



Uji Aktivitas Pengawet terhadap mikroorganisme

Purwanto

Fakultas Farmasi UGM

Apa itu pengawet ?

- Pengawet antimikroba → senyawa yang ditambahkan ke dalam non-sterile dosage forms untuk melindunginya dari pertumbuhan mikrobia, baik yang ada selama proses atau masuk setelah proses produksi



Apa itu Uji efektivitas antimikroba?

- Mengacu pada USP Chapter <51> → uji untuk membuktikan effectiveness dari suatu sistem preservative dalam suatu produk
- Produk diinokulasi dengan mikroorganisme tertentu dgn jumlah diketahui. Uji tersebut membandingkan jumlah mikroorganisme dalam bahan kontrol terhadap sample selama periode 28 hari.
- Setiap zat antimikroba dapat bersifat pengawet. Meskipun demikian semua zat antimikroba adalah zat yang beracun
- Untuk melindungi konsumen → kadar pengawet harus dikontrol ketat agar tidak menimbulkan keracunan bagi manusia

Contoh pengawet

Table 10.1 Examples of preservatives commonly used in pharmaceutical formulations

Product type	Preservative	Concentration (% w/v)	Proportion of USP formulations in which preservative used (%) [*]
Parenteral	Benzyl alcohol	0.1–3.0	31.0
	Methyl/propyl paraben	0.08–0.1/ 0.001–0.023	13.8
	Phenol	0.2–0.5	7.9
	Methyl paraben (alone)	0.1	6.6
	Chlorbutanol	0.25–0.5	5.3
	Sodium metabisulphite	0.025–0.66	5.3
Ophthalmic	Benzalkonium chloride	0.0025–0.0133	50.0
	Thiomersal	0.001–0.5	19.8
	Methyl/propyl paraben	0.05/0.01	6.6
	Benzalkonium chloride plus EDTA	0.01/0.1	3.3
Creams	Benzyl alcohol	1.0–2.0	25.4
	Methyl/propyl paraben	NA	18.6
	Methyl paraben (alone)	0.1–0.3	11.9
	Benzoic acid	0.2	8.5
	Sorbic acid	0.1	8.5
	Chlorocresol	0.05	6.8
Oral	Sodium benzoate	NA	34.4
	Methyl/propyl paraben	NA	18.3
	Methyl paraben (alone)	0.1	9.7
	Methyl paraben plus sodium benzoate	NA	7.5

^{*} Only the most commonly used agents are listed; thus percentages in each product category do not total 100%.
NA = not available.

Mengapa perlu pengawet ?

- Untuk sediaan Farmasi NON STERIL :
 - utk melindungi dari pertumbuhan mikroba yang ada saat proses atau mikroba yang mungkin masuk setelah proses
- Untuk sediaan Farmasi yang STERIL
- → digunakan utk produk steril yang multi dosis (proses penggunaan berulang) misal vial berisi obat suntik

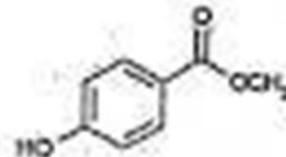


Beberapa jenis pengawet

- Asam benzoat and garamnya
- Asam sorbat and garamnya
- Paraben (metil dan propil paraben)



METILPARABEN
Methyl paraben



Metil p-hidroksibenzoat [99-76-3]
 $C_8H_8O_3$

BM 152,15 6

Faktor yang mempengaruhi aktivitas pengawet

- pH
- Keberadaan fasa non akuatik pada sediaan
- Adsorpsi solid dalam suspensi
- Adsorpsi pada kemasan plastik

Prosedur Dasar

- Mikroorganisme yg digunakan : bakteri, khamir, dan kapang
- Gunakan mikroorganisme specific ATCC (atau sumber lain yg sah) :

Bakteri :

- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*

Khamir : *Candida albicans*

Kapang : *Aspergillus niger*

Additional/tambahan Organisme

- *Zygosaccharomyces rouxii* untuk produk dengan kadar gula tinggi
- Atau isolat2 dari lingkungan
- Untuk sediaan parenteral, mungkin dapat dimasukkan mikroorganisme nosocomial infections.

Contoh :

- Resistant organism in cosmetic formulation : *Bacillus*
- Nosocomial Organisms : *Serratia marcescens, Candida albicans, Streptococcus, Staphylococcus aureus*

Prosedur pengujian

PROSEDUR UJI EFEKTIVITAS



Inokulasi dengan salah satu mikroba uji (0,1 mL/20 mL sediaan)

Jumlah mikroba $10^5 - 10^6$ /mL

Tetapkan jumlah mikroba viabel dalam setiap suspensi inokula, Hitung angka awal /mL sediaan dengan metode lempeng



Inkubasi pada 20-25 °C



Amati pada hari 7,14, 21, 28

Catat tiap perubahan dan tetapkan jumlah mikroba viabel dengan metode lempeng

Hitung perubahan jumlah tiap mikroba dalam % selama pengujian

PENAFSIRAN HASIL

Suatu pengawet dinyatakan efektif apabila:

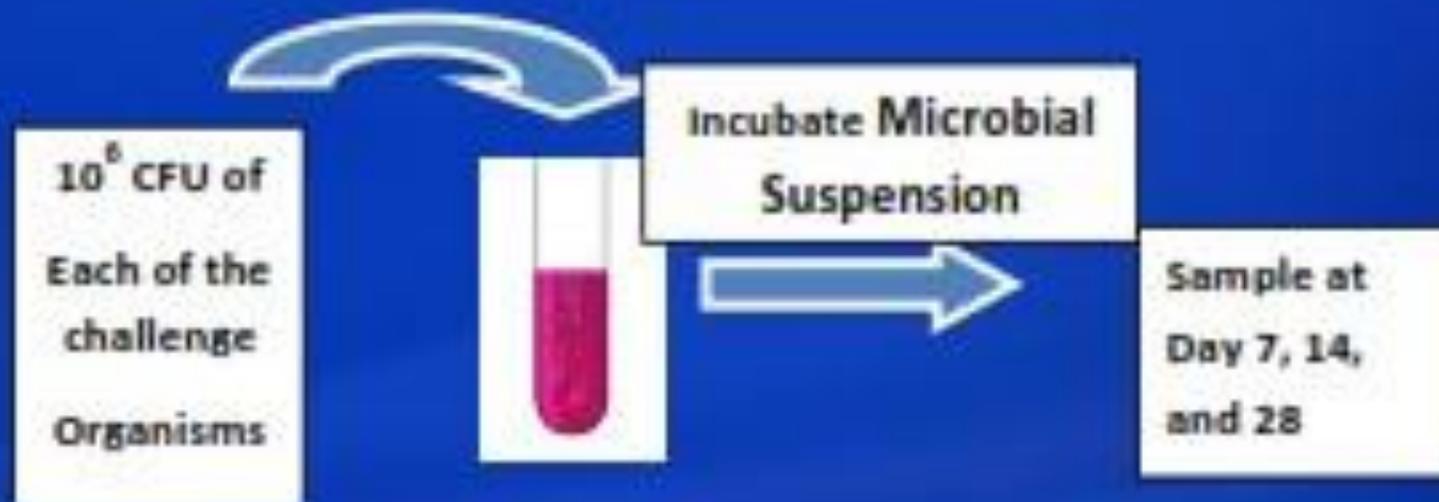
Jumlah bakteri viabel pada hari ke 14 berkurang hingga tidak lebih dari 0,1% dari jumlah awal

Jumlah kapang dan khamir viabel pada hari ke 14 berkurang hingga tidak lebih dari 0,1% dari jumlah awal

Jumlah tiap mikroba uji selama hari tersisa dari 28 hari pengujian adalah tetap atau kurang dari bilangan yang disebut di atas

Prinsip uji :

- Untuk setiap mikroorganisme uji ditempatkan pada wadah terpisah, termasuk juga kontrol positif dan kontrol negatif.
- Sampel yang akan diuji di tempatkan pada wadah steril dan terlindung dari cahaya.
- PASTIKAN inokulum mikroorganisme uji yang disiapkan telah diketahui dengan pasti jumlah koloni nya (CFU/mL) yaitu antara 10^5 - 10^6 cfu/mL
- Biakan mikroorganisme harus disiapkan fresh/segar/baru
- **Yang dihitung dari mikroba uji dalam evaluasi efektivitas pengawet ini adalah : pengurangan mikroba secara logaritmik**



•At the test time, remove aliquots and perform plate counts.



Category of product (USP)

Category	Product Description
1	Injections, other parenterals including emulsions, otic products, sterile nasal products, and ophthalmic products made with aqueous bases or vehicles
2	Topically used products made with aqueous bases or vehicles, non-sterile nasal products and emulsions, including those applied to mucus membranes
3	Oral products other than antacids, made with aqueous bases or vehicles
4	Antacids made with an aqueous base

- Suatu produk di inokulasi (sengaja di kontaminasi) dengan sejumlah mikroorganisme antara 1×10^5 (100,000) to 1×10^6 (1,000,000) colony forming units (CFU) per mL produk.
- Pada rentang yg bervariasi, tgt category, produk diuji ntuk menetapkan kemampuannya mengontrol reproduksi atau membunuh mikroorganisme.

Category 1	
Bacteria	Not less than 1.0 log reduction from the initial calculated count, at 7 days. Not less than 3.0 log reduction from the initial count at 14 days. No increase from the count at 14 days to the count at 28 days.
Yeast and Mold	No increase from the initial count calculated at 7, 14 and 28 days
Category 2	
Bacteria	Not less than 2.0 log reduction from the initial calculated count, at 14 days. No increase from the count at 14 days to the count at 28 days.
Yeast and Mold	No increase from the initial count calculated at 14 and 28 days
Category 3	
Bacteria	Not less than 1.0 log reduction from the initial calculated count, at 14 days and no increase from the count at 14 days to the count at 28 days.
Yeast and Mold	No increase from the initial count calculated at 14 and 28 days
Category 4	
Bacteria, Yeast and Mold	No increase from the initial calculated count at 14 and 28 days.

Validasi

- Saat pertama kali suatu produk diuji untuk Antimicrobial Effectiveness, perlu dilakukan validasi untuk menjamin formula yang diuji dapat menghambat pertumbuhan mikroorganismenya.
- Full validation harus dilakukan dalam 3 (three) pekerjaan independen, dan setiap pekerjaan harus menunjukkan recovery pertumbuhan mikroorganismenya pada inokulum dan kontrol tidak berbeda kurang dari 70%

Kapan harus re-validasi?

Revalidasi perlu dilakukan jika ada perubahan formula produk, atau proses produksi, atau perubahan pada pengemasan.

Variabilitas adlh sangat mungkin, karena :

- Sumber mikroorganisme
 - ATCC
 - Berbagai sumber lain / collections
 - Pertumbuhan dan cara panen
- Asal biakan : Liquid vs agar cultures
- Komposisi buffers
- Komposisi neutralizers
- Cara perhitungan Plate counting
- Konversi /Mathematical transformations

Terimakasih