



BERITA NEGARA REPUBLIK INDONESIA

No.595, 2011

BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN.
Analisis Kosmetika. Analisis.

PERATURAN KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN REPUBLIK INDONESIA

NOMOR HK.03.1.23.08.11.07331 TAHUN 2011

TENTANG

METODE ANALISIS KOSMETIKA

DENGAN RAHMAT TUHAN YANG MAHA ESA

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN REPUBLIK INDONESIA,

- Menimbang : a. bahwa masyarakat perlu dilindungi dari peredaran kosmetika yang tidak memenuhi persyaratan keamanan, kemanfaatan, dan mutu;
- b. bahwa untuk menjamin terpenuhinya persyaratan keamanan dan mutu kosmetika perlu dilakukan pengujian dengan menggunakan metode analisis yang sesuai;
- c. bahwa beberapa metode analisis kosmetika sudah diakui dan disepakati untuk digunakan di kawasan ASEAN sesuai dengan kesepakatan terakhir di Malaysia pada tahun 2006;
- d. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud dalam huruf a, huruf b, dan huruf c perlu menetapkan Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan tentang Metode Analisis Kosmetika;
- Mengingat : 1. Undang-Undang Nomor 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1999 Nomor 42,

- Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3821);
2. Undang-Undang Nomor 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2009 Nomor 144, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5063);
 3. Peraturan Pemerintah Nomor 72 Tahun 1998 tentang Pengamanan Sediaan Farmasi dan Alat Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1998 Nomor 138, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3781);
 4. Keputusan Presiden Nomor 103 Tahun 2001 tentang Kedudukan, Tugas, Fungsi, Kewenangan, Susunan Organisasi dan Tata Kerja Lembaga Pemerintah Non Departemen sebagaimana telah beberapa kali diubah terakhir dengan Peraturan Presiden Nomor 64 Tahun 2005;
 5. Keputusan Presiden Nomor 110 Tahun 2001 tentang Unit Organisasi dan Tugas Eselon I Lembaga Pemerintah Non Departemen sebagaimana telah beberapa kali diubah terakhir dengan Peraturan Presiden Nomor 52 Tahun 2005;
 6. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 1176/Menkes/Per/VIII/2010 Tahun 2010 tentang Notifikasi Kosmetika;
 7. Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 02001/SK/KBPOM Tahun 2001 tentang Organisasi dan Tata Kerja Badan Pengawas Obat dan Makanan, sebagaimana telah diubah dengan Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor HK.00.05.21.4231 Tahun 2004;
 8. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor HK.00.05.42.1018 Tahun 2008 tentang Bahan Kosmetik;
 9. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor HK.03.1.23.12.10.11983 Tahun 2010 tentang Kriteria dan Tata Cara Pengajuan Notifikasi Kosmetika;

10. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor HK.03.1.23.12.10.12123 Tahun 2010 tentang Pedoman Dokumen Informasi Produk;
11. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor HK.03.1.23.12.10.12459 Tahun 2010 tentang Persyaratan Teknis Kosmetika;
12. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor HK.03.1.23.07.11.6662 Tahun 2011 tentang Persyaratan Cemaran Mikroba Dalam Kosmetika;

MEMUTUSKAN:

Menetapkan : PERATURAN KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN TENTANG METODE ANALISIS KOSMETIKA.

BAB I

KETENTUAN UMUM

Pasal 1

Dalam Peraturan ini, yang dimaksud dengan:

1. Kosmetika adalah bahan atau sediaan yang dimaksudkan untuk digunakan pada bagian luar tubuh manusia (epidermis, rambut, kuku, bibir, dan organ genital bagian luar), atau gigi dan membran mukosa mulut, terutama untuk membersihkan, mewangikan, dan mengubah penampilan, dan/atau memperbaiki bau badan atau melindungi atau memelihara tubuh pada kondisi baik.
2. Metode Analisis adalah prosedur teknis tertentu yang ditujukan untuk pelaksanaan analisis kosmetika.

BAB II

RUANG LINGKUP

Pasal 2

Ruang lingkup metode yang ditetapkan dalam Peraturan ini berupa beberapa Metode Analisis untuk:

1. pengujian cemaran mikroba;
2. pengujian logam berat;
3. pengujian beberapa bahan yang dilarang digunakan dalam Kosmetika; dan
4. pengujian beberapa bahan pengawet yang digunakan dalam Kosmetika.

BAB III METODE ANALISIS

Pasal 3

Metode Analisis untuk pengujian cemaran mikroba sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 angka 1, berupa Metode Analisis untuk:

- a. Penetapan Angka Kapang Khamir dan Uji Angka Lempeng Total dalam Kosmetika sebagaimana tercantum dalam Lampiran 1 yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Peraturan ini; dan
- b. Uji Efektivitas Pengawet dalam Kosmetika sebagaimana tercantum dalam Lampiran 2 yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Peraturan ini.

Pasal 4

Metode Analisis untuk pengujian logam berat sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 angka 2, berupa Metode Analisis Penetapan Kadar Logam Berat (Arsen, Kadmium, Timbal, dan Merkuri) dalam Kosmetika sebagaimana tercantum dalam Lampiran 3 yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Peraturan ini.

Pasal 5

Metode Analisis untuk pengujian beberapa bahan yang dilarang digunakan dalam Kosmetika sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 angka 3 berupa Metode Analisis untuk:

- a. identifikasi Asam Retinoat dalam Kosmetika secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) sebagaimana tercantum dalam Lampiran 4 yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Peraturan ini;
- b. identifikasi Bahan Pewarna yang Dilarang dalam Kosmetika secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) sebagaimana tercantum dalam Lampiran 5 yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Peraturan ini;
- c. identifikasi dan Penetapan Kadar Hidrokinon dalam Kosmetika secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) sebagaimana tercantum dalam Lampiran 6 yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Peraturan ini; dan
- d. identifikasi Senyawa Kortikosteroid dalam Kosmetika secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) sebagaimana tercantum dalam Lampiran 7 yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Peraturan ini.

Pasal 6

Metode Analisis untuk pengujian beberapa bahan pengawet yang digunakan dalam Kosmetika sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 angka 4 berupa Metode Analisis Identifikasi dan Penetapan Kadar Pengawet dalam Kosmetika secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) sebagaimana tercantum dalam Lampiran 8 yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Peraturan ini.

BAB IV

KETENTUAN PENUTUP

Pasal 7

Peraturan ini mulai berlaku sejak tanggal diundangkan.

Agar setiap orang mengetahuinya, memerintahkan pengundangan Peraturan ini dengan penempatannya dalam Berita Negara Republik Indonesia.

Ditetapkan di Jakarta

pada tanggal 15 Agustus 2011

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT
DAN MAKANAN REPUBLIK INDONESIA,

KUSTANTINAH

Diundangkan di Jakarta

pada tanggal 21 September 2011

MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
REPUBLIK INDONESIA,

PATRIALIS AKBAR

Lampiran 1
Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat
dan Makanan Republik Indonesia
Nomor HK.03.1.23.08.11.07331 Tahun 2011

METODE ANALISIS PENETAPAN ANGKA KAPANG KHAMIR DAN UJI ANGKA LEMPENG TOTAL DALAM KOSMETIKA

A. PENETAPAN ANGKA KAPANG DAN KHAMIR

1. Ruang lingkup

Pedoman ini digunakan untuk menetapkan angka kapang dan khamir dalam kosmetika dengan cara menghitung koloni dalam media agar selektif setelah inkubasi secara aerobik.

2. Prinsip

2.1. Umum

2.1.1. Metode ini meliputi penghitungan kapang dan khamir pada media agar selektif.

2.1.2. Apabila diperkirakan contoh dapat menghambat pertumbuhan mikroba maka contoh harus dinetralkan supaya mikroba yang masih hidup dapat terdeteksi dan prosedur netralisasi harus divalidasi.

2.2. Metode yang digunakan

Penghitungan lempeng dengan:

2.1.3. Cara tuang atau sebar

Penghitungan angka lempeng dilakukan dengan menginokulasikan secara langsung sejumlah tertentu dari suspensi awal atau yang telah diencerkan secara desimal ke dalam media spesifik dengan cara tuang atau sebar, dan diinkubasi secara aerob pada suhu yang sesuai dalam waktu tertentu. Jumlah mikroba dinyatakan dalam koloni atau cfu (*colony forming units*) per mL atau per g produk.

2.1.4. Penyaringan membran

Penyaringan membran dilakukan dengan cara memindahkan sejumlah contoh ke dalam peralatan filtrasi yang telah dibasahi dengan sejumlah kecil pengencer yang steril, segera disaring dan dibilas. Membran penyaring kemudian diletakkan di atas permukaan media agar spesifik serta diinkubasi pada suhu yang sesuai dalam waktu tertentu. Jumlah koloni dinyatakan dalam cfu kapang dan khamir per mL atau per g produk.

3. Pengencer, penetral dan media kultur

3.1. Umum

Jika air merupakan komponen formula, maka digunakan air suling atau air yang sudah dimurnikan untuk pengencer, bahan penetral dan media kultur. Berikut ini adalah pengencer, bahan penetral dan media kultur yang sesuai untuk penghitungan dan deteksi bakteri. Bahan lain dapat digunakan jika telah dibuktikan kesesuaiannya.

3.2. Pengencer penetral dan pengencer

3.2.1. Umum

Pengencer digunakan untuk mendispersikan contoh. Bahan ini mengandung bahan penetral jika contoh yang akan di uji mengandung sifat anti mikroba dan efektifitas penetralan harus dibuktikan sebelum penghitungan.

3.2.2. Pengencer penetral

Pengencer penetral yang digunakan adalah media *Fluid Casein Digest Soy Lecithin Polysorbate 20* atau *Soy Casein Digest Lecithin Polysorbate 20 Broth (SCDLP 20 Broth)* dengan komposisi dan cara pembuatan tertera pada Apendiks A.1

3.2.3. Pengencer penetral lain

Pengencer penetral lain yang sesuai dan dapat digunakan tertera pada Apendiks B dan C.

3.2.4. Pengencer

Pengencer yang digunakan adalah cairan A dengan komposisi dan cara pembuatan tertera pada Apendiks A.2.

3.2.5. Pengencer lain

Pengencer lain yang dapat digunakan tertera pada Apendiks D.

3.3. Pengencer untuk suspensi khamir (*Tryptone Sodium Chloride Solution*)

Pengencer untuk suspensi khamir yang digunakan adalah larutan *Tryptone Sodium Chloride* dengan komposisi dan cara pembuatan tertera pada Apendiks A.3.

3.4. Media

3.4.1. Umum

Media kultur dapat disiapkan sesuai petunjuk atau dari kultur media dehidrat yang mengacu pada instruksi dari pabrik. Media siap pakai dapat digunakan jika komposisi dan/atau hasil pertumbuhannya sebanding dengan formula berikut ini.

3.4.2. Media untuk penghitungan

3.4.3. Media *Soybean Casein Digest Agar (SCDA)*, dengan komposisi dan pembuatan dapat dilihat pada Apendiks A.4.

3.4.3.1. Media lain yang dapat digunakan dilihat pada Apendiks F.

3.4.3.2. Media agar untuk kultivasi galur pembanding : media *Sabouroud Dextrose Agar (SDA)*, komposisi dan pembuatan dapat dilihat pada Apendiks A.8.

4. Peralatan dan alat gelas

Inkubator $22,5 \pm 2,5$ °C

Alat hitung koloni

Perlengkapan laboratorium, peralatan dan alat gelas yang umum digunakan dalam laboratorium mikrobiologi.

5. Galur mikroba

Untuk validasi kondisi pengujian, dapat digunakan galur:

5.1. *Candida albicans* ATCC 10231¹⁾ atau galur yang setara

5.1.1 . *Candida albicans* IP 48.72³⁾ atau

5.1.2 . *Candida albicans* NCPF 3179⁴⁾ atau

5.1.3 . *Candida albicans* NBRC⁵⁾ 1594 atau KCTC⁶⁾ 17205 atau

5.1.4 . *Candida albicans* TISTR 5779 atau

5.1.5 . galur koleksi nasional yang setara.

5.2. Galur khamir terpilih yang dianggap lebih sensitif terhadap aktivitas mikroba dibandingkan dengan kapang, dapat diterima sebagai perwakilan jamur (khamir dan kapang) untuk validasi metode.

Walaupun dalam kasus tertentu, diperlukan pengujian efektivitas bahan penetral yang dilakukan dengan penambahan galur jamur pembanding, menggunakan protokol yang sesuai untuk penyiapan inokulum terkalibrasi.

Galur harus diremajakan sesuai prosedur yang diberikan oleh pemasok galur dan harus disimpan di dalam laboratorium sesuai dengan standar.

6. Penanganan Produk kosmetika dan contoh

Produk yang akan diuji disimpan pada suhu ruang, tidak diinkubasi, didinginkan atau dibekukan sebelum dan sesudah analisis.

7. Prosedur

Bahan dan peralatan steril serta teknik aseptik digunakan untuk menyiapkan contoh. Untuk penyiapan suspensi awal, waktu antara selesainya penyiapan suspensi awal dan waktu inokulasi tidak boleh lebih dari 45 menit, kecuali dinyatakan lain dalam dokumen atau protokol yang berlaku.

7.1. Penyiapan suspensi awal

Suspensi awal disiapkan dari contoh, minimal 1 g atau 1 mL dari campuran homogen produk yang diuji.

Suspensi awal biasanya dibuat dengan pengenceran 1:10. Volume pengencer atau media pengkaya mungkin diperlukan lebih banyak jika pada pengenceran 1:10 tingkat kontaminasi masih tinggi dan/atau efek antimikroba masih ada.

7.1.1. Produk yang dapat bercampur dengan air

Contoh dari produk dipindahkan ke dalam sejumlah volume tertentu pengencer penetral atau pengencer.

7.1.2. Produk yang tidak dapat bercampur dengan air

Contoh dari produk dipindahkan ke dalam wadah yang berisi sejumlah tertentu bahan peningkat kelarutan (misal larutan polisorbit 80), didispersikan dan ditambah sejumlah volume tertentu pengencer penetral atau pengencer, media pengkaya, tergantung metode yang digunakan.

7.2. Metode penghitungan

7.2.1. Pengenceran untuk metode penghitungan

Suspensi awal umumnya adalah pengenceran pertama yang dihitung. Jika diperlukan, dapat dibuat seri pengenceran selanjutnya dengan menggunakan pengencer yang sama sesuai dengan tingkat kontaminasi produk yang diperkirakan.

Penghitungan umumnya dilakukan menggunakan minimal 2 cawan Petri. Namun untuk pengujian rutin boleh menggunakan satu cawan Petri, atau jika penghitungan dilakukan pada pengenceran yang berurutan dari contoh yang sama, atau mengacu pada hasil sebelumnya.

7.2.2. Metode Penghitungan Lempeng

7.2.2.1. Cara tuang

Dalam cawan Petri berdiameter 85-100 mm, diinokulasikan dengan 1 mL suspensi awal dan/atau pengenceran contoh seperti yang disiapkan pada proses validasi (lihat prosedur penetralan aktifitas antimikroba produk) dan kemudian dituangkan 15-20 mL media agar (suhu tidak lebih dari 48°C). Suspensi awal dan/atau pengenceran contoh dicampur dengan media, digoyang dengan hati-hati atau dimiringkan secukupnya supaya terdispersi dengan baik. Campuran dalam cawan Petri dibiarkan memadat pada suhu ruang (Apendiks H.1).

7.2.2.2. Cara sebar permukaan

Dalam cawan Petri berdiameter 85-100 mm, dimasukkan 15-20 mL media agar (suhu tidak lebih dari 48°C). Media agar dibiarkan dingin dan memadat di dalam inkubator, selanjutnya tidak kurang dari 0,1 mL suspensi awal dan/atau pengenceran contoh disebar pada permukaan media (Apendiks H.2).

7.2.2.3. Cara penyaringan membran

Sejumlah suspensi awal yang sesuai atau contoh yang telah diencerkan dituang ke dalam perangkat penyaring yang dilengkapi membran dengan ukuran pori 0,45 μm , membran dibilas segera setelah penyaringan dan dipindahkan ke permukaan media agar (Apendiks H.3).

7.2.2.4. Inkubasi

Kecuali dinyatakan lain, cawan Petri yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi pada $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 3-5 hari pada posisi dibalik. Segera diamati, jika tidak maka dapat disimpan dalam lemari pendingin maksimum 24 jam.

(Catatan: Pada kasus tertentu, dimana ada potensi menyebabkan keraguan dalam membedakan partikel produk dengan koloni yang dihitung, maka sebaiknya disiapkan cawan duplikat dengan pengenceran contoh dan media agar yang sama serta disimpan dalam lemari pendingin, sebagai pembanding cawan yang diinkubasi).

8. Pengamatan

8.1. Penghitungan koloni (Cara angka lempeng total dan penyaringan membran).

Setelah inkubasi, jumlah koloni dihitung sebagai berikut:

8.1.1. Pada cawan Petri yang mengandung 15-150 koloni; jika kurang dari 15 koloni dihitung seperti tertera pada **9.3**.

8.1.2. Pada membran yang mengandung 15-150 koloni; jika kurang dari 15 koloni dihitung seperti tertera pada **9.3**.

9. Pernyataan hasil

9.1. Umum

Bermacam-macam sifat dari angka lempeng harus dimasukkan dalam penghitungan. Dua hasil hanya dianggap berbeda jika selisihnya melebihi 50% atau ketika dinyatakan dalam logaritma, selisihnya melebihi 0,3.

Untuk penghitungan yang tepat, hanya dari cawan Petri dan penyaringan membran dengan koloni lebih dari 15 dan kurang dari 150 koloni.

Penghitungan yang diperoleh dari pengenceran yang tervalidasi harus diperiksa sesuai dengan metode yang dipilih.

9.2. *Jika jumlah cfu lebih dari 15 dan kurang dari 150, hasil dinyatakan sebagai berikut :*

- Jika S minimal 1 g atau 1 mL dan V minimal 1 mL

Jumlah khamir dan kapang per mL atau per g adalah = N/S

- Jika $S < 1$ g atau 1 mL, dan/atau $V <$ dari 1 mL

Jumlah khamir dan kapang dalam contoh ⁷⁾ adalah = N

Dimana S adalah berat atau volume contoh (7.1)

Hasil dinyatakan sebagai angka antara 1,0 dan 9,9 dikalikan dengan 10 pangkat (Lihat contoh 1, 2)

9.3. *Jika jumlah cfu < 15, hasil dinyatakan sebagai berikut:*

- Jika S minimal 1 g atau 1 mL dan V minimal 1 mL

Jumlah perkiraan khamir dan kapang per mL atau per g contoh adalah = N/S

- Jika $S < 1$ g atau 1 mL, dan/atau $V < 1$ mL

Jumlah perkiraan khamir dan kapang dalam contoh adalah = N

Jumlah contoh yang diuji dicatat dan dimasukkan ke dalam penghitungan S dan V, dimana S adalah berat atau volume contoh (7.1)

Hasil dinyatakan sebagai angka antara 1,0 dan 9,9 dikalikan dengan 10 pangkat (lihat contoh 3)

9.4. *Jika tidak ada koloni yang diamati, hasilnya dilaporkan sebagai berikut:*

- Kurang dari atau $\leq (1/d) \times V \times S$ cfu khamir dan kapang per g atau mL produk (S minimal 1 g atau 1 mL)

- Kurang dari atau $\leq 1/(d \times V)$ cfu khamir dan kapang pada contoh S (jumlah contoh yang diambil harus dicatat dan dimasukkan ke dalam penghitungan S dan V, serta S kurang dari 1 g atau 1 mL);

dimana **d** adalah faktor pengenceran dari suspensi awal (7.1) dan V adalah 1 (untuk penghitungan dengan cara tuang dan cara penyaringan membran) atau 0,1 (untuk cara sebar permukaan).

9.5. Contoh penghitungan

- **Contoh 1.** Dua cawan Petri atau dua membran penyaringan untuk satu pengenceran

$S = 1$ g atau 1 mL; $V = 1$ mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran 10^{-1} adalah 20 dan 16 maka rataannya adalah 18.

$N = m/(Vxd) = 18 / (1 \times 10^{-1}) = 18/0,1 = 180 = 1,8 \times 10^2$ cfu khamir dan kapang per g atau mL contoh

- **Contoh 2.** Satu cawan Petri atau satu membran penyaringan untuk satu pengenceran

$S = 1$ g atau 1 mL; $V = 1$ mL; jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran 10^{-1} adalah 20,

$N = c / (V \times d) = 20 / (1 \times 10^{-1}) = 20 / 0,1 = 200 = 2 \times 10^2$ cfu khamir dan kapang per g atau mL contoh.

- **Contoh 3.** Dua cawan Petri atau dua membran penyaringan untuk dua pengenceran

S= 1 g atau 1 mL; V = 1 mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran 10^{-1} adalah 120 dan 145, pengenceran 10^{-2} adalah 15 dan 25

$N = \sum c / (V \times d) = (120 + 145 + 15 + 25) / [1 (2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-1}] = 305 / 0,22 = 1386$ atau 1.4×10^3 cfu khamir dan kapang per g atau mL contoh.

X adalah rata-rata dari koloni yang dihitung dari 2 pengenceran dan dihitung sbb :

$$x_c = \sum c / (n_1 + 0,1 n_2)$$

n_1 adalah jumlah yang dihitung dari suspensi awal (atau untuk pengenceran pertama) dan n_2 adalah jumlah yang dihitung dari pengenceran 1/10 suspensi awal (atau untuk pengenceran kedua)

- **Contoh 4.** Tidak ada koloni

S= 1 g atau 1 mL; V = 1 mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran 10^{-1} adalah 0 dan 0

$$N \leq (1/d) \times V \times S$$

$$\leq (1/0,1) \times 1 \times 1$$

≤ 10 cfu khamir dan kapang per g atau mL produk

10. Netralisasi sifat antimikroba produk

10.1. Umum

Pengujian berbeda yang dijelaskan berikut menunjukkan bahwa mikroba dapat tumbuh di bawah kondisi analisis.

10.2. Preparasi inokulum

Sebelum pengujian, *C. albicans* diinokulasikan pada permukaan media agar non selektif *Sabouraud Dextrose Agar (SDA)*, diinkubasi pada $32,5 \pm 2,5$ °C selama 18-24 jam.

Untuk memanen kultur, digunakan jarum ose (sengkelit) steril yang digoreskan pada permukaan biakan dan kemudian diresuspensikan ke dalam pelarut untuk mendapatkan suspensi bakteri terkalibrasi lebih kurang 1×10^6 cfu per mL (diukur menggunakan spektrofotometer).

Suspensi ini dan pengencerannya dapat digunakan dalam waktu 2 jam

10.3. Validasi metode penghitungan

10.3.1. Prinsip

Contoh yang telah dinetralkan (suspensi awal, atau pengencer contoh berdasarkan pada aktivitas anti mikroba atau rendahnya kelarutan produk) dicampur dengan pengenceran mikroba. Campuran diinokulasikan pada cawan Petri atau disaring dengan penyaring membran. Setelah diinkubasi, jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dibandingkan terhadap kontrol (tanpa contoh).

Jika jumlah koloni kurang dari 50% atau 0,3 log dari kontrol, prosedur dimodifikasi (pengencer, zat penetral atau kombinasi keduanya, lihat Apendiks C). Kegagalan dari pertumbuhan inokulum tidak berlaku pada tes ini kecuali ada kemungkinan terjadi kontaminasi dari mikroba ini.

10.3.2. Validasi cara tuang

Sejumlah 9 mL suspensi awal dan atau contoh yang telah diencerkan dalam pengencer yang bersifat menetralkan dicampur dengan 1 mL suspensi mikroba yang mengandung 1000-3000 CFU/mL. Sejumlah 1 mL dipipet ke dalam cawan Petri (dilakukan secara duplo) dan dituangkan 15-20 mL medium agar cair suhu tidak lebih dari 48°C. Pada saat yang bersamaan disiapkan cawan Petri kontrol menggunakan pengencer yang sama dan suspensi mikroba yang sama, tanpa contoh.

Setelah diinkubasi selama 72 ± 6 jam pada $22,5^\circ\text{C} \pm 2,5^\circ\text{C}$, jumlah koloni pada lempeng dihitung dan dibandingkan dengan jumlah yang diperoleh dari kontrol. Pengencer dan metode penghitungan divalidasi pada pengenceran 1:10 (ketika 1 mL suspensi awal digunakan), jika penghitungan hasil kurang dari 50% atau 0,3 log dari penghitungan kontrol.

10.3.3. Validasi cara sebar permukaan

Sejumlah 9 mL suspensi awal dalam pengencer yang bersifat menetralkan (atau yang lain, lihat 3.2) dicampur dengan 1 mL suspensi mikroba yang mengandung 10.000-30.000 cfu/mL (atau kurang jika 0,5 mL atau 1 mL yang disebarkan). Kurang lebih 0,1 mL disebarkan pada permukaan lempeng agar padat (3.4.2.1) (dilakukan secara duplo). Pada saat yang bersamaan disiapkan lempeng

kontrol menggunakan pengencer yang sama dan suspensi mikroba yang sama, tanpa contoh.

Setelah diinkubasi selama 72 ± 6 jam pada $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, jumlah koloni pada lempeng dihitung dan dibandingkan dengan jumlah yang diperoleh dari kontrol. Pengencer dan metode penghitungan divalidasi pada pengenceran 1:10 (ketika 1 mL suspensi awal digunakan), jika penghitungan hasil kurang dari 50% atau 0,3 log dari penghitungan kontrol.

10.3.4. Validasi cara penyaringan membran

Sejumlah suspensi mikroba yang mengandung lebih kurang 100 cfu yang telah terkalibrasi dicampurkan pada sejumlah volume suspensi awal atau pengenceran contoh yang digunakan dalam pengujian (lihat 7.2.2.3)

Seluruh volume campuran segera disaring menggunakan membran dan dibilas menggunakan sejumlah volume air (3.1), pengencer (3.2.4) atau pengencer yang dapat menetralkan (3.2.2). Membran kemudian dipindahkan ke permukaan media agar yang sesuai (3.4.2.1).

Pada saat yang sama, disiapkan kontrol pada kondisi yang sama seperti diatas tetapi tanpa produk.

Setelah diinkubasi selama 72 ± 6 jam pada $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, jumlah koloni pada lempeng dihitung dan dibandingkan dengan jumlah yang diperoleh dari kontrol. Pengencer dan metode penghitungan divalidasi pada pengenceran 1:10 (ketika 1 mL suspensi awal digunakan), jika penghitungan hasil kurang dari 50% atau 0,3 log dari penghitungan kontrol.

11. Laporan pengujian

Laporan pengujian harus menjelaskan hal-hal berikut :

- a. Semua informasi lengkap yang dibutuhkan untuk identifikasi produk;
- b. Metode yang digunakan;
- c. Hasil yang diperoleh;
- d. Semua rincian proses untuk penyiapan suspensi awal;
- e. Deskripsi metoda dengan bahan-bahan penetral dan media yang digunakan;
- f. Validasi metoda, meskipun pengujian dilakukan terpisah.

- g. Hal-hal yang tidak diuraikan dalam dokumen ini, atau yang dianggap sebagai pilihan, bersama dengan rincian kejadian yang mungkin dapat mempengaruhi hasil.

B. UJI ANGKA LEMPENG TOTAL

1. Ruang lingkup

Pedoman ini digunakan untuk menetapkan angka bakteri aerob mesofil yang masih memiliki daya hidup dalam produk kosmetika.

2. Prinsip

2.1. Umum

- 2.1.1. Metode ini meliputi penghitungan koloni bakteri pada media agar non selektif maupun ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri setelah pengkayaan.
- 2.1.2. Apabila diperkirakan contoh dapat menghambat pertumbuhan mikroba maka contoh harus dinetralkan supaya mikroba yang masih hidup dapat terdeteksi dan prosedur netralisasi harus divalidasi.

2.2. Metode yang digunakan

Penghitungan lempeng dengan:

2.2.1 Cara tuang atau sebar

Penghitungan angka lempeng total dilakukan dengan menginokulasikan secara langsung sejumlah tertentu suspensi awal atau yang telah diencerkan secara desimal ke dalam media spesifik dengan cara tuang atau sebar, dan diinkubasi secara aerob pada suhu yang sesuai dalam waktu tertentu. Jumlah mikroba dinyatakan dalam koloni atau cfu per mL atau per g produk.

2.2.2. Cara penyaringan membran

Penyaringan membran dilakukan dengan cara memindahkan sejumlah contoh ke dalam peralatan penyaring (filtrasi) yang telah dibasahi dengan pengencer steril, segera disaring dan dibilas. Membran penyaring kemudian diletakkan di atas permukaan media agar spesifik dan diinkubasi pada suhu yang sesuai dalam waktu tertentu. Jumlah mikroba dihitung dan angka lempeng total dinyatakan dalam koloni atau cfu per mL atau per g produk.

(Catatan : Cara penyaringan membran dilakukan untuk contoh yang mengandung pengawet, atau bahan antimikroba lain yang dapat larut).

2.3. Deteksi bakteri dengan pengkayaan

Deteksi dilakukan dengan cara menginokulasikan sejumlah contoh dalam media cair non selektif yang mengandung zat penetral dan/atau zat pendispersi, diinkubasi pada suhu yang sesuai dan waktu tertentu. Sejumlah tertentu dari suspensi pengkayaan kemudian diinokulasikan pada media agar non selektif dan diinkubasi pada suhu yang sesuai dalam waktu tertentu. Pertumbuhan bakteri dideteksi dan dinyatakan sebagai ada atau tidak adanya bakteri aerob mesofili per contoh dari produk.

3. Pengencer, penetral dan media kultur

3.1. Umum

Jika air merupakan komponen formula, maka digunakan air suling atau air yang sudah dimurnikan untuk pengencer, bahan penetral dan media kultur. Berikut ini adalah pengencer, bahan penetral dan media kultur yang sesuai untuk penghitungan dan deteksi bakteri. Bahan lain dapat digunakan jika telah dibuktikan kesesuaiannya.

3.2. Pengencer penetral dan pengencer

3.2.1. Umum

Pengencer digunakan untuk mendispersikan contoh. Bahan ini mengandung bahan penetral jika contoh yang akan di uji mengandung sifat anti mikroba dan efektifitas penetralan harus dibuktikan sebelum penghitungan.

3.2.2. Pengencer penetral

Pengencer penetral yang digunakan adalah media *Fluid Casein Digest-Soy lecithin- Polysorbate 20* medium atau *Soy Casein Digest Lecithin Polysorbate 20 Broth (SCDLP 20 Broth)* dengan komposisi dan cara pembuatan tertera pada Apendiks A.1.

3.2.3. Pengencer penetral lain

Pengencer penetral lain yang sesuai dan dapat digunakan tertera pada Apendiks B dan C.

3.2.4. Pengencer

Pengencer yang digunakan adalah cairan A dengan komposisi dan cara pembuatan tertera pada Apendiks A.2.

3.2.5. Pengencer lain

Pengencer lain yang dapat digunakan tertera pada Apendiks D.

3.3. Pengencer untuk suspensi bakteri.

Pengencer untuk suspensi bakteri yang digunakan adalah larutan *Tryptone Sodium Chloride* dengan komposisi dan cara pembuatan tertera pada Apendiks A.3.

3.4. Media

3.4.1. Umum

Media kultur dapat disiapkan sesuai petunjuk atau mengacu pada instruksi dari pabrik. Media siap pakai dapat digunakan jika komposisi dan/atau hasil pertumbuhannya sebanding dengan formula berikut ini.

3.4.2. Media untuk penghitungan

3.4.2.1. *Soybean Casein Digest Agar (SCDA)* atau *Tryptic Soy Agar (TSA)* dengan komposisi dan pembuatan tertera pada Apendiks A.4.

3.4.2.2. Media lain yang dapat digunakan tertera pada Apendiks E.

3.4.3. Media untuk deteksi

Media pengkayaan dan media agar dapat digunakan untuk meningkatkan populasi mikroba awal. Media ini mengandung bahan penetral jika contoh yang diuji memiliki sifat antimikroba.

3.4.3.1. Media Pengkaya : *Eugon LT 100 Broth*

Media ini mengandung bahan yang dapat menetralkan bahan penghambat yang ada dalam contoh (lesitin dan polisorbat 80) dan bahan pendispersi (oktosinol 9). Komposisi dan pembuatan tertera pada Apendiks A.5.

3.4.3.2. Media agar *Eugon LT 100* dengan komposisi dan pembuatan tertera pada Apendiks A.6.

3.4.3.3. Media agar lain

Media lain yang dapat digunakan tertera pada Apendiks E.

3.4.3.4. Media agar untuk kultivasi mikroba pembanding

Soybean Casein Digest Agar (SCDA) atau *Tryptic Soy Agar (TSA)* (Apendiks A.4).

4. Peralatan dan alat gelas

Inkubator $32,5 \pm 2,5$ °C

Alat hitung koloni

Perlengkapan laboratorium, peralatan, dan alat gelas yang umum digunakan dalam laboratorium mikrobiologi.

5. Galur mikroba pembanding

Untuk validasi kondisi pengujian, dapat digunakan galur :

5.1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 atau galur yang setara

5.1.1. *Pseudomonas aeruginosa* CIP 82.118 atau

5.1.2. *Pseudomonas aeruginosa* NCIMB 8626 atau

5.1.3. *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275 atau

5.1.4. *Pseudomonas aeruginosa* KCTC atau

5.1.5. galur koleksi nasional yang setara

5.2. *Staphylococcus aureus* ATCC¹⁾ 6538 atau galur yang setara :

5.1.6. *Staphylococcus aureus* CIP 2) 4.83 atau

5.1.7. *Staphylococcus aureus* NCIMB 3) atau

5.1.8. *Staphylococcus aureus* NBRC 4) 13276 atau

5.1.9. *Staphylococcus aureus* KCTC 5) 1916 atau

5.1.10. galur koleksi nasional yang setara

Galur mikroba pembanding harus diremajakan sesuai prosedur yang diberikan oleh pemasok galur dan harus disimpan di dalam laboratorium sesuai dengan standar.

6. Penanganan kosmetika dan contoh

Jika diperlukan, simpan kosmetika yang akan diuji pada suhu ruang. Jangan diinkubasi, didinginkan atau dibekukan sebelum atau sesudah analisis.

7. Prosedur

Bahan dan peralatan steril serta teknik aseptik digunakan untuk menyiapkan contoh. Untuk penyiapan suspensi awal, waktu antara selesainya penyiapan suspensi awal dan waktu inokulasi tidak boleh lebih dari 45 menit, kecuali dinyatakan lain dalam dokumen atau protokol yang berlaku.

7.1. Penyiapan suspensi awal

Suspensi awal disiapkan dari contoh, minimal 1 g atau 1 mL dari campuran homogen produk yang diuji.

Suspensi awal biasanya dibuat dengan pengenceran 1:10. Volume pengencer atau media pengkaya diperlukan lebih banyak jika pada pengenceran 1:10 tingkat kontaminasi masih tinggi dan/atau efek antimikroba masih ada.

7.1.1. Produk yang dapat bercampur dengan air

Contoh dari produk dipindahkan ke dalam sejumlah volume tertentu pengencer penetral atau pengencer atau media pengkaya, tergantung pada cara yang digunakan.

7.1.2. Produk yang tidak dapat bercampur dengan air

Contoh dari produk dipindahkan ke dalam wadah yang berisi sejumlah tertentu bahan peningkat kelarutan (misal larutan polisorbitat 80), ditambah sejumlah volume tertentu pengencer penetral atau pengencer atau media pengkaya, tergantung pada metode yang digunakan.

7.2. Metode Penghitungan

7.2.1. Pengenceran untuk metode penghitungan

Suspensi awal umumnya adalah pengenceran pertama yang dihitung. Jika diperlukan, dapat dibuat seri pengenceran selanjutnya dengan menggunakan pengencer yang sama sesuai dengan tingkat kontaminasi produk yang diperkirakan.

Penghitungan umumnya dilakukan menggunakan minimal 2 cawan Petri. Namun untuk pengujian rutin boleh menggunakan satu cawan Petri, atau jika penghitungan dilakukan pada pengenceran yang berurutan dari contoh yang sama, atau mengacu pada hasil sebelumnya.

7.2.1. Metode Lempeng

7.2.2.1. Cara tuang

Dalam cawan Petri berdiameter 85-100 mm, diinokulasi dengan 1 mL suspensi awal dan/atau pengenceran contoh seperti yang disiapkan pada proses validasi (lihat prosedur penetralan aktivitas antimikroba produk) dan kemudian dituangkan 15-20 mL media agar (suhu tidak lebih dari 48°C). Suspensi awal dan/atau pengenceran contoh dicampur dengan media, digoyang dengan hati-hati atau dimiringkan secukupnya supaya terdispersi dengan baik. Campuran dalam cawan Petri dibiarkan memadat pada suhu ruang (Apendiks H.1).

7.2.2.2. Cara sebar permukaan

Dalam cawan Petri berdiameter 85-100 mm, dimasukkan 15-20 mL media agar (suhu tidak lebih dari 48°C). Media agar dibiarkan dingin dan memadat di dalam inkubator, selanjutnya tidak kurang dari 0,1 mL suspensi awal dan/atau pengenceran contoh disebarakan pada permukaan media (Apendiks H.2).

7.2.2.3. Cara penyaringan membran

Sejumlah suspensi awal yang sesuai atau contoh yang telah diencerkan dituang ke dalam perangkat penyaring yang dilengkapi membran dengan ukuran pori 0,45 µm, membran dibilas segera setelah penyaringan dan dipindahkan ke permukaan media agar (Apendiks H.3).

7.2.2.4. Inkubasi

Kecuali dinyatakan lain, cawan Petri yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi pada $32,5 \pm 2,5$ °C selama 72 ± 6 jam pada posisi dibalik. Segera diamati, jika tidak maka dapat disimpan dalam lemari pendingin selama tidak lebih dari 24 jam.

(Catatan : Pada kasus tertentu, dimana ada potensi menyebabkan keraguan dalam membedakan partikel produk dengan koloni yang dihitung, maka sebaiknya disiapkan cawan duplikat dengan pengenceran contoh dan media agar yang sama serta disimpan dalam lemari pendingin, sebagai pembanding cawan yang diinkubasi).

7.3. Pengkayaan

7.3.1. Umum

Penyiapan suspensi awal dalam media pengkaya yang sesuai prosedur.

7.3.2. Inkubasi contoh

7.3.2.1. Umum

Inkubasi suspensi awal yang telah disiapkan pada $32,5 \pm 2,5$ °C selama 20 jam.

7.3.2.2. Subkultur

Sejumlah 0,1-0,5 mL suspensi yang telah diinkubasi, diinokulasi dengan menggunakan pipet steril, ke atas

permukaan cawan Petri berdiameter 85-100 mm yang berisi kurang lebih 15-20 mL media agar yang telah memadat.

7.3.2.3. Inkubasi subkultur

Setelah suspensi meresap dalam media agar, diinkubasi pada $32,5 \pm 2,5$ °C selama 48-72 jam dengan posisi terbalik.

8. Pengamatan

8.1. Penghitungan koloni (Cara lempeng dan penyaringan membran)

Setelah inkubasi, jumlah koloni dihitung sebagai berikut:

8.1.1. Pada cawan Petri yang mengandung 30-300 koloni; jika kurang dari 30 koloni dihitung seperti tertera pada **9.2.3**.

8.1.2. Pada membran yang mengandung 15-150 koloni; jika kurang dari 15 koloni dihitung seperti tertera pada **9.2.3**.

8.2. Deteksi pertumbuhan (Cara pengkayaan)

Setelah hasil subkultur diinkubasi, permukaan agar diamati dan dicatat ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri.

9. Pernyataan hasil

9.1. Cara perhitungan untuk Angka Lempeng Total

Jumlah N mikroba yang ada di dalam contoh dihitung dengan menggunakan:

$$N = m / (V \times d) \dots \dots (1)$$

$$N = c / (V \times d) \dots \dots (2)$$

$$N = x_c / (V \times d) \dots \dots (3)$$

dimana :

m adalah rata-rata hitungan yang diperoleh dari pengamatan duplo

V adalah jumlah volume inokulum yang dipindahkan ke masing-masing cawan Petri, dalam satuan mililiter

d adalah faktor pengenceran dari pengenceran yang dibuat untuk preparasi suspensi awal (9.2) atau pengenceran pertama.

c adalah jumlah koloni yang terhitung pada Petri tunggal

x_c adalah rata-rata hitungan yang diperoleh dari dua pengenceran yang berturut-turut, dan dihitung sebagai berikut:

$$x_c = \frac{\Sigma c}{n_1 + 0,1 n_2}$$

dimana:

Σc adalah jumlah koloni terhitung pada semua cawan Petri yang diperoleh dari dua pengenceran berturut-turut

n_1 adalah jumlah yang terhitung pada cawan Petri untuk suspensi awal (atau untuk pengenceran pertama)

n_2 adalah jumlah yang terhitung pada cawan Petri untuk 1/10 dari suspensi awal (atau untuk pengenceran kedua)

Hasil dibulatkan dalam 2 angka. Jika angka terakhir adalah di bawah 5, angka sebelumnya tidak diubah; jika angka terakhir adalah 5 atau lebih, angka sebelumnya dinaikkan satu unit. Teruskan sampai diperoleh 2 angka yang signifikan. Catat jumlah N yang didapat.

9.2. Interpretasi

9.2.1. Keragaman sifat dari perhitungan lempeng diambil untuk penghitungan. Dua hasil dapat dianggap berbeda jika selisihnya melebihi 50 % atau ketika dinyatakan dalam logaritma, selisihnya melebihi 0,3.

Untuk penghitungan yang tepat, hanya cawan Petri dengan koloni lebih dari 30 dan kurang dari 300 untuk penghitungan cara tuang dan sebar permukaan.

Untuk penghitungan cara penyaringan membran, hanya membran dengan koloni lebih dari 15 dan kurang dari 150.

9.2.2. Jika jumlah koloni lebih dari 30 dan kurang dari 300 pada cawan Petri, atau lebih dari 15 dan kurang dari 150 pada membran, dimana S adalah massa atau volume contoh, hasil dinyatakan sebagai berikut :

Jika S adalah sedikitnya 1 g atau 1 mL, V sedikitnya 1 mL

Jumlah bakteri aerob mesofil per mL atau per gram contoh adalah = N/S

Jika $S < 1$ g atau 1 mL, dan atau $V < 1$ mL

Jumlah bakteri aerob mesofil per mL atau per gram contoh adalah = N (jumlah contoh yang diambil untuk penghitungan S dan V harus dicatat).

Nyatakan hasil sebagai angka antara 1,0 dan 9,9 dikalikan dengan 10 pangkat (Lihat contoh 1,2,3 dan 7)

9.2.3. Jika jumlah koloni kurang dari 30 pada cawan Petri atau 15 pada membran, hasil dinyatakan sebagai berikut:

Jika S paling sedikit 1 g atau 1 mL, dan V paling sedikit 1 mL;

Jumlah perkiraan bakteri per mL atau per g contoh adalah N/S

Jika $S < 1$ g atau 1 mL, dan atau $V < 1$ mL;

Bakteri per mL atau per g contoh adalah N

Hasil dinyatakan sebagai angka antara 1,0 dan 9,9 dikalikan dengan faktor pengenceran (misal 10^2 , 10^3 dst) (lihat contoh 4, 5, dan 6)

9.2.4. Jika **tidak ada koloni** yang diamati, hasilnya dilaporkan sebagai berikut :

Kurang dari $1/(d \times V \times S)$ dari bakteri per mL atau per g produk (S minimal 1 g atau 1 mL);

Kurang dari $1/(d \times V)$ dari bakteri pada contoh S (jumlah contoh yang diambil harus dicatat dan dimasukkan ke dalam penghitungan S dan V, serta S kurang dari 1 g atau 1 mL)

dimana d adalah faktor pengenceran dari suspensi awal dan V adalah 1 (untuk penghitungan dengan cara tuang dan cara penyaringan membran) atau 0,1 (untuk cara sebar permukaan).

9.3. Contoh penghitungan

Contoh 1. Dua cawan Petri untuk satu pengenceran

$S = 1$ g atau 1 mL; $V = 1$ mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran 10^{-1} adalah 38 dan 42 maka rata-ratanya adalah 40, menggunakan persamaan 1.

$N = m/(V \times d) = 40 / (1 \times 10^{-1}) = 40 / 0,1 = 400 = 4 \times 10^2$ cfu bakteri per g atau mL contoh

Contoh 2. Satu cawan Petri untuk satu pengenceran

$S = 1$ g atau 1 mL; $V = 1$ mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran 10^{-1} adalah 60 menggunakan persamaan 2.

$N = c / (V \times d) = 60 / (1 \times 10^{-1}) = 60 / 0,1 = 600 = 6 \times 10^2$ cfu bakteri per gram atau mililiter contoh.

Contoh 3. Dua cawan Petri untuk dua pengenceran

S= 1 g atau 1 mL; V = 1 mL; Jumlah koloni pada pengenceran 10^{-2} adalah 235 dan 282, pada pengenceran 10^{-3} adalah 31 dan 39, menggunakan persamaan 3.

$$N = \bar{x}_c / (V \times d) = (235 + 282 + 31 + 39) / [1 (2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-2}] = 587/0,022 = 26682$$

Hasil di atas dibulatkan menjadi 27000 atau $2,7 \times 10^4$ cfu bakteri per mL atau per g contoh.

Contoh 4. Dua membran penyaring untuk satu pengenceran

S= 1 g atau 1 mL; V = 1 mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran 10^{-1} adalah 18 dan 22 maka rataannya adalah 20, menggunakan persamaan 1.

$$N = m / (V \times d) = 20 / (1 \times 10^{-1}) = 20/0,1 = 200 = 2 \times 10^2 \text{ cfu bakteri per g atau mL contoh.}$$

Contoh 5. Satu membran penyaring untuk satu pengenceran

S= 1 g atau 1 mL; V = 1 mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran 10^{-1} adalah 65, menggunakan persamaan 2.

$$N = c / (V \times d) = 65 / (1 \times 10^{-1}) = 65/0,1 = 650 = 6,5 \times 10^2 \text{ cfu bakteri per g atau mL contoh.}$$

Contoh 6. Dua membran penyaring untuk dua pengenceran

S= 1 g atau 1 mL; V = 1 mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran 10^{-1} adalah 121 dan 105, pengenceran 10^{-2} adalah 15 dan 25, menggunakan persamaan 3.

$$N = \bar{x}_c / (V \times d) = (121 + 105 + 15 + 25) / [1 (2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-2}] = 266/0,022 = 1209$$

Hasil di atas dibulatkan menjadi 1200 atau $1,2 \times 10^3$ cfu bakteri per mL atau per gram contoh.

Contoh 7. Dua cawan Petri untuk satu pengenceran

S= 1 g atau 1 mL; V = 1 mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran 10^{-1} adalah 28 dan 22 maka rataannya adalah 25, menggunakan persamaan 1.

$$N = m / (V \times d) = 25 / (1 \times 10^{-1}) = 25 / 0,1 = 250$$

Jumlah perkiraan adalah 250 atau $2,5 \times 10^2$ cfu bakteri per g atau mL contoh.

Contoh 8.

$S = 1$ g atau 1 mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran 10^{-1} adalah 0 dan 0, menggunakan persamaan 1

$$N \leq 1 / (V \times d)$$

$$\leq 1 / (1 \times 10^{-1})$$

$$\leq 1 / 0,1$$

$$\leq 10$$

Jumlah perkiraan adalah ≤ 10 cfu bakteri per g atau mL contoh.

Contoh 9.

$S = 1$ g atau 1 mL; Jumlah koloni yang diperoleh pada pengenceran 10^{-1} adalah 0 dan 3 maka rata-ratanya adalah 1,5 menggunakan persamaan 1

$$N \leq m / (V \times d)$$

$$\leq 1,5 / (1 \times 10^{-1})$$

$$\leq 1,5 / 0,1$$

$$\leq 15$$

Jumlah perkiraan adalah ≤ 15 cfu bakteri aerob mesofil per g atau mL sampel.

9.4. Deteksi setelah pengkayaan

Jika terdapat pertumbuhan (lihat ketentuan 8.2), hasilnya dinyatakan sebagai berikut:

”Terdapat bakteri aerob mesofil dalam contoh”

Dan dilanjutkan dengan penghitungan menggunakan salah satu cara yang telah diuraikan (lihat 7.2).

Jika tidak terdapat pertumbuhan (lihat ketentuan 8.2), hasilnya dinyatakan sebagai berikut:

”Tidak terdapat bakteri aerob mesofil dalam contoh”

10. Netralisasi sifat antimikroba produk

10.1. Umum

Pengujian berbeda yang dijelaskan berikut menunjukkan bahwa mikroba dapat tumbuh di bawah kondisi analisis.

Dua galur (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) digunakan untuk menunjukkan validitas sifat-sifat yang secara umum sensitif terhadap bahan antimikroba.

10.1. Preparasi inokulum

Sebelum pengujian, kedua galur masing-masing diinokulasikan pada permukaan media *Soybean Casein Digest Agar (SCDA)* atau media lain yang sesuai (tidak selektif dan tidak menetralkan), kemudian diinkubasi pada $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ selama 18-24 jam. Untuk memanen kultur digunakan jarum ose (sengkelit) steril yang digoreskan pada permukaan biakan dan diresuspensikan ke dalam pelarut untuk mendapatkan suspensi bakteri terkalibrasi lebih kurang 1×10^8 cfu per mL (diukur menggunakan spektrofotometer). Suspensi ini dan pengencerannya dapat digunakan dalam waktu 2 jam.

10.2. Validasi metode penghitungan

10.2.1. Prinsip

Untuk masing-masing galur mikroba, contoh yang telah dinetralkan (suspensi awal, atau pengencer contoh berdasarkan pada aktivitas anti mikroba atau rendahnya kelarutan produk) dicampur dengan pengenceran mikroba. Campuran diinokulasikan pada cawan Petri atau disaring dengan penyaring membran. Setelah diinkubasi, jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dibandingkan terhadap kontrol (tanpa contoh).

Jika jumlah koloni kurang dari 50% atau 0,3 log dari kontrol, prosedur dimodifikasi (pengencer, zat penetral atau kombinasi keduanya). Variasi sifat-sifat dari angka lempeng seharusnya diambil dalam penghitungan. Dua hasil dianggap berbeda jika selisihnya melebihi 50% atau ketika dinyatakan dalam

logaritma, selisihnya melebihi 0,3. Kegagalan dari pertumbuhan inokulum tidak berlaku pada uji ini kecuali ada kemungkinan terjadi kontaminasi dari mikroba ini.

10.2.2. Validasi cara tuang

Sejumlah 9 mL suspensi awal dan atau contoh yang telah diencerkan dalam pengencer yang bersifat menetralkan dicampur dengan 1 mL suspensi mikroba yang mengandung 1000-3000 cfu/mL. Sejumlah 1 mL dipipet ke dalam cawan Petri (dilakukan secara duplo) dan kemudian dituangkan 15-20 mL medium agar cair suhu tidak lebih dari 48°C. Pada saat yang bersamaan disiapkan cawan Petri kontrol menggunakan pengencer yang sama dan suspensi mikroba yang sama, tanpa contoh.

Setelah diinkubasi selama 24-72 jam pada $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, jumlah koloni pada lempeng dihitung dan dibandingkan dengan jumlah yang diperoleh dari kontrol. Pengencer dan metode penghitungan divalidasi pada pengenceran 1:10 (ketika 1 mL suspensi awal digunakan), jika penghitungan hasil kurang dari 50% atau 0,3 log dari penghitungan kontrol.

10.2.3. Validasi cara sebar permukaan

Sejumlah 9 mL suspensi awal dalam pengencer yang bersifat menetralkan (atau yang lain, lihat 3.1) dicampur dengan 1 mL suspensi mikroba yang mengandung 10.000-30.000 cfu/mL (atau kurang jika 0,5 mL atau 1 mL yang disebarkan). Kurang lebih 0,1 mL disebarkan pada permukaan lempeng agar padat (3.4.2) (dilakukan secara duplo). Pada saat yang bersamaan disiapkan lempeng kontrol menggunakan pengencer yang sama dan suspensi mikroba yang sama, tanpa contoh.

Setelah diinkubasi selama 24-72 jam pada $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, jumlah koloni pada lempeng dihitung dan dibandingkan dengan jumlah yang diperoleh dari kontrol. Pengencer dan metode penghitungan divalidasi pada pengenceran 1:10 (ketika 1 mL suspensi awal digunakan), jika penghitungan hasil kurang dari 50% atau 0,3 log dari penghitungan kontrol.

10.2.4. Validasi cara penyaringan membran

Sejumlah suspensi mikroba yang mengandung lebih kurang 100 cfu yang telah terkalibrasi dicampurkan pada sejumlah volume suspensi awal atau pengenceran contoh yang digunakan dalam pengujian (lihat 7.2.2.3)

Seluruh volume campuran segera disaring menggunakan membran dan dibilas menggunakan sejumlah volume air (3.1), pengencer (3.2.4) atau pengencer yang dapat menetralkan (3.2.2). Membran dipindahkan ke permukaan media agar yang sesuai (3.4.2).

Pada saat yang sama, disiapkan kontrol pada kondisi yang sama seperti diatas tetapi tanpa produk.

Setelah diinkubasi selama 24-72 jam pada $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, jumlah koloni pada lempeng dihitung dan dibandingkan dengan jumlah yang diperoleh dari kontrol. Pengencer dan metode penghitungan divalidasi pada pengenceran 1:10 (ketika 1 mL suspensi awal digunakan), jika penghitungan hasil kurang dari 50% atau 0,3 log dari penghitungan kontrol.

10.3. Validasi cara deteksi dengan pengkayaan

10.4. Prosedur

Masing-masing suspensi galur terkalibrasi diencerkan dengan 9 mL pengencer sehingga diperoleh jumlah bakteri antara 100-500 CFU/mL. Untuk menghitung konsentrasi akhir dari mikroba yang hidup dalam suspensi, sejumlah 1 mL suspensi dipindahkan ke dalam cawan Petri dan kemudian dituang 15-20 mL media agar cair suhu tidak lebih dari 48°C , kemudian diinkubasi pada $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ selama 20-24 jam

Suspensi awal contoh disiapkan secara duplo pada kondisi yang dipilih untuk pengujian (minimal 1 g atau 1 mL produk), media pengkaya dengan volume tertentu (3.4.3.1) dalam tabung atau Erlenmeyer. Pada satu tabung (uji validasi), dimasukkan secara aseptik 0,1 ml suspensi mikroba terkalibrasi, kemudian masing-masing diinkubasi pada $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ selama 20-24 jam.

Setelah diinkubasi masing-masing tabung atau Erlenmeyer dipipet sejumlah 0,1-0,5 mL dalam kondisi yang sama seperti

pada pengujian ke atas permukaan cawan Petri yang berisi lebih kurang 15-20 mL media agar yang sesuai dan diinkubasi pada $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ selama 20-24 jam.

10.4.1. Interpretasi hasil

10.4.1.1. Harus dipastikan bahwa suspensi mengandung *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* masing-masing 100 cfu/mL.

10.4.1.2. Metode netralisasi dan deteksi dinyatakan valid jika karakteristik pertumbuhannya terdapat pada cawan validasi dan tidak terdapat pada cawan kontrol, sebagai berikut:

Staphylococcus aureus: koloni berwarna kuning dan *Pseudomonas aeruginosa*: koloni berwarna kehijauan sampai kekuningan.

10.4.1.3. Jika pertumbuhan terdeteksi pada lempeng kontrol (produk terkontaminasi), metode netralisasi dan deteksi dinyatakan valid jika mikroba yang diinokulasi tumbuh pada lempeng validasi.

10.5. Interpretasi hasil validasi

10.5.1. Kegagalan pertumbuhan pada lempeng validasi mengindikasikan bahwa aktivitas anti mikroba masih ada, sehingga memerlukan modifikasi kondisi metode dengan cara meningkatkan volume media pertumbuhan tetapi jumlah produknya tetap sama, atau dengan penggabungan sejumlah bahan penetral pada media pertumbuhan, atau kombinasi dari modifikasi yang sesuai sehingga memungkinkan terjadinya pertumbuhan bakteri.

10.5.2. Apabila penggabungan dan peningkatan jumlah bahan dan bahan penetral dalam media pertumbuhan masih tidak memungkinkan untuk menumbuhkan kultur sebagaimana dijelaskan di atas, maka hal ini mengindikasikan bahwa contoh tidak terkontaminasi oleh bakteri.

11. Laporan pengujian

Laporan pengujian harus menjelaskan hal-hal berikut :

- a. Semua informasi lengkap yang dibutuhkan untuk identifikasi produk;

- b. Metode yang digunakan;
- c. Hasil yang diperoleh;
- d. Semua rincian proses untuk penyiapan suspensi awal;
- e. Deskripsi metoda dengan bahan-bahan penetral dan media yang digunakan;
- f. Validasi metoda, meskipun pengujian dilakukan terpisah;
- g. Hal-hal yang tidak diuraikan dalam dokumen ini, atau yang dianggap sebagai pilihan, bersama dengan rincian kejadian yang mungkin dapat mempengaruhi hasil.

C. MEDIA, PENGECER PENETRAL, TEHNIK DASAR UNTUK PENGHITUNGAN DAN PLATING SERTA PERSIAPAN DAN KALIBRASI INOKULUM

APENDIKS A

A.1. Fluid Casein Digest Soy Lecithin Polysorbate 20 (SCDLP 20 broth)

Komposisi

| | |
|------------------------------------|--------|
| <i>Pancreatic digest of casein</i> | 20,0 g |
| Lesitin soya | 5,0 g |
| Polisorbat 20 | 40,0 g |
| Air | 960 mL |

Penyiapan

Larutkan Polisorbat 20 ke dalam 960 mL air, dengan cara mencampur dan memanaskan pada $49 \pm 2^\circ\text{C}$. Tambahkan *Pancreatic digest of casein* dan lesitin soya kemudian dipanaskan kurang lebih 30 menit sampai larut. Pindahkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai $7,3 \pm 0,2$.

A.2. Cairan A

Komposisi

| | |
|--|---------|
| <i>Peptic digest of animal tissue</i> (pepton) | 1,0 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan 1 gram pepton ke dalam air dengan cara menggoyang dan memanaskan. Pindahkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi

dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai $7,1 \pm 0,2$.

A.3. Tryptone Sodium Chloride Solution

Komposisi

| | |
|--|---------|
| <i>Tryptone, pancreatic digest of casein</i> | 1 g |
| Natrium klorida | 8,5 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan semua komponen ke dalam air dengan pemanasan. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai $7,0 \pm 0,2$.

A.4. Soybean Casein Digest Agar (SCDA) atau Tryptic Soy Agar (TSA)

Komposisi

| | |
|--------------------------------------|---------|
| <i>Pancreatic digest of casein</i> | 15,0 g |
| <i>Papaic digest of soybean meal</i> | 5,0 g |
| Natrium klorida | 5,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan semua komponen atau media lengkap yang dikeringkan ke dalam air dengan pemanasan. Pindahkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai $7,3 \pm 0,2$.

A.5. Cairan pengkaya : Eugon LT 100 Broth

Komposisi

| | |
|--------------------------------------|--------|
| <i>Pancreatic digest of casein</i> | 15,0 g |
| <i>Papaic digest of soybean meal</i> | 5,0 g |
| L-sistin | 0,7 g |
| Natrium klorida | 4,0 g |
| Natrium sulfit | 0,2 g |

| | |
|---------------|------------------------|
| Glukosa | 5,5 g |
| Lesitin telur | 1,0 g (zat penetral) |
| Polisorbat 80 | 5,0 g (zat penetral) |
| Oktosinol 9 | 1,0g (zat pendispersi) |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan Polisorbat 80, oktosinol 9, dan lesitin telur ke dalam air mendidih sampai terlarut sempurna. Tambahkan komponen lain dengan pengadukan sambil dipanaskan. Pindahkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai $7,0 \pm 0,2$.

A.6. Eugon LT 100 Agar

Komposisi

| | |
|--------------------------------------|---------|
| <i>Pancreatic digest of casein</i> | 15,0 g |
| <i>Papaic digest of soybean meal</i> | 5,0 g |
| L-sistin | 0,7 g |
| Natrium klorida | 4,0 g |
| Natrium sulfit | 0,2 g |
| Glukosa | 5,5 g |
| Lesitin telur | 1,0 g |
| Polisorbat 80 | 5,0 g |
| Oktosinol 9 | 1,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan Polisorbat 80, oktosinol 9, dan lesitin telur ke dalam air mendidih sampai terlarut sempurna. Tambahkan komponen lain dengan pemanasan, campurkan perlahan untuk menghindari terbentuknya busa. Pindahkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus $7,0 \pm 0,2$.

A.7. Sabouraud Dextrose Chloramphenicol Agar (SDCA)**Komposisi**

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Dekstrosa | 40 g |
| <i>Peptic digest of animal tissue</i> | 5,0 g |
| <i>Pancreatic digest of casein</i> | 5,0 g |
| Kloramfenikol | 0,05 g |
| Agar | 15 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan semua komponen (termasuk kloramfenikol) atau media lengkap yang dikeringkan ke dalam air dengan cara mencampur dan memanaskan. Pindahkan ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai 5,6±0,2.

A.8. Saboroud Dextrose Agar (SDA)**Komposisi**

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Dekstrosa | 40 g |
| <i>Peptic digest of animal tissue</i> | 5,0 g |
| <i>Pancreatic digest of casein</i> | 5,0 g |
| Agar | 15 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan komponen atau media lengkap yang dikeringkan ke dalam air dengan cara mencampur dan memanaskan. Pindahkan ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai 5,6±0,2.

A.9. Cetrinide Agar**Komposisi**

| | |
|---|--------|
| <i>Pancreatic digest of gelatin</i> | 20,0 g |
| Magnesium klorida | 1,4 g |
| Kalium sulfat | 10,0 g |
| <i>Cetrinide (cetyltrimethylammonium bromide)</i> | 0,3 g |
| Agar | 13,6 g |

| | |
|----------|---------|
| Gliserin | 10,0 mL |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan semua komponen padat ke dalam air, dan tambahkan gliserin. Panaskan, goyang secara teratur, dan didihkan selama 1 menit untuk melarutkannya. Pindahkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai $7,2 \pm 0,2$.

A.10. *Pseudomonas* Agar P

Komposisi

| | |
|-------------------------------------|---------|
| <i>Pancreatic digest of gelatin</i> | 20,0 g |
| Magnesium klorida anhidrat | 1,4 g |
| Kalium sulfat anhidrat | 10,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Gliserin | 10,0 mL |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan semua komponen padat ke dalam air, dan tambahkan gliserin. Panaskan, goyang secara teratur, dan didihkan selama 1 menit untuk melarutkannya. Pindahkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai $7,2 \pm 0,2$.

A.11. *Fluid Soybean Casein Digest*

Komposisi

| | |
|--------------------------------------|---------|
| <i>Pancreatic digest of casein</i> | 15,0 g |
| <i>Papaic digest of soybean meal</i> | 5,0 g |
| Natrium klorida | 5,0 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan semua komponen (media lengkap yang dikeringkan) satu persatu ke dalam air mendidih sampai terlarut sempurna. Pindahkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai $7,3 \pm 0,2$.

A.12. Mannitol Salt Agar (Chapman Agar)**Komposisi**

| | |
|------------------------------------|---------|
| <i>Beef extract</i> | 1,0 g |
| <i>Pancreatic digest of casein</i> | 5,0 g |
| <i>Pancreatic digest of beef</i> | 5,0 g |
| Natrium klorida | 75,0 g |
| D-manitol | 10,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Phenol red | 0,025 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Campur, kemudian panaskan dengan pengendapan bertahap dan didihkan selama 1 menit untuk memberi efek melarut. Pindahkan seperti yang diinginkan dan sterilkan.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mendekati $7,4 \pm 0,2$.

A.13. Vogel Johnson Agar (VJA)**Komposisi**

| | |
|------------------------------------|---------|
| <i>Pancreatic digest of casein</i> | 10,0 g |
| <i>Yeast extract</i> | 5,0 g |
| Manitol | 10,0 g |
| Kalium fosfat dibasa | 5,0 g |
| Litium klorida | 5,0 g |
| Glisin | 10,0 g |
| Agar | 16,0 g |
| Merah fenol | 0,025 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Didihkan larutan atau padatan selama 1 menit. Sterilkan dan dinginkan sampai antara $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ sampai $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan tera dengan 20 mL larutan kalium telurit steril.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mendekati $7,2 \pm 0,2$.

A.14. *Baird Parker Agar (BPA)*

A.14.1. **Media dasar**

Komposisi

| | |
|------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Pancreatic digest of casein</i> | 10,0 g |
| Ekstrak ragi | 1,0 g |
| Ekstrak daging | 5,0 g |
| Natrium piruvat | 10,0 g |
| L-glisin | 12,0 g |
| Litium klorida | 5,0 g |
| Agar | 12 g sampai 22 g ¹⁾ |
| Air | sampai volume akhir 950 mL |

Penyiapan

Larutkan komponen atau media dasar lengkap yang dikeringkan dalam air dengan cara pemanasan. Pindahkan media secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 mL atau botol dengan kapasitas yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mendekati $7,2 \pm 0,2$.

A.14.2. **Larutan Kalium telurit**

Komposisi

| | |
|-------------------------------|---------|
| Kalium telurit (K_2TeO_3) | 1,0 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan kalium telurit secara sempurna dalam air dengan pemanasan minimal.

Sterilkan dengan penyaring membran 0,22 μ m. Larutan dapat disimpan paling lama 1 bulan pada suhu $3^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Buang larutan jika terbentuk endapan putih.

Padatan harus siap larut. Jika terdapat endapan putih dalam air, padatan tersebut harus dibuang.

A.14.3. **Emulsi kuning telur** (konsentrasi kurang lebih 20% atau mengikuti instruksi dari pabrik)

Jika cara penyiapan dari pabrik tidak ada, siapkan media dilakukan seperti berikut:

Gunakan telur ayam segar dengan kulit masih lengkap. Bersihkan telur menggunakan sikat dengan detergen. Bilas dengan air mengalir, lalu disinfektan telur dengan merendamnya dalam etanol 70% selama 30 detik dan biarkan kering di udara, atau semprot dengan alkohol yang dilanjutkan dengan sterilisasi dengan api. Semua proses dilakukan secara aseptik, pecahkan telur dan pisahkan kuning telur dengan mengeluarkan putihnya dengan berulang-ulang melalui kulitnya. Tempatkan kuning telur pada alat gelas steril dan tambahkan air steril 4 kali volume kuning telur dan kocok. Panaskan campuran pada 47°C selama 2 jam dan biarkan selama 18 jam sampai 24 jam pada suhu 3°C±2°C biarkan terbentuk endapan. Dengan cara aseptik, media cair supernatan diambil dan dimasukkan kedalam alat gelas steril untuk digunakan.

Emulsi disimpan pada suhu 3°C±2°C paling lama 72 jam

A.14.4. Media lengkap

Komposisi

| | |
|---------------------------------|--------|
| Media dasar (A.14.1) | 100 mL |
| Larutan Kalium telurit (A.14.2) | 1,0 mL |
| Emulsi kuning telur (A.14.3) | 5,0 mL |

Penyiapan

Lelehkan media dasar (A.14.1) kemudian dinginkan hingga suhu kira-kira 47°C. Pada kondisi aseptik, kedua larutan (A.14.2 dan A.14.3) masing-masing di panaskan pada 47°C, campur.

A.15. Corn Meal Agar (CMA) dengan 1% Polisorbit 80

Komposisi

| | |
|--------------------------------|---------|
| <i>Infusion from corn meal</i> | 50,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Polisorbat 80 | 10,0 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan komponen atau media lengkap yang dikeringkan dalam air dengan cara mencampur dan memanaskan. Pindahkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus $6,0 \pm 0,2$.

A. 16. *Potato Dextrose Agar (PDA)*

Komposisi

| | |
|-----------------|---------|
| Ekstrak kentang | 4,0 g |
| Glukosa | 20,0 g |
| Agar | 15 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan semua komponen atau medium dehidrat dalam air dengan cara mencampur dan memanaskan. Pindahkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus $5,6 \pm 0,2$.

A.17. *Glucose and Peptone added Lecithin Polysorbate 80 (GPLP 80 Broth)*

Komposisi

| | |
|-------------------------------|---------|
| Glukosa | 20,0 g |
| Ekstrak ragi | 2,0 g |
| Magnesium sulfat | 0,5 g |
| Pepton | 5,0 g |
| Kalium hidrogen fosfat dibasa | 1,0 g |
| Lesitin | 1,0 g |
| Polisorbat 80 | 7,0 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan semua komponen atau medium dehidrat dalam air mendidih untuk melarutkan secara sempurna. Pindahkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus $5,7 \pm 0,2$.

APENDIKS B

Pengencer Penetral Lain

B.1. *Lechitin Polysorbate (LP)***Komposisi**

| | |
|---------------|--------|
| Polipepton | 1,0 g |
| Lesitin telur | 0,7 g |
| Polisorbat 80 | 20,0 g |
| Air | 980 mL |

Penyiapan

Campur dan larutkan bahan sambil dipanaskan. Dinginkan hingga suhu 25°C sebelum pencampuran. Pindahkan larutan ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai $7,2 \pm 0,2$.

B.2. *Modified Letheen Broth (MLB)***Komposisi**

| | |
|------------------------------------|---------|
| <i>Peptic digest of meat</i> | 20,0 g |
| <i>Pancreatic digest of casein</i> | 5,0 g |
| Ekstrak daging sapi | 5,0 g |
| Ekstrak ragi | 2,0 g |
| Lesitin | 0,7 g |
| Polisorbat 80 | 5,0 g |
| Natrium klorida | 5,0 g |
| Natrium bisulfit | 0,1 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan polisorbat 80 dan lesitin berturut-turut ke dalam air mendidih sampai membentuk larutan yang sempurna. Larutkan komponen lainnya sambil dipanaskan. Campur perlahan hindari terbentuknya busa. Pindahkan ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai $7,2 \pm 0,2$.

APENDIKS C**Penetrasi Sifat Antimikroba dari Pengawet dan Cairan Pembilas**

| Pengawet | Senyawa kimia yang dapat menetralkan | Contoh penetrasi yang sesuai dan cairan |
|----------|--------------------------------------|---|
|----------|--------------------------------------|---|

| | pengawet aktivitas mikroba | pembilas (untuk metode penyaringan membran) |
|--|--|---|
| Senyawa Fenol : Paraben, Fenoksietanol, Feniletanol, dll. Anilida | Lesitin, Polisorbat 80, Kondensat Etilen oksida dari <i>fatty alcohol</i> Surfaktan non ionik | Polisorbat 80, 30g/L + lesitin 3 g/L Kondensat Etilen oksida dari <i>fatty alcohol</i> 7 g/L + lesitin 20 g/L + polisorbat 80, 4 g/L <i>D/E Neutralizing broth^a</i> Cairan pembilas : air destilasi, tripton, 1 g/L + NaCl 9 g/L, polisorbat 80, 5 g/L |
| Senyawa Amonium kuartener, Surfaktan kation | Lesitin, Saponin polisorbat 80, Natrium dodesil sulfat Kondensat Etilen oksida dari <i>fatty alcohol</i> | Polisorbat 80, 30 g/L + natrium dodesil sulfat, 4 g/L + lesitin, 3 g/L Polisorbat 80, 30 g/L + saponin 30 g/L + lesitin 3 g/L <i>D/E Neutralizing Broth^a</i> Cairan pembilas : air destilasi, tripton 1 g/L + NaCl 9 g/L, polisorbat 80, 3 g/L |
| Aldehid Formaldehid- <i>released agents</i> | Glisin, histidin | Lesitin, 3 g/L + Polisorbat 80, 30 g/L + L-histidin, 1 g/L Polisorbat 80, 30 g/L + saponin, 30 g/L + L- histidin 1 g/L + L- sistin, 1 g/L <i>D/E Neutralizing Broth^a</i> Cairan pembilas : polisorbat 80, 3 g/L + L-Histidin 0,5 g/L |
| Senyawa oksidasi | Natrium tiosulfat | Natrium tiosulfat 5 g/L Cairan pembilas : natrium tiosulfat, 3 g/L |

| | | |
|--|--|--|
| Isotiazolinon, Imidazol | Lesitin, saponin Amina, sulfat, merkaptan, natrium bisulfit, natrium tioglikolat | Polisorbat 80, 30 g/L + saponin, 30 g/L + lesitin, 3 g/L Cairan pembilas : tripton 1 g/L + NaCl 9 g/L ; polisorbat 80, 5 g/L |
| Biguanida | Lesitin, saponin, polisorbat 80 | Polisorbat 80, 30 g/L + saponin, 30 g/L + lesitin, 3 g/L Cairan pembilas : tripton, 1 g/L + NaCl 9 g/L ; polisorbat 80, 5 g/L |
| <i>Metallic salts</i> (Cu, Zn, Hg) Senyawa merkuri organik | Natrium bisulfit, L- sistin Senyawa Sulfidril, asam tioglikolat | Natrium tioglikolat, 0,5 g/L atau 5 g/L L-sistin, 0,8 g/L atau 1,5 g/L <i>D/E Neutralizing Broth^a</i> Cairan pembilas : Natrium tioglikolat, 0,5 g/L |
| Catatan : mengacu pada pH produk kosmetik dari penetral dapat ditambahkan pada nilai tertentu | | |
| ^a D/E media penetral (media penetral Dey/Engley) Lihat Apendiks E | | |

APENDIKS D

Pengencer Lain

D.1. *Buffered Peptone solution pH 7*

Komposisi

| | |
|--------------------------------|---------|
| <i>Meat peptone</i> | 1,0 g |
| Natrium klorida | 4,3 g |
| Kalium fosfat monobasa | 3,6 g |
| Natrium fosfat dibasa dihidrat | 7,2 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan bahan dalam air mendidih, campur, kemudian dinginkan sampai suhu 25°C. Pindahkan ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai $7,1 \pm 0,2$.

APENDIKS E

Media Kultur Lain

E.1. *LT Agar*

Komposisi

| | |
|------------------------------------|---------|
| <i>Pancreatic digest of casein</i> | 15,0 g |
| <i>Papaic digest of soybean</i> | 5,0 g |
| Natrium klorida | 5,0 g |
| Lesitin telur | 1,0 g |
| Polisorbat 80 | 5,0 g |
| Oktosinol 9 | 1,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan polisorbat 80, oktosinol 9, dan lesitin telur berturut-turut ke dalam air mendidih sampai larut sempurna. Larutkan komponen lain dengan pencampuran sambil dipanaskan. Campur perlahan hindari terbentuknya busa. Pindahkan ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai $7,0 \pm 0,2$.

E.2. *Soybean Casein Digest Lecithin Polysorbate 80 (SCDLP 80 Broth)*

Komposisi

| | |
|-------------------------------|--------|
| <i>Casein peptone</i> | 17,0 g |
| <i>Soybean peptone</i> | 3,0 g |
| Natrium klorida | 5,0 g |
| Kalium hidrogen fosfat dibasa | 2,5 g |
| Glukosa | 2,5 g |
| Lesitin | 1,0 g |
| Polisorbat 80 | 7,0 g |

Air 1000 mL

Penyiapan

Larutkan semua komponen atau dehidrasi semua medium ke dalam air mendidih sampai terlarut sempurna. Pindahkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai $7,2 \pm 0,2$.

E.3. D/E Neutralizing broth (Dey/Engley Neutralizing Broth)

Komposisi

| | |
|------------------------------------|---------|
| Glukosa | 10,0 g |
| <i>Soybean lecithin</i> | 7,0 g |
| Natrium tiosulfat pentahidrat | 6,0 g |
| Polisorbat 80 | 5,0 g |
| <i>Pancreatic digest of casein</i> | 5,0 g |
| Natrium bisulfit | 2,5 g |
| Ekstrak ragi | 2,5 g |
| Natrium tioglikolat | 1,0 g |
| Ungu Bromkresol | 0,002 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan semua komponen atau dehidrasi semua medium ke dalam air mendidih sampai terlarut sempurna. Pindahkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai $7,6 \pm 0,2$.

E.4. Soybean Casein Digest Lesitin Polysorbate 80 Agar (SCDLPA) untuk pendeteksi

Komposisi

| | |
|------------------------|---------|
| <i>Casein peptone</i> | 15,0 g |
| <i>Soybean peptone</i> | 5,0 g |
| Natrium klorida | 5,0 g |
| Lesitin telur | 1,0 g |
| Polisorbat 80 | 7,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan semua bahan cara dipanaskan. Pindahkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai $7,0 \pm 0,2$.

APENDIKS F

Media Kultur Lainnya

F.1. Gambaran Umum

Media kultur apapun dapat digunakan jika telah dilakukan pengecekan dan validasi. Berikut adalah contoh-contoh media dengan formula yang sesuai.

F.2. Media Agar untuk penghitungan

F.2.1. *Potato Dextrose Agar (PDA)* dengan antibiotik

Komposisi

| | |
|-----------------|---------|
| Ekstrak kentang | 4,0 g |
| Glukosa | 20,0 g |
| Agar | 15 g |
| Kloramfenikol | 0,05 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Campur semua komponen dan pindahkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi pH akan mencapai $5,6 \pm 0,2$ ketika diukur pada suhu ruang.

Sebagai alternatif, kloramfenikol dapat diganti dengan menggunakan 0,1 kalium benzilpenisilin dan 0,10 g tetrasiklin tiap liter media, ditambahkan sebagai larutan steril, sebelum digunakan.

F.2.2. *Glucose Peptone Agar (GPA)* dengan antibiotik

Komposisi

| | |
|--------------|--------|
| Glukosa | 20,0 g |
| Ekstrak ragi | 2,0 g |

| | |
|------------------------|---------|
| Magnesium sulfat | 0,5 g |
| Pepton | 5,0 g |
| Kalium fosfat monobasa | 1,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Kloramfenikol | 0,05 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Campur semua komponen dan pindahkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai $5,7 \pm 0,2$.

Sebagai alternatif, kloramfenikol dapat diganti dengan menggunakan 0,1 kalium benzilpenisilin dan 0,10 g tetrasiklin tiap liter media, ditambahkan sebagai larutan steril, sebelum digunakan.

F.3. Malt Extract

Komposisi

| | |
|--|---------|
| <i>Malt extract</i> | 30,0 g |
| <i>Soya peptone, papaic digest of soybean meal</i> | 3,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Kloramfenikol | 0,05 g |
| Air | 1000 mL |

Penyiapan

Larutkan semua komponen (termasuk kloramfenikol) atau media lengkap yang dikeringkan ke dalam air dengan pemanasan. Pindahkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilisasi dengan otoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, ukur pH media pada suhu ruang, pH media harus mencapai $5,6 \pm 0,2$.

APENDIKS G

G.1 Persiapan kultur murni

G.1.1 Umum

Mulailah persiapan kultur murni dengan seleksi koloni pada media agar yang telah diinokulasi dengan sebuah pengenceran sampel uji atau dengan kultur

Kemudian inokulasikan koloni terseleksi pada media agar non selektif. Setelah inkubasi, pilih koloni yang terpisah. Ulangi proses ini jika diperlukan

Gunakan teknik plating yang di jelaskan pada G.1.2. Metode yang lain mungkin di butuhkan pada kasus tertentu.

G.1.2 *Plating*

G.1.2.1 Umum

Ambil sejumlah kecil dari permukaan koloni yang terpisah menggunakan ujung jarum ose steril

Kemudian di *plating* baik secara langsung dengan sell yang ada di jarum ose atau setelah disiapkan suspensi selnya (A.1.2.3)

G.1.2.2 Metode langsung : Contoh

Gunakan ujung jarum ose, inokulasi, goreskan secara rapat (*close streak*) pada satu bagian sekitar sepertiga permukaan media agar. Sterilkan dan dinginkan jarum ose. Dari tepi area yang terinokulasi, buatlah seri-seri goresan yang lain, kurang rapat di bandingkan yang pertama, lebih dari setengah area permukaan tidak diinokulasi. Ulangi proses di atas permukaan yang tersisa untuk membuat goresan yang lebih menyebar. (lihat gambar A.1)

G.1.2.3 Metode menggunakan pengenceran

Suspensikan sel dalam 1 - 2 mL pengencer, masukkan jarum ose yang telah diinokulasi ke dalam permukaan cairan, kemudian campurkan dengan baik.

Sterilkan dan dinginkan jarum ose. Gunakan jarum ose, ambil sebagian kecil suspensi mikroba dan di proses seperti pada A.1.2.2.

G.1.3 *Inkubasi*

Balik cawan petri yang telah diinokulasi dan letakkan dalam inkubator pada waktu dan suhu yang dipilih.

G.1.4 Seleksi

Setelah inkubasi, pilih koloni pada cawan petri yang terpisah bagus, baik untuk *plating out* selanjutnya atau pengujian yang akan dikerjakan.

Jika memungkinkan, pada uji akhir digunakan sel *stemming* dari satu koloni tunggal. Jika sel dari satu koloni tidak mencukupi, terlebih dahulu di subculture pada media cair atau media agar miring, subculture ini digunakan untuk pengujian yang dilakukan.

G.2 Pewarnaan Gram (Teknik modifikasi Hucker)

G.2.1 Umum

Pewarnaan sel bakteri ini memberikan deskripsi morfologi bakteri dan klasifikasinya menjadi dua grup berdasarkan kemampuan bisa atau tidak mempertahankan warna ungu kristal violet selama kondisi pengujian. Perbedaan hasil ini disebabkan oleh adanya perbedaan struktur membran sel dari kedua grup dan ini juga berhubungan dengan perbedaan yang lain antara kedua grup. Terdapat sejumlah cara untuk melakukan pewarnaan Gram, tapi kebanyakan mengikuti urutan seperti di bawah.

G.2.2 Larutan yang digunakan

G.2.2.1 Umum

Larutan yang terdapat secara komersial dapat digunakan. Dalam hal ini, ikutilah rekomendasi dari pabrik pembuatnya.

G.2.2.2 Larutan kristal violet

Komposisi

| | |
|-----------------|-------|
| Kristal violet | 2,0 g |
| Etanol (95%) | 20 mL |
| Amonium oksalat | 0,8 g |
| Air | 80 mL |

Penyiapan

Larutkan kristal violet dalam etanol dan amonium oksalat dalam air. Campurkan kedua larutan itu dan biarkan bercampur selama 24 jam sebelum digunakan.

G.2.2.3 Larutan iodium

Komposisi

| | |
|--------------------|--------|
| Iodium | 1,0 g |
| Kalium iodida (KI) | 2,0 g |
| Air | 100 mL |

Penyiapan

Larutkan kalium iodida ke dalam 10 mL air, tambahkan iodida sedikit demi sedikit. Setelah terlarut, volumenya dibuat 100 mL dalam Erlenmeyer.

G.2.2.4 Larutan Safranin

Komposisi

| | |
|--------------|--------|
| Safranin O | 0,25 g |
| Etanol (95%) | 10 mL |
| Air | 100 mL |

Penyiapan

Larutkan safranin dalam etanol kemudian campurkan dengan air. Buatlah volume akhirnya menjadi 100 mL.

Ketika kristal violet digunakan, kestabilan larutan seharusnya diverifikasi. Untuk verifikasi, campurkan satu tetes dari larutan kristal violet dengan satu tetes larutan iodin pada gelas benda untuk melihat reaksi kimianya. Jika terlihat adanya kristalisasi, jangan gunakan larutan kristal violet.

G.2.2.5 Teknik Pewarnaan

- Setelah proses fiksasi (misalnya menggunakan api) lapisan bakteri di atas gelas benda mikroskop yang disiapkan dari kultur 18-24 jam, atau ketika media cair menjadi keruh, tutup lapisannya dengan larutan kristal violet (G.2.2.2.). Biarkan bereaksi selama 1 menit.
- Lapisi kaca obyek dengan larutan iodium (G.2.2.3). Biarkan bereaksi selama 1 menit. Cuci pelan-pelan kaca obyek (sambil dimiringkan) dengan air selama beberapa detik.
- Tuang pelan-pelan dan secara kontinyu lapisan etanol (95%) di atas kaca obyek selama tidak lebih

dari 30 detik dan sampai warna ungu tidak terpancar lagi.

- Cuci pelan-pelan kaca obyek (sambil dimiringkan) dengan air untuk menghilangkan etanol.
- Lapisi kaca obyek dengan larutan safranin (G.2.2.4) selama 10 detik
- Bilas pelan-pelan kaca obyek dengan air
- Keringkan kaca obyek.

G.2.2.6 Interpretasi

Uji preparat di bawah mikroskop. Sel bakteri yang menampakkan warna biru atau violet merupakan Gram positif, sedangkan yang berwarna pink gelap sampai merah merupakan Gram negatif.

Untuk kultur murni dari tipe bakteri tertentu, baik sel Gram positif dan negatif dapat dilakukan pada mikroskop yang sama.

G.3 Uji katalase

G.3.1 Umum

Deteksi enzim katalase yang dapat mendekomposisi hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan oksigen, dapat ditetapkan menggunakan kultur cair, kultur agar atau koloni terpisah dalam media agar.

G.3.2 Dari kultur cair

Tambahkan 0,5 mL larutan hidrogen peroksida 3% b/b ke dalam 1 mL kultur. Amati terbentuknya gelembung oksigen (katalase positif) atau tidak terbentuk (katalase negatif)

G.3.3 Dari kultur media agar

Tutup kultur dengan menambahkan 1 - 2 mL larutan hidrogen peroksida 3% b/b. Amati terbentuknya gelembung oksigen (katalase positif) atau tidak terbentuk (katalase negatif)

G.3.4 Dari koloni

Tempatkan secara terpisah 2 tetes larutan hidrogen peroksida 3% b/b pada kaca obyek.

Ambil koloni dengan batang kaca steril atau batang plastik (tidak menggunakan bahan logam) dan buat emulsi yang tipis mulai dari satu atau dua tetes. Amati terbentuknya gelembung oksigen (katalase positif) atau tidak terbentuk (katalase negatif). Jika terdapat keraguan tutup masing-masing tetes dengan kaca penutup dan bandingkan terjadinya gelembung di bawah kaca penutup.

Pengamatan dapat dilakukan secara makroskopis dan dengan mikroskop perbesaran rendah.

G.4 Uji Oksidase

G.4.1 Umum

Pendeteksian dari oksidase yang dapat memberikan hasil berupa perubahan warna dari senyawa selama proses oksidasi oleh aktivitas enzim.

G.4.2 Bahan kimia

G.4.2.1 Komposisi

| | |
|--|--------|
| N,'N,'N,'N'-Tetra metil 3-p-fenilendiamin dihidroklorida | |
| 1,0 g | |
| Air | 100 mL |

G.4.2.2 Penyiapan

Siapkan larutan pereaksi sesaat sebelum digunakan dengan melarutkan dalam air dingin.

Dapat digunakan disk atau stik yang terdapat di pasaran. Kemudian ikuti rekomendasi dari pabrik pembuatnya.

G.4.2.3 Teknik

Basahi satu lembar kertas saring dengan pereaksi. Ambil satu koloni kultur bakteri dari media agar dengan menggunakan jarum ose platina atau batang kaca atau plastik dan totolkan di atas kertas saring basah. Dianjurkan tidak menggunakan jarum ose nikel atau krom karena dapat memberikan kesalahan positif.

G.4.2.4 Interpretasi Hasil

Jika terdapat enzim oksidase, akan terbentuk warna ungu sampai merah keunguan dalam waktu 5-10 detik. Jika warna tidak berubah setelah 10 detik, pengujian ini dianggap negatif.

G.5 Penggunaan Uji Biokimia untuk Identifikasi

Uji biokimia yang digunakan untuk identifikasi dapat dilakukan dengan cara konvensional atau menggunakan kit. Uji biokimia dengan menggunakan kit mempunyai tingkat keandalannya yang tidak sama, oleh karena itu sebelum digunakan harus divalidasi, kecuali telah divalidasi oleh pabrik.

APENDIKS H

Teknik Dasar Untuk Penghitungan dan *Plating*

H.1 Inokulasi untuk metode tuang

Siapkan media, cawan Petri, pengencer dan seri pengenceran untuk diuji dalam volume dan jumlah sesuai dengan rencana inokulasi yang akan dilakukan.

Dalam cawan Petri berdiameter 85-100 mm, diinokulasi dengan 1 mL suspensi awal dan/atau pengenceran contoh seperti yang disiapkan pada proses validasi (lihat prosedur penetralan aktivitas antimikroba produk) dan kemudian dituangkan 15-20 mL media agar (suhu tidak lebih dari 48°C). Suspensi awal dan/atau pengenceran contoh dicampur dengan media, digoyang dengan hati-hati atau dimiringkan secukupnya supaya terdispersi dengan baik. Campuran dalam cawan Petri dibiarkan memadat pada suhu ruang.

H.2 Permukaan Inokulasi

Dalam cawan Petri berdiameter 85-100 mm, dimasukkan 15-20 mL media agar (suhu tidak lebih dari 48°C). Media agar dibiarkan dingin dan memadat di dalam inkubator, selanjutnya 0,1 mL suspensi awal dan/atau pengenceran contoh disebar pada permukaan media.

H.3 Penyaringan Membran

Sejumlah suspensi awal yang sesuai atau contoh yang telah diencerkan dituang ke dalam perangkat penyaring yang dilengkapi membran dengan ukuran pori 0,45 µm, membran dibilas segera setelah penyaringan dan dipindahkan ke permukaan media agar.

APENDIKS I

Persiapan dan Kalibrasi inokulum

I.1 Kultur dari Galur Pembanding

Dalam rangka untuk memperbaiki hasil keberulangan dan reproduisibilitas, disarankan untuk menggunakan generasi ketiga (paling tidak yang kedua) dari subkultur yang ditumbuhkan pada media agar untuk menyiapkan inokulum bakteri. Untuk *E. coli*, *P. aeruginosa*, dan *S. aureus*, menggunakan subkultur yang telah ditumbuhkan pada interval 18-24 jam. Untuk *C. albicans*, menggunakan subkultur pertama atau kedua subkultur yang ditumbuhkan selama 36-48 jam.

I.2 Preparasi suspensi sel

Ambil 10 mL pengencer di dalam wadah 100 mL yang berisi 5 g *glass beads*. Pindahkan 1 sengkeli sel yang dipanen dari media agar ke dalam pengencer. Sel sebaiknya disuspensikan ke dalam pengencer dengan menimmersikan sengkeli ke dalam pengencer dan gosokkan ke sisi –sisi tabung untuk mengeluarkan sel. Kocok tabung selama 2 sampai 3 menit (Jika memungkinkan gunakan pengocok otomatis). Keluarkan bagian paling atas dari suspensi (hindari kontak dengan bantalan kaca) dan pindahkan suspensi yang terkandung dalam wadah steril.

I.3 Kalibrasi dari suspensi

Tambahkan sejumlah sel dalam suspensi sebanyak 1×10^8 cfu/mL sampai 3×10^8 cfu/mL (dengan *C. albicans* sebanyak 1×10^7 cfu/mL sampai 3×10^7 cfu/mL) menggunakan pengencer mengacu pada hasil data kalibrasi dalam laboratorium. Sebagai contoh, gunakan spektrometer (panjang gelombang (620 ± 20) nm) dan menggunakan kuvet yang kecil berukuran 10 mm. Ukur absorbansinya dari seri pengenceran suspensi dan jika diperlukan, encerkan larutan untuk mendapatkan absorbansi diantara nilai yang ditentukan. Nilai densitas optik yang sesuai didapatkan antara 0,150 dan 0,460 mengacu pada strain.

ACUAN

1. Anonim (2001) General Test-Microbial Limit Test, dalam *Japanese Pharmacopoeia* 14 ed.
2. Anonim (2002) Microbiological Examination of non-sterile products, dalam *European Pharmacopoeia* 4th ed., Council of Europe.
3. Anonim (2005) Microbial Limit Test, dalam *US Pharmacopoeia* 28 ed.
4. Atlas, R. M., and Parks, L. C. (1993) *Handbook of microbiological media*, CRC Press, Boca Raton.

5. COLIPA (1997) *Guidelines on Microbial Quality Management*, European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association.
6. CTFA (2001) *Microbiology Guidelines*, Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association.
7. EN 1040, *Chemical disinfectants and Antiseptics - Basic bactericidal activities*.
8. EN 12353, *Chemical disinfectants and antiseptics — Preservation of microbial strains used for the determination of bactericidal and fungicidal activity*
9. FDA (1995) *Bacteriological Analytical Manual*, 8th edition, U.S Food and Drug Administration.
10. ISO 18415:2007, *Cosmetic - Microbiology - Detection of specified and non specified microorganism*.
11. ISO 21149:2006, *Cosmetics – Microbiology - Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria*.
12. ISO 21150:2006, *Cosmetics-Microbiology-Detection of Escherichia coli*.
13. ISO 22717:2006, *Cosmetics - Microbiology – Detection of Pseudomonas aeruginosa*.
14. ISO 22718:2006, *Cosmetics – Microbiology - Detection of Staphylococcus aureus*.
15. Singer, S. (1987) The use of Preservative Neutralizers in Diluents and Plating Media. *Cosmetics and Toiletries*, **102**: 55-60
16. EN 13624, *Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants for instrument used in the medical area- Test methode and requirements (phase 2, step 1*.
17. ISO 18415:2007 ^{1>}, *Cosmetic - Microbiology - Detection of candida albicans*.

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA,

KUSTANTINAH

Lampiran 2
Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat
dan Makanan Republik Indonesia
Nomor HK.03.1.23.08.11.07331 Tahun 2011

METODE ANALISIS

UJI EFEKTIVITAS PENGAWET DALAM KOSMETIKA

1. Ruang lingkup

Pedoman ini digunakan untuk menetapkan efektivitas antimikroba meliputi penentuan kesesuaian dan kinerja minimal pengawet dalam kosmetika.

2. Prinsip

- 2.1 Ujiantang terhadap produk bebas cemaran dengan menggunakan mikroba baku yang telah ditetapkan, kemudian produk yang telah diinokulasi tersebut disimpan pada suhu yang telah ditetapkan.
- 2.2 Penghitungan jumlah mikroba baku yang bertahan hidup dalam produk yang diuji, pada interval waktu yang ditentukan dengan metode angka lempeng.
- 2.3 Penentuan produk yang memenuhi kriteria, merupakan produk yang menggunakan pengawet yang sesuai, baik untuk proses pembuatan maupun penggunaan oleh konsumen.
- 2.4 Penentuan produk yang tidak memenuhi kriteria, merupakan produk yang tidak menggunakan pengawet yang sesuai.

3. Peralatan

- 3.1. *Biohazard cabinet*
- 3.1. Otoklaf
- 3.1. Oven
- 3.1. Inkubator suhu $(35 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ dan $(25 \pm 2)^{\circ}\text{C}$
- 3.1. *Vortex mixer*
- 3.1. Butir kaca (*glass beads*)
- 3.1. Pipet ukur berskala
- 3.1. Cawan Petri
- 3.1. Hemositometer dan mikroskop fase-kontras (jika ada)
- 3.1. Spektrofotometer/kolorimeter (jika ada)
- 3.1. Alat hitung koloni (*colony counter*)
- 3.1. Botol media
- 3.1. Tabung reaksi

- 3.1. Jarum inokulasi (*loop*) atau batang kaca bengkok (*spreader*)
- 3.1. Pembakar Bunsen (*bactincinerator*)
- 3.1. Tangas air
- 3.1. Timbangan *top-loading*
- 3.1. pH meter
- 3.1. Mc. Farland (BaSO₄) no.2 (jika tersedia)

4. Media dan Pereaksi

Media bentuk kering dengan fungsi setara, yang telah diuji sterilitas dan kemampuannya dalam menumbuhkan mikroba baku yang sesuai, terdiri dari:

- 4.1 *Nutrient Agar* atau yang setara (*Tryptic Soy Agar/TSA*)
- 4.2 *Lethen Agar* atau *Tryptic Soy Agar* + 1% Tween 80 (TSA_t)
- 4.3 *Mycophil Agar* pH 4,7 atau *Potato Dextrose Agar* + antibiotik (PDA_a)/SDA_a atau *Sabouraud Dextrose Agar* + 1% Tween 80 (SDA_t)
- 4.4 *Lethen Broth* atau Peptone Salin + 1% Tween 80
- 4.5 Larutan Dapar Klorida atau yang setara
- 4.6 Larutan Pengencer 1 steril (0,1% Peptone dalam NaCl 0,9%)
- 4.7 Larutan Pengencer 2 steril (0,05% Tween 80 dalam NaCl 0,9%)

5. Mikroba Uji

- 5.1 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, CIP 82.118, atau yang setara
- 5.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (NCIMB 9518, CIP 4.83, NCTC 10788)
- 5.3 *Candida albicans* ATCC 10231 (NCPF 3179, IP 48.72)
- 5.4 *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048
- 5.5 *Aspergillus niger* ATCC 16404 (IMI 149007, IP 1431.83)

6. Pemeliharaan Mikroba Uji

Mikroba uji dipelihara pada media yang sesuai:

- 6.1 Bakteri dengan *Nutrient Agar* (TSA atau yang setara)
- 6.2 Kapang dan khamir dengan *Mycophil Agar* pH 4,7 (PDA_a/SDA_a atau yang setara).

7. Prosedur

7.1 Penyiapan Mikroba Uji

- 7.1.1 Mikroba hidup yang digunakan dalam uji harus tidak boleh lebih dari turunan kelima biakan asli ATCC.

- 7.1.2 Goreskan stok biakan *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, dan *Enterobacter aerogenes* pada agar miring TSA dan inkubasi pada $35 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 18-24 jam.
- 7.1.3 Goreskan stok biakan *Candida albicans* pada agar miring SDAa dan inkubasi pada $25 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 48 jam.
- 7.1.4 Goreskan stok biakan *Aspergillus niger* pada agar miring SDAa dan inkubasi pada $25 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 7-14 hari atau sampai sporulasi sempurna.

7.2 Pemanenan Biakan Mikroba Uji

- 7.2.1 Cuci setiap biakan bakteri dan khamir dengan 2 x 2,5 mL larutan pengencer 1; dan biakan kapang dengan 2 x 2,5 mL larutan pengencer 2, lepaskan biakan dari permukaan agar dengan bantuan butir kaca steril. Pindahkan suspensi ke dalam tabung reaksi steril dan campur menggunakan *vortex mixer* agar tersebar merata.
- 7.2.2 Sesuaikan setiap pencucian dengan pengencer yang sama untuk menghasilkan 10^8 cfu/mL suspensi bakteri dan 10^7 cfu/mL suspensi khamir dan kapang. Bandingkan suspensi dengan larutan standar Mc. Farland (BaSO_4) no.2, pengukuran absorbansi atau metode lain yang berkaitan dengan Angka Lempeng Total (ALT) sebagaimana akan dijelaskan dalam poin 7.3 dan 7.4.

7.3 Penentuan Jumlah Bakteri Uji dengan Metode ALT-Cara Sebar Permukaan

- 7.3.1 Tuang sekitar 15 - 20 mL TSA yang telah dicairkan pada cawan Petri steril dan biarkan memadat.
- 7.3.2 Isi masing-masing dari 10 tabung steril dengan 9 mL larutan pengencer 1.
- 7.3.3 Inokulasi 1 mL dari masing-masing suspensi bakteri (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, dan *Enterobacter aerogenes*) ke dalam tabung reaksi pertama yang mengandung 9 mL pengencer 1 (tandai sebagai 10^{-1}). Ulangi proses pengenceran 10-kali hingga 10^{-10} . Campur menggunakan *vortex mixer* untuk menjamin distribusi yang homogen.
- 7.3.4 Pipet 0,5 mL suspensi dari pengenceran 10^{-4} hingga 10^{-10} dan sebarkan ke permukaan TSA, dilakukan secara duplo.
- 7.3.5 Setelah suspensi diserap oleh media, balikkan cawan dan inkubasi pada $35 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 24-48 jam.
- 7.3.6 Catat pertumbuhan antara 30-300 koloni. Total koloni merupakan hasil penjumlahan koloni dari kedua cawan Petri, dikalikan faktor pengenceran. Gunakan suspensi mengandung 10^8 cfu/mL bakteri uji.
- 7.3.7 Gunakan bakteri segera atau simpan di kulkas pada $2-8^\circ\text{C}$ selama tidak lebih dari 72 jam.

7.4 Penentuan Jumlah Kapang dan Khamir Uji dengan Metode ALT-Cara Tuang

- 7.4.1 Cairkan SDAa dan jaga suhu pada 45-50°C dalam tangas air.
- 7.4.2 Isi masing-masing 10 tabung reaksi steril dengan 9 mL pengencer (pengencer 1 untuk *Candida albicans* dan pengencer 2 untuk *Aspergillus niger*).
- 7.4.3 Inokulasi 1 mL *Candida albicans* ke dalam tabung reaksi pertama yang berisi pengencer 1 dan *Aspergillus niger* ke dalam tabung reaksi pertama berisi pengencer 2. Ulangi proses dengan menginokulasi 1 mL suspensi dari tabung reaksi pertama ke dalam tabung reaksi kedua. Lakukan seri pengenceran kelipatan 10 hingga 10^{-10} . Campur menggunakan *vortex mixer* untuk menjamin homogenitas contoh.
- 7.4.4 Pipet 1 mL suspensi dari pengenceran 10^{-4} hingga 10^{-10} ke dalam cawan petri steril, lakukan secara duplo. Tuang sekitar 15-20 mL SDAa yang telah dicairkan ke dalam setiap cawan, tutup, goyang perlahan dan biarkan memadat.
- 7.4.5 Inkubasi pada 25 ± 2 ° C selama 48 jam (khamir) dan 72 jam (kapang) dalam posisi cawan dibalik.
- 7.4.6 Catat pertumbuhan antara 30-300 koloni. Total koloni merupakan rata-rata koloni dari kedua cawan Petri, dikalikan faktor pengenceran.
- 7.4.7 Gunakan suspensi yang mengandung 10^7 cfu/mL khamir dan kapang untuk uji.
- 7.4.8 Gunakan mikroba segera atau simpan di kulkas pada 2-8°C **selama tidak lebih dari 72 jam.**

7.5 Penyiapan Contoh

- 7.5.1 Siapkan 5 x 100 g contoh dalam 5 wadah gelas yang sesuai. Tandai dengan tepat (3 wadah untuk mikroba uji bakteri dan 2 wadah untuk kapang dan khamir).
- 7.5.2 Kosmetik cair
Gunakan produk secara langsung untuk uji.
- 7.5.3 Krim dengan dasar air dan losion
Larutkan menggunakan larutan dapar klorida dengan perbandingan sama (1:1). Panaskan pada 40-45°C dan homogenkan menggunakan *vortex mixer* dengan bantuan butir kaca
- 7.5.4 Padat dan serbuk
Campur produk dengan larutan dapar klorida dengan perbandingan yang sama. Panaskan pada 40-45°C dan homogenkan menggunakan *vortex mixer* dengan bantuan butir kaca.

7.5.5 Produk berbasis minyak/lemak

Campur 100 g contoh dengan 20 g minyak mineral sehingga terbentuk pasta. Tambahkan 80 mL larutan dapar klorida. Panaskan pada 40-45°C dan homogenkan menggunakan *vortex mixer* dengan bantuan butir kaca.

7.5.6 Aerosol

Simpan seluruh wadah dalam *refrigerator* (2-8°C) selama 30 menit. Pindahkan 50 g aerosol ke dalam wadah yang berisi 50 mL larutan dapar klorida. Homogenkan menggunakan *vortex mixer* dengan bantuan butir kaca.

7.6 Prosedur Uji

7.6.1 Contoh harus diverifikasi tidak adanya pertumbuhan bakteri, khamir dan kapang, menggunakan metode uji “Penetapan Angka Kapang Khamir dan Uji Angka Lempeng Total dalam Kosmetika”. Hal ini harus dilakukan sebelum melangkah ke proses lebih lanjut.

7.6.2 Inokulasi masing-masing wadah contoh dengan 1 mL suspensi dari tiap mikroba uji yang mengandung 1,0 hingga $9,9 \times 10^6$ cfu/mL (untuk bakteri) atau 1,0 hingga $9,9 \times 10^5$ cfu/mL (untuk khamir dan kapang) [volume suspensi sebaiknya tidak melebihi 1% dari jumlah contoh yang diuji]. Homogenkan menggunakan *vortex mixer*.

7.6.3 Pindahkan masing-masing 20 g dari contoh yang telah diinokulasi (sebagaimana tercantum dalam 7.6.2) ke dalam 4 wadah yang berbeda untuk diuji dalam jangka waktu 2, 7, 14 dan 28 hari.

Untuk tujuan validasi, uji kontrol harus dilakukan bersamaan dengan uji contoh: hari ke-0, 2, 7, 14, dan 28

7.6.3.1 Inokulasi 100 g contoh tanpa pengawet atau 100 g larutan fisiologis NaCl steril yang mengandung 1% Tween 80 dengan 1 mL suspensi dari salah satu mikroba uji untuk menghasilkan 1,0 hingga $9,9 \times 10^6$ cfu/mL (untuk bakteri) atau 1,0 hingga $9,9 \times 10^5$ cfu/mL (untuk khamir dan kapang) sebagai kontrol.

7.6.3.2 Pindahkan 1 mL contoh dalam waktu 30 menit dari masing-masing wadah untuk diuji pada hari ke-0, 2, 7, 14 dan 28 hari. Lakukan pengujian dengan melakukan seri pengenceran kelipatan 10 menggunakan larutan pepton salin yang mengandung 1% polisorbate 80.

Catatan: contoh yang belum diuji disimpan pada suhu ruangan (20-25°C) selama pengujian.

7.6.3.3 Tentukan jumlah mikroba hidup dengan menggunakan metode ALT cara sebar permukaan pada TSA untuk bakteri dan metode ALT cara tuang dengan menggunakan SDA untuk khamir dan kapang. Lakukan secara duplo.

7.6.3.4 Inkubasi bakteri pada $35 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 24 - 48 jam, khamir dan kapang pada $25 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 3 - 5 hari. Hitung jumlah mikroba yang bertahan hidup tiap g atau mL contoh.

7.6.3.5 Identifikasi mikroba dengan pewarnaan Gram yang tepat.

7.7 Cara Perhitungan

7.7.1 Persentase Reduksi, dihitung dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Reduksi} = \frac{\text{jumlah inokulum } (t_0) - \text{jumlah pada interval produk } (t_i)}{\text{jumlah inokulum } (t_0)} \times 100$$

catatan:

t_0 adalah jumlah koloni yang diperoleh dari hasil pengujian hari ke-0

t_i adalah jumlah koloni yang diperoleh dari hasil pengujian hari ke- i (hari ke-2, ke-7, ke-14, dan ke-28)

7.7.2 Log Reduksi dihitung dengan rumus:

$$\text{Log Reduksi} = \log \text{ jumlah inokulum } (t_0) - \log \text{ jumlah pada interval produk } (t_i)$$

7.8 Interpretasi Data

Pengawet harus menunjukkan aktivitas terhadap mikroba uji sebagai berikut:

7.8.1 Jumlah bakteri dan khamir harus menunjukkan penurunan sekurang-kurangnya 99,0% (2 log) pada hari ke 2 dan 99,9% (3 log) pada hari ke 7 untuk setiap mikroba uji dan tidak ada peningkatan lagi selama uji selanjutnya dalam variasi data yang normal.

7.8.2 Jumlah kapang seharusnya menunjukkan penurunan 90,0% (1 log) pada hari ke 14 dan 99,0% (2 log) pada hari ke 28.

Jumlah mikroba uji pada contoh uji kontrol seharusnya tidak menunjukkan hasil seperti pada 7.8.1 dan 7.8.2.

7.9 Presisi dan Bias

Presisi dan bias metode ini belum ditetapkan. Direkomendasikan adanya replikasi contoh.

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA,

KUSTANTINAH

Lampiran 3
Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat
dan Makanan Republik Indonesia
Nomor HK.03.1.23.08.11.07331 Tahun
2011

**METODE ANALISIS
PENETAPAN KADAR CEMARAN LOGAM BERAT
(ARSEN, KADMIUM, TIMBAL DAN MERKURI) DALAM KOSMETIKA**

1. Ruang lingkup

Metode ini menguraikan prosedur untuk penetapan kadar cemaran logam berat (arsen, kadmium, timbal dan merkuri) dalam kosmetika.

2. Prinsip

Contoh didigesti dengan cara digesti basah atau digesti kering atau digesti gelombang mikro bertekanan tinggi (*High Pressure Microwave Digestion*) dan ditetapkan kadar logam berat seperti arsen (As), kadmium (Cd), timbal (Pb) dan merkuri (Hg) menggunakan *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer* (GF-AAS) dan *Flow Injection Analysis System - Atomic Absorption Spectrophotometer* (FIAS-AAS).

3. Pereaksi

Seluruh pereaksi yang digunakan harus pro analisis

3.1 Asam nitrat pekat

3.2 Asam klorida pekat

3.3 Larutan hidrogen peroksida 30 % v/v

3.4 Pereduksi untuk merkuri

3.4.1 Larutan timah (II) klorida 1,1% dalam larutan asam klorida 3% v/v

3.4.2 Larutan natrium borohidrida 0,2% dalam larutan natrium hidroksida 0,05 %

3.5 Larutan magnesium nitrat 50%

3.6 Air deionisasi, dengan resistivitas $\geq 18,2$ Mohm

3.7 Larutan *Modifier* untuk GF-AAS

3.7.1 Untuk As: *modifier* Pd 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

3.7.2 Untuk Pb dan Cd: buat campuran larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2% dalam larutan asam nitrat 0,5% v/v dan larutan $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,2% dalam larutan asam nitrat 0.5 % v/v (1:1)

3.8 Pereaksi untuk perlakuan awal pengujian As: buat campuran larutan kalium iodida 10% dan larutan asam askorbat 10% (1:1)

4. Peralatan

Peralatan laboratorium yang umum digunakan adalah:

- 4.1 Kertas *Whatman no.1* dan *no.40*
- 4.2 Tabung digesti bertutup ulir, 50 mL
- 4.3 Tanur
- 4.4 Alat digesti gelombang mikro dengan kondisi sebagai berikut:

| Bentuk sediaan | Daya Maksimum (W) | Suhu Maksimum (°C) | Tekanan maksimum (bar) | Waktu (menit) |
|----------------|-------------------|--------------------|------------------------|---------------|
| Krim | 800 | 200 | 75 | 50 |
| Serbuk | 1000 | 200 | 75 | 40 |
| Lipstik | 900 | 200 | 75 | 50 |

- 4.5 Tabung kuarsa atau tetrafluorometan (TFM) 50 mL
- 4.6 *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer* (As, Cd, Pb) dengan kondisi sebagai berikut:

| Unsur | Panjang gelombang (nm) | Pirolisis (°C) | Suhu atomisasi (°C) | Volume injeksi (µL) |
|-------|------------------------|----------------|---------------------|---------------------|
| As | 193,7 | 1250 | 2100 | 20 |
| Cd | 228,8 | 550 | 1550 | 20 |
| Pb | 283,3 | 550 | 1550 | 20 |

- 4.7 *Flow Injection Analysis System - Atomic Absorption Spectrophotometer* dengan kondisi sebagai berikut:

| Unsur | Teknik | Panjang gelombang (nm) | Zat pereduksi | Pembawa | Suhu atomisasi (°C) | Volume injeksi (µL) |
|-------|-------------------------------------|------------------------|---|--------------|---------------------|---------------------|
| As | <i>Hydride Generation Technique</i> | 193,7 | NaBH ₄ 0,2 % | HCl 10 % v/v | 900 | 500 |
| Hg | <i>Cold Vapour Technique</i> | 253,7 | SnCl ₂ 1,1% atau NaBH ₄ 0,2 % | HCl 3 % v/v | 300 | 500 |

- 4.8 *Electrodeless Discharge Lamp* atau *Hollow Cathode Lamp*: As, Cd, Pb, Hg

5. Prosedur

5.1 Penyiapan larutan baku kalibrasi

Larutan baku persediaan As, Cd, Pb dan Hg dengan konsentrasi masing-masing 1000 µg/mL

5.1.1 As:

5.1.1.1 Untuk GF-AAS

Buat larutan baku kalibrasi As dengan konsentrasi 5, 10, 20, 30 dan 50 µg/L dalam larutan asam nitrat 0,5% v/v.

5.1.1.2 Untuk FIAS-AAS (*Hydride Generation Technique*)

- Buat Larutan baku kalibrasi As dengan konsentrasi 1 µg/mL.
- Pipet 200, 400, 600, 800 µL larutan baku, masukkan ke dalam masing-masing labu tentukur 100-mL dan lanjutkan seperti yang tertera pada Prosedur 5.3.

5.1.2 Cd: buat larutan baku kalibrasi Cd dengan konsentrasi 0,5; 1; 2; 3 dan 5 µg/L dalam larutan asam nitrat 0,5% v/v.

5.1.3 Pb: buat larutan baku kalibrasi Pb dengan konsentrasi 5; 10; 20; 30 dan 50 µg/L dalam larutan asam nitrat 0,5% v/v.

5.1.4 Hg: buat larutan baku kalibrasi Hg dengan konsentrasi 0,5; 1; 2; 3 dan 5 µg/L dalam larutan asam klorida 3% v/v.

5.2 Penyiapan larutan uji

5.2.1 Buat pereaksi blanko seperti penyiapan larutan uji tetapi tanpa penambahan contoh.

5.2.2 Buat larutan uji dengan salah satu dari metode sebagai berikut:

5.2.2.1 Alat digesti gelombang mikro (untuk As, Cd, Pb, Hg)

- a. Timbang saksama 0,15 - 0,20 g contoh, masukkan ke dalam tabung kuarsa atau tetrafluorometan (TFM) 50 mL. Hindari kontak dengan dinding tabung, tambahkan 3,0 mL asam nitrat pekat dan 1,0 mL larutan hidrogen peroksida 30% v/v. Jika contoh mengandung talk atau pigmen, tambahkan 1 mL asam klorida pekat.
- b. Tutup tabung dan diamkan selama 15 menit untuk menjamin reaksi berjalan sempurna. Digesti dalam *microwave digestion system* menggunakan program khusus.
- c. Setelah didinginkan sampai suhu ruang, tambahkan 20 mL air deionisasi pada larutan digesti, bilas bagian

dalam dan bagian tutup, saring dengan kertas *Whatman no.1*. Tampung filtrat dalam labu tentukur 50-mL dan encerkan dengan air deionisasi sampai tanda.

5.2.2.2 Digesti kering/pengabuan (untuk As, Cd, dan Pb)

- Timbang saksama lebih kurang 2,5 g contoh, masukkan ke dalam cawan porselen dan tambahkan 3 mL larutan magnesium nitrat 50%.
- Keringkan di atas tangas air, abukan residu terlebih dahulu dalam mantel pemanas sampai tidak terdapat asap, kemudian panaskan dalam tanur pada suhu 500°C selama 3 jam.
- Dinginkan, tambahkan 25 mL larutan asam klorida 6 M, saring ke dalam labu tentukur 50-mL dan encerkan dengan air sampai tanda. Untuk penetapan As, lanjutkan seperti yang tertera pada 5.3.

5.2.2.3 Digesti basah (untuk Hg)

(Perhatian: Teknik ini memberikan hasil perolehan kembali Hg yang rendah dibandingkan dengan teknik digesti gelombang mikro.)

- Timbang saksama lebih kurang 0,5 g contoh, masukkan ke dalam tabung digesti bertutup dan tambahkan 7 mL asam nitrat pekat.
- Panaskan di atas lempeng pemanas pada suhu maksimum 60°C selama tidak kurang dari 3 jam.
- Dinginkan dan encerkan dengan air hingga 50 mL. Biarkan selama 24 jam dalam lemari pendingin untuk krim dan lipstik. Saring larutan melalui kertas saring *Whatman no. 40*.
- Larutan digesti ini digunakan untuk analisis secara *FIAS-AAS (Cold Vapour Mercury Technique)*.

5.3 Perlakuan awal untuk pengujian As

5.3.1 Pipet masing-masing 10 mL air deionisasi (sebagai blanko baku), pereaksi blanko, larutan baku, larutan uji ke dalam labu tentukur 100-mL.

5.3.2 Tambahkan 10 mL asam klorida pekat dan 10 mL pereaksi untuk perlakuan awal pengujian As, seperti yang tertera pada 3.8, pada masing-masing larutan dan biarkan selama 45 menit pada suhu

ruang. Encerkan dengan air hingga tanda. Konsentrasi akhir larutan baku berturut-turut adalah 2,0; 4,0; 6,0 dan 8,0 µg/L.

5.3.3 Larutan ini digunakan untuk analisis secara *FIAS-AAS (Hydride Generation Technique)*

5.4 Kurva kalibrasi

Suntikkan larutan baku kalibrasi dan larutan *modifier* ke dalam alat *GF-AAS* (rasio injeksi larutan baku dan *modifier* = 20 µL : 5 µL) atau *FIAS-AAS (Cold Vapour Technique)* atau *FIAS-AAS (Hydride Generation Technique)* pada kondisi tertentu, seperti yang tertera pada 4.6 dan 4.7. Buat kurva antara respon (serapan atau tinggi puncak) dengan kadar dari masing-masing larutan baku.

5.5 Suntikkan larutan uji dan larutan *modifier* dengan rasio seperti pada 5.4 ke dalam alat *GF-AAS* atau *FIAS-AAS (Cold Vapour Technique)* atau *FIAS-AAS (Hydride Generation Technique)* dan rekam respon.

6. Penghitungan

Hitung kadar As, Cd, Pb, Hg (µg/g) dalam contoh dengan persamaan garis regresi kurva kalibrasi, menggunakan rumus:

$$\frac{C_u}{B_u} \times \frac{1}{1000} \times F$$

dimana

Cu = Konsentrasi As, Cd, Pb, Hg (µg/L) dalam contoh yang dihitung dari kurva kalibrasi.

F = Volume larutan uji dalam mL

Bu = Bobot contoh (g) dari larutan uji

7. Keterangan

7.1. Penetapan batas kuantitasi

| Logam | Batas kuantitasi (µg/g) |
|-------|-------------------------|
| As | 2,5 |
| Cd | 1 |
| Pb | 10 |
| Hg | 0,5 |

7.2. Laporan hasil

7.2.1. Jika hasil pengujian berada dibawah batas kuantitasi yang tertera pada tabel 7.1. maka dilaporkan sebagai “dibawah batas kuantitasi”.

- 7.2.2. Jika kadar logam tinggi, larutan uji (5.2) harus diencerkan sampai kadar dalam rentang kurva kalibrasi. Faktor pengenceran diperlukan jika sampel diencerkan lebih lanjut.

ACUAN

ASEAN Cosmetic Method (ACM) THA 05

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA,

KUSTANTINAH

Lampiran 4
Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan
Makanan Republik Indonesia
Nomor HK.03.1.23.08.11.07331 Tahun 2011

**METODE ANALISIS
IDENTIFIKASI ASAM RETINOAT DALAM KOSMETIKA
SECARA KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) DAN KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI (KCKT)**

A. IDENTIFIKASI SECARA KLT

1. Ruang lingkup

Metode ini menguraikan prosedur untuk identifikasi asam retinoat dalam kosmetika.

(Perhatian: Pada saat penanganan larutan baku dan contoh, seluruh personel terutama wanita hamil atau diduga hamil harus memperhatikan keamanan penanganan berbagai senyawa retinoat).

2. Prinsip

Asam retinoat diidentifikasi secara KLT.

3. Baku Pembanding (BP)

Asam retinoat BP. Simpan dibawah nitrogen dan terlindung dari cahaya, pada suhu ruang.

4. Pereaksi

Semua pereaksi yang digunakan harus pro analisis.

4.1 Asam asetat glasial

4.2 Asam fosfomolibdat

4.3 Aseton

4.4 Etanol mutlak

4.5 Dietil eter

4.6 n-heksan

4.7 Metanol

4.8 Gas nitrogen

4.9 Sikloheksan

4.10 Larutan pengembang :

4.10.1 Sistem A: campuran n-heksan - asam asetat glasial 0,33% dalam etanol mutlak (9:1) v/v

4.10.2 Sistem B: campuran n-heksan - aseton (6:4) v/v

4.10.3 Sistem C: campuran sikloheksan - eter - aseton - asam asetat glasial (54:40:4:2) v/v/v/v

- 4.11 Larutan penampak bercak: asam fosfomolibdat 5% dalam etanol mutlak yang harus dibuat baru (berupa cairan jernih berwarna kuning).

5. Peralatan

Peralatan laboratorium yang umum digunakan dan

- 5.1 Bejana kromatografi
- 5.2 Kertas saring *Whatman no. 41* atau yang setara
- 5.3 Lampu UV 254 nm
- 5.4 Lempeng KLT silika gel 60F₂₅₄ siap pakai, 20 cm x 20 cm, tebal 0,25 mm
- 5.5 Penyaring membran PTFE (*Politetrafluoroetilen*) porositas 0,45 µm atau yang setara
- 5.6 Peralatan gelas tahan cahaya
- 5.7 Peralatan penampak bercak
- 5.8 Tabung sentrifus bertutup 30 mL
- 5.9 *Vortex mixer*

6. Prosedur

(*Catatan: Penimbangan dan pemipetan pada saat pembuatan larutan baku dan larutan uji harus dilakukan secara cepat dan hindarkan dari cahaya untuk meminimalkan penguraian asam retinoat. Jika tidak tersedia peralatan gelas tahan cahaya, tabung dan bejana dapat dibungkus dengan aluminium foil.*)

- 6.1 Penyiapan larutan baku
Timbang saksama lebih kurang 0,01 g Asam retinoat BP, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan metanol sampai tanda.
- 6.2 Penyiapan larutan uji
 - 6.2.1 Produk krim
Timbang lebih kurang 3 g contoh, masukkan ke dalam tabung sentrifus 30 mL, bungkus dengan aluminium foil, tambahkan 10 mL metanol dan campur menggunakan *vortex mixer* selama 5 menit. Dinginkan dalam es selama 15 menit dan saring melalui kertas saring *Whatman no. 41* atau yang setara.
 - 6.2.2 Produk berbasis air (larutan dan gel)
Timbang lebih kurang 10 g contoh, masukkan ke dalam corong pisah. Untuk contoh gel, tambahkan dalam 5 mL air. Ekstraksi larutan dengan 50 mL n-heksan dan cuci ekstrak n-heksan dengan 10 mL air. Uapkan ekstrak dengan hembusan gas nitrogen sampai kering. Larutkan residu dalam 1 mL metanol dan saring melalui penyaring membran PTFE dengan porositas 0,45 µm.
(*Catatan: Gunakan penyaring membran berdiameter kecil.*)

6.3 Prosedur KLT

6.3.1 Produk krim

- 4.1. Siapkan lempeng KLT dengan membuat batas penotolan dan batas eluasi lebih kurang 10 cm.
- 4.2. Totolkan secara terpisah, masing-masing 5 hingga 20 μL larutan uji dan 5 μL larutan baku pada batas penotolan dari lempeng KLT.
- 4.3. Kembangkan lempeng dalam bejana kromatografi yang berisi larutan pengembang sistem A. Angkat lempeng dan biarkan hingga kering. Amati bercak gelap di bawah penyinaran lampu UV.
- 4.4. Semprot dengan larutan penampak bercak, akan tampak bercak berwarna biru tua pada nilai Rf yang menunjukkan adanya asam retinoat.
- 4.5. Hembuskan udara panas pada lempeng, akan tampak bercak berwarna hijau kebiruan dari asam retinoat.
- 4.6. Jika hasil positif, menunjukkan adanya asam retinoat. Ulangi pengujian seperti yang tertera pada 6.3.1.1 hingga 6.3.1.5 menggunakan larutan pengembang sistem B.

6.3.2 Produk berbasis air

- 4.1. Isi dan jenuhkan bejana kromatografi dengan larutan pengembang sistem C yang dilapisi dengan kertas saring.
- 4.2. Totolkan secara terpisah, masing-masing 5 hingga 20 μL larutan uji dan 5 μL larutan baku pada garis awal dari lempeng KLT. Biarkan sampai bercak kering.
- 4.3. Kembangkan lempeng sampai jarak rambat pengembang kurang lebih 15 cm.
- 4.4. Keringkan lempeng di udara dan amati lempeng di bawah penyinaran lampu UV 254 nm. Semprot lempeng dengan larutan penampak bercak.
- 4.5. Hembuskan udara panas pada lempeng, akan tampak bercak berwarna hijau kebiruan dari asam retinoat.
- 4.6. Bandingkan nilai Rf dan warna bercak yang diperoleh dari larutan uji dengan larutan baku.

7. Identifikasi

7.1 Hitung nilai Rf untuk masing-masing bercak

Nilai Rf = Jarak tempuh bercak/Jarak tempuh larutan pengembang

- 7.2 Bandingkan bercak yang diperoleh dari larutan uji dengan larutan baku berdasarkan nilai Rf, warna bercak dibawah penyinaran lampu UV dan warna bercak setelah visualisasi dengan penyemprotan larutan penampak bercak.

| Sistem pengembang | Perkiraan nilai Rf | Batas deteksi (μg) |
|-------------------|--------------------|---------------------------------|
| Sistem A | 0,1 – 0,3 | 0,125 |
| Sistem B | 0,5 | |
| Sistem C | 0,4 | |

7.3 Lakukan pengujian lebih lanjut secara KCKT, seperti yang tertera pada bagian B dan bandingkan waktu retensi yang diperoleh dari puncak larutan uji dengan larutan baku.

B. IDENTIFIKASI SECARA KCKT

1. Ruang lingkup

Metode ini menjelaskan prosedur untuk identifikasi asam retinoat dalam kosmetika.

2. Prinsip

Asam retinoat diidentifikasi secara kromatografi cair fase balik dengan deteksi ultra violet.

3. Baku Pembanding (BP)

Asam retinoat BP. Simpan dibawah gas nitrogen dan terlindung dari cahaya.

4. Pereaksi

Semua pereaksi yang digunakan harus pro analisis dan sesuai untuk KCKT

4.1 Air bidestilasi, 18 Mohm

4.2 Asam asetat glasial

4.3 Metanol

4.4 Fase gerak: campuran metanol-air-asam asetat glasial (85:15:0,5) v/v/v

5. Peralatan

Peralatan laboratorium yang umum digunakan dan

5.1 Peralatan gelas tahan cahaya

5.2 Tabung sentrifus bertutup 30 mL

5.3 Vial berwarna coklat

5.4 KCKT dengan detektor ultra violet 353 nm

5.5 Kolom analitik: kolom baja tahan karat, 150 x 4,6 mm, berisi oktadesilsilana C18 dengan ukuran partikel 5 μm atau yang setara.

5.6 Penyaring membran PVDF (*Polyvinylidene difluoride*) porositas 0,45 μm atau yang setara

6. Prosedur

(Catatan: Penimbangan dan pemipetan pada saat pembuatan larutan baku dan larutan uji harus dilakukan secara cepat dan hindari cahaya untuk meminimalkan penguraian asam retinoat. Jika tidak tersedia peralatan

gelas tahan cahaya, tabung dan bejana dapat dibungkus dengan aluminium foil).

6.1 Penyiapan larutan baku (larutan harus dibuat baru)

Timbang saksama lebih kurang 10 mg Asam retinoat BP, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dalam 5 mL metanol, jika perlu sonikasi selama 1 hingga 2 menit dan encerkan dengan metanol sampai tanda (A). Buat pengenceran 1000 kali dengan cara: pipet 1 mL (A) ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan metanol sampai tanda (B); pipet 1 mL (B) ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan metanol sampai tanda (C); pipet 1 mL (C) ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan metanol sampai tanda (D). Larutan (D) yang digunakan sebagai larutan baku.
(Catatan: Larutan ini digunakan dalam 24 jam.)

6.2 Penyiapan larutan uji

6.2.1 Produk Krim

Timbang lebih kurang 1 g contoh, masukkan ke dalam tabung sentrifus 30 mL yang dibungkus dengan aluminium foil, tambahkan 10 mL metanol dan campur menggunakan vortex mixer selama 5 menit. Dinginkan dalam es selama 15 menit dan saring melalui penyaring membran berdiameter kecil dengan porositas 0,45 µm. Kumpulkan filtrat dalam vial berwarna coklat, buang beberapa mL filtrat pertama. Gunakan filtrat sebagai larutan uji.

6.2.2 Larutan jernih

Saring larutan melalui penyaring membran berdiameter kecil dengan porositas 0,45 µm. Kumpulkan filtrat dalam vial berwarna coklat, buang beberapa mL filtrat pertama. Gunakan filtrat sebagai larutan uji.

6.3 Prosedur KCKT

6.3.1 Kondisi :

Suhu kolom : 30°C
Laju alir : 1,4 mL/menit
Detektor : UV 353 nm
Volume injeksi : 20 µL

6.3.2 Suntikkan secara terpisah larutan baku dan larutan uji ke dalam kromatograf.

6.3.3 Bandingkan waktu retensi yang diperoleh dari kromatogram larutan uji dengan larutan baku.

7. Perhitungan penetapan kadar

Gunakan luas puncak asam retinoat pada kromatogram untuk menghitung kadar dalam contoh. Hitung kadar asam retinoat % (b/b) dalam contoh, dengan rumus:

$$\frac{A_u}{A_b} \times \frac{B_b}{B_u} \times \frac{F_u}{F_b} \times K_b \times 100$$

dimana:

Au = Luas puncak asam retinoat larutan uji

Ab = Luas puncak asam retinoat larutan baku

Bb = Bobot baku

Bu = Bobot contoh

Fu = Faktor pengenceran larutan uji

Fb = Faktor pengenceran larutan baku

Kb = Kemurnian baku

100 = Faktor konversi untuk persentase

8. Keterangan

8.1 Batas deteksi lebih kurang 0,002 mg/mL.

8.2 Larutan uji dan larutan baku harus dalam konsentrasi yang berdekatan untuk digunakan dalam perhitungan. Jika diperlukan, buat larutan baku yang lebih pekat atau larutan uji yang lebih encer. Perbedaan luas puncak larutan uji dan larutan baku tidak lebih dari 10%.

8.3 Identifikasi asam isoretinoat.

Metode ini dapat digunakan untuk identifikasi asam isoretinoat (asam retinoat bentuk 13-cis).

8.4 Untuk konfirmasi kemurnian puncak dapat digunakan detektor *Photo Diode Array (PDA)*.

C. KESIMPULAN

Gabungkan hasil KLT dan KCKT untuk identifikasi adanya asam retinoat.

D. ACUAN

ASEAN Cosmetic Method (ACM) SIN 01

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA,

KUSTANTINAH

Lampiran 5
Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat
Dan Makanan Republik Indonesia
Nomor HK.03.1.23.08.11.07331 Tahun 2011

METODE ANALISIS
IDENTIFIKASI BAHAN PEWARNA YANG DILARANG DALAM KOSMETIKA
SECARA KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) DAN
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

A. IDENTIFIKASI SECARA KLT

1. Ruang lingkup

Metode ini menguraikan prosedur untuk identifikasi bahan pewarna yang dilarang dalam kosmetika, yaitu:

| Nomor CI | Nama lain |
|----------|---------------------------------------|
| 12075 | Jingga K1 (<i>Pigment Orange 5</i>) |
| 13065 | Kuning Metanil |
| 45170 | Merah K10 (<i>Rhodamine B</i>) |

2. Prinsip

Bahan pewarna yang dilarang dalam kosmetika diekstraksi dan diidentifikasi secara KLT.

3. Baku Pembanding (BP)

3.1 Jingga K1 BP

3.2 Kuning metanil BP

3.3 Merah K10 BP

4. Pereaksi

Semua pereaksi yang digunakan harus pro analisis.

4.1 Air destilasi

4.2 Amonia 25%

4.3 Asam asetat glasial

4.4 Asam ortofosfat 85%

4.5 n-butanol

4.6 Diklorometan

4.7 N,N-dimetilformamida (DMF)

- 4.8 Etanol 96%
- 4.9 Etil asetat
- 4.10 n-heksan
- 4.11 Isobutanol
- 4.12 Isopropanol
- 4.13 Metanol
- 4.14 Petroleum eter (antara 40-60°C atau 60-80°C)
- 4.15 Pelarut campuran: campuran N,N-dimetilformamida - asam ortofosfat (95:5) v/v yang dibuat baru.
- 4.16 Larutan pengembang:
 - Pewarna larut minyak dikembangkan dengan larutan pengembang Sistem A dan pewarna larut air dengan larutan pengembang lainnya.
 - 4.16.1 Sistem A : diklorometan
 - 4.16.2 Sistem B : campuran etil asetat-metanol-[amonia 25% - air (3:7)] (15:3:3) v/v/v yang dibuat baru.
 - 4.16.3 Sistem C: campuran etanol-air-isobutanol-amonia 25% (31:32:40:1) v/v/v/v
 - 4.16.4 Sistem D: campuran isopropanol-amonia 25% (100:25) v/v
 - 4.16.5 Sistem E: campuran n-butanol - etanol - air - asam asetat glasial (60:10:20:0,5) v/v/v/v
 - 4.16.6 Sistem F: campuran etil asetat - n-butanol - amonia 25 % (20:55:25) v/v/v

5. Peralatan

Peralatan laboratorium yang umum digunakan, dan

- 5.1 Lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄ siap pakai, ukuran 20 cm x 20 cm, tebal 0,25 mm
- 5.2 Bejana kromatografi
- 5.3 Pipa kapiler *Micropipette* (1-5 µL)
- 5.4 Kertas saring
- 5.5 Penyaring membran PTFE, diameter 13 mm, porositas 0,45 µm, atau yang setara
- 5.6 *Vortex mixer*
- 5.7 Lampu UV 254 nm dan 366 nm
- 5.8 Tangas air

6. Prosedur

- 6.1 Penyiapan larutan baku

(Catatan: Larutan baku yang pekat, akan memberikan bercak tambahan)

- 6.1.1 Larutan baku bahan pewarna larut minyak

Timbang saksama sejumlah Jingga K1 BP, larutkan dalam diklorometan atau pelarut campur hingga kadar 0,1 mg/mL dan sonikasi sampai homogen.

6.1.2 Larutan baku bahan pewarna larut air

Timbang saksama sejumlah Kuning Metanil BP, dan Merah K10 BP, masing-masing dilarutkan dan diencerkan dengan metanol atau DMF atau pelarut campur hingga kadar 0,2 mg/mL.

6.2 Penyiapan larutan uji

6.2.1 Produk kosmetika berwarna

Timbang saksama lebih kurang 0,1 g – 0,3 g contoh dan larutkan dalam 2 mL pelarut campur.

6.2.1.1 Untuk contoh yang diduga mengandung Jingga K1:

Lakukan ekstraksi dengan diklorometan. Jika perlu, panaskan pada suhu 90°C selama 1 jam atau sampai larut.

6.2.1.2 Untuk contoh kosmetika yang mengandung minyak :

Lakukan ekstraksi lemak 2 kali, setiap kali dengan 5 mL n-heksan. Kumpulkan ekstrak n-heksan. Jika ekstrak berwarna, ekstraksi kembali dengan 2 mL pelarut campur dan buang lapisan n-heksan. Saring lapisan pelarut campur melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 µm. Gunakan filtrat sebagai larutan uji.

6.2.2 Sediaan mandi dan produk kosmetika berbasis air lainnya

6.2.2.1 Timbang saksama lebih kurang 1 sampai 5 g contoh (tergantung konsentrasi warna pada contoh), tambahkan 20 mL DMF dan panaskan di atas tangas air selama 10 menit. Biarkan pada suhu ruang hingga dingin dan saring melalui kertas saring *Whatman* (kecepatan sedang sampai tinggi). Pewarna organik akan larut dalam DMF.

6.2.2.2 Lakukan ekstraksi terhadap lapisan DMF dengan 40 mL petroleum eter untuk menghilangkan kelebihan minyak. Uapkan lapisan DMF di atas tangas air sampai kering.

6.2.2.3 Jika lapisan petroleum eter berwarna, menunjukkan adanya pewarna larut minyak. Uapkan lapisan petroleum eter sampai kering.

6.3 Prosedur KLT

6.3.1 Produk kosmetika berwarna

6.3.1.1 Lapsi bejana KLT menggunakan kertas saring, jenuhkan bejana KLT dengan larutan pengembang yang sesuai.

6.3.1.2 Siapkan lempeng KLT dengan membuat batas penotolan dan batas eluasi lebih kurang 15 cm, kecuali untuk larutan pengembang sistem A, lebih kurang 11 cm.

6.3.1.3 Totolkan secara terpisah, masing-masing 1 μ L sampai 5 μ L larutan baku dan sejumlah volume sama larutan uji (tergantung kepekatan warna) pada batas penotolan.

6.3.1.4 Kembangkan lempeng dalam masing-masing bejana kromatografi yang berisi larutan pengembang sampai batas eluasi pada suhu ruang.

6.3.1.5 Angkat lempeng dan keringkan pada suhu ruang.

6.3.2 Sediaan mandi dan produk kosmetika berbasis air lainnya (gel dan larutan)

6.3.2.1 Larutkan residu (lihat 6.2.2.2 dan 6.2.2.3) dengan 0,5-1 mL metanol dan saring melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 μ m.

6.3.2.2 Totolkan secara terpisah, sejumlah volume sama (1 μ L sampai 5 μ L) larutan baku dan larutan uji pada batas penotolan.

6.3.2.3 Untuk bahan pewarna larut air (kuning metanil, dan merah K10), kembangkan lempeng sampai batas eluasi, dalam masing-masing bejana kromatografi yang berisi larutan pengembang sistem B sampai sistem F.

6.3.2.4 Untuk bahan pewarna larut minyak (jingga K1), kembangkan lempeng sampai batas eluasi lebih kurang 11 cm dalam bejana kromatografi yang berisi larutan pengembang sistem A. Untuk pengujian pendahuluan, dapat digunakan larutan pengembang sistem B.

6.3.2.5 Angkat lempeng dan keringkan pada suhu ruang.

7. Identifikasi

7.1 Hitung nilai Rf untuk masing-masing bercak.

7.2 Bandingkan nilai Rf dan warna bercak pada pengamatan secara visual yang diperoleh dari larutan uji dan larutan baku.

7.3 Amati bercak Merah K10 di bawah penyinaran lampu UV, bercak berwarna terang yang menunjukkan adanya pewarna golongan ksanten.

7.4 Nilai Rf yang tertera dalam tabel dibawah ini, merupakan harga perkiraan yang mungkin diperoleh :

| Nomor CI | Nama Pewarna | Warna bercak | Perkiraan nilai Rf pada sistem larutan pengembang | | | | | |
|----------|----------------|--------------|---|-----|-----|-----|-----|------|
| | | | A | B | C | D | E | F |
| CI 12075 | Jingga K1 | Jingga | 0,4 | - | - | - | - | - |
| CI 13065 | Kuning Metanil | Kuning | - | 0,4 | 0,9 | 0,7 | 0,6 | 0,65 |
| CI 45170 | Merah K10 | Pink cerah | - | 0,8 | 0,8 | 0,7 | 0,4 | 0,88 |

7.5 Buat kesimpulan awal mengenai identitas bahan pewarna. Jika tampak bercak bahan pewarna yang dilarang dalam contoh, lakukan pengujian lebih lanjut secara KCKT seperti yang tertera pada bagian B

(Catatan: Untuk pemurnian lebih lanjut, larutan pewarna dapat digoreskan sebanyak yang dapat dilakukan, untuk membentuk pita pada batas penotolan lempeng KLT. Kembangkan lempeng dalam bejana kromatografi yang berisi larutan pengembang sistem A untuk menghilangkan minyak. Lempeng yang sama dapat dikembangkan lebih jauh dengan larutan pengembang sistem B yang akan memisahkan bahan pewarna larut air. Kerok masing-masing pita pada lempeng KLT dan masukkan secara terpisah ke dalam Beaker glass. Lakukan ekstraksi bahan pewarna dari silika gel pada masing-masing pita dengan metanol, saring dan uapkan filtrat sampai kering. Lanjutkan pengujian seperti yang tertera pada 6.3).

8. Keterangan mengenai batas deteksi

| Bahan pewarna | Batas Deteksi | | |
|----------------|--------------------------------------|--|--|
| | Baku ($\mu\text{g}/\text{bercak}$) | Produk kosmetika berwarna ($\mu\text{g}/\text{g}$) | Sediaan mandi ($\mu\text{g}/\text{g}$) |
| Jingga K1 | 0,02 | 133 - 400 | 0,4 - 4 |
| Kuning Metanil | 0,005 | 33 - 100 | 0,1 - 1 |
| Merah K10 | 0,04 | 266 - 800 | 0,8 - 8 |

B. IDENTIFIKASI SECARA KCKT

1. Ruang lingkup

Metode ini menguraikan prosedur untuk identifikasi bahan pewarna yang dilarang dalam kosmetika, yaitu:

| Nomor CI | Nama lain |
|----------|---------------------------------------|
| 12075 | Jingga K1 (<i>Pigment Orange 5</i>) |
| 13065 | Kuning Metanil |
| 45170 | Merah K10 (<i>Rhodamine B</i>) |

2. Prinsip

Bahan pewarna yang dilarang dalam kosmetika diidentifikasi secara kromatografi cair fase balik dengan deteksi cahaya tampak.

3. Baku Pembanding (BP)

3.1. Jingga K1 BP

3.2. Kuning metanil BP

3.3. Merah K10 BP

4. Pereaksi

Semua pereaksi yang digunakan harus pro analisis atau derajat kemurnian KCKT.

4.1 Air bidestilasi

4.2 Asam ortofosfat 85%

4.3 Diklorometan

4.4 Kalium hidroksida

4.5 Metanol

4.6 N,N-Dimetilformamida (DMF)

4.7 n-heksan

4.8 Larutan tetrabutylamonium hidroksida (TBA) 20%

4.9 Pelarut campur: campuran N,N-dimetilformamida-asam ortofosfat (95:5) v/v yang dibuat baru.

5. Peralatan

Peralatan laboratorium yang umum digunakan dan

5.1 KCKT dengan detektor berbagai panjang gelombang cahaya tampak dan detektor *Photo Diode Array* (PDA)

5.2 Penyaring membran PTFE, diameter 13 mm, porositas 0,45 μm , atau yang setara

5.3 Penyaring nilon, porositas 0,45 μm atau yang setara

5.4 *Vortex mixer* atau tangas ultrasonik

5.5 Tangas air

5.6 Kertas saring, *Whatman* (medium sampai cepat)

6. Prosedur

6.1 Penyiapan larutan baku

6.1.1 Larutan baku bahan pewarna larut minyak

Timbang saksama sejumlah Jingga K1 BP larutkan dalam diklorometan atau pelarut campur hingga kadar 0,1 mg/mL dan sonikasi selama setengah jam atau sampai larut.

6.1.2 Larutan baku bahan pewarna larut air

Timbang saksama sejumlah Kuning Metanil BP dan Merah K10 BP, masing-masing dilarutkan dan diencerkan dengan metanol atau N,N-dimetilformamida atau pelarut campur hingga kadar 0,2 mg/mL.

6.2 Penyiapan larutan uji

Lakukan seperti yang tertera pada 6.2 dalam bagian A (Identifikasi secara KLT).

6.3 Prosedur KCKT

6.3.1 Fase gerak

6.3.1.1 Buat campuran larutan tetrabutylamonium 0,005 M - air (75:25) v/v

6.3.1.2 Buat larutan tetrabutylamonium 0,5 M, sebagai berikut:

- Larutkan 2,8 g kalium hidroksida dalam 10 mL air.
- Masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL.
- Tambahkan 65 mL larutan tetrabutylamonium hidroksida 20%, encerkan dengan air sampai tanda.
- Atur pH hingga 7 dengan penambahan asam ortofosfat.

6.3.1.3 Buat larutan tetrabutylamonium 0,005 M sebagai berikut:

Pipet 10 mL larutan tetrabutylamonium 0,5 M ke dalam labu tentukur 1000-mL, encerkan dengan metanol sampai tanda. Larutan menjadi keruh. Biarkan mengendap selama beberapa jam dan saring melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 μ m.

6.3.2 Kondisi

Suhu oven kolom : 30°C

| | |
|------------------------------|--|
| Kolom | : kolom baja tahan karat berisi oktadesil- silana C18, ukuran partikel 5 μm , 200 x 4,6 mm atau yang setara |
| Laju alir | : 1 mL/menit |
| Detektor | : 435 nm dan 535 nm |
| Rentang spektra detektor PDA | : 275 sampai 760 nm |
| Volume injeksi | : 20 μL |
| Waktu analisis | : 35 menit |

6.3.3 Suntikkan secara terpisah larutan baku dan larutan uji ke dalam kromatograf. Amati dan catat kromatogram. Ukur luas puncak. Bandingkan waktu retensi yang diperoleh dari kromatogram larutan uji dengan larutan baku.

7. Identifikasi

7.1 Bandingkan waktu retensi dan spektrum yang diperoleh dari kromatogram larutan uji dengan larutan baku.

Waktu retensi dan spektrum yang sama antara larutan uji dengan larutan baku, menunjukkan adanya bahan pewarna dimaksud.

7.2 Panjang gelombang detektor dan waktu retensi baku bahan pewarna, sebagai berikut

| Bahan pewarna | Panjang gelombang (nm) | Perkiraan waktu retensi (menit) |
|----------------|------------------------|---------------------------------|
| Jingga K1 | 535 | 13 |
| Kuning metanil | 435 | 3 |
| Merah K10 | 535 | 6 |

Catatan :

- *Kromatogram dan waktu retensi harus memberikan faktor kemiripan lebih dari 90%.*
- *Jika diduga mengandung bahan pewarna, tambahkan baku bahan pewarna ke dalam contoh. Puncak tunggal harus diperoleh untuk puncak yang diduga dan puncak baku bahan pewarna.*
- *Gunakan detektor Spektrometri Massa untuk konfirmasi.*

8. Keterangan mengenai batas deteksi

| Bahan pewarna | Batas deteksi | | |
|----------------|---------------------------|---|-----------------------------------|
| | Baku ($\mu\text{g/mL}$) | Produk kosmetika berwarna ($\mu\text{g/g}$) | Sediaan mandi ($\mu\text{g/g}$) |
| Jingga K1 | 16 | 153 | 32 |
| Kuning Metanil | 3 | 70 | 6 |
| Merah K10 | 40 | 800 | 80 |

C. KESIMPULAN

Hasil dari pengujian KLT dan KCKT dapat digunakan untuk menyimpulkan adanya bahan pewarna yang dilarang dalam kosmetika.

D. ACUAN

ASEAN Cosmetic Method (ACM) SIN 02

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN
MAKANAN REPUBLIK INDONESIA,

KUSTANTINAH

Lampiran 6
Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat
dan Makanan Republik Indonesia
Nomor HK.03.1.23.08.11.07331 Tahun 2011

METODE ANALISIS

IDENTIFIKASI DAN PENETAPAN KADAR HIDROKINON DALAM KOSMETIKA SECARA KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) DAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

A. IDENTIFIKASI SECARA KLT

1. Ruang lingkup

Metode ini menguraikan prosedur untuk identifikasi dan penetapan kadar hidrokinon dalam kosmetika.

2. Prinsip

Hidrokinon diidentifikasi secara KLT.

3. Baku Pembanding (BP)

Hidrokinon BP

4. Pereaksi

Semua pereaksi yang digunakan harus pro analisis.

4.1. Amonia 25%

4.2. Asam asetat glasial

4.3. Asam fosfomolibdat

4.4. Aseton

4.5. Etanol mutlak

4.6. Etanol 96% v/v

4.7. n-heksan

4.8. Perak nitrat

4.9. Toluena

4.10. Larutan pengembang

4.10.1. Sistem A: n-heksan - aseton (3:2)

4.10.2. Sistem B: toluena - asam asetat glasial (8:2)

4.11. Larutan penampak bercak:

4.11.1. Ke dalam larutan perak nitrat 5% dalam air, tambahkan amonia 25% hingga endapan yang terbentuk larut.

(Peringatan: jika disimpan, larutan tidak stabil dan bersifat eksplosif oleh karena itu harus segera dibuang setelah digunakan)

4.11.2. Larutan asam fosfomolibdat 5% dalam etanol mutlak.

5. Peralatan

Peralatan laboratorium yang umum digunakan dan

5.1. Lampu UV 254 nm

- 5.2. Lempeng KLT silika gel GF₂₅₄ siap pakai, ukuran 20 cm x 20 cm, tebal 0,25 mm.
- 5.3. Tangas ultrasonik

6. Prosedur

6.1. Penyiapan larutan baku (larutan dibuat baru)

Timbang saksama lebih kurang 0,02 g Hidrokinon BP, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, tambahkan dengan 5 mL etanol 96% v/v, lalu kocok sampai larut, kemudian encerkan dengan etanol 96% v/v sampai tanda.

(*Catatan: Larutan ini stabil kurang dari 1 hari pada suhu ruang*).

6.2. Penyiapan larutan uji

Timbang saksama lebih kurang 1,5 g contoh di dalam *Beaker glass* 25 mL. Tambahkan 15 mL etanol 96% v/v sedikit demi sedikit, kemudian campur. Tuang ke dalam labu tentukur 25-mL. Homogenkan dalam tangas ultrasonik selama 10 menit, dan dinginkan labu hingga suhu ruang. Tambahkan etanol 96% v/v sampai tanda, lalu campur. Letakkan dalam tangas es hingga terjadi pemisahan lemak selama lebih kurang 10 menit. Saring melalui kertas saring.

6.3. Penyiapan larutan uji yang ditambahkan baku pembanding (*spiked sample*)

Campur 1 mL larutan baku dengan 1 mL larutan uji, kemudian kocok.

6.4. Prosedur KLT

6.4.1. Aktifkan lempeng pada suhu 100°C selama 10 menit.

6.4.2. Jenuhkan bejana kromatografi dengan masing-masing larutan pengembang.

6.4.3. Totolkan secara terpisah, sejumlah volume sama (20 µL) larutan baku, larutan uji dan *spiked sample* pada lempeng. Penotolan dapat dilakukan dua kali.

6.4.4. Kembangkan lempeng dalam bejana kromatografi di ruang gelap pada suhu ruang hingga jarak rambat mencapai lebih kurang 15 cm dari titik penotolan.

6.4.5. Pindahkan lempeng, dan keringkan pada suhu ruang.

6.4.6. Deteksi

6.4.6.1. Amati lempeng di bawah penyinaran lampu UV 254 nm, dan tandai posisi bercak.

6.4.6.2. Semprot lempeng dengan:

- pereaksi perak nitrat, atau
- pereaksi asam fosfomolibdat, dan panaskan lempeng pada suhu lebih kurang 100°C selama 10 menit.

7. Identifikasi

- 7.1. Hitung nilai Rf untuk masing-masing bercak.
- 7.2. Bandingkan nilai Rf bercak yang diperoleh dari larutan uji dengan larutan baku, dan warna bercak dibawah penyinaran lampu UV serta warna bercak setelah penyemprotan dengan larutan penampak bercak.
- 7.3. Lakukan pengujian lebih lanjut secara KCKT.

8. Keterangan

Di bawah kondisi seperti di atas, perkiraan nilai Rf adalah sebagai berikut

Sistem A: Rf lebih kurang 0,5

Sistem B: Rf lebih kurang 0,2 - 0,3

B. IDENTIFIKASI DAN PENETAPAN KADAR SECARA KCKT

1. Ruang lingkup

Metode ini menjelaskan prosedur untuk identifikasi dan penetapan kadar hidrokinon dalam kosmetika.

2. Prinsip

Hidrokinon diidentifikasi secara KCKT fase balik dengan deteksi sinar UV.

3. Baku Pembanding (BP)

Hidrokinon BP

4. Pereaksi

Semua pereaksi yang digunakan harus pro analisis dan sesuai untuk KCKT

4.1. Air bidestilasi

4.2. Metanol

4.3. Fase gerak: metanol - air (55:45) v/v.

5. Peralatan

Peralatan laboratorium yang umum digunakan, dan:

- 5.1. Tangas air, suhu 60°C
- 5.2. KCKT dengan detektor ultra violet
- 5.3. Kolom analitik: kolom baja tahan karat, 250 x 4,6 mm, berisi oktadesilsilana dengan ukuran partikel 5 µm atau yang setara.
- 5.4. Kertas saring *Whatman no. 1*, diameter 90 mm atau yang setara
- 5.5. *Vortex mixer*
- 5.6. Penyaring membran *HVLP*, porositas 0,45 µm atau yang setara
- 5.7. Sentrifus

6. Prosedur

- 6.1. Penyiapan larutan baku (larutan harus dibuat baru)

Timbang saksama lebih kurang 0,01 g Hidrokinon BP, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dalam 5 mL fase gerak dan encerkan dengan fase gerak sampai tanda. Pipet 1 mL larutan ke dalam labu tentukur 10-mL. Encerkan dengan fase gerak sampai tanda.

(*Catatan: Pengenceran disesuaikan dengan konsentrasi. Dapat digunakan gelas amber*).

- 6.2. Penyiapan larutan uji

Timbang saksama lebih kurang 1 g contoh di dalam *Beaker glass* 25 mL, tambahkan sedikit demi sedikit 25 mL fase gerak, dan campur hingga homogen. Tuang ke dalam labu tentukur 50-mL. Kocok menggunakan *Vortex mixer* selama 1 menit. Masukkan labu ke dalam tangas air pada suhu 60°C selama 15 menit, kemudian dinginkan labu pada suhu ruang. Encerkan dengan fase gerak sampai tanda. Saring larutan menggunakan penyaring membran dengan porositas 0,45 µm (Sebelum penyaringan, jika perlu, sentrifus lebih dahulu selama 10 menit). Gunakan filtrat sebagai larutan uji dalam waktu kurang dari 24 jam.

- 6.3. Prosedur KCKT

- 6.3.1. Kondisi:

Laju alir : 1,0 mL / menit

Detektor : UV 295 nm

Volume injeksi : 20 µL

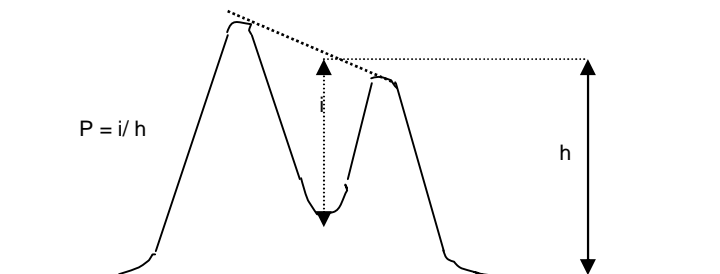
- 6.3.2. Kesesuaian sistem

6.3.2.1. Suntikkan larutan baku dan rekam kromatogram. Injeksikan 6 kali untuk memastikan luas puncak konstan.

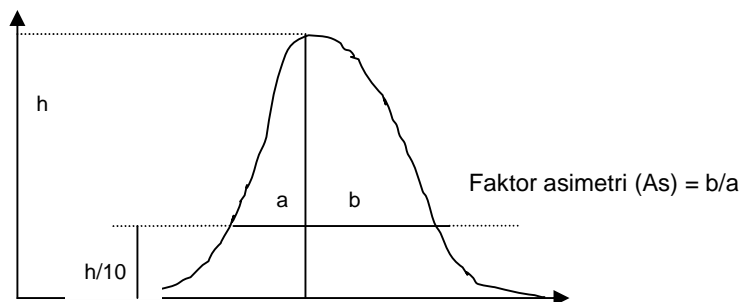
Simpangan Baku Relatif (SBR) pada penyuntikan ulang kurang dari 1% untuk waktu retensi dan kurang dari 2% untuk luas puncak.

6.3.2.2. Pastikan hasil kromatogram larutan baku dan larutan uji sesuai persyaratan berikut ini:

- **Daya pisah puncak (resolusi)** antara dua puncak yang pemisahannya buruk, tidak kurang dari 0,90 dihitung dari rumus $P = i / h$, seperti di gambarkan berikut ini:



- **Faktor asimetri (As)** antara 0,9-1,5.



- **Garis dasar (baseline)** harus stabil

6.3.3. Suntikkan secara terpisah larutan baku dan larutan uji ke dalam kromatograf. Amati dan rekam kromatogram serta luas puncak.

6.3.4. Bandingkan waktu retensi yang diperoleh dari kromatogram larutan uji dengan larutan baku. Gunakan untuk identifikasi adanya hidrokinon.

7. Perhitungan penetapan kadar

Gunakan luas puncak hidrokinon pada kromatogram untuk menghitung kadar hidrokinon dalam contoh. Hitung kadar hidrokinon % (b/b) dalam contoh, dengan rumus:

$$\frac{Au}{Ab} \times \frac{Bb}{Bu} \times \frac{Fu}{Fb} \times Kb \times 100$$

dimana:

Au = Luas puncak hidrokinon larutan uji

Ab = Luas puncak hidrokinon larutan baku

Bb = Bobot baku

Bu = Bobot contoh

Fu = Faktor pengenceran larutan uji

Fb = Faktor pengenceran larutan baku

Kb = Kemurnian baku

100 = Faktor konversi untuk persentase

8. Keterangan

7.1. Keberulangan (*Repeatability*)

Untuk kandungan hidrokinon 2,0%, perbedaan antara 2 hasil penetapan secara paralel menggunakan contoh yang sama sebaiknya tidak melebihi 2% dari harga mutlak.

7.2. Reprodusibilitas

Untuk kandungan hidrokinon 2,0%, perbedaan antara 2 hasil penetapan menggunakan contoh yang sama dengan kondisi yang berbeda (laboratorium, operator, alat dan/atau waktu), sebaiknya tidak melebihi 2% dari harga mutlak.

7.3. Catatan

7.3.1. Jika kandungan hidrokinon yang ditemukan lebih besar dari 2% dan diperlukan perkiraan kadar hidrokinon secara akurat, maka larutan uji harus diencerkan sampai diperoleh konsentrasi sama seperti larutan uji yang mengandung hidrokinon 2% dan ulangi penetapan. Larutan uji dan larutan baku harus mempunyai konsentrasi yang mirip. Perbedaan luas puncak larutan uji dan larutan baku tidak lebih dari 10%.

7.3.2. Untuk konfirmasi kemurnian puncak dapat digunakan detektor *Photo Diode Array (PDA)*

C. KESIMPULAN

Hasil dari pengujian KLT dan KCKT dapat digunakan untuk menyimpulkan adanya hidrokinon dalam kosmetika.

D. ACUAN

ASEAN Cosmetic Method (ACM) INO 03

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA,

KUSTANTINAH

Lampiran 7

Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat
dan Makanan Republik Indonesia

Nomor HK.03.1.23.08.11.07331 Tahun 2011

METODE ANALISIS

IDENTIFIKASI SENYAWA KORTIKOSTEROID DALAM KOSMETIKA SECARA KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) DAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

A. IDENTIFIKASI SECARA KLT

1. Ruang lingkup

Metode ini menguraikan prosedur untuk identifikasi senyawa kortikosteroid: hidrokortison asetat, deksametason, betametason, betametason 17-valerat dan triamsinolon asetonida dalam kosmetika.

2. Prinsip

Senyawa kortikosteroid dalam contoh diekstraksi dan diidentifikasi secara KLT.

3. Baku Pembanding (BP)

- 3.1. Hidrokortison asetat BP
- 3.2. Deksametason BP
- 3.3. Betametason BP
- 3.4. Betametason 17-valerat BP
- 3.5. Triamsinolon asetonida BP

4. Pereaksi

Seluruh pereaksi yang digunakan harus pro analisis

- 4.1. Air destilasi
- 4.2. Anisaldehyda
- 4.3. Asam asetat glasial
- 4.4. Asam sulfat pekat
- 4.5. Biru tetrazolium
- 4.6. Diklorometan
- 4.7. Etil asetat
- 4.8. Metil asetat
- 4.9. Metanol
- 4.10. Natrium hidroksida
- 4.11. Larutan asam klorida 0,5 M
- 4.12. Larutan amonium hidroksida 0,5 M
- 4.13. Larutan pengembang: buat campuran diklorometan-metil asetat-air (100:50:50) v/v/v, gunakan lapisan bawah dari campuran.
- 4.14. Larutan penampak bercak
 - 4.14.1. Masukkan 50 mL asam asetat glasial ke dalam labu Erlenmeyer bertutup 100 mL, tambahkan 0,5 mL anisaldehyda, dan 11 mL asam sulfat pekat. Kocok perlahan.
 - 4.14.2. Penampak bercak lainnya
Larutan biru tetrazolium basa: buat campuran larutan biru tetrazolium 0,2% dalam metanol dan larutan natrium hidroksida 12% dalam metanol (1:3) yang dibuat baru.

5. Peralatan

Peralatan laboratorium yang umum digunakan dan

- 5.1. Bejana kromatografi
- 5.2. Lampu UV 254 nm
- 5.3. Tabung sentrifus bertutup 30 mL
- 5.4. Lempeng KLT silika gel 60F₂₅₄ siap pakai, tebal 0,25 mm
- 5.5. Oven

- 5.6. Penyaring membran PVDF(*Polyvinylidene difluoride*), porositas 0,45 μm atau yang setara
- 5.7. pH meter
- 5.8. Tangas air
- 5.9. Tangas ultrasonik

6. Prosedur

6.1 Penyiapan larutan baku

6.1.1 Larutan baku

Timbang saksama lebih kurang 10 mg masing-masing baku pembanding, masukkan ke dalam masing-masing labu tentukur 10-mL. Tambahkan 5 mL metanol dan sonikasi selama 5 menit. Encerkan dengan metanol sampai tanda.

6.1.2 Larutan baku campuran

Timbang saksama lebih kurang 10 mg setiap baku pembanding, masukkan ke dalam sebuah labu tentukur 10-mL. Tambahkan 5 mL metanol dan sonikasi selama 5 menit. Encerkan dengan metanol sampai tanda.

6.2 Penyiapan larutan uji

6.2.1 Produk cair

Pipet 15 mL contoh dan atur pH hingga 7 dengan larutan asam klorida 0,5 M atau larutan amonium hidroksida 0,5 M. Lakukan ekstraksi 2 kali, setiap kali dengan 20 mL etil asetat. Buang lapisan air. Kumpulkan ekstrak (jika perlu disaring) dalam cawan penguap. Uapkan sampai kering di atas tangas air. Larutkan residu dalam 5 mL metanol dan saring melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 μm .

6.2.2 Produk krim

Timbang saksama lebih kurang 5 g contoh, masukkan ke dalam tabung sentrifus dan larutkan dengan 20 mL metanol. Panaskan di atas tangas air selama 10 menit dan kocok kuat selama 5 menit menggunakan pengocok. Sentrifus pada kecepatan 3000-4000 rpm selama 10 menit dan masukkan dalam lemari pembeku selama 10 menit. Pindahkan dan uapkan beningan hingga kering di atas tangas air. Larutkan residu dalam 5 mL metanol dan saring melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 μm .

6.3 Prosedur KLT

- 6.3.1 Jenuhkan bejana kromatografi dengan larutan pengembang.
- 6.3.2 Totolkan secara terpisah, sejumlah volume sama (lebih kurang 20 μ L) larutan baku dari masing-masing baku pembanding, larutan baku campuran dan larutan uji pada lempeng,
- 6.3.3 Kembangkan lempeng hingga jarak rambat larutan pengembang mencapai 15 cm dari batas penotolan.
- 6.3.4 Angkat lempeng dan keringkan pada suhu ruang.
- 6.3.5 Amati bercak di bawah penyinaran lampu UV 254 nm dan tandai posisi bercak.
- 6.3.6 Semprot lempeng dengan larutan penampak bercak anisaldehyd dan biarkan lempeng sampai kering.
- 6.3.7 Masukkan lempeng ke dalam oven pada suhu 120°C selama 10 menit dan amati bercak.

7. Identifikasi

7.1 Hitung nilai Rf untuk masing-masing bercak.

7.2 Bandingkan nilai Rf bercak yang diperoleh dari larutan uji dengan larutan baku, dan warna bercak dibawah penyinaran lampu UV serta warna bercak setelah penyemprotan dengan larutan penampak bercak.

| Senyawa kortikosteroid | Warna bercak | | Perkiraan nilai Rf |
|------------------------|-----------------------------|----------------------------------|--------------------|
| | Penampak bercak anisaldehyd | Penampak bercak biru tetrazolium | |
| Hidrokortison asetat | Coklat tua | Biru keunguan | 0,4 |
| Deksametason | Abu-abu | Biru keunguan | 0,2 |
| Betametason | Biru keabu-abuan | Biru keunguan | 0,2 |
| Triamsinolon asetonida | Hijau kekuningan | Biru keunguan | 0,3 |
| Betametason 17-valerat | Ungu tua | Biru keunguan | 0,35 |

8. Keterangan

8.1. Metode ini dapat juga digunakan untuk identifikasi senyawa kortikosteroid berikut; kortison asetat, prednisolon, prednison, flusinolon asetonida, betametason 21-valerat dan hidrokortison.

8.2. Jika terdapat senyawa kortikosteroid dalam contoh, lakukan pengujian lebih lanjut secara KCKT.

B. IDENTIFIKASI SECARA KCKT

1. Ruang Lingkup

Metode ini menjelaskan prosedur lebih lanjut untuk identifikasi senyawa kortikosteroid: hidrokortison asetat, deksametason, betametason, betametason 17-valerat dan triamsinolon asetonida dalam kosmetika.

2. Prinsip

Senyawa kortikosteroid dalam contoh diekstraksi dan diidentifikasi secara KCKT fase balik dengan deteksi ultra violet.

3. Baku Pembanding (BP)

- 3.1 Hidrokortison asetat BP
- 3.2 Deksametason BP
- 3.3 Betametason BP
- 3.4 Betametason 17-valerat BP
- 3.5 Triamsinolon asetonida BP

4. Pereaksi

Seluruh pereaksi yang digunakan harus pro analisis dan sesuai untuk KCKT

- 4.1 Air bidestilasi
- 4.2 Asetonitril
- 4.3 Etil asetat
- 4.4 Larutan amonium hidroksida 0,5 M
- 4.5 Larutan asam klorida 0,5 M
- 4.6 Metanol
- 4.7 Fase gerak: campuran asetonitril dengan air secara eluasi gradien.

Kondisi gradien:

| Waktu (menit) | Perbandingan (%) | |
|------------------|------------------|-----|
| | Asetonitril | Air |
| 0,01 - 15,00 | 30 | 70 |
| 15,01 - 21,00 | 60 | 40 |

| | | |
|---------------|------|----|
| 21,01 - 30,00 | 50 | 50 |
| 30,01 - 35,00 | 30 | 70 |
| 35,00 | STOP | |

5. Peralatan

Peralatan laboratorium yang umum digunakan dan

5.1 Tangas air, suhu 60°C

5.2 KCKT dengan detektor ultra violet

5.3 Kolom analitik: kolom baja tahan karat 250 x 4,6 mm, berisi oktadesilsilana dengan ukuran partikel 5 µm, atau yang setara

5.4 pH meter

5.5 Penyaring membran dengan porositas 0,45 µm

5.6 Tangas ultrasonik

6. Prosedur

6.1. Penyiapan larutan baku

6.1.1 Larutan baku

Timbang saksama lebih kurang 10 mg masing-masing baku pembanding, masukkan ke dalam masing-masing labu tentukur 10-mL. Tambahkan 5 mL metanol dan sonikasi selama 5 menit. Encerkan dengan metanol sampai tanda. Saring melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 µm.

6.1.2 Larutan baku campuran

Timbang saksama lebih kurang 10 mg setiap baku pembanding, masukkan ke dalam sebuah labu ukur 10-mL. Tambahkan 5 mL metanol dan sonikasi selama 5 menit. Encerkan dengan metanol sampai tanda. Saring melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 µm.

6.2. Penyiapan larutan uji

6.2.1 Produk cair

Pipet 15 mL contoh dan atur pH hingga 7 dengan larutan asam klorida 0,5 M atau larutan amonium hidroksida 0,5 M. Lakukan ekstraksi 2 kali, setiap kali dengan 20 mL etil asetat. Buang lapisan air. Kumpulkan ekstrak (jika perlu disaring) dalam cawan penguap. Uapkan sampai kering di atas tangas air. Larutkan residu dalam 5 mL metanol dan saring melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 µm..

6.2.2 Produk krim

Timbang saksama lebih kurang 5 g contoh, masukkan ke dalam labu sentrifus dan larutkan dengan 20 mL metanol. Panaskan di atas tangas air selama 10 menit dan kocok kuat selama 5 menit. Sentrifus pada kecepatan 3000-4000 rpm selama 10 menit dan masukkan dalam lemari pembeku selama 10 menit. Pindahkan dan uapkan beningan hingga kering di atas tangas air. Larutkan residu dalam 5 mL metanol dan saring melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 μm .

6.3. Prosedur KCKT

6.3.1 Kondisi :

Laju alir : 1,2 mL/menit
 Detektor UV : 245 nm
 Volume injeksi : 20 μL

6.3.2 Kesesuaian sistem

Suntikkan larutan baku dan rekam kromatogram. Injeksikan 6 kali untuk memastikan luas puncak konstan.

Simpangan baku relatif (SBR) pada penyuntikan ulang kurang dari 1% untuk waktu retensi dan kurang dari 2% untuk luas puncak.

6.3.3 Suntikkan secara terpisah, sejumlah volume sama larutan baku dari masing-masing baku pembanding, larutan baku campuran dan larutan uji pada kromatograf.

6.3.4 Bandingkan waktu retensi dari kromatogram yang diperoleh dari larutan uji dan larutan baku.

7. Identifikasi

7.1 Perbedaan waktu retensi larutan baku pembanding dan larutan uji tidak lebih dari 1%.

7.2 Perkiraan waktu retensi (t_R) untuk senyawa kortikosteroid adalah sebagai berikut :

| Senyawa kortikosteroid | Perkiraan waktu retensi (menit) |
|------------------------|---------------------------------|
| Betametason | 15 |
| Deksametason | 16 |
| Triamsinolon asetonida | 19 |
| Hidrokortison asetat | 20 |

| | |
|------------------------|----|
| Betametason 17-valerat | 22 |
|------------------------|----|

8. Batas deteksi dan batas kuantitasi

| Senyawa Kortikosteroid | Batas deteksi | | | Batas kuantitasi | | |
|------------------------|---------------|---------------------------|--------------------------|------------------|---------------------------|--------------------------|
| | Baku (mg/mL) | Produk | | Baku (mg/mL) | Produk | |
| | | Cair ($\mu\text{g/mL}$) | Krim ($\mu\text{g/g}$) | | Cair ($\mu\text{g/mL}$) | Krim ($\mu\text{g/g}$) |
| Hidrokortison asetat | 0,02 | 7 | 20 | 0,07 | 23 | 70 |
| Triamsinolon asetonida | 0,04 | 14 | 40 | 0,13 | 46 | 130 |
| Betametason | 0,05 | 17 | 50 | 0,15 | 58 | 150 |
| Deksametason | 0,05 | 17 | 50 | 0,16 | 62 | 160 |
| Betametason 17-valerat | - | - | - | - | - | - |

9. Keterangan

Metode ini dapat juga digunakan untuk identifikasi senyawa kortikosteroid berikut; kortison asetat, prednisolon, prednison, flusinolon asetonida, betametason 21-valerat dan hidrokortison.

C. KESIMPULAN

Hasil dari pengujian KLT dan KCKT dapat digunakan untuk menyimpulkan adanya Hidrokortison asetat, Deksametason, Betametason, Betametason 17-valerat Dan Triamsinolon asetonida dalam kosmetika.

D. ACUAN

ASEAN Cosmetic Method (ACM) MAL 07

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA,

KUSTANTINAH

Lampiran 8
Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat
dan Makanan Republik Indonesia
Nomor HK.03.1.23.08.11.07331 Tahun 2011

METODE ANALISIS
IDENTIFIKASI DAN PENETAPAN KADAR PENGAWET DALAM KOSMETIKA
SECARA KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) DAN
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

A. IDENTIFIKASI SECARA KLT

1. Ruang lingkup

Metode ini menjelaskan prosedur untuk identifikasi pengawet: 2-fenoksietanol, metil 4-hidroksibenzoat, etil 4-hidroksibenzoat, propil 4-hidroksibenzoat dan butil 4-hidroksibenzoat dalam kosmetika.

2. Prinsip

Pengawet dalam contoh diekstraksi dan diidentifikasi secara KLT.

3. Baku Pembanding (BP)

- 3.1. 2-fenoksietanol BP
- 3.2. Metil 4-hidroksibenzoat (metilparaben) BP
- 3.3. Etil 4-hidroksibenzoat (etilparaben) BP
- 3.4. n-propil 4-hidroksibenzoat (propilparaben) BP

3.5. n-butil 4-hidroksibenzoat (butilparaben) BP

4. **Pereaksi**

Semua pereaksi yang digunakan harus pro analisis

- 6.1. Air destilasi
- 6.2. Asam asetat glasial
- 6.3. Aseton
- 6.4. Dietil eter
- 6.5. Etanol
- 6.6. n-pentan
- 6.7. Kalsium klorida dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 6.8. Larutan Asam klorida 4 M
- 6.9. Larutan Kalium hidroksida 4 M
- 6.10. Larutan pengembang: campuran n-pentan-asam asetat glasial (88:12) v/v
- 6.11. Larutan penampak bercak: pereaksi Millon (raksa (II) nitrat), yang telah tersedia di pasaran.

5. **Peralatan**

Peralatan laboratorium yang umum digunakan dan

- 5.1. Bejana kromatografi (tidak dilapisi dengan kertas saring)
- 5.2. Pengalir udara panas (hot-air hair dryer)
- 5.3. Lampu UV 254 nm
- 5.4. Lempeng KLT silika gel 60 F254 siap pakai, ukuran 20 cm x 20 cm, tebal 0,25 mm (jika perlu gunakan lempeng dengan concentrating zone).
- 5.5. Oven suhu 105°C
- 5.6. Tabung gelas bertutup ulir 50 mL atau yang setara.
- 5.7. Tangas air suhu 60°C
- 5.8. Vortex mixer
- 5.9. *Wollen paint roller*, panjang lebih kurang 10 cm, diameter luar lebih kurang 3,5 cm. Tebal lapisan wool 2 hingga 3 mm. Jika perlu pangkas/ratakan woolnya. Lihat catatan pada 6.3.

6. **Prosedur**

- 6.1. Penyiapan larutan baku
Buat larutan pengawet 0,1% dalam etanol untuk setiap baku pembanding, kecuali untuk 2-fenoksietanol konsentrasi larutannya 1%.
- 6.2. Penyiapan larutan uji:

Timbang saksama lebih kurang 1 g contoh, masukkan ke dalam labu Erlenmeyer 125 mL. Tambahkan 4 tetes larutan asam klorida 4 M, tambahkan 40 mL aseton dan campur (*lihat catatan di bawah*). Panaskan campuran pada suhu 60°C selama lebih kurang 10 menit. Dinginkan dan kocok selama 1 menit dengan *vortex mixer*. Atur pH larutan hingga tidak lebih dari 3 dengan penambahan larutan asam klorida 4 M (gunakan kertas indikator pH). Kocok menggunakan *vortex mixer* selama 1 menit. Saring larutan melalui kertas saring ke dalam labu Erlenmeyer 125 mL. Pipet 20 mL filtrat ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 60 mL air, dan campur. Atur pH larutan hingga lebih kurang 10 dengan penambahan larutan kalium hidroksida 4 M (gunakan kertas indikator pH). Tambahkan 1 g kalsium klorida dihidrat, dan kocok. Saring larutan ke dalam corong pisah 250 mL yang berisi 75 mL dietil eter, dan kocok selama 5 menit. Biarkan hingga terjadi pemisahan fase. Buang lapisan atas (fase dietil eter). Kumpulkan lapisan air ke dalam corong pisah 100 mL. Atur pH larutan hingga lebih kurang 2 dengan penambahan larutan asam klorida 4 M. Tambahkan dietil eter 10 mL, dan kocok selama 5 menit. Biarkan hingga terjadi pemisahan. Buang lapisan air. Pindahkan 2 mL lapisan dietil eter ke dalam vial contoh 5 mL.

(Catatan: Untuk produk kosmetika yang bersifat basa kuat, misalnya sabun mandi, tambahkan 20 tetes larutan asam klorida. Tutup labu Erlenmeyer, panaskan campuran dengan hati-hati pada suhu lebih kurang 60°C untuk memudahkan ekstraksi bahan pengawet ke dalam fase aseton dan kocok kuat selama 1 menit).

6.3. Prosedur KLT

- 6.3.1. Aktifkan lempeng pada 100°C selama 10 menit. Totolkan 10 µL dari tiap larutan baku dan 100 µL larutan uji pada batas penotolan dari lempeng. Jika perlu, dapat digunakan aliran udara untuk memudahkan penguapan pelarut.
- 6.3.2. Pindahkan sejumlah volume larutan pengembang ke dalam bejana kromatografi yang sesuai.
- 6.3.3. Tempatkan segera lempeng dalam bejana KLT tak jenuh dan kembangkan pada suhu kamar hingga larutan pengembang naik sekitar 15 cm dari batas penotolan.

- 6.3.4. Pindahkan lempeng dari bejana pengembang dan keringkan dengan udara panas menggunakan pengalir udara panas.
- 6.3.5. Amati lempeng di bawah penyinaran lampu UV dan tandai posisi bercak.
- 6.3.6. Panaskan lempeng dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit untuk menghilangkan kelebihan asam asetat.
- 6.3.7. Amati bercak pengawet pada lempeng KLT menggunakan pereaksi Millon, dengan mencelupkan *paint roller* ke dalam pereaksi Millon kemudian dioleskan ke permukaan lempeng KLT
(*Catatan: Sebagai alternatif, bercak dapat diamati dengan meneteskan satu tetes pereaksi Millon pada setiap bercak*). Ester dari asam 4-hidroksibenzoat tampak sebagai bercak warna merah dan 2-fenoksietanol sebagai bercak warna kuning.

(*Catatan: asam 4- hidroksibenzoat itu sendiri kemungkinan ada dalam contoh sebagai pengawet atau hasil dekomposisi dari paraben, juga akan tampak sebagai bercak warna merah. Lihat 8.3 dan 8.4*).

7. Identifikasi

- 7.1. Hitung nilai Rf setiap bercak.
- 7.2. Bandingkan nilai Rf bercak yang dihasilkan larutan uji dengan larutan baku dan warna bercak di bawah penyinaran lampu UV atau sesudah pengamatan secara visual.
- 7.3. Buat kesimpulan awal tentang identitas pengawet. Jika kemungkinan terdapat turunan paraben dalam contoh, lakukan pengujian lebih lanjut dengan KCKT.

8. Keterangan

- 8.1. Penyemprotan dengan pereaksi Millon tidak dianjurkan karena sangat toksik.
- 8.2. Senyawa lain yang mengandung gugus hidroksil dapat juga memberikan warna dengan pereaksi Millon.
- 8.3. Tabel warna dan harga Rf yang dihasilkan dari beberapa pengawet yang menggunakan prosedur KLT dapat dilihat dalam: N. de Kruijf, M.A.H. Rijk, L.A. Pranato-Soetardhi dan A.

Schouten (1987): Determination of preservatives in cosmetic products I: Thin-layer chromatographic procedure for the identification of preservatives in cosmetic products (J. Chromatography 410, 395-411).

- 8.4. Perkiraan nilai Rf yang tercantum dalam tabel dibawah ini digunakan sebagai indikasi nilai yang mungkin diperoleh :

| Senyawa | Rf | Warna |
|-----------------|------|------------------|
| Metilparaben | 0,12 | <i>Pink</i> ++++ |
| Etilparaben | 0,17 | <i>Pink</i> +++ |
| Propilparaben | 0,21 | <i>Pink</i> ++ |
| Butilparaben | 0,26 | <i>Pink</i> muda |
| 2-fenoksietanol | 0,29 | Kuning lemon |

- 8.5. Jika pemisahan antara asam 4-hidroksibenzoat dan metil paraben atau benzil paraben dan etil paraben tidak berhasil, maka lakukan konfirmasi melalui pengujian secara KCKT dan bandingkan waktu retensi yang dihasilkan larutan uji dan larutan baku.

B. IDENTIFIKASI DAN PENETAPAN KADAR SECARA KCKT

1. Ruang lingkup

Metode ini menjelaskan prosedur untuk identifikasi dan penetapan kadar pengawet: 2-fenoksietanol, metil 4-hidroksibenzoat, etil 4-hidroksibenzoat, propil 4-hidroksibenzoat dan butil 4-hidroksibenzoat dalam kosmetika.

2. Prinsip

Pengawet dalam contoh diekstraksi dan diidentifikasi serta ditetapkan kadarnya secara KCKT fase balik menggunakan isopropil 4-hidroksibenzoat atau benzofenon sebagai baku internal.

3. Baku Pembanding (BP)

- 3.1 2-fenoksietanol BP
- 3.2 Metil 4-hidroksibenzoat (metilparaben) BP
- 3.3 Etil 4-hidroksibenzoat (etilparaben) BP
- 3.4 n-propil 4-hidroksibenzoat (propilparaben) BP
- 3.5 n-butil 4-hidroksibenzoat (butilparaben) BP
- 3.6 Isopropil 4-hidroksibenzoat (isopropilparaben) BP

3.7 Benzofenon BP

4. Perekasi

Semua pereaksi yang digunakan harus pro analisis dan sesuai untuk KCKT.

4.1. Air bidestilasi

4.2. Asetonitril

4.3. Etanol absolut

4.4. Larutan asam sulfat 2 M

4.5. Metanol

4.6. Tetrahidrofuran

4.7. Campuran etanol-air (9:1) v/v

4.8. Fase gerak: campuran tetrahidrofuran-air-metanol-asetonitril (5:60:10:25) v/v/v/v

5. Peralatan

Peralatan laboratorium yang umum digunakan, dan:

5.1. Tangas air, suhu pada 60°C

5.2. KCKT dengan detektor UV 280 nm

5.3. Kolom analitik: kolom baja tahan karat berisi oktadesilsilana C18, ukuran partikel: 5 µm, 250 x 4,6 mm atau yang setara

5.4. Labu kaca 100-mL bertutup atau yang setara

5.5. Penyaring membran PVDF (*Polyvinylidene difluoride*) atau HVLP, porositas 0,45 µm, atau yang setara.

6. Prosedur

6.1. Penyiapan larutan baku

6.2.1. Larutan baku internal

Timbang saksama lebih kurang 0,125 g isopropilparaben atau benzofenon, masukkan ke dalam labu tentukur 250-mL, larutkan dan encerkan dengan campuran etanol-air (9:1) v/v sampai tanda.

6.2.2. Larutan baku persediaan

Timbang saksama masing-masing 0,05 g metil, etil, propil, butil 4-hidroksibenzoat dan 0,2 g 2-fenoksietanol dan masukkan ke dalam sebuah labu tentukur 100-mL. Larutkan dalam 50 mL campuran etanol-air (9:1) v/v dan encerkan sampai tanda.

(Catatan: Simpan dalam lemari pendingin, semua larutan tersebut stabil selama 1 minggu.)

6.2.3. Larutan baku (larutan dibuat baru)

- 6.1.3.1 Pipet 20 mL, 10 mL, 5 mL, 2 mL dan 1 mL larutan baku persediaan, masukkan masing-masing ke dalam labu tentukur 50-mL.
- 6.1.3.2 Tambahkan 10,0 mL larutan baku internal ke dalam masing-masing labu.
- 6.1.3.3 Tambahkan 1,0 mL larutan asam sulfat 2 M dan kocok sampai homogen.
- 6.1.3.4 Tambahkan campuran etanol-air (9:1) v/v sampai tanda.
- 6.1.3.5 Saring melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 μm ke dalam vial.

6.2. Penyiapan larutan uji

- 6.2.1. Timbang saksama 1 g contoh ke dalam labu Erlenmeyer bertutup 125 mL.
- 6.2.2. Tambahkan 1,0 mL asam sulfat 2 M; 40,0 mL campuran etanol-air (9:1) v/v, batu didih dan 10,0 mL larutan baku internal yang mengandung isopropil hidrosibenzoat 0,05% atau benzofenon 0,05%. Kocok kuat selama 1 menit sampai homogen.
- 6.2.3. Panaskan di atas tangas air pada suhu lebih kurang 60°C selama 5 menit.
- 6.2.4. Dinginkan labu Erlenmeyer dengan air dingin mengalir dan simpan dalam lemari pendingin selama 1 jam. Jika perlu di sentrifus.
- 6.2.5. Saring larutan melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 μm ke dalam labu Erlenmeyer bertutup 125 mL .
- 6.2.6. Pindahkan lebih kurang 2 mL filtrat ke dalam vial contoh 5 mL.
- 6.2.7. Lakukan penetapan kadar terhadap larutan uji secara KCKT dalam waktu kurang dari 24 jam.

6.3. Prosedur KCKT

6.3.1. Kondisi :

- | | |
|----------------|--------------------|
| Suhu kolom | : 25° C |
| Laju alir | : 1,5 mL/menit |
| Detektor UV | : 280 nm |
| Volume injeksi | : 20 μL |

6.3.2. Kesesuaian sistem

6.3.2.1. Suntikkan 6 kali sejumlah volume sama larutan baku internal dan/atau larutan baku. Simpangan baku relatif (SBR) pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2%.

6.3.2.2. Penetapan faktor asimetrik (As) antara 0,9 hingga 1,5 (lihat pada 6.3.4.3) dan daya pisah puncak (resolusi) tidak kurang dari 0,9.

6.3.3. Pembuatan kurva kalibrasi

6.3.3.1. Suntikkan setiap larutan baku ke dalam kromatograf dan rekam kromatogram.

6.3.3.2. Catat dan hitung rasio luas puncak larutan baku dengan larutan baku internal dari kromatogram.

6.3.3.3. Buat kurva antara rasio luas puncak dengan konsentrasi larutan baku masing-masing pengawet.

6.3.3.4. Tentukan linearitas kurva kalibrasi masing-masing pengawet.

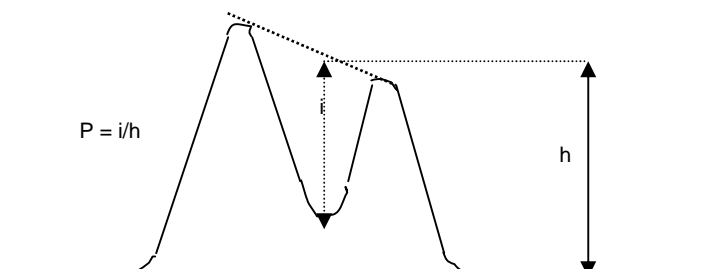
6.3.4. Penetapan kadar

6.3.4.1. Suntikkan larutan uji ke dalam kromatograf dan rekam kromatogram.

6.3.4.2. Catat dan hitung rasio luas puncak dari pengawet yang diuji terhadap luas puncak baku internal dari kromatogram.

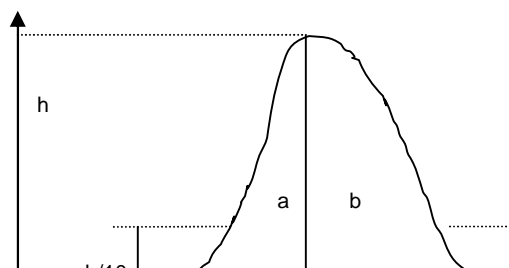
6.3.4.3. Pastikan bahwa kromatogram yang dihasilkan larutan baku dan larutan uji sesuai dengan persyaratan uji kesesuaian sistem berikut :

- ii. **Daya pisah puncak (resolusi)** antara dua puncak yang pemisahannya buruk, tidak kurang dari 0,90 (Ketentuan pemisahan puncak, lihat gambar)



iii.

- iv. **Faktor asimetri (As)** antara 0,9 - 1,5. (Ketentuan faktor asimetrik puncak, lihat gambar).



Faktor asimetri (As) = b/a

-
- **Garis dasar (*baseline*)** harus stabil

7. Perhitungan

Hitung kadar pengawet: 2-fenoksietanol, metil 4-hidroksibenzoat, etil 4-hidroksibenzoat, propil 4-hidroksibenzoat, butil 4-hidroksibenzoat % (b/b) dalam contoh dengan persamaan garis regresi kurva kalibrasi, menggunakan rumus:

$$\frac{bi}{a} \times \frac{51}{10000}$$

dimana,

bi = Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) pengawet i dalam larutan uji yang dihitung dari kurva kalibrasi.

a = Bobot contoh (g) dari larutan uji.

8. Keterangan

Telah dilakukan uji kolaborasi terhadap metode ini yang diikuti oleh 9 laboratorium terhadap tiga contoh. Tabel berikut berisi data: rata-rata % b/b (m), *repeatability* (r), reproduisibilitas (R) dari analit yang terkandung dalam ke 3 contoh tersebut.

| Contoh | | 2-fenoksi- etanol | 1- fenoksi- propan- 2-ol | Metil parabe n | Etil parabe n | Propil parabe n | Butil parabe n | Benzil parabe n |
|-----------------|---|----------------------|-----------------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| Krim vitamin | m | 1,124 | - | 0,250 | 0,0628 | 0,031 | 0,090 6 | - |
| | r | 0,016 | - | 0,018 | 0,0035 | 0,0028 | 0,004 4 | - |

| | | | | | | | | |
|-------------------|---|-------|-------|-------|--------|--------|------------|-------|
| | R | 0,176 | - | 0,030 | 0,0068 | 0,0111 | 0,003 4 | - |
| Krim vanishing | m | 1,196 | - | 0,266 | 0,076 | - | - | - |
| | r | 0,040 | - | 0,003 | 0,002 | - | - | - |
| | R | 0,147 | - | 0,022 | 0,004 | - | - | - |
| Krim pijat | m | - | 0,806 | - | - | 0,180 | 0,148 | 0,152 |
| | r | - | 0,067 | - | - | 0,034 | 0,013 | 0,015 |
| | R | - | 0,112 | - | - | 0,078 | 0,012 | 0,016 |

C. KESIMPULAN

Hasil dari pengujian KLT dan KCKT dapat digunakan untuk menyimpulkan adanya 2-fenoksietanol, metil 4-hidroksibenzoat, etil 4-hidroksibenzoat, propil 4-hidroksibenzoat dan butil 4-hidroksibenzoat dalam kosmetika. Kadar masing-masing pengawet dalam kosmetika dihitung dari hasil pengujian secara KCKT.

D. ACUAN

ASEAN Cosmetic Method (ACM) INO 04.

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA,

KUSTANTINAH