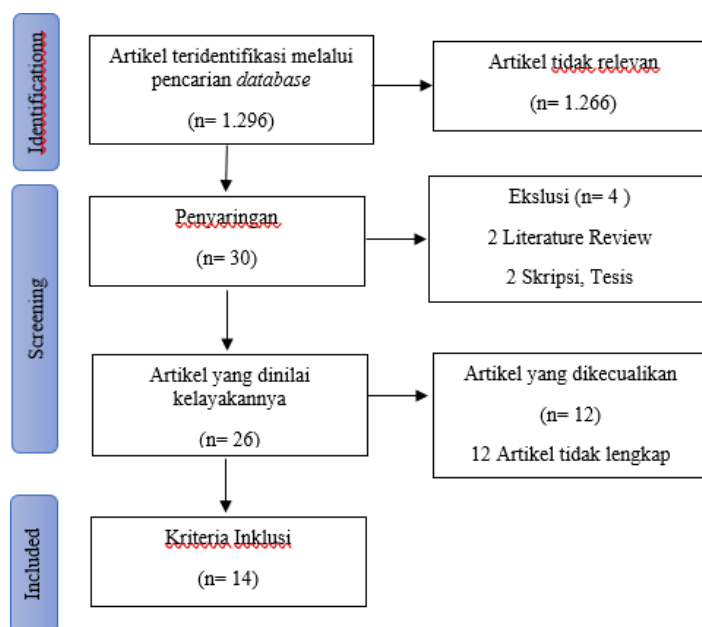
Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat elektronik berupa personal computer HP AU28MEO dengan spesifikasi processor AMD Ryzen 3 3250U with radeon Graphics dan sistem operasi 64 bit.

Metode

Metode penelitian yang digunakan yaitu penelitian deskriptif berupa studi literatur. Penelusuran literatur dilakukan dengan menggunakan sumber database seperti *Google Scholar*, *PubMed*, dan *Semantic Scholar*. Pencarian jurnal nasional menggunakan kata kunci "Penetapan Kadar", "Metformin", "Plasma" dan "Validasi Metode", sedangkan untuk jurnal internasional menggunakan kata kunci "Assay", "Metformin", "Plasma" dan "Method Validation". Artikel diseleksi berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif kualitatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan pencarian literatur, hasil penelusuran yang didapatkan sebanyak 1.296 artikel kemudian dilakukan penyeleksian berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi didapatkan sebanyak 14 artikel yang masuk dalam kriteria inklusi. Alur pemilihan artikel tersebut disajikan pada Gambar 1, sedangkan hasil analisis studi literature ditampilkan pada Tabel 1.



Gambar 1. Alur Pemilihan Artikel

Tabel 1. Hasil Analisis Studi Literatur

No.	Sumber Pustaka	Metode	Parameter Validasi						
			Selektivitas	Linearitas	Batas Deteksi	Batas Kuantitasi	Akurasi	Presisi	
								Intra-day	Inter-day
1.	Yusuf <i>et al.</i> , (2015)	RP-HPLC	Baik	$y = 0,311x - 0,005$ $R^2 = 0.9998$	0,02 µg/ml	0,05 µg/ml	81 - 95%	0,6 - 3,6%	3,5% - 8,1 %
2.	Manidipa D & Gowri SD, (2015)	RP-HPLC	Baik	$y = 1192x - 38173$ $R^2 = 0.997$	-	-	99,88-100,05%	0,12 – 0,47%	0,04 - 0,21%
3.	Kumar <i>et al.</i> , (2015)	LC-MS/MS	Baik	$R^2 = 0.999$	-	-	98,78-102,30%	0,51 – 2,93%	0,45 – 3,87%
4.	Ningrum <i>et al.</i> , (2018)	HPLC-UV	Baik	$y = 10847.3x + 472.5$ $R^2 = 0.999$	0,14 µg/mL	0,44 µg/mL	58,73 - 94,69%	-7,94 -16,5%	-13,43 – 16,35%
5.	Antonopoulos <i>et al.</i> , (2018)	HILIC/ESI-MS	Baik	$y = 0.00715x + 0.066$ $R^2 \geq 0.996$	0,3 µg/ml	1 µg/ml	35 - 92,6%	5,3 – 9,1%	3,0 – 7,1%
6.	Ramisetti <i>et al.</i> , (2019)	LC–MS/MS	Baik	$R^2 \geq 0.99$	-	10,03µg/mL	95,8 – 106%	3,12 – 7,42%	2,69 – 6,78%
7.	Mohamed <i>et al.</i> , (2019)	LC–MS/MS	Baik	$y = 0.0016x - 0.0088$ $R^2 = 0.9971$	-	-	91,7 – 101,44%	2,98 – 8,46%	4,98 – 8,27%
8.	Kang <i>et al.</i> , (2020)	UHPL-CHRMS	Baik	$R^2 \geq 0.9980$	-	-	91,13 - 105,25 %	1,35 – 8,57%	6,61 - 13,46%
9.	Thao <i>et al.</i> , (2020)	LC–MS/MS	Baik	$y = 0.01175x - 0.0570$ $R^2 \geq 0,99$	-	-	96,62 – 107,3%	2,72 - 5,23 %	2,52 – 4,37%
10.	Shakoor <i>et al.</i> , (2020)	RP-HPLC	Baik	$R^2 = 0.9917$	2,18 µg/mL	6,55 µg/mL	99,83-100,22 %	0,43 - 0,87 %	0,35 - 0,88%
11.	Abou-omar <i>et al.</i> , (2021)	UPLC-MS/MS	Baik	$y = 0.0038X + 0.0111$ $R^2 = 0.9999$	-	-	90,62 – 105,5%	0,9 – 5,63%	2,74 – 6,32%



12.	Magdy <i>et al.</i> , (2023)	RP-HPLC	Baik	$y = 2.46x - 0.23$ $R^2 = 0.9999$	0,18 µg/mL	0,50 µg/mL	97.2 -101.21%	-	-
13.	Fernando <i>et al.</i> , (2024)	HPLC-UV	Baik	$y = 0,0184x + 0,0726$ $R^2 = 0.9979$	0,24 µg/mL	0,8 µg/mL	110,5 - 945,5 %	6,72-19,7%	-
14.	Fattah <i>et al.</i> , (2024)	RP-HPLC	Baik	1–1000 ng/mL	0,74 µg/mL	2,23 µg/mL	100 – 101,7%	0,49 – 1,40%	1,20 – 2,42%

Berdasarkan hasil penelusuran literatur yang telah dilakukan, diperoleh 14 artikel yang memenuhi kriteria inklusi. Artikel-artikel tersebut membahas validasi metode analisis penetapan kadar metformin dalam plasma menggunakan berbagai metode, yaitu RP-HPLC, HPLC-UV, LC-MS/MS, HILIC/ESI-MS, UHPLC-MS/MS, dan UPLC-MS/MS. Pembahasan berikut akan menguraikan hasil analisis parameter validasi metode metformin dalam plasma, yang meliputi selektivitas, linearitas, batas deteksi (LOD), batas kuantifikasi (LOQ), akurasi, dan presisi.

Selektivitas

Selektivitas adalah kemampuan suatu metode analisis untuk membedakan dan mengukur analit target secara spesifik di dalam matriks biologis, sehingga respons yang diperoleh hanya berasal dari analit yang dituju meskipun terdapat komponen lain yang mungkin mengganggu dalam sampel (ICH, 2022). Uji selektivitas dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan metode dalam membedakan analit target dari komponen lain yang berpotensi terdapat dalam matriks sampel. Pengujian ini dilakukan dengan menganalisis campuran yang mengandung analit target dan zat pengganggu menggunakan metode yang divalidasi, sehingga dapat dinilai apakah terdapat interferensi terhadap respons analit. Jika metode hanya memberikan satu reaksi yang berkaitan dengan zat target dan tidak terpengaruh oleh zat pengganggu, maka selektivitasnya baik (Yusuf *et al.*, 2015).

Berdasarkan hasil kajian literatur dari 14 artikel yang dianalisis, semua metode menghasilkan selektivitas yang baik. Hal ini sejalan dengan pernyataan (Pricilia, Sudewi and Lolo, 2015) yang menyatakan bahwa metode analisis dikatakan selektif jika hanya memberikan respons terhadap analit target dan tidak terpengaruh oleh keberadaan zat pengganggu dalam sampel.

Berdasarkan hasil penelitian Yusuf *et al.* (2015) yang menggunakan metode RP-HPLC, tidak ditemukan adanya puncak interferensi yang signifikan pada waktu retensi metformin dalam kromatogram plasma blanko, sehingga metode dinyatakan memiliki selektivitas yang baik. Penelitian Manidipa D dan Gowri SD. (2015) yang juga menggunakan RP-HPLC menunjukkan bahwa metode yang dikembangkan mampu memisahkan metformin dari alogliptin dan komponen plasma lainnya tanpa adanya gangguan, yang dikonfirmasi melalui pemeriksaan kromatogram plasma blank. Penelitian (Shakoor *et al.*, 2020) menggunakan metode *stability-indicating* RP-HPLC dalam analisis metformin dan vildagliptin menunjukkan bahwa metode yang dikembangkan mampu membedakan dan mengukur metformin secara spesifik dalam plasma manusia tanpa adanya interferensi dari eksipien, matriks biologis, maupun produk degradasi. Penelitian Magdy *et al.* (2023) menggunakan pendekatan *Analytical Quality by Design* (AQbD) untuk mengembangkan metode RP-HPLC, hasil uji selektivitas menunjukkan pemisahan yang baik antara ketiga analit (omarigliptin, metformin, ezetimibe) dengan tidak adanya interferensi dari komponen plasma. Penelitian Fattah *et al* (2024) menunjukkan bahwa metode HPLC yang dikembangkan bersifat selektif karena mampu membedakan dan mengukur metformin (MET) dan dapagliflozin (DAP) secara jelas tanpa adanya gangguan dari komponen lain, diperkuat dengan penggunaan solid phase extraction (SPE) sebagai teknik pemurnian sampel.

Berdasarkan hasil penelitian Ningrum *et. al* (2018) menggunakan metode KCKT menunjukkan selektivitas yang baik meskipun terdapat beberapa tantangan dalam pemisahan akibat kompleksitas matriks plasma. Selektivitas dijaga dengan mengoptimalkan kondisi kromatografi dan prosedur preparasi sampel yang ketat. Penelitian Fernando *et al* (2024) juga menunjukkan hasil selektivitas yang baik pada metode HPLC-UV yang dikembangkan, dengan kromatogram menunjukkan pemisahan baseline yang jelas antara metformin dan komponen plasma lainnya.

Penelitian Kumar *et al* (2015), Ramiseti *et al* (2019) dan Mohamed *et. al* (2019) menggunakan metode LC-MS/MS dan menunjukkan hasil selektivitas yang sangat baik, dengan tidak ditemukannya puncak interferensi yang berarti dari komponen endogen plasma pada waktu retensi metformin maupun standar internal yang digunakan. Penelitian Thao *et. al* (2020), hasil uji selektivitas menunjukkan tidak adanya puncak interferensi pada waktu retensi metformin dan standar internal,

yang mengindikasikan bahwa metode tersebut selektif untuk menganalisis metformin dalam matriks plasma.

Penelitian Antonopoulos *et al* (2018) menggunakan metode HILIC/ESI-MS yang menggabungkan kromatografi interaksi hidrofilik dengan deteksi massa; metode ini menunjukkan selektivitas yang sangat baik karena mekanisme retensi HILIC yang berbeda secara fundamental dari RP-HPLC memungkinkan pemisahan yang lebih baik untuk senyawa polar seperti metformin

Berdasarkan hasil penelitian Kang *et al* (2020), hasil uji selektivitas menggunakan metode UHPL CHRMS menunjukkan bahwa respon zat pengganggu pada plasma blank berada di bawah 20% dari LLOQ untuk analit dan di bawah 5% untuk standar internal. Selain itu, kromatogram plasma tidak menunjukkan puncak interferensi pada waktu retensi metformin. Hal ini membuktikan bahwa metode memiliki selektivitas yang baik untuk analisis metformin dalam plasma manusia. Penelitian Abou-omar *et al* (2021) yang mengembangkan metode UPLC-MS/MS untuk analisis metformin dan empagliflozin menghasilkan selektivitas yang baik dengan tidak ditemukannya puncak interferensi dari komponen endogen plasma pada waktu retensi analit.

Metode-metode tersebut tetap dianggap dapat digunakan untuk analisis metformin dalam plasma karena telah melalui proses validasi parameter lainnya yang memadai. Menurut Yusuf *et al.*, (2015), dalam beberapa kasus selektivitas dapat diimplikasikan dari parameter validasi lain seperti spesifisitas dan linearitas, terutama jika tidak ada interferensi yang teramati selama proses analisis. Proses pencapaian selektivitas yang baik dalam analisis metformin pada plasma umumnya melibatkan beberapa tahap preparasi sampel. Sebagian besar penelitian yang dikaji menggunakan teknik protein precipitation atau liquid-liquid extraction untuk membersihkan sampel plasma dari protein dan lipid yang dapat mengganggu analisis (Lestari, 2014). Dalam penelitian Abou-omar *et al.*, (2021) mengembangkan pendekatan *freezing lipid precipitation* yang terbukti efektif dalam meningkatkan selektivitas metode dengan menghilangkan interferensi dari komponen lipid plasma. Penggunaan detektor massa (MS/MS) pada beberapa metode seperti LC-MS/MS dan UPLC-MS/MS juga berkontribusi signifikan terhadap peningkatan selektivitas. Detektor massa mampu mengidentifikasi analit berdasarkan rasio massa terhadap muatan (m/z) yang spesifik, sehingga meminimalkan kemungkinan interferensi dari senyawa lain yang memiliki waktu retensi serupa (Ravisankar *et al.*, 2015). Hal ini menjadikan metode-metode berbasis MS/MS menunjukkan selektivitas yang lebih unggul dibandingkan metode berbasis UV maupun DAD.

Berdasarkan uraian di atas, dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang dikembangkan untuk penetapan kadar metformin dalam plasma telah memenuhi kriteria selektivitas yang baik. Selektivitas yang baik merupakan prasyarat penting untuk memastikan bahwa hasil analisis yang diperoleh benar-benar merefleksikan konsentrasi metformin dalam sampel plasma tanpa bias dari komponen lain, metode analisis yang dikembangkan menunjukkan tidak adanya interferensi dari komponen matriks plasma pada waktu retensi metformin. Selektivitas yang baik ini penting untuk menjaga keakuratan dan ketepatan hasil analisis, terutama pada konsentrasi rendah, sehingga metode dapat diandalkan untuk aplikasi klinis seperti studi farmakokinetik dan *therapeutic drug monitoring*.

Linearitas

Linieritas merupakan kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Astuti *et al.*, 2016). Dalam konteks analisis bioanalitik, linearitas sangat penting untuk memastikan bahwa metode dapat mengukur konsentrasi analit secara akurat pada berbagai level konsentrasi yang mungkin ditemukan dalam sampel biologis (Lestari, 2014). Pengujian linearitas dilakukan dengan membuat kurva kalibrasi pada berbagai konsentrasi sampel yang berbeda, di mana dari data tersebut diperoleh persamaan regresi linear dengan y adalah respons (luas area/absorbansi), x adalah konsentrasi, dan r adalah koefisien korelasi. R (koefisien korelasi) kemudian dihitung untuk menilai kualitas hubungan linear tersebut. Menurut ICH (2005), nilai r yang diterima untuk metode bioanalitik adalah $\geq 0,998$.

Hasil kajian literatur dari 14 artikel menunjukkan variasi dalam persamaan regresi linier dan nilai koefisien korelasi yang dilaporkan. Penelitian Yusuf *et al* (2015) menggunakan metode RP-KCKT melaporkan persamaan regresi linier $y = 0,311x - 0,005$ dengan $R^2 = 0,9998$. Persamaan ini menunjukkan slope yang rendah (0,311) mencerminkan sensitivitas deteksi UV pada panjang gelombang yang digunakan. Nilai $R^2 = 0,9998$ menunjukkan hubungan linear yang sangat baik antara konsentrasi metformin dan respons detektor dalam rentang konsentrasi yang diuji. Penelitian Manidipa D & Gowri SD (2015) melaporkan persamaan regresi $y = 1192x - 38173$ dengan $R^2 = 0,997$ menggunakan metode RP-HPLC. Slope yang sangat besar (1192) pada persamaan ini mencerminkan penggunaan deteksi pada panjang gelombang dengan absorptivitas molar metformin yang tinggi, sehingga memberikan respons area yang besar terhadap perubahan konsentrasi. Penelitian Shakoor *et al* (2020) menggunakan metode *stability-indicating* RP-HPLC melaporkan $R^2 = 0,9917$ tanpa menyertakan persamaan regresi lengkap. Meskipun nilai ini paling rendah di antara semua penelitian yang dikaji, linearitas ini masih dapat diterima untuk analisis metformin dalam sampel biologis. Penelitian Magdy *et al* (2023) menggunakan metode RP-HPLC dengan pendekatan AQbD melaporkan persamaan regresi $y = 2,46x - 0,23$ dengan $R^2 = 0,9999$. Slope (2,46) mencerminkan sensitivitas detektor UV pada panjang gelombang 235 nm yang dipilih melalui optimasi AQbD. Intercept negatif kecil (-0,23) menunjukkan bahwa terdapat sedikit offset dalam respons sistem yang perlu diperhitungkan dalam kalkulasi konsentrasi. Optimasi sistematis parameter analitik menggunakan design of experiments (DOE) dalam pendekatan AQbD terbukti menghasilkan kurva kalibrasi dengan linearitas yang sangat baik. Penelitian Fattah *et al* (2024) melaporkan rentang linearitas yang sangat luas yaitu 1–1000 ng/mL dengan metode KCKT, namun tidak melaporkan persamaan regresi secara eksplisit dalam publikasi. Berdasarkan informasi yang tersedia, nilai R^2 dari metode ini memenuhi kriteria penerimaan, dan rentang yang luas ini sangat menguntungkan untuk aplikasi klinis karena dapat mengukur konsentrasi metformin dari level subterapeutik hingga toksik tanpa perlu dilusi sampel.

Penelitian Ningrum *et al* (2018) menggunakan metode HPLC-UV melaporkan persamaan regresi $y = 10847,3x + 472,5$ dengan $R^2 = 0,999$. Slope yang besar (10847,3) pada metode ini konsisten dengan penggunaan detektor UV pada panjang gelombang optimal metformin di mana absorptivitas molarnya cukup tinggi. Intercept positif (472,5) menunjukkan adanya sedikit sinyal latar belakang yang terdeteksi bahkan tanpa analit, yang umum terjadi dalam analisis matriks plasma. Penelitian Fernando *et al* (2024) menggunakan metode HPLC-UV melaporkan persamaan regresi $y = 0,0184x + 0,0726$ dengan $R^2 = 0,9979$. Slope (0,0184) dan intercept (0,0726) dalam persamaan ini mencerminkan karakteristik absorbansi metformin pada panjang gelombang yang digunakan untuk mengevaluasi interaksi farmakokinetik metformin dengan sari buah pare.

Penelitian Kumar *et al* (2015) menggunakan metode LC-MS/MS melaporkan $R^2 = 0,999$ tanpa menyebutkan persamaan regresi lengkap dalam artikel yang dikaji; sensitivitas tinggi deteksi massa menjadikan slope kurva kalibrasi umumnya sangat kecil dalam satuan rasio area analit terhadap standar internal. Penelitian Ramiseti *et al* (2019) menggunakan metode LC-MS/MS melaporkan $R^2 \geq 0,99$ tanpa menyebutkan persamaan regresi lengkap; nilai korelasi ini masih memenuhi kriteria penerimaan meskipun sedikit lebih rendah dibandingkan dengan beberapa jurnal lain. Penelitian Mohamed *et al* (2019) menggunakan metode LC-MS/MS melaporkan persamaan regresi $y = 0,0016x - 0,0088$ dengan $R^2 = 0,9971$. Slope kecil (0,0016) dan intercept negatif kecil (-0,0088) adalah karakteristik umum kurva kalibrasi dengan deteksi massa, di mana respons dinyatakan sebagai rasio area analit terhadap standar internal. Penelitian Thao *et al* (2020) menggunakan metode LC-MS/MS melaporkan persamaan regresi $y = 0,01175x - 0,0570$ dengan $R^2 \geq 0,99$. Slope (0,01175) dan intercept negatif (-0,0570) yang kecil merupakan pola umum pada kurva kalibrasi MS/MS dengan standar internal. Meskipun nilai R^2 sedikit lebih rendah daripada beberapa jurnal lain, linearitas ini masih dianggap acceptable karena mampu memberikan hasil yang reliable dalam rentang konsentrasi terapi metformin.

Penelitian Antonopoulos *et al* (2018) menggunakan metode HILIC/ESI-MS melaporkan

persamaan regresi $y = 0,00715x + 0,066$ dengan $R^2 \geq 0,996$. Slope yang sangat kecil (0,00715) mencerminkan karakteristik deteksi massa yang bekerja berdasarkan rasio ion, berbeda dengan detektor UV. Nilai intercept positif kecil (0,066) mengindikasikan adanya noise latar belakang yang minimal dalam sistem deteksi massa yang digunakan.

Penelitian Kang *et al* (2020) menggunakan metode UHPLC-MS/MS melaporkan $R^2 \geq 0,9980$. Meskipun tidak melaporkan persamaan regresi lengkap, nilai korelasi tersebut memenuhi kriteria ICH untuk linearitas metode bioanalitik dan metode ini menggunakan rentang konsentrasi yang cukup luas untuk mencakup berbagai kondisi klinis. Penelitian Abou-omar *et al* (2021) menggunakan metode UPLC-MS/MS melaporkan persamaan regresi $y = 0,0038x + 0,0111$ dengan $R^2 = 0,9999$. Persamaan ini menunjukkan slope kecil (0,0038) yang khas untuk deteksi massa, dengan intercept positif yang sangat kecil (0,0111), mengindikasikan noise latar belakang yang minimal dan sistem analisis yang sangat bersih. Nilai $R^2 = 0,9999$ merupakan nilai tertinggi bersama Magdy *et al*. (2023) di antara seluruh metode, mencerminkan kualitas kurva kalibrasi yang sangat baik.

Secara keseluruhan, semua metode yang dikembangkan memiliki linearitas yang memenuhi atau melampaui persyaratan internasional untuk metode bioanalitik, dengan nilai R^2 berkisar antara 0,9913 hingga 0,9999. Linearitas yang baik ini menjadi fondasi untuk parameter validasi lainnya seperti akurasi dan presisi, serta memastikan bahwa seluruh 14 metode dapat diandalkan untuk aplikasi klinis seperti *therapeutic drug monitoring* dan studi farmakokinetik metformin.

Limit of Detection (LOD) dan Limit of Quantification (LOQ)

LOD dan LOQ merupakan parameter validasi yang menunjukkan sensitivitas metode analisis. LOD adalah konsentrasi terendah analit yang dapat dideteksi namun tidak harus dikuantifikasi dengan akurasi dan presisi yang *acceptable*, sedangkan LOQ adalah konsentrasi terendah analit yang dapat dikuantifikasi dengan akurasi dan presisi yang memadai (ICH, 2005).

Parameter skala kecil yang dapat digunakan pada instrumen atau perangkat untuk menentukan konsentrasi terendah suatu analit yang dapat dideteksi adalah batas deteksi (LOD). Batas deteksi dapat berupa sejumlah kecil suatu analit yang terdeteksi tanpa harus memenuhi standar presisi dan akurasi. Jumlah data terkecil yang dapat dikuantifikasi pada tingkat presisi dan akurasi tertentu disebut Batas Kuantifikasi (LOQ) atau batas kuantifikasi. Dalam penelitian kuantitatif, batas kuantifikasi adalah matriks yang digunakan untuk menilai signifikansi temuan analitik dalam kumpulan data multidisiplin yang kompleks. Hal ini juga dapat digunakan untuk menilai apakah suatu produk telah rusak atau memburuk (Sayuthi & Kurniawati, 2015). LOD dan LOQ dapat dihitung menggunakan rumus $LOD = 3,3\sigma/S$ dan $LOQ = 10\sigma/S$, di mana σ adalah standar deviasi respons blanko dan S adalah slope kurva kalibrasi (Sumarno & Kusumaningtyas, 2019).

Berdasarkan hasil kajian literatur, terdapat variasi yang cukup signifikan dalam nilai LOD dan LOQ yang dilaporkan oleh berbagai penelitian. Hal ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor termasuk jenis metode analisis, sistem deteksi yang digunakan, dan kompleksitas preparasi sampel (Sari & Kuntari, 2019).

Berdasarkan penelitian Yusuf *et al* (2015) menggunakan RP-HPLC melaporkan LOD 0,02 $\mu\text{g/mL}$ dan LOQ 0,05 $\mu\text{g/mL}$, yang merupakan nilai sangat rendah untuk metode berbasis UV. Sensitivitas yang baik ini dicapai melalui optimasi kondisi kromatografi termasuk pemilihan panjang gelombang deteksi yang optimal. Penelitian Manidipa D & Gowri SD (2015) tidak melaporkan nilai LOD dan LOQ secara eksplisit dalam artikel; hal ini dapat disebabkan oleh fokus penelitian yang lebih ditekankan pada pemisahan dan kuantifikasi pada konsentrasi terapi. Penelitian Shakoor *et al* (2020) melaporkan LOD 2,18 $\mu\text{g/mL}$ dan LOQ 6,55 $\mu\text{g/mL}$ menggunakan metode stability-indicating RP-HPLC, yang merupakan nilai tertinggi di antara semua metode berbasis UV/DAD. Sensitivitas yang lebih rendah ini dapat disebabkan oleh optimasi metode yang lebih difokuskan pada kemampuan stability-indicating daripada sensitivitas maksimal. Penelitian Magdy *et al* (2023) melaporkan nilai LOD dan LOQ terendah di antara semua metode berbasis UV, yaitu 0,18 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,50 $\mu\text{g/mL}$ menggunakan metode RP-HPLC. Sensitivitas yang tinggi ini sangat penting terutama untuk studi

farmakokinetik yang memerlukan pengukuran konsentrasi metformin pada fase eliminasi terminal. Penelitian Fattah *et al* (2024) menggunakan metode HPLC dengan SPE melaporkan LOD 0,74 µg/mL dan LOQ 2,23 µg/mL; meskipun nilai ini relatif lebih tinggi, sensitivitas metode ini masih memadai untuk mengukur konsentrasi 8 metformin dalam plasma pada kondisi terapi, mengingat konsentrasi plasma puncak metformin setelah dosis oral 850 mg dapat mencapai $1,73 \pm 0,54$ µg/mL (Yusuf *et al.*, 2015).

Penelitian Ningrum *et al* (2018) melaporkan LOD 0,14 µg/mL dan LOQ 0,44 µg/mL menggunakan metode HPLC-UV, menunjukkan sensitivitas yang cukup baik untuk analisis metformin dalam plasma. Penelitian Fernando *et al* (2024) melaporkan LOD 0,24 µg/mL dan LOQ 0,8 µg/mL, nilai yang sedikit lebih tinggi dari Magdy *et al* (2023) namun masih cukup sensitif untuk aplikasi klinis.

Penelitian Kumar *et al* (2015) menggunakan LC-MS/MS juga tidak melaporkan LOD dan LOQ secara eksplisit; seperti yang umum pada metode berbasis MS/MS, sensitivitas yang sangat tinggi (dalam kisaran ng/mL hingga pg/mL) diasumsikan tanpa perlu melaporkan nilai spesifik dalam beberapa penelitian. Penelitian Mohamed *et al* (2019) menggunakan LC-MS/MS tidak melaporkan LOD dan LOQ; seperti Kumar *et al.* (2015), sensitivitas tinggi metode MS/MS umumnya diasumsikan tanpa pelaporan nilai spesifik. Penelitian Ramiseti *et al* (2019) menggunakan LC-MS/MS tidak melaporkan nilai LOD, namun melaporkan LOQ 10,03 µg/mL yang relatif tinggi dibandingkan metode lain. Nilai LOQ ini mencerminkan pemilihan rentang kalibrasi yang disesuaikan dengan konsentrasi plasma yang diharapkan dalam studi farmakokinetik spesifik penelitian tersebut.

Penelitian Antonopoulos *et al* (2018) melaporkan LOD 0,3 µg/mL dan LOQ 1 µg/mL menggunakan HILIC/ESI-MS, meskipun menggunakan deteksi massa, yang mungkin disebabkan oleh efek ionisasi yang kurang optimal pada metode HILIC untuk metformin.

Penelitian Kang *et al* (2020), Thao *et al* (2020), dan Abou-omar *et al* (2021) seluruhnya menggunakan metode berbasis mass spectrometry (UHPLC-MS/MS, LC-MS/MS, dan UPLC-MS/MS) dan tidak melaporkan nilai LOD dan LOQ secara eksplisit. Umumnya, metode berbasis MS/MS memiliki sensitivitas yang sangat tinggi dengan LOD dan LOQ dalam rentang µg/mL bahkan pg/mL (Ravisankar *et al.*, 2015), sehingga meskipun tidak dilaporkan, dapat diasumsikan bahwa sensitivitas metode ini lebih unggul dibandingkan metode berbasis UV/DAD.

Perbedaan sensitivitas antara metode berbasis MS/MS dan UV/DAD dapat dijelaskan dari mekanisme deteksi yang mendasarinya. Detektor massa bekerja berdasarkan fragmentasi ion spesifik (MRM) yang memberikan selektivitas dan sensitivitas tinggi, sedangkan detektor UV/DAD bekerja berdasarkan absorpsi cahaya UV yang kurang spesifik dan sensitif (Lestari, 2014).

Akurasi

Tujuan dari pengujian akurasi adalah untuk memastikan apakah teknik analitis yang digunakan untuk menguji suatu sampel dapat menghasilkan nilai pemulihan yang memenuhi standar yang ditetapkan. Nilai pemulihan dapat menunjukkan seberapa dekat hasil analisis tersebut dengan konsentrasi sebenarnya dari analit. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa faktor terpenting yang harus dipenuhi oleh suatu metode analisis adalah pengujian akurasi (Ravisankar *et al.*, 2015).

Akurasi adalah sebuah ukuran yang menyatakan derajat kedekatan antara nilai rata-rata hasil analisis dengan hasil teoritis. Parameter akurasi ditunjukkan oleh persen perolehan kembali (% recovery) dari hasil analisis uji terhadap kadar analit sebenarnya. Syarat penerimaan akurasi berdasarkan panduan FDA pada *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation* (2018) adalah nilai % diff < 20% pada kadar terendah dan < 15% pada kadar lainnya, atau % recovery dalam rentang 80–110% (Huber & Ludwig, 2007; Yuwono & Indrayanto, 2005). Nilai persen perolehan kembali tidak harus 100%, namun dimaksimalkan untuk konsisten, presisi, dan reproduibel.

Hasil kajian literatur menunjukkan bahwa sebagian besar metode yang dikembangkan memiliki akurasi yang baik dan memenuhi kriteria *acceptance* yang ditetapkan. Berdasarkan hasil penelitian Yusuf *et al* (2015) menggunakan RP-HPLC melaporkan rentang akurasi 81–95%. Meskipun batas bawah 81% berada tepat di atas batas minimum 80% yang diizinkan FDA, nilai ini masih dinyatakan

acceptable karena berada dalam rentang yang ditetapkan oleh panduan bioanalitik. Penelitian Manidipa D & Gowri SD (2015) melaporkan akurasi yang sangat baik dengan recovery 99,88–100,05% menggunakan RP-HPLC. Nilai recovery yang sangat mendekati 100% ini menunjukkan bahwa prosedur preparasi sampel dan kondisi kromatografi yang dikembangkan sangat efisien dalam mengekstraksi dan mendeteksi metformin dari plasma. Penelitian Magdy *et al* (2023) melaporkan akurasi 97,2–101,21% untuk metode RP-HPLC dengan pendekatan AQbD; nilai yang sangat konsisten ini merupakan hasil dari optimasi sistematis menggunakan *design of experiments*. Penelitian Fattah *et al* (2024) melaporkan akurasi 100–101,7% menggunakan metode HPLC dengan SPE; nilai yang sangat dekat dengan 100% ini menunjukkan bahwa SPE efektif dalam membersihkan sampel dari interferensi dan menghasilkan recovery yang konsisten. Penelitian Shakoor *et al* (2020) melaporkan akurasi 99,83–100,22% menggunakan metode RP-HPLC, merupakan nilai terbaik di antara semua metode berbasis HPLC-UV yang dikaji, menunjukkan bahwa prosedur *stability-indicating* yang dikembangkan tidak hanya mampu mengukur metformin dengan tepat tetapi juga membedakannya dari produk degradasi.

Penelitian Ningrum *et al* (2018) melaporkan akurasi 58,73–94,69% menggunakan HPLC-UV, di mana batas bawah 58,73% jauh di bawah persyaratan FDA (2018). Nilai recovery yang rendah dan bervariasi ini mengindikasikan adanya masalah dalam efisiensi ekstraksi atau preparasi sampel, sehingga metode ini memerlukan optimasi lebih lanjut sebelum dapat diaplikasikan secara rutin. Penelitian Fernando *et al* (2024) melaporkan rentang akurasi yang sangat luas yaitu 110,5–945,5%, di mana nilai recovery > 110% hingga > 900% tidak *acceptable* menurut kriteria FDA (2018), mengindikasikan adanya masalah dalam preparasi sampel atau interferensi positif dari komponen sari buah pare yang dikombinasikan dengan metformin, sehingga metode ini memerlukan investigasi dan optimasi lebih lanjut.

Penelitian Kumar *et al* (2015) menggunakan LC-MS/MS melaporkan akurasi 98,78–102,30%, rentang yang sangat baik dan konsisten, mencerminkan keunggulan metode MS/MS dalam memberikan hasil yang akurat bahkan dalam matriks biologis yang kompleks. Penelitian Ramiseti *et al* (2019) menggunakan LC-MS/MS melaporkan akurasi 95,8–106%, yang merupakan rentang yang sangat baik dan memenuhi persyaratan FDA. Penelitian Mohamed *et al* (2019) menggunakan LC MS/MS melaporkan akurasi 91,7–101,44%, yang juga memenuhi persyaratan dengan rentang yang cukup konsisten. Penelitian Thao *et al* (2020) melaporkan recovery 96,62–107,3% untuk metode LC MS/MS, dengan konsistensi nilai recovery pada berbagai level konsentrasi yang menunjukkan akurasi yang baik dan reliable.

Penelitian Antonopoulos *et al* (2018) menggunakan HILIC/ESI-MS melaporkan akurasi 35–92,6%, rentang yang sangat lebar dan batas bawah yang sangat rendah. Variabilitas akurasi yang tinggi pada metode HILIC ini mungkin disebabkan oleh efek matriks yang signifikan pada sistem ionisasi ESI yang sensitif terhadap komponen plasma. Penelitian Kang *et al* (2020) melaporkan akurasi 91,13–105,25% menggunakan metode UHPLC-MS/MS; nilai recovery yang mendekati 100% mengindikasikan proses ekstraksi dan preparasi sampel yang efisien. Penelitian Abou-omar *et al* (2021) melaporkan recovery 90,62–105,5% untuk metode UPLC-MS/MS, di mana teknik freezing lipid precipitation terbukti efektif dalam meningkatkan *recovery* dengan mengurangi interferensi dari komponen lipid plasma.

Secara keseluruhan, dengan pengecualian pada Ningrum *et al*. (2018), Antonopoulos *et al*. (2018), dan Fernando *et al*. (2024) yang menunjukkan akurasi di luar batas penerimaan, 11 dari 14 metode menunjukkan akurasi yang baik dan memenuhi kriteria validasi bioanalitik FDA (2018). Perbedaan tingkat akurasi antar metode terutama dipengaruhi oleh efisiensi teknik preparasi sampel dan kemampuan metode dalam mengelola efek matriks plasma yang kompleks.

Presisi

Presisi merupakan parameter validasi yang menunjukkan tingkat kesesuaian atau *reproducibility* hasil pengukuran yang diperoleh dari serangkaian pengukuran berulang pada kondisi

yang sama (ICH, 2005). Presisi biasanya dinyatakan sebagai relative standard deviation (RSD) atau *coefficient of variation* (CV). Menurut FDA (2018), kriteria *acceptance* untuk presisi adalah $RSD \leq 15\%$ untuk konsentrasi menengah dan tinggi, serta $RSD \leq 20\%$ untuk konsentrasi terendah (LLOQ). Presisi dinilai dalam dua dimensi utama yaitu presisi intraday (keterulangan dalam satu hari analisis) dan presisi interday (reprodusibilitas antar hari yang berbeda). Pengujian presisi intraday dilakukan pada satu hari dengan kondisi, peralatan, dan perlakuan yang sama, sedangkan pengujian interday dilakukan pada hari yang berbeda (umumnya tiga hari berturut-turut) dengan kondisi yang sama (ICH, 2005).

Presisi intraday mengukur keterulangan metode dalam satu sesi analisis dan mencerminkan konsistensi instrumen, preparasi sampel, dan prosedur analisis dalam kondisi yang identik. Penelitian Yusuf *et al* (2015) menggunakan RP-HPLC melaporkan RSD intraday 0,6–3,6%. Rentang yang kecil ini menunjukkan keterulangan yang sangat baik dalam satu hari analisis. Penelitian Manidipa D & Gowri SD (2015) melaporkan RSD intraday 0,12–0,47% menggunakan RP-HPLC, merupakan nilai terbaik di antara seluruh jurnal yang dikaji dan mencerminkan presisi yang sangat tinggi. Penelitian Shakoor *et al* (2020) melaporkan RSD intraday 0,43–0,87% menggunakan RP-HPLC, merupakan salah satu nilai terbaik di antara seluruh metode berbasis UV. Penelitian Magdy *et al* (2023) menggunakan RP-HPLC melaporkan RSD intraday $< 2\%$ berdasarkan hasil yang dilaporkan dalam artikel; nilai yang sangat baik ini konsisten dengan pendekatan AQbD yang digunakan dalam optimasi metode. Penelitian Fattah *et al* (2024) melaporkan RSD intraday 0,49–1,40%, mencerminkan keterulangan yang sangat tinggi berkat penggunaan SPE sebagai teknik preparasi sampel yang konsisten.

Penelitian Ningrum *et al* (2018) melaporkan nilai yang tidak lazim yaitu RSD intraday –7,94% hingga 16,35% menggunakan HPLC-UV; nilai negatif pada RSD menunjukkan kemungkinan pelaporan yang tidak konvensional atau masalah pada perhitungan, dan nilai 16,35% melampaui batas *acceptance* FDA. Penelitian Fernando *et al* (2024) melaporkan RSD intraday 6,72–19,7% menggunakan HPLC; nilai pada batas atas (19,7%) sangat mendekati batas penerimaan LLOQ (20%) menurut FDA, konsisten dengan masalah akurasi yang juga ditemukan pada metode ini dan mengindikasikan perlunya optimasi lebih lanjut.

Penelitian Kumar *et al* (2015) menggunakan LC-MS/MS melaporkan RSD intraday 0,51–2,93%, menunjukkan keterulangan yang sangat baik bahkan dalam matriks biologis yang kompleks. Penelitian Ramiseti *et al* (2019) melaporkan RSD intraday 3,12–7,42% menggunakan LC-MS/MS, masih memenuhi kriteria penerimaan FDA. Penelitian Mohamed *et al* (2019) melaporkan RSD intraday 2,98–8,46% menggunakan LC-MS/MS, demikian pula masih dalam batas yang *acceptable*. Penelitian Thao *et al* (2020) melaporkan RSD intraday 2,72–5,23% menggunakan LC-MS/MS, menunjukkan keterulangan yang baik.

Penelitian Antonopoulos *et al* (2018) melaporkan RSD intraday 5,3–9,1% menggunakan HILIC/ESI-MS, yang masih dalam batas penerimaan meskipun sedikit lebih tinggi, kemungkinan akibat variabilitas ionisasi yang lebih besar pada metode HILIC. Penelitian Kang *et al* (2020) melaporkan RSD intraday 1,35–8,57% menggunakan UHPLC-MS/MS, memenuhi kriteria penerimaan. Penelitian Abou omar *et al* (2021) melaporkan RSD intraday 0,9–5,63% menggunakan UPLC-MS/MS, menunjukkan presisi yang sangat baik.

Presisi interday mengukur reprodusibilitas metode pada hari-hari yang berbeda dan mencerminkan stabilitas sistem analisis terhadap variasi waktu, kondisi lingkungan, dan batch reagen yang berbeda. Presisi interday umumnya sedikit lebih tinggi dari intraday karena adanya faktor-faktor variabilitas tambahan antar sesi analisis.

Berdasarkan hasil penelitian Yusuf *et al* (2015) melaporkan RSD interday 3,5–8,1% menggunakan RP-HPLC; nilai yang sedikit lebih tinggi dari intraday (0,6–3,6%) menunjukkan adanya variabilitas antar hari yang normal dalam sistem HPLC-UV. Penelitian Manidipa D & Gowri SD (2015) melaporkan RSD interday 0,04–0,21% menggunakan RP-HPLC; nilai yang sangat rendah ini menunjukkan reprodusibilitas yang luar biasa bahkan antar hari berbeda, merupakan nilai presisi

interday terbaik di antara seluruh metode yang dikaji. Penelitian Shakoore *et al* (2020) melaporkan RSD interday 0,35–0,88% menggunakan RP-HPLC, sangat baik dan konsisten dengan nilai intraday. Penelitian Magdy *et al* (2023) menggunakan RP-HPLC melaporkan RSD interday < 2% berdasarkan 11 hasil yang dilaporkan dalam artikel menunjukkan hasil sangat baik dan konsisten dengan presisi intraday. Berdasarkan penelusuran artikel, metode ini melaporkan RSD $\leq$ 2% baik untuk intraday maupun interday pada plasma, namun nilai spesifik per level konsentrasi tidak tersedia untuk dikonfirmasi lebih lanjut. Penelitian Fattah *et al* (2024) melaporkan RSD interday 1,20–2,42% menggunakan HPLC dengan SPE, menunjukkan reproduktibilitas yang sangat baik antar hari.

Penelitian Ningrum *et al* (2018) melaporkan RSD interday –13,43% hingga 16,35% menggunakan HPLC-UV. Nilai pada batas atas (16,35%) melampaui persyaratan FDA, dan nilai negatif menunjukkan masalah yang sama seperti pada intraday. Penelitian Fernando *et al* (2024) data interday tidak dilaporkan secara spesifik dalam artikel yang dikaji, merupakan keterbatasan pelaporan yang perlu diperhatikan.

Penelitian Kumar *et al* (2015) melaporkan RSD interday 0,45–3,87% menggunakan LC-MS/MS, menunjukkan reproduktibilitas yang sangat baik. Penelitian Ramiseti *et al* (2019) melaporkan RSD interday 2,69–6,78% menggunakan LC-MS/MS, sedikit lebih rendah dari intraday dan dalam batas penerimaan. Penelitian Mohamed *et al* (2019) melaporkan RSD interday 4,98–8,27% menggunakan LC-MS/MS, dalam batas penerimaan. Penelitian Thao *et al* (2020) melaporkan RSD interday 2,52–4,37% menggunakan LC-MS/MS, sedikit lebih rendah dari intraday dan dalam batas penerimaan yang baik.

Penelitian Antonopoulos *et al* (2018) melaporkan RSD interday 3,0–7,1% menggunakan HILIC/ESI-MS, sedikit lebih rendah dari intraday (5,3–9,1%), yang merupakan pola tidak umum namun masih acceptable. Penelitian Kang *et al* (2020) melaporkan RSD interday 6,61–13,46% menggunakan UHPLC-MS/MS; nilai yang lebih tinggi dari intraday (1,35–8,57%) ini masih dalam batas penerimaan tetapi menunjukkan variabilitas antar hari yang lebih besar, mungkin terkait dengan kompleksitas prosedur analisis. Penelitian Abou-omar *et al* (2021) melaporkan RSD interday 2,74–6,32% menggunakan UPLC-MS/MS, menunjukkan reproduktibilitas yang baik antar hari.

Secara keseluruhan, sebagian besar metode menunjukkan presisi intraday dan interday yang baik dan memenuhi kriteria penerimaan FDA (2018). Metode berbasis HPLC-UV dengan teknik preparasi sampel yang optimal seperti SPE (Fattah *et al.*, 2024) dan AQbD (Magdy *et al.*, 2023) menunjukkan presisi terbaik dengan RSD < 2%. Beberapa metode berbasis MS/MS menunjukkan variabilitas interday yang sedikit lebih tinggi akibat kompleksitas sistem instrumentasi. Metode yang memerlukan optimasi lebih lanjut terkait presisi adalah Ningrum *et al.* (2018) dan Fernando *et al.* (2024).

Perbandingan Metode Analisis

Berdasarkan keseluruhan parameter validasi yang telah dibahas, dapat dilakukan perbandingan komprehensif antara berbagai metode analisis yang digunakan untuk penetapan kadar metformin dalam plasma dari 14 artikel yang dikaji.

Dari segi selektivitas, seluruh metode menunjukkan selektivitas yang baik dilihat dari tidak adanya interferensi komponen matriks plasma pada waktu retensi metformin. Namun, metode berbasis MS/MS (LC-MS/MS, UHPLC-MS/MS, UPLC-MS/MS) dan HILIC/ESI-MS secara alami memiliki selektivitas yang lebih unggul karena mekanisme deteksi berdasarkan massa (m/z) yang spesifik, dibandingkan metode berbasis UV/DAD yang lebih rentan terhadap interferensi dari senyawa dengan waktu retensi serupa. Dari segi linearitas, semua metode memiliki korelasi yang sangat baik (R^2 0,9913–0,9999). Metode UPLC-MS/MS (Abou-omar *et al.*, 2021) dan RP-HPLC dengan AQbD (Magdy *et al.*, 2023) mencapai nilai R^2 tertinggi (0,9999), menunjukkan linearitas yang hampir sempurna. Persamaan regresi linier yang diperoleh dari berbagai metode mencerminkan karakteristik sistem deteksi masing-masing, di mana metode MS/MS umumnya menghasilkan slope yang jauh lebih kecil (dalam orde 10^{-3} hingga 10^{-2}) karena respons dinyatakan sebagai rasio area terhadap

standar internal, sedangkan metode HPLC-UV menghasilkan slope yang lebih besar (dalam orde 10^2 hingga 10^4) karena respons merupakan hasil langsung dari absorpsi UV. Dari segi sensitivitas (LOD/LOQ), metode berbasis MS/MS menawarkan keunggulan sensitivitas yang jauh lebih tinggi. Di antara metode berbasis UV/DAD, Magdy *et al.* (2023) mencapai sensitivitas terbaik dengan LOD 0,18 $\mu\text{g/mL}$ dan LOQ 0,50 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan Shakoor *et al.* (2020) memiliki sensitivitas paling rendah (LOD 2,18 $\mu\text{g/mL}$; LOQ 6,55 $\mu\text{g/mL}$). Perbedaan sensitivitas antar metode UV/DAD ini terutama dipengaruhi oleh kondisi kromatografi, panjang gelombang deteksi yang dipilih, dan efisiensi preparasi sampel. Dari segi akurasi, metode HPLC berbasis SPE (Fattah *et al.*, 2024), RP-HPLC dengan AQbD (Magdy *et al.*, 2023), dan *stability-indicating* RP-HPLC (Shakoor *et al.*, 2020) menunjukkan akurasi tertinggi dengan recovery mendekati 100%. Tiga metode (Ningrum *et al.*, 2018; Antonopoulos *et al.*, 2018; Fernando *et al.*, 2024) menunjukkan akurasi di luar batas penerimaan dan memerlukan optimasi lebih lanjut. Dari segi presisi, metode RP-HPLC dari Manidipa D & Gowri SD (2015) dan Shakoor *et al.* (2020) serta HPLC dengan SPE dari Fattah *et al.* (2024) menunjukkan presisi terbaik dengan RSD konsisten $< 1\%$ untuk intraday dan interday, diikuti oleh AQbD RP-HPLC (Magdy *et al.*, 2023) dengan RSD $< 2\%$.

Berdasarkan evaluasi komprehensif terhadap seluruh parameter validasi dari 14 metode, metode RP-HPLC terbukti menjadi metode yang paling seimbang dan optimal untuk penetapan kadar metformin dalam plasma, ditinjau dari kombinasi performa validasi, kemudahan implementasi, dan efisiensi biaya. Secara spesifik, metode RP-HPLC dengan pendekatan AQbD sebagaimana dikembangkan oleh Magdy *et al.* (2023) merupakan metode yang paling direkomendasikan untuk laboratorium klinik dan penelitian dengan sumber daya menengah. Metode ini menunjukkan linearitas sempurna ($R^2 = 0,9999$), sensitivitas terbaik di antara metode UV (LOD 0,18 $\mu\text{g/mL}$; LOQ 0,50 $\mu\text{g/mL}$), akurasi yang sangat baik (97,2–101,21%), serta presisi yang baik (RSD $< 2\%$). Pendekatan AQbD yang digunakan tidak hanya menghasilkan metode yang valid tetapi juga robust terhadap variasi parameter analitik, sehingga cocok untuk implementasi rutin. Penelitian yang membutuhkan sensitivitas sangat tinggi seperti studi farmakokinetik populasi khusus (pediatri, gangguan ginjal) atau analisis sampel dengan konsentrasi sangat rendah, metode UPLC-MS/MS (Abou-omar *et al.*, 2021) menjadi pilihan terbaik dengan kombinasi linearitas sempurna ($R^2 = 0,9999$), akurasi baik (90,62–105,5%), dan presisi yang baik (RSD 0,9–6,32%), meskipun memerlukan investasi instrumentasi yang lebih besar. Untuk laboratorium dengan sumber daya terbatas yang membutuhkan metode sederhana dan cost-effective, metode *stability-indicating* RP-HPLC dari Shakoor *et al.* (2020) menawarkan alternatif yang sangat baik dengan akurasi mendekati 100% (99,83–100,22%) dan presisi yang sangat baik (RSD intraday 0,43–0,87%; interday 0,35–0,88%), meskipun dengan sensitivitas yang lebih rendah (LOD 2,18 $\mu\text{g/mL}$).

Secara keseluruhan, pemilihan metode harus mempertimbangkan tidak hanya aspek teknis parameter validasi, tetapi juga ketersediaan instrumen, keahlian analis, biaya operasional, volume sampel, dan tujuan akhir analisis. Seluruh metode yang dikaji, dengan pengecualian pada metode yang menunjukkan akurasi dan presisi di luar batas penerimaan (Ningrum *et al.*, 2018; Antonopoulos *et al.*, 2018; Fernando *et al.*, 2024) yang memerlukan optimasi lebih lanjut, telah terbukti valid untuk penetapan kadar metformin dalam plasma dan dapat digunakan sesuai dengan kebutuhan spesifik masing-masing laboratorium.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil literatur review terhadap 14 artikel penelitian mengenai validasi metode analisis penetapan kadar metformin dalam plasma dengan berbagai metode, diperoleh bahwa metode analisis yang dapat digunakan untuk penetapan kadar metformin dalam plasma meliputi RP-HPLC, HPLC-UV, LC-MS/MS, HILIC/ESI-MS, UHPLC-MS/MS, dan UPLC-MS/MS; semuanya telah memenuhi parameter validasi metode bioanalitik. Hasil pengkajian menunjukkan bahwa seluruh metode memiliki selektivitas yang baik. Parameter linearitas pada seluruh metode juga memenuhi kriteria penerimaan dengan nilai koefisien korelasi (r) berada pada rentang 0,9913–0,9999.

Sensitivitas metode bervariasi secara signifikan tergantung pada sistem deteksi. Di antara metode yang melaporkan nilai tersebut, LOD berkisar antara 0,02–2,18 µg/mL dan LOQ berkisar antara 0,05–10,03 µg/mL. Parameter akurasi pada 11 artikel menunjukkan akurasi yang memenuhi kriteria penerimaan FDA (2018) sedangkan 3 artikel lainnya (Ningrum *et al.*, 2018; Antonopoulos *et al.*, 2018; Fernando *et al.*, 2024) menunjukkan nilai recovery di luar batas penerimaan dan memerlukan optimasi lebih lanjut. Parameter presisi pada sebagian besar metode menunjukkan presisi dalam hari dan antar hari yang baik serta memenuhi kriteria FDA (2018). Nilai RSD intraday berkisar 0,12–19,7% dan interday berkisar 0,04–16,35%. Metode RP-HPLC dari Manidipa D & Gowri SD (2015), stability-indicating RP-HPLC dari Shakoor *et al.* (2020), dan HPLC-SPE dari Fattah *et al.* (2024) menunjukkan presisi terbaik, dengan RSD yang konsisten di bawah 1%. Berdasarkan evaluasi menyeluruh seluruh parameter validasi, metode RP-HPLC khususnya dengan pendekatan AQbD merupakan metode yang paling optimal dan seimbang untuk penetapan kadar metformin ditinjau dari kombinasi linearitas, sensitivitas, akurasi, presisi, dan kemudahan implementasi di laboratorium klinik. Untuk keperluan yang membutuhkan sensitivitas sangat tinggi, metode berbasis MS/MS tetap menjadi pilihan unggul.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Bakti Tunas Husada terutama fakultas farmasi atas fasilitas dan dukungan dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abou-Omar, M.N. *et al.* (2021) "Validation of a novel UPLC-MS / MS method for estimation of metformin and empagliflozin simultaneously in human plasma using freezing lipid precipitation approach and its application to pharmacokinetic stu," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 200, pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114078>.
- Antonopoulos, N. *et al.* (2018) "Hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of metformin and rosuvastatin in human plasma," *Molecules*, 23(7), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules23071548>.
- Bajaj, S., Singla, D. and Sakhuja, N. (2012), "Stability Testing of Pharmaceutical Products," *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(3), pp. 129–138. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2322>.
- Depkes, R. (2009) *Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 36 Tahun 2009 Tentang Kesehatan*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Fattah, H.M.A. *et al.* (2024) "Eco-Friendly HPLC Method for Quantification of Metformin and Dapagliflozin in Tablets Dosage Form and Spiking Human Plasma Utilizing Solid Phase Extraction," *Egyptian Journal of Chemistry*, 67(10), pp. 309–317. Available at: <https://doi.org/10.21608/ejchem.2024.279260.9529>.
- Fauziah, N.A.N., Husni, P. and Kurniati, B.D. (2023) "Artikel Review: Pengembangan dan Validasi Metode Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Untuk Penetapan Kadar Simvastatin Dalam Sediaan Tablet," *Farmaka*, 22(1), pp. 118–127.
- Fernando, A., Putri, N.K. and Fadhli, H. (2024) "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)," *Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*, 13(1), pp. 32–40.
- ICH (2022) "Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis M10," *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, (May), pp. 1–59.
- Kang, Y. *et al.* (2020) "Bioanalytical Method Using Ultra-High-Performance," pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/doi:10.3390/molecules25204625>.
- Khodijah, Sriwidodo and Roestan, R. (2024) "Validasi Metode Analisis Penetapan Kadar Paracetamol,

- Chlorphenamine Maleate, Dextromethorphan HBR, dan Phenylephrine HCL Dalam Sediaan Kaplet Secara HPLC,” *Jurnal Ilmu Kesehatan*, 2(3), pp. 91–109. Available at: <https://doi.org/10.5455/mnj.v1i2.644>.
- Kumar, Pp., Murthy, T.E.G.K. and Basaveswara Rao, M. (2015) “Development, validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of rosuvastatin and metformin in human plasma and its application to a pharmacokinetic study,” *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 6(3), p. 118. Available at: <https://doi.org/10.4103/2231-4040.157982>.
- Lestari, S.W. (2014) “Validasi Metode Penetapan Kadar Aliskiren dalam Plasma Darah secara In Vitro menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).”
- Magdy, G. et al. (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*, pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13065-023-00955-w>.
- Manidipa D, A. K., and Gowri SD, S. R. (2015) “New Validated Stability Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Metformin and Alogliptin in Human Plasma,” *Journal of Chromatography & Separation Techniques*, 06(06), pp. 6–11. Available at: <https://doi.org/10.4172/2157-7064.1000293>.
- Mariska, R., Ratnawulan Mita, S., and Nuryani, T.W. (2025) “Indonesian Journal of Biological Pharmacy Review Article: Development of Analytical Methods for Determining Albumin Levels in Traditional Medicine and Health Supplements.”
- Mohamed, D. et al. (2019) “Novel LC-MS/MS method for analysis of metformin and canagliflozin in human plasma: Application to a pharmacokinetic study,” *BMC Chemistry*, 13(3), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13065-019-0597-4>.
- Ningrum, V.D.A. et al. (2018) “Validation of an HPLC-UV method for the determination of metformin hydrochloride in spiked-human plasma for the application of therapeutic drug monitoring,” *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 11(6), pp. 2197–2202. Available at: <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2018.00406.7>.
- Pricilia, G., Sudewi, S. and Lolo, W.A. (2015) “Validasi Metode Analisis Untuk Penetapan Kadar Parasetamol dalam Sediaan Tablet,” *Pharmacon*, 4(4), pp. 168–178.
- Putra, D. D., Yety L N., and Dhurhanian, C. E. (2023) “Penetapan Kadar Sediaan Tablet Kombinasi Parasetamol Dan Tramadol Dengan Metode Spektrofotometri UV Lamda Berganda,” *Indonesian Journal on Medical Science*, 10(1), pp. 43–49. Available at: <https://doi.org/https://doi.org/10.55181/ijms.v10i1.391>.
- Ramiseti, M. et al. (2019) “Simultaneous determination of canagliflozin and metformin in human plasma by LC-MS/MS assay and its application to a human pharmacokinetic study,” *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 53(3), pp. S364–S372. Available at: <https://doi.org/10.5530/ijper.53.3s.107>.
- Sahumena, M.H. et al. (2020) “Identifikasi Jamu Yang Beredar Di Kota Kendari Menggunakan Metode Spektrofotometri Uv-Vis,” 2(September), pp. 65–72.
- Shakoor, A. et al. (2020) “Stability-Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Metformin Hydrochloride and Vildagliptin in Tablet and Biological Samples,” 32(January), pp. 39–43. Available at: <https://doi.org/10.1556/1326.2019.00555>.
- Tania, L., Sitepu, E. S., and Harahap, Y. (2016) “Validasi Metode Analisis Ofloksasin dalam Plasma In Vitro secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Fluoresensi Mengacu pada European Medicines Agency Guideline,” *Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(2), pp. 61–71.
- Thao, N.N.N. et al. (2020) “Development, Validation, and Application for Simultaneous Assay of Metformin and Sitagliptin in Human Plasma by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry,” *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(2), pp. 6–13. Available at: <https://doi.org/10.5530/srp.2020.2.02>.



Yusuf, A. *et al.* (2015) "Development and validation of RP-HPLC method for the determination of metformin in human plasma," 4(07), pp. 128–138.