

Formulasi dan Uji Stabilitas Tetes Mata Sulfasetamida

Marline Abdassah, Tenri Noviardani, Jutti Levita, Shelvy E. Suherman
Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Jawa Barat, Indonesia

Abstrak

Tetes mata sulfasetamida yang mengandung natrium sulfasetamida 10%, 15%, dan 30% telah dibuat dan disterilkan. Metode sterilisasi yang digunakan adalah uap air mengalir 98–100 °C, penyaring bakteri, dan autoklaf 120–121 °C selama 15 menit. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan sediaan yang paling stabil selama penyimpanan 28 hari. Semua sediaan diamati kejernihan, pH dan konsentrasi natrium sulfasetamida. Semua sediaan mengalami kenaikan pH. Kekeruhan terjadi pada sediaan yang disterilkan dengan autoklaf. Sediaan paling stabil adalah tetes mata yang mengandung natrium sulfasetamid 10% yang disterilisasi dengan penyaring bakteri.

Kata kunci: Natrium sulfasetamid, tetes mata, uji stabilitas

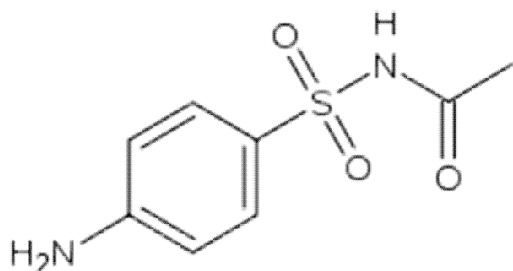
Formulation and Stability Study of Sulfacetamide Eyedrops

Abstract

Sulfacetamide eyedrops which contained 10%, 15%, and 30% of sulfacetamide sodium have been prepared and sterilized by three different methods. The sterilization method was flowing steam 98–100° C, bacteria filter, and autoclave 120–121 °C for 15 minutes. The objective was to obtain the most stable preparation during 28 days of storage. All preparations were evaluated for their clarity, pH, and the concentration of sulfacetamide sodium in 28 days. An increasing of pH was observed in all preparations. Turbidity was observed in preparations that were sterilized by autoclave. The most stable preparation was 10% sulfacetamide sodium eyedrops sterilized by bacteria filter.

Keywords: Eyedrops, sulfacetamide sodium, stability study

Pendahuluan



Gambar 1 Struktur Kimia Sulfasetamida¹

Sulfasetamida (Gambar 1) atau *N*-(4-aminophenyl) sulfonamide, adalah serbuk hablur putih yang tidak berbau dan memiliki rasa pahit. Senyawa ini termasuk golongan sulfonamida, merupakan turunan *N*-tersubstitusi dari senyawa sulfanilamid, berkompetisi dengan *p*-amino benzoat di dalam sintesis enzimatis asam folat.² Bentuk garam dari sulfasetamida, yaitu natrium sulfasetamid mudah larut dalam air, agak sukar larut dalam etanol, serta praktis tidak larut dalam kloroform dan eter.¹

Tetes mata natrium sulfasetamid dapat disterilkan dengan beberapa cara, misalnya dengan autoklaf, pemanasan, bakterisida, dan penyaringan menggunakan penyaring bakteri.¹ Larutan sulfasetamida mengalami hidrolisis oleh pemanasan, akan mengubah sulfasetamida menjadi sulfanilamida yang dapat mengkristal dan mengendap.³

Analisis sulfasetamida dapat dilakukan menggunakan metode spektrofotometri,⁴⁻⁶ kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT),⁷ voltametri,⁸ kromatografi cair dan deteksi secara spektrofotometri,⁹ KCKT dengan deteksi fluoresensi.¹⁰

Metode

Alat-alat yang digunakan di penelitian ini adalah spektrofotometer ultra violet (Shimadzu), *laminar air flow box*, *syringe* 1 cc (Finnpipette), pH meter (Metrohm), inkubator (Mettler), autoklaf (Everlight), timbangan analitik (Sartorius), penyaring bakteri (Sartorius), dan alat-alat yang biasa digunakan di Laboratorium Steril.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah natrium sulfasetamid, timerosal, natrium tiosulfat, dapar fosfat, dinatrium edetat, dan air untuk injeksi. Media yang digunakan pada uji sterilitas adalah media cair Tioglikolat untuk pertumbuhan bakteri dan media cair untuk pertumbuhan jamur yaitu *Soybean Casein Digest*. Mikroorganisme yang digunakan pada uji sterilitas adalah bakteri *Bacillus subtilis* (ATCC Nomor 6633, Biofarma) dan jamur *Candida albicans* (ATCC Nomor 10231, Biofarma).

Pemeriksaan bahan baku pada formula dilakukan berdasarkan persyaratan yang terdapat pada Farmakope Indonesia edisi V.¹

Sediaan tetes mata dibuat tiga formula dengan konsentrasi natrium sulfasetamid (formula I: 10%, II: 15%, III: 30%) seperti pada Tabel 1. Setiap formula disterilisasi dengan tiga cara yaitu dengan uap air mengalir 98–100 °C selama 30 menit (cara A), penyaring bakteri (cara B), dan autoklaf 120–121 °C selama 15 menit (cara C). Dapar yang digunakan adalah larutan dapar fosfat pH 7 larutan dapar dapat dilihat pada Tabel 2.¹¹

Setelah semua bahan baku ditimbang, dilarutkan dan dicampurkan ke dalam

Tabel 1 Formula Sediaan Tetes Mata Natrium Sulfasetamid

| Bahan | Formula I | Formula II | Formula III |
|---------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Sulfasetamida natrium (%) | 10 | 15 | 30 |
| Natrium tiosulfat (%) | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Dinatrium edetat (%) | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Timerosal (%) | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| Dapar fosfat (pH) | pH 7 | pH 7 | pH 7 |
| Air untuk injeksi | hingga 100 mL | hingga 100 mL | hingga 100 mL |

Tabel 2 Larutan Dapar Fosfat Isotonis¹¹ dan Penimbangan Zat Pembuat Dapar Fosfat

| | pH | Larutan NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 0,8% (mL) | Larutan Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 0,947% (mL) | NaCl yang diperlukan untuk isotonis (g per 100 ml) |
|-------------|-----|---|--|---|
| Literatur | 7,0 | 40 | 60 | 0,46 |
| Penimbangan | 7,0 | 0,32 | 0,57 | 0,46 |

gelas piala 150 mL yang telah dikalibrasi, air untuk injeksi ditambahkan hingga tanda batas dan disaring dengan kertas saring, lalu pH awal sediaan diukur.

Larutan diambil menggunakan *syringe* dan dimasukkan ke dalam vial-vial coklat masing-masing sebanyak 10 mL, untuk selanjutnya disterilisasi dengan tiga metode yang berbeda yaitu dengan uap air mengalir suhu 98–100 °C selama 30 menit, dengan penyaring bakteri dan dengan autoklaf 120–121 °C selama 15 menit.¹

Peralatan yang digunakan harus steril dan semua proses dilakukan secara aseptis untuk menghindari kontaminasi mikroba. Semua sediaan disimpan pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya serta sinar matahari secara langsung selama 28 hari. Pengamatan dilakukan pada hari ke-1, 3, 7, 14, dan 28.

Evaluasi dilakukan terhadap 9 sediaan tetes mata natrium sulfasetamid, yang terdiri dari pemeriksaan visualisasi, pH, penentuan kadar natrium sulfasetamid, dan uji sterilitas terhadap sediaan tetes mata yang memiliki formula paling stabil selama penyimpanan.

Pemeriksaan visualisasi merupakan uji kejernihan, dilakukan dengan mengamati endapan atau kekeruhan pada sediaan tetes mata selama waktu penyimpanan (28 hari).

Pemeriksaan pH sediaan tetes mata dilakukan pada hari ke- 1, 3, 7, 14 dan 28 dengan alat pH meter. Sediaan tetes mata natrium sulfasetamid dinyatakan stabil bila memiliki pH pada rentang pH stabilitas yaitu 8,0–9,5³ dan tidak terdapat adanya perubahan pH yang signifikan.

Penentuan kadar natrium sulfasetamida dilakukan dengan mengukur absorbansi pada spektrofotometer UV dengan metode standar adisi. Natrium sulfasetamid dalam air akan memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang yaitu 255 nm. Pemeriksaan dilakukan pada hari ke-1, 3, 7, 14, dan 28.

Prosedur pengukuran serapan natrium sulfasetamida dengan spektrofotometer UV menggunakan metode standar adisi meliputi pembuatan larutan baku/standar natrium sulfasetamid dan penentuan kadar natrium sulfasetamid.¹²

Pembuatan larutan standar natrium sulfasetamida dilakukan dengan natrium sulfasetamid ditimbang seberat 50 mg, lalu dilarutkan dalam labu ukur 50 mL, dan ditambahkan air suling ganda hingga konsentrasi 1000 ppm. Larutan tersebut selanjutnya akan digunakan sebagai larutan baku pada metode standar adisi.

Sampel dari sediaan diencerkan pada labu ukur 10 mL sampai konsentrasi 5 ppm

Tabel 3 Hasil Pengamatan Sediaan Tetes Mata Natrium Sulfasetamida

| Hari Ke- | I (Natrium sulfasetamida 10%) | | | II (Natrium sulfasetamida 15%) | | | III (Natrium sulfasetamida 30%) | | |
|----------|----------------------------------|--------|--------|-----------------------------------|--------|--------|------------------------------------|--------|--------|
| | IA | IB | IC | IIA | IIB | IIC | IIIA | IIIB | IIIC |
| 1 | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb |
| 3 | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb |
| 7 | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb |
| 14 | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb | (-) tb |
| 28 | (-) tb | (-) tb | (+) tb | (-) tb | (-) tb | (+) tb | (-) tb | (-) tb | (+) tb |

Keterangan: A: Sterilisasi dengan uap air mengalir 98–100 °C, B: Sterilisasi dengan penyaring bakteri, C: Sterilisasi dengan autoklaf 120–121 °C, (-): Tidak ada endapan atau partikel asing (jernih), (+): Ada endapan atau partikel asing (tidak jernih), tb: Tidak ada perubahan warna, b: Adanya perubahan warna

(pada formula I) dan 6 ppm (pada formula II dan III). Digunakan tiga labu ukur 10 mL (L_1 , L_2 , L_3). Pada labu L_1 dimasukkan sampel tanpa penambahan baku, pada labu L_2 dimasukkan sampel dan ditambahkan larutan baku 2,5 ppm, pada labu L_3 sampel dimasukkan dan ditambahkan larutan baku 5 ppm. Pengukuran serapan dari natrium sulfasetamid pada labu ukur (L_1 , L_2 , L_3) dilakukan dengan pengulangan sebanyak dua kali. Kadar natrium sulfasetamida dalam sampel diketahui dari absorbansi analit, selanjutnya dibuat kurva kalibrasi absorbansi terhadap konsentrasi (mg/mL) penambahan baku. Dari titik-titik yang diketahui (absorbansi L_1 , L_2 , L_3) dibuat persamaan garis lurus hingga memotong pada sumbu X. Perpotongan ini belum menunjukkan kadar natrium sulfasetamida karena perlu dikalikan faktor pengenceran. Hasil perkalian tersebut merupakan kadar natrium sulfasetamida sebenarnya di dalam sampel (mg/mL).

Sediaan tetes mata diuji sterilitasnya meliputi beberapa tahap, yaitu pelarutan media uji, evaluasi media uji, dan uji sterilitas sediaan.

Media yang digunakan untuk uji sterilitas adalah media Tioglikolat dan *Soybean-Casein Digest*. Media Tioglikolat dibuat dengan menimbang 29,8 g, lalu dilarutkan di dalam 1 L akuades, dididihkan sampai larut sempurna. Media diisikan ke dalam tabung reaksi, ditutup dengan kapas yang dibalut kasa, lalu disterilkan dengan autoklaf selama 30 menit pada suhu 121 °C. Untuk media *Soybean-Casein Digest* dibuat dengan menimbang 30 g kemudian dilarutkan ke dalam 1 L akuades, dididihkan sampai larut sempurna. Media diisikan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan kapas yang dibalut kasa, disterilkan dengan autoklaf selama 30 menit pada suhu 121 °C.¹

Media uji yang telah dibuat harus dievaluasi sebelum digunakan dalam uji sterilitas dari sediaan tetes mata natrium sulfasetamid. Pengujian media meliputi uji sterilitas media, uji fertilitas media, dan uji efektifitas media.¹

Uji sterilitas media dilakukan dengan mengambil media Tioglikolat dan *Soybean Casein Digest* steril masing-masing dua tabung dan diinkubasikan pada suhu 30–35 °C (untuk Tioglikolat) dan suhu 20–25 °C (untuk *Soybean-Casein Digest*) dalam waktu tidak kurang dari 7 hari. Sisa media disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu 10 °C sampai waktu penggunaan. Pertumbuhan bakteri atau jamur dapat diketahui dengan timbulnya kekeruhan pada media.¹

Uji fertilitas dilakukan dengan cara penanaman bakteri *Bacillus subtilis* ke dalam dua tabung reaksi yang berisi media Tioglikolat steril, diinkubasikan pada suhu 30–35 °C selama tidak kurang dari 7 hari. Kemudian ke dalam dua tabung reaksi yang berisi media *Soybean-Casein Digest* masing-masing ditanamkan jamur *Candida albicans*, diinkubasikan pada suhu 20–25 °C selama tidak kurang dari 7 hari. Diamati apakah terjadi kekeruhan atau tidak.¹

Uji efektifitas dilakukan dengan cara menanamkan bakteri *Bacillus subtilis* ke dalam dua tabung reaksi berisi media Tioglikolat steril kemudian masing-masing ditambahkan sediaan uji 2 mL kemudian diinkubasikan pada suhu 30–35 °C selama tidak kurang dari 7 hari. Ke dalam dua tabung reaksi berisi media *Soybean-Casein Digest* steril, masing-masing ditanamkan jamur *Candida albicans* serta ditambahkan 2 mL sediaan uji, diinkubasikan pada suhu 20–25 °C selama tidak kurang dari 7 hari. Amati apakah terjadi kekeruhan atau tidak.

Sebelum melakukan uji sterilitas dari sediaan, pada meja lemari aseptis terlebih dahulu dilap dengan alkohol 70%, lalu dinyalakan lampu ultraviolet (UV) dan aliran udara laminar selama 1 jam. Kemasan obat tetes mata bagian luarnya dibersihkan dengan alkohol 70%. Tiga tabung reaksi yang berisi media Tioglikolat, ke dalam masing-masing tabung diteteskan 2 mL sediaan uji dan diinkubasikan pada suhu 30–35 °C. Hal yang sama dilakukan terhadap tiga tabung reaksi yang berisi media *Soybean-Casein Digest*, dan diinkubasikan pada suhu

20–25 °C. Inkubasi dilakukan selama tidak kurang dari 14 hari dan setiap hari diamati apakah terjadi kekeruhan.¹

Pada uji sterilitas perlu adanya kontrol sterilitas media uji, kontrol positif, dan kontrol negatif.¹

Kontrol positif, yaitu tabung berisi media Tioglikolat yang telah ditanami bakteri indikator *Bacillus subtilis* dan juga tabung yang berisi media *Soybean-Casein Digest* yang telah ditanami jamur *Candida albicans*, kemudian diinkubasikan bersama dengan tabung uji lainnya. Kontrol negatif yaitu tabung yang berisi media Tioglikolat dan tabung media *Soybean-Casein Digest* yang telah diberi 5 tetes Albuvit® (sediaan tetes mata natrium sulfasetamid steril) dan diinkubasikan bersama dengan tabung uji lainnya. Kontrol sterilitas media uji, yaitu tabung yang berisi media Tioglikolat dan tabung berisi media *Soybean-Casein* yang tidak ditanami, tetapi diinkubasikan juga bersama tabung uji lainnya.¹

Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan kadar natrium sulfasetamida antara ketiga cara sterilisasi, data yang diperoleh pada Formula I, II dan III diuji secara statistik dengan desain eksperimen faktorial 3x5, pada angka 3 menjelaskan banyaknya variasi cara sterilisasi (dengan uap air mengalir, penyaring bakteri, dan autoklaf), sedangkan angka 5 menjelaskan jumlah/banyaknya pengukuran kadar yang dilakukan (pada hari ke- 1, 3, 7, 14 dan 28). Kemudian pengujian dilanjutkan dengan uji lanjut Newman Keuls untuk mengetahui bagaimana perbedaan kadar

sulfasetamida natrium pada formula I, II dan III.

Hasil

Bahan baku formula telah diperiksa dan dinyatakan memenuhi syarat sesuai dengan Farmakope Indonesia edisi kelima.

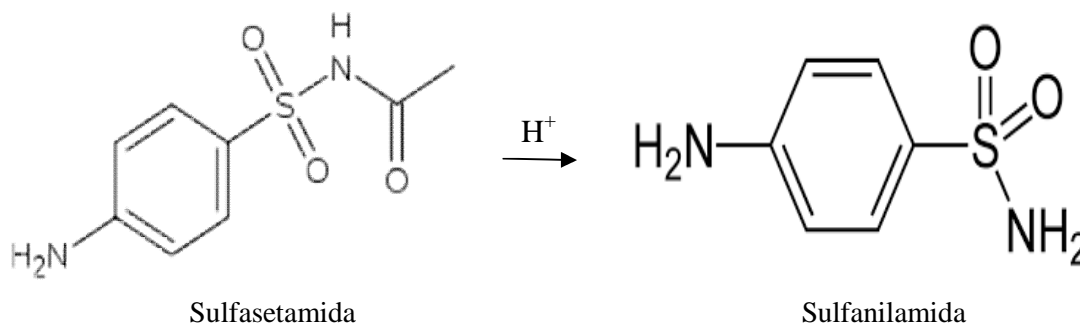
Hasil pengamatan terhadap endapan dari ketiga formula sediaan tetes mata natrium sulfasetamida dapat dilihat pada Tabel 3. Ketiga sediaan yang telah disterilisasi dengan autoklaf menunjukkan adanya endapan pada hari ke-28, sediaan lain yang disterilisasikan dengan uap air mengalir dan penyaring bakteri tidak menunjukkan adanya perubahan.

Hasil pemeriksaan pH dari ketiga formula sediaan tetes mata sulfasetamida natrium dapat dilihat pada Tabel 4, dapat diketahui bahwa pada masing-masing formula terjadi kenaikan pH.

Hasil penetapan kadar natrium sulfasetamid pada masing-masing formula sediaan tetes mata natrium sulfasetamida dapat dilihat pada Tabel 5. Dapat diketahui bahwa kadar natrium sulfasetamida akan mengalami penurunan bila disimpan pada waktu tertentu. Kadar maksimum dicapai pada pengukuran hari pertama dan terus menurun hingga hari ke-28.

Pembahasan

Bahan baku formula telah diperiksa dan dinyatakan memenuhi syarat sesuai Farmakope Indonesia.



Gambar 2 Reaksi Hidrolisis Sulfasetamida³

Tabel 4 Hasil Pemeriksaan pH

| Pengamatan hari ke- | (Natrium sulfasetamid 10%) | | | (Natrium sulfasetamid 15%) | | | (Natrium sulfasetamid 30%) | | |
|------------------------|----------------------------|------|------|----------------------------|------|------|----------------------------|------|------|
| | IA | IB | IC | IIA | IIB | IIC | IIIA | IIIB | IIIC |
| 1 | 7,51 | 7,50 | 7,50 | 7,72 | 7,73 | 7,77 | 8,49 | 8,45 | 8,45 |
| 3 | 7,52 | 7,51 | 7,56 | 7,77 | 7,76 | 7,78 | 8,65 | 8,50 | 8,59 |
| 7 | 7,53 | 7,52 | 7,56 | 7,79 | 7,77 | 7,79 | 8,66 | 8,62 | 8,64 |
| 14 | 7,56 | 7,53 | 7,56 | 7,79 | 7,78 | 7,79 | 8,66 | 8,62 | 8,66 |
| 28 | 7,60 | 7,58 | 7,56 | 7,80 | 7,82 | 7,81 | 8,73 | 8,70 | 8,68 |

Keterangan: A: Sterilisasi dengan uap air mengalir 98–100 °C, B: Sterilisasi dengan penyaring bakteri, C: Sterilisasi dengan autoklaf 120–121 °C

Hasil dari pengamatan endapan pada Tabel 3 dapat diketahui bahwa sediaan IC, IIC, dan IIIC terdapat endapan pada hari ke-28 setelah disterilisasi dengan autoklaf, sediaan lain yang disterilisasi dengan uap air mengalir dan penyaring bakteri tidak menunjukkan adanya perubahan. Endapan diperkirakan adalah sulfanilamida yang merupakan hasil hidrolisis dari natrium sulfasetamida saat pemanasan pada suhu tinggi (Gambar 2).³

Pada hasil pemeriksaan pH, masing-masing formula mengalami kenaikan pH. Penambahan dapar fosfat sebagai tidak mencegah perubahan pH. Hal ini karena adanya pelepasan ion OH⁻ secara perlahan dari wadah gelas (vial coklat) serta pada formula terdapat beberapa bahan baku yang berupa garam natrium (mempunyai sifat basa kuat) sehingga semakin meningkatkan kebasan larutan. Selain itu sediaan tetes mata yang dinyatakan stabil adalah sediaan IIIA, IIIB, dan IIIC, karena harga pH-nya berada pada rentang pH stabilitas, yaitu 8,0–9,5.³

Kadar natrium sulfasetamida ditetapkan dengan spektrofotometer UV, berdasarkan kromofor yang terdapat pada molekul sulfasetamida (Gambar 1), yaitu kromofor aromatik, karbonil, dan sulfon.

Absorbansi natrium sulfasetamida pada sampel diukur pada panjang gelombang maksimumnya (255 nm). Penentuan kadar natrium sulfasetamida dilakukan dengan metode standar adisi karena pada sediaan yang dibuat terdapat beberapa zat tambahan (timerosal, natrium tiosulfat, dinatrium edetat dan dapar fosfat) yang dikhawatirkan dapat ikut memberikan absorbansi saat pengukuran. Berdasarkan data-data hasil

pengukuran, terlihat bahwa semakin besar konsentrasi natrium sulfasetamida di dalam sediaan, penurunan kadarnya juga semakin besar. Hal ini diperkirakan karena natrium sulfasetamida terhidrolisis menjadi sulfanilamida, makin pekat larutan natrium sulfasetamida maka proses hidrolisis akan lebih mudah terjadi, menyebabkan natrium sulfasetamida lebih mudah mengkristal dan mengendap.³ Dapat disimpulkan bahwa natrium sulfasetamida memberikan sediaan tetes mata yang paling stabil pada konsentrasi 10%.

Selain itu, diketahui juga bahwa sediaan Formula I (natrium sulfasetamida 10%) yang disterilisasi dengan penyaring bakteri (cara B) mempunyai persentase penurunan kadar natrium sulfasetamida yang terkecil dibandingkan dengan seluruh sediaan lain pada Formula I, II dan III. Sehingga dapat disimpulkan bahwa cara sterilisasi yang paling baik untuk formulasi sediaan tetes mata natrium sulfasetamida adalah dengan menggunakan penyaring bakteri. Hal ini karena pada sterilisasi dengan penyaring bakteri tidak digunakan pemanasan, sedangkan pada sterilisasi yang lainnya digunakan pemanasan.² Pemanasan dapat mempercepat pembentukan sulfanilamida akibat hidrolisis natrium sulfasetamid (Gambar 2).¹³

Penurunan kadar natrium sulfasetamida pada semua sediaan setelah penyimpanan selama 28 hari, mengakibatkan seluruh sediaan tidak dapat diterima sebagai sediaan tetes mata natrium sulfasetamida yang baik, karena kadarnya tidak sesuai dengan persyaratan dalam Farmakope Indonesia edisi kelima, (99–100,5%)¹ dari kadar yang tertera pada etiket (natrium

Tabel 5 Kadar Natrium Sulfasetamida dalam Tetes Mata Formula I, II, dan III (mg/mL)

| Formula | Sterilisasi | Hari ke- | | | | | % |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| | | 1 | 3 | 7 | 14 | 28 | |
| Formula I (natrium sulfasetamida 10%) | A | 111,08±0,14 | 111,63±0,41 | 110,21±0,81 | 110,69±0,38 | 100,62±0,65 | 9,42 |
| | B | 110,58±0,40 | 109,57±0,32 | 107,08±0,82 | 109,42±0,08 | 100,78±0,76 | 8,86 |
| | C | 110,91±0,07 | 108,51±0,07 | 110,25±0,16 | 103,19±0,07 | 97,78±0,230 | 11,84 |
| Formula II (natrium sulfasetamida 15%) | A | 160,20±0,39 | 160,48±0,09 | 159,21±0,08 | 159,11±0,62 | 144,0±0,08 | 10,11 |
| | B | 164,20±0,17 | 163,85±0,28 | 164,39±0,18 | 164,58±0,26 | 147,6±0,09 | 10,05 |
| | C | 164,16±0,09 | 164,64±0,39 | 164,86±0,08 | 149,44±0,18 | 137,53±2,85 | 16,22 |
| Formula III (natrium sulfasetamida 30%) | A | 321,55±0,42 | 322,95±1,20 | 310,32±0,18 | 285,77±0,74 | 270,90±0,21 | 15,5 |
| | B | 320,65±1,20 | 314,95±0,21 | 323,17±0,81 | 298,00±0,71 | 269,80±0,21 | 15,86 |
| | C | 320,90±0,21 | 320,62±0,18 | 317,27±2,23 | 319,27±1,02 | 268,10±0,42 | 16,45 |

Keterangan: A: Sterilisasi dengan uap air mengalir 98–100 °C, B: Sterilisasi dengan penyaring bakteri, C: Sterilisasi dengan autoklaf 120–121 °C, (%): Persentase penurunan kadar natrium sulfasetamida

sulfasetamida 10%, 15%, dan 30%) yaitu sebesar 99,0–100,5 mg/mL; 148,5–150,75 mg/mL dan 297–301,5 mg/mL). Kadar natrium sulfasetamida menurun diduga diakibatkan oleh terjadi reaksi hidrolisis sulfasetamida menjadi sulfanilamida.³

Uji sterilitas hanya dilakukan pada sediaan tetes mata natrium sulfasetamida yang paling stabil selama penyimpanan, yaitu sediaan IB yang mengandung natrium sulfasetamida sebesar 10% dan disterilisasi dengan penyaring bakteri. Sebelum melakukan uji sterilitas sediaan, dilakukan uji sterilitas, uji fertilitas, dan uji efektifitas terhadap media pertumbuhan.²

Hasil uji sterilitas media menunjukkan tidak adanya pertumbuhan, artinya media tersebut telah steril dan dapat digunakan untuk pengujian selanjutnya.

Hasil uji fertilitas media menunjukkan pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* pada media Tioglikolat dan jamur *Candida albicans* pada media *Soybean Casein-Digest*. Hal ini berarti bahwa media tersebut fertil dan dapat digunakan untuk pengujian selanjutnya.²

Hasil pengujian efektifitas dari media pertumbuhan, menunjukkan hasil terdapat

Tabel 6 Hasil Pengamatan Uji Sterilitas Tetes Mata Natrium Sulfasetamida

| Hari ke- | KSM | | KP | | KN | | SU 1 | | SU 2 | | SU 3 | |
|----------|-----|---|----|---|----|---|------|---|------|---|------|---|
| | B | J | B | J | B | J | B | J | B | J | B | J |
| 1 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 13 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 14 | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |

Keterangan: KSM: Kontrol Sterilitas Media, KP: Kontrol Positif, KN: Kontrol Negatif, SU 1: Sediaan Uji pertama, SU 2: Sediaan Uji kedua, SU 3: Sediaan Uji ketiga. (+): Terjadi kekeruhan, (-): Tidak terjadi kekeruhan, B: Media uji Tioglikolat (untuk bakteri), J: Media uji *Soybean-Casein Digest* (untuk jamur)

kekeruhan pada media Tioglikolat dan *Soybean Casein-Digest* setelah ditanami kuman indikator dan sediaan steril, artinya bahwa media tersebut dapat menumbuhkan mikroorganisme walaupun mengandung sediaan uji.

Pemantauan ruang uji sterilitas, tidak ditemukan pertumbuhan mikroorganisme, artinya ruangan tersebut sudah steril dan memenuhi syarat untuk pengujian. Data pengamatan terhadap media Tioglikolat dan *Soybean Casein-Digest* untuk uji sterilitas dapat dilihat pada Tabel 6.

Untuk mengetahui lebih lanjut apakah terdapat perbedaan kadar sulfasetamida natrium pada formula I, II, dan III, maka dilakukan pengujian statistik menggunakan desain eksperimen faktorial 3x5 dengan asumsi model tetap, yaitu tiga taraf faktor variasi cara sterilisasi (uap air mengalir, penyaring bakteri dan autoklaf) dan lima taraf faktor hari pengamatan (hari ke-1, 3, 7, 14, dan 28), yang semuanya digunakan dalam eksperimen.

Hipotesis yang harus diuji adalah H_{01} : $\mu_i=0$ (tidak ada perbedaan kadar natrium sulfasetamida karena variasi cara sterilisasi yang berbeda), H_{02} : $\mu_j=0$ (tidak ada perbedaan kadar natrium sulfasetamida karena hari pengamatan yang berbeda), dan H_{03} : $\mu_{ij}=0$ (tidak ada perbedaan kadar natrium sulfasetamida karena variasi cara sterilisasi dan hari pengamatan yang berbeda).

Dari Tabel 7–9 dapat terlihat bahwa semua F hitung lebih besar daripada F tabel, sehingga semua H_0 ditolak, dengan kekeliruan sebesar 5%. Dapat disimpulkan masing-masing formula terdapat perbedaan kadar natrium sulfasetamida yang berbeda (signifikan) karena variasi cara sterilisasi, hari pengamatan, dan interaksi antara kedua faktor tersebut. Untuk mengetahui perbedaan kadar natrium sulfasetamida, maka dilanjutkan dengan uji Newman Keuls untuk variasi cara sterilisasi dan variasi hari pengamatan.

Uji Newman Keuls untuk variasi cara sterilisasi dilakukan dengan menguji beberapa hipotesis. Hipotesis yang harus

diuji dari formula I adalah H_{01} : $\mu_A=\mu_C$, H_{02} : $\mu_A=\mu_B$, dan H_{03} : $\mu_B=\mu_C$. Hipotesis yang harus diuji dari formula II adalah H_{01} : $\mu_B=\mu_C$, H_{02} : $\mu_B=\mu_A$, dan H_{03} : $\mu_A=\mu_C$. Hipotesis yang harus diuji dari formula III adalah H_{01} : $\mu_C=\mu_A$, H_{02} : $\mu_C=\mu_B$, dan H_{03} : $\mu_B=\mu_A$.

Hasil pengujian statistik menggunakan uji Newman Keuls pada masing-masing formula terlihat pada Tabel 10–12.

Dari Tabel *range student* diketahui bahwa q hitung untuk H_{01} , H_{02} , dan H_{03} pada formula I lebih besar dari *Rasio Statistic Test* (RST) maka semua hipotesis ditolak, dengan kekeliruan sebesar 5% disimpulkan terdapat perbedaan kadar natrium sulfasetamida yang signifikan antara sediaan tetes mata formula I yang disterilisasi dengan cara A, B, maupun C.

Pada formula II, H_{01} dan H_{02} ditolak sedangkan H_{03} diterima sehingga dengan tingkat kepercayaan sebesar 95% dapat disimpulkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari kadar natrium sulfasetamida pada sediaan tetes mata formula II yang disterilisasi dengan cara A dan C. Dengan kekeliruan sebesar 5% dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan dari kadar natrium sulfasetamida antara tetes mata yang disterilisasi cara B dan C dan antara tetes mata yang disterilisasi dengan cara B dan A.

Pada formula III, semua H_0 ditolak. Sehingga dengan kekeliruan sebesar 5% dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan kadar yang signifikan dari natrium sulfasetamida pada sediaan tetes mata formula III yang disterilisasi dengan cara A, B, dan C.

Uji Newman Keuls untuk variasi hari pengamatan dilakukan dengan menguji beberapa hipotesis. Hipotesis yang harus diuji dari formula I dan III adalah H_{01} : $\mu_{H1}=\mu_{H28}$, H_{02} : $\mu_{H1}=\mu_{H14}$, H_{03} : $\mu_{H1}=\mu_{H7}$, H_{04} : $\mu_{H1}=\mu_{H3}$, H_{05} : $\mu_{H3}=\mu_{H28}$, H_{06} : $\mu_{H3}=\mu_{H14}$, H_{07} : $\mu_{H3}=\mu_{H7}$, H_{08} : $\mu_{H7}=\mu_{H28}$, H_{09} : $\mu_{H7}=\mu_{H14}$, dan H_{10} : $\mu_{H14}=\mu_{H28}$.

Untuk formula II hipotesis yang diuji adalah H_{01} : $\mu_{H3}=\mu_{H28}$, H_{02} : $\mu_{H3}=\mu_{H14}$, H_{03} : $\mu_{H3}=\mu_{H7}$, H_{04} : $\mu_{H3}=\mu_{H1}$, H_{05} : $\mu_{H1}=\mu_{H28}$, H_{06} :

$\mu_{H1}=\mu_{H14}$, H_{07} : $\mu_{H1}=\mu_{H7}$, H_{08} : $\mu_{H7}=\mu_{H28}$, H_{09} : $\mu_{H7}=\mu_{H14}$, dan H_{10} : $\mu_{H14}=\mu_{H28}$.

Dari Tabel 13 dan 15 untuk formula I dan III terlihat bahwa semua H_0 ditolak, yang artinya dengan kekeliruan sebesar 5% disimpulkan bahwa terdapat perbedaan kadar natrium sulfasetamida yang signifikan pada sediaan tetes mata formula I dan III yang diukur pada hari-hari tertentu (hari ke-1, 3, 7, 14 dan 28).

Pada Tabel 14, formula II diketahui bahwa H_{03} , H_{04} , dan H_{07} diterima, artinya dengan kepercayaan sebesar 95% dapat disimpulkan tidak terdapat perbedaan kadar yang signifikan dari natrium sulfasetamida sediaan tetes mata yang diukur pada hari ke-3 dengan hari ke-7, pada hari ke-3 dengan hari ke-1, dan antara hari ke-1 dengan hari ke-7. Formula II H_0 yang lainnya ditolak, yang berarti terdapat perbedaan kadar natrium sulfasetamida yang signifikan.

Simpulan

Formula natrium sulfasetamida dengan kadar 10% yang disterilisasi menggunakan penyaring bakteri merupakan formula yang paling stabil.

Daftar Pustaka

1. Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. Farmakope Indonesia edisi ke-5 Buku II. Jakarta: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia; 2013; 1240–1242, 1359.
2. Injac R, Nina K, Borut S. Optimized method for determination of amoxicillin, ampicillin, sulfamethoxazole, and sulfacetamide in animal feed by micellar electrokinetic capillary chromatography and comparison with high-performance liquid chromatography. *Croatica Chemica Acta*. 2009;82(3):685–694.
3. Sweetman SC. Martindale the complete drug reference, thirty-seventh edition. London: The Pharmaceutical Press; 2011;364.
4. Al-Nuri IJ, Israa' AA. Direct determination of sulfacetamide sodium by derivative UV spectrophotometry. *Journal Raf. Sci*. 2009;20(4):17–26.
5. Padmarajaiah N, Shailendrad N, Ashwineek S, Anantharaman S. A sensitive spectrophotometric method for the determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations. *Acta Pharm*. 2007; 57:333–342.
6. Ayad MRR, Ali HM, Musa AM. Spectrophotometric determination of sulfacetamide in pure form and pharmaceutical formulations with metol and potassium hexacyanoferrate (III). *AJPS*. 2012;12(2):189–199.
7. Samide A, Tutunaru B, Negrilaa C, Trandafir I, Maxut A. Effect of sulfacetamide on the composition of corrosion products formed onto carbon steel surface in hydrochloric acid. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 2011;6(2):663–673.
8. Taherpoura A, Davood N, Behnoud H, Amene A. Experimental and theoretical study of free energies and kinetical parameters in the photo electron transfer process of nano supramolecular complexes of sulfacetamide, sulfathiazole, sulfabenzamide and sulfadiazine with fullerenes. *Proceedings of the 4 th International Conference on Nanostructures (ICNS4)*; 2012 March 12-14; Kish Island, I.R. Iran. I.R. Iran: Sharif University of Technology; 2012.
9. Fernanda HS, Maria Eugênia C Q. Microextraction in packed sorbent for determination of sulfonamides in egg samples by liquid chromatography and spectrophotometric detection. *J. Braz. Chem. Soc*. 2011;22(9):1656–1661.
10. Victorita B, Liviu M, Daniel D, Otilia B. Determination of six sulfonamide residues in honey by HPLC with fluorescence detection. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*. 2009;66(1–2):237–241.

11. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Formularium Nasional Edisi Kedua. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1978.
12. Celeber M and Alnoz S. Determination of olmesartan medoxomil in tablets by UV-Vis spectrophotometry. Pharmazie. 2007; 62:419–422.
13. Wahyudi J, Wusana AW, Yulian AR, Atika K. Pengaruh suhu terhadap kadar glukosa terbentuk dan konstanta kecepatan reaksi pada hidrolisa kulit pisang. prosiding seminar nasional teknik kimia “kejuangan” pengembangan teknologi kimia untuk pengolahan sumber daya alam Indonesia; 22 Februari 2011; Yogyakarta, Indonesia: Universitas Sebelas Maret.

Lampiran

Tabel 7 Daftar ANAVA Formula I

| Sumber variasi | Dk | JK | KT | F | Ftabel |
|----------------|----|------------|------------|--------|--------|
| Rata-rata | 1 | 346601,505 | 346601,505 | - | - |
| Perlakuan: | | | | | |
| S | 2 | 36,938 | 18,469 | 91,88 | 3,68 |
| H | 4 | 482,164 | 120,541 | 599,71 | 3,06 |
| SH | 8 | 62,464 | 7,808 | 38,85 | 2,64 |
| Kekeliruan | 15 | 3,023 | 0,201 | - | - |
| Jumlah | 30 | 347186,094 | - | - | - |

Tabel 8 Daftar ANAVA Formula II

| Sumber variasi | Dk | JK | KT | F | Ftabel |
|----------------|----|------------|------------|--------|--------|
| Rata-rata | 1 | 747899,668 | 747899,668 | - | - |
| Perlakuan: | | | | | |
| S | 2 | 140,722 | 70,361 | 115,92 | 3,68 |
| H | 4 | 1766,995 | 441,749 | 727,76 | 3,06 |
| SH | 8 | 279,936 | 34,992 | 57,65 | 2,64 |
| Kekeliruan | 15 | 9,099 | 0,607 | - | - |
| Jumlah | 30 | 750096,42 | - | - | - |

Tabel 9 Daftar ANAVA Formula III

| Sumber variasi | Dk | JK | KT | F | Ftabel |
|----------------|----|------------|------------|---------|--------|
| Rata-rata | 1 | 2802046,41 | 2802046,41 | - | - |
| Perlakuan : | | | | | |
| S | 2 | 241,83 | 120,915 | 161,22 | 3,68 |
| H | 4 | 11261,34 | 2815,335 | 3753,78 | 3,06 |
| SH | 8 | 1149,78 | 143,72 | 191,63 | 2,64 |
| Kekeliruan | 15 | 11,21 | 0,75 | - | - |
| Jumlah | 30 | 2814710,57 | - | - | - |

Tabel 10 Hasil Uji Newman Keuls pada Perbandingan Cara Sterilisasi terhadap Kadar Natrium Sulfasetamida (Formula I)

| Ho | q hitung | RST | Keterangan |
|----|----------|------|------------|
| 1 | 2,72 | 0,52 | Ditolak |
| 2 | 1,36 | 0,43 | Ditolak |
| 3 | 1,36 | 0,43 | Ditolak |

Tabel 11 Hasil Uji Newman Keuls pada Perbandingan Cara Sterilisasi terhadap Kadar Natrium Sulfasetamida (Formula II)

| Ho | q hitung | RST | Keterangan |
|----|----------|------|------------|
| 1 | 4,82 | 0,9 | Ditolak |
| 2 | 0,48 | 0,74 | Ditolak |
| 3 | 4,34 | 0,74 | Diterima |

Tabel 12 Hasil Uji Newman Keuls pada Perbandingan Cara Sterilisasi terhadap Kadar Natrium Sulfasetamida (Formula III)

| Ho | q hitung | RST | Keterangan |
|----|----------|------|------------|
| 1 | 6,94 | 1,00 | Ditolak |
| 2 | 3,02 | 0,82 | Ditolak |
| 3 | 3,92 | 0,82 | Ditolak |

Tabel 13 Hasil Uji Newman Keuls pada Perbandingan Hari terhadap Kadar Natrium Sulfasetamida (Formula I)

| H ₀ | q hitung | RST | Keterangan |
|----------------|----------|------|------------|
| 1 | 11,13 | 0,62 | Ditolak |
| 2 | 3,09 | 0,58 | Ditolak |
| 3 | 1,68 | 0,52 | Ditolak |
| 4 | 0,96 | 0,43 | Ditolak |
| 5 | 10,17 | 0,58 | Ditolak |
| 6 | 2,13 | 0,52 | Ditolak |
| 7 | 0,72 | 0,43 | Ditolak |
| 8 | 8,04 | 0,52 | Ditolak |
| 9 | 1,41 | 0,43 | Ditolak |
| 10 | 9,45 | 0,43 | Ditolak |

Tabel 14 Hasil Uji Newman Keuls pada Perbandingan Hari terhadap Kadar Natrium Sulfasetamida (Formula II)

| H ₀ | q hitung | RST | Keterangan |
|----------------|----------|------|------------|
| 1 | 19,92 | 1,08 | Ditolak |
| 2 | 5,28 | 1,00 | Ditolak |
| 3 | 0,18 | 0,9 | Diterima |
| 4 | 0,14 | 0,74 | Diterima |
| 5 | 19,78 | 1,00 | Ditolak |
| 6 | 5,14 | 0,9 | Ditolak |
| 7 | 14,64 | 0,74 | Diterima |
| 8 | 19,74 | 0,9 | Ditolak |
| 9 | 5,1 | 0,74 | Ditolak |
| 10 | 0,04 | 0,74 | Ditolak |

Tabel 15 Hasil Uji Newman Keuls pada Perbandingan Hari terhadap Kadar Natrium Sulfasetamida (Formula III)

| H ₀ | q hitung | RST | Keterangan |
|----------------|----------|------|------------|
| 1 | 51,43 | 1,2 | Ditolak |
| 2 | 20,01 | 1,12 | Ditolak |
| 3 | 4,1 | 1,0 | Ditolak |
| 4 | 1,52 | 0,82 | Ditolak |
| 5 | 49,91 | 1,12 | Ditolak |
| 6 | 18,49 | 1,0 | Ditolak |
| 7 | 2,58 | 0,82 | Ditolak |
| 8 | 47,33 | 1,0 | Ditolak |
| 9 | 31,42 | 0,82 | Ditolak |
| 10 | 15,91 | 0,82 | Ditolak |