

UJI EFEKTIVITAS PENGAWET BENZALKONIUM KLORIDA DALAM DUA MACAM OBAT TETES MATA NAFAZOLIN HIDROKLORIDA YANG BEREDAR DI PASARAN

Sohadi Warya, Sulistianingsih, Heni Satya Wijayanti
Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Padjadjaran, Jatinangor-Sumedang

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian mengenai uji efektivitas pengawet Benzalkonium Klorida 0,01% dalam dua sediaan tetes mata yang beredar di pasaran. Pengujian dilakukan terhadap 2 produk, yaitu produk O yang mengandung Nafazolin Hidroklorida dan produk Z yang mengandung Nafazolin Hidroklorida dan Seng Sulfat. Uji efektivitas pengawet Benzalkonium Klorida dilakukan terhadap 4 mikroba uji, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*. Data yang diperoleh dari hasil penelitian kemudian diuji secara statistika menggunakan desain eksperimen faktorial 4x8x2 dan uji Newman Keuls. Hasil penelitian menunjukkan pengawet Benzalkonium Klorida dalam produk O dan Z efektif mematikan mikroba uji dan mencegah terjadinya kontaminasi. Pengujian statistika menggunakan desain eksperimen faktorial 4x8x2 menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan terhadap efektivitas pengawet Benzalkonium Klorida pada produk O dan produk Z. Uji Newman Keuls menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada pengawet Benzalkonium Klorida dalam mematikan *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*.

Kata kunci; Benzalkonium klorida, Tetes mata, Nafazolin hidroklorida

ABSTRACT

A research concerned preservative effectiveness testing of Benzalkonium Chloride 0,01% of two multidose eye drops preparation that was available commercially has been done. The research studied 2 products, product O contained Nafazolin Hydrochloride and product Z contained Nafazolin Hydrochloride and Zinc Sulfas. Its applied to Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Candida albicans as test organisms. The data of this research is tested statistically using design of factorial experiment 4x8x2 and Newman Keuls testing. The result showed that Benzalkonium Chloride 0,01% as preservative of product O and product Z was effective to destroy test organisms and to prevent from contamination. Statistic test using design of factorial experiment 4x8x2 showed that there was not a significant difference of preservative effectiveness of Benzalkonium Chloride contained in product O and product Z. Newman Keuls testing showed that there was significant difference of preservative effectiveness of Benzalkonium Chloride to destroy Staphylococcus aureus and Candida albicans.

Keywords: Benzalkonium chloride, Eyedrops, Nafazolin Hydrochloride

PENDAHULUAN

Setiap larutan tetes mata yang mengandung bahan pengawet harus tidak mengiritasi serta dapat mencegah berkembang atau masuknya mikroorganisme dengan tidak sengaja ke dalam larutan obat

mata ketika wadah terbuka selama pemakaian. Selain itu, harus diperhatikan juga sifat dari pengawet, seperti kelarutan dari pengawet dan efek yang terjadi pada zat aktifnya (Ansel, H. C., 1989).

Larutan Benzalkonium Klorida mempunyai range aktivitas antibakteri yang

lebar, khususnya terhadap bakteri gram positif. Benzalkonium Klorida mempunyai sifat higroskopis dan mungkin juga dapat dipengaruhi oleh cahaya, air dan logam (Pelczar, 1996).

Benzalkonium Klorida merupakan senyawa turunan amonium kuartener yang digunakan pada formulasi farmasetik sebagai pengawet. Senyawa ini bersifat surfaktan kationik, yang aktivitasnya akan tidak aktif oleh sabun dan surfaktan anionik (Remington, J. P., 1975). Benzalkonium Klorida tidak tercampurkan dengan aluminium, surfaktan anionik, sitrat, kapas, fluoresein, hidrogen peroksida hidroksipropil metilselulosa, iod, kaolin, lanolin, nitrat, surfaktan nonionik dalam konsentrasi tinggi, permanganat, protein, salisilat, garam-garam perak, sabun, sulfonamida, tartrat, seng oksida, seng sulfat, beberapa macam karet dan plastik (Wade, A.,1994).

Untuk mengetahui efektivitas pengawet Benzalkonium Klorida dalam obat tetes mata yang mengandung Nafazolin Hidroklorida dan obat tetes mata yang mengandung Nafazolin Hidroklorida dan Seng Sulfat, maka akan dilakukan pengujian efektivitas pengawet Benzalkonium klorida yang dilakukan selama 28 hari penyimpanan dengan menggunakan mikroba uji.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini berupa sediaan tetes mata ganda yang terdiri dari dua macam produk, yaitu :

1. Produk O (produk yang mengandung Nafazolin Hidroklorida sebagai zat aktif dan Benzalkonium klorida 0,01% sebagai pengawet).
2. Produk Z (produk yang mengandung Nafazolin Hidroklorida dan Seng Sulfat sebagai zat aktif dan Benzalkonium Klorida 0.01% sebagai pengawet).

Mikroba Uji

Pada penelitian ini mikroba uji yang digunakan adalah :

- Bakteri : *Staphylococcus aureus* (Biofarma), *Pseudomonas aeruginosa* (Biofarma) dan *Escherichia coli* (Biofarma).
- Jamur : *Candida albicans* (Biofarma).

Media Uji

Media uji yang digunakan untuk pengembangan mikroba uji segar adalah agar nutrisi untuk pertumbuhan bakteri dan agar *Sabouraud Dextrose* untuk pertumbuhan jamur, karena sesuai untuk pertumbuhan masing-masing mikroba uji. Sedangkan media uji yang digunakan untuk penghitungan jumlah mikroba uji viabel adalah agar nutrisi.

Metode Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel obat tetes mata sebagai bahan uji untuk uji efektivitas pengawet adalah melalui pengambilan secara acak dua obat tetes mata yang beredar di pasaran, terdiri atas satu obat tetes mata yang mengandung Nafazolin Hidroklorida sebagai zat aktif dan Benzalkonium Klorida sebagai pengawet dan satu obat tetes mata yang mengandung Nafazolin Hidroklorida dan Seng Sulfat sebagai zat aktif dan Benzalkonium Klorida sebagai pengawet.

2. Pembuatan Media Uji

Cara pembuatan media uji untuk pertumbuhan dan penghitungan jumlah mikroba uji viabel adalah sebagai berikut :

Media Agar Nutrien

Ditimbang agar nutrisi sebanyak 28 gram, masukkan ke dalam erlenmeyer, larutkan dalam 1 liter aquadest yang telah dididihkan terlebih dahulu, kemudian larutkan sempurna di atas penangas air. Tutup dengan kapas yang telah dibalut kain kasa. Sterilkan dengan menggunakan sterilisasi A, pemanasan dengan otoklaf.

Media Agar Sabouraud Dextrose

Ditimbang agar *Sabouraud Dextrose* sebanyak 65 gram, masukkan ke dalam Erlenmeyer, larutkan dalam 1 liter aquadest yang telah dididihkan terlebih dahulu, kemudian larutkan sempurna di atas penangas air. Tutup dengan kapas yang telah

dibalut kain kasa. Sterilkan dengan menggunakan sterilisasi A, penanaman dengan otoklaf.

3. Pembuatan Suspensi Mikroba Uji

Sebelum pengujian dilakukan, inokulasikan permukaan media uji dengan biakan mikroba uji untuk mendapatkan persediaan mikroba uji segar. Masing-masing mikroba uji diinokulasikan pada agar miring dengan media yang sesuai yang telah diberi tanda dengan nama mikroba uji yang akan dikembangkan. Inkubasi biakan bakteri pada suhu 30-35° C selama 18-24 jam dan biakan jamur pada suhu 20-25° C selama 48 jam.

Untuk memanen biakan bakteri dan jamur digunakan larutan NaCl 0,9% steril, dengan cara mengambil 1 koloni mikroba yang tumbuh di permukaan agar kemudian disuspensikan dalam NaCl 0,9% steril dalam tabung steril. Ukur absorbansi dengan menggunakan panjang gelombang tertentu. Tambahkan NaCl 0,9% steril jika perlu untuk mengurangi jumlah angka mikroba uji sehingga jumlah mikroba uji dalam sediaan segera setelah inokulasi adalah 100.000-1.000.000 cfu/ml.

4. Prosedur Kerja

Siapkan masing-masing 4 buah obat tetes mata produk A dan B, kemudian tandai dengan nama mikroba uji yang akan diinokulasikan. Inokulasi masing-masing wadah dengan menggunakan suspensi mikroba uji menggunakan perbandingan 0,10 ml inokulum setara dengan 20 ml volume sampel (sampel yang diuji bervolume 5 ml dan 10 ml, jadi suspensi yang diinokulasikan ke dalam sampel adalah 0,025 ml dan 0,05 ml), campurkan. Di samping itu, tetapkan juga jumlah awal mikroba uji yang dimasukkan ke dalam sediaan dengan menggunakan metode pengenceran dan cawan tuang (jumlah awal mikroba uji dalam sediaan segera setelah inokulasi adalah 100.000-1.000.000 cfu/ml). Inkubasikan wadah yang telah diinokulasi pada suhu ruangan. Kemudian lakukan pengamatan pada hari ke 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 dan 28 setelah inokulasi. Setelah itu tetapkan jumlah mikroba viabel pada tiap selang

waktu tersebut dengan metode lempeng agar. Hitung perubahan kadar dalam persen tiap mikroba uji selama pengujian berlangsung.

Lakukan pengujian ulang terhadap masing-masing 4 buah obat tetes mata produk A dan B dengan prosedur yang sama.

5. Analisis Data

Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan efektivitas pengawet Benzalkonium Klorida pada sediaan produk O dan Z karena pengaruh penambahan seng sulfat pada sediaan produk Z, maka data yang diperoleh dari pengujian diolah secara statistika menggunakan desain eksperimen faktorial. Setelah itu dilanjutkan dengan uji Newman Keuls untuk mengetahui efektivitas pengawet Benzalkonium Klorida terhadap masing-masing mikroba uji pada produk O dan Z.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil Perhitungan Jumlah Awal Mikroba Uji

Setelah dilakukan penanaman dengan menggunakan metode cawan tuang dan media agar nutrisi didapat jumlah awal rata-rata biakan masing-masing mikroba uji yang terdapat dalam setiap obat tetes mata O dan Z seperti tertera pada tabel 2.1 berikut :

Tabel 1 Jumlah awal rata-rata mikroba uji dalam cfu (*colony forming units*) per ml untuk uji efektivitas pengawet Benzalkonium Klorida pada obat tetes mata Nafazolin Hidroklorida dan obat tetes mata campuran Nafazolin Hidroklorida dan Seng Sulfat.

Mikroba Uji	PERCOBAAN I	PERCOBAAN II
SA	960.000	984.000
PA	770.000	956.000
EC	900.000	694.000
CA	784.000	960.000

Keterangan :

SA = *Staphylococcus aureus* ; PA = *Pseudomonas aeruginosa* ; EC = *Escherichia coli* ; CA = *Candida albicans*

Berdasarkan tabel 2.1 dapat disimpulkan bahwa jumlah awal rata-rata setiap mikroba untuk uji efektivitas pengawet Benzalkonium Klorida yang diinokulasikan ke dalam bahan uji memenuhi persyaratan yang terantun dalam Farmakope Indonesia Edisi ke-4, yaitu jumlah mikroba di dalam sediaan uji segera setelah inokulasi adalah antara 100.000 dan 1.000.000 cfu/ml.

2. Hasil Perhitungan Jumlah Mikroba Uji dalam Rentang Waktu Pengamatan

Setelah dilakukan penginokulasian biakan masing-masing mikroba uji pada obat tetes mata O dan Z, dilakukan penginkubasian dan penanaman dengan cara metode lempeng agar untuk mengetahui jumlah mikroba viabel per ml.

Hasil perhitungan jumlah mikroba uji selama 28 hari pengujian, dengan pengamatan pada hari ke 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 dan 28 setelah inokulasi tercantum pada tabel 2.2 berikut :

Tabel 2 Jumlah mikroba pada uji efektivitas pengawet Benzalkonium Klorida dalam obat tetes mata Nafazolin Hidroklorida dan obat tetes mata campuran Nafazolin Hidroklorida dan Seng Sulfat selama 28 hari pengamatan.

Percobaan I :

Hari Pengamatan	SA		PA		EC		CA	
	O	Z	O	Z	O	Z	O	Z
1	1.000	0	0	1.000	1.000	2.000	0	2.000
2	0	0	0	1.000	0	1.000	1.000	4.000
3	0	0	0	0	0	0	6.000	11.000
4	0	0	0	0	0	0	24.000	19.000
7	0	0	0	0	0	0	167.000	113.000
14	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0

Percobaan II :

Hari Pengamatan	SA		PA		EC		CA	
	O	Z	O	Z	O	Z	O	Z
1	2.000	0	0	1.000	1.000	2.000	0	2.000
2	0	0	0	1.000	0	1.000	1.000	4.000
3	0	0	0	0	0	0	6.000	11.000
4	0	0	0	0	0	0	24.000	19.000
7	0	0	0	0	0	0	167.000	113.000
14	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0

Kedua tabel di atas menunjukkan bahwa pengawet Benzalkonium Klorida dapat menurunkan jumlah semua mikroba uji, baik bakteri (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) maupun jamur (*Candida albicans*) mulai dari hari ke-14 selama 28 hari pengujian.

Dengan melihat jumlah awal mikroba uji dan jumlah mikroba uji setelah diinokulasikan dalam rentang waktu pengamatan selama 28 hari dapat dihitung persentase rata-rata pengurangan mikroba uji, hasil perhitungan tertera pada tabel 2.3.

Tabel 3 Persentase rata-rata pengurangan mikroba uji dalam rentang waktu pengamatan selama 28 hari pada uji efektivitas pengawet Benzalkonium Klorida dalam obat tetes mata Nafazolin Hidroklorida

Percobaan I :

Hari Pengamatan	SA		PA		EC		CA	
	O (%)	Z(%)	O(%)	Z(%)	O(%)	Z(%)	O(%)	Z(%)
1	99,89	100	100	99,87	99,89	99,78	100	99,74
2	100	10	100	99,87	100	99,89	99,87	99,49
3	100	100	100	100	100	100	99,23	98,59
4	100	100	100	100	100	100	96,94	97,58
7	100	100	100	100	100	100	78,69	85,59
14	100	100	100	100	100	100	100	100
21	100	100	100	100	100	100	100	100
28	100	100	100	100	100	100	100	100

Percobaan II :

Hari Pengamatan	SA		PA		EC		CA	
	O(%)	Z(%)	O(%)	Z(%)	O(%)	Z(%)	O(%)	Z(%)
1	99,79	100	99,79	99,89	99,57	99,71	99,89	99,79
2	100	100	99,79	100	100	100	99,69	98,75
3	100	10	99,89	100	100	100	99,17	98,54
4	100	100	100	100	100	100	96,77	97,19
7	100	100	100	100	100	100	85,10	92,92
14	100	100	100	100	100	100	100	10
21	100	100	100	100	100	100	100	100
28	100	100	100	100	100	100	100	100

Dari tabel persentase rata-rata pengurangan jumlah mikroba uji di atas dapat dilihat :

1. Pada percobaan I dan II, jumlah mikroba uji *Staphylococcus aureus* berkurang 100% pada hari kedua pada obat tetes mata O, sedangkan pada obat tetes mata Z pada hari pertama.
2. Pada percobaan I, jumlah mikroba uji *Pseudomonas aeruginosa* berkurang 100% pada hari pertama pada obat tetes mata O, sedangkan pada obat tetes mata Z pada hari ketiga. Pada percobaan II, jumlah mikroba uji *Pseudomonas aeruginosa* berkurang 100% pada hari keempat untuk obat tetes mata O, sedangkan pada obat tetes mata Z pada hari kedua.
3. Pada percobaan I, jumlah mikroba uji *Escherichia coli* berkurang 100% pada hari kedua pada obat tetes mata O, sedangkan pada obat tetes mata Z pada hari ketiga. Pada percobaan II, jumlah mikroba uji *Escherichia coli* berkurang 100% pada hari kedua pada obat tetes mata O dan Z.
4. Pada percobaan I dan II, jumlah mikroba uji *Candida albicans* berkurang 100% pada hari ke-14 pada obat tetes mata O dan Z.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh jumlah awal rata-rata mikroba uji yang terdapat dalam sediaan segera setelah inokulasi adalah antara 100.000 dan 1.000.000 cfu/ml, yang sesuai dengan persyaratan dalam Farmakope Indonesia edisi ke-4 untuk uji efektivitas pengawet.

Dari hasil uji dapat dilihat bahwa pengawet Benzalkonium Klorida 0.01% dalam obat tetes mata Nafazolin Hidroklorida yang beredar di pasaran adalah efektif menurunkan jumlah semua mikroba uji, yaitu *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*, sampai 100% mulai dari hari ke-14 dan mencegah kontaminasi selama 28 hari masa pengujian, begitu juga pada obat tetes mata campuran Nafazolin Hidroklorida dan Seng Sulfat.

Berdasarkan hasil pengujian secara statistika, yaitu dengan menggunakan desain eksperimen faktorial 4x8x2 diperoleh bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada pengujian dengan menggunakan produk tetes mata yang berbeda, yang berarti tidak terdapat perbedaan efektivitas pengawet Benzalkonium Klorida pada obat tetes mata Nafazolin Hidroklorida dan obat tetes mata campuran Nafazolin Hidroklorida dan Seng Sulfat.

Dari uji Newman Keuls diperoleh bahwa secara signifikan yang paling tidak efektif pada pengujian efektivitas pengawet Benzalkonium Klorida pada kedua tetes mata adalah mikroba uji *Candida albicans*. Sedangkan berdasarkan urutan data diperoleh bahwa pengawet Benzalkonium Klorida pada kedua tetes mata paling efektif terhadap mikroba uji *Staphylococcus aureus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ansel, H. C.. 1989. **Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi**. Ed ke-4. Jakarta : UI Press. Hal : 540-556.
- Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1978. **Formularium Nasional**. Ed ke-4. Jakarta : Depkes RI. Hal : 316-317.
- Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. **Farmakope Indonesia**. Ed ke-4. Jakarta : Depkes RI. Hal 12-14, 130-131, 847-852, 854-862.
- Hoover. 1975. **The Science and Practise of Pharmacy**. Philedelphia : College of Pharmacy and Science. Page : 1492-1497, 1500-1502.
- Jenkins, W. A., Osborn, K. R. **Packaging Drugs and Pharmaceuticals**. Pennsylvania : Technomic Publisher Company, Inc. Page : 284-385.
- Lachman, L., Lieberman, H. A., Kanig, J. L. 1994. **Teori dan Praktek Farmasi Industri III**. Penerjemah : Siti Suyatmi. Edisi ke-3. Jakarta : UI Press. Hal : 1317.
- Martindale. 1982. **The Extra Pharmacopoeia**, 28th Edition. London : The Pharmaceutical Press. Page : 1101-1102.
- Nolanol, George. 1979. **General Biologi**. London : The CV Mosby Company. Page : 431.
- Pelczar, Michel J., E. C. S. Chan. 1986. **Dasar-Dasar Mikrobiologi I**. Jakarta : Penerbit Universitas Indonesia. Hal : 85-88, 135-139.

- Remington, J. P.. 1975. **Remington'S Pharmaceutical Science**, 15th Edition. Pennsylvania : Mack Publishing Company. Page : 1088-1089.
- Siswandono, dkk. 1998. **Prinsip-Prinsip Rancangan Obat**. Surabaya : Airlangga University Press. Hal : 39-41, 126-127.
- Sudjana. 1995. **Desain dan Analisis Eksperimen**. Edisi ke-4. Bandung : Tarsito. Hal : 109-141.
- Turco, S., King, R. E. 1979. **Sterile Dossage Forms**. Edisi ke-2. Philadelphia : Lea & Febiger. Page : 357-358.
- Voigt, Rudolf. 1995. **Buku Pelajaran Teknologi Farmasi**. Penerjemah : Dr. Noerono Suwandhi. Yogyakarta : UGM Press. Hal : 522-526, 528-529.
- Wade, Ainley., Weller, Paul J. 1994. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. Second Edition. London : The Pharmaceutical Press. Page : 27-29.
- . 1973. **British Pharmacopeia**. London : The Pharmaceutical Press. Page : 46-47.
- . 1980. **United State Pharmacopeia**, 15th Edition. Rockville : USP Convention, Inc. Page : 1211-1212.