

BPOM DI BANDUNG INSTRUKSI KERJA LAB OBAT TRADISIONAL	No. Dokumen : IKLOT 03-03/BBPOM BDG/07
	Terbitan/Revisi : 1/2
	Tanggal Terbit : 10 Januari 2017
IDENTIFIKASI DAN PENETAPAN KADAR PENGAWET DALAM SEDIAAN PADAT	Halaman : 1 dari 8
	Setuju diterbitkan : Manajer mutu

ASLI

1. Tujuan

Melakukan uji identifikasi dan penetapan kadar Pengawet dalam Obat Tradisional Sediaan padat

2. Ruang Lingkup

Metode ini digunakan untuk uji identifikasi dan penetapan kadar Pengawet dalam Obat Tradisional Sediaan Padat secara Ekstraksi-KLT, Spektrofotometri dan SPE-KCKT-PDA

3. Pustaka

MA PPOM 40/OT/92, 41/OT/92, 35/OT/93, 31/OT/93 (Ekstraksi-KLT, Spektrofotometri)

MA PPOM 21/OT/94 (Identifikasi Pengawet secara SPE-KCKT-PDA)

MA PPOM 10/OT-PK/15 (Penetapan Kadar Pengawet secara SPE-KCKT-PDA)

Peraturan Kepala Badan POM RI No. 12 Tahun 2014 (Persyaratan yang Berlaku)

4. Prosedur

4.1. Pereaksi

A. Pereaksi untuk Penetapan secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Spektrofotometri :

Metanol, Etanol, eter, Natrium Hidroksida (NaOH), Asam Sulfat (H_2SO_4), pentana, asam asetat glasial, propanol, etil asetat, toluen, air .

Pembuatan larutan :

- Larutan NaOH 1N : 4 gram NaOH dalam 100 mL air
- Larutan NaOH 0,1N : 0,4 gram NaOH dalam 100 mL air
- Larutan H_2SO_4 1N : pipet 3 mL asam sulfat pekat dalam 100 mL air

(Caranya : Dalam labu tentukur 100 mL masukkan sejumlah kurang lebih 80 mL air, pipet 3 mL asam sulfat pekat ke dalam labu tentukur yang sudah berisi air, kemudian tambahkan air melalui dinding labu tentukur sampai tanda batas)

B. Pereaksi untuk Penetapan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Asam orthofosfat (H_3PO_4) 85%, asetnitril, metanol, air, kalium hidroksida.

Disiapkan oleh:  Wiwiet Yuniati, S.Si., Apt	Diverifikasi oleh :  Puji Astuti, S.Farm Penyelia	Disahkan oleh :  Dra. Ami Damilah, Apt Manajer Teknis
--	---	---

BPOM DI BANDUNG INSTRUKSI KERJA LAB OBAT TRADISIONAL	No. Dokumen : IKLOT 03-03/BBPOM BDG/07
	Terbitan/Revisi : 1/2
	Tanggal Terbit : 10 Januari 2017
IDENTIFIKASI DAN PENETAPAN KADAR PENGAWET DALAM SEDIAAN PADAT	Halaman : 2 dari 8
	Setuju : Manajer mutu diterbitkan

ASLI

Pembuatan Larutan :

- Pelarut KCKT: Larutan amonium hidroksida 1% dalam air (pipet 4 mL amonia 25% add air sampai 100 mL)
- Larutan pengelusi SPE-KCKT : Asam fosfat 4% dalam metanol (pipet 4,75 mL asam orthofosfat 85% add metanol sampai 100 mL)
- Larutan Kalium Hidroksida (KOH) 10% (20 g dalam 200 mL air)
- Dapar fosfat pH $\pm$ 3,74 : Dipipet 6640 μ L H_3PO_4 85% ke dalam labu tentukur 1 L, ditambahkan air sampai tanda. pH diatur hingga $\pm$ 3,74 dengan larutan KOH 10%.

4.2. Peralatan

- Plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Silika gel 60F₂₅₄
- Spektrofotometri UV-Vis
- Seperangkat peralatan Kromatografi Cair Konerja Tinggi dengan detektor PDA, kolom C18 (4,6 x 250 mm, ukuran partikel 5 μ m)

4.3. Bahan dan Baku Pembanding

- Bahan : Kertas pH indikator universal, MAX 3 cc (60 mg) *Extraction Cartridge*, penyaring membran hidrofilik 0,45 μ m atau 0,20 μ m.
- Baku Pembanding : Asam Benzoat, Asam Sorbat, Metil Paraben, Etil Paraben, Propil Paraben, dan Butil Paraben.

4.4. Penetapan secara Kromatografi Lapis Tipis dan Spektrofotometri

4.4.1 Larutan uji

Sejumlah serbuk obat tradisional yang sudah dihomogenkan, ditimbang seksama dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 100 mL, ditambahkan 50 mL air dan dibasakan dengan larutan NaOH 1N sampai pH 10. Kocok selama 30 menit kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh diasamkan dengan larutan asam sulfat 1N sampai pH 3-4, kemudian diekstraksi tiga kali dengan masing-masing 30 mL eter dan diuapkan sampai kering. Sisa penguapan dilarutkan dalam 5 mL etanol.
(A)

4.4.2 Larutan Baku

- Larutan baku asam benzoat : Sejumlah 20 mg baku asam benzoat ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, ditambahkan etanol sampai tanda. (b₁)

BPOM DI BANDUNG INSTRUKSI KERJA LAB OBAT TRADISIONAL	No. Dokumen : IKLOT 03-03/BBPOM BDG/07
	Terbitan/Revisi : 1/2
	Tanggal Terbit : 10 Januari 2017
IDENTIFIKASI DAN PENETAPAN KADAR PENGAWET DALAM SEDIAAN PADAT	Halaman : 3 dari 8
	Setuju : Manajer mutu diterbitkan

ASLI

- Larutan baku asam sorbat : Sejumlah 20 mg baku asam sorbat ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, ditambahkan etanol sampai tanda. (b₂)
- Larutan baku metil paraben (nipagin) : Sejumlah 10 mg baku metil paraben ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, ditambahkan metanol sampai tanda. (b₃)
- Larutan baku propil paraben (nipasol): Sejumlah 10 mg baku propil paraben ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, ditambahkan metanol sampai tanda. (b₄)

4.4.3 Larutan *Spiked Sample*

- Dengan cara yang sama seperti larutan uji, diekstraksi sejumlah satu dosis obat tradisional yang ditambahkan 5 mL larutan baku asam benzoat b₁ (C).
- Dengan cara yang sama seperti larutan uji, diekstraksi sejumlah satu dosis obat tradisional yang ditambahkan 2 mL larutan baku asam sorbat b₂ (D).
- Dengan cara yang sama seperti penyiapan larutan uji, diekstraksi sejumlah satu dosis obat tradisional yang ditambahkan 5 mL baku metil paraben b₃ (E).
- Dengan cara yang sama seperti penyiapan larutan uji, diekstraksi sejumlah satu dosis obat tradisional yang ditambahkan 5 mL larutan baku propil paraben b₄ (F).

4.4.4 Penetapan Secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Totolkan masing-masing larutan A, b₁, b₂, b₃, b₄, C, D, E dan F secara terpisah dan lakukan kromatografi lapis tipis sebagai berikut :

Fase Diam	:	Silika gel 60 F ₂₅₄
Fase Gerak (harus dibuat segar)	i	pentana-asam asetat glasial (88:12)
	ii	propanol-etil asetat-air (60:10:30)
	iii	toluen-metanol-asam asetat glasial (90:16:8)
Penjenuhan	:	Kertas saring
Jarak rambat	:	15 cm
Volume penotolan	:	Larutan A dan b ₁ 50 µL
		Larutan b ₂ -b ₄ , C, D, E dan F 25 µL
Penampak bercak	:	UV 254 nm

BPOM DI BANDUNG INSTRUKSI KERJA LAB OBAT TRADISIONAL	No. Dokumen : IKLOT 03-03/BBPOM BDG/07
	Terbitan/Revisi : 1/2
	Tanggal Terbit : 10 Januari 2017
IDENTIFIKASI DAN PENETAPAN KADAR PENGAWET DALAM SEDIAAN PADAT	Halaman : 4 dari 8
	Setuju : Manajer mutu diterbitkan

ASLI

4.4.5 Penetapan Secara Spektrofotometri Ultraviolet

Tandai bercak baku dan senyawa yang mempunyai Rf sama dan dikerok. Hasil kerokan dilarutkan dalam 5 mL metanol, kecuali untuk asam sorbat dilarutkan dalam larutan NaOH 0.1N, kemudian disaring. Filtrat diukur serapannya pada panjang gelombang antara 200 sampai 300 nm. Panjang gelombang maksimum masing-masing adalah Asam Benzoat 227 nm, asam sorbat 255 nm, nipagin 256 nm dan nipasol 268 nm.

4.4.6 Perhitungan Kadar

Dari hasil pengukuran serapan secara spektrofotometri, dihitung kadar asam benzoat, asam sorbat, nipagin dan nipasol masing-masing dengan rumus sebagai berikut :

$$\frac{A_u}{A_b} \times K_b \times \frac{V_{tb}}{V_{tu}} \times \frac{V_{eu}}{B} \times F$$

Keterangan :

- Au : Serapan larutan uji
- Ab : Serapan larutan baku
- Kb : Konsentrasi larutan baku
- Vtb : Volume penotolan larutan baku (μL)
- Vtu : Volume penotolan larutan uji (μL)
- VeU : Volume awal ekstrak larutan uji (mL)
- B : Bobot cuplikan (mg)
- F : Faktor pengenceran

4.5 Penetapan Secara Solid Phase Extraction-Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Photo Diode Array (SPE-KCKT-PDA)

4.5.1 Penyiapan Larutan Uji

Penetapan bobot rata-rata terlebih dahulu dilakukan terhadap minimal 10 bungkus/kapsul/tablet. Sejumlah serbuk obat tradisional dihomogenkan kemudian ditimbang seksama lebih kurang 500 mg, dimasukkan ke dalam tabung sentrifus 50 mL, ditambah 10 mL pelarut, ultrasonik selama 15 menit, disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam vial, dipipet 200 μL ditambahkan 1800 μL pelarut, kocok hingga homogen. Lakukan duplo (Larutan A1 dan A2).

BPOM DI BANDUNG INSTRUKSI KERJA LAB OBAT TRADISIONAL	No. Dokumen : IKLOT 03-03/BBPOM BDG/07
	Terbitan/Revisi : 1/2
	Tanggal Terbit : 10 Januari 2017
IDENTIFIKASI DAN PENETAPAN KADAR PENGAWET DALAM SEDIAAN PADAT	Halaman : 5 dari 8
	Setuju : Manajer mutu diterbitkan

ASLI

4.5.2 Penyiapan Larutan Baku

1. Larutan Baku Induk Asam Benzoat

Sejumlah 5 mg baku asam benzoat ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 mL, dilarutkan dan diencerkan dengan pelarut sampai tanda (Larutan B1).

2. Larutan Baku Induk Asam Sorbat

Sejumlah 5 mg baku asam sorbat ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 mL, dilarutkan dan diencerkan dengan pelarut sampai tanda (Larutan B2).

3. Larutan Baku Induk Metil Paraben

Sejumlah 5 mg baku Metil Paraben ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 mL, dilarutkan dan diencerkan dengan pelarut sampai tanda (Larutan B3).

4. Larutan Baku Induk Etil Paraben

Sejumlah 5 mg baku Etil Paraben ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 5 mL, dilarutkan dan diencerkan dengan pelarut sampai tanda (Larutan B4).

5. Larutan Baku Propil Paraben

Sejumlah 5 mg baku Propil Paraben ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, dilarutkan dan diencerkan dengan pelarut sampai tanda (Larutan B5).

6. Larutan Baku Butil Paraben

Sejumlah 5 mg baku Butil Paraben ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, dilarutkan dan diencerkan dengan pelarut sampai tanda (Larutan B6).

4.5.3 Larutan Seri Baku Kerja

Sejumlah masing-masing 300 μ L larutan B1 dan 500 μ L larutan B2-B6 dipipet dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, ditambahkan pelarut sampai tanda (Larutan C).

Larutan seri baku kerja dibuat dengan memipet sejumlah larutan C ke dalam labu tentukur 5 mL dan diencerkan dengan pelarut sampai tanda, sebagai berikut :

- Larutan seri baku 1 : 25 μ L Larutan C (Larutan C1)
- Larutan seri baku 2 : 75 μ L Larutan C (Larutan C2)

BPOM DI BANDUNG INSTRUKSI KERJA LAB OBAT TRADISIONAL	No. Dokumen : IKLOT 03-03/BBPOM BDG/07
	Terbitan/Revisi : 1/2
	Tanggal Terbit : 10 Januari 2017
IDENTIFIKASI DAN PENETAPAN KADAR PENGAWET DALAM SEDIAAN PADAT	Halaman : 6 dari 8
	Setuju : Manajer mutu diterbitkan

ASLI

- Larutan seri baku 3 : 250 µL Larutan C (Larutan C3)
- Larutan seri baku 4 : 500 µL Larutan C (Larutan C4)
- Larutan seri baku 5 : 750 µL Larutan C (Larutan C5)
- Larutan seri baku 6 : 1000 µL Larutan C (Larutan C6)
- Larutan seri baku 7 : 1250 µL Larutan C (Larutan C7)

4.5.4 Larutan *Spiked Sample*

Dengan cara yang sama seperti Larutan Uji, ditambahkan 300 µL asam benzoat, dan masing-masing 500 µL asam sorbat, metil, etil, propil dan butil paraben (Larutan E).

4.5.5 Cara penetapan

a. Secara *Solid Phase Extraction* (SPE/Pemisahan Matriks Sampel)

Larutan Uji (A1 dan A2) dan larutan *Spiked Sample* (Larutan E) dilakukan pemisahan dengan SPE dengan kondisi sebagai berikut :

Kolom	:	<i>Cartridge</i> SPE MAX
Pelarut Kondisioning	:	• 1,0 mL Metanol • 1,0 mL Air
Load Sampel	:	500 µL
Larutan Pencuci	:	1,0 mL Air
Larutan Pengelusi	:	1,0 mL Asam Fosfat 4% dalam metanol

- Dilakukan pengkondisian *cartridge* SPE MAX berturut- turut menggunakan 1,0 mL Metanol dan 1,0 mL Air (*Cartridge* tidak boleh sampai kering), biarkan menetes perlahan tanpa bantuan *vacuum manifold*
- Larutan Uji dan Larutan *Spiked Sample* sebanyak 500 µL dimasukkan ke dalam *cartridge* SPE MAX secara terpisah, biarkan menetes perlahan ($\pm$ 15 tetes per menit) dengan bantuan *vacuum manifold*
- *Cartridge* SPE MAX dicuci dengan 1,0 mL Air, biarkan menetes perlahan ($\pm$ 15 tetes per menit) dengan bantuan *vacuum manifold*
- Dilakukan eluasi dengan larutan pengelusi, biarkan menetes perlahan perlahan ($\pm$ 15 tetes per menit) dengan bantuan *vacuum manifold*, ditampung dalam tabung reaksi, dan dipindahkan ke dalam labu tentukur 5 mL. Tabung reaksi dibilas dengan pelarut pengelusi kemudian dimasukkan

BPOM DI BANDUNG INSTRUKSI KERJA LAB OBAT TRADISIONAL	No. Dokumen : IKLOT 03-03/BBPOM BDG/07
	Terbitan/Revisi : 1/2
	Tanggal Terbit : 10 Januari 2017
IDENTIFIKASI DAN PENETAPAN KADAR PENGAWET DALAM SEDIAAN PADAT	Halaman : 7 dari 8
	Setuju : Manajer mutu diterbitkan

ASLI

ke dalam labu tentukur tersebut. Larutan pengelusi ditambahkan sampai tanda dan dikocok perlahan hingga homogen.

b. Secara KCKT

Larutan uji (A1 dan A2), Larutan *Spiked Sample* (Larutan E) hasil SPE, Larutan Baku Campuran (Larutan D) dan Larutan Seri Baku Kerja (Larutan C1-C7) disuntikkan secara terpisah ke KCKT dengan kondisi sebagai berikut :

Kolom : C18 (4,6 x 250 mm, ukuran partikel 5 µm)
Suhu Kolom : 40°C
Fase Gerak : Asetonitril dan Dapar Fosfat pH ± 3,7 dengan sistem gradien sebagai berikut :

Menit	Komposisi Fase Gerak (%)	
	Asetonitril	Dapar Fosfat pH ± 3,74
0,01	20	80
15,00	25	75
15,01	55	45
25,00	55	45
25,01	20	80
29,99	20	80
35,00	STOP	

Laju Alir : 1,0 mL/menit
Volume Penyuntikan : 20 µL
Detektor : PDA pada panjang gelombang 200–400 nm (spektrum pada panjang gelombang 254 nm untuk asam sorbat, metil, etil, propil, butil paraben dan 230 nm untuk asam benzoat)

4.6 Interpretasi Hasil

Perhitungan Kadar :

Kurva kalibrasi dibuat dengan menggunakan data konsentrasi Larutan Seri Baku Kerja sebagai absis (x) dan area (luas puncak) sebagai ordinat (y)

Kurva Kalibrasi : $y = bx + a$, maka $x_i = \frac{y_i - a}{b}$

BPOM DI BANDUNG INSTRUKSI KERJA LAB OBAT TRADISIONAL	No. Dokumen : IKLOT 03-03/BBPOM BDG/07
	Terbitan/Revisi : 1/2
	Tanggal Terbit : 10 Januari 2017
IDENTIFIKASI DAN PENETAPAN KADAR PENGAWET DALAM SEDIAAN PADAT	Halaman : 8 dari 8
	Setuju : Manajer mutu diterbitkan

g
ASLI

$$\text{Kandungan sampel (\%)} = \frac{x_i (\mu\text{g/mL}) \times V (\text{mL})}{\text{Bu (g)}} \times F (\text{mL})$$

Keterangan :
 y_i : Luas puncak larutan uji
 x_i : kadar sampel dari kurva kalibrasi ($\mu\text{g/mL}$)
 a : Intersep
 b : slop
 F : Pengenceran (mL)
 Bu : Bobot penimbangan sampel (g)
 V : Volume labu (mL)

Persyaratan

1. Asam Benzoat : maksimal 0.15 %
2. Asam Sorbat : 0.05 – 0.2 %
3. Metil paraben : 0,015 – 0,2 %
4. Etil Paraben, Propil Paraben dan Butil Paraben : dilarang

5. Dokumen Terkait

LCP K-02, LCP K-13, LCP K-16

6. Riwayat Perubahan

Terb/Rev	Perubahan	Tanggal Efektif
1/2	• Mengganti judul dari "Penetapan kadar pengawet dalam sediaan padat" menjadi "Identifikasi dan penetapan kadar pengawet dalam sediaan padat" • Menambahkan acuan pustaka dengan MA PPOM No. 21/OT/14 ; 10/OT-PK/15 dan Peraturan Kepala Badan POM RI No. 12 Tahun 2014 • Mengganti prosedur untuk penetapan secara KCKT menjadi SPE-KCKT-PDA	10 Januari 2017