BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah bagian keseluruhan subjek penelitian. Populasi pada penelitian ini adalah produk gel klindamisin dengan berbagai merek yang beredar dipasaran. Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang sudah mampu secara representatif mewakili populasi dalam penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu gel klindamisin merek X, Y, dan Z yang beredar dan dibeli di pasaran dengan kriteria mencantumkan nilai kandungan klindamisin 1% pada kemasan sediaan tersebut.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang dimuat dalam penelitian ini adalah pengujian mutu fisik dan aktivitas antibakteri gel klindamisin 1% terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi sumuran.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama diklasifikasikan dalam 3 macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu produk gel klindamisin 1% berbagai merek yang beredar di pasaran. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah mutu fisik dan diameter zona hambat pada sampel gel klindamisin yang dianalisis terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah suhu inkubasi, lama inkubasi, sterilisasi alat, media pertumbuhan, dan bakteri *Staphylococcus aureus*.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, mutu fisik sediaan adalah pengujian yang dilakukan untuk mengetahui kualitas fisik dalam sediaan gel klindamisin yang meliputi parameter organoleptis, homogenitas, pH, daya lekat, daya sebar, dan viskositas.

Kedua, aktivitas antibakteri adalah kemampuan suatu senyawa dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan daerah jernih di sekeliling sumuran yang menunjukkan adanya zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Ketiga, gel klindamisin adalah sediaan semi solid dan memiliki manfaat dalam penyembuhan infeksi bakteri sebagai obat jerawat dengan kandungan klindamisin 1% yang tertera pada kemasan produk bermerek dan diambil dengan nomor *batch* yang sama untuk setiap mereknya serta masih dalam periode penggunaan.

Keempat, bakteri *S.aureus* adalah bakteri yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi di Surakarta.

Kelima, difusi sumuran adalah suatu metode yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dalam suatu produk gel klindamisin dengan membuat lubang sumur pada media padat yang telah ditambahkan suspensi bakteri.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel gel klindamisin 1% merek X, Y, dan Z yang beredar dipasaran, *aquadest*, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), media *Nutrient Agar* (NA), media *Vogel Jhonson Agar* (VJA), media *Brain Heart Infusion* (BHI), biakan murni *Staphylococcus aureus*, H₂O₂, plasma darah, larutan standar *Mc Farland* 0,5, kapsul klindamisin 300 mg, Na CMC, koran.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pH meter, *object glass*, *extensometer*, viskometer Brookfield, neraca analitik, gelas ukur, *beaker glass*, kaca arloji, jarum ose, tabung reaksi, cawan petri, autoklaf, penggaris, jangka sorong, erlemenyer, *laminar air-flow*, pembakar spirtus, *hotplate*, spuit injeksi, *boor prof*, vortex, mikroskop, inkubator.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi Sampel

Identifikasi sampel gel klindamisin dilakukan dengan mengamati bobot, kandungan klindamisin, tanggal kadaluarsa, nomor *batch*, *manufacturing date*, nomor registrasi, dan klaim yang tercantum pada kemasan primer maupun sekunder gel klindamisin.

2. Pengujian Mutu Fisik

2.1 Organoleptis. Pengujian organoleptis dilakukan dengan cara diamati secara langsung bentuk, warna, dan bau dari sediaan gel (Nurlely *et al.*, 2021).

2.2 Homogenitas. Sediaan diamati homogenitasnya dengan cara sejumlah 1 gram sediaan gel dioleskan pada *object glass* dan diamati apakah terdapat butiran kasar atau tidak (Nurlely *et al.*, 2021).

2.3 Pengukuran pH. Pemeriksaan pH sediaan gel klindamisin dilakukan dengan pH meter. Sediaan gel klindamisin dimasukkan dalam *beaker glass* kemudian diukur pH gel klindamisin menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi menggunakan larutan dapar netral pH 7. Pengukuran pH dilakukan sebanyak tiga kali ulangan (triplo) untuk setiap sampel guna memperoleh hasil yang akurat dan dapat diandalkan (Nurlely *et al.*, 2021).

2.4 Daya Sebar. Uji daya sebar dilakukan dengan sampel gel klindamisin ditimbang sebanyak 0,5 gram dan diletakkan di atas lempengan kaca yang terdapat skala diameter, lalu ditutup dengan kaca yang lain. Beban 50 gram kemudian diletakkan diatas kaca dan dibiarkan selama 1 menit, lalu diukur diameter penyebaran gel klindamisin. Beban lain 100 g diletakkan dan diukur diameter, selanjutnya beban 150 g, 200 g, dan 300 g diletakkan secara bergantian dan diukur diameter penyebarannya pada setiap penambahan beban. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali (triplo) untuk masing-masing beban guna memperoleh nilai rata-rata daya sebar (Nurlely *et al.*, 2021).

2.5 Daya Lekat. Sampel ditimbang sebanyak 0,25 gram dan diletakkan diantara 2 buah *object glass* yang telah ditandai luasnya 4 x 2,5 cm. *Object glass* kemudian ditindih dengan beban 1 kg selama 5 menit. Beban diangkat lalu ditarik dengan beban 80 gram dan dicatat waktu yang dibutuhkan hingga kedua *object glass* terpisah. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali (triplo) untuk memperoleh nilai rata-rata waktu lekat (Nurlely *et al.*, 2021).

2.6 Viskositas. Pengujian viskositas sediaan gel klindamisin dilakukan dengan menggunakan viskometer Brookfield. Sediaan gel klindamisin dimasukkan dalam beaker glass kemudian dimasukkan spindle yang sesuai ke dalam sampel hingga mencapai batas pada spindle. Kecepatan yang digunakan yaitu 50 rpm dan waktu pemutaran diatur selama 1 menit dan dicatat hasil viskositas yang tertera pada layar alat viskometer. Setiap pengukuran viskositas dilakukan sebanyak tiga kali (triplo) pada masing-masing sampel untuk mendapatkan hasil yang akurat. (Nurlely *et al.*, 2021).

3. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan disterilkan terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan. Alat gelas (gelas ukur, *erlemeyer*, tabung reaksi, kaca aloji, dan cawan petri) ditutup lubangnya dengan kapas yang dibalut dengan kain kasa steril kemudian dibungkus dengan kertas koran dan disterilkan di dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs. Untuk alat seperti jarum ose disterilkan dengan cara pemijaran yaitu melewati alat pada nyala api bunsen (Rusli *et al.*, 2016).

4. Pembuatan Media Agar

4.1 Pembuatan Media Agar Miring. Media NA (*Nutrient Agar*) yang telah dibuat, sebanyak 5 mL dituangkan pada masing-masing pada 3 tabung reaksi steril. Media dituang dalam kondisi hangat dan bagian mulut tabung disumbat dengan kapas yang dibalut kasa steril dan disterilkan menggunakan autoklaf, kemudian dibiarkan pada suhu ruang selama 30 menit hingga memadat pada kemiringan 30-45°C. Pembuatan media dilakukan secara aseptis di *Laminar Air Flow* dan media agar miring digunakan untuk inokulum bakteri (Athallah & Sugesti, 2020).

5. Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri uji diremajakan dengan mengambil 1 ose biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan jarum ose yang telah disterilkan, kemudian digoreskan secara zig-zag pada media agar miring NA (*Nutrient Agar*). Bakteri yang sudah digoreskan pada media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, setelah diinkubasi kemudian dilakukan pembuatan suspensi bakteri (Karmilah *et al.*, 2023).

6. Pembuatan Suspensi Bakteri

Diambil 1-2 ose biakan bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah diremajakan di media NA (*Nutrient Agar*) kemudian disuspensikan dalam tabung reaksi yang berisi media BHI sebanyak 5 mL dan divortex hingga homogen, kemudian dibandingkan dengan kekeruhan standar *Mc Farland* 0,5 (10^8 CFU/mL) (Asiyah & Wulandari, 2019).

7. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Identifikasi bakteri yang dilakukan meliputi uji dengan media *Vogel Jhonson Agar* (VJA), pewarnaan Gram, uji katalase, dan uji koagulase.

7.1 Uji Pada Media Vogel Jhonson Agar (VJA). Uji pada media VJA dilakukan dengan cara biakan murni bakteri *S.aureus* diinokulasikan pada media VJA (*Vogel Jhonson Agar*) yang ditambah dengan kalium tellurite 3 tetes dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pertumbuhan koloni *S.aureus* ditandai dengan adanya warna hitam pada koloni dan medium disekitar koloni bewarna kuning (Rahayu *et al.*, 2022).

7.2 Pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengenal sifat Gram dan morfologi bakteri. Koloni yang tumbuh pada media VJA kemudian dibuat ulasan pada *object glass* lalu difiksasi diatas bunsen dan ditetesi dengan Gram A (kristal violet), dibiarkan selama 1-2 menit dan dibilas dengan air mengalir. Preparat selanjutnya ditetesi dengan Gram B (*lugol iodine*), dibiarkan kembali selama 1-2 menit dan dibilas dengan air mengalir. Ulasan kemudian ditetesi dengan larutan Gram C (alkohol-aseton), diamkan selama 5-10 detik dan dibilas dengan air mengalir. Terakhir ulasan ditetesi dengan Gram D (safranin), diamkan 1-2 menit lalu dibilas dan dikeringkan, selanjutnya dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Hasil positif *S.aureus* yaitu Gram positif dengan bentuk kokus dan bergerombol bewarna ungu (Rahayu *et al.*, 2022).

7.3 Uji Katalase. Uji katalase dilakukan untuk mengetahui aktivitas katalase pada bakteri yang diuji. Langkah pengujiannya bakteri dibiakkan pada media cair *Brain Heart Infusion* (BHI), suspensi bakteri pada media BHI kemudian dituangkan dalam tabung reaksi steril sebanyak 1 mL kemudian ditetesi H₂O₂ 3%. Hasil yang positif ditandai dengan terbentuknya gelembung udara (Rahayu *et al.*, 2022).

7.4 Uji Koagulase. Uji koagulase dilakukan dengan menambahkan plasma sitrat sebanyak 1 mL dalam tabung reaksi steril yang kemudian ditambahkan 2-3 ose kultur bakteri dan dicampur. Tabung reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selanjutnya dilakukan pengamatan pada 4 jam pertama, dan sesudah 24 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya gumpalan seperti agar-agar, dan reaksi dinyatakan negatif jika tidak terdapat gumpalan (Rahayu *et al.*, 2022).

8. Uji Aktivitas Antibakteri

8.1 Pembuatan Media Uji. Sebanyak 13,68 gram *Mueller Hinton Agar* dilarutkan dalam 360 mL akuades steril. Media dipanaskan hingga mendidih menggunakan magnetic stirrer, kemudian media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15 lbs. Media dituangkan dalam cawan petri sebanyak

60 mL lalu diratakan dan ditunggu hingga memadat. Media agar yang telah memadat lalu ditanami bakteri uji dengan cara swab steril dicelupkan pada suspensi bakteri yang telah dibuat sesuai standar *Mc Farland* dan diperas dengan cara ditekan pada dinding tabung, lalu diinokulasikan pada media agar. Media yang telah ditanami suspensi bakteri kemudian dibuat lubang sumuran dan pada masing-masing sumuran diberi tanda. Pengujian dilakukan 3 kali pengulangan (Hafsari *et al.*, 2015).

8.2 Pembuatan Larutan Kontrol Positif. Kontrol positif dibuat dari sediaan obat kapsul klindamisin 300 mg. Satu kapsul klindamisin dibuka cangkang kapsulnya kemudian ditimbang serbuk yang setara dengan 300 mg klindamisin kemudian serbuk dilarutkan dalam 10 mL *aquadest* dan dilakukan pengenceran 1,5x, selanjutnya dimasukkan dalam lubang sumuran sebanyak 0,05 mL.

8.3 Pembuatan Kontrol Negatif. Kontrol negatif dibuat dari basis Na CMC 3,5%. Serbuk Na CMC ditimbang sebanyak 3,5 gram kemudian ditambahkan 100 mL *aquadest* dan digerus dengan menggunakan mortar hingga homogen.

8.4 Proses Uji Aktivitas Antibakteri. Gel klindamisin diambil sebanyak 0,1 mL lalu dimasukkan ke dalam masing-masing lubang sumuran berukuran 8 mm yang telah diberi tanda, kontrol positif yang digunakan adalah larutan klindamisin 300 mg/mL dan untuk kontrol negatif menggunakan basis gel Na CMC dengan konsentrasi 3,5%. Semua cawan petri diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Diameter zona bening yang terbentuk diukur dengan menggunakan penggaris / jangka sorong dalam satuan millimeter.

E. Analisis Hasil

Data yang diperoleh dari uji mutu fisik lalu dibandingkan antara ketiga sampel tersebut apakah kualitas produk sudah memenuhi kriteria mutu fisik yang baik. Data hasil uji aktivitas antibakteri gel klindamisin 1% dianalisis berdasarkan uji hipotesis yaitu uji normalitas dan uji homogenitas dengan analisis statistik *Shapiro-Wilk* untuk uji normalitas dan *Levene Statistic* untuk uji homogenitas. Jika data hasil uji normalitas dan uji homogenitas terdistribusi normal, dapat dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way-Anova*. Apabila data tidak terdistribusi normal, maka dapat dilanjutkan uji non parametrik dengan *Kruskal-Wallis* menggunakan SPSS.