

Uji Pirogenitas dengan Kelinci dan Limulus Amebocyt Lysate

Drs. Usman Suwandi

Pusat Penelitian dan Pengembangan PT. Kalbe Farma, Jakarta

PENDAHULUAN

Pirogen merupakan substansi yang mampu menyebabkan demam dan sering mencemari sediaan farmasi. Uji pirogenitas dimaksudkan untuk membatasi resiko reaksi demam yang dapat diterima oleh pasien apabila diinjeksi dengan suatu sediaan farmasi. Sampai saat ini, substansi pirogenik yang diketahui paling aktif dan paling sering mencemari sediaan farmasi adalah endotoksin; selain itu masih banyak substansi pirogenik lainnya seperti bakteri, fungi, DNA—RNA virus dan lain-lain.

Uji pirogenitas biasanya menggunakan kelinci. Pengujian ini ditetapkan di USP pertama kali pada tahun 1942 dan merupakan pengujian resmi untuk menentukan non-pirogenitas sediaan farmasi. Dengan demikian lebih dari 40 tahun perusahaan farmasi telah melakukan pengujian pirogenitas dengan menggunakan kelinci.

Sejak diketahui bahwa endotoksin ternyata mampu menggumpalkan sel darah Limulus, kemudian dikembangkan suatu pengujian untuk mendeteksi adanya endotoksin dengan menggunakan reagensia yang dibuat dari sel darah Limulus. Pengujian ini kemudian dikenal sebagai metode *Limulus Amebocyt Lysate* (LAL). Metode LAL merupakan pengujian *in vitro*; maka mulailah perusahaan-perusahaan melihat kemungkinan untuk menggantikan uji pirogenitas kelinci dengan metode LAL. Mulai saat itu muncullah argumentasi-argumentasi sebagai akibat perbandingan antara uji kelinci dan uji LAL. Sebagian menyatakan keuntungan-keuntungan menggunakan uji LAL dan kerugian-kerugian uji kelinci. Dilain pihak ingin mempertahankan kelinci dalam melakukan pengujian pirogenitas suatu sediaan.

UJI PIROGENITAS MENGGUNAKAN KELINCI

Uji kelinci telah lama digunakan dengan baik untuk membantu industri farmasi menguji pirogenitas sediaan farmasi. Pengujian ini pada prinsipnya merupakan injeksi intravena ke tubuh kelinci di bawah kondisi tertentu dan selanjutnya dipantau dan

dicatat temperatur 3 kelinci dalam jangka waktu tertentu.

Farmakope Indonesia menyebutkan, suatu sediaan dinyatakan memenuhi syarat, jika kenaikan suhu ketiga kelinci tidak melebihi batas tertentu; dan tidak memenuhi syarat jika total kenaikan suhu ketiga kelinci melebihi batas tertentu (lihat Tabel 1). Jika respon yang terjadi terletak di antaranya, pengujian dapat diulangi menggunakan 3 kelompok kelinci yang lain. Apabila pengujian ke empat jumlah respon melebihi 6,60° C, sediaan tersebut dinyatakan tidak memenuhi syarat.

label 1. Syarat pirogenitas sediaan

Jumlah kelinci	Sediaan uji memenuhi syarat jika jumlah respon tidak melebihi (C)	Sediaan uji tidak memenuhi syarat jika jumlah respon melebihi (C)
3	1,20	2,70
6	2,80	4,30
9	4,50	6,00
12	6,60	6,60

Walaupun terdapat variasi prosedur pelaksanaan pada berbagai Farmakope, tetapi pada prinsipnya adalah sama yaitu mencatat kenaikan suhu badan kelinci sebagai respon terhadap substansi pirogenik dalam sediaan yang disuntikkan ke tubuh kelinci.

Keuntungan pengujian ini antara lain telah lama dikenal dan digunakan untuk menguji berbagai sediaan dan terbukti memberikan hasil memuaskan. Keuntungan kedua, sensitivitas kelinci dan manusia terhadap substansi pirogenik relatif sama. Kenaikan suhu kelinci akibat substansi-pirogenik, sampai batas tertentu masih dapat diterima oleh manusia; sehingga kenaikan suhu kelinci tersebut dapat distandardisasi terhadap substansi pirogenik yang dapat diterima manusia. Bangham menyebutkan, uji kelinci menggambarkan seluruh respon farmakologis terhadap pirogen dan relevan dengan respon pada manusia.

Keuntungan ketiga dibandingkan dengan uji LAL yaitu mampu mendeteksi semua pirogen termasuk endotoksin.

Pada saat ini endotoksin diketahui merupakan pirogen yang paling kuat, namun kehadiran pirogen lain dalam suatu sediaan perlu diperhitungkan; karena manusia tidak hanya respon terhadap endotoksin saja tetapi juga pirogen yang lain. Pengujian kelinci menawarkan jasa untuk maksud tersebut dan sampai saat ini belum dapat digantikan dengan pengujian lain.

Kelemahan uji kelinci dibandingkan dengan uji Lal antara lain memerlukan pemeliharaan dan perawatan hewan dan laboratorium yang lebih intensif. Hewan harus dipelihara dalam ruangan dengan temperatur tidak jauh berbeda dengan tempat percobaan. Pemeliharaan hewan harus dilakukan dengan sebaik mungkin untuk menghindari infeksi penyakit yang dapat mengganggu percobaan atau mengacaukan interpretasi hasil. Berat badan kelinci harus dijaga jangan sampai mengalami penurunan yang berarti dalam 1 minggu menjelang digunakan. Kelemahan kedua yaitu sensitivitas dipengaruhi oleh musim, kegaduhan, kegelisahan, makanan dan lain sebagainya. Kegelisahan akan dapat menyebabkan kenaikan suhu relatif tinggi, sehingga mengacaukan interpretasi hasil. Kelemahan ketiga yaitu variabilitas biologis. Respon setiap kelinci terhadap substansi yang sama belum tentu sama, sehingga terdapat variasi kenaikan suhu pada tiap kelinci.

UJI LIMULUS, AMEBOCYT LYSATE (LAL)

Uji LAL merupakan pengujian untuk memperkirakan konsentrasi endotoksin bakteri yang mungkin ada dalam contoh bahan. Pengujian ini pada prinsipnya merupakan koagulasi protein yang ada dalam reagensia LAL oleh endotoksin. Pengujian tersebut ialah dinyatakan positif apabila terjadi pembentukan gel dan dinyatakan negatif bila tidak terjadi pembentukan gel. Pembentukan gel akan terjadi apabila kandungan endotoksin dalam contoh sediaan lebih besar daripada sensitivitas reagen yang dinyatakan dalam Endotoksin Unit per ml (EU/ml) atau ng/ml.

LAL telah digunakan secara resmi di USP XXI untuk membatasi kandungan endotoksin bakteri suatu sediaan, terutama sediaan radiofarmasi. Peranan LAL untuk membatasi kandungan endotoksin bakteri makin lama makin luas digunakan terutama untuk sediaan parenteral dan peralatan medis. Kruger (1983) melaporkan kemungkinan pemakaian metode LAL untuk pengujian berbagai bahan yang berkaitan dengan farmasi, antara lain:

- Pemeriksaan bahan baku untuk parenteral.
- Pemeriksaan air proses untuk parenteral
- Pemeriksaan elemen filter untuk eliminasi pirogen.
- Menentukan penyebab terjadinya pirogen positif.
- Untuk validasi sterilisasi *dry-heat*.
- Pengujian produk jadi.
- Radiofarmasi.
- Larutan untuk hemodialisis dan air untuk mengencerkan larutan hemodialisis (pengujian tidak diperlukan secara resmi).
- Injeksi dengan dosis tunggal lebih besar dari 15 ml.
- Infus.
- dan lain-lain.

Salah satu kelebihan menggunakan LAL dibandingkan

dengan kelinci yaitu penanganannya lebih praktis. Sebagai pengujian *in vitro*, tidak ada kesalahan/kegagalan akibat variasi biologis. Kelebihan kedua, waktu yang dipergunakan untuk melakukan pengujian lebih singkat, baik pada waktu pelaksanaan maupun waktu persiapannya. Kelebihan ketiga, ruangan yang digunakan relatif lebih kecil dan personil yang dibutuhkan relatif sedikit. Selain itu LAL mendeteksi endotoksin lebih sensitif dibandingkan kelinci. Sensitivitas LAL mencapai 0,01 — 0,04 ng/ml atau lebih kecil.

Jika dibandingkan dengan uji kelinci, LAL mempunyai beberapa kelemahan antara lain: LAL hanya mendeteksi endotoksin dan tidak mampu mendeteksi pirogen eksogen yang lain seperti virus, fungi, bakteri dan lain-lain. Selain itu LAL tidak dapat digunakan untuk memeriksa beberapa sediaan secara langsung, seperti

- Sediaan yang tidak dapat dinetralkan menjadi pH 6—7, 5 misalnya potasium kanrenoate.
- Sediaan yang mengandung zat-zat penghambat pembentukan gel misalnya konsentrasi Ca^{2+} tinggi, tetrasiklin, streptomisin, polimisin, kloramfenikol, penisilin semisintetik, sitrat, fosfat dan lain-lain.

Untuk melakukan pemeriksaan bahan-bahan tersebut dengan LAL, memerlukan beberapa *pretreatment* yang berfungsi menghilangkan gangguan-gangguan yang ada. Perlakuan tersebut antara lain dengan pengenceran atau filtrasi.

SENSITIVITAS LAL

Di USP XXI, batas kandungan endotoksin bakteri *Water for Injection (WFI)* ditetapkan 0,25 EU/ml. Kadar endotoksin di sini tidaklah untuk disamakan dengan jumlah endotoksin dalam air tersebut, melainkan daya kerja endotoksin dalam organisme. Setiap endotoksin bakteri mempunyai daya kerja yang berbeda-beda, misalnya batas ambang endotoksin pada manusia dan kelinci untuk *Salmonella typhosa* antara 0,1 — 1,0 ng/kg berat badan, sedangkan untuk *Pseudomonas* lebih besar dari 50 ng/kg BB. Adanya berbagai jenis endotoksin dengan aktivitas yang berbeda, dapat menyebabkan kesulitan.

LAL mampu mengkonversikan dari berbagai endotoksin bakteri ke dalam satuan tertentu. Di USA telah dibuat suatu satuan endotoksin, yaitu Endotoksin Unit (EU). Ada 2 macam EU yaitu EC-2 dan EC-5, di mana 1 EU mempunyai potensi setara dengan 0,2 ng EC-2 dan 0,1 ng EC-5.

Sensitivitas LAL ditetapkan sebagai konsentrasi endotoksin paling rendah yang mampu menimbulkan terbentuknya gel. Sensitivitas LAL ada bermacam-macam dan telah distandarisasi sesuai dengan potensi endotoksin standar.

Sediaan parenteral perlu dibatasi kandungan endotoksinnya. Untuk menentukan batas endotoksin suatu sediaan kita harus memperhitungkan jenis sediaan tersebut, cara pemberiannya, dan besar dosis yang diberikan. Batas endotoksin suatu sediaan parenteral telah ditetapkan sesuai dengan rumus K/M, sama dengan jumlah endotoksin (dalam EU) per mg atau ml sediaan. K, selain yang diberikan secara intrateka sama dengan 5,0 EU/kg; untuk sediaan yang diberikan secara intrateka K = 0,2 EU/kg. M adalah dosis kelinci atau dosis manusia maksimum per kg diberikan sekali dalam periode 1jam.

Apabila melakukan uji LAL, perlu memilih sensitivitas lisat dengan tepat, sehingga memberikan hasil sesuai yang kita

harapkan. Bickel dan Meyer (1982) menerangkan cara memilih lisat, yaitu berdasarkan pada dosis kelinci atau dosis manusia.

• Berdasarkan dosis manusia

Memilih lisat berdasarkan batas ambang endotoksin yang dapat diterima manusia pada saat sediaan diberikan. Misalnya larutan infus yang diberikan pada manusia dengan volume 1000 ml per orang. Dosis ambang endotoksin paling kuat pada manusia $0,5 \text{ ng/kg} = 25 \text{ ng/orang}$ (diambil berat rata-rata orang Indonesia 50 kg). Reaksi pirogenik akan dapat terjadi apabila larutan tersebut mengandung 25 ng endotoksin atau 0,025 ng/ml. Untuk mendeteksi batas kandungan endotoksin tersebut diperlukan lisat dengan sensitivitas setidaknya 0,025 ng/ml.

• Berdasarkan dosis kelinci

Di sini memilih lisat berdasarkan pada batas ambang endotoksin yang dapat diterima kelinci ketika dilakukan pengujian kelinci. Larutan yang sama, bila dilakukan pengujian kelinci, disuntikkan 10 ml/kg **BB**. Apabila kelinci beratnya 3 kg maka diperlukan volume 30 ml. Batas ambang endotoksin EC-2 pada kelinci $1 \text{ ng/kg} = 3 \text{ ng/kelinci}$. Reaksi pirogenik pada kelinci akan terjadi apabila dalam larutan 30 ml tersebut mengandung 3 ng atau 0,1 ng/ml. Untuk mendeteksi kandungan endotoksin tersebut memerlukan lisat dengan sensitivitas setidaknya 0,1 ng/ml.

BATAS ENDOTOKSIN DALAM AIR DAN BAHAN BAKU

Di atas telah diuraikan tentang cara menentukan batas endotoksin yang ada dalam sediaan jadi dan cara memilih lisat sesuai dengan batas endotoksin yang telah ditentukan. Kemudian yang perlu diketahui adalah cara supaya suatu sediaan jadi mengandung endotoksin sedikit mungkin. Untuk tujuan tersebut perlu diketahui sumber-sumber endotoksin dan membatasi endotoksin dalam sumber tersebut. Sumber endotoksin antara lain berasal dari air baku dan bahan baku, wadah atau pembungkus primer, proses produksi dan lain-lain. Untuk membatasi kandungan endotoksin dalam sediaan jadi, perlu ditetapkan batas endotoksin dalam setiap sumber. Sebagai contoh, larutan infus mengandung glukosa 10% dengan volume 1000 ml. Larutan tersebut kira-kira terdiri dari 100 gr glukosa dan 900 ml air (WFI). Dalam 1000 ml larutan tersebut tidak boleh mengandung endotoksin melebihi dosis ambang manusia, misal 25 ng ($0,5 \text{ ng/kg BB}$). Jika menggunakan batas endotoksin WFI 0,25 EU/ml EC-2 ($0,05 \text{ ng/ml}$), maka larutan tersebut dapat mengandung endotoksin 45 ng ($900 \times 0,05$) yang berasal dari air (WFI). Kandungan tersebut jelas melebihi batas dosis ambang manusia; oleh sebab itu walaupun batas endotoksin WFI di USP disebut 0,25 EU/ml, sering dianjurkan menggunakan batas 0,01 ng/ml. Dengan batas ini larutan tersebut dapat mengandung endotoksin 9 ng yang berasal dari air. Apabila batas ambang manusia misalnya 25 ng, maka endotoksin yang diperbolehkan dari sumber lain yaitu $25 \text{ ng} - 9 \text{ ng} = 16 \text{ ng}$. Bila sumber yang diperhatikan hanya glukosa, maka bahan tersebut boleh mengandung endotoksin 16 ng/

$100 \text{ gr} = 0,16 \text{ ng/gr}$.

Contoh di atas baru melibatkan sumber endotoksin yang berasal dari air baku dan bahan baku; di dalam praktek masih ada sumber-sumber kontaminasi endotoksin yang lain, yang menyebabkan meningkatnya kandungan endotoksin sediaan jadi.

PENUTUP

Pirogen merupakan substansi yang mampu menginduksi demam. Istilah pirogen tidak menunjukkan golongan substansi tertentu dan diukur berdasarkan efek fisiologis yang diinduksi oleh berbagai substansi.

Dalam masalah endotoksin, LAL berperan untuk mengontrol kualitas setiap bahan baku dan batas kandungan endotoksin setiap bahan dapat ditetapkan, begitu pula batas kandungan.. endotoksin setiap tahap selama proses juga dapat ditentukan.

Kontaminasi substansi pirogenik selain dari bahan baku, juga dapat berasal dari berbagai sumber, di mana pada akhirnya substansi pirogenik dan endotoksin yang berasal dari berbagai sumber tersebut akan terakumulasi dalam sediaan jadi. LAL dapat digunakan untuk mendeteksi endotoksin, tetapi tidak dapat digunakan untuk memutuskan bahwa sediaan tersebut tidak menimbulkan kenaikan suhu yang berarti setelah disuntikkan.

Satu-satunya cara yang telah diketahui untuk mendeteksi substansi pirogenik termasuk endotoksin adalah uji pirogenitas dengan menggunakan kelinci. Pengujian ini akan merekam semua efek fisiologis dan menggambarkan responfarmakologis berbagai substansi pirogenik, sehingga akan mencerminkan respon yang akan terjadi bila sediaan tersebut disuntikkan pada manusia.

Dengan demikian dapat dikatakan, setiap pengujian baik pengujian dengan kelinci maupun pengujian LAL mempunyai kelebihan dan kekurangan. Apabila ditempatkan pada bagaiannya keduanya akan dapat saling melengkapi. LAL mampu membatasi kandungan endotoksin sebagai substansi pirogenik yang kuat, sedangkan pengujian kelinci mampu merangkum akumulasi berbagai substansi pirogenik.

KEPUSTAKAAN

1. Bickel H and Meyer KH, Application of the LAL-test within the scope of Inprocess controls with regard to Quantitative Aspects, Drug Made in German, 1982; 25 (3) : 105-108.
2. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Farmakope Indonesia, 3rd ed., Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979.
3. Kruger D, The Detection of Pyrogens with the Limulus Test, Drug Made in German, 1982; 25 (1) : 12-23.
4. Kruger D. The Limulus test in Europe, Drug Made in German, 1983; 26 (4) : 196-204.
5. McCullough KZ; Pyrogen Testing, Pharmaceutical Engineering, 1987; 7 (5) : 35-36.
6. The United State Pharmacopeia, 20 th revision, US Pharmacopeial convention, Inc. Rockville, 1979.
7. Weary M. Pyrogen Testing with the Limulus Amoebocyte Lysate Test, Pharm Int, 1986; (4) : 99-102.