

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis dan Desain Penelitian**

Dalam penelitian ini menggunakan jenis metode penelitian Eksperimen. Peneliti menggunakan penelitian Eksperimen untuk mengetahui cemaran bakteri *Staphylococcus aureus* pada beberapa jenis sampel lipstik dengan perlakuan yang berbeda dengan melakukan isolasi bakteri. Desain penelitian yang digunakan adalah true eksperimental desain dengan membandingkan hasil dari setiap perlakuan yang berbeda pada sampel lipstik padat.

#### **3.2 Sampel Penelitian**

1. Sampel yang digunakan pada uji organoleptik yaitu 2 jenis sediaan lipstik berwarna merah dan diberi kode A1 dan B2 dengan lama penyimpanan selama 4 minggu
2. Sampel yang digunakan pada uji *Staphylococcus Aureus* yaitu menggunakan 3 jenis sampel lipstik berwarna merah yang memiliki waktu kadaluarsa kurang dari satu tahun dan ketiga sampel diidentifikasi dengan perlakuan yang berbeda yaitu :
  - Sampel 1 : 1 buah lipstik yang telah digunakan individu sebanyak 10 kali dan disimpan selama 1 bulan dengan pemakaian dilakukan setelah mandi saat bibir dalam keadaan bersih dan diberi kode A1
  - Sampel 2 : 1 buah lipstik yang telah digunakan secara bersama oleh 5 orang dengan pemakaian dilakukan setelah makan dan diberi kode B2
  - Sampel 3: 1 buah lipstik yang masih baru dan diberi kode C3

Penggunaan lipstik oleh 1 orang dapat mempermudah pertumbuhan mikroba pada lipstik. Produk lipstik agar tidak mudah tercemar bakteri seharusnya digunakan pada permukaan bibir yang bersih. Dan juga penggunaan lipstik cair lebih dari 1 orang perlu dihindari untuk mencegah pertumbuhan bakteri lebih banyak lagi. Dimana pemakaian lipstik secara bersamaan dan bersentuhan langsung pada kulit dapat meningkatkan jumlah

mikroba. Hal ini disebabkan karena pada kulit terdapat banyak mikroba. Selain itu, kontaminasi mikroorganisme dapat lewat udara, tangan yang sudah terkontaminasi, cara penggunaan yang kurang baik dan penggunaan bahan kosmetik yang sudah terkontaminasi dalam jangka waktu yang lama (Djajadisastra, 2004; Nasser, 2008)

3. Sampel yang digunakan pada uji Rhodamin B sampel yang digunakan yaitu lipstik berwarna merah

### **3.3 Waktu dan Tempat Penelitian**

1. Waktu penelitian dilaksanakan pada tanggal 19 April – 7 Mei 2021
2. Tempat penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Poltekkes Kemenkes Malang dan Laboratorium Kimia Poltekkes Kemenkes Malang.

### **3.4 Bahan dan Alat**

#### **3.4.1 Alat dan bahan Uji cemaran Staphylococcus Aureus**

- **Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas beker, pipet volume 1 ml, pipet ukur 10 ml, pipet tetes, Erlenmeyer, tabung reaksi 20 ml, tabung reaksi 50 ml, tabung durham, cawan petri, sendok, bola hisap, kaca objek, kaca arloji, gelas ukur 250 ml, mikropipet+ tip, batang pengaduk, rak tabung, kompor, Bunsen, korek, jarum ose, neraca triple beam, inkubator, autoklaf, mikroskop, LAF (*Laminar Air Flow*).

- **Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel lipstik, padatan MSA (Monnitol Salt Agar), aquadest, larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, padatan NA, larutan yodium, zat pewarna kristal violet, plasma uji, bromtimol biru, alcohol, safranin, kapas, aluminium foil

#### **3.4.2 Alat dan bahan Uji Rhodamin B**

- **Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas beaker, kaca arloji, kertas saring, hot plate, botol vial, plat KLT, oven, neraca analitik, corong gelas, pipet tetes, pipet ukur dan bola hisap.

- **Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel lipstik, aquadest, Methanol, HCl 4M, Natrium sulfat anhidrat, Etil asetat, Ammonia dan N-butanol.

### 3.5 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (Independent variable)

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahan atau timbulnya variabel dependen (terikat) (Sugiyono, 2012). Variable bebas dalam praktikum ini adalah sediaan lipstik padat.

2. Variabel Terikat (Dependent Variable)

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat, karena adanya variabel bebas (Sugiyono, 2012). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah rhodamin B dan cemaran bakteri *Staphylococcus Aureus*.

### 3.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3.1. Definisi operasional variabel

Variabel	Definisi	Alat ukur	Hasil ukur	Skala
Sediaan Lipstik	Lipstik merupakan sediaan kosmetika yang digunakan untuk mewarnai bibir.	• Fisika : Uji Organoleptik	• Fisika : Diperoleh hasil organoleptik meliputi warna, aroma dan tekstur.	Skala Nominal. Skala nominal adalah skala yang hanya mendasarkan pada pengelompokan atau pengkategorian peristiwa atau fakta dan apabila menggunakan notasi angka hal itu sama sekali tidak menunjukkan perbedaan kuantitatif melainkan hanya menunjukkan perbedaan kualitatif (Abdul Stang. 2020)
Rhodamin B	Rhodamin B	• Kimia : Uji	Kimia : Parameter	Skala Nominal.

	merupakan pewarna sintetik yang tidak boleh dipergunakan dalam kosmetika maupun makanan.	Rhodamin B menggunakan KLT	positif apabila warna bercak antara standar dengan sampel sama dan nilai Rfnya antara standar dengan sampel sama atau saling mendekati dengan selisih $\leq 0,2$ (Depkes, 2014)	Skala nominal adalah skala yang hanya mendasarkan pada pengelompokan atau pengkategorian peristiwa atau fakta dan apabila menggunakan notasi angka hal itu sama sekali tidak menunjukkan perbedaan kuantitatif melainkan hanya menunjukkan perbedaan kualitatif (Abdul Stang. 2020)
Cemaran bakteri <i>S.Aureus</i>	Cemaran adalah sesuatu yang masuk ke dalam Kosmetika secara tidak disengaja dan tidak dapat dihindari yang berasal dari proses pengolahan, penyimpanan dan/atau terbawa dari bahan baku.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biologi : Isolasi <i>Staphylococcus Aureus</i> menggunakan : <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Uji katalase</li> <li>2. Uji koagulase</li> <li>3. Uji gula-gula</li> <li>4. Pewarnaan gram</li> </ol> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biologi : Dikatakan aman jika tidak ditemukan <i>Staphylococcus Aureus</i></li> </ul>	Skala Nominal. Skala nominal adalah skala yang hanya mendasarkan pada pengelompokan atau pengkategorian peristiwa atau fakta dan apabila menggunakan notasi angka hal itu sama sekali tidak menunjukkan perbedaan kuantitatif melainkan hanya menunjukkan perbedaan kualitatif (Abdul Stang. 2020)

### 3.7 Metode Penelitian (prosedur penelitian)

#### 3.7.1 Uji Organoleptik

Dilakukan untuk mengetahui sediaan lipstik secara organoleptis meliputi warna, tekstur, bau atau aroma lipstik (Nurhabibah, dkk 2017)

### **3.7.2 Uji Rhodamin B**

Pada uji Rhodamin B langkah pertama yang dilakukan yaitu membuat larutan uji dengan cara menimbang 2 gram cuplikan lipstick kemudian dimasukkan dalam gelas beker. Setelah itu ditambahkan 16 tetes asam klorida 4 M dan 20 ml metanol lalu dipanaskan diatas hot plate hingga larut. Selanjutnya disaring dengan kertas saring yang berisi natrium sulfat anhidrat lalu diambil filtratnya. Kemudian filtrat dipanaskan kembali lalu dimasukkan kedalam botol vial dan ditandai sebagai larutan A.

Langkah kedua yaitu membuat larutan baku dengan cara menimbang 50 mg baku pembanding merah K10 kemudian dilarutkan dengan 10 ml metanol dan larutan digunakan sebagai control positif dan ditandai sebagai larutan B.

Langkah ketiga yaitu mencampurkan 8 tetes larutan uji dengan 8 tetes larutan baku dan ditandai sebagai larutan C. Selanjutnya membuat eluen campuran etil-asetat, n-butanol dan ammonia dengan perbandingan 20 : 55 :25 dengan total eluen 10 ml lalu dimasukkan kedalam bejana.

Langkah selanjutnya dilakukan penotolan larutan A, larutan B dan larutan C secara terpisah pada plat KLT. Kemudian dimasukkan plat KLT kedalam bejana yang telah berisi eluen campuran etil-asetat, n-butanol dan ammoniakemudian ditutup bejana. Diamati bercak yang muncul pada plat KLTkemudian disinari dengan sinar UV.

### **3.7.3 Uji Staphylococcus Aureus**

#### **a) Sterilisasi Alat**

Alat-alat yang distrerilkan antara lain: cawan petri, tabung reaksi, tabung durham, pipet ukur, pipet volume,kaca arloji, spatula, gelas beaker, erlenmeyer, batang pengaduk. Sterilisasi alat dengan cara sterilisasi panas menggunakan alat oven pada suhu 180<sup>0</sup>C selama 1 jam. Jarum ose dan pinset disterilkan dengan membakar langsung alat tersebut di atas api spirtus.

**b) Preparasi sampel**

Sampel ditimbang sebanyak 1 gram secara aseptik kemudian masukkan kedalam erlenmeyer steril. Kemudian dilarutkan dalam aquadest 10 ml dan diaduk hingga homogen. Setelah itu ditutup Erlenmeyer yang berisi larutan sampel menggunakan kapas dan kertas perkamen.

**c) Pembuatan media**

• **Media Manitol Salt Agar (MSA)**

Pada pembuatan media Manitol Salt Agar (MAS) ditimbang media sebanyak 16,7 gram kemudian dilarutkan dengan 150 ml aquadest lalu dipanaskan sambil diaduk hingga larut sempurna. Setelah itu media disterilisasi dengan autoklaf. Selanjutnya dimasukkan media MSA kedalam 9 cawan petri sebanyak 15 ml dan ditunggu hingga media memadat.

• **Media Nutrient Agar Salt (NAS)**

Untuk membuat media Nutrient Agar Salt (NAS) ditimbang media sebanyak 2 gram dan dimasukkan dalam gelas beker ukuran 100 ml. Kemudian dilarutkan dengan 100 ml aquadest lalu dipanaskan sambil diaduk hingga larut sempurna. Setelah itu dimasukkan media NAS kedalam tabung reaksi sebanyak 9 ml dan ditutup dengan kapas. Selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf.

• **Media laktosa, glukosa, sukrosa dan maltosa**

Menimbang padatan pepton sebanyak 10,2 gram kemudian dilarutkan dalam 400 ml akuades. Setelah itu menimbang padatan laktosa, glukosa, sukrosa dan maltosa masing-masing 1 gram. Selanjutnya dicampur masing-masing padatan gula-gula (laktosa, glukosa, sukrosa dan maltosa) dengan masing-masing 100 ml larutan pepton. Kemudian ditambahkan masing-masing 1 ml bromtimol blue. Selanjutnya dipipet sebanyak 6 ml larutan gula-gula dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah berisi tabung

durham. Kemudian ditutup tabung reaksi dengan kapas lalu disterilkan secara uap basah menggunakan autoklaf.

**d) Sterilisasi media**

Media yang akan digunakan disterilisasi menggunakan autoklaf. Langkah pertama yang dilakukan yaitu diisi autoklaf terlebih dahulu dengan air hingga batas lalu memasukkan media kedalam autoklaf kemudian ditutup rapat. Kemudian disterilisasi pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dengan tekanan 1-2 atm selama 15 menit. Setelah itu dibuka katup uap sampai uap habis. Selanjutnya dibuka autoklaf dan media dikeluarkan.

**e) Penanaman pada media MSA**

Untuk penanaman pada media MSA, langkah pertama yang dilakukan yaitu memasukkan sebanyak 1 ose larutan sampel kemudian digoreskan kedalam cawan petri berisi media MSA. Setelah itu diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.

**f) Penanaman pada media NAS**

Pada inokulasi biakan bakteri pada media NAS, menyiapkan biakan bakteri pada media MSA kemudian diambil 1 koloni menggunakan ose bulat. Setelah itu dilakukan penanaman pada media NAS dengan metode zig-zag. Selanjutnya diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.

**g) Uji katalase**

Pada uji katalase, langkah pertama yang dilakukan yaitu menyiapkan kaca benda yang sudah disterilkan dengan alcohol kemudian ditetesi dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$  pada kaca benda. Setelah itu mengambil 1 ose biakan dari media NAS secara aseptik lalu diletakkan diatas kaca benda dan dicampurkan dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Jika positif akan menghasilkan gelembung gas  $\text{O}_2$

**h) Uji koagulase**

Untuk uji koagulase, disiapkan biakan bakteri pada media NAS kemudian diambil 1 ose bakteri dan diletakkan diatas kaca benda yang sudah disemprot alcohol. Setelah itu ditetesi 1 tetes plasma darah

kemudian diamati perubahan yang terjadi. Jika positif maka akan terbentuk gumpalan.

**i) Uji gula-gula**

Pada uji gula-gula langkah pertama yang dilakukan yaitu menyiapkan 4 tabung reaksi steril yang berisi media pepton + laktosa, pepton + glukosa, pepton + sukrosa dan pepton + maltose yang sudah distrerilisasi dengan autoklaf. Setelah itu mengambil biakan dari media NAS dengan menggunakan ose bulat steril dan ditanamkan pada media secara aseptik. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37<sup>0</sup>C. Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna pada media dan terdapat gelembung

**j) Pewarnaan gram**

Langkah pertama yang dilakukan pada pewarnaan gram yaitu membersihkan kaca preparat menggunakan alkohol 70% lalu dikeringkan dengan cara di lap perlahan dengan tisu. Kemudian ditetesi 1 tetes akuades pada kaca preparat. Setelah itu mengambil 1 ose biakan dan dicampurkan dengan akuades secara merata dan di fiksasi. Kemudian ditetesi Kristal violet sebanyak 1 tetes dan didiamkan selama satu menit. Selanjutnya dibilas kaca preparat menggunakan akuades lalu ditetesi lugol dan ditunggu selama satu menit kemudian dibilas menggunakan akuades. Setelah itu ditetesi 1 tetes alkohol 95% dan ditunggu selama 30 detik kemudian dibilas menggunakan akuades. Lalu ditetesi dengan safranin dan ditunggu selama satu menit kemudian dibilas dengan akuades. Selanjutnya kaca benda dikeringkan dengan cara difiksasi kemudian ditetesi oleum imersi. Setelah itu diamati dengan mikroskop.

**3.8 Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data**

- Data analisis sifat fisik pada sediaan lipstick padat dengan uji organoleptik
- Data analisis pewarna pada sediaan lipstick padat dianalisis secara kualitatif menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)



- Data analisis cemaran bakteri *staphylococcus aureus* diidentifikasi dengan isolasi bakteri menggunakan uji katalase, uji kougulase, uji gula-gula dan pewarnaan gram