



# PENGUJIAN MIKROBIOLOGI BAHAN FARMASI

# Bahan Farmasi

- Bahan baku
- Air murni (Purified Water)
- Produk Farmasi Steril (Sterile Pharmaceuticals)
- Produk Farmasi Non-Steril (Non-Sterile Pharmaceuticals)



# BAHAN BAKU FARMASI

- Bahan baku untuk produk farmasi dapat berupa bahan kimia atau bahan yang berasal dari alam
- Bahan yang berasal dari alam lebih cenderung terkontaminasi mikroorganisme lebih berat dibandingkan bahan sintetik kimia

# Uji Mikrobiologi yang Tercantum pada Farmakope Indonesia edisi V

- Uji secara Mikrobiologi

- <51> Uji Batas Mikroba

- <61> Uji Efektivitas Pengawet

- <71> Uji Sterilitas

- Uji dan Penetapan secara Biologi

- <91> Penetapan Aktivitas Vitamin B12

- <121> Penetapan Kadar Kalsium Pantotenat

- <131> Penetapan Potensi Antibiotik secara Mikrobiologi

# <51> Uji Batas Mikroba

Uji ini dilakukan untuk memperkirakan jumlah mikroba aerob serta mendeteksi mikroba yang terdapat dalam sediaan farmasi (dari bahan baku sampai bahan jadi).

Uji Batas Mikroba ini terbagi dua yaitu

1. Uji Enumerasi mikroba
2. Uji Mikroorganisme spesifik



# Uji Enumerasi Mikroba

- Adalah pengujian kuantitatif untuk bakteri mesofil dan kapang yang dapat tumbuh pada kondisi aerob.
- Pengujian ini dirancang untuk menentukan suatu bahan atau sediaan memenuhi spesifikasi mutu secara mikrobiologi yang telah ditetapkan, termasuk jumlah sampel yang akan digunakan dan interpretasi hasil uji.
- Metode ini tidak dapat diaplikasikan untuk produk yang mengandung mikroba viabel sebagai bahan aktif

# Uji Enumerasi Mikroba

- Pengujian dilakukan pada kondisi aseptik sebagai tindakan pencegahan untuk menghindari kontaminasi mikroba dari luar produk.
- Jika produk mempunyai aktifitas antimikroba sebelum diuji dilakukan netralisasi menggunakan inaktivator yang telah dibuktikan tidak toksik terhadap mikroba yang diuji.  
 contoh untuk pengawet nipagin dan nipasol menggunakan penetral adalah Polisorbat 80 (Tween 80)



# Uji Enumerasi Mikroba

- Metode pengujian Enumerasi ada 3 metode yaitu
  1. Metode Penyaringan Membran .
  2. Metode Angka Lempeng total
  3. Metode Angka Paling Mungkin (APM) yang umum digunakan untuk produk dengan tingkat kontaminasi rendah.
- Pemilihan metode pengujian berdasarkan beberapa faktor antara lain jenis produk yang diuji, persyaratan yang ditentukan dan ukuran sampel yang memadai untuk memperkirakan kesesuaian secara spesifik

# Uji Enumerasi Mikroba

- Ada dua yaitu
  1. Uji total mikroba aerob
  2. Uji total kapang dan khamir

## Media dan inkubasi

1. Uji total mikroba menggunakan media Tryptic soy agar (Soybean-Casein Digest Agar) . Inkubasi dilakukan pada suhu 30-35°, selama  $\leq 3$  hari.
- 2. Uji total kapang dan khamir menggunakan media Sabouraud Dextrose Agar (SDA) . Inkubasi dilakukan pada suhu 20-25°, selama  $\leq 5$  hari

# Uji Mikroorganisme Spesifik

adalah uji batas mikroba spesifik yang mungkin terdeteksi dengan kondisi dan metode yang sesuai.

Metode uji dirancang untuk menetapkan suatu produk memenuhi kriteria mutu secara mikrobiologi.

# Uji Mikroorganisme Spesifik

- Uji mikroorganisme spesifik ini untuk mendeteksi 7 mikroorganisme yaitu
    1. Bakteri *Escherichia coli*
    2. Bakteri *Salmonella*
    3. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*
    4. Bakteri *Staphylococcus aureus*
    5. Bakteri Empedu bakteri gram negatif (Bile tolerant gram negatif)
    6. Khamir *Candida albicans*
    7. *Clostridia*
- Mikroorganisme 1-6 adalah termasuk mikroba aerob dan mikroorganisme 7 adalah mikroba anerob.

# Bakteri *Salmonella*

Media yang digunakan adalah

## 1. Media Tryptic soy broth (TSB)

- Media ini merupakan media penyubur untuk mikroba patogen. Jika media terjadi pertumbuhan mikroba ditandai dengan adanya kekeruhan. Jika tidak keruh berarti negatif mengandung bakteri *Salmonella*.
- Inkubasi 30° - 35° selama 18-24 jam.

## 2. Media Rappaport Vassiliadis Salmonella Enrichment Broth (RVSE)

- Media ini digunakan jika pada media TSB terjadi kekeruhan (ada pertumbuhan mikroba). Jika ada pertumbuhan *Salmonella* pada media ini terjadi kekeruhan.
- Inkubasi 30° - 35° selama 18-24 jam.

# Bakteri *Salmonella*

- 
- 3. Media Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLDA)
  - Pada media ini Pertumbuhan koloni berwarna merah, dengan atau tanpa titik hitam di bagian tengah menunjukkan karakteristik *Salmonella*.
  - Inkubasi 30° - 35° selama 18-24 jam.



# Bakteri *Escherichia coli*

Media yang digunakan adalah

## 1. Media Tryptic soy broth (TSB)

- Media ini merupakan media penyubur untuk mikroba patogen. Jika media terjadi pertumbuhan mikroba ditandai dengan adanya kekeruhan. Jika tidak keruh berarti negatif mengandung bakteri *E.coli*
- Inkubasi 30° - 35° selama 18-24 jam.

## 2. Media Mac Conkey Broth (MCB)

- Media ini digunakan jika pada media TSB terjadi kekeruhan (ada pertumbuhan mikroba). Jika ada pertumbuhan *E.coli* pada media ini terjadi kekeruhan.
- Inkubasi 42° - 44° selama 24-48 jam.

# Bakteri *Eecherichia coli*

.

## 3. Media Mac Conkey Agar (MCA)

- Pada media ini ditandai tidak adanya pertumbuhan koloni berarti negatif *E.coli*. Jika ada pertumbuhan koloni berarti positif *E.coli*.
- Inkubasi 30° - 35° selama 18-72 jam.

# Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Media yang digunakan adalah

## 1. Media Tryptic soy broth (TSB)

- Media ini merupakan media penyubur untuk mikroba patogen. Jika media terjadi pertumbuhan mikroba ditandai dengan adanya kekeruhan. Jika tidak keruh berarti negatif mengandung bakteri *Staphylococcus aureus*
- Inkubasi 30° - 35° selama 18-24 jam.

## 2. Media Ceftrimide Agar (CETA)

- Pada media ini ditandai tidak adanya pertumbuhan koloni berarti negatif *P.aeruginosa*. Jika ada pertumbuhan koloni berarti positif *P.aeruginosa*
- Inkubasi 30° - 35° selama 18-72 jam.

# Bakteri *Staphylococcus aureus*

Media yang digunakan adalah

## 1. Media Tryptic soy broth (TSB)

- Media ini merupakan media penyubur untuk mikroba patogen. Jika media terjadi pertumbuhan mikroba ditandai dengan adanya kekeruhan. Jika tidak keruh berarti negatif mengandung bakteri *Staphylococcus aureus*
- Inkubasi 30° - 35° selama 18-24 jam.

## 2. Media Manitol salt agar (MSA)

- Pada media terjadi pertumbuhan koloni berwarna kuning atau putih dikelilingi zona kuning menunjukkan adanya *S.aureus*
- Inkubasi 30° - 35° selama 18-72 jam.

# Bakteri *Empedu gram negatif* (*bile tolerant gram negatif*)

Media yang digunakan adalah

## 1. Media Tryptic soy broth (TSB)

- Media ini merupakan media penyubur untuk mikroba patogen. Jika di media terjadi pertumbuhan mikroba ditandai dengan adanya kekeruhan. Jika tidak keruh berarti negatif mengandung bakteri E.coli
- Inkubasi 20° - 25° selama 2-5 jam.

## 2. Media *Enterobacteria Enrichment Broth Mossel*

Media ini digunakan jika pada media TSB terjadi kekeruhan (ada pertumbuhan mikroba). Jika ada pertumbuhan Empedu gram negatif pada media ini terjadi kekeruhan.

- Inkubasi 30° - 35° selama 24-48 jam.

# Bakteri *Empedu gram negatif* (*bile tolerant gram negatif*)

- 
- 3. *Media Violet Red Bile Glucose Agar*  
Pada media ini ditandai tidak adanya pertumbuhan koloni berarti negatif *Empedu gram negatif*. Jika ada pertumbuhan koloni berarti positif *Empedu gram negatif*
- Inkubasi 30° - 35° selama 18-24 jam.



# Khamir *Candida albicans*

Media yang digunakan adalah

## 1. Media Sabouraud Dextrose Broth(SDB)

- Media ini merupakan media penyubur untuk khamir. Jika di media terjadi pertumbuhan khamir ditandai dengan adanya kekeruhan. Jika tidak keruh berarti negatif mengandung khamir *Candida albicans*.
- Inkubasi 30° - 35° selama 3-5 hari

## 2. Media Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

- Media ini digunakan jika pada media SDB terjadi kekeruhan (ada pertumbuhan khamir). Adanya pertumbuhan koloni pada media ini ditandai adanya koloni berwarna putih menunjukkan adanya *C. albicans*.
- Inkubasi 30° - 35° selama 24-48 jam.

# Bakteri Clostridia

- Bakteri ini merupakan bakteri anaerob. Untuk menumbuhkan bakteri ini harus menggunakan anerobik jar dan menggunakan kits untuk bisa menarik oksigen.
- Untuk preparasi panaskan satu bagian sampel pada 80<sup>0</sup> selama 10 menit, dinginkan dengan cepat. Satu bagian lainnya tidak dipanaskan

# Bakteri Clostridia

Media yang digunakan adalah

## 1. Media *Reinforced Medium for Clostridia (RMC)*

- Media ini merupakan media penyubur untuk Clostrida. Jika media terjadi pertumbuhan Clostrida ditandai dengan adanya kekeruhan. Jika tidak keruh berarti negatif mengandung bakteri Clostridia.
- Inkubasi pada kondisi anaerob pada suhu 30° - 35° selama 48-72 jam.

## 2. Media Columbia agar

- Media ini digunakan jika pada media RMC terjadi kekeruhan (ada pertumbuhan bakteri Clostridia). Adanya pertumbuhan koloni Pertumbuhan koloni anaerob bentuk batang (dengan atau tanpa endospora) memberikan reaksi katalase negatif.
- Inkubasi 30° - 35° selama 48 jam.

# <61> Uji Efektivitas Pengawet

- **Pengertian Pengawet Antimikroba** : zat yang ditambahkan pada sediaan obat untuk melindungi sediaan terhadap kontaminasi mikroba.
- Pengawet terutama digunakan pada **wadah dosis ganda**
- Pengawet tidak boleh digunakan semata-mata untuk menurunkan jumlah mikroba viabel sebagai pengganti cara produksi yang tidak baik
- **Kadar** yang digunakan harus serendah mungkin
- Pengujian dalam farmakope dimaksudkan untuk menguji efektivitas pengawet yang ditambahkan pada sediaan dosis ganda yang dibuat dengan **dasar atau bahan pembawa cairan**
- Pengujian dan persyaratan hanya berlaku pada produk di dalam **wadah asli yang belum dibuka** , yang didistribusikan oleh produsen

# <61> Uji Efektivitas Pengawet

Untuk tujuan pengujian, sediaan dibagi menjadi 4 Kategori yaitu

1. Termasuk emulsi, sediaan tetes telinga, sediaan steril tetes hidung, dan sediaan optalmik yang dibuat dengan dasar atau pembawa air.
2. Sediaan topikal yang dibuat dengan dasar atau pembawa air, sediaan tetes hidung non-steril, dan emulsi, termasuk sediaan yang dioleskan ke membran mukosa.
3. Sediaan oral selain antasida, dibuat dengan dasar atau pembawa air.
4. Antasida yang dibuat dengan pembawa air.

# <61> Uji Efektivitas Pengawet

## • MIKROBA UJI DAN MEDIA YANG DIGUNAKAN

Gunakan biakan mikroba berikut:

- *Candida albicans* (ATCC No. 10231), media yang digunakan *Sabouraud Dextrose Agar* dan *Sabouraud Dextrose Broth*
- *Aspergillus niger* (ATCC No.16404), media yang digunakan *Soybean-Casein Digest Broth (TSB)* ; *Soybean-Casein Digest Agar (TSA)*
- *Escherichia coli* (ATCC No. 8739), media yang digunakan *Soybean-Casein Digest Broth (TSB)* ; *Soybean-Casein Digest Agar (TSA)*



# <61> Uji Efektivitas Pengawet

## • MIKROBA UJI DAN MEDIA YANG DIGUNAKAN

Gunakan biakan mikroba berikut:

- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC No. 9027) media yang digunakan *Soybean-Casein Digest Broth (TSB)* ; *Soybean-Casein Digest Agar (TSA)*
- *Staphylococcus aureus* (ATCC No. 6538), media yang digunakan *Soybean-Casein Digest Broth (TSB)* ; *Soybean-Casein Digest Agar (TSA)*
- Mikroba hidup yang digunakan untuk pengujian tidak boleh lebih dari lima pasase dari biakan ATCC asli.

# <61> Uji Efektivitas Pengawet

- **KRITERIA EFEKTIVITAS ANTIMIKROBA**

Persyaratan untuk efektivitas antimikroba dipenuhi jika kriteria spesifik pada *Tabel dibawah* dipenuhi: Tidak terjadi peningkatan lebih tinggi dari log 0,5 unit terhadap nilai log mikroba awal.

# <61> Uji Efektivitas Pengawet

## Tabel kriteria untuk mikroba uji

	<b>Kategori sediaan 1</b>
Bakteri	Koloni tidak kurang dari 1,0 log reduksi dari jumlah hitungan awal pada hari ke-7, tidak kurang dari 3,0 log reduksi dari hitungan awal pada hari ke-14, dan tidak meningkat sampai dengan hari ke-28.
Jamur	Koloni tidak meningkat dari jumlah hitungan awal sampai hari ke-7, 14 dan 28.
	<b>Kategori sediaan 2</b>
Bakteri	Koloni tidak kurang dari 2,0 log reduksi dari jumlah awal pada hari ke-14, dan tidak meningkat dari hari ke-14 sampai hari ke-28.
Jamur	Koloni tidak meningkat dari jumlah hitungan awal sampai hari ke-14 dan 28.
	<b>Kategori sediaan 3</b>
Bakteri	Koloni tidak kurang dari 1,0 log reduksi dari jumlah hitungan awal pada hari ke-14, dan tidak meningkat sampai dengan hari ke-28.
Jamur	Koloni tidak meningkat dari jumlah hitungan awal sampai hari ke-14 dan 28.

# <61> Uji Efektivitas Pengawet

Tabel kriteria untuk mikroba uji

	Kategori sediaan 4
Bakteri dan jamur	Koloni tidak meningkat dari jumlah hitungan awal sampai hari ke-14 dan 28.

# <71> Uji Sterilitas

- Digunakan untuk menetapkan apakah bahan atau produk farmasi yang harus steril memenuhi syarat berkenaan dengan uji sterilitas seperti yang tertera pada masing-masing monografi bahan atau produk
- Media berikut adalah media yang sesuai untuk uji sterilitas. Media Cair Tioglikolat terutama digunakan untuk pertumbuhan bakteri anaerob, termasuk juga untuk mendeteksi bakteri aerob. “*Soybean-Casein Digest Medium (TSB)*” sesuai untuk pertumbuhan kapang dan bakteri aerob.

# <71> Uji Sterilitas

- Metoda yang digunakan ada dua yaitu

## 1. Metoda penyaringan membran

Setelah isi wadah atau isi beberapa wadah yang diuji disaring melalui membran. Membrannya ditanamkan pada media untuk uji sterilitas.

## 2. Cara langsung

Bahan yang akan diuji dimasukkan langsung kedalam media . Biasanya digunakan untuk pengujian sterilitas benang bedah, kasa steril.

# <71> Uji Sterilitas

- **Pengamatan dan Penafsiran Hasil Uji.**
- Jika tidak terjadi pertumbuhan mikroba, maka bahan uji memenuhi syarat sterilitas.
- Jika terbukti terjadi pertumbuhan mikroba, maka bahan uji tidak memenuhi syarat sterilitas, kecuali dapat ditunjukkan bahwa uji tidak absah disebabkan oleh hal yang tidak berhubungan dengan bahan uji.

# <71> Uji Sterilitas

- **Pengamatan dan Penafsiran Hasil Uji.**
- Pada interval waktu tertentu dan akhir periode inkubasi, amati secara visual adanya pertumbuhan mikroba dalam media. Jika bahan uji menimbulkan kekeruhan pada media sehingga tidak dapat ditetapkan secara visual ada atau tidaknya pertumbuhan mikroba, 14 hari sejak mulai inkubasi, pindahkan sejumlah media (tiap tabung tidak kurang dari 1 ml) ke dalam media segar yang sama, kemudian inkubasi bersama-sama tabung awal selama tidak kurang dari 4 hari.



# <71> Uji Sterilitas

- **Pengamatan dan Penafsiran Hasil Uji.**
- Uji dikatakan tidak absah jika satu atau lebih kondisi dibawah ini dipenuhi:
  - a. Data pemantauan mikrobiologi terhadap fasilitas uji sterilitas menunjukkan ketidaksesuaian
  - b. Pengkajian prosedur uji yang digunakan selama pengujian menunjukkan ketidaksesuaian
  - c. Pertumbuhan mikroba ditemukan pada kontrol negatif

# <71> Uji Sterilitas

- **Pengamatan dan Penafsiran Hasil Uji.**
- d. Setelah dilakukan identifikasi mikroba yang diisolasi dari hasil uji, pertumbuhan mikroba (beberapa mikroba) dapat dianggap berasal dari kesalahan pada bahan uji, atau teknik pengujian yang digunakan pada prosedur uji sterilitas.

# <71> Uji Sterilitas

- **Pengamatan dan Penafsiran Hasil Uji.**
- Jika pengujian dinyatakan tidak absah, lakukan uji ulang dengan jumlah bahan yang sama dengan uji awal.
- Jika tidak terbukti terjadi pertumbuhan mikroba pada uji ulang, maka contoh memenuhi syarat uji sterilitas.
- Jika ditemukan pertumbuhan mikroba pada uji ulang, maka contoh tidak memenuhi syarat uji sterilitas.

# <91> Penetapan Aktivitas Vitamin B12

- Dilakukan menggunakan bakteri uji *Lactobacillus leichmanii* dengan metode turbidimetri
- Pembanding larutan baku **Sianokobalamin BPF1** berkisar antara 0,01 – 0,04 ng per mL. Blanko menggunakan air.
- Metode spektrofotometri pada panjang gelombang 530 nm.
- Penetapan kadar dihitung melalui kurva baku

# <121> Penetapan Kadar Kalsium Pantotenat

- Dilakukan menggunakan bakteri uji *Lactobacillus plantarum* dengan metode turbidimetri
- Pembanding larutan baku Kalsium pantotenat BPF1 berkisar antara 0,01 – 0,04  $\mu\text{g}$  per mL. Blanko menggunakan air.
- Metode spektrofotometri pada panjang gelombang 660 nm.
- Penetapan kadar dihitung melalui kurva baku

# <131> Penetapan Potensi Antibiotik secara Mikrobiologi

- Aktivitas (potensi) suatu antibiotik dapat ditunjukkan pada kondisi sesuai dengan efek daya hambatnya terhadap mikroba uji
- Perbedaan kadar dan potensi
- Dua metode umum : **cara lempeng** dan **cara tabung**
- Cara lempeng : menggunakan kertas cakram atau selinder baja, efek difusi antibiotik pada medium agar.
- Cara tabung : turbidimetri, efek larutan antibiotik terhadap turbiditas mikroba

TERIMA KASIH