

**UJI EFEKTIFITAS PENGAWET TIMEROSAL
PADA OBAT TETES MATA YANG MENGANDUNG ASAM BORAT DAN OBAT
TETES MATA YANG MENGANDUNG NATRIUM TIOSULFAT
YANG BEREDAR DI PASARAN**

Sohadi Warya, Sulistianingsih, Arie Dewi Munigar
Jurusan Farmasi FMIPA UNPAD, Jatinangor-Sumedang

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian mengenai efektifitas pengawet timerosal 0,02% dalam obat tetes mata yang mengandung asam borat dan natrium tiosulfat yang beredar di pasaran selama 28 hari pengujian. Pengujian dilakukan terhadap 2 produk, yaitu produk A yang mengandung asam borat dan produk B yang mengandung natrium tiosulfat. Uji efektifitas pengawet ini dilakukan terhadap *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*. Data yang diperoleh dari hasil penelitian kemudian diuji secara statistik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengawet timerosal 0,02% dalam produk A dan produk B ternyata efektif dalam mematikan mikroba uji dan mencegah terjadinya kontaminasi. Hasil pengujian statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan efektivitas pengawet yang signifikan antara produk A dengan produk B. Hasil uji Newman Keuls menyatakan bahwa terdapat perbedaan efek timerosal yang signifikan terhadap mikroba uji *Escherichia coli* dan *Candida albicans* pada produk A dan B, sedangkan terhadap mikroba uji *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*, tidak memberikan perbedaan yang signifikan.

Kata kunci: Timerosal, Tetes mata, Asam borat, Natrium tiosulfat

ABSTRACT

The research on preservative effectivity of 0.02% Thimerosal ion eyedrop containing Boric acid and sodium thiosulfat sold in the market had been carried out for 28 investigation days. The tests werw conducted to two products to which A containig Boric acid and B containing Sodium thiosulfat. The effectivity of the preservative were tested into Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus and Candida albicans. The data obtained then were analysed by statistic. The results showed that 0.02% Thimerosal in product A and product B were effective in killing microorganism and preventung contamination. The statistical analysis also showed that there was significant difference in preservative effectivity in product A and B. The Newman Keuls test gave the results that there was was significant difference in thimerosal effectivity into Escherichia coli and Candida albicans in product A dan B, while into Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus was not.

Keywords: *Thimerosal, Eyedrop, Boric acid, Sodium thiosulfat*

PENDAHULUAN

Setiap larutan tees mata yang mengandung bahan pengawet harus tidak mengiritasi serta dapat mencegah berkembangnya atau masuknya mikroorganisme dengan tidak sengaja yang

masuk ke dalam larutan, ketika wadah terbuka selama pemakaian. Selain itu harus diperhatikan juga sifat dari pengawet, seperti kelarutan dari pengawet dan efek yang terjadi pada zat aktifnya. Bahan pengawet juga mempunyai syarat-syarat tertentu berkenaan dengan kesabilan,

tersatukan secara kimia dengan bahan lain dalam formulasi dan aktivitas anti bakteri (Ansel, 1989).

Timerosal digunakan sebagai antimikroba pada sediaan farmasi sejak tahun 1930. penggunaannya merupakan alternatif dari benzalkonium klorida dan pengawet fenilmerkuri lainnya. Timerosal memiliki aktivitas anti bakteri sekaligus anti fungi (Ainley Wade, 1994). Akan tetapi aktivitas antimikroba timerosal dapat tereduksi oleh adanya asam borat dan natrium tiosulfat (Martindale, 1982).

Oleh karena banyaknya sediaan larutan obat mata di pasaran yang menggunakan timerosal sebagai pengawet dan juga mengandung asam borat atau natrium tiosulfat dalam satu kemasan, maka perlu dilakukan penelitian seberapa besar pengaruh asam borat dan natrium tiosulfat terhadap efektivitas pengawet timerosal dalam larutan obat mata.

ALAT DAN BAHAN

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain: lemari pendingin (Toshiba), spektrofotometri visibel, timbangan (shimadzu), cawan petri, syringe 1 cc, incubator (memmert), autoklaf (everlight), dan alat-alat yang biasa digunakan di Laboratorium Teknologi Sediaan Steril dan Laboratorium Mikrobiologi.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini berupa sediaan obat tetes mata yang terdiri dari 2 produk, yaitu:

1. Produk A (obat tetes mata yang mengandung timerosal 0,02% dan mengandung asam borat di dalamnya).
2. Produk B (obat tetes mata yang mengandung timerosal 0,02% dan mengandung natrium tiosulfat di dalamnya).

Pada penelitian ini, mikroba uji yang digunakan adalah sebagai berikut:

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

Media yang digunakan pada uji ini adalah agar nutrisi untuk pertumbuhan bakteri dan agar *Sabouraud Dextrose* untuk pertumbuhan jamur. Masing-masing merupakan media yang sesuai untuk pertumbuhan mikroba uji. Sedangkan media untuk penghitungan jumlah koloni bakteri dan jamur digunakan agar nutrisi.

METODE PENELITIAN

Metode yang dilakukan pada penelitian ini mengacu pada uji efektivitas pengawet dari Farmakope Indonesia edisi IV. Penelitian ini dilakukan melalui tahapan kerja sebagai berikut:

1. Penyediaan sampel pemeriksaan.
2. Penyediaan media uji dan bakteri uji.
3. Penginokulasian biakan mikroba uji yang jumlahnya telah diketahui ke dalam sampel yang akan diuji.
4. Pengambilan sampel dan penghitungan jumlah mikroba yang berkurang dalam sediaan uji hari ke-1 sampai hari ke-7, hari ke-14, hari ke-21, dan hari ke-28 setelah inokulasi dengan metode lempeng agar.
5. Pengolahan data.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan pembuatan inokulum, didapat jumlah awal rata-rata biakan masing-masing mikroba uji yang akan diinokulasikan ke dalam obat tetes mata yang diuji seperti yang tertera pada tabel 1 berikut ini:

Tabel 1 Jumlah Awal Rata-Rata Mikroba Uji

Jumlah koloni Mikroba Uji (cfu/ml)			
EC	PA	SA	CA
742.000	780.000	738.000	788.000

Keterangan:

EC = *Escherichia coli*; PA = *Pseudomonas aeruginosa*;

SA = *Staphylococcus aureus*; CA = *Candida albicans*

Berdasarkan tabel 1 di atas dapat disimpulkan bahwa jumlah awal rata-rata mikroba uji yang diinokulasikan ke dalam bahan uji memenuhi persyaratan Farmakope Indonesia edisi ke-IV, yaitu antara 100.000-1.000.000/ml, oleh karena itu jumlah tersebut sesuai untuk digunakan pada penelitian selanjutnya.

Setelah dilakukan penginokulasian biakan masing-masing mikroba uji pada tetes mata A dan B, kemudian dilakukan penginkubasian dan penanaman dengan cara metode lempeng agar untuk mengetahui jumlah mikroba viabel per ml. Hasil dari pemantauan angka lempeng total selama 28 hari pengujian tercantum pada tabel 2 berikut ini:

Tabel 2 Jumlah Rata-Rata Mikroba Uji Hasil Pemantauan Angka Lempeng Total Selama 28 Hari pada Uji Efektivitas Pengawet Timerosal dalam Obat Tetes Mata yang Mengandung Asam Borat dan Obat Tetes Mata Yang Mengandung Natrium Tiosulfat

Hari Ke-	Jumlah Mikroba Uji (cfu/ml)							
	Produk A				Produk B			
	EC	PA	SA	CA	EC	PA	SA	CA
1	7.000	2.000	2.000	36.000	12.000	7.000	2.000	16.000
2	2.000	1.000	0	23.000	3.000	2.000	1.000	6.000
3	0	0	0	11.000	1.000	1.000	0	3.000
4	0	0	0	3.000	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
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

Dengan menggunakan bilangan jumlah mikroba awal pada tabel 1, maka dari jumlah rata-rata mikroba uji hasil pemantauan angka lempeng total

selama 28 hari pada tabel 2 maka dapat dihitung perubahan kadar dalam persen tiap mikroba selama pengujian seperti yang tercantum pada tabel 3 berikut :

Tabel 3 Persentase Rata-Rata Pengurangan Mikroba Uji Hasil Pemantauan Angka Lempeng Total pada Uji Efektivitas Pengawet Timerosal dalam Obat Tetes Mata yang Mengandung Asam Borat dan Obat Tetes Mata Yang Mengandung Natrium Tiosulfat

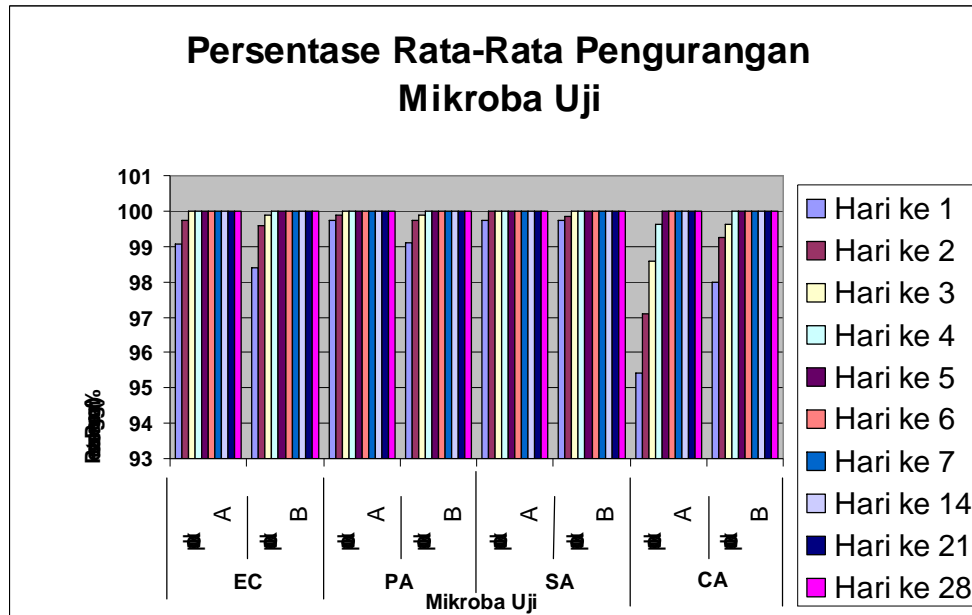
Hari ke-	Produk A (%)				Produk B (%)			
	EC	PA	SA	CA	EC	PA	SA	CA
1	99,06	99,74	99,73	95,43	98,38	99,10	99,73	97,97
2	99,73	99,87	100	97,08	99,60	99,74	99,86	99,24
3	100	100	100	98,60	99,87	99,87	100	99,62
4	100	100	100	99,62	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100	100
6	100	100	100	100	100	100	100	100
7	100	100	100	100	100	100	100	100
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

Berdasarkan tabel 3 di atas dapat disimpulkan bahwa semua bakteri uji pada produk A jumlahnya menurun 100% pada hari ke-3, kecuali *Staphylococcus aureus* yang langsung

menurun hingga 100% pada hari ke-2. Sedangkan jumlah *Candida albicans* berkurang sampai dengan 100% di hari ke-5. Demikian juga pada produk B, hampir semua mikroba uji, termasuk

Candida albicans menurun hingga 100% pada hari ke-4. Hanya *Staphylococcus aureus* yang langsung menurun hingga 100% pada hari ke-3.

Dari tabel 3 di atas, maka dapat dibuat histogram mengenai persentase rata-rata pengurangan mikroba uji selama 28 hari pengamatan.



Gambar 1 Histogram Persentase Rata-Rata Pengurangan Mikroba Uji

Berdasarkan penafsiran hasil uji efektivitas pengawet yang tercantum pada Farmakope Indonesia edisi IV, dari tabel 3 dan gambar 1 dapat disimpulkan bahwa pengawet timerosal 0,02% dalam obat tetes mata yang mengandung asam borat dan obat tetes mata yang mengandung natrium tiosulfat adalah sama-sama efektif karena mampu menurunkan jumlah mikroba uji dan menghambat terjadinya kontaminasi dari mikroba uji. Hal ini terbukti dengan tidak ditemukannya mikroba uji yang tumbuh mulai dari pengamatan hari ke-lima.

Untuk mengetahui lebih lanjut apakah terdapat perbedaan efektivitas timerosal antara produk A dan B yang diuji, maka dilakukan pengujian statistik.

Data hasil penelitian pada tabel 2 diuji secara statistik dengan menggunakan desain eksperimen faktorial 2x4x10 dengan asumsi model

yang digunakan pada penelitian ini adalah model tetap, yaitu penulis mempunyai dua taraf faktor produk obat tetes mata (produk A dan B), 4 buah taraf faktor mikroba uji (EC, PA, SA dan CA) serta 10 buah taraf faktor pengamatan (hari ke 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21 dan 28) yang semuanya digunakan dalam eksperimen.

Hipotesis yang harus diuji:

$H_{01} : P_i = 0$ (tidak ada perbedaan pengurangan jumlah mikroba uji karena produk obat tetes mata yang berbeda).

$H_{02} : M_j = 0$ (tidak ada perbedaan pengurangan jumlah mikroba uji karena mikroba uji yang berbeda).

$H_{03} : H_k = 0$ (tidak ada perbedaan pengurangan jumlah mikroba uji karena hari pengamatan yang berbeda).

$H_{04} : P_{Mij} = 0$ (tidak ada perbedaan pengurangan jumlah mikroba uji karena produk obat tetes mata dan mikroba uji yang berbeda).

$H_{05} : PHik = 0$ (tidak ada perbedaan pengurangan jumlah mikroba karena produk obat tetes mata dan hari pengamatan yang berbeda).

$H_{06} : MHjk = 0$ (tidak ada perbedaan pengurangan jumlah mikroba karena mikroba uji dan hari pengamatan yang berbeda).

$H_{07} : PMHijk = 0$ (tidak ada perbedaan pengurangan jumlah mikroba karena produk obat tetes mata, mikroba uji dan hari pengamatan yang berbeda).

Hasil pengujian statistik dengan menggunakan desain eksperimen faktorial $2 \times 4 \times 10$ dapat dilihat pada tabel 4 berikut ini:

Tabel 4 Tabel Anava Hasil Pemantauan Angka Lempeng Total pada Uji Efektivitas Pengawet Timerosal dalam Obat Tetes Mata yang Mengandung Asam Borat dan Obat Tetes Mata Yang Mengandung Natrium Tiosulfat

Sumber variasi	dk	JK	RJK	F	Ftabel
Rata-rata	1	124,256	124,256		
Perlakuan:					
P	1	6,807	6,807	19,788	4,00
M	3	136,319	45,44	132,093	2,76
H	9	423,557	47,062	136,808	2,04
PM	3	53,268	17,756	51,616	2,76
PH	9	14,505	1,612	4,686	2,04
MH	27	377,118	13,967	40,602	1,70
PMH	27	129,67	4,803	13,96	1,70
Kekeliruan	80	27,497	0,344		
Jumlah	160	1293			

Dari tabel anava di atas terlihat bahwa F hitung lebih besar daripada F tabel, artinya semua H_0 ditolak. Dengan kekeliruan sebesar 5% dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan efektivitas pengawet timerosal yang signifikan antara produk A dan produk B.

Untuk mengetahui bagaimana perbedaan efektivitas pengawet timerosal terhadap masing-masing

mikroba uji yang diinokulasikan pada produk A dan produk B, maka dilanjutkan dengan uji Newman Keuls.

Hipotesis yang harus diuji:

$H_{01} : \mu_{EC, \text{Produk A}} = \mu_{EC, \text{Produk B}}$

$H_{02} : \mu_{PA, \text{Produk A}} = \mu_{PA, \text{Produk B}}$

$H_{03} : \mu_{SA, \text{Produk A}} = \mu_{SA, \text{Produk B}}$

$H_{04} : \mu_{CA, \text{Produk A}} = \mu_{CA, \text{Produk B}}$

Hasil pengujian statistik menggunakan uji Newman Keuls dapat dilihat pada tabel 5 berikut:

Tabel 4.5 Hasil Uji Newman Keuls pada Uji Efektivitas Pengawet Timerosal dalam Obat Tetes Mata yang Mengandung Asam Borat dan Obat Tetes Mata Yang Mengandung Natrium Tiosulfat

H_0	q hitung	q tabel
1	2,672	3,38
2	2,672	3,38
3	0,382	2,815
4	18,321	2,815

Dari tabel di atas terlihat bahwa q hitung pada H_{01} , H_{02} dan H_{03} lebih kecil dari q tabel sedangkan q hitung pada H_{04} lebih besar dari q tabel, sehingga dengan tingkat kekeliruan sebesar 5% dari hasil pengujian Newman Keuls dapat disimpulkan bahwa H_{01} , H_{02} dan H_{03} diterima

sedangkan H_{04} ditolak dengan nilai kepercayaan 95%, artinya:

- a. Tidak terdapat perbedaan efektivitas timerosal yang signifikan terhadap *Escherichia coli* pada produk A dengan *Escherichia coli* pada produk B.

- b. Tidak terdapat perbedaan efektivitas timerosal yang signifikan terhadap *Pseudomonas aeruginosa* pada produk A dengan *Pseudomonas aeruginosa* pada produk B.
- c. Tidak terdapat perbedaan efektivitas timerosal yang signifikan terhadap *Staphylococcus aureus* pada produk A dengan *Staphylococcus aureus* pada produk B.
- d. Terdapat perbedaan efektivitas timerosal yang signifikan terhadap *Candida albicans* pada produk A dengan *Candida albicans* pada produk B.

Apabila dilihat dari nilai rata-rata mikroba uji, dapat disimpulkan bahwa timerosal pada produk B menunjukkan efektivitas yang lebih baik daripada produk A terhadap mikroba uji *Candida albicans*. Hal ini disebabkan karena pada produk B mengandung natrium tiosulfat yang juga memberikan efektifitas sebagai antifungi.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh jumlah awal rata-rata mikroba uji yang terdapat dalam bahan uji segera setelah inokulasi memenuhi persyaratan Farmakope Indonesia edisi ke-IV untuk uji efektivitas pengawet, yaitu antara 100.000-1.000.000 cfu/ml.

Adanya asam borat dan natrium tiosulfat ternyata tidak perlu mengganggu efektifitas timerosal sebagai pengawet. Hal ini disimpulkan berdasarkan hasil penelitian uji

efektivitas pengawet timerosal pada sediaan tetes mata yang mengandung asam borat (produk A) dan natrium tiosulfat (produk B) yang beredar di pasaran. Timerosal terbukti efektif dalam mematikan semua mikroba uji, yaitu *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*, selama 28 hari pengujian, karena pengawet timerosal yang terkandung baik dalam produk A maupun produk B mampu menurunkan jumlah keempat mikroba uji sampai dengan 100% mulai dari hari ke-5. Disamping itu, pengawet timerosal dalam produk A maupun produk B juga dapat mencegah terjadinya kontaminasi, hal ini terbukti dengan tidak ditemukannya pertumbuhan mikroba uji sampai pengamatan hari ke-28.

Berdasarkan hasil pengujian secara statistik, yaitu dengan menggunakan desain eksperimen faktorial 2x4x10 diperoleh bahwa terdapat perbedaan efektivitas pengawet timerosal yang signifikan antara obat tetes mata produk A dengan produk B.

Sedangkan dari hasil Uji Newman Keuls menunjukkan bahwa terdapat perbedaan efektivitas timerosal yang signifikan terhadap mikroba uji *Candida albicans* pada produk A dan B, sedangkan terhadap mikroba uji *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*, tidak memberikan perbedaan efektivitas yang berarti. Timerosal pada produk B menunjukkan efektivitas yang lebih baik daripada produk A terhadap mikroba uji *Candida albicans*.

DAFTAR PUSTAKA

Ainley, Wade., Weller, Paul J. 1994. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 2nd edition. London: The Pharmaceutical Press. Hal: 526-527.

- Ansel, Howard C. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Edisi ke-4. Jakarta: UI Press. Hal: 540-556.
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1978. *Formularium Nasional*. Edisi ke-2. Jakarta: Depkes RI. Hal: 316-317.
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi ke-4. Jakarta: Depkes RI. Hal: 847-852, 854-855.
- Entjang, Indan. 2001. *Mikrobiologi dan Parasitologi untuk Akademi Keperawatan*. Bandung: PT Citra Aditya Bakti. Hal: 78.
- Hoover. 1975. *The Science and Practise of Pharmacy*. Philadelphia: College of Pharmacy and Science. Hal: 1492-1497, 1500-1502.
- Jenkins, W.A dan K.R Osborn. *Packaging Drugs and Pharmaceuticals*. Pensiylania: Technomic Publisher Company. Inc. Hal: 284-385.
- Lachman, Leon., Herbert A. Lieberman dan J.L. Kanig. 1994. *Teori dan Praktek Farmasi Industri III*. (Siti Suyatmi). Ed ke-3. Jakarta: UI Press. Hal 1317.
- Martindale. 1982. *The Extra Pharmacopeia* 28th edition. London: The Pharmaceutical Press. Hal: 1126-1127.
- Pearce, Evelyn C. 1995. *Anantomi dan Fisiologi untuk Paramedis*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama. Hal: 314-324.
- Sudjana. 1995. *Desain dan Analisis Eksperimen*. Edisi ke-4. Bandung: Tarsito. Hal: 109-141.
- Turco, Salvatore dan Robert. E. King. 1979. *Sterile Dossage Forms*. Edisi ke-2. Philadelphia: Lea & Febiger. Hal: 357-358.
- Voigt, Rudolf. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. (Dr. Noerono Suwandhi). Yogyakarta: UGM Press. Hal: 522-526, 528-529.
- 1999. *British Pharmacopeia*. Vol II. London: The Stationary office. Hal: 505.
- 2003. *The United States Pharmacopeia 26*. Jilid III. The Official Compendia of Standards. Rockville: USP Convention, Inc. Hal: 791-792.