

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kosmetik merupakan suatu sediaan yang sering digunakan untuk memperbaiki penampilan, membersihkan, dan memelihara kondisi tubuh, salah satunya krim pemutih wajah (BPOM RI 2011). Krim pemutih wajah bertujuan untuk memperbaiki warna kulit dengan cara depigmentasi, yang melibatkan mekanisme penghambatan produksi enzim tirosinase, dan melanin (Tranggono & Latifah 2014). Penelitian ini menggunakan 10 sampel krim pemutih tanpa izin edar dalam kondisi baru, yang pengujiannya dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Kondisi sampel dalam kondisi baru dipilih karena untuk melihat cemaran mikrobanya saat proses produksinya atau sebelum digunakan konsumen. Sampel yang telah dibuka atau dipakai berulang tidak dilakukan pengujian karena kemungkinan faktor kontaminasi berasal saat produk telah dibuka, sehingga saat pengujian sampel hanya sekali pakai (tidak untuk pengujian berikutnya). Faktor utama yang menyebabkan kontaminasi produk dalam kondisi baru adalah bahan baku, bahan pengemas, peralatan, prosesnya, dan tenaga kerja, selain itu kemungkinan juga karena kondisi penyimpanan dan kemasan yang tidak memadai. Mikroba dapat tumbuh dengan baik di krim pemutih wajah karena memiliki kandungan air, bahan organik ataupun nitrogen serta garam-garam mineral yang dibutuhkan (Tranggono & Latifah 2014).

A. Pengenceran Sampel

Pengenceran bertujuan untuk mendapatkan koloni bakteri dengan jumlah antara 30-300 koloni, dan jamur 15-150 koloni, sehingga mempermudah perhitungan koloni (BPOM RI 2011). Perhitungan koloni sulit dilakukan, jika jumlah koloni mikroba sangat pekat sehingga perlu dilakukan pengenceran. Pengenceran sampel menggunakan larutan NaCl 0,9% steril bertujuan untuk menjaga keseimbangan tekanan osmosis sel-sel mikroba yang mungkin terganggu kelangsungan hidupnya karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam sampel (merecovery) (Harti 2014). Konsentrasi NaCl yang tinggi dapat

mengganggu tekanan osmosis bakteri sehingga sel menjadi hipotonis (mengkerut dan lama kelamaan mati), terjadi denaturasi protein mikroba, ataupun ionisasi ion klor yang beracun terhadap mikroba (Indarti 2009, diacu dalam Amalia 2016).

Pengenceran sampel menggunakan tween 80 bertujuan untuk menurunkan tegangan permukaan dari sampel yang berupa emulsi (terdapat kandungan minyak) sehingga mudah bercampur dengan larutan berair (larutan NaCl 0,9%) (Rowe *et al.* 2009). Penggunaan tween 80 pada pengenceran kedua dan ketiga tidak diperlukan, karena sampel telah bercampur dengan larutan NaCl 0,9% steril.



Gambar 5. Pengenceran sampel

B. Uji Angka Lempeng Total (ALT)

Uji angka lempeng total (ALT) digunakan untuk menghitung cemaran bakteri aerob mesofil yang hidup (BPOM RI 2011), dan sebagai indikator higienitas (Hartati 2016). Semakin tinggi nilai ALT menandakan proses produksi kurang terjamin dan kemungkinan terdapat mikroba yang patogen. Tingginya jumlah mikroba pada ALT dapat merusak produk secara fisika dan kimia (Radji 2011; Tivani 2018).

Sampel ditanam pada media NA yang terdapat kandungan pepton yang merupakan sumber nitrogen untuk bakteri, ekstrak ragi yang mampu merangsang pertumbuhan bakteri, NaCl yang mampu menjaga tekanan osmosis bakteri dalam sitoplasma, air yang penting untuk pertumbuhan dan reproduksi mikroba, dan agar sebagai agen penguat dan zat pemat. Media tidak mengandung karbohidrat sehingga mencegah pertumbuhan kapang dan khamir (Himedia 2018; Irianto 2011).

Suspensi sampel diambil sebanyak 1 ml tiap pengenceran, dan dimasukkan ke dalam petri kosong yang steril, kemudian media NA yang cair dan hangat dituang, lalu diratakan dan dibiarkan hingga memadat, cara ini disebut metode tuang (*pour plate*). Penuangan media harus dalam keadaan hangat (sesuai dengan suhu tubuh), hal ini karena apabila terlalu dingin media akan memadat, sedangkan apabila terlalu panas menyebabkan mikroba akan mati. Sampel dalam media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Koloni bakteri yang didapat dihitung dengan *coloni counter* atau secara manual. Koloni bakteri yang bergabung atau menumpuk dihitung menjadi satu koloni, hal ini karena sel bakteri belum terpisah sempurna (Irianto 2011). Syarat ALT untuk sampel kosmetik yaitu tidak boleh lebih dari 10^3 koloni/gram (BPOM RI 2014).

C. Uji Angka Kapang Khamir (AKK)

Uji angka kapang khamir (AKK) bertujuan untuk menghitung jumlah cemaran kapang dan khamir, dan sebagai indikator higienitas (Harti 2016). Semakin tinggi nilai AKK menunjukkan proses produksi kurang terjamin dan kemungkinan terdapat mikroba yang patogen. Tingginya jumlah mikroba pada AKK dapat merusak produk secara fisika dan kimia (Radji 2011; Tivani 2018).

SDA mampu menumbuhkan kapang dan khamir karena terdapat kandungan enzimatis digest kasein, jaringan hewan, dan dekstrosa yang menyediakan sumber asam amino, nitrogen, karbon dan energi. Media SDA memiliki pH asam (± 5), sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri, selain itu karena adanya penambahan antibiotik kloramfenikol (Himedia 2018; Tjay & Rahardja 2013). Kloramfenikol memiliki titik lebur yang tinggi, stabil dan tahan terhadap panas tinggi (Ditjen POM, 2012) sehingga tidak rusak jika diautoklaf.

Suspensi sampel diambil 1 ml pada tiap pengenceran dimasukkan ke dalam petri kosong yang steril, kemudian dituang dengan media SDA yang telah ditambah kloramfenikol yang telah hangat, kemudian diratakan. Penuangan media SDA ini harus dalam keadaan hangat (sesuai dengan suhu tubuh), hal ini karena apabila terlalu dingin media memadat, sedangkan apabila terlalu panas menyebabkan kapang dan khamir akan mati.

Sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 48-72 jam untuk pertumbuhan khamir, setelah itu diinkubasi pada suhu ruang 25°C selama 24-48 jam. Suhu yang berbeda antara kapang dan khamir karena kapang membutuhkan kelembapan yang tinggi sedangkan khamir membutuhkan kelembapan yang rendah (Irianto 2014). Koloni kapang dan khamir dihitung dengan *coloni counter* atau secara manual. Syarat AKK untuk sampel kosmetik, tidak boleh lebih dari 10^3 koloni/gram (BPOM RI 2014).

D. Uji Mikrobiologis Sampel

Serangkaian pengujian mikrobiologis pada sampel krim pemutih wajah tanpa izin edar dilakukan secara berkesinambungan yaitu uji ALT, AKK, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Candida albicans*. Pengujian ini perlu dilakukan secara satu seri agar mendapatkan hasil yang lebih seragam.

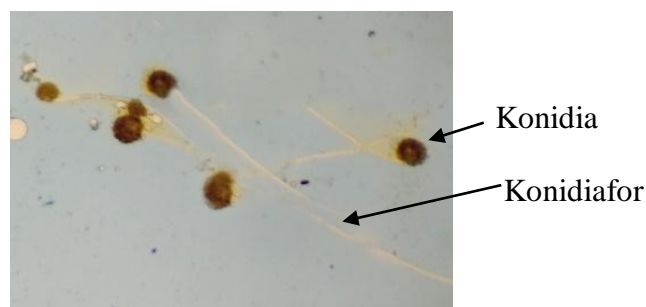
Tabel 2. Uji Mikrobiologis Sampel

| Sampel | ALT koloni/gram | AKK koloni/gram | <i>Candida albicans</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
|--------|---|---|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| A | - | $<1,5 \times 10^2$ ($1,5 \times 10^1$) | - | - | - |
| B | - | - | - | - | - |
| C | - | $<1,5 \times 10^2$ ($2,5 \times 10^1$) | - | - | - |
| D | $2,7 \times 10^5$ | $<1,5 \times 10^2$ ($1,5 \times 10^1$) | - | + | - |
| E | $<3,0 \times 10^2$ (5×10^1) | - | - | - | - |
| F | $<3,0 \times 10^2$ (4×10^1) | - | - | - | - |
| G | - | $<1,5 \times 10^2$ ($0,7 \times 10^1$) | - | - | - |
| H | $<3,0 \times 10^2$ (2×10^1) | $>1,5 \times 10^5$ ($2,1 \times 10^5$) | + | - | - |
| I | $<3,0 \times 10^3$ | $<1,5 \times 10^2$ | - | - | - |

| | | | | | |
|----------|-----------------------|-----------------------|---|---|---|
| | ($2,4 \times 10^2$) | ($0,3 \times 10^1$) | | | |
| J | $7,7 \times 10^2$ | - | - | - | - |

1. Sampel A

Sampel A pada uji ALT, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa* hasilnya negatif, sedangkan pada uji AKK terdapat 1-2 koloni pada pengenceran pertama, lihat lampiran 19. Koloni tersebut berbentuk bulat dengan ukuran sedang hingga besar, berwarna putih cenderung krem, sedikit menonjol, dan terdapat hifa. Pemeriksaan lanjutan dengan pewarnaan Gram, tampak konidia yang berwarna coklat gelap berkumpul membentuk bulatan, dan terdapat konidiafor yang panjang. Koloni ini diduga *Aspergillus sp.*, sehingga sampel dikatakan negatif terhadap *Candida albicans*. Spora dari *Aspergillus sp.* jika terhirup dapat menyebabkan penyakit aspergillosis pada paru-paru dan infeksiya menyebar dengan cepat melalui aliran darah menuju ke otak, jantung, ginjal, dan kulit. Infeksi aspergillosis pada kulit berupa pembengkakan pada salah satu bagian pipi, dan lesi kulit (Hasanah 2017).



Gambar 6. Pewarnaan Kapang pada Sampel A

AKK pada sampel ini sebesar $<1,5 \times 10^2$ ($1,5 \times 10^1$), sehingga tetap memenuhi syarat yaitu kurang dari 10^3 koloni/ gram. Nilai ALT yang negatif menunjukkan tidak ada kontaminasi bakteri saat produksi atau proses produksi sesuai dengan standart, pengawet yang digunakan sebagai antibakteri saja, terdapat bahan berbahaya dan logam berat yang dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri, maupun adanya kompetisi nutrisi antara kapang dengan bakteri. Bahan berbahaya dan logam berat dapat menyebabkan iritasi kulit hingga penyakit kulit yang serius. Logam berat mampu berikatan dengan gugus

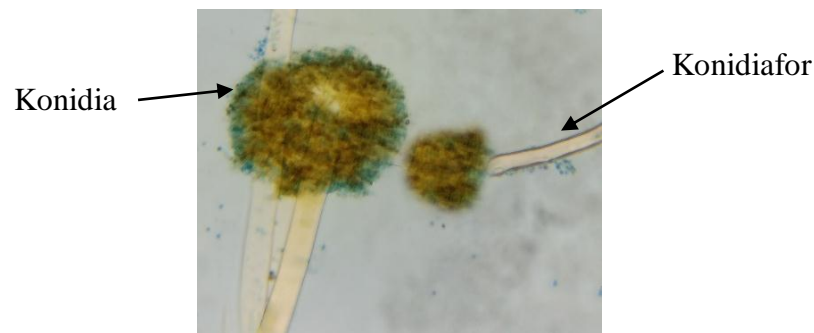
sulfhidril dari protein sehingga terjadi denaturasi protein dan menyebabkan bakteri lisis (Murphy *et al.* 2015 & Muhammed 2017).

2. Sampel B

Pengujian pada sampel B tidak ditemukan koloni bakteri dan kapang atau khamir, sehingga sampel dikatakan memenuhi syarat mikrobiologis. Hasil negatif tersebut diduga karena kadar pengawet yang tinggi, dan terdapat bahan berbahaya dan logam berat yang dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri dan kapang khamir. Kadar pengawet yang tinggi, maupun bahan berbahaya dan logam berat dapat menyebabkan iritasi kulit hingga penyakit kulit yang serius. Logam berat mampu berikatan dengan gugus sulfhidril dari protein sehingga terjadi denaturasi protein dan menyebabkan bakteri lisis (Murphy *et al.* 2015 & Muhammed 2017).

3. Sampel C

Sampel C pada uji ALT, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa* hasilnya negatif, sedangkan pada uji AKK terdapat 1-2 koloni pada pengenceran pertama tiap replikasinya, sedangkan pada pengenceran kedua di replikasi kedua terdapat 1 koloni, lihat lampiran 7. Replikasi yang lain tidak tumbuh koloni jamur karena jumlahnya yang terlalu sedikit dan keberadaan sporanya. Koloni yang tampak berbentuk bulat, kecil, berwarna krem keputihan, dan tampak sedikit menonjol. Koloni tersebut diambil sedikit dan diperiksa dibawah mikroskop, didapatkan hasil terlihatnya konidia yang berwarna coklat berkumpul membentuk bulatan, terdapat vesikel, dan konidiafor. Kapang ini diduga *Aspergillus sp.*, sehingga sampel dikatakan negatif terhadap *Candida albicans*. Spora dari *Aspergillus sp.* jika terhirup dapat menyebabkan penyakit aspergillosis pada paru-paru dan infeksiya menyebar dengan cepat melalui aliran darah menuju ke otak, jantung, ginjal, dan kulit. Infeksi aspergillosis pada kulit berupa pembengkakan pada salah satu bagian pipi, dan lesi kulit (Hasanah 2017). Nilai AKK pada sampel sebesar $< 1,5 \times 10^2$ ($2,5 \times 10^1$), sehingga tetap memenuhi syarat yaitu kurang 10^3 koloni/gram.



Gambar 7. Pewarnaan Kapang pada Sampel C

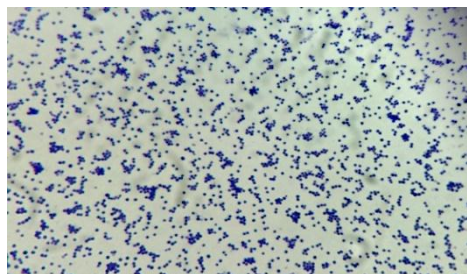
Nilai ALT yang negatif menunjukkan tidak ada kontaminasi bakteri saat produksi atau proses produksi sesuai dengan standart, pengawet yang digunakan sebagai antibakteri saja, terdapat bahan berbahaya dan logam berat yang dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri, maupun adanya kompetisi nutrisi antara kapang dengan bakteri. Bahan berbahaya dan logam berat dapat menyebabkan iritasi kulit hingga penyakit kulit yang serius. Logam berat mampu berikatan dengan gugus sulfhidril dari protein sehingga terjadi denaturasi protein dan menyebabkan bakteri lisis (Murphy *et al.* 2015 & Muhammed 2017).

4. Sampel D

Sampel D menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri pada media NA, dan VJA, sedangkan pada media PSA tidak terdapat koloni bakteri. Pengenceran tiap replikasi memiliki koloni lebih dari 300, kecuali pengenceran ketiga di replikasi kedua dan ketiga koloninya dibawah 300, lihat lampiran 8. Hasil yang berbeda tiap replikasi ini dirata-rata, dan diambil koloni yang memenuhi range 30-300. Nilai ALT dari sampel sebesar $2,7 \times 10^5$, sehingga lebih dari 10^3 koloni/ gram. ALT pada sampel D yang tinggi, menandakan proses produksi yang tidak memenuhi standart, dan kemungkinan adanya bakteri yang patogen. Nilai ALT yang tinggi dapat menyebabkan kerusakan produk secara fisika dan kimia (Radji 2011).

Koloni bakteri di media VJA tiap replikasi memiliki bentuk yang bulat, kecil, dan berwarna hitam, tetapi pada replikasi kedua terdapat koloni yang berwarna krem, sedangkan pada replikasi ketiga sekeliling koloni berwarna kuning. Koloni bakteri yang berwarna hitam karena terjadi reduksi kalium telurit menjadi logam tellurium yang mengendap berwarna hitam (Sariadji *et al.* 2015).

Koloni bakteri yang berwarna krem menunjukkan bakteri tidak bisa mereduksi kalium telurit, atau penambahan kalium telurit kurang merata, ataupun koloni tersebut terjadi perubahan gen yang membuatnya tidak mampu mereduksi kalium telurit. Zona sekeliling bakteri berwarna kuning karena bakteri mampu memfermentasi manitol sebagai sumber karbon (Irianto 2013). Koloni sekeliling bakteri tidak menjadi kuning, kemungkinan karena bakteri tidak mampu memfermentasi manitol, ataupun proses pertumbuhan bakteri cepat sehingga manitol yang disekeliling bakteri habis. Ketiga replikasi dilakukan pengujian dengan pewarnaan Gram, dan hasilnya sama tiap replikasi yaitu koloni bakteri bulat, bergerombol, dan berwarna ungu. Warna ungu menandakan bakteri merupakan Gram positif yang memiliki dinding peptidoglikan yang tebal sehingga mampu mempertahankan kompleks warna ungu kristal violet-iodin setelah ditambahkan Gram C sebagai peluntur, selain itu terjadi rehidrasi yang menyebabkan pori-pori dinding sel menciut sehingga warna ungu terperangkap (Radji 2010).

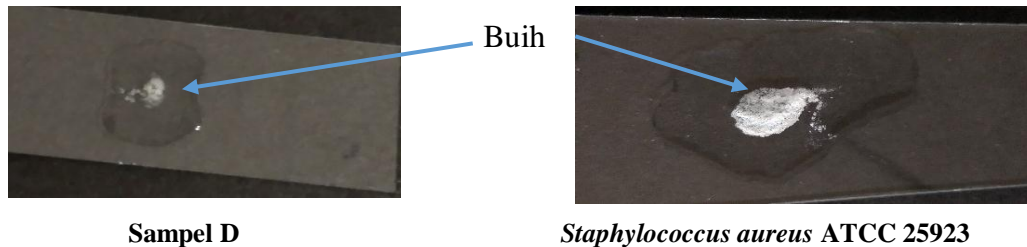


Gambar 8. Pewarnaan Gram Bakteri Sample D

Hasil dari pewarnaan Gram ini diduga bakteri *Staphylococcus aureus*, kemudian 1 koloni dari media VJA ini diambil dan diinokulasikan pada media BHI, agar mendapatkan koloni bakteri yang lebih banyak. Koloni bakteri yang berasal dari BHI tersebut diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C, kemudian dilakukan pengujian katalase, koagulase, dan diuji kembali di VJA.

Pertama, dilakukan uji katalase dengan meletakan bakteri pada media slide kemudian ditetesi 1-2 tetes H₂O₂ 3%, dan hasilnya terdapat buih, hasil serupa pada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Uji katalase bertujuan untuk membedakan genus *Staphylococcus* sp dan *Streptococcus* sp. Buih yang

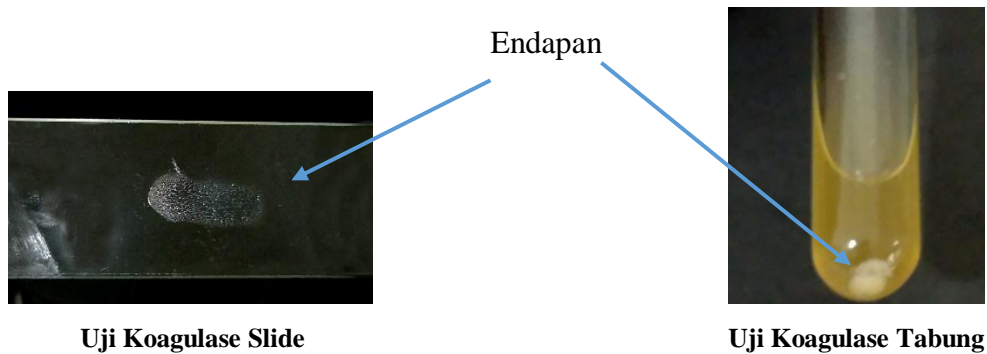
dihasilkan tergantung banyaknya koloni bakteri yang diambil, semakin banyak koloni bakteri maka buih yang didapat semakin banyak (Leboffe & Pierce 2011).



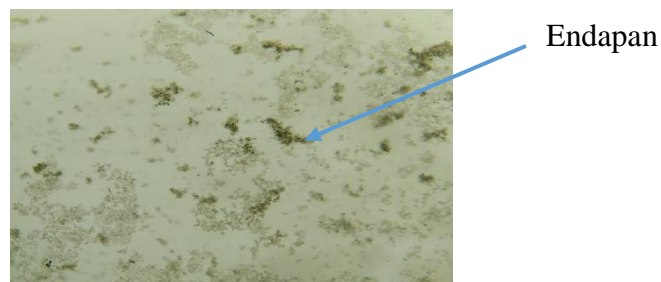
Gambar 9. Uji Katalase

Kedua, dilakukan uji koagulase dengan plasma sitrat kelinci pada media slide, dan ditunggu beberapa menit hasilnya terdapat gumpalan, setelah itu untuk pemastian diperiksa dengan mikroskop menunjukkan penggumpalan. Hasil serupa dengan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sebagai pembandingan. Uji koagulase tabung membutuhkan waktu 24 jam, dan hasilnya terdapat endapan putih yang jika dikocok pelan sulit hilang. Perbedaan lamanya pengujian pada media slide dan tabung karena media slide hanya dapat melihat *bound coagulase*-nya, sedangkan uji dengan tabung dapat terlihat *bound coagulase* dan *free coagulase*. Hasil penggumpalan yang didapat juga berbeda, pada media slide tidak terlalu tampak sedangkan pada media tabung terlihat jelas. Faktor yang mempengaruhinya yaitu jumlah dari sampel yang diuji, dan juga pada media slide (*bound coagulase*) plasma sitrat akan masuk ke dinding sel bakteri dan bereaksi dengan fibrinogen yang menyebabkan penggumpalan sel menjadi satu, sedangkan pada uji tabung (*free coagulase*) juga dilihat ada tidaknya koagulase bebas karena adanya reaksi enzim ekstraseluler dengan plasma sitrat yang memulai mekanisme protombin dan fibribogen. Enzim koagulase merupakan salah satu faktor virulensi, yang mampu mengendapkan protein, dan membentuk penggumpalan di bagian permukaan sehingga sulit difagositosis (Leboffe & Pierce 2011). Berdasarkan hasil tersebut dapat dikatakan bahwa bakteri tersebut *Staphylococcus aureus*, untuk pemastian lebih lanjut bakteri dari media BHI ditanam ke media VJA yang telah ditambah dengan kalium telurit. Penanaman kembali koloni ke media VJA bertujuan untuk pemurnian dan pengujian selanjutnya (uji sensitivitas antibiotik). Hasil yang didapat terdapat koloni bakteri bulat, kecil, berwarna hitam, dan sekeliling koloni

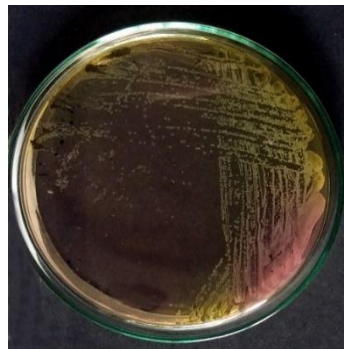
berubah menjadi kuning. Infeksi yang ditimbulkan *Staphylococcus aureus* yaitu impetigo, ruam, infeksi kulit, folikulitis, dan infeksi pada folikel rambut (Radji 2010).



Gambar 10. Uji Koagulase Sample D



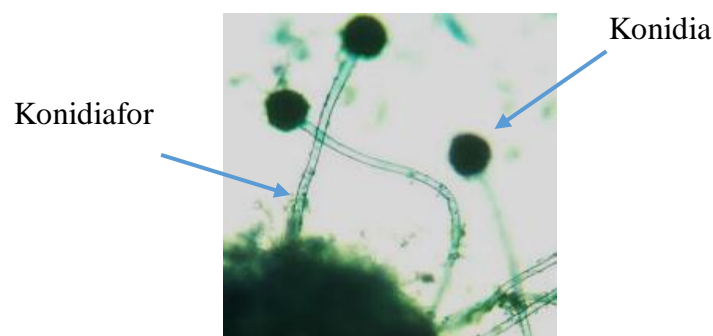
Gambar 11. Uji Koagulase dengan Mikroskop Sampel D



Gambar 12. Pemurnian *Staphylococcus aureus* Sampel D pada VJA

Koloni pada media SDA berbentuk bulat, kecil hingga sedang, warna krem, sedikit menonjol, dan sporanya berwarna coklat kehitaman. Pemastian lebih lanjut dengan melihat strukturnya, dan hasilnya terdapat konidia yang berkumpul menjadi bulatan dan berwarna hitam, serta terdapat konidiafor. Hasil tersebut diduga struktur dari *Aspergillus sp*, dan dinyatakan sampel negatif *Candida*

albicans. Spora dari *Aspergillus sp.* jika terhirup dapat menyebabkan penyakit aspergillosis pada paru-paru dan dengan cepat infeksi menyebar melalui aliran darah menuju ke otak, jantung, ginjal, dan kulit. Infeksi aspergillosis pada kulit berupa pembengkakan pada salah satu bagian pipi, dan lesi kulit (Hasanah 2017). Nilai AKK-nya sebesar $<1,5 \times 10^2$ ($1,5 \times 10^1$), sehingga masih memenuhi syarat yaitu kurang dari 10^3 koloni/ gram. Sampel D walaupun nilai AKK memenuhi syarat, namun secara keseluruhan sampel D tidak layak karena nilai ALT yang melebihi batas dan terdapat *Staphylococcus aureus*.



Gambar 13. Identifikasi Kapang dan Khamir Sampel D

5. Sampel E

Sampel E tidak terdapat koloni di media PSA, dan SDA. Jumlah bakteri yang tumbuh di media NA tiap replikasi tidak jauh berbeda, dan hasilnya dirata-rata. Nilai ALT yang didapat $< 3,0 \times 10^2$ (5×10^1), nilai ini kurang dari 10^3 koloni/gram sehingga sampel tetap memenuhi syarat mikrobiologisnya. Nilai AKK yang negatif sedangkan terdapat nilai ALT, menandakan kandungan air atau kelembapan rendah dari produk sehingga kapang dan khamir tidak tumbuh (Radji 2010).

Media VJA ditumbuhi koloni bakteri tiap replikasinya. Koloni tersebut berbentuk bulat, hitam, kecil hingga sedang, menonjol keluar, dan berlendir, tetapi pada replikasi ketiga koloni bakteri berkerumun jadi satu (*swarm*), lihat lampiran 8. Identifikasi lanjutan dengan pewarnaan Gram, hasilnya berbentuk batang, dan berwarna merah. Warna merah menunjukkan bakteri tidak bisa mempertahankan zat warna ungu dari kristal violet saat diberi peluntur (alkohol-aseton), hal ini karena bakteri memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis, dapat disimpulkan koloni tersebut bakteri Gram negatif. Media VJA merupakan media yang selektif

untuk pertumbuhan bakteri *Staphylococcus sp.* karena adanya kandungan litum klorida, kalium telurit, dan glisin yang tinggi sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif (Himedia 2018). Berdasarkan literatur dari Himedia menyebutkan bakteri Gram negatif seperti *Proteus mirabilis* dapat tumbuh dan membentuk koloni berwarna abu-abu hingga hitam, tetapi tidak mampu memfermentasi manitol sehingga media tidak berubah menjadi kuning. *Proteus mirabilis* mampu bertahan dalam media yang memiliki kandungan kalium telurit karena kemungkinan telah resisten terhadap kalium telurit sehingga mampu mereduksi kalium telurit menjadi logam tellurium yang mengendap berwarna hitam, selain itu *Proteus mirabilis* dapat tumbuh pada media dengan kandungan protein tinggi (Pearson *et al.* 2010; Sariadji *et al.* 2015). *Proteus mirabilis* dapat berasal dari sumber air yang digunakan dalam proses produksi (Afriani 2014). Hasil koloni yang tumbuh pada sampel E diduga bakteri *Proteus mirabilis* namun perlu dilakukan pemastian dengan uji biokimia. Sampel E tidak ditumbuhi bakteri *Staphylococcus aureus*, sehingga dinyatakan memenuhi syarat mikrobiologis namun tetap perlu dilakukan pengujian kembali terkait bakteri Gram negatif yang tumbuh tersebut.



Gambar 14. Pewarnaan Gram Sampel E

6. Sampel F

Sampel F didapatkan koloni bakteri di media NA, dan VJA, sedangkan pada PSA dan SDA tidak terdapat koloni yang tumbuh. Nilai ALT sebesar $< 3,0 \times 10^2$ (4×10^1), sehingga memenuhi syarat yaitu dibawah 10^3 koloni/gram. Nilai AKK yang negatif sedangkan terdapat nilai ALT, menandakan kandungan air atau kelembapan rendah dari produk sehingga kapang dan khamir tidak tumbuh (Radji 2010).

Sampel F ini menunjukkan tidak adanya pertumbuhan dari *Staphylococcus aureus*, tetapi terdapat koloni lain berbentuk bulat, kecil, berwarna hitam dan berlendir (lihat lampiran 9), serta pada pewarnaan Gram strukturnya berbentuk batang merah. Koloni ini diduga Gram negatif, berdasarkan literatur dari HIMEDIA bakteri Gram negatif dapat tumbuh di VJA dan mereduksi kalium telurit adalah *Proteus mirabilis*, namun perlu dilakukan pemastian lebih lanjut. Berdasarkan literatur dari Himedia menyebutkan bakteri Gram negatif seperti *Proteus mirabilis* dapat tumbuh dan membentuk koloni berwarna abu-abu hingga hitam, tetapi tidak mampu memfermentasi manitol sehingga media tidak berubah menjadi kuning. *Proteus mirabilis* mampu bertahan dalam media yang memiliki kandungan kalium telurit karena bakteri ini kemungkinan telah resisten terhadap kalium telurit sehingga mampu mereduksi kalium telurit menjadi logam tellurium yang mengendap berwarna hitam, selain itu *Proteus mirabilis* dapat tumbuh pada media yang memiliki kandungan protein tinggi (Pearson *et al.* 2010; Sariadji *et al.* 2015). *Proteus mirabilis* dapat berasal dari sumber air yang digunakan dalam proses produksi (Afriani 2014). Sampel F dinyatakan memenuhi syarat mikrobiologis.



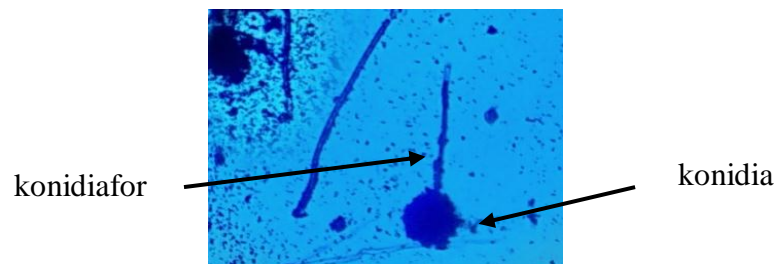
Gambar 15. Pewarnaan Gram pada Sampel F

7. Sampel G

Sampel G menunjukkan tidak terdapat pertumbuhan bakteri di media NA, VJA, dan PSA, namun terdapat pertumbuhan kapang pada media SDA. Koloni kapang tumbuh pada pengenceran pertama dan kedua di replikasi pertama. Kapang tersebut berukuran sedang hingga besar, berwarna krem, menonjol kepermukaan, dan spora berwarna hitam. Pewarnaan dari struktur kapang tersebut, terlihat konidia yang berkumpul menjadi bulatan dan berwarna hitam, serta terdapat konidiafor, diduga kapang tersebut merupakan *Aspergillus sp.* Spora dari

Aspergillus sp. jika terhirup dapat menyebabkan penyakit aspergillosis pada paru-paru dan menyebar dengan cepat melalui aliran darah menuju ke otak, jantung, ginjal, dan kulit. Infeksi aspergillosis pada kulit berupa pembengkakan pada salah satu bagian pipi, dan lesi kulit (Hasanah 2017). Nilai AKK pada sampel ini sebesar $<1,5 \times 10^2$ ($0,7 \times 10^1$), sehingga masih aman karena dibawah 10^3 koloni/gram.

Nilai ALT yang negatif menunjukkan tidak ada kontaminasi bakteri saat produksi atau proses produksi sesuai dengan standart, pengawet yang digunakan sebagai antibakteri saja, terdapat bahan berbahaya dan logam berat yang dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri, maupun adanya kompetisi nutrisi antara kapang dengan bakteri. Bahan berbahaya dan logam berat dapat menyebabkan iritasi kulit hingga penyakit kulit yang serius. Logam berat mampu berikatan dengan gugus sulfhidril dari protein sehingga terjadi denaturasi protein dan menyebabkan bakteri lisis (Murphy *et al.* 2015 & Muhammed 2017).



Gambar 16. Identifikasi Kapang dan Khamir Sampel G

8. Sampel H

Sampel H terdapat pertumbuhan khamir pada media SDA, koloninya berbentuk bulat, kecil, berwarna krem, serupa pada kontrol *Candida albicans* ATCC 10231.



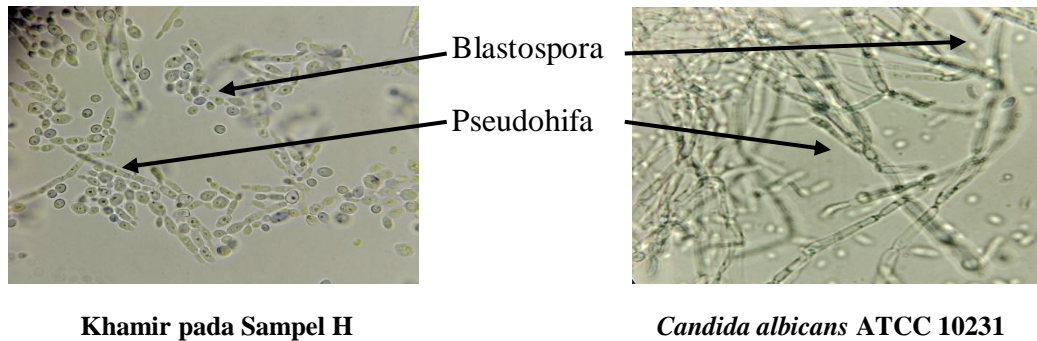
Candida albicans ATCC 10231



Khamir Sampel H

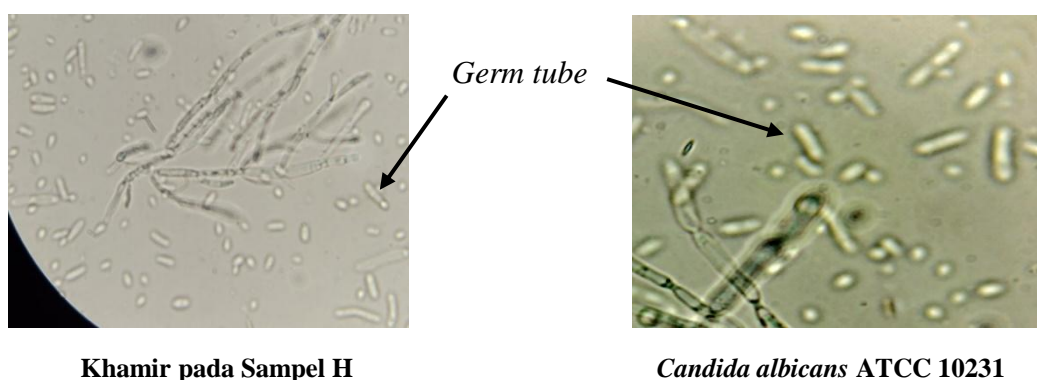
Gambar 17. Identifikasi Kapang dan Khamir

Pewarnaan dari sampel H, terdapat pseudohifa, dan blastospora, stuktur tersebut mirip dengan *Candida albicans* ATCC 10231.



Gambar 18. Identifikasi Kapang dan Khamir Sampel H

Pengujian lebih lanjut dengan serum kelinci, terdapat *germ tube* serupa pada hasil *Candida albicans* ATCC 10231, sehingga sampel dinyatakan positif *Candida albicans*. Serum mengandung berbagai macam protein yang dibutuhkan *Candida albicans* untuk membentuk sel hifa dan molekul-molekul perlekatan, serta integritas biofilm. *Candida albicans* bersifat patogen dilihat dari kemampuannya yang mampu membentuk *germ tube*, adanya perubahan bentuk dari khamir menjadi hifa merupakan faktor virulensinya. Pseudohifa ini lebih virulen karena ukurannya lebih besar dan sulit difagositosis, serta terdapat blastokonidia multiple pada satu filamen (Kabir *et al.* 2012; Irianto 2013). Nilai AKK pada sampel ini sebesar $>1,5 \times 10^5$ ($2,1 \times 10^5$), lebih dari 10^3 koloni/gram.



Gambar 19. Germ tube Sampel H

Sampel H terdapat pertumbuhan bakteri pada media NA, VJA, tetapi pada media PSA tidak terdapat bakteri yang tumbuh. Koloni bakteri yang tumbuh di media NA jumlahnya pada tiap replikasi berbeda, dan tidak terdapat bakteri yang

tumbuh pada pengenceran kedua atau ketiga, hal ini karena jumlah bakteri yang sudah sedikit di awal pengenceran pertama. Nilai ALT yang didapat sebesar $< 3,0 \times 10^2$ (2×10^1), sehingga dibawah 10^3 koloni/gram. Koloni yang tumbuh pada media VJA berbentuk bulat, kecil, berwarna krem, dan terdapat media yang berubah menjadi kuning, seperti di lampiran 12. Warna kuning ini menunjukkan bakteri mampu memfermentasi manitol. Pemeriksaan lanjutan dengan pewarnaan Gram, hasilnya berbentuk bulat tetapi bagian salah satu ujung agak lancip, dan ukurannya lebih besar daripada sel bakteri. Koloni ini diduga khamir, dan untuk pemastian dilakukan pemurnian koloni dari VJA ke media SDA. Koloni tersebut pada media SDA berbentuk bulat, kecil hingga sedang, dan berwarna krem. Struktur serupa dengan *Candida albicans* ATCC 10231, sehingga dinyatakan koloni tersebut *Candida albicans*. *Candida albicans* dapat tumbuh di media VJA karena adanya kandungan karbohidrat atau manitol yang tinggi, dimana khamir membutuhkan kandungan karbohidrat yang tinggi (Irianto 2013). Sampel ini dinyatakan tidak memenuhi syarat mikrobiologis karena nilai AKK yang melebihi batas, dan adanya *Candida albicans* yang dapat berubah menjadi patogen dan menyebabkan penyakit kandidiasis (Jawetz *et al.* 2013).



Sebelum pemurnian

Pemurnian di SDA

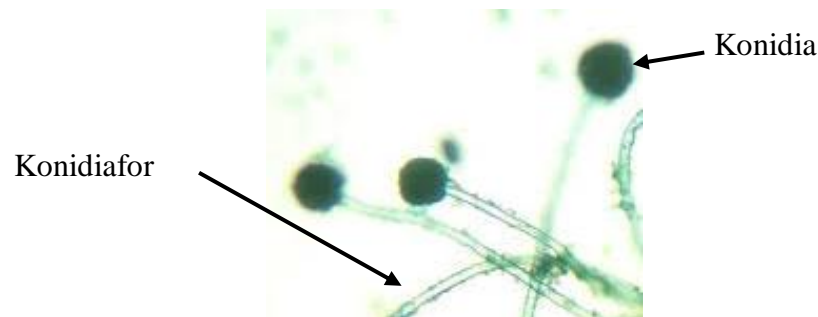
Sesudah pemurnian

Gambar 20. Identifikasi Koloni di Media VJA Sampel H

9. Sampel I

Sampel I terdapat koloni bakteri di media NA, dan tidak terdapat koloni pada media VJA dan PSA. Nilai ALT pada media $< 3,0 \times 10^3$ ($2,4 \times 10^2$), dibawah 10^3 koloni/gram sehingga memenuhi syarat nilai ALT. Media SDA ditumbuhi oleh kapang pada replikasi pertama (pengenceran pertama) dan replikasi kedua (pengenceran kedua), seperti di lampiran 13. Koloni tidak tumbuh pada

pengenceran pertama, kemungkinan karena jumlah spora yang sangat sedikit dan saat pengambilan suspensi spora yang terambil di pengenceran kedua saja, ataupun terjadi kontaminasi walaupun pengerjaannya sudah dilakukan seaseptis mungkin. Koloni kapang pada pengenceran kedua berbentuk bulat besar hingga menutupi petri, sedangkan pada pengenceran pertama tidak terlalu besar, berwarna putih hingga krem, terdapat spora berwarna hitam, dan telah muncul hifanya. Pewarnaan dari stuktur kapang tersebut, terlihat konidia yang berkumpul menjadi bulatan dan berwarna hitam, serta terdapat konidiafor, diduga kapang tersebut merupakan *Aspergillus sp.*



Gambar 21. Identifikasi Kapang dan Khamir pada Sampel H

Spora dari *Aspergillus sp.* jika terhirup dapat menyebabkan penyakit aspergillosis pada paru-paru dan menyebar dengan cepat melalui aliran darah menuju ke otak, jantung, ginjal, dan kulit. Infeksi aspergillosis pada kulit berupa pembengkakan pada salah satu bagian pipi, dan lesi kulit (Hasanah 2017). Koloni yang sangat besar hingga menutupi petri tidak dihitung dalam nilai AKK, sehingga nilai $< 3,0 \times 10^2$ ($0,3 \times 10^1$) dibawah 10^3 koloni/gram sehingga memenuhi syarat nilai AKK.

10. Sampel J

Sampel J terdapat pertumbuhan bakteri pada media NA, tetapi pada media VJA dan PSA tidak terdapat koloni bakteri yang tumbuh. Pengenceran pertama pada media NA terdapat beberapa koloni yang menjadi satu koloni besar, hal ini karena bakteri tidak dapat memisah menjadi satu koloni yang tunggal. Koloni yang berkumpul menjadi satu, dalam nilai ALT tetap dihitung menjadi satu walaupun koloninya sangat besar, namun tidak melebihi setengah dari petri. Replikasi pertama pengenceran ketiga didapatkan jumlah koloni yang lebih besar daripada pengenceran pertama dan kedua, hal ini karena bakteri pada pengenceran

pertama merupakan koloni-koloni yang bergabung menjadi satu. Nilai ALT sebesar $7,7 \times 10^2$ kurang dari 10^3 koloni/gram, sehingga sampel J dinyatakan memenuhi syarat mikrobiologis. Nilai AKK yang negatif sedangkan terdapat nilai ALT, menandakan kandungan air atau kelembapan rendah dari produk sehingga kapang dan khamir tidak tumbuh (Radji 2010).

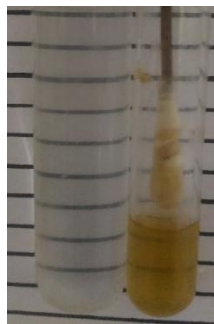
E. Pertahanan Kulit

Kontaminasi mikroba dalam kosmetik dapat menyebabkan infeksi kulit karena mikroba akan berkolonisasi ataupun masuk pada permukaan kulit yang luka atau terbuka, folikel rambut maupun kelenjar keringat. Mikroba patogen dapat menyebabkan infeksi jika mampu bertahan dalam kompetisi dengan mikroflora untuk mendapatkan tempat kolonisasi dan nutrisi untuk bertahan hidup. Kosmetik yang terkontaminasi mikroba tidak selalu menimbulkan infeksi dan iritasi, hal ini tergantung dari kondisi kulit dan imunitas dari tubuh. Kelembaban, suhu, pH pada kulit berpengaruh, apabila suhu lebih dari 35°C , pH 6-8, dan kelembaban yang tinggi merupakan kondisi yang optimum untuk mikroba berkembang cepat. Pertahanan kulit lainnya berupa proses keratinasi, yang menyebabkan kolonisasi mikroba pada permukaan kulit akan ikut terbuang saat proses pembuangan sel-sel kulit mati. Kelenjar keringat mensekresi lizozim yang dapat menghalangi pertumbuhan dari bakteri melalui perusakan dinding peptidoglikan. Kulit memiliki suatu jaringan pertahanan berupa *skin associated lymphoid tissue* (SALT), sehingga menyebabkan mikroba sulit menembus kulit bagian dalam. Kehilangan SALT terutama pada orang yang mengalami luka bakar serius, menyebabkan mikroba patogen dapat berpenetrasi dan berdistribusi ke pembuluh darah, dan menyebabkan infeksi local maupun sistemik. *Proteus mirabilis* tidak menyebabkan infeksi pada kulit, melainkan infeksi pada saluran kemih (ISK), kemungkinan dapat menyebabkan ISK jika mampu menembus SALT dan berpenetrasi ke pembuluh darah (Tranggono & Latifah 2014; Kuswiyanto 2016).

F. Uji Sensitivitas Antibiotik

Uji sensitivitas bakteri patogen dalam kosmetik dilakukan untuk mengatasi infeksi yang disebabkan bakteri patogen tersebut. Bakteri dalam kosmetik tidak menutup kemungkinan terjadi resistensi. Resistensi bisa terjadi karena faktor alam dan host. Faktor alam terjadi akibat pengaruh dari lingkungan, kompetisi dengan mikroba lain untuk mendapatkan nutrisi, sehingga akan membentuk suatu sistem pertahanan yang baru untuk bertahan hidup. Bakteri yang resisten juga terjadi karena adanya mutasi gen berupa perubahan nukleotida pada genom, dan adanya transfer gen resisten antar bakteri yang dimediasi oleh faga, transformasi dan konjugasi bakteri. Faktor host terjadi karena bakteri dalam tubuh telah mengalami resistensi kemudian tersebar melalui udara (saat batuk, bersin, dsb), air, dan tenaga kerja (tangan) saat produksi (Cornelissen *et al.* 2015).

Koloni bakteri yang positif *Staphylococcus aureus* pada sampel D diuji sensitivitasnya dengan metode difusi cakram. Koloni bakteri disuspensikan pada media BHI dan disesuaikan dengan standart Mc. Farland 0,5 atau setara dengan $1,5 \times 10^8$ cfu/ml.



Gambar 22 Suspensi Bakteri Sampel D

Suspensi tersebut diinokulasikan pada media MHA dengan cara perataan dan kemudian diletakan cakram antibiotik klindamisin, gentamisin, amoksisilin, dan vankomisin. Inkubasi dilakukan pada suhu 37° selama 24 jam, kemudian diperiksa zona hambat (zona bening disekeliling cakram) yang terbentuk. Zona hambat ini diukur kemudian dibandingkan dengan kontrol dan tabel zona hambat dari CLSI 2017.

Tabel 3. Zona Hambat Antibiotik

| | Antibiotik | Replikasi 1 (mm) | Replikasi 2 (mm) | Replikasi 3 (mm) | Interprestasi Hasil |
|-----------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------------|
| Kontrol | Ampisilin | 15 | 16 | 14 | R |
| | Klindamisin | 27 | 27 | 26 | S |
| | Vankomisin | 18 | 18 | 19 | S |
| | Gentamisin | 23 | 23 | 22 | S |
| Sampel D | Ampisilin | 28 | 29 | 27 | S |
| | Klindamisin | 31 | 31 | 32 | S |
| | Vankomisin | 20 | 21 | 21 | S |
| | Gentamisin | 30 | 30 | 29 | S |

Keterangan:

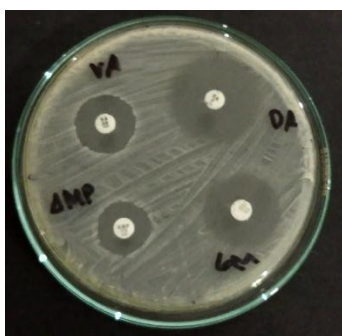
Kontrol : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

S : Sensitif

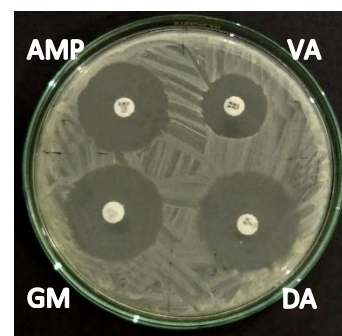
R : Resisten

I : Intermediet

Uji sensitivitas bakteri *Staphylococcus aureus* dari sampel D, dibandingkan dengan kontrol bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 didapatkan hasil seperti pada tabel 2. Bakteri yang ada dalam sampel maupun kontrol, jika dibandingkan dengan tabel CLSI didapatkan hasil semuanya sensitif kecuali bakteri kontrol terhadap antibiotik ampisilin yang kurang sensitif atau resisten. Bakteri yang ada dalam sampel lebih sensitif dibandingkan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, sehingga dapat dinyatakan bahwa bakteri tersebut patogenitasnya lebih ringan daripada bakteri ATCC.



Staphylococcus aureus ATCC 25923



Staphylococcus aureus pada Sampel D

Gambar 23. Uji Sensitivitas Antibiotik

Staphylococcus aureus ATCC 25923 kurang sensitif karena banyak digunakan untuk pengujian sensitivitas bakteri terhadap antibiotik. Bakteri *Staphylococcus aureus* dari sampel D sensitif terhadap antibiotik atau tidak terlalu patogen karena bakteri tersebut berada dalam kosmetik, dimana dalam proses produksi kosmetik kemungkinan terpapar antibiotik kecil, selain itu kemungkinan kondisi bakteri yang belum terjadi resistensi dalam personalia maupun lingkungan produksi.

Staphylococcus aureus dapat menyebabkan berbagai infeksi kulit seperti ruam, impetigo, dan folikulitis. *Staphylococcus aureus* dari sampel D sensitif terhadap antibiotik ampisilin, klindamisin, gentamisin, dan vankomisin karena ampisilin dan vankomisin mekanisme kerjanya dengan mengganggu sintesis dinding sel, klindamisin akan mengganggu proses translasi pada ribosom sub unit 50s, sedangkan gentamisin mengganggu proses translasi pada ribosom sub unit 50s (Goodman & Gilman 2012; Tjay & Rahardja 2013). Antibiotik-antibiotik tersebut dapat digunakan untuk mengobati infeksi kulit yang terjadi akibat penggunaan krim pemutih wajah sampel D.

Uji sensitivitas antifungi pada *Candida albicans* tidak dilakukan karena berdasarkan literatur, pengobatan untuk *Candida albicans* menunjukkan hasil sensitivitasnya tinggi sebesar $\pm 92\%$ terhadap beberapa antifungi (Nirwati *et al.* 2013; Sarbu *et al.* 2016).