

Masukan dapat disampaikan melalui menu Konsultasi Publik pada laman <https://standarobat.pom.go.id> atau melalui email standardisasiobat@pom.go.id sampai dengan **24 April 2026**

RANCANGAN
KEPUTUSAN KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
NOMOR TAHUN 2026
TENTANG
PEDOMAN VERIFIKASI METODE ANALISIS UJI PENGHITUNGAN MIKROBA
DAN UJI MIKROBA SPESIFIK PADA OBAT DAN BAHAN OBAT

DENGAN RAHMAT TUHAN YANG MAHA ESA

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN,

- Menimbang : a. bahwa untuk memastikan obat dan bahan obat telah sesuai dengan persyaratan mutu, perlu dilakukan pengujian menggunakan metode analisis yang telah diverifikasi sehingga mendapatkan hasil yang valid, akurat, dan konsisten sesuai tujuan penggunaannya;
- b. bahwa berdasarkan ketentuan Pasal ... Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor ... Tahun 2026 tentang Kriteria dan Tata Laksana Registrasi Obat perlu disusun pedoman verifikasi metode analisis uji penghitungan mikroba dan uji mikroba spesifik pada obat dan bahan obat;
- c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud dalam huruf a dan huruf b, perlu menetapkan Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan tentang Pedoman Verifikasi Metode Analisis Uji Penghitungan Mikroba dan Uji Mikroba Spesifik pada Obat dan Bahan Obat;
- Mengingat : 1. Peraturan Presiden Nomor 80 Tahun 2017 tentang Badan Pengawas Obat dan Makanan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2017 Nomor 180);
2. Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 21 Tahun 2020 tentang Organisasi dan Tata Kerja Badan Pengawas Obat dan Makanan (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2020 Nomor 1002) sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 13 Tahun 2022 tentang Perubahan atas

- Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 21 Tahun 2020 tentang Organisasi dan Tata Kerja Badan Pengawas Obat dan Makanan (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2022 Nomor 629);
3. Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 19 Tahun 2023 tentang Organisasi dan Tata Kerja Unit Pelaksana Teknis pada Badan Pengawas Obat dan Makanan (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2023 Nomor 611) sebagaimana telah beberapa kali diubah terakhir dengan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 1 Tahun 2026 tentang Perubahan Kedua atas Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 19 Tahun 2023 tentang Organisasi dan Tata Kerja Unit Pelaksana Teknis pada Badan Pengawas Obat dan Makanan (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2026 Nomor 61);
 4. Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor xx Tahun 2026 tentang Kriteria dan Tata Laksana Registrasi Obat (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2026 Nomor xxx);

MEMUTUSKAN:

- Menetapkan : KEPUTUSAN KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN TENTANG PEDOMAN VERIFIKASI METODE ANALISIS UJI PENGHITUNGAN MIKROBA DAN UJI MIKROBA SPESIFIK PADA OBAT DAN BAHAN OBAT.
- Kesatu : Menetapkan Pedoman Verifikasi Metode Analisis Uji Penghitungan Mikroba dan Uji Mikroba Spesifik Pada Obat dan Bahan Obat yang selanjutnya disebut Pedoman sebagaimana tercantum dalam Lampiran yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Keputusan ini.
- Kedua : Pedoman sebagaimana dimaksud dalam diktum Kesatu terdiri atas verifikasi metode analisis untuk:
a. uji penghitungan mikroba; dan
b. uji mikroba spesifik.
- Ketiga : Pedoman sebagaimana dimaksud dalam diktum Kesatu sebagai acuan bagi:

- a. Pelaku Usaha dan Petugas dalam melakukan verifikasi metode analisis uji penghitungan mikroba dan uji mikroba spesifik di laboratorium; dan
- b. Petugas dalam melakukan evaluasi hasil verifikasi metode analisis uji penghitungan mikroba dan uji mikroba spesifik yang dilakukan oleh Pelaku Usaha.

Keempat : Pelaksanaan Pedoman sebagaimana dimaksud dalam diktum Kesatu merupakan bagian dari pemenuhan persyaratan mutu yang tidak terpisahkan sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang mengatur mengenai:

- a. kriteria dan tata laksana registrasi Obat;
- b. standar cara pembuatan Obat yang baik; dan/atau
- c. Farmakope Indonesia.

Kelima : Keputusan ini mulai berlaku pada tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di Jakarta
pada tanggal **xxxx**

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN
MAKANAN,

TARUNA IKRAR

LAMPIRAN
KEPUTUSAN KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN
MAKANAN
NOMOR TAHUN 2026
TENTANG
PEDOMAN VERIFIKASI METODE ANALISIS UJI
PENGHITUNGAN MIKROBA DAN UJI MIKROBA SPESIFIK
PADA OBAT DAN BAHAN OBAT

**PEDOMAN VERIFIKASI METODE ANALISIS UJI PENGHITUNGAN
MIKROBA DAN UJI MIKROBA SPESIFIK PADA OBAT DAN BAHAN OBAT**

**BAB I
PENDAHULUAN**

A. Latar belakang

Pengujian mikrobiologi merupakan parameter yang sangat penting untuk memastikan bahwa obat dan/atau bahan obat tidak terkontaminasi mikroorganisme yang dapat memengaruhi keamanan, khasiat, mutu obat dan/atau bahan obat tersebut. Selama proses pembuatan produk farmasi, kontaminasi mikrobiologi dikendalikan dengan penerapan Standar Cara Pembuatan Obat yang Baik (CPOB). Proses pengendalian mikrobiologi di industri farmasi memerlukan penilaian risiko yang komprehensif. Penilaian ini melibatkan pengujian bahan baku, pemeriksaan selama proses produksi, dan pengujian pada produk jadi untuk memastikan tidak ada mikroorganisme yang melampaui batas yang ditentukan. Pada produk nonsteril, penilaian risiko menjadi lebih kompleks, dimana jumlah mikroorganisme dan jenisnya menjadi faktor penting yang perlu diperhatikan. Oleh karena itu, penting untuk melakukan pengujian mikrobiologi yang lebih rinci pada produk nonsteril, terutama uji penghitungan mikroba dan uji mikroba spesifik.

Pengujian mikrobiologi untuk obat dan/atau bahan obat telah diatur dalam Farmakope Indonesia (FI) maupun farmakope yang diterapkan di negara lain atau pedoman/ketentuan yang berlaku secara internasional yang telah menetapkan serangkaian prosedur/metode analisis pengujian mikrobiologi yang sangat penting untuk memastikan obat dan/atau bahan obat aman digunakan. Oleh karena itu, keandalan metode analisis mikrobiologi menjadi persyaratan mutlak dalam sistem jaminan mutu. Sebelum digunakan pertama kali untuk pengujian sampel, metode analisis harus divalidasi atau diverifikasi. Hal ini sesuai dengan Standar Cara Pembuatan Obat yang Baik yang menyatakan bahwa metode analisis seharusnya divalidasi, kecuali metode yang digunakan tersebut terdapat dalam

farmakope yang relevan atau rujukan standar lain yang diakui. Meskipun demikian, kesesuaian semua metode pengujian yang digunakan seharusnya diverifikasi pada kondisi aktual penggunaan dan didokumentasikan.

Dalam praktik laboratorium, verifikasi metode analisis mikrobiologi bertujuan untuk memastikan bahwa metode yang telah divalidasi sesuai dengan kondisi laboratorium pengguna, yang dapat berbeda dengan kondisi laboratorium pengembang metode. Variasi kondisi tersebut meliputi:

1. Kompetensi personel penguji di laboratorium tersebut.
2. Peralatan dan instrumen yang digunakan.
3. Kualitas reagen, media kultur, dan *strain* mikroba uji yang digunakan.
4. Komposisi produk uji, seperti adanya pengawet atau zat penghambat.
5. Bentuk sediaan.

Perbedaan kondisi tersebut dapat memengaruhi kinerja metode, yang berpotensi menghasilkan data yang tidak valid jika tidak dilakukan verifikasi terlebih dahulu. Oleh karena itu, verifikasi metode sangat penting untuk memastikan bahwa metode yang digunakan dapat diterapkan pada kondisi laboratorium pengguna dan sampel sesuai dengan tujuan penggunaannya.

Ketentuan mengenai verifikasi metode analisis pada prinsipnya telah diatur dalam farmakope, antara lain Farmakope Indonesia pada Lampiran *Verifikasi Prosedur dalam Farmakope* <1382> maupun *General Chapter USP Verification of Compendial Procedures* <1226>. Lampiran pada farmakope tersebut secara spesifik menyatakan bahwa verifikasi metode analisis mikrobiologi tidak termasuk dalam Lampiran <1382> karena telah tercantum dalam *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba* <52>, *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Mikroba Spesifik* <53>, dan *General Chapter USP: Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles* <1227>. Namun, baik lampiran FI <52> dan <53> maupun *General Chapter USP* <1227> belum memuat secara eksplisit terkait pelaksanaan verifikasi metode analisis, khususnya dalam hal karakteristik kinerja analitik dan kriteria keberterimaan. Sejalan dengan hal tersebut, dibutuhkan suatu pedoman verifikasi metode analisis uji penghitungan mikroba dan uji mikroba spesifik pada obat dan bahan obat yang dapat digunakan sebagai rujukan bagi pengguna metode analisis baku dalam melakukan verifikasi metode analisis yang sesuai.

B. Maksud dan Tujuan

Pedoman ini dimaksudkan untuk melengkapi Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan yang mengatur kriteria dan tata laksana registrasi Obat, Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan yang mengatur Verifikasi Metode Analisis Obat dan Bahan Obat, dan Farmakope Indonesia. Pedoman Verifikasi Metode Analisis Uji Penghitungan Mikroba dan Uji Mikroba Spesifik pada Obat dan Bahan Obat bertujuan untuk memberikan panduan yang memuat persyaratan minimum yang harus dipenuhi oleh:

- a. Pelaku Usaha dan Petugas dalam melakukan verifikasi metode analisis uji penghitungan mikroba dan uji mikroba spesifik di laboratorium; dan
 - b. Petugas dalam melakukan evaluasi hasil verifikasi metode analisis uji penghitungan mikroba dan uji mikroba spesifik yang dilakukan oleh Pelaku Usaha,
- pada bahan baku obat nonsteril dan sediaan obat nonsteril untuk memastikan metode yang digunakan menghasilkan hasil yang valid, akurat, dan konsisten.

C. Ruang Lingkup

Pedoman ini memuat ketentuan mengenai verifikasi metode analisis uji penghitungan mikroba dan uji mikroba spesifik pada bahan baku obat nonsteril dan sediaan obat nonsteril yang tidak mempersyaratkan uji sterilitas.

D. Definisi Operasional

1. Obat adalah bahan, paduan bahan, termasuk produk biologi, yang digunakan untuk mempengaruhi atau menyelidiki sistem fisiologi atau keadaan patologi dalam rangka penetapan diagnosis, pencegahan, penyembuhan, pemulihan, peningkatan kesehatan, dan kontrasepsi untuk manusia.
2. Bahan Obat adalah bahan yang berkhasiat atau tidak berkhasiat yang digunakan dalam pengolahan Obat dengan standar dan mutu sebagai bahan farmasi.
3. Petugas adalah pegawai di lingkungan Badan Pengawas Obat dan Makanan yang diberi tugas melakukan pengawasan Obat dan/atau Bahan Obat.
4. Pelaku Usaha adalah setiap orang perseorangan atau badan usaha, baik yang berbentuk badan hukum maupun bukan badan hukum, yang didirikan dan berkedudukan atau melakukan kegiatan dalam wilayah hukum Negara Republik Indonesia, baik sendiri maupun bersama-sama menyelenggarakan kegiatan usaha dalam bidang Obat dan/atau Bahan Obat.

BAB II

TINJAUAN TEORI

A. Kontaminasi Mikroba

Sediaan farmasi rentan terhadap kontaminasi mikroba yang dapat menimbulkan risiko kesehatan bagi pasien serta menyebabkan kerusakan sediaan, perubahan estetika, dan penurunan efektivitas sediaan farmasi tersebut. Kontaminasi mikroba dapat berasal dari bahan obat atau berasal dari proses pembuatan, pengemasan, penyimpanan, maupun penggunaan. Sumber utama kontaminasi meliputi:

- i. Bahan obat termasuk air yang dapat mengandung mikroorganisme.
- ii. Proses pembuatan: kontaminasi dapat berasal dari personel, peralatan yang terkontaminasi, lingkungan, dan kemasan.
- iii. Penyimpanan dan penggunaan: penanganan dan kondisi penyimpanan yang tidak tepat dapat menyebabkan kontaminasi atau memfasilitasi pertumbuhan mikroba.

Sediaan yang paling rentan terhadap kontaminasi adalah sediaan yang memiliki aktivitas air seperti pada Tabel 1, mengandung pemanis atau gula, atau dalam wadah dosis ganda. Hal ini menjadi salah satu alasan utama pengawet ditambahkan pada formulasi sediaan tersebut untuk melindungi dari pertumbuhan mikroba.

Tabel 1. Sediaan farmasi yang rentan terhadap kontaminasi berdasarkan aktivitas air

Sediaan	Aktivitas air	Kontaminan berpotensi besar tumbuh
Inhalasi hidung	0,99	Bakteri Gram-negatif
Cairan topikal	0,99	Bakteri Gram-negatif
Antasida	0,99	Bakteri Gram-negatif
Krim topikal	0,97	Bakteri Gram-positif
Cairan oral	0,90	Bakteri Gram-positif dan kapang
Suspensi oral	0,87	Kapang
Salep topikal	0,55	-
Suppositoria vaginal dan rektal	0,30	-
Tablet kempa	0,36	-

Kapsul berisi cairan	0,30	-
----------------------	------	---

(Pustaka: Kementerian Kesehatan. 2022. *Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI. 2022. Hal 294*)

Mayoritas kontaminan pada bahan obat sediaan non steril adalah bakteri, kapang dan khamir. Mikroba ini dapat berkembang biak dengan tersedianya nutrisi dan kondisi lingkungan yang sesuai. Bahan obat yang digunakan dalam formulasi sediaan farmasi dapat menjadi substrat bagi mikroorganisme ketika kondisi yang tepat tersedia seperti aktivitas air, pH, dan suhu.

Sediaan oral dengan pembawa bukan air (misalnya tablet) meskipun kurang rentan terhadap kontaminasi mikroba, kerusakan sediaan tersebut akibat organisme vegetatif juga dapat terjadi terutama di daerah beriklim tropis dan lembap. Berbagai jenis tablet, baik bersalut maupun tidak bersalut, dapat terkontaminasi oleh bakteri (seperti *Klebsiella aerogenes*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Staphylococcus aureus*), kapang dan khamir (seperti *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, dan *Saccharomyces spp*).

Sediaan oral dengan pembawa air (misalnya sirup) yang mengandung gula tinggi (sekitar 85%) dapat menghambat pertumbuhan bakteri karena efek eksosmotik terhadap mikroorganisme, sedangkan sediaan yang mengandung lebih dari 15% alkohol, umumnya memiliki efek pengawet alami. Namun, mikroba tetap dapat bertahan dalam kondisi lingkungan yang ekstrim. Salah satu contoh adalah povidone iodine yang merupakan zat antimikroba yang seharusnya mampu membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri, dalam kondisi tertentu zat ini sendiri dapat terkontaminasi oleh bakteri, terutama spesies *Pseudomonas*. Sediaan non steril lain (seperti krim, salep, gel, pasta dan suppositoria) juga berisiko mengalami kontaminasi mikroba, terutama bila mengandung air atau bahan alami yang menjadi sumber nutrisi bagi mikroba.

Untuk memastikan bahwa sediaan tersebut memenuhi persyaratan mutu mikrobiologi dan aman digunakan oleh pasien, maka diperlukan serangkaian pengujian mikrobiologi yang terstandar. Pengujian ini berfungsi untuk menilai tingkat cemaran mikroba serta memastikan tidak adanya mikroorganisme patogen yang berpotensi menimbulkan risiko terhadap kesehatan. Adanya mikroba tertentu dalam sediaan obat non steril dapat berpotensi mengurangi atau bahkan menonaktifkan aktivitas sediaan terapeutik dan berpotensi memberi dampak buruk bagi kesehatan pasien. Oleh karena itu, Pelaku Usaha harus memastikan jumlah cemaran mikroba yang rendah dalam obat jadi dengan menerapkan standar CPOB selama pembuatan, penyimpanan, dan distribusi sediaan farmasi. Uji mikroba sediaan obat non steril dilakukan sesuai dengan metode pada pengujian

mikrobiologi sediaan non steril yaitu uji penghitungan mikroba dan uji mikroba spesifik. (Pustaka: Clontz, Lucia, 2009. *Microbial Limit and Bioburden Test, Validation Approaches and Global Requirements Second Edition*. Taylor & Francis Group. 35-40).

1. Uji Penghitungan Mikroba

Uji ini merupakan uji kuantitatif untuk bakteri mesofil dan kapang khamir yang dapat tumbuh pada kondisi aerob. Pengujian ini dirancang untuk menentukan apakah suatu bahan atau sediaan memenuhi spesifikasi mutu secara mikrobiologi yang telah ditetapkan. Metode ini tidak dapat diaplikasikan untuk sediaan yang mengandung mikroba viabel sebagai bahan aktif.

Pengujian dilakukan pada kondisi aseptik sebagai tindakan pencegahan untuk menghindari kontaminasi mikroba luar terhadap sediaan, tetapi tidak memengaruhi mikroba yang diuji. Jika sediaan yang akan diuji memiliki aktivitas antimikroba, sifat antimikroba dihilangkan atau dinetralkan sebelum diuji. Jika digunakan inaktivator, harus dibuktikan efikasi dan tidak toksik terhadap mikroba. Jika dalam penyiapan sampel digunakan surfaktan, harus dibuktikan surfaktan tidak toksik terhadap mikroba dan kompatibel dengan inaktivator yang digunakan.

2. Uji Mikroba Spesifik

Uji ini untuk menjelaskan tentang keberadaan atau batas mikroba spesifik yang dapat dideteksi dengan kondisi dan metode yang sesuai. Pengujian ini dirancang untuk menentukan apakah suatu bahan atau sediaan memenuhi kriteria spesifikasi mutu secara mikrobiologi yang telah ditetapkan. Untuk penyiapan sampel dan perlakuan terhadap obat yang memiliki aktivitas antimikroba dan surfaktan, dilakukan sesuai dengan uji penghitungan mikroba.

Kemampuan metode untuk mendeteksi mikroba pada obat yang diuji harus ditetapkan. Jika terjadi perubahan kinerja pengujian atau perubahan sediaan yang memengaruhi hasil uji, maka harus dilakukan kesesuaian terhadap metode. Dalam uji mikroba spesifik, mikroba yang perlu diperhatikan antara lain:

- a. *Escherichia coli* (*E. coli*);
- b. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*);
- c. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*);
- d. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium atau, alternatif,
- e. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abony
- f. *Aspergillus brasiliensis*
- g. *Candida albicans*

- h. *Bacillus subtilis*
- i. *Clostridium sporogens*
- j. Bakteri Gram-Negatif *Bile tolerant* misalnya *Enterobacter*

Dalam Kompendia, beberapa monografi bahan baku dan obat menetapkan batas mikroba serta mempersyaratkan bahan baku bebas dari satu atau lebih spesies mikroorganisme tertentu. Jika tidak disebutkan pada monografi, kriteria keberterimaan untuk uji mikrobiologi sediaan non steril berdasarkan ALT dan AKK yang tertera pada Tabel 2 serta kriteria keberterimaan untuk uji mikrobiologi bahan baku non steril untuk penggunaan farmasi seperti yang tertera pada Tabel 3. Kriteria keberterimaan berdasarkan pada hasil masing-masing uji atau rata-rata replikasi uji ketika replikasi dilakukan (misalnya, metode lempeng).

Tabel 2. Kriteria Keberterimaan untuk Uji Mikrobiologi Sediaan Non Steril

Rute Pemberian	Angka Lempeng Total (koloni per gram atau koloni per mL)	Angka Kapang Khamir (koloni per gram atau koloni per mL)	Mikroba Spesifik
Sediaan oral dengan pembawa bukan air	10 ³	10 ²	<i>Escherichia coli</i> : negatif per gram atau per mL
Sediaan oral dengan pembawa air	10 ²	10 ¹	<i>Escherichia coli</i> : negatif per gram atau per mL
Sediaan rektal	10 ³	10 ²	-
Sediaan untuk mukosa oral	10 ²	10 ¹	1. <i>Staphylococcus aureus</i> : negatif per gram atau per mL 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : negatif per gram atau per mL
Sediaan untuk gigi	10 ²	10 ¹	1. <i>Staphylococcus aureus</i> : negatif per gram atau per mL 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : negatif per gram atau

Rute Pemberian	Angka Lempeng Total (koloni per gram atau koloni per mL)	Angka Kapang Khamir (koloni per gram atau koloni per mL)	Mikroba Spesifik
			per mL
Sediaan untuk kulit	10^2	10^1	1. <i>Staphylococcus aureus</i> : negatif per gram atau per mL 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : negatif per gram atau per mL
Sediaan untuk hidung	10^2	10^1	1. <i>Staphylococcus aureus</i> : negatif per gram atau per mL 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : negatif per gram atau per mL
Sediaan untuk telinga	10^2	10^1	1. <i>Staphylococcus aureus</i> : negatif per gram atau per mL 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : negatif per gram atau per mL
Sediaan untuk vagina	10^2	10^1	1. <i>Staphylococcus aureus</i> : negatif per gram atau per mL 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : negatif per gram atau per mL 3. <i>Candida albicans</i> : negatif per gram atau per mL
Sediaan transdermal	10^2	10^1	1. <i>Staphylococcus aureus</i> :

Rute Pemberian	Angka Lempeng Total (koloni per gram atau koloni per mL)	Angka Kapang Khamir (koloni per gram atau koloni per mL)	Mikroba Spesifik
(batas untuk satu patch termasuk lapisan perekat dan penutup)			negatif per patch 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : negatif per patch
Sediaan inhalasi (persyaratan khusus berlaku untuk sediaan nebulizer)	10 ²	10 ¹	1. <i>Staphylococcus aureus</i> : negatif per gram atau per mL 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : negatif per gram atau per mL 3. Bakteri Gram-Negatif <i>Bile tolerant</i> : negatif per gram atau per mL

Tabel 3. Kriteria Keberterimaan untuk Uji Mikrobiologi Bahan Baku Nonsteril untuk Penggunaan Farmasi

	Angka Lempeng Total (koloni per gram atau koloni per mL)	Angka Kapang Khamir (koloni per gram atau koloni per mL)
Bahan untuk penggunaan farmasi	10 ³	10 ²

Tabel 2 meliputi daftar mikroba spesifik dan kriteria keberterimaan yang ditetapkan. Jenis mikroba spesifik dan kriteria keberterimaan yang ditetapkan pada Tabel 2 tidak membatasi untuk dilakukannya uji mikroba lain bila diperlukan untuk sediaan tertentu tergantung pada sifat bahan awal dan proses produksi.

Meskipun Lampiran <52 dan <53> menjelaskan mengenai metode untuk perolehan kembali dan identifikasi mikroba spesifik berdasarkan persyaratan pada monografi, pada dasarnya tetap diperlukan untuk mendeteksi keberadaan mikroba lain yang mungkin terdapat dalam produk. Dalam banyak kasus, mikroba tersebut merupakan patogen oportunistik atau patogen

yang baru diketahui dan tidak ditargetkan untuk perolehan kembali sesuai Lampiran <52 dan <53>.

Apabila dipersyaratkan kriteria keberterimaan untuk uji mikrobiologi, dapat diinterpretasikan sebagai berikut:

- $\leq 10^1$ koloni: maksimum penghitungan yang dapat diterima = 20;
- $\leq 10^2$ koloni: maksimum penghitungan yang dapat diterima = 200;
- $\leq 10^3$ koloni: maksimum penghitungan yang dapat diterima = 2000; dan seterusnya.

Satuan yang digunakan pada uji mikrobiologi adalah

- Koloni per gram (cfu/g) adalah untuk jumlah koloni mikroorganisme yang tumbuh dalam sampel padatan atau bahan yang memiliki massa tertentu.
- Koloni per milliliter (cfu/mL) adalah untuk menghitung jumlah koloni mikroorganisme yang tumbuh dalam sampel cairan atau media.
- Negatif per 10 gram adalah untuk tidak adanya mikroba spesifik dalam sampel padatan atau bahan yang memiliki massa tertentu.
- Negatif per gram adalah untuk tidak adanya mikroba spesifik dalam sampel padatan atau bahan yang memiliki massa tertentu.
- Negatif per ml adalah untuk tidak adanya mikroba spesifik dalam sampel cairan atau media.

Berdasarkan hal di atas, untuk memastikan batas mikroba pada bahan obat dan sediaan, pengendalian mutu yang berdasarkan ilmu pengetahuan harus diterapkan. Oleh karena itu, sangat penting bagi personel yang bertanggung jawab terhadap pengembangan/validasi dan verifikasi metode analisis untuk memiliki pemahaman yang mendalam tentang sifat fisiko kimia dan kerentanan kontaminasi mikroba dari obat dan bahan obat yang diuji.

(Pustaka: Kementerian Kesehatan. 2022. Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI. 2022. Hal 290-292).

B. Verifikasi Metode Analisis untuk Uji Mikrobiologi Non Steril

Dalam uji mikrobiologi sediaan non steril jika menggunakan metode yang tercantum pada farmakope, maka tidak diperlukan validasi metode analisis. Namun demikian, harus dilakukan verifikasi metode analisis untuk membuktikan tingkat perolehan kembali mikroba yang ada dalam sampel dengan metode uji yang digunakan

dan bahwa sampel tidak menghambat pertumbuhan mikroba atau memengaruhi kinerja maupun pengamatan metode tersebut.

Verifikasi kesesuaian metode dilakukan dengan mempertimbangkan beberapa hal:

- a. Terhadap produk atau bentuk sediaan baru dan/atau bahan aktif obat atau eksipien terkait.
- b. Terdapat perubahan pada prosedur pengujian selama prosedur tersebut masih terdapat pada kompendial.
- c. Terdapat perubahan pada bahan atau sediaan yang dapat memengaruhi hasil uji atau pertumbuhan mikroba.

Verifikasi kesesuaian metode diuji dengan dan tanpa penambahan sampel dilakukan dengan tiga percobaan independen.

(Pustaka: Roesti, David dan Goverde, Marcel. 2020. Pharmaceutical Microbiological Quality Assurance and Control, Practical Guide for Non-Sterile Manufacturing. Wiley. Hal 127).

Laboratorium diharapkan secara konsisten dapat membuktikan bahwa validasi/verifikasi tetap berlaku melalui prosedur pengendalian mutu yang mencakup karakteristik/parameter kinerja metode. Revalidasi/reverifikasi dapat dilakukan jika:

- a. Digunakan instrumen baru, misalnya penggunaan alat pendeteksian baru atau instrumen pengujian lainnya.
- b. Digunakan sampel baru; senyawa baru; matriks baru atau baku mikroba baru (apabila menggunakan mikroba lain yang tidak sesuai dengan acuan);
- c. Dilakukan pada lokasi dan kondisi lingkungan baru;
- d. Dilakukan modifikasi karena kendala analitis;
- e. Tinjauan pengendalian mutu menunjukkan bahwa metode yang telah ditetapkan mengalami perubahan seiring waktu;
- f. Dijadwalkan sesuai prosedur laboratorium;
- g. Dalam kasus kriteria kinerja metode yang berada di luar kriteria penerimaan.

(Pustaka: SADCAS Advisory Committee, 2018. Criteria for Validation and Quality Assurance in Microbiological Testing. SADCAS CEO. Hal 16).

BAB III

UJI PENGHITUNGAN MIKROBA

A. Pendahuluan

Prosedur uji penghitungan mikroba pada Lampiran <52> Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba di Suplemen I FI Edisi VI telah tervalidasi sehingga pengguna cukup melakukan verifikasi metode analisis ketika metode tersebut pertama kali digunakan di laboratorium untuk pengujian sampel dan/atau terdapat perubahan yang dapat memengaruhi metode tersebut untuk pengujian sampel. Verifikasi metode analisis bertujuan untuk membuktikan kesesuaian metode dalam menunjukkan kemampuan perolehan kembali mikroba uji dengan adanya matriks sampel.

Uji penghitungan mikroba termasuk dalam uji mikrobiologi kuantitatif. Uji mikrobiologi kuantitatif adalah metode analisis yang responsnya berupa jumlah dari analit terhadap sampel yang diuji, baik yang diukur secara langsung (misalnya penghitungan mikroba dalam bentuk koloni/ *colony forming unit/cfu*) maupun secara tidak langsung (misalnya nilai absorbans, intensitas warna, dan lain-lain) yang dinyatakan sebagai nilai numerik dalam satuan yang sesuai. Metode uji penghitungan mikroba pada Lampiran <52> di Suplemen I FI Edisi VI bertujuan untuk memperkirakan secara kuantitatif jumlah analit mikroba berdasarkan pertumbuhan (perkembangbiakan) mikroba yang dapat diamati dalam bentuk koloni atau kekeruhan. Jumlah koloni yang muncul atau tingkat kekeruhan pada pengamatan hasil merupakan indikator jumlah mikroba hidup yang terkandung dalam sampel.

Sebelum melakukan uji penghitungan mikroba untuk bahan obat dan/atau sediaan obat, terdapat beberapa hal kritis yang harus diperhatikan karena dapat memengaruhi hasil uji, di antaranya:

1. penanganan dan penyimpanan sampel yang akan diuji: sampel disimpan sesuai dengan kondisi penyimpanan yang tercantum pada label atau brosur kemasan, serta bagian luar wadah sampel harus didesinfeksi terlebih dahulu sebelum dipindahkan ke area kerja
2. komposisi produk yang diuji: keberadaan penghambat pertumbuhan mikroba (misalnya pengawet antimikroba, antibiotik, dan bahan sitotoksik)
3. kompleksitas metode: misalnya kebutuhan untuk menggunakan zat penetral atau tahap pengenceran/pencucian jika terdapat zat penghambat.
4. dapar dan media pertumbuhan spesifik yang digunakan harus sesuai, dan

5. metode uji penghitungan mikroba yang sesuai.

Terdapat 3 (tiga) jenis metode uji penghitungan mikroba yang dijelaskan dalam Lampiran <52> di Suplemen I FI Edisi VI, meliputi:

1. Angka lempeng (*Plate-count*)

Metode ini terdiri dari 2 (dua) jenis, yaitu metode tuang dan metode sebar. Pada metode tuang, sampel atau pengencerannya ditempatkan di dalam cawan yang kemudian dituangkan media agar yang masih cair, lalu koloni yang tumbuh di dalam media agar padat dihitung. Sedangkan pada metode sebar, sampel atau pengencerannya diteteskan pada permukaan agar padat, lalu koloni yang tumbuh di permukaan agar dihitung. Metode ini sesuai untuk bahan atau sediaan tidak larut air dan bahan atau sediaan berlemak. Kriteria keberterimaan berupa koloni/mL atau koloni/gram.

2. Penyaringan membran (*Membrane Filtration*)

Pada metode ini, koloni mikroba yang tumbuh pada membran dengan porositas tidak lebih dari 0,45 μm di permukaan media agar dihitung. Metode ini paling umum digunakan di farmakope dan memiliki sensitivitas paling tinggi dibanding metode lainnya. Metode ini sesuai untuk bahan atau sediaan berair, bahan atau sediaan larut air, dan bahan atau sediaan berminyak. Kriteria keberterimaan berupa koloni/mL atau koloni/gram.

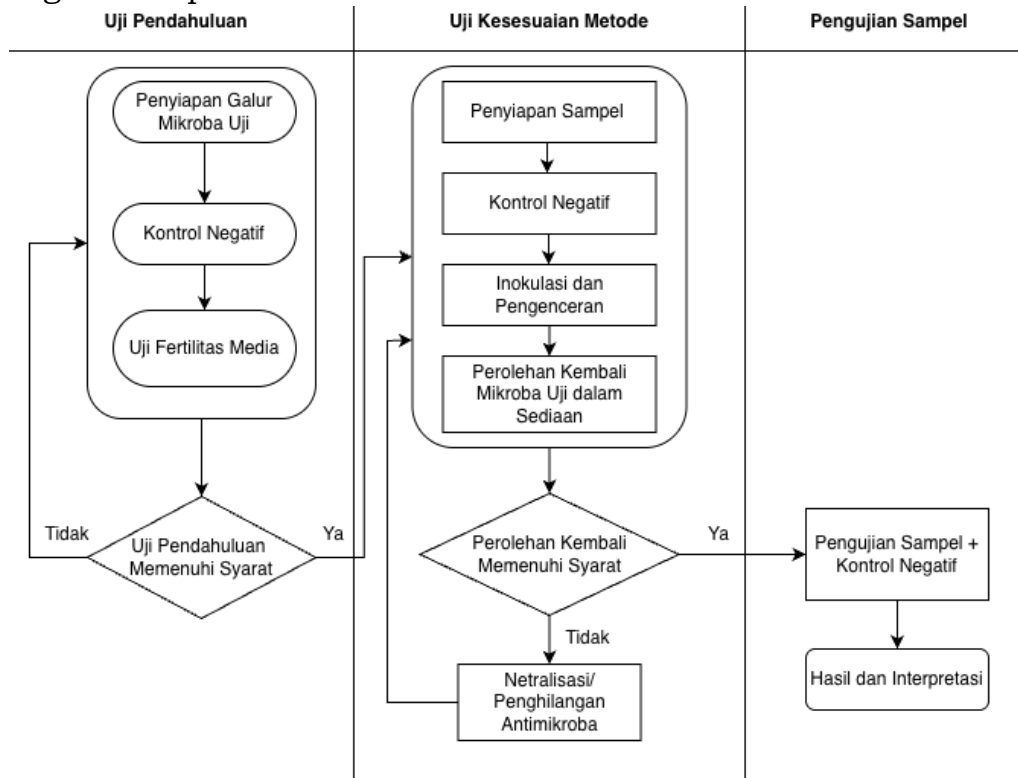
3. Angka Paling Mungkin (APM) (*Most Probable Number/MPN*)

Pada metode ini, perkiraan jumlah mikroba didasarkan pada proporsi dari pengenceran berseri kultur cair yang menunjukkan pertumbuhan setelah diberi inokulum dalam jumlah rendah. Metode ini sesuai untuk bahan atau sediaan tidak larut air dan bahan atau sediaan berlemak. Kriteria keberterimaan berupa APM/mL atau APM/gram.

Uji penghitungan mikroba yang terdapat di farmakope dilakukan sesuai dengan yang dipersyaratkan di monografi. Metode APM secara umum kurang akurat untuk penghitungan mikroba, namun sesuai untuk produk dengan tingkat kontaminasi mikroba yang rendah. Pemilihan metode yang digunakan didasarkan pada faktor-faktor antara lain sifat fisika/kimia produk (misalnya kelarutan dan sifat antimikroba) atau jenis produk yang diuji, dan batas mikroba yang dipersyaratkan, serta memungkinkan pengujian dengan jumlah sampel yang memadai untuk menilai kesesuaian dengan spesifikasi.

B. Verifikasi Uji Penghitungan Mikroba

Prosedur uji penghitungan mikroba sesuai dengan Lampiran <52> Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba di Suplemen I FI Edisi VI yang terdiri dari 3 (tiga) tahap utama sebagaimana pada *Gambar 1*.



Gambar 1. Tahap Uji Penghitungan Mikroba di Farmakope

Berdasarkan *Gambar 1*, tahapan verifikasi metode uji penghitungan mikroba adalah uji pendahuluan dan uji kesesuaian metode penghitungan mikroba dalam sampel. Apabila hasil yang diperoleh dari uji kesesuaian metode pada Lampiran <52> di Suplemen I FI Edisi VI memenuhi kriteria keberterimaan, metode yang digunakan dianggap telah terverifikasi pada kondisi penggunaan aktual di laboratorium yang melaksanakannya. Ketika metode uji penghitungan mikroba sudah diverifikasi dengan hasil memenuhi syarat pada sampel tertentu, selanjutnya dapat dilakukan pengujian rutin pada sampel. Untuk pengujian rutin pada sampel, apabila tidak terdapat perubahan pada sampel dan/atau prosedur yang dapat memengaruhi hasil uji, pengguna cukup melakukan uji pendahuluan dan pengujian sampel.

Sebelum melakukan verifikasi metode uji penghitungan mikroba, hendaknya laboratorium menyediakan dan menyiapkan beberapa hal berikut:

1. mikroba target dengan koleksi kultur mikroba standar yang sesuai (ATCC, NCIMB, CIP, atau NBRC),
2. peralatan dan instrumen ukur yang telah dikalibrasi, dan

3. personel yang terlatih dan kompeten.

Tahapan dalam verifikasi uji penghitungan mikroba dijabarkan sebagai berikut:

1. Uji Pendahuluan

a. Penyiapan Galur Mikroba Uji

Penyiapan galur mikroba uji dilakukan seperti pada *Tabel 4*, bertujuan untuk menjamin mikroba uji yang perlu dibiakkan kembali agar dalam keadaan hidup sebelum digunakan untuk pengujian.

Tabel 4. Penyiapan Galur Mikroba Uji

Bagian	Keterangan
Mikroba uji	Digunakan 5 mikroba uji yang stabil dan terstandar sesuai <i>Tabel 5</i> di bawah, yaitu <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida albicans</i> , dan <i>Aspergillus brasiliensis</i> .
Pembiakkan mikroba	Dilakukan secara terpisah untuk setiap galur bakteri dan kapang khamir dengan media dan kondisi inkubasi sesuai <i>Tabel 5</i> di bawah.
Kriteria keberterimaan	Galur mikroba uji dipelihara dengan teknik biakan lot benih hingga mikroba yang digunakan untuk inokulasi tidak lebih dari 5 pasase dari master lot benih asli.
Suspensi mikroba uji	Digunakan pelarut <i>Larutan Dapar Natrium Klorida-Pepton pH 7,0</i> atau <i>Larutan Dapar Fosfat pH 7,2</i> . Untuk mempertahankan spora <i>Aspergillus brasiliensis</i> , ditambahkan <i>polisorbat 80 P 0,05%</i> pada dapar.
Penghitungan jumlah mikroba target	<ul style="list-style-type: none"> - Metode ALT atau AKK menggunakan media pertumbuhan dan kondisi inkubasi yang sesuai untuk mikroba target. Dilakukan penghitungan jumlah koloni yang terbentuk pada lempeng untuk mendapatkan jumlah mikroba per unit sampel. - Metode Standar Mc Farland/ Spektrofotometer: suspensi mikroba diukur menggunakan

Bagian	Keterangan
	standar McFarland atau spektrofotometer, dengan referensi jumlah koloni yang telah diketahui pada tiap tingkat Mc Farland atau nilai transmittan dari mikroba yang digunakan.
Penggunaan suspensi mikroba	Suspensi digunakan dalam waktu 2 jam, atau 24 jam jika disimpan pada 2° - 8° C. Sebagai alternatif penyiapan dan pengenceran suspensi segar sel vegetatif <i>A. brasiliensis</i> atau <i>B. subtilis</i> , dapat digunakan suspensi spora yang stabil dengan volume yang sesuai untuk inokulasi. Suspensi spora yang stabil dipertahankan pada 2° - 8° C untuk jangka waktu yang tervalidasi. Jika digunakan suspensi bakteri atau kapang siap pakai komersial, maka pengguna perlu melakukan penyiapan dan penyimpanan sesuai dengan instruksi dari produsen.

Tabel 5. Mikroba dan Kondisi Uji untuk Penyiapan Galur Mikroba Uji

Mikroba Uji	Penyiapan Galur Uji
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, atau NBRC 13276	<i>Soybean-Casein Digest Agar</i> atau <i>Soybean-Casein Digest Broth</i> , 30-35°, 18-24 jam
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 atau NBRC 13275	<i>Soybean-Casein Digest Agar</i> atau <i>Soybean-Casein Digest Broth</i> , 30-35°, 18-24 jam
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62 atau NBRC 3134	<i>Soybean-Casein Digest Agar</i> atau <i>Soybean-Casein Digest Broth</i> , 30-35°, 18-24 jam
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 atau NBRC 1594	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i> atau <i>Sabouraud Dextrose Broth</i> , 20-25°, 2-3 hari

Mikroba Uji	Penyiapan Galur Uji
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83 atau NBRC 9455	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i> atau <i>Potato-Dextrose Agar</i> , 20-25°, 5-7 hari, atau hingga diperoleh sporulasi yang baik

b. Kontrol Negatif

Uji kontrol negatif dilakukan seperti pada *Tabel 6*, bertujuan untuk membuktikan bahwa pengujian dilakukan secara aseptik, serta media dan pelarut yang digunakan bebas dari kontaminasi mikroba.

Tabel 6. Kontrol Negatif

Bagian	Keterangan
Prosedur	Pengujian menggunakan pelarut dan media yang sesuai seperti pada penyiapan larutan uji tanpa penambahan mikroba uji, dilakukan minimal satu kali pengulangan dengan metode yang telah ditetapkan. Jika tahapan uji dilakukan bersamaan, maka kontrol negatif dilakukan satu kali.
Kriteria keberterimaan	Harus menunjukkan tidak ada pertumbuhan mikroba. Apabila terjadi kegagalan pada kontrol negatif, diperlukan investigasi untuk menunjukkan uji tersebut tidak sah dan perlu diulang.

c. Uji Fertilitas Media

Uji fertilitas media dilakukan seperti pada *Tabel 7*, bertujuan untuk menunjukkan kemampuan media kultur dalam menumbuhkan mikroba uji tanpa adanya sampel.

Tabel 7. Uji Fertilitas Media

Bagian	Keterangan
Frekuensi	Uji fertilitas media dilakukan pada setiap betas media siap pakai dan setiap betas media yang dibuat dari media kering atau dari komponen yang tertera pada formula.
Media	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Soybean-Casein Digest Agar</i> (SCDA) dan <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (SDA) merupakan media nonselektif untuk metode penyaringan membran dan angka lempeng (metode tuang dan metode sebar). Sedangkan, <i>Soybean-Casein Digest Broth</i> (SCDB) merupakan media nonselektif untuk metode APM. - Khusus untuk <i>C. albicans</i> dan <i>A. brasiliensis</i>, uji fertilitas media dilakukan pada media SCDA dan SDA. Hal ini karena secara definisi, ALT meliputi bakteri, kapang, dan khamir sehingga uji fertilitas media pada SCDA harus dilakukan terhadap mikroba yang mewakili semua kelompok ini.
Prosedur	5 (lima) mikroba uji diinokulasikan secara terpisah sebanyak tidak lebih dari 100 cfu ke dalam masing-masing media dan kondisi inkubasi sesuai <i>Tabel 8</i> di bawah.
Kondisi inkubasi	Cawan dan tabung untuk uji fertilitas media sebaiknya tidak diinkubasi dalam inkubator yang sama dengan yang digunakan untuk pengujian sampel. Jika hal ini tidak dapat dihindari karena keterbatasan ruang, lebih baik sampel yang telah diinokulasi mikroba ditempatkan di bagian bawah inkubator, di bawah cawan atau tabung sampel uji.
Kriteria keberterimaan	- Untuk media padat, pertumbuhan yang diperoleh tidak boleh

Bagian	Keterangan
	<p>berbeda lebih dari faktor dua dari nilai hitung inokulum standar. Contoh, jika inokulum standar yang digunakan adalah 100 koloni maka nilai hitung yang diterima adalah $100 \text{ koloni} / 2 = 50$ sampai $100 \times 2 = 200$ koloni. Faktor ini mempertimbangkan variabilitas yang umum terjadi dalam pengujian mikrobiologi. Pertumbuhan mikroba dan hasil uji fertilitas pada inokulum yang dibuat segar harus sebanding dengan betas media sebelumnya yang telah diuji dan disetujui.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Untuk media cair, pertumbuhan mikroba uji terlihat jelas dan sebanding dengan hasil uji fertilitas betas media sebelumnya yang telah disetujui.

Tabel 8. Mikroba dan Kondisi Uji Untuk Uji Fertilitas Media

Mikroba Uji	Fertilitas	
	Total Mikroba Aerob	Angka Kapang dan Khamir
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, atau NBRC 13276	<i>Soybean-Casein Digest Agar</i> dan <i>Soybean-Casein Digest Broth</i> , ≤100 koloni, 30-35° C, ≤ 3 hari	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 atau NBRC 13275	<i>Soybean-Casein Digest Agar</i> dan <i>Soybean-Casein Digest Broth</i> , ≤100 koloni, 30-35° C, ≤ 3 hari	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62 atau NBRC 3134	<i>Soybean-Casein Digest Agar</i> dan <i>Soybean-Casein Digest Broth</i> , ≤100 koloni, 30-35°C, ≤ 3 hari	

<i>Candida albicans</i> ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 atau NBRC 1594	<i>Soybean-Casein Digest Agar</i> , ≤100 koloni, 30-35° C, ≤ 5 hari	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i> , ≤100 koloni, 20-25° C, ≤ 5 hari
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83 atau NBRC 9455	<i>Soybean-Casein Digest Agar</i> , ≤100 koloni, 30-35° C, ≤ 5 hari	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i> , ≤100 koloni, 20-25° C, ≤ 5 hari

2. Uji Kesesuaian Metode Penghitungan Mikroba

Uji kesesuaian metode penghitungan mikroba bertujuan untuk menunjukkan bahwa sampel yang diuji tidak memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan mikroba pada kondisi pengujian. Meskipun tujuan utamanya adalah melakukan uji kesesuaian terlebih dahulu sebelum pengujian sampel, dimungkinkan untuk melakukan pengujian sampel dan uji kesesuaian secara bersamaan. Namun, perlu diperhatikan bahwa jika uji kesesuaian dilakukan bersamaan dengan pengujian sampel, dan uji kesesuaian tersebut gagal, maka hasil pengujian sampel menjadi tidak valid, dan baik uji kesesuaian maupun pengujian sampel harus diulang dengan modifikasi metode yang tepat untuk menetralkan sifat penghambatan sampel.

Secara umum, uji kesesuaian metode penghitungan mikroba terdiri dari tahapan penyiapan sampel, inokulasi dan pengenceran, netralisasi/penghilangan aktivitas antimikroba (jika diperlukan), dan perhitungan perolehan kembali mikroba uji dengan adanya sampel menggunakan mikroba dan kondisi uji seperti pada *Tabel 9*. Jika sampel yang akan diuji memiliki aktivitas antimikroba, sifat antimikroba harus dihilangkan atau dinetralkan sebelum diuji, dan penggunaan inaktivator tersebut harus terbukti efektif dan tidak toksik terhadap mikroba.

Tabel 9. Mikroba dan Kondisi Uji untuk Uji Kesesuaian Metode Penghitungan Mikroba

Mikroba Uji	Kesesuaian Metode Penghitungan dalam Sediaan	
	Total Mikroba Aerob	Angka Kapang dan Khamir
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, atau NBRC 13276	<i>Soybean-Casein Digest Agar/APM Soybean-Casein Digest Broth</i> , ≤100 koloni, 30-35° C, ≤ 3 hari	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 atau NBRC 13275	<i>Soybean-Casein Digest Agar/APM Soybean-Casein Digest Broth</i> , ≤100 koloni, 30-35° C, ≤ 3 hari	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62 atau NBRC 3134	<i>Soybean-Casein Digest Agar/APM Soybean-Casein Digest Broth</i> , ≤100 koloni, 30-35°C, ≤ 3 hari	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 atau NBRC 1594	<i>Soybean-Casein Digest Agar</i> , ≤100 koloni, 30-35° C, ≤ 5 hari APM: tidak ada	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i> , ≤100 koloni, 20-25° C, ≤ 5 hari
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83 atau NBRC 9455	<i>Soybean-Casein Digest Agar</i> , ≤100 koloni, 30-35° C, ≤ 5 hari APM: tidak ada	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i> , ≤100 koloni, 20-25° C, ≤ 5 hari

Pelaksanaan verifikasi uji kesesuaian metode penghitungan mikroba dapat dirinci sebagai berikut:

a. Penyiapan Sampel

Verifikasi pada tahap penyiapan sampel harus mampu menentukan faktor pengenceran sampel dan jenis pelarut yang sesuai untuk digunakan. Prosedur penyiapan sampel harus disesuaikan dengan karakteristik fisik sediaan yang akan diuji seperti tertera pada Lampiran <52> di Suplemen I FI Edisi VI bagian *PENYIAPAN SAMPEL*. Jika tidak ada prosedur pada Lampiran tersebut memberikan hasil yang

memadai, maka perlu dilakukan pengembangan metode lain yang lebih tepat.

b. Inokulasi dan Pengenceran

Pada tahap ini, diinokulasikan sejumlah suspensi mikroba uji seperti pada *Tabel 9* secara terpisah dengan konsentrasi tidak lebih dari 100 koloni pada:

1) sampel yang telah disiapkan sesuai tahap *Penyiapan Sampel* dan telah diencerkan (umumnya dimulai dengan pengenceran 1:10), sebagai kontrol positif sampel. Beberapa hal yang harus diperhatikan:

- a) volume suspensi inokulum yang ditambahkan tidak lebih dari 1% dari volume sampel yang diencerkan.
- b) untuk menunjukkan perolehan kembali mikroba uji yang dapat diterima dari sampel, sebaiknya digunakan sampel dengan faktor pengenceran terendah yang memungkinkan.
- c) konsentrasi 100 koloni merupakan inokulum yang terdapat di cawan (jika digunakan metode angka lempeng) atau penyaring (jika menggunakan metode penyaringan membran). Sebagai contoh, suspensi yang mengandung $\leq 10^4$ koloni/mL disiapkan dan 0,1 mL ditambahkan ke dalam 10 mL pengenceran yang telah disiapkan pada langkah sebelumnya. Kemudian, 1 mL suspensi ini diproses, yang memiliki konsentrasi inokulum ≤ 100 koloni/mL.

2) pelarut/pengencer tanpa sampel (sebagai kontrol positif).

c. Perolehan Kembali Mikroba Uji dalam Sampel dan Kriteria Keberterimaan

Pada tahap ini, dilakukan pengujian perolehan kembali mikroba uji dalam sampel sesuai dengan metode uji penghitungan mikroba yang ditetapkan (Angka Lempeng/Penyaringan Membran/Angka Paling Mungkin) tanpa menggunakan penetral terlebih dahulu.

1) Metode Angka Lempeng

Metode angka lempeng dapat dilakukan dengan cara metode tuang atau metode sebar. Pengujian dilakukan setidaknya duplo untuk tiap media, dan hasil merupakan rata-rata hitung jumlah koloni.

a) Metode Tuang

- i. Prosedur: Ditambahkan masing-masing secara terpisah 1 mL kontrol positif sampel dan kontrol positif seperti tertera pada tahap *Penyiapan*

Sampel, Inokulasi dan Pengenceran ke dalam tiap cawan petri, kemudian ditambahkan 15-20 mL media agar cair yang sesuai (SCDA/SDA) pada suhu tidak lebih dari 45° C, dibiarkan memadat, dan diinkubasi pada suhu dan waktu inkubasi seperti tertera pada *Tabel 9*. Pengujian dilakukan duplo untuk tiap mikroba uji yang tertera pada *Tabel 9*. Dilakukan penghitungan jumlah koloni rata-rata dari tiap cawan media dan jumlah koloni inokulum awal.

- ii. Kriteria keberterimaan: jumlah mikroba uji pada kontrol positif sampel tidak berbeda lebih dari faktor 2 (perolehan kembali 50%–200%) dibandingkan kontrol positif.

b) Metode Sebar

- i. Prosedur: Ditambahkan 15-20 mL media agar cair yang sesuai (SCDA/SDA) pada suhu tidak lebih dari 45° C ke dalam tiap cawan petri, dibiarkan memadat, kemudian ke dalam agar padat diinokulasikan masing-masing secara terpisah 0,1 mL kontrol positif sampel dan kontrol positif seperti tertera pada tahap *Penyiapan Sampel, Inokulasi dan Pengenceran* dengan menyebarkan pada permukaan lempeng media. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu dan waktu inkubasi seperti tertera pada *Tabel 9*. Pengujian dilakukan duplo untuk tiap mikroba uji yang tertera pada *Tabel 9*. Dilakukan penghitungan jumlah koloni rata-rata dari tiap cawan media dan jumlah koloni inokulum awal.
- ii. Kriteria keberterimaan: jumlah mikroba uji pada kontrol positif sampel tidak berbeda lebih dari faktor 2 (perolehan kembali 50%–200%) dibandingkan kontrol positif.

2) Metode Penyaringan Membran

Pengujian dilakukan menggunakan penyaring membran dengan porositas tidak lebih dari 0,45 µm. Jenis bahan penyaring dipilih sedemikian rupa sehingga kemampuan menahan bakteri tidak dipengaruhi oleh kandungan sampel uji, digunakan satu membran penyaring untuk tiap mikroba uji. Prosedur uji sebagai berikut:

- a) Sejumlah kontrol positif sampel seperti tertera pada tahap *Penyiapan Sampel, Inokulasi dan Pengenceran* (setara 1 g atau kurang dari 1 g jika

diperkirakan jumlah koloni besar) dan kontrol positif dipindahkan ke dalam penyaring membran, disaring segera, dan penyaring membran dibilas dengan sejumlah tertentu volume pengencer. Digunakan satu membran penyaring untuk tiap mikroba uji.

- b) Untuk penentuan ALT, penyaring membran dipindahkan ke permukaan lempeng media SCDA. Untuk penentuan AKK, penyaring membran dipindahkan ke permukaan lempeng media SDA. Dilakukan inkubasi pada suhu dan waktu inkubasi seperti tertera pada *Tabel 9*.
- c) Pengujian dilakukan minimal 1 (satu) kali pengulangan untuk tiap mikroba uji. Selanjutnya, dilakukan pengamatan dan penghitungan jumlah koloni mikroba.

Kriteria keberterimaan: Jumlah mikroba uji pada kontrol positif sampel tidak berbeda lebih dari faktor 2 (perolehan kembali 50%–200%) dibandingkan kontrol positif.

3) Metode APM

Prosedur uji kesesuaian metode penghitungan mikroba dengan metode APM sebagai berikut:

- a) Pengujian dilakukan dengan menyiapkan minimal tiga seri pengenceran seperti tertera pada tahap *Penyiapan Sampel, Inokulasi dan Pengenceran*.
- b) Dari tiap tingkat pengenceran sediaan, diinokulasikan masing-masing tiga alikuot 1 g atau 1 mL ke dalam tiga seri tabung berisi 9–10 mL media SCDB. Jika dibuat tiga tingkat pengenceran, maka diperoleh 9 tabung terinokulasi.
- c) Dilakukan inkubasi semua tabung yang telah diinokulasi pada suhu 30° - 35° C selama tidak lebih dari 3 hari.
- d) Jika terdapat kesulitan dalam membaca hasil, atau ketidakyakinan terhadap sifat dari sediaan yang diuji, dilakukan sub-kultur pada media *Broth* yang sama atau SCDA selama 1 sampai 2 hari pada suhu yang sama, dan hasil ini yang digunakan.
- e) Dilakukan penentuan angka paling mungkin (APM) per g atau per mL sediaan uji seperti tertera pada *Lampiran <52> Suplemen I FI Edisi VI Tabel 3 Nilai Angka Paling Mungkin Mikroba. Catatan Metode*

APM tidak dapat digunakan untuk uji kesesuaian metode penghitungan mikroba pada *Candida albicans* dan *Aspergillus brasiliensis* karena hasilnya tidak dapat diandalkan untuk penghitungan kapang.

Kriteria keberterimaan: Nilai yang dihitung dari inokulum harus dalam batas kepercayaan 95% dari nilai kontrol.

Seluruh pengujian dengan ketiga metode di atas dilakukan terhadap kontrol positif sampel, kontrol positif, dan kontrol negatif (pelarut dan/atau media seperti pada kontrol positif sampel tanpa penambahan mikroba uji). Jika pertumbuhan mikroba uji terhambat (dengan faktor reduksi lebih besar dari 2) untuk metode Angka Lempeng atau Penyaringan membran, atau nilai yang dihitung dari inokulum di luar rentang batas kepercayaan 95% dari nilai kontrol untuk metode APM, maka harus dilakukan modifikasi prosedur uji penghitungan mikroba untuk memastikan validitas hasil. Modifikasi prosedur dapat dilakukan dengan:

- 1) penambahan larutan penetral khusus atau umum pada pengencer;
 - 2) penambahan jumlah volume pengencer atau media biakan;
 - 3) penyaringan membran; atau
 - 4) kombinasi perubahan di atas.
- d. Netralisasi/ Penghilangan Aktivitas Antimikroba dan Toksisitas Penetral (Jika Diperlukan)

Secara umum, dapat dipahami bahwa jika suatu produk memiliki sifat antimikroba karena adanya bahan pengawet tertentu atau karena formulasinya, sifat antimikroba ini harus dinetralkan untuk mendapatkan perolehan kembali mikroba target yang diinginkan. Adanya aktivitas antimikroba pada sediaan memerlukan modifikasi prosedur uji yaitu melalui tahapan netralisasi/penghilangan aktivitas antimikroba.

- 1) Metode Netralisasi Aktivitas Antimikroba

Secara umum, terdapat 3 (tiga) metode yang dapat digunakan untuk menetralkan aktivitas antimikroba dalam sampel, yaitu penghambatan kimia (menggunakan zat penetral), pengenceran, serta penyaringan dan pembilasan.

- a) Penghambatan kimia (penambahan larutan penetrant khusus atau umum pada pengencer)

Zat penetrant digunakan untuk menetralkan aktivitas senyawa antimikroba. Zat penetrant yang digunakan harus menunjukkan efikasi dan tidak toksik terhadap mikroba yang dibuktikan dengan penambahan zat penetrant pada blangko tanpa sediaan.

Zat penetrant yang sesuai dapat digunakan untuk menetralkan aktivitas antimikroba dalam sampel seperti yang tercantum pada *Lampiran <52> Suplemen I FI Edisi VI* yaitu *Tabel 2. Zat Penetrant/Metode Umum untuk Zat Penghambat*.

- b) Pengenceran (penambahan jumlah volume pengencer atau media biakan)

Pendekatan kedua untuk menetralkan sifat antimikroba suatu produk adalah dengan pengenceran, karena konsentrasi zat antimikroba memberikan efek besar pada potensinya. Hubungan antara konsentrasi dan efek antimikroba berbeda-beda di antara zat bakterisidal, tetapi tetap konstan untuk zat antimikroba tertentu. Hubungan tersebut bersifat eksponensial dengan rumus umum sebagai berikut:

$$C^{\eta t} = k$$

di mana:

C = konsentrasi zat antimikroba

η = eksponen konsentrasi (koefisien pengenceran), *slope* dari kurva $\log t$ vs $\log C$

t = waktu yang dibutuhkan untuk membunuh inokulum standar

k = konstanta

Zat antimikroba dengan nilai η yang tinggi dapat dinetralkan dengan cepat melalui proses pengenceran, sedangkan zat antimikroba dengan nilai η yang rendah bukan merupakan pilihan yang baik untuk dinetralkan hanya dengan pengenceran.

Tabel 10. Eksponen Konsentrasi untuk Beberapa Zat Antimikroba

Contoh Zat Antimikroba	Nilai η	Peningkatan Faktor Waktu (x) untuk Membunuh Mikroba Ketika Konsentrasi Dikurangi Menjadi:	
		Setengah dari Konsentrasi	Sepertiga dari Konsentrasi
Fenol	6	64	729
Alkohol	10	1024	59.000
Paraben	2,5	6	16
Klorheksidin	2	4	8
Senyawa Merkuri	1	2	3
Senyawa Ammonium Kuarterner	1	2	3
Formaldehida	1	2	3

c) Penyaringan membran dan pembilasan

Pendekatan ini mengandalkan retensi fisik mikroba pada penyaring membran, dengan zat antimikroba yang melewati penyaring dan masuk ke dalam filtrat. Penyaring membran kemudian diinkubasi agar didapatkan perolehan kembali mikroba viabel. Namun, filtrasi saja mungkin tidak cukup untuk menghilangkan zat antimikroba untuk menumbuhkan mikroba yang masih hidup.

Adanya penempelan zat antimikroba yang tersisa pada penyaring membran dapat menyebabkan penghambatan pertumbuhan. Filtrasi menggunakan bahan penyaring dengan ikatan rendah, seperti *polyvinylidene difluoride*, dapat membantu meminimalkan penghambatan pertumbuhan ini. Selain itu, pengawet dapat diencerkan atau dibuang dari penyaring dengan membilasnya menggunakan cairan nontoksik, seperti Fluid A yang diencerkan seperti tertera pada *Lampiran <71> Uji Sterilitas* di FI Edisi VI. Zat penetral dalam cairan pembilas dapat memastikan bahwa sisa-sisa antimikroba pada membran tidak

mengganggu perolehan kembali mikroba yang masih hidup.

2) Verifikasi Metode Netralisasi Aktivitas Antimikroba

Metode netralisasi untuk menetralkan sifat antimikroba suatu sampel harus memenuhi dua kriteria: efektivitas penetral dan nontoksisitas penetral. Harus terdapat bukti terdokumentasi melalui verifikasi bahwa metode netralisasi yang digunakan efektif dalam menghambat sifat antimikroba sampel (efektivitas penetral) tanpa mengganggu perolehan kembali mikroba yang masih hidup (nontoksisitas penetral). Metode netralisasi harus memenuhi kedua kriteria tersebut dengan membandingkan hasil perolehan kembali mikroba target antara tiga kelompok pengujian yang berbeda:

- a) Sampel yang telah dinetralkan dan ditambahkan inokulum (Kelompok uji);
- b) Kontrol inokulum dalam larutan dapar (*Pepton control group*/Kelompok kontrol pepton); dan
- c) Inokulum tanpa penambahan sampel atau penetral (Kelompok viabilitas)

Verifikasi metode netralisasi aktivitas antimikroba dilakukan melalui pengujian kesesuaian metode penghitungan mikroba dengan penetral dan nontoksisitas penetral dengan prosedur sebagai berikut:

- a) Metode preparasi sampel dilakukan sesuai dengan prosedur seperti yang tertera pada *Bab III tahap Penyiapan Sampel, Inokulasi dan Pengenceran*.
- b) Untuk masing-masing sediaan baru yang diuji, penyiapan mikroba uji dilakukan seperti tertera pada *Tabel 9. Mikroba dan Kondisi Uji untuk Uji Kesesuaian Metode Penghitungan Mikroba* dengan kelompok pengujian sebagai berikut:

Tabel 11. Kelompok Perlakuan pada Uji Metode Netralisasi

Perlakuan 1	Kelompok uji*)	Sampel (+) Penetral (+) Pelarut (+) Mikroba target**
Perlakuan 2	Kelompok kontrol pepton*)	Pepton atau <i>Fluid A</i> atau dapar lain (+) Penetral (+) Pelarut (+) Mikroba target**

Perlakuan 3	Kelompok viabilitas	(+) Pelarut (+) Mikroba target** tanpa penambahan penetral
-------------	---------------------	---

*) *Perlakuan 1 dan 2 dinetralkan terlebih dahulu dengan cara mencampur penetral ke dalam pelarut atau sampel kemudian dihomogenisasi-*

**) *Mikroba target ditambahkan tidak lebih dari 100 koloni*

Setiap perlakuan dilakukan minimal 1 ulangan.

- c) Setiap kelompok perlakuan dilakukan inkubasi sesuai dengan kondisi inkubasi seperti tertera pada *Tabel 9. Mikroba dan Kondisi Uji untuk Uji Kesesuaian Metode Penghitungan Mikroba.*
- d) Pada setiap kelompok perlakuan, dilakukan penghitungan jumlah koloni rata-rata dari tiap cawan media dan jumlah koloni inokulum awal.

Kriteria keberterimaan yakni dari ketiga perlakuan harus menunjukkan:

- a) Efektivitas penetral: perolehan kembali/akurasi mikroba uji antara *Kelompok Uji* dan *Kelompok kontrol pepton* tidak boleh berbeda lebih dari faktor 2 (perolehan kembali 50%–200%).
- b) Nontoksisitas penetral: Perolehan kembali/akurasi mikroba uji antara *Kelompok kontrol pepton* dan *Kelompok viabilitas* tidak boleh berbeda lebih dari faktor 2 (perolehan kembali 50%–200%).

Secara prinsip, pelaksanaan uji kesesuaian penghitungan mikroba dengan penetral harus menunjukkan bahwa perolehan kembali dari inokulum yang ditambahkan (kurang dari 100 koloni) tidak terhambat oleh sampel dan metode netralisasi. Hal ini dapat dibuktikan dengan membandingkan hasil pada *Kelompok uji* terhadap *Kelompok viabilitas*. Jika pertumbuhan mikroba target pada *Kelompok uji* dan/atau *Kelompok kontrol pepton* tidak sebanding dengan pertumbuhan mikroba target pada *Kelompok viabilitas*, maka perlu ditentukan apakah metode netralisasi yang dilakukan toksik terhadap mikroba target.

Jika tidak ditemukan metode netralisasi yang sesuai, dapat diartikan bahwa kegagalan isolasi mikroba yang diinokulasikan disebabkan oleh aktivitas antimikroba dari sampel. Hal ini menunjukkan bahwa sampel tidak mungkin terkontaminasi spesies mikroba

uji yang digunakan. Dilakukan pengujian dengan faktor pengenceran tertinggi yang sesuai dengan pertumbuhan mikroba uji dan kriteria keberterimaan khusus. Sebagai informasi, produk mungkin dapat menghambat spesies mikroba spesifik tertentu seperti tertera pada *Lampiran <52> Suplemen I FI Edisi VI Tabel 1. Penyiapan dan Penggunaan Mikroba Uji*, namun tidak dapat menghambat galur mikroba lainnya.

BAB IV UJI MIKROBA SPESIFIK

A. Pendahuluan

Uji mikroba spesifik pada sediaan nonsteril sebagaimana tercantum pada Lampiran <53> Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Mikroba Spesifik di Suplemen I FI Edisi VI bertujuan untuk mendeteksi keberadaan atau batas mikroba spesifik yang dapat dideteksi dengan kondisi dan metode yang sesuai.

Uji mikroba spesifik dilakukan pada mikroba seperti *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, dan *Candida albicans*. Metode yang digunakan dan hasil yang diperoleh harus sesuai dengan spesifikasi serta kriteria keberterimaan yang ditetapkan dalam farmakope.

Lampiran <53> menjelaskan prosedur pengayaan spesifik yang bergantung pada mikroba target yang tidak boleh terdapat dalam obat dan bahan obat sesuai dengan yang dipersyaratkan dalam monografi.

Keberadaan mikroba spesifik tertentu dalam sediaan non steril, meskipun dalam jumlah rendah, dapat berpotensi mengurangi atau bahkan menonaktifkan aktivitas terapeutik produk tersebut, yang dapat berdampak buruk pada kesehatan pasien.

Tabel berikut memberikan rincian lebih lanjut mengenai alasan pemilihan mikroba spesifik dan pentingnya mikroba tersebut sebagai indikator kepatuhan dan kontrol mutu pada Cara Pembuatan Obat yang Baik (CPOB).

Tabel 12. Mikroba Spesifik

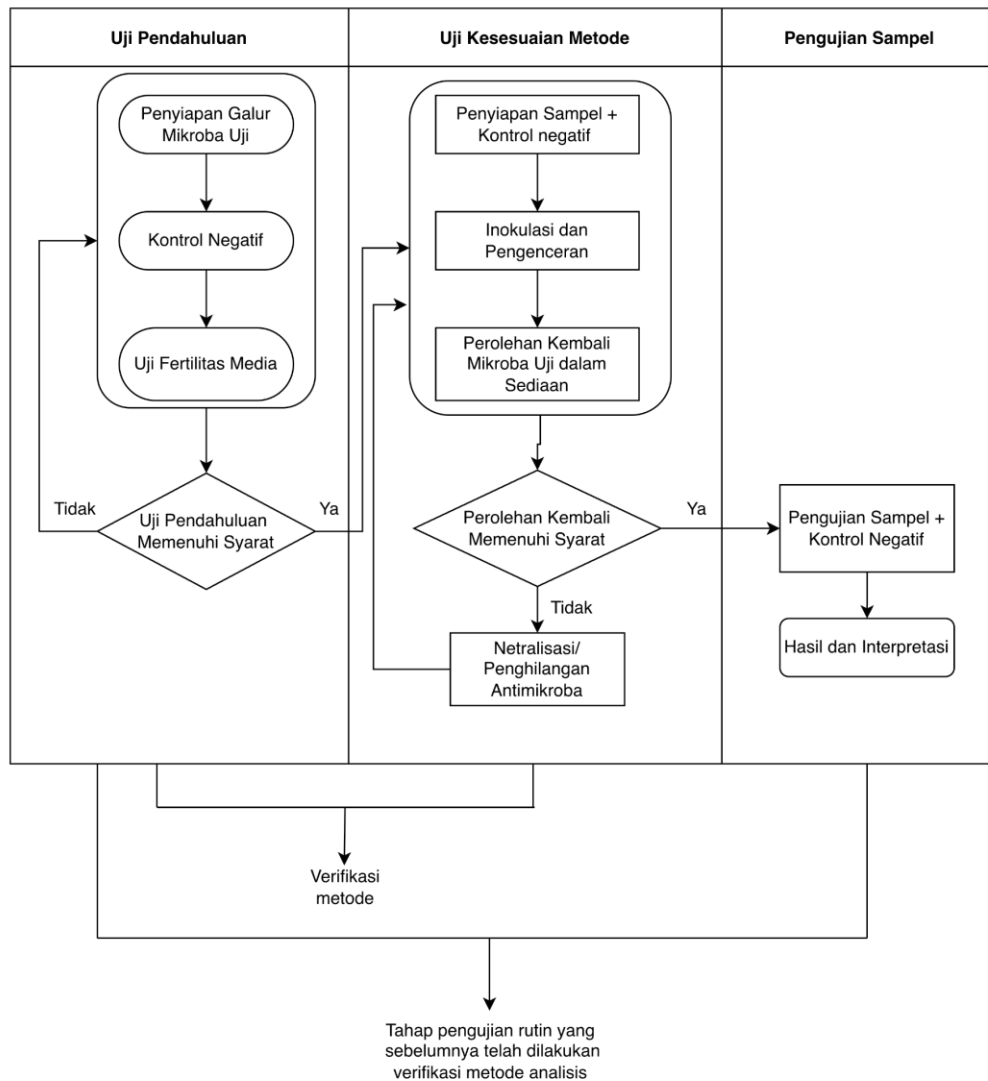
Patogen	Keterangan
<i>Escherichia coli</i>	Sebagian besar <i>strain E. coli</i> tidak berbahaya dan umumnya ditemukan di usus bagian bawah organisme berdarah panas, tetapi beberapa serotipe bersifat patogen dan dapat menyebabkan infeksi serius.
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i> adalah anggota flora normal, sering ditemukan di hidung, saluran pernapasan, kulit, dan saluran reproduksi bawah pada wanita. Meskipun <i>S. aureus</i> tidak selalu patogen, namun merupakan penyebab umum infeksi kulit. <i>Strain</i> patogen sering menyebabkan infeksi dengan memproduksi faktor virulensi seperti toksin protein kuat yang mengikat dan menonaktifkan antibodi.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> ditemukan di tanah, air, flora kulit, dan

Patogen	Keterangan
	sebagian besar lingkungan buatan yang dapat menyebabkan penyakit pada tanaman dan hewan, termasuk manusia. Mikroba ini resisten terhadap banyak obat karena bersifat ubikuitos dan mekanisme resistensi antibiotik yang <i>advanced</i> serta berhubungan dengan penyakit serius. Mikroba ini dianggap oportunistik karena infeksi serius sering terjadi sebagai konsekuensi dari penyakit atau kondisi yang sudah ada, terutama fibrosis kistik dan luka bakar traumatis.
<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i> adalah kapang patogen oportunistik yang merupakan anggota umum dari flora usus manusia. Tidak berkembang biak di luar tubuh manusia. Ditemukan di saluran pencernaan dan mulut pada 40-60% orang dewasa sehat. Biasanya merupakan mikroba komensal, tetapi dapat menjadi patogen pada individu yang mengalami gangguan kekebalan tubuh di berbagai kondisi.
<i>Bile-Tolerant gram negative bacteria</i> (Bakteri gram-negatif yang toleran terhadap empedu)	Bakteri gram-negatif yang toleran terhadap empedu termasuk dalam flora usus, mikrobiota usus, atau mikrobiota gastrointestinal, yang merupakan komunitas mikroba kompleks yang hidup di saluran pencernaan manusia dan hewan lainnya, termasuk serangga. Keberadaannya menunjukkan kemungkinan kontaminasi asal hewan.

Prosedur uji mikroba spesifik yang terdapat pada Lampiran <53> telah tervalidasi. Namun, penggunaan metode farmakope tersebut memerlukan verifikasi metode analisis dengan menunjukkan kemampuan perolehan kembali mikroba uji dalam keberadaan produk.

B. Tahapan Uji Mikroba Spesifik

Tahapan uji mikroba spesifik pada Lampiran <53> dapat digambarkan sesuai *Gambar 2. Tahapan Uji Mikroba Spesifik di Farmakope.*



Gambar 2. Tahapan uji mikroba spesifik di Farmakope

Verifikasi metode uji mikroba spesifik terdiri dari uji pendahuluan dan uji kesesuaian metode mikroba spesifik dalam sediaan. Ketika metode uji mikroba spesifik sudah diverifikasi dengan hasil memenuhi syarat pada sampel tertentu, selanjutnya dapat dilakukan pengujian rutin pada sampel. Untuk pengujian rutin pada sampel, apabila tidak terdapat perubahan pada sampel dan/atau prosedur yang dapat mempengaruhi hasil uji, pengguna cukup melakukan uji pendahuluan dan pengujian sampel.

C. Pelaksanaan Verifikasi Uji Mikroba Spesifik

1. Uji Pendahuluan

a. Penyiapan Galur Mikroba Uji

Penyiapan galur mikroba uji bertujuan untuk menjamin mikroba uji yang perlu dibiakkan kembali agar dalam keadaan hidup sebelum digunakan untuk pengujian. Prosedur:

- 1) Galur mikroba uji yang digunakan untuk uji mikroba spesifik harus merupakan suspensi mikroba yang stabil dan terstandar seperti tertera pada *Tabel 13*.

Tabel 13. Galur Mikroba Uji

Mikroba Target		
Mikroba Aerob	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, atau NBRC 13276
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 atau NBRC 13275
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126 atau NBRC 3972
	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium atau sebagai pilihan lain</i>	ATCC 14028
	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Abony</i>	NBRC 100797, NCTC 6017 atau CIP 80.39
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 atau NBRC 1594
Mikroba Anaerob	<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 11437 (NBRC 14293, NCIMB 12343, CIP 100651) atau ATCC 19404 (NCTC 532 atau CIP 79.3)

- 2) Galur mikroba uji dipelihara dengan teknik biakan lot benih sehingga mikroba yang digunakan untuk inokulasi tidak lebih dari 5 pasase dari master lot benih asli.
- 3) Pemiakan tiap galur bakteri dilakukan secara terpisah menggunakan media dan kondisi inkubasi yang sesuai seperti tertera pada *Tabel 14*.

Tabel 14. Penyiapan Galur Uji

Mikroba Target	Penyiapan Galur Target
Mikroba Aerob, selain <i>Candida albicans</i>	Masing-masing galur bakteri dibiakkan secara terpisah dalam wadah berisi media <i>Soybean-Casein Digest Broth</i> atau <i>Soybean-Casein Digest Agar</i> , pada suhu 30°C-35°C selama 18 - 24 jam.
<i>Candida albicans</i>	Galur uji <i>Candida albicans</i> secara dibiakkan terpisah pada <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> atau dalam <i>Sabouraud Dextrose Broth</i> pada suhu 20°C-25°C selama 2 - 3 hari.
Mikroba Anaerob (<i>Clostridium sporogenes</i>)	Galur uji <i>Clostridia</i> dibiakkan dalam kondisi anaerob pada <i>Reinforced Medium for Clostridia</i> pada suhu 30°C-35°C selama 24 - 48 jam.

- 4) Pembuatan suspensi mikroba uji:
- Digunakan pelarut berupa *Larutan Dapar Natrium Klorida-Pepton pH 7,0* atau *Larutan Dapar Fosfat pH 7,2*. Suspensi tersebut digunakan dalam waktu 2 jam atau jika digunakan sampai 24 jam harus disimpan pada suhu 2°C-8°C.
 - Khusus untuk *Clostridium sporogenes*, sebagai alternatif penyiapan dan pengenceran suspensi segar sel vegetatif *Clostridium sporogenes*, dapat digunakan suspensi spora yang stabil untuk inokulasi. Suspensi spora yang stabil dipertahankan pada suhu 2°C-8°C, untuk jangka waktu yang tervalidasi.
- 5) Penghitungan jumlah mikroba target dilakukan dengan metode berikut:
- **Metode ALT atau AKK** menggunakan media pertumbuhan dan kondisi inkubasi yang sesuai untuk mikroba target. Jumlah koloni yang terbentuk pada lempeng dilakukan penghitungan untuk mendapatkan jumlah mikroba per unit sampel.
 - **Metode Standar McFarland/ Spektrofotometri:** suspensi mikroba diukur menggunakan standar McFarland atau spektrofotometer, dengan referensi jumlah koloni yang telah diketahui pada tiap tingkat McFarland atau nilai transmittan dari mikroba yang digunakan.

b. Uji Kontrol Negatif

Tujuan dari uji kontrol negatif adalah untuk menunjukkan bahwa tidak ada kontaminasi selama pengujian selain dari sampel. Jika pada kontrol negatif didapatkan hasil uji positif mikroba spesifik, maka uji tersebut dapat dianggap tidak sah dan perlu diulang. Ketentuan pelaksanaan uji kontrol negatif mengacu pada *Bab III Bagian B Butir 1.b Kontrol Negatif*.

Dilakukan uji kontrol negatif minimal 1 kali pengulangan. Dalam kondisi tertentu, jika diperlukan, dapat dilakukan pengujian menggunakan kontrol negatif sampel.

Jika uji pendahuluan, uji kesesuaian metode dan/atau pengujian sampel dilakukan secara bersamaan, maka kontrol negatif dilakukan satu kali.

c. Uji Fertilitas, Daya Hambat, dan Indikatif Media

Uji fertilitas media merupakan bagian dari prosedur pengendalian mutu yang digunakan untuk memastikan bahwa media kultur yang digunakan dapat mendukung pertumbuhan mikroba target. Tujuan utama uji fertilitas, daya hambat, dan indikatif media adalah untuk memverifikasi fertilitas, selektivitas, dan sifat penghambatan media kultur sebelum digunakan dalam pengujian.

Uji fertilitas, daya hambat, dan indikatif media dilakukan pada setiap *batch* media siap pakai dan setiap *batch* media yang dibuat dari media kering atau dari komponen yang tertera pada formula.

Verifikasi kesesuaian sifat media sesuai dengan sifat media yang akan dievaluasi seperti yang tertera pada *Tabel 1 di Lampiran <53> Suplemen I FI VI*.

Adapun prosedur uji fertilitas, daya hambat, dan indikatif media untuk media cair dan media padat sebagai berikut:

1) Uji Fertilitas Media Cair

Prosedur:

- Sejumlah mikroba uji (tidak lebih dari 100 koloni) diinokulasikan ke dalam media yang sesuai.
- Pengujian pada setiap media masing-masing dilakukan duplo.
- Inkubasi dilakukan pada suhu tertentu selama periode yang tidak lebih dari periode terpendek seperti yang tertera pada *Tabel 15. Uji Kesesuaian Metode*. Sebagai contoh jika rentang waktu inkubasi yang ditentukan adalah 18–72 jam, maka pertumbuhan harus terjadi dalam waktu 18 jam.

Kriteria Keberterimaan:

- Pertumbuhan mikroba uji harus terlihat jelas dan harus sebanding dengan hasil uji fertilitas *batch* media sebelumnya.

2) Uji Fertilitas Media Padat

Prosedur:

- Untuk uji fertilitas media padat, dilakukan dengan metode sebar sesuai dengan ketentuan masing-masing media pada *Tabel 1 di Lampiran <52> Suplemen I FI VI*.
- Pengujian pada setiap media masing-masing dilakukan duplo.
- Masing-masing lempeng diinokulasikan dengan sejumlah mikroba uji yang sesuai (tidak lebih dari 100 koloni).
- Inkubasi pada suhu tertentu selama tidak lebih dari periode terpendek seperti tertera pada *Tabel 15. Uji Kesesuaian Metode*. Sebagai contoh jika rentang waktu inkubasi yang ditentukan adalah 18–72 jam, maka pertumbuhan harus terjadi dalam waktu 18 jam.

Kriteria Keberterimaan:

- Pertumbuhan mikroba harus dapat dibandingkan dengan hasil uji fertilitas *batch* media sebelumnya.

Uji mikroba spesifik merupakan uji kualitatif, sehingga tidak terdapat ketentuan yang secara khusus mengatur kriteria keberterimaan uji fertilitas media. Penggunaan faktor 2 dapat diterapkan sebagaimana dijelaskan dalam *Bab III Bagian B Butir 1.c. Uji Fertilitas Media* juga dapat ditetapkan secara mandiri, misalnya dengan membandingkan morfologi koloni pada waktu inkubasi terpendek yang direkomendasikan.

3) Uji Daya Hambat Media Cair atau Padat

Prosedur:

- Sejumlah mikroba uji (tidak lebih dari 100 koloni) diinokulasi ke dalam media yang sesuai.
- Pengujian pada setiap media masing-masing dilakukan duplo.
- Inkubasi pada suhu tertentu selama tidak lebih dari periode terpanjang seperti tertera pada *Tabel 15. Uji Kesesuaian Metode*. Sebagai contoh jika rentang waktu inkubasi adalah 18–72 jam, maka tidak boleh ada pertumbuhan setelah 72 jam.

Kriteria Keberterimaan:

- Tidak terdapat pertumbuhan mikroba uji.

4) Uji Indikatif Media

Prosedur:

- Uji indikatif media dilakukan dengan metode sebar sesuai dengan ketentuan masing-masing media pada *Tabel 1 di Lampiran <52> Suplemen I FI VI*.
- Pengujian pada setiap media masing-masing dilakukan duplo.
- Masing-masing lempeng diinokulasikan dengan sejumlah mikroba uji yang sesuai (tidak lebih dari 100 koloni).
- Inkubasi pada suhu tertentu selama tidak lebih dari periode terpendek seperti tertera pada *Tabel 3. Uji Kesesuaian Metode*. Sebagai contoh jika rentang waktu inkubasi yang ditentukan adalah 18–72 jam, maka inkubasi harus berlangsung dalam rentang tersebut.

Kriteria Keberterimaan:

- Koloni mikroba uji harus terlihat jelas dan menunjukkan reaksi indikasi yang sama dengan *batch* media sebelumnya.

2. Uji Kesesuaian Metode

Uji kesesuaian metode (*Suitability of the Test Method*) bertujuan untuk menunjukkan bahwa sampel yang diuji tidak memiliki efek penghambatan terhadap pertumbuhan mikroba target di bawah kondisi pengujian yang diterapkan.

Verifikasi tahap uji kesesuaian metode dilakukan sesuai dengan prosedur yang tercantum pada farmakope untuk menetapkan parameter pengujian secara rinci, seperti jenis media, tingkat pengenceran, volume pembilasan, dan waktu inkubasi yang tepat, untuk memastikan perolehan kembali mikroba target. Penyiapan sampel dilakukan dengan periode inkubasi terpendek sesuai dengan prosedur pada *Tahap Penyiapan Sampel*.

Meskipun idealnya uji kesesuaian metode dilakukan sebelum pengujian sampel, pelaksanaannya secara bersamaan dengan pengujian sampel masih dapat diterima. Namun, perlu diperhatikan bahwa apabila uji kesesuaian metode dilakukan bersamaan dengan pengujian sampel dan hasil uji kesesuaian metode tidak memenuhi persyaratan, maka hasil pengujian sampel menjadi tidak valid. Dalam kondisi tersebut, uji kesesuaian metode dan pengujian sampel harus diulang dengan melakukan modifikasi metode yang sesuai untuk menetralkan sifat penghambatan yang ada.

Uji kesesuaian metode mikroba spesifik hanya dilakukan terhadap mikroba target sesuai dengan yang dipersyaratkan pada monografi. Adapun prosedur uji kesesuaian metode uji mikroba spesifik sebagai berikut:

- a. Tahap Penyiapan Sampel

Pada tahap ini terdapat 2 kelompok pengujian yaitu kontrol positif (inokulum dan media) dan kontrol positif sampel (inokulum, media dan sampel) dengan prosedur sebagai berikut:

- 1) Metode preparasi sampel dilakukan sesuai dengan prosedur pada *Bab III Bagian B Butir 2.a. Penyiapan Sampel*.
 - 2) Untuk masing-masing sediaan baru yang diuji, penyiapan mikroba uji dilakukan seperti tertera pada *Penyiapan Sampel* di *Tabel 15. Uji Kesesuaian Metode*.
 - 3) Pada saat pencampuran, ditambahkan secara terpisah masing-masing suspensi mikroba uji sejumlah tidak lebih dari 100 koloni.
- b. Tahap Inokulasi dan Pengenceran (Pra-Inkubasi, Seleksi dan Subkultur)

Setelah tahap penyiapan sampel, dilakukan pra inkubasi, seleksi dan subkultur mengacu pada *Tabel 15. Uji Kesesuaian Metode*, dimana inkubasi dilakukan dengan masa inkubasi terpendek.

Tabel 15. Uji Kesesuaian Metode

Jenis Mikroba Uji	Penyiapan Sampel dan Pra Inkubasi	Seleksi dan Subkultur	Interpretasi Hasil
Uji Bakteri Gram Negatif <i>Bile-Tolerant</i>	Dilakukan penyiapan sampel dengan pengenceran 1 dalam 10 menggunakan tidak kurang dari 1 g sediaan yang akan diuji. Digunakan <i>Soybean-Casein Digest Broth</i> sebagai pengencer. Dilakukan pencampuran dan penginkubasian pada suhu 20°C - 25°C selama waktu yang cukup untuk menumbuhkan bakteri tetapi tidak cukup untuk memicu multiplikasi mikroba	Uji Kualitatif Dilakukan inokulasi pada sejumlah volume setara dengan 1 g sediaan. Penginkubasian dilakukan pada suhu 30°C -35°C selama 24-48 jam. Subkultur dilakukan pada lempeng <i>Violet Red Bile Glucose Agar</i> . Penginkubasian dilakukan pada suhu 30°C -35°C selama 18-24 jam.	Pertumbuhan koloni pada media <i>Violet Red Bile Glucose Agar</i> berupa koloni dengan presipitat kemerahan.
		Uji Kuantitatif Dilakukan inokulasi pada sejumlah sediaan yang akan diuji ke dalam media <i>Enterobacteria</i>	Pertumbuhan koloni di setiap tingkat pengenceran pada media <i>Violet Red</i>

Jenis Mikroba Uji	Penyiapan Sampel dan Pra Inkubasi	Seleksi dan Subkultur	Interpretasi Hasil
	(biasanya 2 jam tetapi tidak lebih dari 5 jam).	<p><i>Enrichment Broth Mossel.</i> Pengenceran sampel tersebut dilakukan hingga masing-masing mengandung 0,1 g; 0,01 g dan 0,001 g (atau 0,1 mL; 0,01 mL dan 0,001 mL). Penginkubasian dilakukan pada suhu 30°C -35°C selama 24-48 jam. Subkultur dilakukan dengan menginokulasikan masing-masing biakan pada lempeng <i>Violet Red Bile Glucose Agar.</i> Penginkubasian dilakukan pada suhu 30°C-35°C selama 18 – 24 jam.</p>	<p><i>Bile Glucose Agar</i> berupa koloni dengan presipitat kemerahan.</p>
<i>Escherichia coli</i>	<p>Penyiapan sampel dilakukan dengan pengenceran 1 dalam 10 menggunakan tidak kurang dari 1 g sediaan yang akan diuji. Digunakan 10 mL atau sejumlah tertentu setara dengan 1 g atau 1 mL sediaan yang akan diuji yang selanjutnya diinokulasikan ke dalam sejumlah volume media <i>Soybean-Casein Digest Broth.</i> Dilakukan pencampuran dan penginkubasian</p>	<p>Dilakukan pengocokan wadah, dipindahkan 1 mL <i>Soybean-Casein Digest Broth</i> ke dalam 100 mL <i>MacConkey Broth</i>, penginkubasian dilakukan pada suhu 42°C-44°C selama 24-48 jam. Subkultur dilakukan pada lempeng <i>MacConkey Agar.</i> Dilakukan penginkubasian pada suhu 30°C-35°C selama 18-72 jam.</p>	<p>Pertumbuhan koloni dalam media <i>MacConkey Agar</i> berwarna merah, biasanya koloni non-mukoid yang dikelilingi dengan zona presipitasi kemerahan.</p>

Jenis Mikroba Uji	Penyiapan Sampel dan Pra Inkubasi	Seleksi dan Subkultur	Interpretasi Hasil
	pada suhu 30°C-35°C selama 18-24 jam.		
<i>Salmonella sp.</i>	Penyiapan sampel dilakukan dengan menggunakan sejumlah tertentu sediaan yang akan diuji setara dengan tidak kurang dari 10 g atau 10 mL. Diinokulasikan ke dalam sejumlah volume media <i>Soybean-Casein Digest Broth</i> . Dilakukan pencampuran dan penginkubasian pada suhu 30°C-35°C selama 18-24 jam.	Sebanyak 0,1 mL <i>Soybean-Casein Digest Broth</i> dipindahkan ke dalam 10 mL media <i>Rappaport Vasiliadis Salmonella Enrichment Broth</i> . Dilakukan penginkubasian pada suhu 30°C-35°C selama 18-24 jam. Subkultur dilakukan pada lempeng <i>Xylose Lysine Deoxycholate Agar</i> . Dilakukan penginkubasian pada suhu 30°C-35°C selama 18-48 jam.	Pertumbuhan koloni dalam Media <i>Xylose Lysine Deoxycholate Agar</i> berwarna merah, dengan atau tanpa inti hitam.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Penyiapan sampel dilakukan dengan mengencerkan 1 dalam 10 dengan tidak kurang dari 1 g sediaan yang akan diuji. Digunakan 10 mL atau sejumlah tertentu setara dengan 1 g atau 1 mL sediaan yang akan diuji. Diinokulasikan ke dalam sejumlah volume media <i>Soybean-Casein Digest Broth</i> dan dihomogenkan.	Subkultur dilakukan pada lempeng <i>Cetrimide Agar</i> . Penginkubasian dilakukan pada suhu 30°C-35°C selama 18-72 jam.	Pertumbuhan koloni dalam media <i>Cetrimide Agar</i> sebagian besar koloni berwarna kehijauan.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Penyiapan sampel dilakukan dengan pengenceran 1	Dilakukan subkultur pada lempeng <i>Mannitol Salt Agar</i> .	Pertumbuhan koloni dalam media <i>Mannitol Salt</i>

Jenis Mikroba Uji	Penyiapan Sampel dan Pra Inkubasi	Seleksi dan Subkultur	Interpretasi Hasil
	<p>dalam 10 pada tidak kurang dari 1 g sediaan yang akan diuji. Digunakan 10 mL atau sejumlah tertentu setara dengan 1 g atau 1 mL sediaan yang akan diuji. Diinokulasikan ke dalam sejumlah volume media <i>Soybean-Casein Digest Broth</i> dan dihomogenkan.</p>	<p>Penginkubasian dilakukan pada suhu 30°C-35°C selama 18-72 jam.</p>	<p>Agar akan menunjukkan pertumbuhan berwarna kuning/putih yang dikelilingi dengan zona kuning.</p>
<i>Clostridia</i>	<p>Penyiapan sampel dilakukan dengan mengencerkan 1 dalam 10 (total volume minimum 20 mL) menggunakan tidak kurang dari 2 g atau 2 mL sediaan yang akan diuji. Sampel dipisahkan menjadi dua bagian, sekurang-kurangnya 10 mL. Satu bagian dipanaskan pada 80°C selama 10 menit, dan didinginkan dengan cepat. Satu bagian lainnya tidak dipanaskan.</p>	<p>Digunakan 10 mL atau sejumlah tertentu setara dengan 1 g atau 1 mL sediaan yang akan diuji dari kedua bagian, diinokulasikan ke dalam sejumlah volume media <i>Reinforced Medium for Clostridia</i> Penginkubasian dilakukan pada kondisi anaerob pada suhu 30°C-35°C selama 48 jam. Setelah diinkubasi, subkultur dibuat dari masing-masing wadah pada <i>Columbia agar</i>, dan inkubasi dilakukan pada kondisi anaerob pada suhu 30°C - 35°C selama 48-72 jam.</p>	<p>Pertumbuhan koloni anaerob dalam media <i>Reinforced Medium for Clostridia</i> akan menunjukkan bentuk batang (dengan atau tanpa endospora) memberikan reaksi katalase negatif.</p>
<i>Candida albicans</i>	<p>Digunakan 10 mL atau sejumlah tertentu setara dengan tidak kurang dari 1 g</p>	<p>Subkultur dilakukan pada lempeng <i>Sabouraud Dextrose Agar</i></p>	<p>Pertumbuhan koloni dalam media <i>Sabouraud Dextrose Agar</i></p>

Jenis Mikroba Uji	Penyiapan Sampel dan Pra Inkubasi	Seleksi dan Subkultur	Interpretasi Hasil
	atau 1 mL sediaan yang akan diuji. Diinokulasikan ke dalam 100 mL media <i>Sabouraud Dextrose Broth</i> , dan dilakukan pencampuran. Penginkubasian dilakukan pada suhu 30°C-35°C selama 3-5 hari.	dan penginkubasian dilakukan pada suhu 30°C-35°C selama 24-48 jam.	akan menunjukkan warna putih, koloni menyerupai khamir.

c. Interpretasi Hasil

- 1) Metode dinyatakan sesuai apabila mikroba spesifik harus terdeteksi dengan sifat-sifat reaksi yang sesuai dan seperti tercantum seperti tertera pada *Interpretasi Hasil* di *Tabel 15. Uji Kesesuaian Metode*.
- 2) Hasil uji mikroba spesifik pada uji kesesuaian metode perlu dilakukan uji konfirmasi spesies menggunakan uji biokimia yang sesuai.
- 3) Apabila uji kesesuaian metode dinyatakan belum memenuhi persyaratan maka diperlukan uji netralisasi untuk mengetahui adanya pengaruh aktivitas antimikroba pada sediaan.
- 4) Apabila aktivitas antimikroba pada produk atau sediaan tidak dapat dinetralisasi, dapat diasumsikan bahwa mikroba yang diuji tersebut tidak ada dalam sediaan.

d. Tahap Netralisasi/ Penghilangan Aktivitas Antimikroba dan Toksisitas Penetral (Jika Diperlukan)

Secara umum, terdapat 3 (tiga) metode yang dapat digunakan untuk menetralkan aktivitas antimikroba dalam sampel, yaitu: penghambatan kimia (menggunakan zat penetral), pengenceran, serta penyaringan dan pembilasan sebagaimana telah dijelaskan pada *Bab III, bagian d. Netralisasi/ Penghilangan Aktivitas Antimikroba dan Toksisitas Penetral*.

Untuk prosedur verifikasi netralisasi/ penghilangan aktivitas antimikroba dan toksisitas penetral sebagai tahapan dalam verifikasi uji mikroba spesifik dengan menggunakan metode penghambatan kimia (menggunakan zat penetral) adalah sebagai berikut:

- a) Metode preparasi sampel dilakukan sesuai dengan prosedur pada *Bab III Bagian B Butir 2.a. Penyiapan Sampel*.

- b) Untuk masing-masing sediaan baru yang diuji, penyiapan mikroba uji dilakukan seperti tertera pada *Penyiapan Sampel* di *Tabel 15. Uji Kesesuaian Metode* dengan kelompok pengujian sebagai berikut:

Tabel. 16 Kelompok Perlakuan Uji Netralisasi

Perlakuan 1	Kelompok uji*)	Sampel (+) Penetral (+) Pelarut (+) Mikroba target**
Perlakuan 2	Kelompok kontrol pepton*)	Pepton atau Fluid A atau dapar lain (+) Penetral (+) Pelarut (+) Mikroba target**
Perlakuan 3	Kelompok Viabilitas	(+) Pelarut (+) Mikroba target** tanpa penambahan penetral

*) *Perlakuan 1 dan 2 dinetralkan terlebih dahulu dengan cara mencampur penetral ke dalam pelarut atau sampel pada saat homogenisasi sampel.*

***) *Mikroba target ditambahkan tidak lebih dari 100 koloni*

- c) Setelah tahap penyiapan sampel, dilakukan pra inkubasi, seleksi dan subkultur mengacu pada *Tabel 15. Uji Kesesuaian Metode*, dimana inkubasi dilakukan dengan masa inkubasi terpendek.
- d) Kriteria keberterimaan:
Metode dinyatakan sesuai apabila mikroba spesifik terdeteksi dengan sifat-sifat reaksi yang sesuai bagian *Interpretasi Hasil* di *Tabel 15. Uji Kesesuaian Metode* dengan tambahan kriteria sebagai berikut:
- Perolehan kembali mikroba uji yang serupa antara *Test group* dan *Peptone Control Group* menunjukkan efektivitas penetral yang memadai;
 - Perolehan yang serupa antara *Peptone Control Group* dan *Viability Group* menunjukkan non-toksisitas penetral yang memadai.

Secara prinsip, pelaksanaan uji kesesuaian mikroba spesifik dengan penetral harus menunjukkan bahwa perolehan kembali dari inokulum yang ditambahkan (kurang dari 100 koloni) tidak terhambat oleh sampel dan metode netralisasi. Hal ini dapat dibuktikan dengan membandingkan hasil pada *test group* terhadap *viability group*. Jika

pertumbuhan mikroba target pada kelompok uji dan/atau kelompok pepton tidak sebanding dengan pertumbuhan mikroba target pada kelompok viabilitas, maka perlu ditentukan apakah metode netralisasi yang dilakukan toksik terhadap mikroba target.

Jika tidak ditemukan metode netralisasi yang sesuai, dapat diartikan bahwa kegagalan isolasi mikroba yang diinokulasikan disebabkan oleh aktivitas antimikroba dari sampel. Hal ini menunjukkan bahwa sampel tidak mungkin terkontaminasi spesies mikroba uji yang digunakan. Dilakukan pengujian dengan faktor pengenceran tertinggi yang sesuai dengan pertumbuhan mikroba uji dan kriteria keberterimaan khusus. Sebagai informasi, produk mungkin dapat menghambat spesies mikroba spesifik tertentu seperti tertera pada *Lampiran <52> Suplemen I FI Edisi VI Tabel 1. Penyiapan dan Penggunaan Mikroba Uji*, namun tidak dapat menghambat galur mikroba lainnya.

BAB V

PENUTUP

Pengujian mutu Obat dan Bahan Obat di laboratorium merupakan langkah penting untuk memastikan bahwa produk yang beredar memenuhi standar mutu, keamanan, dan khasiat yang ditetapkan. Salah satu aspek fundamental dalam proses ini adalah verifikasi metode analisis mikrobiologi yang harus dilakukan sebelum suatu metode diterapkan secara rutin untuk pengujian di laboratorium. Pedoman Verifikasi Metode Analisis Uji Penghitungan Mikroba dan Uji Mikroba Spesifik pada Obat dan Bahan Obat ini disusun untuk memberikan panduan yang jelas mengenai persyaratan minimum yang harus dipenuhi oleh pelaku usaha dan petugas dalam melakukan dan/atau mengevaluasi hasil verifikasi metode analisis uji penghitungan mikroba dan uji mikroba spesifik di laboratorium pada bahan baku obat non steril dan sediaan obat non steril. Verifikasi metode pengujian mikrobiologi yang baik sangat penting dalam memastikan bahwa hasil pengujian dapat diandalkan dan memenuhi standar mutu yang ditetapkan.

Melalui pedoman ini, diharapkan proses verifikasi pengujian mikrobiologi di laboratorium dapat dilakukan dengan konsisten, valid, dan reliabel, sehingga memberikan jaminan bahwa setiap bahan obat dan produk obat yang diuji telah memenuhi standar mikrobiologi yang diperlukan. Lebih lanjut, dengan adanya pedoman ini, diharapkan pengawasan terhadap kualitas obat dan bahan obat dapat dilakukan secara lebih objektif, transparan, dan efisien. Melalui penerbitan pedoman ini, diharapkan seluruh pemangku kepentingan, termasuk laboratorium industri farmasi, lembaga pengujian independen, laboratorium perguruan tinggi, serta regulator, dapat menerapkan verifikasi metode analisis uji penghitungan mikroba dan uji mikroba spesifik pada obat dan bahan obat secara konsisten dan bertanggung jawab.

Pedoman ini akan terus dikaji dan diperbarui sesuai dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang mikrobiologi, sehingga tetap relevan dan selaras dengan standar yang berlaku di tingkat nasional dan internasional. Dengan perbaikan berkelanjutan, pedoman ini diharapkan dapat memastikan pengujian mikrobiologi yang lebih berkualitas dan dapat diandalkan dalam rangka mendukung pengambilan keputusan berbasis data yang valid. Implementasi pedoman ini akan berkontribusi dalam menjaga mutu obat dan bahan

obat di Indonesia serta mendukung upaya perlindungan kesehatan masyarakat secara menyeluruh.