BAB III
METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Desain Penelitian ini menggunakan jenis penelitian Deskriptif dengan metode eksperimental. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui cemaran bakteri *Staphylococcus aureus* pada beberapa jenis sampel liptint dengan perlakukan yang berbeda dengan melakukan isolasi bakteri.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada tanggal 18 Desember 2024 - 30 Januari 2025 dari kegiatan persiapan sampel sampai dengan melaksanakan penelitian dan pengolahan data. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Pada penelitian ini digunakan alat-alat sebagai berikut: Neraca analitik, erlenmeyer 100ml, erlenmeyer 500ml, gelas beaker 250ml, gelas beaker 100ml, gelas ukur 250ml, pipet ukur 10 ml, pipet tetes, tabung reaksi 10 ml, cawan petri, spatula, bola hisap, kaca arloji, penjepit tabung reaksi, batang pengaduk, hot plate Stirrer, magnetic stirer, mikropipet, blue tip, pinset, batang pengaduk, rak tabung, kompor, bunsen, pemantik, rak pewarnaan gram, kaca benda, ose bulat dan ose jarum, inkubator, autoklaf, oven, botol semprot, vortex, LAF (Laminar Air Flow) dan Mikroskop.

3.3.2 Bahan

Pada penelitian ini digunakan bahan-bahan sebagai berikut: sampel liptint, padatan MSA (Mannitol Salt Agar) (Himedia), Media TSB (Trypticase Soy Broth) (Himedia), polysorbate 80, aquades, media NAS (Nutrient Agar Salt) (Merck), H_2O_2, media agar miring Triple Sugar Iron Agar (TSIA) (Himedia), alkohol

70%, alkohol aseton (Indo Reagen), kristal violet (Indo Reagen), lugol (Indo Reagen), safranin (Indo Reagen), oleum imersi (Merck), kapas, kertas tahan panas, aluminium foil, benang, karet, tisu, benang, tisu lensa mikroskop (Kimtech).

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas atau variabel independen, merupakan variabel yang mempengaruhi atau menjadi penyebab terjadinya perubahan pada variabel lain (Sugiyono, 2016). Pada penelitian ini variabel bebasnya adalah pemakaian sediaan liptint.

3.4.2 Variabel terikat

Variabel terikat atau variabel dependen, merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat adanya variabel bebas (Sugiyono, 2016). Pada penelitian ini variabel terikatnya adalah cemaran *Staphylococcus aureus.*

3.5 Populasi

Populasi pada penelitian ini menggunakan pewarna bibir.

3.6 Sampel penelitian

Sampel yang digunakan yaitu menggunakan sampel liptint berwarna coral dan sampel tersebut diidentifikasi dengan perlakuan yang berbeda yaitu :

1. Sampel 1 : 1 buah liptint yang digunakan individu dengan pemakaian setelah mandi selama 1 bulan diberi kode A
2. Sampel 2 : 1 buah liptint yang digunakan individu dengan pemakaian setelah makan selama 1 bulan diberi kode B
3. Sampel 3 : 1 buah liptint yang digunakan individu dengan pemakaian satu kali setelah mandi kemudian disimpan selama 1 bulan dan diberi kode C

4. Sampel 4 : 1 buah liptint yang digunakan individu dengan pemakaian satu kali setelah makan kemudian disimpan selama 1 bulan dan diberi kode D
5. Sampel 6 : 1 buah liptint yang masih baru sebagai kontrol negatif diberi kode E
6. Sampel 7 : 1 buah liptint yang masih baru yang nantinya akan ditambahkan biakan *Staphylococcus aureus* sebagai kontrol positif diberi kode F

Salah satu cara mikroba mencemari sediaan kosmetik yaitu liptint dengan kontak antara kulit dan bibir pengguna menggunakan aplikator yang disimpan pada wadah yang sama dengan liptint tersebut yang menyebabkan mikroorganisme dari flora normal yang mungkin terbawa dari makanan atau minuman masuk ke dalam sediaan liptint. Kondisi penyimpanan, suhu penyimpanan, oksigen yang masuk ke sediaan kosmetik melalui proses penutupan yang kurang tepat, kandungan sediaan kosmetik itu sendiri seperti pH dan kandungan air yang tinggi serta senyawa kimia dalam air juga menjadi faktor yang mendukung sebagai media tempat tumbuhnya mikroba (Harlita, Tiara Dini., et al. 2023)

3.7 Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Sediaan liptint	Liptint dengan pemakaian setelah mandi, setelah makan, digunakan satu kali setelah mandi, digunakan satu kali setelah makan dan disimpan selama 1 bulan.	Observasi	-	-
Uji Cemaran Staphylococcus aureus	Cemaran mikroba pada liptint terhadap pemenuhan syarat cemaran mikroba pada kosmetik untuk area sekitar mata dan membran mukosa yaitu untuk uji Angka Lempeng Total tidak lebih dari 10^3 koloni/g atau koloni/mL, uji bakteri *Staphylococcus aureus* negatif per 0,1g atau 0,1mL sampel (BPOM, 2019).	Biologi : Isolasi *Staphylococcus aureus* menggunakan : Isolasi pada media MSA, pembiakan pada media NAS dan Uji gula-gula (TSIA), Uji katalase, dan pewarnaan gram	Positif atau negatif	Skala Nominal. hanya menunjukkan perbedaan kualitatif (Rahman, 2020).

3.8 Metode Penelitian

3.8.1 Sterilisasi alat

Sebelum dilakukan pengujian mikrobiologi perlu dilakukan langkah persiapan sterilisasi peralatan yang akan digunakan, khususnya peralatan kaca yang akan digunakan, metode sterilisasi kering menggunakan oven pada suhu 170°C selama 1 jam dengan tujuan untuk menghilangkan kontaminasi pada peralatan yang digunakan serta menghilangkan sisa air yang ada pada peralatan kaca (Wulandari et al., 2022). Alat-alat yang disterilkan antara lain: gelas beker, pipet volume 1 ml, pipet ukur 10 ml, Erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, kaca arloji, gelas ukur 250 ml, batang pengaduk. Seluruh peralatan yang akan digunakan dibungkus dengan menggunakan kertas perkamen kemudian diikat rapat dengan benang, tutup tabung reaksi, erlenmeyer, dan ujung pipet ukur dan pipet volume dengan menggunakan kapas.

Blue tip disterilisasi menggunakan autoklaf, dibungkus dengan menggunakan kertas perkamen kemudian ikat rapat dengan benang, Tujuan pembungkusan ini untuk mencegah atau mengurangi air masuk ke alat, kemudian sterilisasi di autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Jarum ose dan pinset disterilkan dengan membakar langsung alat tersebut di atas api spirtus.

3.8.2 Preparasi sampel

Sampel ditimbang atau dipipet sebanyak 1g atau 1ml secara aseptic kemudian masukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian dilarutkan dalam 2ml polysorbate 80 steril dan 7ml media TSB steril dan diaduk hingga homogen (Rahmah et al., 2021). Pengencer digunakan untuk mendispersikan contoh. Bahan ini mengandung bahan penetral jika contoh yang akan diuji mengandung sifat anti mikroba. (BPOM RI, 2011). Setelah itu di

tutup tabung reaksi yang berisi larutan sampel menggunakan kapas (Huang et al., 2021).

3.8.3 Pembuatan media

3.8.3.1 Media Trypticase Soy Broth (TSB)

Pada pembuatan media TSB ditimbang media sebanyak 4 gram dan dilarutkan dengan 100 ml aquadest, dipanaskan sambil diaduk hingga larut sempurna. Setelah itu dimasukkan TSB ke dalam erlenmeyer ditutup dengan kapas. Selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf dan digunakan sebagai pelarut sampel.

3.8.3.2 Media Manitol Salt Agar (MSA)

Pada pembuatan media Manitol Salt Agar (MSA) ditimbang media sebanyak 27,75 gram kemudian dilarutkan dengan 250 ml aquadest, dipanaskan sambil diaduk hingga larut sempurna. Setelah itu media disterilisasi dengan autoklaf. Selanjutnya dimasukkan media MSA ke dalam 12 cawan petri sebanyak 15 ml dan ditunggu hingga media memadat (Suhartati et al., 2018)

3.8.3.3 Media Nutrient Agar Salt (NAS)

Pada pembuatan media Nutrient Agar ditimbang media sebanyak 5 gram dan dilarutkan dengan 250 ml aquadest, dipanaskan sambil diaduk hingga larut sempurna. Setelah itu dimasukkan NAS ke dalam 12 tabung reaksi sebanyak 9 ml dan ditutup dengan kapas. Selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf (Astriani, R., 2022)

3.8.3.4 Media Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

Pada pembuatan media agar miring ditimbang media sebanyak 16,3 gram dan dilarutkan dalam 250 ml aquadest lalu dipanaskan sambil diaduk hingga larut sempurna, ditutup dengan kapas dan kertas tahan panas.

Setelah itu media disterilkan dengan autoklaf. Selanjutnya dimasukkan pada 12 tabung reaksi masing-masing sebanyak ±10 ml dengan posisi miring (Cappuccino, James G., dan Sherman, 2014)

3.8.4 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 ke dalam autoklaf kemudian ditutup rapat. Kemudian disterilisasi pada suhu 121°C dengan tekanan 1-2 atm selama 15 menit. Setelah itu dibuka katup uap sampai uap habis.Selanjutnya dibuka autoklaf dan media dikeluarkan.

3.8.5 Penanaman pada media Mannitol Salt Agar (MSA)

Untuk penanaman pada media MSA, langkah pertama yang dilakukan yaitu memasukkan sebanyak 1 ose larutan sampel kemudian digoreskan ke dalam cawan petri berisi media MSA. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.8.6 Penanaman pada media Nutrient Agar Salt (NAS)

Pada inokulasi biakan bakteri dari media NAS dengan menyiapkan biakan bakteri pada media MSA kemudian diambil 1 koloni menggunakan ose bulat. Setelah itu dilakukan penanaman pada media NAS dengan metode zig-zag dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam

3.8.7 Penanaman pada media Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

Untuk uji TSIA, disiapkan biakan bakteri pada media NAS kemudian diambil 1 ose bakteri dan diinokulasi dengan cara menggoreskan bagian miringnya dan menusuk bagian tegaknya, setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jika pada permukaan miring basa (merah) dan bagian dasar asam (kuning) dengan atau tanpa pembentukan gas (pecah pada dasar agar) maka

terjadi fermentasi glukosa, jika permukaan miring asam (kuning) dan bagian dasar asam (kuning) dengan atau tanpa pembentukan gas maka terjadi fermentasi laktosa dan/atau sukrosa, Jika permukaan miring basa (merah) dan bagian dasar basa (merah) atau tidak berubah (merah-jingga) terjadi fermentasi karbohidrat (Cappuccino et al., 2014)

3.8.8 Uji Katalase

Pada uji katalase dilakukan dengan menyiapkan kaca benda yang sudah disterilkan dengan menggunakan alcohol kemudian ditetesi dengan menggunakan H_2O_2 pada kaca benda. Setelah itu mengambil 1 ose biakan dari NAS secara aseptic dan diletakkan diatas kaca benda dan dicampurkan dengan H_2O_2. Jika positif akan menghasilkan gelembung gas O_2 (Dewi, 2013).

3.8.9 Pewarnaan Gram

Pada pewarnaan gram dilakukan dengan sterilisasi kaca preparat menggunakan alkohol 70% lalu dikeringkan dengan cara di lap menggunakan tisu. Kemudian ditetesi 1 tetes aquades pada kaca benda. Setelah itu mengambil 1 ose biakan dari media NAS dan dicampurkan dengan aquades hingga merata dan difiksasi. Kemudian ditetesi Kristal violet sebanyak 1 tetes dan didiamkan 1 menit. Selanjutnya dibilas kaca benda menggunakan aquades lalu ditetesi lugol dan ditunggu selama satu menit kemudian dibilas menggunakan aquades. Setelah itu ditetesi 1 tetes alkohol 95% dan ditunggu selama 30 detik kemudian dibilas menggunakan aquades. Lalu ditetesi dengan safranin dan ditunggu selama satu menit kemudian dibilas dengan aquades. Selanjutnya kaca benda dikeringkan dengan cara difiksasi kemudian ditetesi oleum imersi. Setelah itu diamati menggunakan mikroskop.

3.8.10 Destruksi Media

Destruksi media dilakukan dengan menggunakan autoklaf dan dilanjutkan dengan sterilisasi alat. Media yang akan

didestruksi dibungkus dengan menggunakan kertas perkamen atau alumunium foil lalu diikat menggunakan karet atau benang. Setelah itu aquades dimasukkan pada autoklaf hingga lempeng hitter terendam, lalu autoklaf ditutup dan dikunci dengan memutar keempat pengunci dan autoklaf dipanaskan terlebih dahulu dengan cara menghubungkan stop kontak dengan aliran listrik lalu tekan tombol on berwarna hijau dan ditunggu hingga aquadest yang ada di dalam autoklaf mendidih.

Setelah aquades mendidih penutup autoklaf dibuka dan bahan yang akan di destruksi dimasukkan ke dalam keranjang autoklaf, dan dimasukkan ke dalam autoklaf. Penutup autoklaf ditutup kembali dan dikunci dengan memutar keempat pengunci dan menutup saluran pembuangan uap. Lalu tombol pengatur tekanan uap diputar ke angka 9 dan ditunggu hingga indikator tekanan sudah menunjukkan angka 1½ . Lalu setelah tekanan 1½, tekanan udara diturunkan dengan memutar tombol pengatur tekanan ke angka 4 lalu dibiarkan selama 15-30 menit. Setelah itu tombol pengatur tekanan diputar ke posisi off dan autoklaf dimatikan dengan menekan tombol on/off berwarna hijau dan saklar dicabut. Selanjutnya saluran pembuangan uap dibuka secara perlahan dan dibiarkan hingga uap panas benar-benar habis. Setelah uap habis, dibuka autoklaf dengan cara memutar keempat pengunci dan bahan yang telah di destruksi dikeluarkan. Sisa media dibuang pada limbah dan aquades yang ada pada autoklaf juga dibuang pada limbah. Alat dan autoklaf dicuci menggunakan sabun serta dikeringkan.

3.9 Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

Pada penelitian ini dilakukan pengolahan untuk mengubah data mentah menjadi data yang dapat dijadikan informasi yang mudah dimengerti dan berguna. Dari penelitian yang telah dilakukan, didapatkan data berupa hasil isolasi dan identifikasi *Staphylococcus aureus*

Tabel 2. Hasil Uji Cemaran Staphylococcus aureus

Sampel	Media MSA	Media NSA	Uji TSIA	Uji Katalase	Pewarnaan Gram
A1					
A2					

Koloni *Staphylococcus aureus* pada media MSA tumbuh dengan ciri– ciri bundar, halus, menonjol, berkilau dan berwarna kuning emas tua. Kemampuan memfermentasi mannitol menjadi asam menyebabkan koloni tampak berwarna kuning. Sebaliknya, bakteri yang tidak mampu memfermentasi akan tampak terlihat zona kemerahan (Yanto et al., 2021)