

Penetapan *Limit of Detection* (LOD) dan Sensitivitas Metode Deteksi *Pseudomonas aeruginosa* dalam Berbagai Matriks Sediaan Obat

Nur Aini^{a,1,*}, Maria Berlina Purba^{a,2}, Sitoresmi Triwibowo^{a,3}, Nenden Solihatul Z^{a,4}, Ratna Wulandari^{b,5}

^a Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional, BPOM, Jl. Percetakan Negara No.23, Jakarta Pusat, 10560

^b Direktorat Pemberdayaan Masyarakat dan Pelaku Usaha Pangan Olahan, BPOM, Jl. Percetakan Negara No.23, Jakarta Pusat, 10560

¹ nur.aini@pom.go.id*; ² mariaberlina.purba@pom.go.id; ³ sitoresmi.triwibowo@pom.go.id;

⁴ nenden.solihatulzannah@pom.go.id; ⁵ ratna.wulandari@pom.go.id

* corresponding author

ARTICLE INFO

ABSTRACT / ABSTRAK

Article history

Received: 19
September 2021

Revised: 29
Oktober 2021

Accepted: 11
November 2021

DOI:

<https://doi.org/10.54384/eruditio.v1i2.82>

Keberadaan mikroorganisme tertentu dalam produk obat dapat berpotensi mengurangi bahkan menginaktivkan aktivitas terapeutik dan berbahaya bagi kesehatan pasien. Persyaratan kualitas mikrobiologi pada produk obat tercantum dalam monografi sesuai acuan Farmakope yang berlaku. Salah satunya adalah parameter cemaran *P. aeruginosa* yang tidak boleh ada dalam sediaan obat. Farmakope menyatakan bahwa metode deteksi mikroba harus mampu mendeteksi mikroba, termasuk *P. aeruginosa* dengan jumlah tidak lebih dari 100 koloni, namun batas deteksi yang sebenarnya tidak pernah ditetapkan secara kuantitatif dan banyak variabel dapat mempengaruhi mikroba yang diperoleh kembali. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui nilai rentang *Limit of Detection* (LOD) dan sensitivitas metode pengujian *P. aeruginosa* pada produk obat. Metode deteksi *P. aeruginosa* mengacu pada pengujian mikroba spesifik Farmakope Indonesia VI (2020) yaitu metode kultur media. Deteksi *P. aeruginosa* dilakukan terhadap delapan produk obat yang mewakili lima bentuk sediaan yang telah dikontaminasi dengan *P. aeruginosa* ATCC 9027 dengan tiga tingkat konsentrasi, yaitu ± 1 sampai 4, ± 5 , dan ± 10 koloni per g atau mL sampel. Berdasarkan hasil pengujian ditetapkan nilai rentang LOD dan sensitivitas metode deteksi *P. aeruginosa* pada produk obat, dan dianalisis secara deskriptif kualitatif. Metode deteksi *P. aeruginosa* sesuai farmakope dapat mendeteksi *P. aeruginosa* dalam berbagai matriks sediaan obat dengan batas deteksi antara 1-10 koloni dan sensitivitas 100%. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan nilai LOD dalam verifikasi metode deteksi *P. aeruginosa* dalam produk obat.

Contamination of certain microorganisms in pharmaceutical products can potentially reduce or even inactivate therapeutic activity and harm patient health. Pharmacopoeia monograph determine the microbiological quality in medicinal products. One of them is P. aeruginosa parameters which should not be present in pharmaceutical preparations. Pharmacopoeia states that microbial detection methods must be able to detect microorganisms, including P. aeruginosa not more than 100 colonies, but the actual detection limit has never been set quantitatively and many variables can affect the microorganism recovery. This study aims to determine the range of Limit of Detection (LOD) values and the sensitivity of the P. aeruginosa method on pharmaceutical products. Detection method of P. aeruginosa refers to the specific microbial test of the Indonesian Pharmacopoeia VI (2020) is culture media methods. Experiments used eight pharmaceutical products representing five dosage forms contaminated with P. aeruginosa ATCC 9027 with three levels of concentration. The results determined LOD range and sensitivity of P. aeruginosa detection method in pharmaceutical products, and analyzed descriptively. This study shows that pharmacopeia method of P. aeruginosa testing can detect P. aeruginosa in various drug preparation matrices with a detection limit of 1-10 colonies and a sensitivity of 100%. Results of this study can be used as reference for LOD value in the verification of the P. aeruginosa detection in medicinal product.

Keywords: LOD, *Pseudomonas aeruginosa*, Pharmaceutical preparation, Sensitivity

Kata Kunci: LOD, *Pseudomonas aeruginosa*, Sediaan obat, Sensitivitas

1. Pendahuluan

Produk obat terbagi menjadi dua grup, yaitu produk steril dan non steril. Produk non steril harus memenuhi persyaratan kualitas mikrobiologi yang terdapat pada monografi Farmakope Indonesia VI (FI VI). Persyaratan mutu mikrobiologi untuk produk obat non steril meliputi Angka Lempeng Total, Angka Kapang Khamir, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bile tolerant gram negative bacteria*, *Candida albicans*, *Clostridia spp.* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020). Keberadaan mikroorganisme tertentu dapat berpotensi mengurangi bahkan menginaktifkan aktivitas terapeutik karena mengubah sifat fisiko-kimiawi obat, menjadi senyawa yang lebih toksik (Ratajczak et al., 2015) dan berbahaya bagi kesehatan pasien (M. Eissa & Mahm, 2016). Produk obat dapat diklasifikasikan berdasarkan rute penggunaan seperti sediaan penggunaan kutan, oromukosal, gingival, vaginal, dan oral yang memiliki kriteria mutu mikrobiologi yang sama seperti *P. aeruginosa* negatif per gram atau mL sampel (The United States Pharmacopeial, 2019).

Pseudomonas aeruginosa merupakan salah satu jenis bakteri patogen pada manusia. Bakteri ini termasuk gram negatif, berflagela, dan menghasilkan metabolit sekunder golongan kuinolon, rhamnolipid, lektin, hidrogen sianida, dan fenazin, yang membuat bakteri ini dapat beradaptasi dengan baik saat hidup bebas maupun sebagai patogen. Bakteri ini secara alami resisten terhadap banyak antibiotik dan desinfektan, sehingga menjadi patogen yang sulit untuk diobati (National Center for Biotechnology Information, 2021). *P. aeruginosa* merupakan patogen yang sering menyebabkan infeksi saluran pernapasan seperti pneumonia (Fujii et al., 2014) dan *cystic fibrosis* (Pages-Monteiro et al., 2017). Dalam farmakologi, *P. aeruginosa* dipersyaratkan negatif per gram atau mL sampel obat, sehingga diperlukan metode yang mampu mendeteksi bakteri dengan konsentrasi rendah.

Farmakope Indonesia VI (2020) menyatakan bahwa metode deteksi mikroba, termasuk *P. aeruginosa* harus mampu mendeteksi mikroba dengan jumlah tidak lebih dari 100 koloni, namun batas deteksi yang sebenarnya tidak pernah ditetapkan secara kuantitatif dan banyak variabel dapat mempengaruhi *recovery* mikroba pada sediaan (The United States Pharmacopeial, 2020). Menurut *International Conference on Harmonisation* (International Conference on Harmonization, 2005), *Limit of Detection* (LOD) atau batas deteksi merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi tetapi tidak penting untuk diukur di bawah kondisi eksperimen. Dalam mikrobiologi kualitatif, LOD suatu metode didefinisikan sebagai jumlah mikroorganisme terkecil dalam volume tertentu sampel yang dapat terdeteksi di bawah kondisi eksperimen tertentu (The United States Pharmacopeial, 2020).

Penelitian terkait nilai rentang LOD metode deteksi *P. aeruginosa* pada sediaan obat belum pernah dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui rentang LOD dan sensitivitas metode deteksi *P. aeruginosa* dari beberapa bentuk sediaan obat dengan matriks yang berbeda. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan nilai LOD dalam verifikasi metode deteksi *P. aeruginosa*.

2. Metodologi

2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Biologi Molekuler, Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional, BPOM pada Bulan Maret sampai Juli 2020.

2.2. Bahan dan Instrumen Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah Larutan Dapar Fosfat (LDF) pH 7,2, Polisorbit 80, Lesitin, media pertumbuhan mikroba (*Soybean Casein Digest Broth* (SCDB), *Cetrimide Agar* (CETA); *Soybean-Casein Digest Agar* (SCDA)), berbagai sediaan obat yang meliputi sediaan penggunaan kulit, oromukosa, gingival, vaginal dan oral, dan baku mikroba *P. aeruginosa* ATCC 9027. Identifikasi bakteri ini menggunakan instrumen VITEK 2 *Compact System* (Biomerieux) dan kit API 20NE (Biomerieux).

2.3. Preparasi Sampel

Preparasi sampel mengikuti metode Farmakope Indonesia Edisi VI (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020) sebagai berikut : Sampel ditimbang sebanyak 10 g atau dipipet 10 mL secara aseptis ke dalam wadah yang sesuai, kemudian ditambahkan Larutan Dapar Fosfat pH 7,2 sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . Untuk Sediaan berlemak, sampel dilarutkan dengan sesedikit mungkin surfaktan Polisorbat 80 steril (1 mL dalam 10 g sampel), ditambahkan LDF pH 7,2, sehingga diperoleh suspensi dengan pengenceran 10^{-1} dan dikocok sampai homogen.

2.4. Pembuatan Spiked Sampel

Pembuatan suspensi bakteri untuk *spike* didasarkan perhitungan jumlah bakteri target yang dilakukan dengan metode Angka Lempeng Total atau dengan menggunakan standar 1 McFarland atau dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (% Transmittan) λ 580 nm, yang sebelumnya telah diketahui konsentrasi dari pengukuran % Transmittan dari bakteri yang digunakan.

Pada penelitian ini, pembuatan suspensi bakteri dilakukan menggunakan *P. aeruginosa* ATCC 9027. Satu Ose kultur *P. aeruginosa* diinokulasi ke permukaan lempeng agar SCDA dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam, kemudian dibuat suspensi *P. aeruginosa* 1 McFarland atau ± 42 % Transmittan dan dihitung jumlah koloninya dengan metode Angka Lempeng Total.

Suspensi *P. aeruginosa* tersebut diinokulasi pada masing-masing sampel hasil preparasi dengan volume tertentu sehingga diperoleh 3 tingkat konsentrasi, yaitu ± 1 sampai 4, ± 5 , dan ± 10 koloni per g atau mL sampel (USP Convention, 2020). Untuk mendapatkan konsentrasi ± 1 sampai 4, ± 5 , dan ± 10 koloni per g atau mL sampel dalam 10 g atau 10 mL sampel, maka ditambahkan inokulum *P. aeruginosa* yang mengandung jumlah koloni sekitar 10 sampai 40; 50 dan 100 koloni.

2.5. Pengukuran atau Pengambilan Data

2.5.1 Penetapan LOD

Penetapan LOD dilakukan dengan 3 tingkat konsentrasi *P. aeruginosa* yaitu ± 1 sampai 4, ± 5 , dan ± 10 koloni per g atau mL sampel. Masing-masing tingkat konsentrasi dilakukan sebanyak 6 ulangan pengujian pada tiap jenis sampel. Pengujian deteksi *P. aeruginosa* dilakukan sesuai metode uji mikroba spesifik Farmakope Indonesia VI (2020). Nilai LOD ditetapkan berdasarkan konsentrasi *P. aeruginosa* terkecil dalam sampel yang masih dapat dideteksi pada semua ulangan (The United States Pharmacopeial, 2020).

2.5.2 Penetapan Sensitivitas

Penetapan sensitivitas dilakukan dari 6 ulangan pengujian pada masing-masing sediaan yang dikontaminasi *P. aeruginosa* pada nilai LOD. Penghitungan nilai sensitivitas dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (The SAC Accreditation Programme, 2019):

$$\text{Sensitivitas} = \frac{\text{Number of True Positive (TP)}}{\text{Number of True Positive (TP)} + \text{False Negative (FN)}}$$

2.5.3 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan analisis statistika deskriptif. Metode deskriptif analitis adalah suatu metode yang berfungsi untuk mendeskripsikan atau memberi gambaran terhadap objek yang diteliti melalui data atau sampel yang telah terkumpul sebagaimana adanya tanpa melakukan analisis dan membuat kesimpulan yang berlaku untuk umum (Sugiyono, 2013).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Penetapan LOD

Limit of Detection (LOD) didefinisikan sebagai jumlah mikroba terkecil dalam volume tertentu sampel yang dapat terdeteksi. Pada penelitian ini digunakan konsentrasi mikroba yang mendekati satu koloni yaitu ± 1 sampai 4, ± 5 , dan ± 10 koloni/g atau mL sampel. Berdasarkan penelitian pada

beberapa bentuk sediaan, diperoleh LOD dengan rentang nilai 1 sampai 10 koloni per gram atau mL sampel obat. Secara umum LOD berada pada rentang 1 sampai 4 koloni per gram atau mL, kecuali sediaan gingival dan sediaan penggunaan kulit 3 (Tabel 1).

Tabel 1. Batas deteksi metode *P. aeruginosa* dalam berbagai matriks sediaan obat

| Bentuk Sediaan | Matriks | LOD |
|----------------------------|-------------------|-------------|
| Sediaan gingival | Cairan obat kumur | 10 koloni/g |
| Sediaan oromukosa | Salep | 2 koloni/g |
| Sediaan oral | Sirup | 2 koloni/mL |
| Sediaan penggunaan kulit 1 | Salep | 3 koloni/g |
| Sediaan penggunaan kulit 2 | Krim | 3 koloni/g |
| Sediaan penggunaan kulit 3 | Krim | 10 koloni/g |
| Sediaan penggunaan kulit 4 | Krim | 1 koloni /g |
| Sediaan vaginal | Tablet | 4 koloni/g |

Sediaan gingival merupakan sediaan yang diaplikasikan pada gingiva atau gusi. Sediaan gingival yang digunakan dalam penelitian ini berbentuk cairan obat kumur yang mengandung benzidamin hidroklorida. Sampel yang dikontaminasi dengan *P. aeruginosa* dengan konsentrasi 3 dan 5 koloni/mL tidak menunjukkan adanya pertumbuhan pada semua ulangannya. Pertumbuhan *P. aeruginosa* terlihat pada konsentrasi 10 koloni/mL. Benzidamin hidroklorida adalah obat antiinflamasi nonsteroid (NSAID) indazole dengan sifat analgesik, antipiretik, dan anti-edema. Tidak seperti NSAID lainnya, benzidamin hidroklorida tidak menghambat siklooksigenase (COX), tetapi menstabilkan membran dan menunjukkan sifat antimikroba (NCBI, 2021). Kemungkinan sifat antimikroba dari zat aktif yang menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* pada konsentrasi 3 dan 5 koloni/mL, sehingga pada sediaan ini nilai LOD diperoleh pada angka 10 koloni/mL.

Sediaan oromukosa merupakan obat dengan rute pemberian melalui mukosa di rongga mulut (Nuryati, 2017). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa salep triamsinolon asetonida. Pada saat preparasi sediaan ini telah ditambahkan polisorbate 80 sebagai penetral dan pengemulsi, LOD menunjukkan nilai 2 koloni/g.

Sediaan oral merupakan obat dengan rute pemberian melalui mulut dan masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan (Nuryati, 2017). Sampel yang digunakan berupa sirup yang mengandung parasetamol, dekstrometorphan, fenilpropanolamin, klorfeniramin maleat, dan etanol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa LOD untuk sediaan oral dengan matriks sirup diperoleh 2 koloni/mL. Etanol menunjukkan aktivitas antimikroba (Li et al., 2017). Menurut Tashiro *et. al* (Tashiro et al., 2014), etanol dalam konsentrasi rendah (1-2%) yang diinokulasi 12 jam dapat membantu pembentukan biofilm *P. aeruginosa*. Hal ini diduga membantu agar *P. aeruginosa* tetap hidup dengan adanya biofilm.

Sediaan penggunaan kulit 1 dan 2 menunjukkan nilai LOD yang sama, yaitu 3 koloni/g. Sediaan kulit merupakan salep asiklovir, sedangkan sediaan kulit 2 mengandung krim hidrokortison. Pada saat preparasi sediaan ini telah ditambahkan polisorbate 80 dan lesitin yang berfungsi sebagai penetral untuk pengawet yang biasa digunakan dalam sediaan kulit. Penambahan zat penetral untuk sampel yang diuji adalah efektif untuk *recovery* bakteri ataupun jamur konsentrasi rendah di dalam sampel (M. E. Eissa, 2016). Dengan penambahan polisorbate 80 dan lesitin, sediaan kulit 1 dan 2 sudah tidak memiliki aktivitas antimikroba, sehingga pada saat dicemari bakteri *P. aeruginosa* dengan konsentrasi rendah sudah menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri tersebut.

Sediaan penggunaan kulit 3 dengan matriks krim menunjukkan LOD 10 koloni/g. Menurut Houssieny *et. al* (El-Houssieny, R. S., Aboulwafa, M. M., Elkhatib, W. F., & Hassouna, 2013),

pertumbuhan mikroba pada produk obat dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah sediaan mengandung minyak yang memiliki potensi untuk mengurangi pertumbuhan dan kontaminasi mikroba. Pada saat preparasi sediaan penggunaan kulit ini telah ditambahkan polisorbate 80 dan lesitin sebagai pengemulsi dan penetral, namun pada sampel yang dikontaminasi dengan *P.aeruginosa* dengan konsentrasi 3 koloni/g tidak menunjukkan adanya pertumbuhan pada semua ulangannya. Pertumbuhan *P.aeruginosa* terlihat pada konsentrasi 10 koloni/g. Sediaan penggunaan kulit 3 berupa krim yang mengandung zat aktif betametason. M. Artini *et. al* (Artini et al., 2014) melaporkan bahwa betametason menunjukkan efek penghambatan yang kuat terhadap pertumbuhan semua strain *Enterobacteriaceae* dan hampir semua strain *Pseudomonas*. Penghambatan pertumbuhan bakteri selain dipengaruhi oleh zat aktif, dapat disebabkan oleh eksipien dalam sampel tersebut.

Sediaan penggunaan kulit 4 dengan matriks krim yang mengandung fluosinolon asetonida menunjukkan nilai LOD terendah yaitu 1 koloni/g. Pada saat preparasi, sediaan ini telah ditambahkan polisorbate 80 yang berfungsi sebagai pengemulsi dan penetral (de Assis et al., 2011). Fluosinolon asetonida termasuk golongan kortikosteroid, dan tidak memiliki sifat anti mikroba (Montoro et al., 2018).

Berdasarkan hasil penelitian, LOD 4 koloni/g terdeteksi untuk sediaan vaginal yang mengandung nistatin. Nilai LOD ini termasuk dalam konsentrasi rendah dari tiga tingkat konsentrasi yang ditetapkan pada penelitian. Kemampuan metode untuk mendeteksi *P. aeruginosa* pada konsentrasi rendah dalam sampel vaginal dapat disebabkan karena tidak ada efek penghambatan dari sediaan obat. Bahan aktif nistatin dalam sediaan obat tidak memiliki sifat anti mikroba. Nistatin efektif untuk jamur dan ragi namun tidak efektif pada bakteri, protozoa dan virus (Djajusman et al., 2014).

Rentang LOD metode deteksi *P. aeruginosa* pada produk obat yang diperoleh dalam penelitian ini mempunyai nilai antara 1-10 koloni per g atau mL sampel dan menunjukkan pertumbuhan pada semua ulangan sampel yang dikontaminasi pada nilai LOD. Hasil ini sesuai dengan nilai LOD yang ditetapkan untuk uji mikrobiologi yaitu pada rentang 5-10 koloni menurut panduan validasi dan verifikasi metode uji (Guidance-Validation, 2018). Metode deteksi *P. aeruginosa* yang digunakan dalam penelitian ini sensitif dan valid digunakan terhadap semua matriks sediaan obat tersebut.

3.2. Penghitungan Sensitivitas

Sensitivitas merupakan nilai yang menyatakan jumlah koloni yang terkonfirmasi positif dari koloni terduga. Sensitivitas ini menunjukkan kemampuan metode dalam mendeteksi analit, dalam hal ini adalah *P. aeruginosa* (The SAC Accreditation Programme, 2019). Penelitian ini menunjukkan metode deteksi *P. aeruginosa* pada beberapa bentuk sediaan obat dengan matriks yang berbeda menunjukkan sensitivitas yang sama, yaitu 100% (Tabel 2).

Tabel 2. Sensitivitas Metode Pengujian *P. aeruginosa* dalam Sediaan Obat

| Bentuk Sediaan | Matriks | Sensitivitas |
|----------------------------|-------------------|--------------|
| Sediaan gingival | Cairan obat kumur | 100% |
| Sediaan oromukosa | Salep | 100% |
| Sediaan oral | Sirup | 100% |
| Sediaan Penggunaan Kulit 1 | Salep | 100% |
| Sediaan Penggunaan Kulit 2 | Krim | 100% |
| Sediaan Penggunaan Kulit 3 | Krim | 100% |
| Sediaan Penggunaan Kulit 4 | Krim | 100% |
| Sediaan Vaginal | Tablet | 100% |

Sensitivitas 100% menunjukkan metode deteksi *P. aeruginosa* yang digunakan dalam penelitian ini mampu mendeteksi *P.aeruginosa* dalam berbagai matriks sediaan obat. *P.aeruginosa* dapat tumbuh dan terkonfirmasi positif pada semua *spiked* sampel dengan konsentrasi pada masing-masing batas deteksinya.

4. Kesimpulan

Limit of Detection metode deteksi *P. aeruginosa* dalam berbagai sediaan obat mempunyai rentang nilai 1 sampai 10 koloni/g atau mL sampel, dan memiliki tingkat sensitivitas yang sama yaitu 100%. Batas deteksi pada sediaan gingival adalah 10 koloni/mL, sediaan oromukosa dan oral sebesar 2 koloni per g atau mL, sediaan kulit 1 dan 2 sebesar 3 koloni/g, sediaan kulit 4 sebesar 1 koloni/g, dan sediaan kulit 3 yang mempunyai batas deteksi 10 koloni/g. Perbedaan nilai LOD dapat disebabkan oleh perbedaan matriks dan zat aktif masing-masing sediaan obat. Nilai LOD yang diperoleh dari penelitian masih sesuai dengan uji kesesuaian metode menurut acuan Farmakope Indonesia VI tahun 2020 dan persyaratan validasi dan verifikasi metode uji (Guidance-Validation, 2018). Nilai LOD ini dapat dijadikan acuan oleh laboratorium dalam memverifikasi metode deteksi *P. aeruginosa* pada masing-masing sediaan obat.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pimpinan dan Staf Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional, BPOM atas segala kontribusi yang diberikan sehingga penelitian ini dapat dilakukan dengan baik. Ucapan terima kasih juga kami sampaikan kepada Bapak Dr. Joko Ridho Witono, M.Si selaku pembimbing penulisan karya tulis.

Daftar Referensi

- Artini, M., Papa, R., Cellini, A., Tilotta, M., Barbato, G., Koverech, A., & Selan, L. (2014). Effect of Betamethasone in Combination with Antibiotics on Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 27(4), 675–682. <https://doi.org/10.1177/039463201402700426>
- de Assis, P. A., de Andrade, S. B., de Oliveira, C. M. C., de Araújo, P. M., Grangeiro, S., & Ramos, S. V. V. (2011). Development and Validation of a Microbial Counting Method for Mebendazole Oral Suspension. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(3), 555–563. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000300013>
- Djajusman, S. K., Tedjosongko, U., & Irmawati, I. (2014). Daya Hambat Xylitol dan Nistation terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* (in vitro) (Inhibition Effect of Xylitol and Nistatin Combination on *Candida albicans* Growth (in vitro)). *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*, 47(3), 164. <https://doi.org/10.20473/j.djmkg.v47.i3.p164-167>
- Eissa, M. E. (2016). Distribution of Bacterial Contamination in Non-sterile Pharmaceutical Materials and Assessment of Its Risk to The Health of The Final Consumers Quantitatively. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(3), 217–230. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2016.08.005>
- Eissa, M., & Mahm, A. (2016). Evaluation of Microbial Recovery from Raw Materials for Pharmaceutical Use. *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 6–11. <https://doi.org/10.14499/jfps>
- El-Houssieny, R. S., Aboulwafa, M. M., Elkhatib, W. F., & Hassouna, N. A. H. (2013). Recovery and Detection of Microbial Contaminants in Some Non-sterile Pharmaceutical Products. *Arch Clin Microbiol*, 4 (6), 1–14.
- Fujii, A., Seki, M., Higashiguchi, M., Tachibana, I., Kumanogoh, A., & Tomono, K. (2014). Community-acquired, hospital-acquired, and healthcare-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Respiratory Medicine Case Reports*, 12, 30–33. <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2014.03.002>
- Guidance-Validation, N. G. A. (2018). *Validation and Verification of Quantitative and Qualitative*

Test Methods.

- International Conference on Harmonization. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). *International Conference on Harmonization*.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2020). Farmakope Indonesia edisi IV. In *Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (VI)*. Kementerian Kesehatan RI.
- Li, X., Liu, J., Du, Y., Wen, Z., Wang, J., & Yang, P. (2017). Antibacterial activity and mechanism of the ethanol extracts from *Sonchus brachyotus* DC. *International Journal of Food Properties*, 20(12), 2923–2931. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1261152>
- Montoro, V., Asensio, C., Martínez, Á., Lorente, J., Rodríguez, F. J., Montojo, J., Gavilanes, J., Sarria, P., Langdon, C., & Prades, E. (2018). Efficacy and safety of fluocinolone acetonide 0.025% otic solution in patients with otic eczema: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Journal of International Medical Research*, 46(10), 4050–4060. <https://doi.org/10.1177/0300060518765333>
- National Center for Biotechnology Information. (2021). *Compound Summary Benzylamine hydrochloride*. U.S. National Library of Medicine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzylamine-hydrochloride>
- Nuryati. (2017). Farmakologi. In BPPSDM Kesehatan (Ed.), *Bahan Ajar Rekam Medis dan Informasi Kesehatan*. BPPSDM Kesehatan.
- Pages-Monteiro, L., Marti, R., Commun, C., Alliot, N., Bardel, C., Meugnier, H., Prouse-De-Montclos, M., Reix, P., Durieu, I., Durupt, S., Vandenesch, F., Freney, J., Cournoyer, B., & Doleans-Jordheim, A. (2017). Strong incidence of *Pseudomonas aeruginosa* on bacterial rrs and ITS genetic structures of cystic fibrosis sputa. *PLoS ONE*, 12(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173022>
- Ratajczak, M., Kubicka, M. M., Kamińska, D., Sawicka, P., & Długaszewska, J. (2015). Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 303–307. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.11.015>
- Sugiyono. (2013). *Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif, dan R&D*. Alfabeta.
- Tashiro, Y., Inagaki, A., Ono, K., Inaba, T., Yawata, Y., Uchiyama, H., & Nomura, N. (2014). Low concentrations of ethanol stimulate biofilm and pellicle formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(1), 178–181. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.877828>
- The SAC Accreditation Programme. (2019). *Guidance Notes C&B AND ENV 002 Method Validation of Microbiological Methods*. Enterprise Singapore. <https://www.sac-accreditation.gov.sg/files/documents/laboratory-accreditation/testing-and-calibration-documents/environmental-testing-field/Guidance-Note-CB-and-ENV-002-29-Mar-2019.pdf>
- The United States Pharmacopeial. (2019). United State Pharmacopoeia 2019 USP 42- NF 37. In The United States Pharmacopeial Convention (Ed.), *United State Pharmacopoeia 2019 USP 42- NF 37*. The United States Pharmacopeia (USP).
- The United States Pharmacopeial. (2020). United State Pharmacopoeia 2020 USP 43-NF 38. In United State Pharmacopoeia (Ed.), *United State Pharmacopoeia (42nd-NF 38th ed.)*. United State Pharmacopoeia.