

Comparative Efficacy of Wet Wipe Preservatives: Antimicrobial Performance to Inhibit Microbial Growth

M. Arif Lukman Hakim¹, Adi Permadi^{1*}, Erna Astuti¹, Farahidah Mohamed²

¹Magister Teknik Kimia, Fakultas teknologi Industri, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia;

²Departemen Farmasi, Fakultas Farmasi, International Islamic University Malaysia, Pahang, Malaysia;

Article History

Received : April 02th, 2025

Revised : May 15th, 2025

Accepted : June 16th, 2025

*Corresponding Author:

Adi Permadi,

Magister teknik Kimia,
Fakultas Teknologi Industri,
Universitas Ahmad Dahlan,
Yogyakarta, Indonesia
Email:

adi.permadi@che.uad.ac.id

Abstract: The global market for wet wipes has seen significant growth in the past decade, establishing them as a popular product for personal care and household use. However, their high water and cellulose content makes them vulnerable to contamination by pathogenic microorganisms, which can cause changes in both their physical and chemical properties. This study aims to evaluate the efficacy of six preservative formulations in preventing microbial contamination in wet wipes. The formulas tested included: Formula 1 (F1) with phenoxyethanol and benzalkonium chloride; Formula 2 (F2) with phenoxyethanol, sodium benzoate, and potassium sorbate; Formula 3 (F3) with phenoxyethanol and caprylyl glycol; Formula 4 (F4) with polyaminopropyl biguanide and caprylyl glycol; Formula 5 (F5) with sodium benzoate, potassium sorbate, and cetylpyridinium chloride; and Formula 6 (F6) with propylene glycol and chlorphenesin. A 28-day challenge test was conducted using a multispecies inoculation technique, including bacteria, mould, and yeast. All formulas were initially sterile, as confirmed by sterility testing. The results showed that Formula F1 was the most effective, reducing microbial growth by over 6 log units within 14 days. Formulas F5 and F6 also demonstrated effectiveness, though microbial reduction in these formulas was slower, only reaching >6 log reduction by day 28. Formulas F2, F3, and F4 did not meet the required standards for mould and yeast reduction. These findings support the use of Formula F1 as the most reliable preservative combination, ensuring the safety and quality of wet wipes.

Keywords: Challenge Test; Preservative; pathogenic microorganisms; Wet Wipes;

Pendahuluan

Penggunaan tisu basah secara global telah mengalami kenaikan yang signifikan selama dekade terakhir, terutama dalam produk kebersihan dan perbekalan kesehatan rumah tangga. Namun seiring dengan perkembangan teknologi, tisu basah berkembang menjadi beberapa varian produk terutama sebagai produk perawatan pribadi, perawatan bayi dan perawatan rumah tangga (Hadley et al., 2022). Tisu basah telah menjadi subjek ekspansi pasar dari tahun 2011. Pada tahun 2011 hingga tahun 2016 tingkat pertumbuhan tisu basah di dunia mencapai 5,10% per tahun, sedangkan dari tahun 2020 hingga tahun 20230 estimasi pertumbuhan pasar akan meningkat sebesar 2,60% pada akhir

tahun 20230 (Grand View research, 2022). Disisi lain, produk tisu basah memiliki masalah mendasar yang sangat sulit untuk ditangani yaitu kontaminasi mikroorganisme.

Kontaminasi mikroorganisme merupakan isu krusial yang mempengaruhi kualitas dan keamanan produk tisu basah (Halla et al., 2018). Tingginya tingkat kontaminasi mempersulit upaya pengawetan produk, meskipun tisu basah diharapkan memiliki stabilitas hingga tiga tahun. Namun, seringkali ditemukan kasus perubahan sifat fisik produk sebelum mencapai batas waktu tersebut, yang ditandai dengan perubahan pH, warna, bau, dan pemisahan emulsi (Azman et al., 2018; Pham et al., 2021). Kerentanan produk tisu basah terhadap kontaminasi mikroorganisme utamanya disebabkan oleh dua faktor: tingginya

kadar air dalam formulasi cairan dan komposisi bahan *non-woven*. Kandungan air yang signifikan (80-90%) dalam cairan tisu basah menyediakan mikronutrien esensial seperti natrium, kalsium, kalium, dan magnesium, yang mendukung proliferasi mikroorganisme (Rodriguez et al., 2020; Salama et al., 2021). Selain itu, bahan *non-woven* yang mengandung selulosa dapat terdegradasi oleh bakteri menjadi glukosa, yang kemudian berfungsi sebagai substrat nutrisi bagi pertumbuhan mikroorganisme (Kang et al., 2023). Proporsi selulosa yang lebih tinggi dalam *non-woven* berkorelasi positif dengan peningkatan kerentanan terhadap pertumbuhan mikroorganisme, sehingga mempersulit upaya pengawetan produk (Ziklo et al., 2024). Oleh karena itu, penggunaan preservatif atau bahan pengawet menjadi strategi krusial untuk memitigasi risiko kontaminasi mikroorganisme.

Preservatif adalah agen kimia esensial dalam produk kosmetik yang berfungsi mencegah degradasi akibat pertumbuhan mikroorganisme, sehingga memperpanjang masa simpan produk (Rahman, 2007). Berbagai studi sebelumnya telah menginvestigasi efektivitas preservatif dalam menghambat kontaminasi mikroorganisme. Sebagai contoh, penelitian menunjukkan bahwa sistem preservatif yang mengandung natrium benzoat (0,35%) dan kalium sorbat (0,10%) masih memungkinkan pertumbuhan bakteri seperti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa* pada hari ke-21. Demikian pula, penggunaan metil paraben (0,20%) tidak sepenuhnya mencegah pertumbuhan kapang (*Aspergillus brasiliensis*) dan khamir (*Candida albicans*) dalam periode yang sama (Salama et al., 2021). Temuan ini mengindikasikan tantangan signifikan dalam pengawetan produk tisu basah.

Meskipun efikasi preservatif dalam tisu basah telah banyak diteliti, sebuah permasalahan krusial yang sering terabaikan adalah keselarasan konsentrasi preservatif yang diuji dengan batasan regulasi yang berlaku. Banyak studi cenderung menggunakan konsentrasi preservatif yang melampaui ambang batas yang diizinkan, sehingga menciptakan diskrepansi antara hasil penelitian dan aplikabilitas praktis serta kepatuhan terhadap standar keamanan produk (Almoughrabie et al., 2020; European Chemical

Agency, 2024; Josephe & Noel, 1997; Mohamed, 2004; Veena et al., 2021). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menjembatani kesenjangan tersebut dengan mengevaluasi beberapa sistem preservatif dalam aplikasi tisu basah yang secara eksplisit mematuhi regulasi yang ditetapkan oleh *European Chemical Agency*. Pendekatan ini diharapkan tidak hanya memberikan pemahaman yang lebih akurat mengenai efektivitas preservatif dalam konteks regulasi yang relevan, tetapi juga berkontribusi pada pengembangan formulasi tisu basah yang aman, efektif, dan sesuai dengan standar pasar global.

Bahan dan Metode

Alat dan Bahan.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, *overhead stirrer*, *heater*, autoklaf, *biohazard cabinet*, oven, inkubator, *vortex mixer*, butir kaca, pipet ukur, cawan petri, *colony counter*, *stomacher STO-4 paddle blender*, botol media, tabung reaksi, jarum inokulasi, pembakar bunsen, tangas air dan pH meter. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi dua yaitu bahan baku formulasi produk dan bahan uji. Bahan baku formulasi produk yaitu air dengan kemurnian 99%, *non-woven* 40 gsm viscose 40% : *polyethylene Terephthalate* 60%, aloe vera ekstrak (kemurnian 99%), propilen glikol (kemurnian 99%), *chlorphenesin* (kemurnian 99%), *PEG 40 hydrogenated castor oil* (kemurnian 99%), asam laktat (kemurnian 98%), *phenoxyethanol* (kemurnian 99%), natrium benzoat (kemurnian 99%), kalium sorbat (kemurnian 99%), *benzalkonium chloride* (kemurnian 50%), *polyaminopropyl biguanide* (kemurnian 20%), *caprylyl glycol* (kemurnian 99%) serta *cetylpyridinium chloride* (kemurnian 99%). Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *trypticase soy agar* (TSA media), *sabouraud dextrose agar* (SDA media), kolam bakteri yang berisi *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella pneumonia*, *Pluralibacter gergoviae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* serta *Staphylococcus epidermidis* yang selanjutnya akan disebut dengan campuran bakteri, kolam khamir yang berisi *Candida albicans* serta *Candida parapsilosis* yang

selanjutnya disebut dengan campuran khamir, dan kolam kapang yang berisi *Aspergillus brasiliensis* serta *Penicillium pinophilum* yang selanjutnya disebut dengan campuran kapang. serta ada beberapa bahan uji lainnya seperti *polysorbate 80*, dan larutan *peptone* 0,1% NaCl. Semua material uji yang digunakan memiliki sertifikasi *pro-analysis grade* dan disediakan oleh *PCI Innovative Chemicals Sdn Bhd*.

Formulasi Tisu Basah

Formulasi produk tissu basah dilakukan dengan membagi bahan menjadi dua kategori yaitu bahan aktif yaitu preservatif yang memiliki jenis yang berbeda-beda dengan persentase yang berbeda di tiap formulanya. F1 terdiri dari

phenoxyethanol dan *benzalkonium chloride*, F2 terdiri dari *phenoxyethanol*, natrium benzoat, dan kalium sorbat, F3 terdiri dari *phenoxyethanol*, dan *caprylyl glycol*, F4 terdiri dari *polyaminopropyl biguanide*, dan *caprylyl glycol*, F5 terdiri dari natrium benzoat, kalium sorbat, dan *cetylpyridinium chloride* serta F6 terdiri dari propilen glikol dan *chlorphenesin*. Selain bahan aktif, adapun bahan tambahan berupa ekstrak aloe vera sebagai emolien, *PEG 40 hydrogenated castor oil (PEG 40 HCO)* sebagai *emulsifier*, *fragrance*, dan asam laktat sebagai pengatur pH. konsentrasi bahan tambahan ini sama dalam setiap formula. Formulasi masing-masing produk tissu basah dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rancangan Formula Produk Tisu Basah

No	Bahan Baku	Fungsi	Persentase (%)					
			F1	F2	F3	F4	F5	F6
1	<i>Phenoxyethanol</i>	Preservatif	0,80	0,80	0,90	-	-	-
2	<i>Benzalkonium chloride</i>	Preservatif	0,05	-	-	-	-	-
3	Natrium benzoat	Preservatif	-	0,50	-	-	0,50	-
4	Kalium sorbat	Preservatif	-	0,60	-	-	0,60	-
5	<i>Caprylyl Glycol</i>	Preservatif	-	-	0,30	0,50	-	-
6	<i>Polyaminopropyl biguanide</i>	Preservatif	-	-	-	0,50	-	-
7	<i>Cetylpyridinium chloride</i>	Preservatif	-	-	-	-	0,05	-
8	Propilen glikol	Preservatif	-	-	-	-	-	20,00
9	<i>Chlorphenesin</i>	Preservatif	-	-	-	-	-	0,30
10	Ekstrak aloe vera	Emolien	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
11	<i>PEG 40 hydrogenated castor oil</i>	<i>Emulsifier</i>	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
12	<i>Fragrance</i>	Aroma	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
13	Asal laktat	Pengatur pH	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
14	Air	Pelarut	98,43	97,38	98,08	98,28	98,13	78,98

Uji Sterilitas Produk Tisu Basah

Pengujian sterilitas dilakukan dengan mempersiapkan sampel tissu basah dalam kemasan 50 lembar, dengan kandungan cairan formula sebesar 161 gram. Sampel tissu basah dikeluarkan dari kemasan dan dimasukkan ke dalam alat *stomacher STO-4 paddle blender* untuk memisahkan komponen non-woven dari cairannya. Sebanyak 16 gram cairan yang diperoleh kemudian diinokulasikan ke media *Tryptic Soy Agar (TSA)* untuk pengujian sterilitas bakteri, dan ke media *Sabouraud Dextrose Agar (SDA)* untuk pengujian sterilitas kapang dan khamir. Media TSA diinkubasi pada suhu 30°C selama 2 hari, sedangkan media SDA diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 hari. Seluruh prosedur pengujian harus dilaksanakan

dengan teknik aseptis. Selanjutnya, dilakukan pengamatan dan perhitungan jumlah koloni bakteri, kapang, dan khamir menggunakan alat *colony counter*. Untuk mendeteksi keberadaan bakteri pembentuk spora pada media *Tryptic Soy Agar (TSA)* dan *Sabouraud Dextrose Agar (SDA)*, dilakukan pengujian lanjutan berupa pewarnaan spora. Endospora bakteri dicirikan oleh dinding sel yang tebal dan impermeabel, sehingga pemanasan diperlukan untuk memfasilitasi penetrasi pewarna primer (*malachite green*) ke dalam spora. Setelah proses pencucian dengan air, sel vegetatif diwarnai dengan safranin. Observasi mikroskopis akan mengungkapkan endospora yang berwarna hijau terang atau biru-hijau, yang mengindikasikan keberadaan bakteri pembentuk spora.

Berdasarkan standar *Cosmetic Toiletry and Fragrance Association* (CTFA), produk kosmetik dianggap memenuhi kriteria sterilitas apabila konsentrasi maksimum mikroorganisme tidak melebihi 10^3 cfu/g (Fiorentino et al., 2011).

Uji Challenge Test Produk Tisu Basah

Pengujian *challenge test* dilakukan dengan menyiapkan tiga kemasan tisu basah (masing-masing 50 lembar) per formulasi, dengan total cairan tisu basah 480 gram. Setiap produk tisu basah kemudian dihancurkan menggunakan *stomacher* untuk memisahkan cairan dari non-woven. Cairan tisu basah yang diperoleh selanjutnya dibagi ke dalam tiga *beaker* terpisah, masing-masing berisi 120 gram cairan. Setiap porsi cairan tersebut kemudian ditambahkan ke dalam cawan petri yang telah berisi suspensi campuran bakteri, campuran kapang, dan campuran khamir secara terpisah.

Setiap wadah contoh diinokulasi dengan 1 mL suspensi mikroba, yang masing-masing mengandung $1,2 \times 10^7$ cfu/g untuk bakteri, $2,6 \times 10^6$ cfu/g untuk khamir, dan $1,8 \times 10^6$ cfu/g untuk kapang. Homogenisasi dilakukan menggunakan *vortex mixer*. Selanjutnya, 20 g dari setiap sampel yang telah diinokulasi dipindahkan ke dalam tiga wadah terpisah untuk pengujian pada interval waktu 7, 14, dan 28 hari. Untuk kuantifikasi mikroorganisme pada setiap titik waktu, dilakukan pengenceran serial dari 10^{-1} hingga 10^{-4} menggunakan larutan pepton 1%. Sebanyak 1 mL dari setiap pengenceran kemudian diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi media yang sesuai (*Tryptic Soy Agar* (TSA) untuk bakteri dan *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) untuk jamur). Kultur bakteri diinkubasi pada suhu 30°C selama 2 hari, sedangkan kultur jamur diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 hari. Penghitungan mikroorganisme selanjutnya dilakukan menggunakan alat *colony counter*. Selanjutnya dihitung log reduksi dari mikroorganisme tersebut dengan rumus :

$$\log_{\text{reduksi}} = \log(N_0) - \log(N_t)$$

Dimana, N_0 merupakan jumlah mikroorganisme pada hari ke-0, sedangkan N_t merupakan jumlah mikroorganisme pada hari ke-7, 14 atau 28. Menurut *British Pharmacopoeia*, suatu preservatif dinyatakan efektif untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme jika preservatif mampu menunjukkan penurunan bakteri

sekurang-kurangnya 99,90% (3 log) pada hari ke-7 dan tidak ada kenaikan jumlah bakteri hingga hari ke-28 dan untuk kapang dan khamir, preservatif mampu menurunkan jumlah kapang dan khamir sekurang-kurangnya 99,00% (2 log) pada hari ke-14, serta tidak ada kapang dan khamir yang terdeteksi pada hari ke-28 pengujian *challenge test*. (Fiorentino et al., 2011; Yablonski & Mancuso, 2007).

Hasil dan Pembahasan

Hasil Uji Sterilitas pada Produk Tisu Basah.

Hasil pengujian sterilitas menunjukkan bahwa semua produk tisu basah dari formula F1 hingga F6 tidak terkontaminasi oleh bakteri, jamur, maupun bakteri pembentuk spora. Detail hasil pengujian sterilitas produk tisu basah ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengujian Sterilitas pada Produk Tisu Basah Formula F1 hingga F6.

Formula	Pertumbuhan mikroorganisme (cfu/g)		
	30 °C TSA	25 °C SDA	SFB
F1	<10	<10	<10
F2	<10	<10	<10
F3	<10	<10	<10
F4	<10	<10	<10
F5	<10	<10	<10
F6	<10	<10	<10

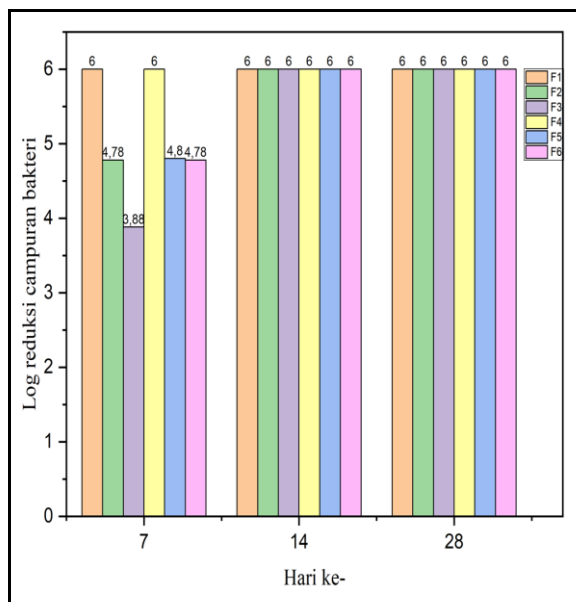
Efektivitas Preservatif Pada Campuran Bakteri

Hasil pengujian efektivitas preservatif menggunakan metode *challenge test* terhadap campuran bakteri menunjukkan bahwa seluruh formula produk tisu basah, dari F1 hingga F6, terbukti efektif dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Detail hasil pengujian *challenge test* untuk formula produk tisu basah ini disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengujian Efektivitas Preservatif Terhadap Campuran Bakteri pada Produk Tisu Basah menggunakan Metode *Challenge Test*.

Formula	Reduksi campuran bakteri (log)		
	Hari ke-7	Hari ke-14	Hari ke-28
F1	> 6,00	> 6,00	> 6,00
F2	4,78	> 6,00	> 6,00
F3	3,88	> 6,00	> 6,00
F4	> 6,00	> 6,00	> 6,00
F5	4,80	> 6,00	> 6,00
F6	4,78	> 6,00	> 6,00

Untuk melihat efek preservatif terhadap penghambatan campuran bakteri uji dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram Pengaruh Preservatif Terhadap Log Reduksi Campuran Bakteri Pada Uji *Challenge Test*.

Gambar 1 mengilustrasikan pengaruh preservatif terhadap reduksi campuran bakteri. Semakin tinggi log reduksi yang dihasilkan maka semakin efektif preservatif tersebut dalam menghambat pertumbuhan campuran bakteri. Pada gambar diatas, dapat dilihat bahwa produk F1 dan F4 memiliki daya reduksi yang sangat baik jika dibandingkan dengan formula lainnya. Sedangkan produk F3 memiliki daya reduksi yang paling rendah terhadap campuran bakteri pada hari ke-7, namun pada hari ke-14 dan hari ke-28, daya reduksi dari produk ini dapat menyamai produk lainnya.

Efektivitas Preservatif Pada Campuran Kapang

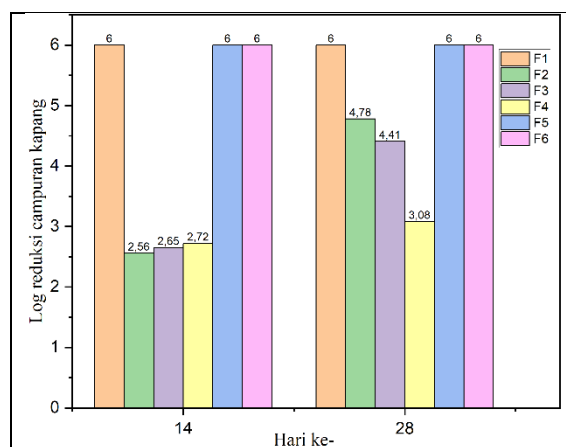
Hasil pengujian efektivitas preservatif menggunakan metode *challenge test* terhadap campuran kapang menunjukkan variasi. Formula tisu basah dengan kode F2, F3, dan F4 dinyatakan tidak memenuhi kriteria uji karena masih terdeteksi adanya pertumbuhan kapang hingga akhir periode pengujian. Detail hasil pengujian *challenge test* terhadap campuran kapang pada produk tisu basah dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Pengujian Efektivitas Preservatif Terhadap Campuran Kapang pada Produk Tisu Basah menggunakan Metode *Challenge Test*.

Formula	Reduksi campuran kapang (log)		
	Hari ke-7	Hari ke-14	Hari ke-28
F1	TD	> 6,00	> 6,00
F2	TD	2,56	4,78
F3	TD	2,65	4,41
F4	TD	2,72	3,08
F5	TD	> 6,00	> 6,00
F6	TD	> 6,00	> 6,00

Notes: TD (Tidak diuji)

Efek preservatif terhadap reduksi campuran kapang dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Diagram Pengaruh Preservatif Terhadap Log Reduksi Campuran Kapang Pada Uji *Challenge Test*.

Pada Gambar 2, dapat dilihat bahwa pada hari ke-14 produk dengan formula F2 memiliki daya reduksi terhadap campuran kapang yang lebih rendah, namun menariknya pada hari ke-28, produk dengan formula F4 memiliki daya hambat yang paling rendah yaitu 3,08. Sedangkan produk dengan formula F1, F5 dan F6 memiliki reduksi terhadap campuran kapang yang paling baik dengan reduksi campuran kapang mencapai > 6 log reduksi.

Efektivitas Preservatif Pada Campuran Khamir

Hasil pengujian efektivitas preservatif terhadap campuran khamir menunjukkan bahwa formula F1, F3, F4, F5, dan F6 efektif dalam menghambat pertumbuhan khamir, sesuai dengan persyaratan keberterimaan *British Pharmacopoeia*. Sebaliknya, formula F2 dinyatakan tidak efektif karena tidak mampu

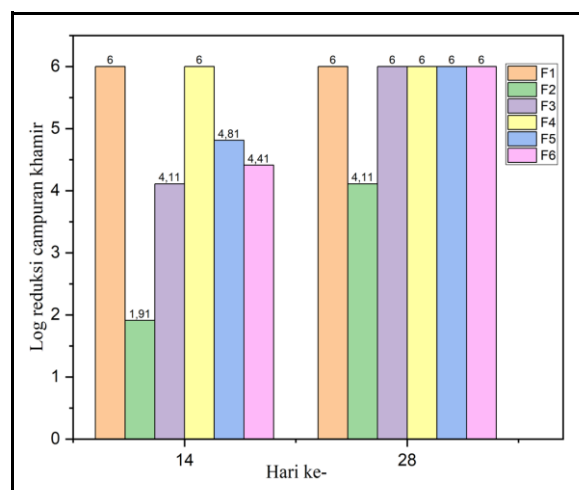
mereduksi jumlah khamir hingga log 2 pada hari ke-14, dan khamir masih terdeteksi hingga akhir masa pengujian. Detail hasil pengujian *challenge test* ini dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Pengujian Efektivitas Preservatif Terhadap Campuran Khamir pada Produk Tisu Basah menggunakan Metode *Challenge Test*.

Formula	Reduksi campuran khamir (log)		
	Hari ke-7	Hari ke-14	Hari ke-28
F1	TD	> 6,00	> 6,00
F2	TD	1,91	4,11
F3	TD	4,11	> 6,00
F4	TD	> 6,00	> 6,00
F5	TD	4,81	> 6,00
F6	TD	4,41	> 6,00

Notes: TD (Tidak diuji)

Kemampuan reduksi preservatif dapat dilihat pada Gambar 3. Gambar 3 mengilustrasikan efek reduksi terbaik terdapat pada produk dengan formula F1 dan F4, dimana kedua formula tersebut mampu mereduksi jumlah khamir hingga lebih dari log 6. Sedangkan, produk tisu basah yang memiliki efek reduksi lebih rendah dibandingkan dengan yang lainnya adalah produk pada formula F2. Hal ini dikarenakan pada hari ke-14, formula F2 hanya mampu mereduksi campuran khamir sebesar 1,91 lebih rendah dari yang dipersyaratkan oleh british pharmacopoeia yang mensyaratkan minimal reduksi khamir mencapai log 2 pada hari ke-14.



Gambar 3. Diagram Pengaruh Preservatif Terhadap Log Reduksi Campuran Kapang Pada Uji *Challenge Test*.

Pembahasan

Sterilitas Produk Tisu Basah.

Uji sterilitas pada produk tisu basah merupakan hal yang penting untuk memastikan bahwa produk yang dihasilkan tidak hanya aman, namun juga memiliki sifat fisiko-kimia yang stabil. Sterilitas produk tisu basah dapat disebabkan oleh proses produksi yang tidak memperhatikan aspek *hygiene* sebagai aspek primer, namun juga dapat disebabkan pada saat penggunaan oleh konsumen sebagai aspek sekunder. Aspek kontaminasi primer dapat dicegah oleh proses manufaktur yang bersih dan steril sedangkan aspek sekunder dapat ditangani oleh preservatif (Baddam et al., 2021). Oleh karena itu, sebelum melakukan uji efektivitas terhadap bakteri, kapang dan khamir, harus dipastikan terlebih dahulu bahwa produk yang akan diuji sudah terbebas dari cemaran mikroorganisme patogen.

Pada Tabel 2, dapat dilihat bahwa semua jenis formula yang diuji (dari F1 hingga F6) menunjukkan pertumbuhan mikroorganisme kurang dari 10 cfu/g, baik pada media TSA dan SDA. Hasil < 10 cfu/g menunjukkan bahwa semua formula tisu basah memiliki tingkat kontaminasi mikroorganisme yang rendah atau bahkan tidak ada pertumbuhan mikroorganisme yang terdeteksi, baik bakteri ataupun jamur. Hal ini mengindikasikan bahwa produk-produk tersebut memenuhi standar sterilitas yang ketat. Jika dibandingkan dengan hasil syarat keberterimaan sterilitas yang dipersyaratkan oleh *British Pharmacopoeia* yang mensyaratkan bahwa jumlah cemaran mikrobiologi maksimal 1000 cfu/g, hasil dari pengujian ini jauh di bawah syarat keberterimaan tersebut. Ketika hasil sterilitas pada pengujian ini dibandingkan dengan standar yang lebih ketat yaitu *US Pharmacopoeia* yang mensyaratkan bahwa batas maksimum jumlah total mikroba aerobik sebesar 200 cfu/g, serta total kapang dan khamir sebesar 1000 cfu/g, semua produk ini masih berada di bawah ambang batas tersebut (Ziklo et al., 2024). Ini mengkonfirmasi bahwa semua formula yang diujikan memiliki kualitas mikrobiologi yang sangat baik untuk digunakan.

Efektivitas Preservatif Produk Tisu Basah Terhadap Bakteri.

Pengujian efektivitas preservatif pada penelitian ini menggunakan metode *challenge test*. Salah satu kelebihan metode *challenge test* dibandingkan dengan metode lainnya dalam menilai efektivitas preservatif yaitu *challenge test* dapat memberikan data empiris yang kuat tentang efektivitas preservatif dalam mencegah terjadinya kontaminasi mikroorganisme patogen. *Challenge test* juga dapat memberikan data yang akurat dan objektif mengenai efektivitas suatu preservatif dalam kondisi yang terkontrol (Giorgio et al., 2018). Ketika produk tisu basah digunakan oleh konsumen, resiko kontaminasi tidak hanya datang dari satu jenis bakteri saja, namun resiko kontaminasi bakteri mungkin datang dari beberapa jenis bakteri baik bakteri gram negatif maupun bakteri gram positif, oleh karena itu, pada penelitian digunakan teknik uji campuran atau inokulasi multispesies untuk mensimulasikan sesuai praktis yang mungkin terjadi ketika penggunaan produk oleh konsumen (Russell, 2003).

Jenis bakteri yang akan diuji terdapat delapan jenis bakteri, baik bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif. Bakteri gram positif yang diuji adalah *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella pneumonia*, *Pluralibacter gergoviae*, *Escherichia coli*, sedangkan bakteri gram positif yang diuji adalah *Staphylococcus aureus* serta *Staphylococcus epidermidis*. Bakteri gram negatif merupakan bakteri uji yang banyak digunakan pada penelitian ini. Hal ini dikarenakan bakteri gram negatif lebih bersifat resisten terhadap preservatif dibandingkan dengan bakteri gram positif. Bakteri gram negatif dapat memproduksi enzim inaktivator preservatif serta memiliki efek pompa *efflux* sehingga dapat bersifat lebih resisten terhadap preservatif (Strateva & Yordanov, 2009).

Jika dilihat pada Tabel 3, formula tisu basah F1 dan F4 menunjukkan reduksi bakteri yang sangat baik dengan nilai log reduksi > 6 pada hari ke-7 dan terus stabil hingga hari ke-28. Angka ini menunjukkan bahwa populasi campuran bakteri berkurang lebih dari 6 log unit, yang mengindikasikan efektivitas pengawet yang sangat tinggi. Sedangkan formula lainnya seperti F2, F3, F5 dan F6 memiliki pola yang hampir sama. Pada hari ke-7 log reduksi keempat

formula tersebut berkisar antara 3,88 hingga 4,80. Meskipun tidak mencapai 6 log reduksi, nilai tersebut masih menunjukkan reduksi yang signifikan terhadap populasi bakteri. Di hari ke-14 dan hari ke-28 semua formula menunjukkan reduksi bakteri hingga >6 log reduksi. Ini mengindikasikan bahwa sistem preservatif membutuhkan waktu yang lebih lama untuk mencapai efektivitas maksimum dalam mengurangi populasi bakteri hingga batas yang sangat rendah. Perbedaan respon pada hari ke-7 antara formula F1 dan F4 dibandingkan dengan formula F2, F3, F5 dan F6, menunjukkan adanya variasi dalam kecepatan aksi pengawet. Formula F1 dan F4 menunjukkan efek bakterisida yang lebih cepat dengan mencapai efek reduksi maksimum dengan hanya waktu satu minggu. Hal ini dikarenakan formula F1 mengandung benzalkonium chloride dan polyaminopropyl biguanide yang merupakan golongan kationik surfaktan yang memiliki efek bakterisida yang sangat kuat terhadap bakteri, sehingga dapat membunuh bakteri dengan sangat cepat (Brycki et al., 2017; Rembe et al., 2016). Keberhasilan semua formula dalam mencapai log reduksi > 6 pada akhir masa pengujian *challenge test* menunjukkan bahwa formulasi yang dikembangkan memiliki sistem pengawet yang kuat dan stabil, sehingga mampu mengatasi potensi masalah pertumbuhan bakteri dan pembentukan biofilm. Kemampuan dalam mempertahankan efektivitas ini hingga hari ke-28 merupakan indikator penting dari stabilitas jangka panjang produk terhadap kontaminasi bakteri selama masa pakainya.

Efektivitas Preservatif Produk Tisu Basah Terhadap Kapang.

Kapang merupakan kelompok jamur yang menghasilkan hifa dan memiliki sifat *ubiquitous*, yang berarti jamur ini dapat ditemukan hampir di semua lingkungan, mulai dari tanah, lemak tubuh (seperti keringat), hingga debu yang dapat berfungsi sebagai media penyebaran mikroorganisme tersebut. Keberadaan kapang pada produk tisu basah dapat menyebabkan perubahan fisik yang signifikan, seperti pemisahan emulsi, perubahan warna tisu menjadi coklat gelap, serta munculnya bercak hitam pada permukaan tisu (Lee et al., 2022). Salah satu tantangan utama dalam pengendalian pertumbuhan kapang adalah resistensinya

terhadap preservatif dan bahan antimikroba, yang lebih kuat dibandingkan dengan mikroorganisme lain. Kapang dapat memproduksi berbagai enzim, seperti dismutase peroksi redoks dan tioredoksin, yang berfungsi untuk melindungi sel-sel kapang dari kerusakan yang disebabkan oleh gangguan eksternal, termasuk efek dari preservatif dan agen antimikroba (Vallejo et al., 2012). Oleh karena itu, pengujian *challenge test* terhadap kapang, terutama yang melibatkan spesies seperti *Aspergillus brasiliensis* dan *Penicillium pinophilum*, menjadi sangat penting untuk menilai efektivitas pengawet dalam menghambat pertumbuhannya pada produk-produk yang rentan terhadap kontaminasi mikroba.

Tabel 4, menunjukkan data reduksi preservatif yang bervariasi. Preservatif terbaik terdapat pada produk tisu basah dengan formula F1, F5 dan F6. Ketiga formula tersebut menunjukkan reduksi > 6 log reduksi pada hari ke-14 dan stabil hingga akhir masa pengujian. Ini mengindikasikan efektivitas pengawet yang sangat tinggi dalam menekan pertumbuhan kapang. Sedangkan, preservatif pada produk dengan formula F2, F3 dan F4 dinyatakan tidak lolos pengujian *challenge test*. Hal ini dikarenakan eliminasi total pada hari ke-28 menunjukkan bahwa meskipun preservatif tersebut dapat mengurangi konsentrasi awal, Preservatif tersebut tidak cukup kuat untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme dibawah batas deteksi dalam jangka waktu yang panjang. Hal ini didukung beberapa penelitian terdahulu. F1 mengandung preservatif *phenoxyethanol* dan *benzalkonium chloride*. *Phenoxyethanol* dikenal memiliki efek sinergis dengan beberapa jenis antimikroba seperti golongan kationik surfaktan, *isothiazolinone* dan *carbamate*, sehingga dapat mereduksi jumlah kapang dengan waktu yang singkat (Alshehrei, 2024). Formula F4 mengandung *cetylpyridinium chloride* yang dikenal memiliki efek antimikroba yang kuat terhadap jamur, salah satunya adalah kapang dan mampu mereduksi kapang dengan mengganggu integritas membran sel jamur, sehingga menyebabkan lisis sel dan mengurangi viabilitas jamur (Phillips & Kaplan, 1976). Sedangkan F3 meskipun hanya mengandung satu jenis preservatif yaitu *chlorphenesin*, namun *chlorphenesin* ini memiliki efek yang sangat baik terhadap kapang. Kekuatan reduksi

chlorphenesin bahkan dinyatakan lebih baik jika dibandingkan dengan daya reduksi *chlorphenesin* terhadap bakteri yang ditunjukkan dengan nilai *minimum inhibitory concentration* yang lebih rendah ke mikroorganisme kapang dibandingkan dengan bakteri (Josephe & Noel, 1997).

Efektivitas Preservatif Produk Tisu Basah Terhadap Khamir.

Khamir merupakan mikroorganisme eukariotik yang diklasifikasikan dalam kingdom fungi yang bersifat uniseluler. Salah satu jenis khamir yang dikenal dan sering mengkontaminasi produk tisu basah adalah golongan *Candida* seperti *Candida albicans* dan *Candida parapsilosis*. Khamir memiliki resistensi terhadap sistem preservatif yang baik. kemampuan resistensi khamir akan naik jika kondisi lingkungannya memiliki kelembaban atau kadar air yang tinggi, seperti yang ditemukan pada tisu basah. Mekanisme pertahanan khamir terhadap preservatif adalah pembentukan biofilm dan over ekspresi gen transport protein *efflux* seperti CDR1 dan CDR2 yang berfungsi memompa preservatif atau antibiotik keluar dari sel khamir serta mutasi pada gen *ergosterol* pada khamir (Li et al., 2023). Pada penelitian ini, digunakan teknik yang sama yaitu teknik inokulasi multispecies terhadap dua jenis khamir yaitu *C. albicans* dan *C. parapsilosis*, sehingga bisa didapatkan profil reduksi dari dua jenis khamir tersebut pada berbagai jenis preservatif.

Pada Tabel 4 dapat dilihat bahwa formula F1 dan F4 memiliki efek reduksi yang sangat baik terhadap campuran khamir. Kedua formula ini menunjukkan log reduksi > 6,00. Angka ini jauh melampaui syarat minimal 2 log reduksi pada hari ke-14. Ini mengindikasikan bahwa sistem pengawet pada formulasi F1 dan F4 memiliki aktivitas fungisida yang sangat kuat dan cepat dalam menekan populasi khamir. Dan nilai tersebut bertahan hingga hari ke-28, ini menggambarkan bahwa sistem preservatif dapat bekerja dalam waktu yang lama, sehingga menawarkan stabilitas efikasi yang baik jika diaplikasikan pada tisu basah. Formula dengan kode F3, F5 dan F6, memiliki pola reduksi yang hampir sama yaitu pada hari ke-14 log reduksi ketiga formula tersebut berada pada rentang 4,11 hingga 4,81. Semua nilai tersebut memenuhi

syarat minimal 2 log reduksi pada hari ke-14. Hal ini menunjukkan sistem preservatif pada formula tersebut cukup efektif dalam mengurangi populasi khamir pada tahap awal. Sedangkan pada akhir masa pengujian, ketiga formula tersebut dapat mereduksi khamir hingga > 6 log reduksi mengindikasikan bahwa populasi khamir telah berkurang hingga dibawah batas deteksi. Formula F2 merupakan satu-satunya jenis surfaktan yang tidak dinyatakan tidak efektif. Hal ini dikarenakan formula F2 menunjukkan log reduksi 1,91 pada hari ke-14, dimana nilai ini tidak memenuhi syarat minimal 2 log reduksi pada hari ke-14. Ini menunjukkan bahwa pengawet pada formula ini tidak cukup efektif dalam mengurangi populasi khamir pada tahap awal. Pada hari ke-28 memang terjadi peningkatan log reduksi mencapai 4,11, namun nilai ini masih menyisakan populasi khamir sehingga formula F2 dinyatakan tidak efektif untuk menghambat pertumbuhan khamir.

Secara keseluruhan, hasil pengujian efektivitas preservatif terhadap campuran khamir pada produk tisu basah ini menunjukkan hasil yang signifikan antar formula. Formula F1, F3, F4, F5 dan f6 menunjukkan kinerja yang sangat baik, memenuhi semua syarat keberterimaan yang ketat untuk khamir sehingga mengindikasikan sistem pengawet yang kuat dan stabil pada campuran khamir. Sebaliknya, formula F2 (*phenoxyethanol* 0,80%, natrium benzoat 0,50% dan kalium sorbat 0,60%) gagal memenuhi kriteria reduksi awal pada hari ke-14 dan juga kriteria eliminasi total pada hari ke-28. Penelitian ini didukung penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa natrium benzoat memiliki *minimum inhibitory concentration* sebesar 25000 ppm (2,50%) sedangkan kalium sorbat memiliki *minimum inhibitory concentration* 50000 ppm (5,0%) terhadap khamir *C. albicans*, sedangkan yang digunakan di formulasi tersebut natrium benzoat dengan konsentrasi 0,50% dan kalium sorbat dengan konsentrasi 0,60% (Cabezas-Pizarro et al., 2018; Dehghan et al., 2018). Hal ini termanifestasi pada hasil *challenge test* yang menyatakan bahwa sistem preservatif tidak cukup kuat untuk menghambat pertumbuhan khamir.

Kesimpulan

Berdasarkan temuan dalam penelitian ini, seluruh formula produk tisu basah yang diuji

telah memenuhi standar sterilitas, dengan tingkat kontaminasi mikroorganisme yang sangat rendah. Namun, dalam uji efektivitas pengawet untuk mencegah kontaminasi mikroorganisme, formula F1 menunjukkan kinerja terbaik dengan reduksi lebih dari 6 log terhadap bakteri, kapang, dan khamir pada hari ke-14. Formula F5 dan F6 juga menunjukkan efektivitas pengawet yang sangat baik terhadap bakteri, kapang, dan khamir, memenuhi seluruh persyaratan *challenge test* meskipun dengan kecepatan reduksi yang lebih lambat dibandingkan F1. Sementara itu, formula F2, F3, dan F4 dinyatakan tidak efektif karena gagal memenuhi persyaratan *challenge test* terhadap kapang atau khamir.

Ucapan Terima Kasih

Penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada ibu Nurani Sofiana dan ibu Stradivary Firdaus atas kontribusi mereka dalam memberikan saran dan kritik untuk artikel penelitian ini. Penelitian ini didanai menggunakan dana pribadi.

Referensi

- Almoughrabie, S., Ngari, C., Guillier, L., Briandet, R., Poulet, V., & Dubois-Brissonnet, F. (2020). Rapid assessment and prediction of the efficiency of two preservatives against *S. aureus* in cosmetic products using High Content Screening—Confocal Laser Scanning Microscopy. *PLOS ONE*, 15(7), e0236059.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236059>
- Alshehrei, F. M. (2024). Microbiological Quality Assessment of Skin and Body care Cosmetics by using Challenge test. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 31(4), 103965.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2024.103965>
- Azman, A.-S., Mawang, C.-I., & Abubakar, S. (2018). Bacterial Pigments: The Bioactivities and as an Alternative for Therapeutic Applications. *Natural Product Communications*, 13(12), 1934578X1801301.
<https://doi.org/10.1177/1934578X1801301>

- 1240
- Baddam, A., Simran, N., Lakshmi, V. P., Akhila, H., & Sharma, J. V. C. (2021). Review on Sterility Testing. *Internatona Journal of Pharmaceutical Research and Applications*, 6(1), 581–586. <https://doi.org/DOI: 10.35629/7781-0601581587>
- Brycki, B., Koziróg, A., Kowalczyk, I., Pospieszny, T., Materna, P., & Marciniak, J. (2017). Synthesis, Structure, Surface and Antimicrobial Properties of New Oligomeric Quaternary Ammonium Salts with Aromatic Spacers. *Molecules*, 22(11), 1810. <https://doi.org/10.3390/molecules22111810>
- Cabezas-Pizarro, J., Redondo-Solano, M., Umaña-Gamboa, C., & Arias-Echandi, M. L. (2018). Antimicrobial activity of different sodium and potassium salts of carboxylic acid against some common foodborne pathogens and spoilage-associated bacteria. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1), 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.11.011>
- Dehghan, P., Mohammadi, A., Mohammadzadeh-Aghdash, H., & Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. (2018). Pharmacokinetic and toxicological aspects of potassium sorbate food additive and its constituents. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.012>
- European Chemical Agency, E. (2024). *Cosmetic Products Regulation, Annex V - Allowed Preservatives* (Cosmetic Products Regulation Annex V-11/01/2024; pp. 1–5). European Chemical Agency.
- Fiorentino, F. A. M., Chorilli, M., & Salgado, H. R. N. (2011). The use of the challenge test to analyse preservative efficiency in non-sterile cosmetic and health products: Applications and critical points. *Analytical Methods*, 3(4), 790. <https://doi.org/10.1039/c0ay00597e>
- Giorgio, A., Miele, L., Bonis, S., Conforti, I., Palmiero, L., Guida, M., Libralato, G., & Aliberti, F. (2018). Microbiological Stability of Cosmetics by using Challenge Test Procedure. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(1), 23–28. <https://doi.org/10.22207/JPAM.12.1.04>
- Grand View research. (2022). *Wet Wipes Market Size And Share Analysis Report, 2030* (Market Report GVR-4-68039-713-5; Wet Wipes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Household Wipes, Baby Wipes, Intimate Wipes), By Material (Non Woven, Woven), By Distribution Channel, By Region And Segment Forecasts, 2023 - 2030, p. 115). Grand View research. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/wet-wipes-market-report/methodology>
- Hadley, T., Hickey, K., Lix, K., Sharma, S., Berretta, T., & Navessin, T. (2022). Flushed but not forgotten: The rising costs and opportunities of disposable wet wipes. *BioResources*, 18(1). <https://doi.org/10.15376/biores.18.1.Hadley>
- Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R., & Barreiro, M. F. (2018). Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. *Molecules*, 23(7), 1571. <https://doi.org/10.3390/molecules23071571>
- Josephe, G. M., & Noel, C. J. (1997). *Utilisation De La Chlorphenesine Comme Agent Conservateur* (Patent FR 2748208A1).
- Kang, J., Sung, M., Kim, J. H., & Yoon, Y. (2023). Pretreatments for Microbial Analysis and Evaluation of Hygiene of Wet Towels and Wet Wipes. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 17(2), 780–787. <https://doi.org/10.22207/JPAM.17.2.03>
- Lee, H. J., Lim, S. J., Jung, D. W., Kim, Y. J., & Lee, C. S. (2022). Evaluation of the awareness of the effects of aroma oils and assessment of the antioxidant and brightening effects. *Journal of Cosmetic Medicine*, 6(1), 40–47. <https://doi.org/10.25056/JCM.2022.6.1.40>
- Li, X., Kong, B., Sun, Y., Sun, F., Yang, H., & Zheng, S. (2023). Synergistic potential of teriflunomide with fluconazole against resistant *Candida albicans* in vitro and in vivo. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1282320.

- <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1282320>
- Mohamed, M. I. (2004). Optimization of chlorphenesin emulgel formulation. *The AAPS Journal*, 6(3), 81–87. <https://doi.org/10.1208/aapsj060326>
- Pham, V. H. T., Kim, J., Chang, S., & Chung, W. (2021). Investigation of Lipolytic-Secreting Bacteria from an Artificially Polluted Soil Using a Modified Culture Method and Optimization of Their Lipase Production. *Microorganisms*, 9(12), 2590. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122590>
- Phillips, B. J., & Kaplan, W. (1976). Effect of cetylpyridinium chloride on pathogenic fungi and *Nocardia asteroides* in sputum. *Journal of Clinical Microbiology*, 3(3), 272–276. <https://doi.org/10.1128/jcm.3.3.272-276.1976>
- Rahman, S. (Ed.). (2007). *Handbook of food preservation* (2nd ed). CRC Press.
- Rembe, J.-D., Fromm-Dornieden, C., Schäfer, N., Böhm, J. K., & Stuermer, E. K. (2016). Comparing two polymeric biguanides: Chemical distinction, antiseptic efficacy and cytotoxicity of polyaminopropyl biguanide and polyhexamethylene biguanide. *Journal of Medical Microbiology*, 65(8), 867–876. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000294>
- Rodriguez, K. J., Cunningham, C., Foxenberg, R., Hoffman, D., & Vongsa, R. (2020). The science behind wet wipes for infant skin: Ingredient review, safety, and efficacy. *Pediatric Dermatology*, 37(3), 447–454. <https://doi.org/10.1111/pde.14112>
- Russell, A. D. (2003). Challenge testing: Principles and practice. *International Journal of Cosmetic Science*, 25(3), 147–153. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2494.2003.00179.x>
- Salama, P., Gliksberg, A., Cohen, M., Tzafrir, I., & Ziklo, N. (2021). Why Are Wet Wipes So Difficult to Preserve? Understanding the Intrinsic Causes. *Cosmetics*, 8(3), 73. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8030073>
- Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58(9), 1133–1148. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>
- Vallejo, M. C., Nakayasu, E. S., Matsuo, A. L., Sobreira, T. J. P., Longo, L. V. G., Ganiko, L., Almeida, I. C., & Puccia, R. (2012). Vesicle and Vesicle-Free Extracellular Proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: Comparative Analysis with Other Pathogenic Fungi. *Journal of Proteome Research*, 11(3), 1676–1685. <https://doi.org/10.1021/pr200872s>
- Veena, S., Kaur, S., & Kulkarni, G. (2021). FORMULATION AND EVALUATION OF ANTIFUNGAL CREAM OF CHLORPHENESIN. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 76–81. <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2021v13i5.1898>
- Yablonski, J. I., & Mancuso, S. E. (2007). Preservative Efficacy Testing: Accelerating the Process. *Cosmetics and Toiletries Magazine*, 122(10), 51–62.
- Ziklo, N., Yuli, I., Bibi, M., & Salama, P. (2024). The Influence of Physical Characteristics of Wet Wipe Fabrics on the Microbial Biomass Accumulation. *Cosmetics*, 11(4), 106. <https://doi.org/10.3390/cosmetics11040106>