

LAMPIRAN

Lampiran 1 Perhitungan

Perhitungan Fase gerak

Larutan Eluen (Fase Gerak) n-heksan : aseton (6:4)

$$\text{Volume dipipet} = \frac{\text{Angka Perbandingan}}{\text{Jumlah Perbandingan}} \times \text{Volume eluen}$$

Eluen n-heksan

$$\text{Volume dipipet} = \frac{6}{10} \times 30 \text{ mL} = 18 \text{ mL}$$

Eluen aseton

$$\text{Volume dipipet} = \frac{4}{10} \times 30 \text{ mL} = 12 \text{ mL}$$

Data Perhitungan nilai Rf

A. Perhitungan nilai Rf pada larutan baku standar asam retinoat

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh substansi}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$
$$R_f = \frac{4,1}{8} = 0,51 \rightarrow 0,5$$

B. Perhitungan nilai Rf pada Kontrol positif

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh substansi}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$
$$R_f = \frac{4,1}{8} = 0,51 \rightarrow 0,5$$

C. Perhitungan nilai Rf pada kontrol negatif

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh substansi}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$
$$R_f = \frac{3}{8} = 0,37 \rightarrow 0,4$$

D. Perhitungan nilai Rf Pada Sampel 1 dengan kode A

Nilai Rf A1:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh substansi}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

$$R_f = \frac{1,8}{8} = 0,22 \rightarrow 0,2$$

Nilai Rf A2:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh substansi}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

$$R_f = \frac{1,2}{8} = 0,15 \rightarrow 0,1$$

Nilai Rf A3:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh substansi}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

$$R_f = \frac{1}{8} = 0,12 \rightarrow 0,1$$

Rata-rata nilai Rf pada sampel 1 dengan kode A yaitu:

$$R_f = \frac{0,2 + 0,1 + 0,1}{3} = 0,1$$

E. Perhitungan nilai Rf pada sampel 2 dengan kode B

Nilai Rf B1:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh substansi}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

$$R_f = \frac{4,4}{8} = 0,55 \rightarrow 0,5$$

Nilai Rf B2:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh substansi}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

$$R_f = \frac{4,4}{8} = 0,55 \rightarrow 0,5$$

Nilai Rf B3:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh substansi}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

$$R_f = \frac{4,4}{8} = 0,55 \rightarrow 0,5$$

Rata-rata nilai Rf pada sampel 2 dengan kode B yaitu:

$$R_f = \frac{0,5 + 0,5 + 0,5}{3} = 0,5$$

F. Perhitungan Nilai Rf pada sampel 3 dengan kode C

Nilai Rf C1:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh substansi}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$
$$R_f = \frac{4}{8} = 0,5$$

Nilai Rf C2:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh substansi}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$
$$R_f = \frac{4}{8} = 0,5$$

Nilai Rf C3:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh substansi}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$
$$R_f = \frac{4}{8} = 0,5$$

Rata-rata nilai Rf sampel 3 dengan kode C yaitu:

$$R_f = \frac{0,5 + 0,5 + 0,5}{3} = 0,5$$

Lampiran 1 Gambar Preparasi Sampel



Bahan-Bahan



Sonikator



Oven



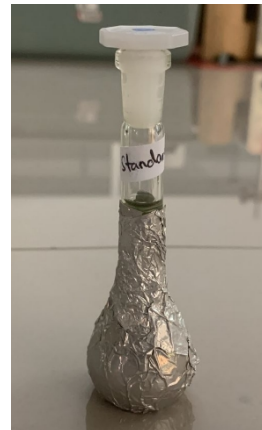
Lemari Asam



Lampu sinar UV



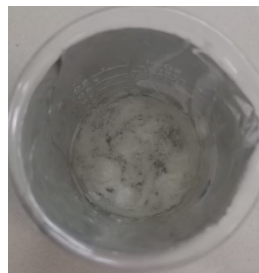
Penimbangan baku asam retinoat



Larutan baku standart asam retinoat



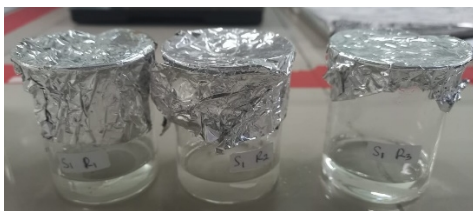
Penimbangan sampel



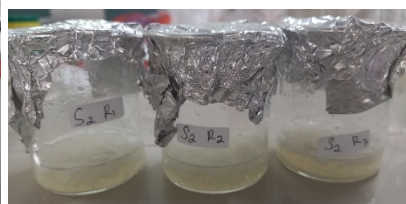
Proses Pengadukan



Proses Sonikasi



Setelah dilakukan proses sonikasi



Setelah didiamkan selama 15 menit



Proses Penyaringan



Kontrol positif dan negatif



Sampel 1



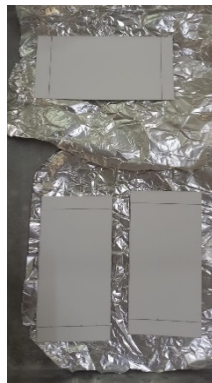
Sampel 2



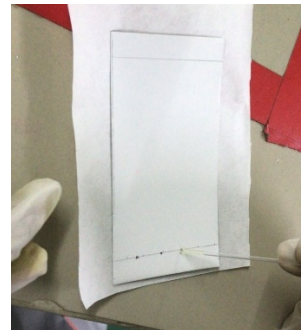
Sampel 3



Proses penjuanan fase gerak



Proses Pengovenan plat KLT



Proses Penotolan



Proses pemasangan fase diam (plat klt)



Proses elusi

Lampiran 1 Metode KLT Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia pada Tahun 2011



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

-2-

- 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.**

**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. Perekasi

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 pipetasi 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

6.3.1.1 Siapkan lempeng KLT dengan membuat batas penotolan dan batas eluasi lebih kurang 10 cm.

6.3.1.2 Totolkan secara terpisah, masing-masing 5 hingga 20 μL larutan uji dan 5 μL larutan baku pada batas penotolan dari lempeng KLT.

6.3.1.3 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.

6.3.1.4 Semprot dengan larutan penampak bercak, akan tampak bercak berwarna biru tua pada nilai Rf yang menunjukkan adanya asam retinoat.

6.3.1.5 Hembuskan udara panas pada lempeng, akan tampak bercak berwarna hijau kebiruan dari asam retinoat.

6.3.1.6 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

6.3.2.1 Isi dan jenuhkan bejana kromatografi dengan larutan pengembang sistem C yang dilapisi dengan kertas saring.

- 6.3.2.2 Totolkan secara terpisah, masing-masing 5 hingga 20 μ L larutan uji dan 5 μ L larutan baku pada garis awal dari lempeng KLT. Biarkan sampai bercak kering.
- 6.3.2.3 Kembangkan lempeng sampai jarak rambat pengembang kurang lebih 15 cm.
- 6.3.2.4 Keringkan lempeng di udara dan amati lempeng di bawah penyinaran lampu UV 254 nm. Semprot lempeng dengan larutan penampak bercak.
- 6.3.2.5 Hembuskan udara panas pada lempeng, akan tampak bercak berwarna hijau kebiruan dari asam retinoat.
- 6.3.2.6 Bandingkan nilai Rf dan warna bercak yang diperoleh dari larutan uji dengan larutan baku.

8. 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 (μ g)
Sistem A	0,1 – 0,3	0,125
Sistem B	0,5	
Sistem C	0,4	

- 7.2 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