

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 LATAR BELAKANG

Bacterial Vaginosis (BV) merupakan infeksi pada vagina yang paling sering terjadi pada wanita produktif. Kondisi ketidakseimbangan antara *Lactobacillus* (Flora vagina) dan patogen menyebabkan BV (Mohanty et al., 2023). Umumnya BV ditandai dengan keputihan yang umum terjadi, bau yang tidak sedap, dan pH vagina yang meningkat >4,5 (Permana et al., 2023). Telah dilaporkan prevalensi BV secara global berkisar antara 23%-29% sedangkan di Asia termasuk Indonesia diketahui sebesar 32% (Peebles et al., 2019). Hal ini dihubungkan dengan berbagai masalah kesehatan yang berbahaya bagi perempuan, seperti kelahiran prematur, penyakit radang panggul, peningkatan risiko HIV dan infeksi menular seksual lainnya. (Abbe & Mitchell, 2023; Muzny & Sobel, 2022).

Salah satu Penyebab utama dari BV adalah *Escherichia coli*, bakteri anaerob fakultatif gram negatif yang bermigrasi dari usus bagian bawah ke vagina. Pada kondisi normal, tubuh memiliki perlindungan alami melalui *Lactobacillus* yang memproduksi senyawa diantaranya asam laktat, hidrogen peroksida dan bakteriosin. lapisan epitel mukosa vagina berperan melindungi terhadap masuknya *Escherichia coli* ke vagina (Mohanty et al., 2023; Singh et al., 2014). Namun, lapisan epitel vagina dapat rusak akibat pola makan yang buruk, kadar hormon yang rendah, ketidakseimbangan mikrobiota dan hubungan seksual yang berlebihan. Bisa dibayangkan bahwa infeksi saluran kemih mungkin terjadi pada wanita pengidap BV. Sebagian besar infeksi saluran kemih disebabkan oleh *Escherichia coli*. Pada laporan yang lainnya penyebab BV terjadi karena *Staphylococcus aureus* (Baig et al., 2022; Loquet et al., 2021; Permana et al., 2023).

Menurut pedoman internasional, pengobatan BV salah satu yang paling umum digunakan adalah Clindamycin. Clindamycin merupakan antibiotik yang paling disukai pada pengobatan BV karena memiliki spektrum luas terbukti dan memiliki kemampuan yang sangat baik untuk melawan bakteri dan efektif dibandingkan antibiotik lain untuk pengobatan BV. Dosis yang direkomendasikan sebanyak 2% clindamycin (5 gr sediaan mengandung sekitar 100 mg) diberikan selama 3 atau 7 hari berturut-turut. clindamycin memiliki kasus kejadian efek samping yang lebih rendah dibandingkan dengan jenis antibiotik yang lain untuk pengobatan BV (Kondapalli, 2023; Tomás et al., 2020). Clindamycin untuk terapi BV tersedia dalam bentuk sediaan oral dan intravaginal (Mauck et al., 2023). sediaan oral telah dilaporkan memiliki beberapa efek samping yang merugikan seperti mual, muntah, diare dan reaksi alergi (Paradis et al., 2020). Krim dan ovula merupakan contoh sediaan intravaginal. Secara konvensional, krim merupakan



ring digunakan untuk pemberian topikal karena memiliki daya sebar
 enimbulkan ketidaknyamanan pada saat penggunaannya karena
 < mineral. Selain itu, untuk penggunaan ovula menimbulkan
 n masalah alergi pada pasien (Jones & Harmanli, 2010; Muzny &
 t al., 2019).

Pengobatan BV dikaitkan dengan kepatuhan pasien menggunakan obat. Ketidakepatuhan terhadap penggunaan antibiotik berpotensi menyebabkan resistensi, yang berdampak buruk terhadap pasien dan mengakibatkan berkurangnya jumlah antibiotik yang efektif. Salah satu hambatan kepatuhan pada pengobatan secara intravaginal adalah karena masalah karakteristik produk seperti sulitnya penggunaan obat, keharusan untuk menggunakan kembali aplikator, dan batasan gaya hidup (Muzny & Kardas, 2020). Oleh karena itu, untuk meningkatkan efektivitas antibakteri dalam pengobatan BV, menghindari efek samping dan meningkatkan kepatuhan pasien, bentuk sediaan gel dapat menjadi solusi karena memberikan efek langsung pada lokasi target dan kenyamanan pada saat penggunaan. Sebelumnya, telah dilakukan sejumlah penelitian terkait pengembangan sistem penghantaran clindamycin secara lokal (Gupta & Sharma, 2011; Khatlab & Nattouf, 2021; Patel & Patel, 2015).

Sebagai alternatif, formula gel lebih baik dibandingkan formulasi krim karena memiliki sifat tidak lengket dan proses pembuatan yang sederhana (Patil et al., 2019; Permana et al., 2021, 2023). Tetapi, penggunaan gel konvensional pada vagina, memiliki kekurangan yaitu waktu tinggal yang terbatas karena adanya mekanisme *self-cleaning* yang menyebabkan berkurangnya efek terapeutik yang dihasilkan, sehingga dibutuhkan aplikasi obat yang berulang kali. Untuk mengatasi masalah tersebut, *Thermosensitive-mucoadhesive hydrogel* (TMH) terintegrasi dengan *gel-flakes* dibuat menggunakan polimer *thermogelling*, yang bertransformasi dari larutan menjadi gel padat pada suhu tubuh. Hasil dari penelitian ini mengusulkan TMH dapat memberikan kontak yang lama dengan lapisan mukosa vagina, mempermudah obat mencapai target, dan efektifitas terapi. Sistem penghantaran ini telah banyak dilaporkan pada penelitian-penelitian sebelumnya (Argenta et al., 2021; Bouchemal et al., 2013; Enggi et al., 2021a; Permana et al., 2021, 2023; Soliman et al., 2017; Sulistiawati et al., 2022; Taurin et al., 2018).

Dalam penelitian ini, clindamycin terlebih dahulu dibuat ke dalam sistem *gel-flakes* sebelum formulasi TMH menggunakan gelam gum dan kitosan sebagai polimer. *Gel-flakes* memiliki bentuk seperti benang dengan struktur *polygonal*, yang memberikan keuntungan bagi clindamycin untuk sampai pada permukaan epitel vagina yang sangat terlipat, dan pelepasan obat yang terkendali (Abd Ellah et al., 2019; Permana et al., 2021, 2023). Sistem *gel-flakes* kemudian diintegrasikan dengan TMH. Dengan Polimer *thermogelling* dari TMH dapat memudahkan pasien dalam penggunaan karena wujudnya yang cair ketika diaplikasikan akan berubah menjadi gel pada suhu tubuh dan polimer *mucoadhesive* bekerja dengan meningkatkan waktu tinggal obat di vagina (Enggi et al., 2021a; Patel & Patel, 2015; Permana et al., 2021, 2023; Sulistiawati et al., 2022). Pada penelitian ini, menggunakan Pluronic[®] sebagai polimer *thermogelling* secara khusus untuk formulasi TMH. Pluronic[®] merupakan polimer non-ionik yang secara luas digunakan sebagai prekursor *thermosensitive hydrogel*. Terdapat berbagai jenis Pluronic[®]



ics[®] PF-127 dan PF-68, dipilih karena keunggulan polimer tersebut transformasi dari larutan ke gel pada suhu tertentu (Russo & Villa, 2019). Sebelumnya menjelaskan bahwa penggunaan Pluronic[®] secara reversibel memberikan sifat *thermosensitive* secara *reversible* dan kombinasi ini mendasarkan, dibandingkan penggunaan tunggal, seperti kombinasi PF68 (Wang, 2020). Kombinasi Pluronic[®] dapat meningkatkan waktu tinggal obat dan tidak bersifat toksik (Enggi

et al., 2021a; Lee et al., 2021). Penambahan hidroksipropil metilselulosa (HPMC) meningkatkan bioadhesive hydrogel pada vagina.

Berdasarkan pada pemaparan diatas, penelitian ini terbilang baru yang merancang TMH dalam mengembangkan *delivery system* clindamycin yang diintegrasikan dengan *gel-flakes* untuk meningkatkan waktu tinggal obat, pelepasan obat yang terkontrol, efektifitas antibakteri dan penggunaan yang mudah. Selanjutnya pengujian dilakukan untuk mengevaluasi TMH yang terintegrasi *gel-flakes* CDN secara *in vitro*, dan *ex vivo*.

1.2 RUMUSAN MASALAH

1. Bagaimana memformulasi *gel-flakes* yang mengandung clindamycin dengan penambahan variasi konsentrasi gellan gum dan kitosan dengan karakterisasi yang baik?
2. Bagaimana hasil evaluasi studi pelepasan dan aktivitas antibakteri secara *in vitro* dari formulasi *gel-flakes* yang terbaik?
3. Bagaimana memformulasi *thermosensitive-mucoadhesive hydrogel* yang terintegrasi *gel-flakes* clindamycin dari variasi konsentrasi polimer Pluronic® F127, F-68 (sebagai *thermogelling*) dan HPMC (sebagai *mucoadhesive*) dengan karakterisasi yang baik?
4. Bagaimana hasil evaluasi permeasi *ex vivo*, Uji HET-CAM dan Uji hemolisis dari formula *thermosensitive-mucoadhesive hydrogel* yang telah dioptimasi?

1.3 TUJUAN PENELITIAN

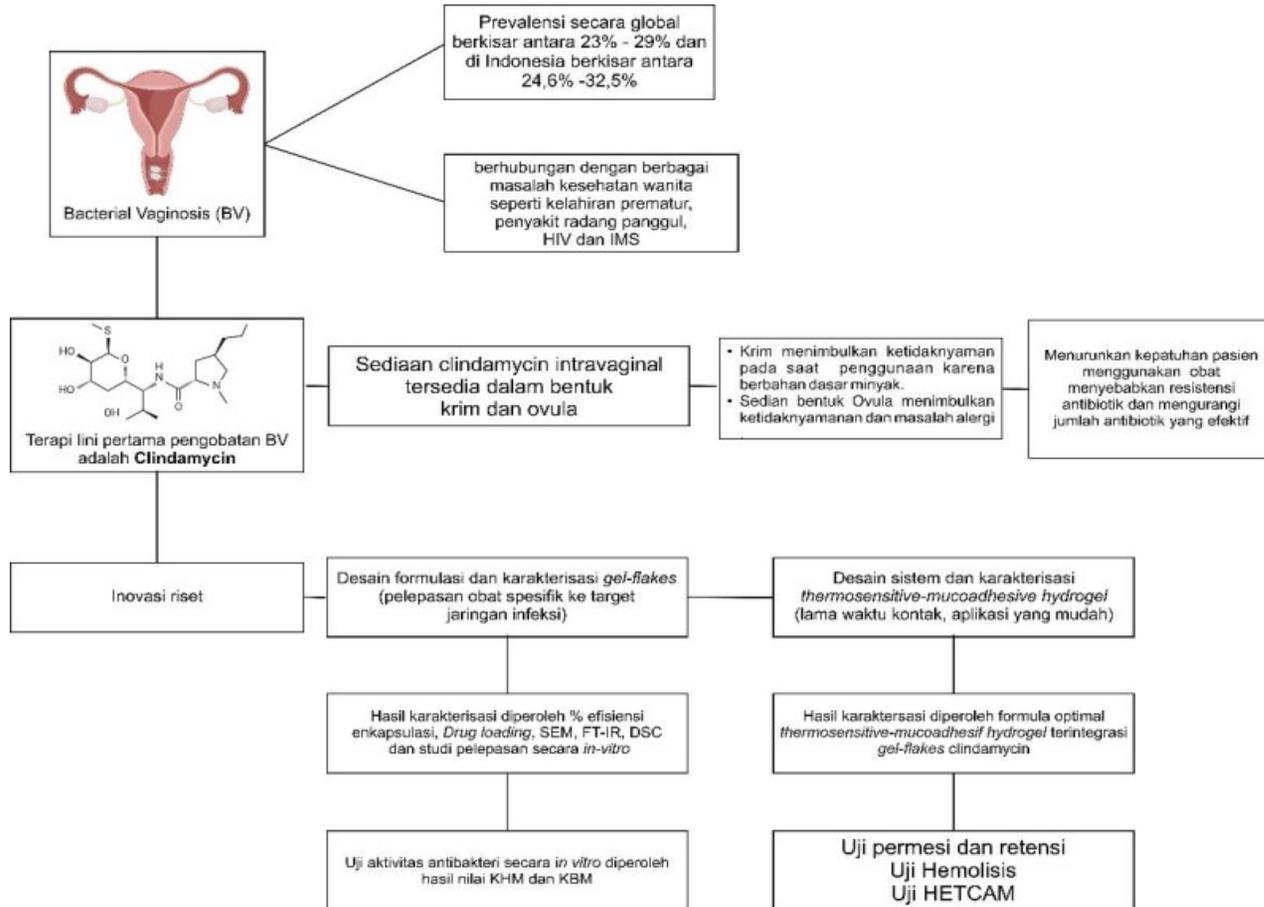
1. Mendapatkan formula terbaik *gel-flakes* yang mengandung clindamycin.
2. Mengevaluasi studi pelepasan dan aktivitas antibakteri *gel-flakes* pada pengujian secara *in vitro*.
3. Mendapatkan formula terbaik sistem *thermosensitive-mucoadhesive hydrogel* yang terintegrasi *gel-flakes* clindamycin.
4. Mendapatkan hasil evaluasi permeasi *ex vivo*, uji HET-CAM dan Uji Hemolisis dari dari formula *thermosensitive-mucoadhesive hydrogel* yang telah dioptimasi

1.4 MANFAAT PENELITIAN

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan menjadi landasan pengembangan ilmu pengetahuan di bidang kesehatan, terkhusus dalam bidang teknologi farmasi tentang pengembangan *drug delivery system* untuk pengobatan *bacterial vaginosis* (BV) yang lebih efektif dan efisien.

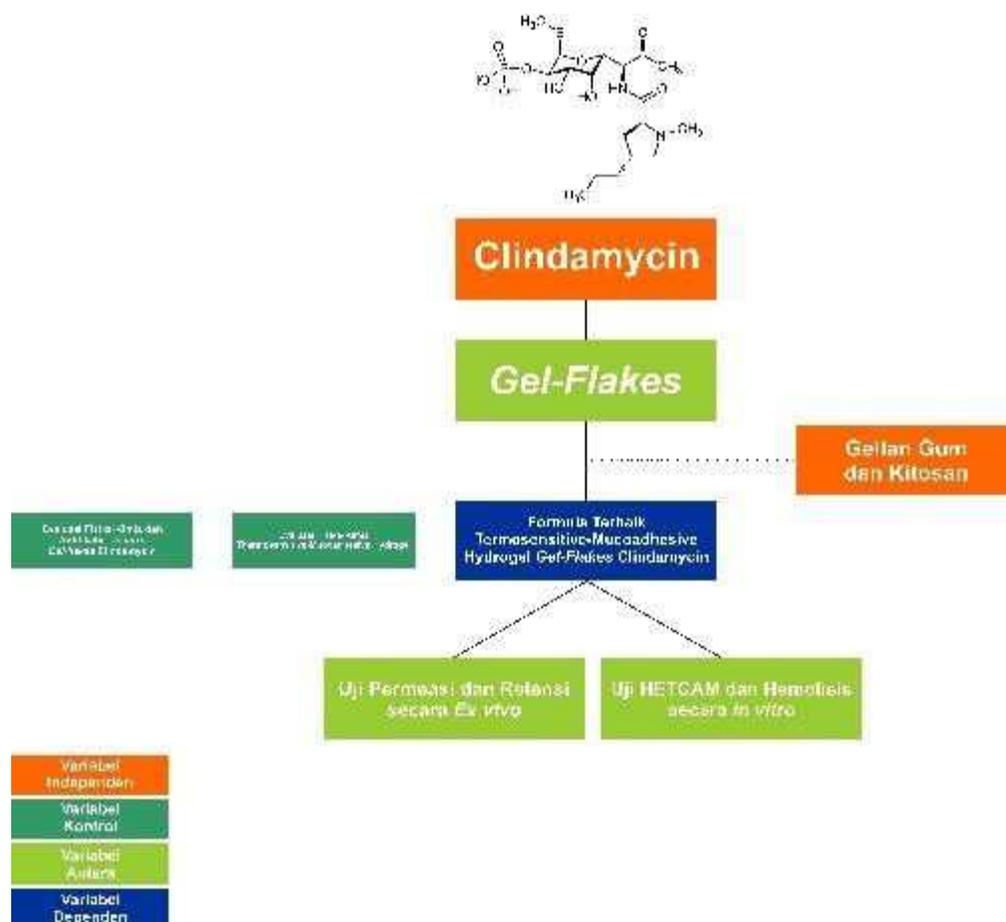


1.5. Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka Teori

1.6. Kerangka Konsep



Gambar 2. Kerangka Konsep



BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 RENCANA DAN LOKASI PENELITIAN

Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan melakukan pengembangan *drug delivery system* TMH yang terintegrasi *gel-flakes* mengandung clindamycin dengan melakukan pengujian karakterisasi formula terbaik, aktivitas antibakteri secara *in vitro*, studi pelepasan obat secara *in vitro* dan *ex vivo*, dan aktivitas antibakteri secara *in vivo*. Penelitian ini dilakukan di laboratorium farmasetika, laboratorium mikrobiologi dan laboratorium farmakologi dan toksikologi fakultas farmasi universitas hasanuddin Makassar.

2.2 ALAT DAN BAHAN

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri, centrifuge (Oregon[®] LC-04S), Desikator, Sonikator (Krisbow[®]), Instrumen FTIR, Instrumen X-RD, Mikroskop optik (Olympus[®]), Pipet mikro, Sel difusi Franz, spektrofotometer UV-Vis (Dynamica[®] HALO XB-10), Timbangan analitik (Sartorius[®]) dan alat-alat gelas (Pyrex[®]).

Bahan-bahan yang digunakan adalah Clindamycin Phosphate, Aquadest (Waterone[™]), Gellan Gum, Kitosan, Pluronic[®] 127, Pluronic[®] 68, PBS pH 7,4, HPMC, *Tryptic Soy Agar*, *Tryptic Soy Broth*.

2.3 METODE KERJA

2.3.1. Metode Analisis Clindamycin

2.3.1.1. Pembuatan Cairan Vagina Buatan

Cairan vagina buatan (CVB) dibuat dengan ditimbang sebanyak 5 g glukosa, 3,5 g NaCl, 2 g asam laktat, 1,4 g KOH, 1 g asam asetat, 0,4 g urea, 0,222 g Ca(OH)₂, 0,018 g serum albumin, dan 0,016 g gliserin lalu dilarutkan dalam 1 L aquades kemudian diaduk hingga pH mencapai 4,2-4,3 dengan penambahan HCL 0,1 N (Sanz et al., 2018).

2.3.1.2. Pembuatan Larutan Stok

Larutan stok CDN dibuat untuk penentuan panjang gelombang maksimum. Larutan stok clindamycin 1000 ppm dibuat dengan diambil 10 mg clindamycin selanjutnya dimasukkan ke labu tentukur 10 mL dan dicukupkan menggunakan PBS pH 7,4 sampai tanda batas.

2.3.1.3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Clindamycin dalam Phosphate

Buffer Saline (PBS) pH 7,4

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara mengukur serapan larutan clindamycin 100 ppm pada panjang gelombang 200-400 nm hingga diperoleh panjang gelombang maksimum. Larutan stok clindamycin dengan 1 diencerkan hingga mencapai 100 ppm. Setelah itu, serapan diukur ofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm. Panjang n ditentukan dari serapan pada sampel.



2.3.1.4. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Clindamycin (CDN) dalam Cairan Vagina Buatan (CVB)

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan cara mengukur serapan larutan CDN 250 ppm pada panjang gelombang 200-400 nm hingga diperoleh pada panjang gelombang maksimum. Larutan stok clindamycin dengan konsentrasi 1000 ppm kemudian diencerkan hingga mencapai 250 ppm menggunakan CVB. Selanjutnya, serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm. Panjang gelombang maksimum ditentukan dari serapan pada sampel.

2.3.1.5. Penentuan Kurva Baku Clindamycin (CDN) dalam PBS pH 7,4

Kurva baku CDN dalam PBS pH 7,4 diukur dengan melakukan pengenceran sebanyak 5 konsentrasi 6,25, 12,5, 25, 50, 100 ppm dari larutan stok CDN 1000 ppm dan perhitungan pengenceran dapat dilihat pada **Lampiran 2**. Masing-masing konsentrasi dicukupkan menggunakan PBS pH 7,4 lalu diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 217 nm. Selanjutnya dibuat kurva baku hubungan antara serapan terhadap konsentrasi.

2.3.1.6. Penentuan Kurva Baku Clindamycin (CDN) dalam Cairan Vagina Buatan (CVB)

Kurva baku CDN dalam CVB diukur dengan melakukan pengenceran sebanyak 5 konsentrasi 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250 ppm dari larutan stok CDN 1000 ppm dan perhitungan pengenceran dapat dilihat pada **Lampiran 2**. Masing-masing konsentrasi dicukupkan dengan CVB lalu diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 232.2 nm. Selanjutnya dibuat kurva baku hubungan antara serapan terhadap konsentrasi.

2.3.2. Formulasi *Gel-flakes* Clindamycin (CDN)

Tabel 1. Komposisi Formula gel-flakes yang mengandung Clindamycin (%b/b)

Senyawa	F1	F2	F3	F4	F5
Clindamycin	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Gellan gum	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
Kitosan	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
Aquadest hingga	100	100	100	100	100

Formula *gel-flakes* yang mengandung CDN dibuat dengan menggunakan teknik *dropwise*. Gellan gum ditimbang (**tabel 1**) dan diaduk menggunakan stirrer dalam 50 mL aquades selama 15-20 menit pada suhu mendidih. Setelah itu, larutan gellan gum didinginkan pada suhu ruang. Selanjutnya, CDN dilarutkan ke dalam larutan gellan gum sampai homogen. pada tempat yang berbeda sejumlah kitosan diambil dan dilarutkan ke dalam larutan asam asetat 1%. Campuran larutan gellan gum dan CDN yang diperoleh m 50 mL larutan kitosan (dalam larutan asam asetat 1%) dengan shan dan diaduk dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 25 °C b).



2.3.3. Karakterisasi *Gel-Flakes* Clindamycin (CDN)

2.3.3.1. Efisiensi Enkapsulasi (EE)

CDN dalam polimer pembentuk *gel-flakes* dianalisis dengan menggunakan metode tidak langsung. Pada fase cair pada formula terlebih dahulu dilewatkan menggunakan filter membran 0,2 μm . Selanjutnya, Clindamycin bebas dalam filtrat dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 217 nm. Nilai EE dihitung dengan 3 replikasi menggunakan persamaan di bawah:

$$\%EE = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100$$

Dimana W_1 adalah konsentrasi clindamycin dalam formula dan W_2 adalah konsentrasi Clindamycin yang terdeteksi dalam filtrat.

2.3.3.2. Drug Loading (DL)

Sebelum dilakukan Penentuan kapasitas pemuatan obat (DL) dari *gel-flakes* terlebih dahulu formula dikeringkan pada suhu 37°C. Selanjutnya *gel-flakes* CDN yang telah dikeringkan ditimbang 25 mg dan dilarutkan ke dalam 50 mL aquadest. Setelah itu, formula disonikasi selama 20 menit. Selanjutnya campuran kemudian disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 7000 rpm. Supernatant diambil dan konsentrasi CDN diukur dengan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 217 nm. DL dihitung dengan 3 replikasi menggunakan persamaan:

$$\%DL = \frac{\text{Jumlah Clindamycin yang terdeteksi}}{\text{Berat teoritis}}$$

2.3.3.3. Analisis Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)

Analisis FT-IR dilakukan untuk mengetahui kemungkinan terjadinya interaksi antara clindamycin dan polimer (gellan gum dan kitosan) yang digunakan untuk formulasi *gel-flakes*. Pada awalnya formula *gel-flakes* dikeringkan pada suhu 37°C. Selanjutnya CDN murni, gellan gum, kitosan dan *gel-flakes* CDN yang telah dikeringkan dianalisis pada suhu 25°C dengan resolusi 4,0 cm^{-1} antara 400 dan 4000 cm^{-1} menggunakan 32 scan.

2.3.3.4. Studi Pelepasan Secara *in vitro* *gel-flakes*

Studi pelepasan *in vitro* *gel-flakes* yang mengandung CDN dan clindamycin murni menggunakan cairan vagina buatan (CVB). *Gel-flakes* kering dan CDN murni (setara dengan 50 mg clindamycin) dimasukkan ke dalam membran dialisis ditambahkan ke dalam botol durhan yang berisi 100 mL CVB, 1 mL sampel dicuplik pada interval waktu yang telah ditentukan (0,5 jam, 1 jam, 2 jam, 3 jam, 4 jam, 5 jam, 6 jam, 7 jam, 8 jam dan 24 jam) dan diganti dengan CVB segar dengan volume yang sama. Pengujian ini dilakukan pada suhu 37°C dengan kecepatan 100 rpm. CDN yang dilepaskan dan terlarut pada CVB selanjutnya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 217 nm.



Selanjutnya model kinetika pelepasan dianalisis, dengan meter yang relevan, menggunakan Excel® (Microsoft Corporation, *d-in-DDSolver* untuk memodelkan data pelepasan obat dengan orde pertama, Higuchi, Korsmeyer-Peppas dan Hixson Crowell. an dengan tiga replikasi (Roska et al., 2022).

2.3.4. Penentuan Aktivitas Antibakteri Secara In Vitro

2.3.4.1. Kultur Bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) dan *Staphylococcus Aureus* (*S. aureus*)

Bakteri ditumbuhkan dalam media *Tryptic Soy Agar* (TSA) selama 24 jam pada suhu 37°C. isolat dari bakteri diambil dan disuspensikan ke dalam aquades yang telah disterilkan. Sebelum dilakukan pengujian antibakteri, suspensi bakteri dikalibrasi dengan konsentrasi 1.5×10^8 CFU/ml yang setara dengan 0.5 *mcFarland*.

2.3.4.2. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bakterisida Minimum (KBM)

Pada pengujian ini metode mikrodilusi digunakan untuk menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bakterisida minimum (KBM) dari *gel-flakes* clindamycin dan clindamycin murni. Sebelumnya, larutan stok *gel-flakes* clindamycin dan clindamycin murni disiapkan. Penelitian dilakukan dengan menggunakan 96 *well plate* steril, selanjutnya menambahkan 100 μ L preparat sampel pada konsentrasi bervariasi, dimulai dari konsentrasi 200 μ g/mL dan dilakukan pengenceran bertingkat dengan menambahkan 100 μ L aquadest yang telah disterilkan. Media yang digunakan pada pengujian ini adalah *Tryptic Soy Broth* (TSB). TSB ditambahkan pada *microplates* yang selanjutnya diikuti penambahan suspensi bakteri setara 0,5 *mcFarland* hingga mencapai konsentrasi akhir pada total volume $1,5 \times 10^6$. Penggunaan media tanpa sampel dan bakteri bertujuan sebagai kontrol negatif dan media yang ditambahkan dengan bakteri digunakan sebagai kontrol positif. Kemudian, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. konsentrasi hambat minimal (KHM) ditentukan dengan menganalisis kekeruhan yang terjadi pada media, dimana perubahan media pada konsentrasi terkecil ditentukan sebagai nilai KHM. Sedangkan untuk mengetahui KBM pada sampel dan obat, 20 μ L sesuai KHM dan konsentrasi di atas KHM dikultur pada cawan petri yang berisi medium TSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. KBM ditentukan sebagai konsentrasi di mana 99,9% bakteri mati, atau tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media (Nurul et al., 2022).

2.3.5. Pengembangan formulasi *Thermosensitive-Mucoadhesive Hydrogel* (TMH) terintegrasi *Gel-flakes* Clindamycin (CDN)

Tabel 2. Komposisi formula awal TMH awal yang mengandung *gel-flakes* Clindamycin (%b/b)

Senyawa	F1	F2	F3	F4	F5
<i>Gel-flakes</i> (Clindamycin Phosphate)	1	1	1	1	1
Pluronic® F127	12	14	16	18	20
Pluronic® F68	2	3	4	5	6
Clindamycin	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
hingga	100	100	100	100	100



Tabel 3. Komposisi formula terbaik TMH yang mengandung *gel-flakes* Clindamycin (%b/b)

Senyawa	F1	F2	F3	F4	F5
<i>Gel-flakes</i> (Clindamycin Phosphate)	1	1	1	1	1
Pluronic® F127	16	16	16	16	16
Pluronic® F68	4	4	4	4	4
HPMC	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Aquades hingga	100	100	100	100	100

TMH dibuat dalam lima formula dengan penambahan variasi konsentrasi mengandung kombinasi polimer Pluronic® F127 dan Pluronic® F68 sebagai polimer *thermogelling*, dan HPMC sebagai polimer *bioadhesive*. Bahan-bahan disiapkan dengan menggunakan timbangan analitik dapat dilihat pada **Tabel 3**. TMH diformulasi menggunakan *cold method*. Pluronic® F127 dan Pluronic® F68 dilarutkan di dalam beaker berisi *aquades* dingin (5°C) dan diaduk pada suhu 20°C, dan didiamkan hingga memperoleh larutan jernih. selanjutnya HPMC ditambahkan ke dalam larutan campuran pluronic® dan diaduk hingga homogen dan disimpan pada suhu 5°C selama 24 jam. Setelah itu *gel-flakes* CDN ditambahkan ke dalam polimer *thermosensitive-mucoadhesive* hydrogel dan diaduk dengan kecepatan 200 rpm selama 30 menit (Permana et al., 2023).

2.3.6. Karakterisasi *Thermosensitive-Mucoadhesive Hydrogel* (TMH) yang terintegrasi *gel-flakes* Clindamycin (CDN)

2.3.6.1. Organoleptis

Formula TMH yang terintegrasi *gel-flakes* clindamycin yang diformulasi diamati bentuk fisik melalui tekstur, warna, homogenitas secara langsung.

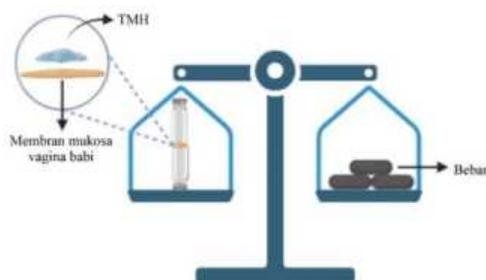
2.3.6.2. Penentuan Suhu Gelasi

Penentuan suhu gelasi dilakukan dengan menggunakan *tube inverting method*. Formula diambil sebanyak 2 mL ditempatkan ke dalam vial dan disimpan pada suhu 4°C. selanjutnya, vial direndam pada air suhu 20°C yang dipanaskan menggunakan *waterbath* dan suhu dinaikkan secara berkala 1°C. suhu gelasi formula dicatat ketika gel berhasil terbentuk dan tidak ada formula yang mengalir secara bebas ketika vial dibalik 90° selama 30 detik. Selain itu formula juga diencerkan menggunakan CVB dan dilakukan uji seperti diatas kemudian dievaluasi dalam 3 replikasi (Permana et al., 2023).

2.3.6.3. Uji Kekuatan *Bioadhesive*

Mukosa vagina babi ditempatkan diantara 2 vial (atas dan bawah), selanjutnya 1 g TMH *gel-flakes* CDN dari tiap formula diletakkan diantara mukosa vagina yang digantung pada sisi kiri neraca. Pada sisi kanan neraca, beban 1 g diletakkan setiap 30 detik diatas hingga permukaan kedua vial terpisah. Tiap pengujian dilakukan 3 replikasi (Permana et al., 2021).





Gambar 3. Skema uji *Bioadhesive* pada neraca timbangan yang dimodifikasi (Biorender.com)

2.3.6.4. Uji pH

Uji pH TMH *gel-flakes* CDN dianalisis menggunakan alat pH meter pada suhu 25°C, dengan cara elektroda pada alat pH meter dicelupkan ke dalam formula TMH dan didiamkan selama 2 menit sampai hasil pengukuran tidak berubah pada alat. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali replikasi (Cunha et al., 2021).

2.3.6.5. Uji Viskositas

Uji Viskositas dianalisis menggunakan alat viskometer *Brookfield*. Pada pengujian ini secara khusus, dilakukan dalam tiga kondisi berbeda digunakan untuk mengukur viskositas formula, yaitu suhu penyimpanan (4°C), suhu ruang (25°C) dan suhu fisiologi atau suhu saat telah diaplikasikan (37°C). Pengujian ini dilakukan sebanyak tiga replikasi dengan menggunakan spindel 07 dengan kecepatan 50 rpm (Roska et al., 2022).

2.3.6.6. Reologi

Pada uji ini alat yang digunakan adalah viskometer *Brookfield*. Formula TMH *gel-flakes* CDN dianalisis pada suhu 25°C dengan menggunakan spindel no 7 pada kecepatan 5, 10, 20, 50, dan 100 rpm. Hasil evaluasi reologi dicatat pada setiap kecepatan. Selanjutnya semua hasil pengukuran dimasukkan pada *graph-pad* untuk membuat grafik, sehingga dapat diamati jenis aliran dari formula TMH *gel-flakes* CDN (Enggi et al., 2021a).

2.3.6.7. Uji Erosi

Uji erosi dilakukan dengan tiap formula uji ditimbang sebanyak 5 g dan dimasukkan ke dalam botol vial. Selanjutnya sebanyak 2 mL CVB dengan suhu 37°C dimasukkan juga ke dalam vial. Vial yang berisi formula uji ditambah dengan CVB kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu 37°C. setelah itu interval waktu yang telah ditetapkan (0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; dan 24 jam), larutan CVB diganti dengan larutan CVB segar. Formula yang tersisa dalam botol vial selanjutnya ditimbang. Nilai uji erosi formula

rhitungan *Weight Loss* (Enggi et al., 2021b).



$$\text{Weight Loss} = \frac{\text{Bobot Awal} - \text{Bobot Akhir}}{\text{Bobot Awal}}$$

2.3.6.8. Penyiapan Mukosa Vagina Babi

Penyiapan dari mukosa vagina babi dilakukan dengan cara melakukan pembedahan dan dibilas dengan air mengalir, selanjutnya mukosa vagina babi yang didapatkan ditempatkan pada wadah tertutup rapat dan didinginkan pada suhu -20°C sampai ke tahap penelitian selanjutnya (Sam et al., 2024).

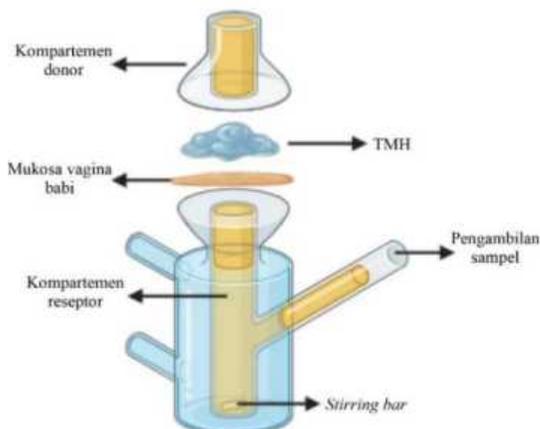
2.3.6.9. Analisa kandungan obat

Untuk analisa kandungan clindamycin pada formulasi TMH *gel-flakes* CDN dianalisis dengan cara diambil sebanyak 100 mg tiap formula, dilarutkan dalam 10 mL metanol dan disonikasi selama 1 jam. Selanjutnya formula dalam metanol disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 7000 rpm. selanjutnya Konsentrasi CDN yang ada pada formula dalam metanol dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 232 nm dengan tiga replikasi (Sulistiawati et al., 2022).

2.3.7. Studi Permeasi *Ex Vivo*

Terlebih dahulu diawal dilakukan formulasi formula pembanding. Formulasi krim intravaginal clindamycin 2% diawali dengan preparasi fase minyak dan air dengan cara fase minyak (asam stearat, stearil alkohol dan span 60) dimasukkan ke dalam beaker, dilebur diatas *waterbath* kemudian ditambahkan *alfa-tokoperol* dan Propill paraben diaduk hingga homogen. Fase air (Tween 60, benzil alkohol, propilenglikol dan aquades) dimasukkan ke dalam gelas beaker selanjutnya ditambahkan metil paraben. Fase minyak yang sudah melebur dituang dalam mortir hangat, diaduk sampai homogen. fase air ditambahkan sedikit demi sedikit sambil dilakukan pengadukan secara cepat hingga terbentuk massa krim. CDN dimasukkan daam kirim dan dihomogenkan (Sobel et al., 2001). Kemampuan permeasi CDN secara *ex vivo* melalui mukosa vagina babi dianalisis menggunakan alat sel difusi *franz*. Sebelum uji permeasi, mukosa vagina babi dipreparasi dengan 1 mL kloroform:metanol (2:1 v/v) selama 60 menit dengan tujuan menghilangkan lipid dari mukosa vagina babi. Selanjutnya mukosa vagina babi dihidrasi menggunakan larutan PBS selama 1 jam. Kemudian CVB sebanyak 12 mL digunakan sebagai media kompartemen reseptor. Sebanyak 1 g formula diaplikasikan pada kompartemen donor. Pengujian ini dilakukan pada waktu yang telah ditentukan (0,5 jam, 1 jam, 2 jam, 3 jam, 4 jam, 5 jam, 6 jam, 7 jam, 8 jam, dan 24 jam) dengan suhu $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Selanjutnya media dicuplik sebanyak 1 mL kemudian diganti dengan media segar. Hasil cuplikan formula dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis sebanyak tiga replikasi (Permana et al., 2021).





Gambar 4. Skema sel difusi Franz uji permeasi ex vivo (dibuat menggunakan Biorender.com)

2.3.8. Uji Retensi

Pengujian retensi dilakukan 24 jam setelah uji permeasi ex vivo. Membran mukosa vagina bayi yang telah digunakan pada uji permeasi ex vivo dibilas sebanyak tiga kali dengan *aquadest* untuk menghilangkan sisa formula. Membran mukosa vagina bayi selanjutnya ditambahkan 10 mL *Tris Buffer Phosphate Saline* disonikasi selama 30 menit. Selanjutnya campuran disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 15 menit. Supernatant diambil dan dianalisis menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 217 nm dengan tiga replikasi. Hasil dari pengukuran yang didapatkan selanjutnya diolah untuk mengetahui jumlah clindamycin yang terlokalisasi setelah pemberian formula (Permana et al., 2023).

2.3.9. Pengujian *Hen's egg test-chorioallantoic membrane (HET-CAM)*

Iritasi yang dapat terjadi karena komposisi pada formula TMH gel-flakes CDN dievaluasi menggunakan uji HET-CAM. Sebelum pengujian dilakukan preparasi terlebih dahulu dilakukan dengan menyiapkan telur ayam *Leghorn* putih yang diinkubasi pada inkubator pada suhu $37 \pm 0,5$ °C dengan kelembapan $58 \pm 8\%$ selama tujuh hari. Hanya telur yang menunjukkan perkembangan embrio yang dipilih pada hari kedelapan dan disiapkan untuk uji HET-CAM setelah 24 jam. Pada bagian atas cangkang dilepas secara perlahan menggunakan bilah gergaji gigi dengan memastikan bahwa membran bagian dalam tidak rusak. Setelah mengangkat membran bagian dalam dan membran *chorioallantoic* yang sangat vaskularisasi terlihat. Selanjutnya untuk menilai iritasi permukaan seperti lisis, perdarahan, dan koagulasi pada telur dengan diberikan 0,3 ml CDN, *gel-flakes* CDN, *gel-flakes* blank, TMH *gel-flakes* CDN, dan TMH blank. Selanjutnya, diamati selama lima menggunakan sebagai kontrol positif dan NACL 0,9% digunakan sebagai kontrol negatif (Rezky et al., 2024).



2.3.10. Uji Hemolisis

Uji hemolisis dilakukan dengan terlebih dahulu mengambil eritrosit tikus. Selanjutnya plasma dari eritrosit tikus diambil dan dibilas sebanyak tiga kali menggunakan PBS. Eritrosit murni selanjutnya disuspensikan pada PBS untuk mencapai konsentrasi akhir 10%v/v. Kemudian, suspensi akhir diambil dan dimasukkan ke dalam sampel dengan beberapa variasi konsentrasi yang telah ditetapkan (500, 50, dan 5 mcg/mL). campuran diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C dan disentrifugasi selama 10 menit. Pengamatan dilakukan secara visual dan supernatan diambil kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada 264 nm (Qadri et al., 2024).

2.3.11. Analisis Data, Pembahasan dan Penarikan Kesimpulan

Data hasil penelitian didapatkan selanjutnya dianalisis menggunakan *Microsoft Excel*[®] dan diolah menjadi bentuk grafik menggunakan *GraphPad Prism*[®] V8.0. untuk memperoleh data analisis yang valid juga dilakukan menggunakan aplikasi *IBM SPSS Statistic*[®] V.2.1. Selanjutnya pembahasan akan diolah dan disusun berdasarkan hasil analisis data dan kesimpulan dari hasil pembahasan.

