



**DAYA HAMBAT EKSTRAK BUAH DELIMA MERAH
(*Punica granatum Linn*) TERHADAP PERTUMBUHAN
*Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh:

Erlita Prestiandari

NIM 141610101016

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

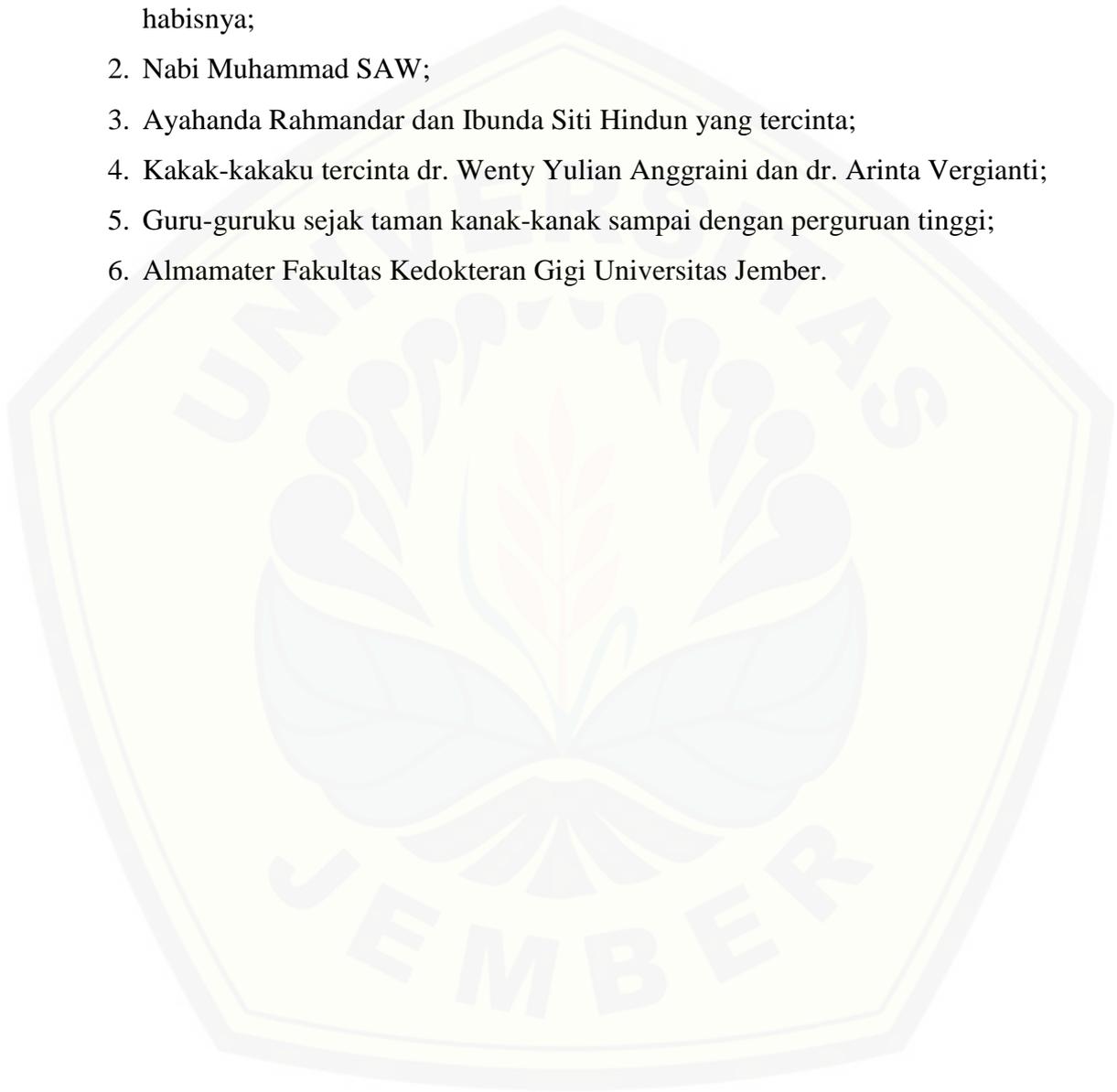
UNIVERSITAS JEMBER

2018

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas limpahan rahmat, hidayah, kemudahan dan berkah yang tiada habisnya;
2. Nabi Muhammad SAW;
3. Ayahanda Rahmandar dan Ibunda Siti Hindun yang tercinta;
4. Kakak-kakaku tercinta dr. Wenty Yulian Anggraini dan dr. Arinta Vergianti;
5. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



MOTO

“Jika engkau berada di sore hari, jangan menunggu datangnya pagi dan jika engkau berada pada waktu pagi hari, jangan menunggu datangnya sore. Pergunakanlah masa sehatmu sebelum sakit dan masa hidupmu sebelum mati.”

(HR. Bukhari)

“Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari suatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain).

Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap”

(QS. Al-Insyirah: 6-8)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Erlita Prestiandari

NIM : 141610101016

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Daya Hambat Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum Linn*) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 19 Januari 2018

Yang menyatakan,

Erlita Prestiandari

NIM 141610101016

SKRIPSI

**DAYA HAMBAT EKSTRAK BUAH DELIMA MERAH
(*Punica granatum Linn*) TERHADAP PERTUMBUHAN
*Staphylococcus aureus***

Oleh:

Erlita Prestiandari

NIM 141610101016

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. drg. Sri Hernawati, M. Kes

Dosen Pembimbing Anggota : drg. Leni Rokhma Dewi, Sp. PM

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul "Daya Hambat Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum Linn*) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*" telah diuji dan disahkan pada :
hari, tanggal : Jumat, 19 Januari 2018
tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Utama

Penguji Anggota

drg. Pujiana Endah Lestari, M. Kes.

NIP. 197608092005012002

drg. Ayu Mashartini Prihanti, Sp. PM

NIP. 198412212009122006

Pembimbing Utama

Pembimbing Anggota

Dr. drg. Sri Hernawati, M. Kes.

NIP. 19700705200312001

drg. Leni Rokhma Dewi, Sp. PM

NRP. 760009241

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas jember,

drg. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp. Pros.

NIP. 196901121996011001

RINGKASAN

Daya Hambat Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum Linn*) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*; Erlita Prestiandari; 141610101016; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Staphylococcus aureus merupakan mikroorganisme yang paling banyak dijumpai pada *angular cheilitis*. *Angular cheilitis* adalah peradangan pada salah satu sudut mulut atau kedua sudut mulut dapat meluas melibatkan komisura bibir dan kulit sekitarnya. Karakteristik dari *angular cheilitis* adalah terdapat erosi, fissure, ulserasi, dan kemerahan disertai sensasi terbakar, nyeri dan kekeringan di sudut mulut. Prevalensi terjadinya *angular cheilitis* yaitu 0,2-15,1% pada anak-anak dan 0,7-3,8% pada orang dewasa. Selama ini perawatan yang dianggap sangat efektif terhadap *angular cheilitis* yang disebabkan oleh *S. aureus* adalah antibiotik asam fusidat. Antibiotik ini efektif terhadap berbagai bakteri Gram positif terutama bakteri *S. aureus*, namun dapat meningkatkan resiko resistensi apabila pemakaian jangka panjang. Selain itu, juga memiliki efek samping seperti *skin rash*, *urticaria*, dan iritasi pada sekitar infeksi. Dalam mengatasi resiko dan efek samping dari antibiotik, maka diperlukan alternatif pengobatan lain. Salah satu alternatif dengan menggunakan tanaman herbal, yaitu buah delima merah. Buah delima merah (*Punica granatum Linn*) mengandung *flavonoid* dan *phenol* yang diduga sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat ekstrak buah delima merah terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian *experimental laboratories* dengan menggunakan rancangan *the post test only control group design*. Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober sampai November 2017 di Laboratorium Bioscience Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Jumlah keseluruhan sampel penelitian yang digunakan sebanyak 36 sampel; terdiri dari 6 kelompok penelitian yaitu ekstrak buah delima merah dengan konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%, antibiotik asam fusidat (kontrol positif) dan aquades steril (kontrol negatif) dengan besar sampel sebanyak 6 untuk setiap kelompok

penelitian. Metode uji antibakteri yang digunakan adalah disk difusi. Masing-masing kelompok perlakuan, kontrol positif, dan kontrol negatif diteteskan pada *blank paper disk* sebanyak 20 μ L dengan menggunakan mikropipet. Kemudian disk diletakkan pada media MHA yang telah diinokulasi suspensi bakteri dengan menggunakan pinset steril. Hal tersebut diulangi pada petridish ke-2, 3, 4, 5, dan 6. Semua petridish dimasukkan dalam desikator dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C \pm 2 °C menggunakan inkubator. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dan data dicatat dalam satuan milimeter.

Data hasil pengamatan ditabulasi dan dilakukan analisis secara statistik. Berdasarkan hasil uji *Kolmogorov-Smirnov* dan uji *Levene's test* maka didapatkan data hasil penelitian berdistribusi normal dan homogen sehingga dilanjutkan dengan uji statistik parametrik *One Way Anova*. Hasil uji *One Way Anova* didapatkan nilai signifikansi (p) sebesar 0,000 ($<0,05$) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada seluruh kelompok penelitian. Setelah uji *One Way Anova*, maka dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*). Hasil uji LSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antar kelompok penelitian yang ditandai dengan nilai signifikansi (p) lebih kecil dari 0,05, kecuali pada kelompok M75 dengan kelompok M100.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak buah delima merah, maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk. Berdasarkan kategori Davis dan Stout, maka dapat diketahui bahwa ekstrak buah delima merah dengan konsentrasi 100%, 75%, 50%, dan 25% sudah memiliki kemampuan yang baik dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* dengan kategori kuat.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak buah delima merah (*Punica granatum Linn*) memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Konsentrasi ekstrak buah delima merah yang memiliki daya hambat terbesar terhadap pertumbuhan *S. aureus*, yaitu konsentrasi 75% dan 100%.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Daya Hambat Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum Linn*) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusun skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tuaku tercinta; Papa Rahmandar dan Mama Siti Hindun, yang tidak pernah lelah memberikan doa, nasihat, semangat, dukungan serta perhatian yang penuh dengan kasih sayang kepada saya;
2. drg. Rahardyan Parnaadji, M. Kes., Sp. Pros sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M. Kes. sebagai Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
4. Dr. drg. Sri Hernawati, M. Kes. sebagai Wakil Dekan II Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan pembimbing utama yang telah meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan dan motivasi dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
5. drg. Izzata Barid, M. Kes., sebagai Wakil Dekan III Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
6. drg. Leni Rokhma Dewi, Sp. PM sebagai pembimbing anggota yang telah banyak meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, saran, nasihat dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
7. drg. Pujiana Endah Lestari, M. Kes., sebagai penguji ketua, dan drg. Ayu Mashartini Prihanti, Sp. PM, sebagai penguji anggota yang telah meluangkan waktu untuk membaca, memberikan kritik dan saran dalam penulisan skripsi ini;

8. Kakak-kakakku yang tercinta, dr. Wenty Yulian Anggraini dan dr. Arinta Vergianti yang telah menjadi teladan, memberikan contoh dan pengalaman, serta motivasi dan doa;
9. Kakak-kakak iparku, Eddien Nurhadiansah Putra S.T dan Angga Prima Soekarno S.T yang juga memberi dukungan dan doa;
10. Kedua keponakanku Eshaal dan Naira yang selalu memberikan keceriaan;
11. Keluarga besar Moh. Sale dan keluarga besar Mansoer-Fatimah yang telah memberikan doa dan mendukung cita-cita saya menjadi seorang dokter gigi;
12. Sahabatku dari jaman putih abu-abu, Putri Lilia Rosa yang selalu ada di saat suka maupun duka;
13. *Kost-mate* tercinta dari maba sampai sekarang, Najla Irhamni Phasa, Azizah Safaatin, dan Arina Nur Rahmah yang selalu ada di saat aku suka maupun duka dan yang selalu sabar mendengarkan keluh kesahku selama perkuliahan;
14. Teman nge-*pump*-ku, Hanifah Nailul Amania dan Tazqia Jamil Pratami yang bersedia menemani bermain dikala jenuh dan suntuk selama perkuliahan dan penyelesaian skripsi ini;
15. Teman seperjuangan dalam penelitian Fadhilah Rusmaputeri dan Kholisa;
16. Staff Laboratorium Bioscience Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
17. Staff Akademik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
18. Teman-teman seperantauan G14Smansa [JEMBER];
19. Seluruh teman-teman LECI FKG 2014, terima kasih atas motivasi, kerja sama, kekeluargaan, dan kekompakkannya selama ini;
20. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 19 Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

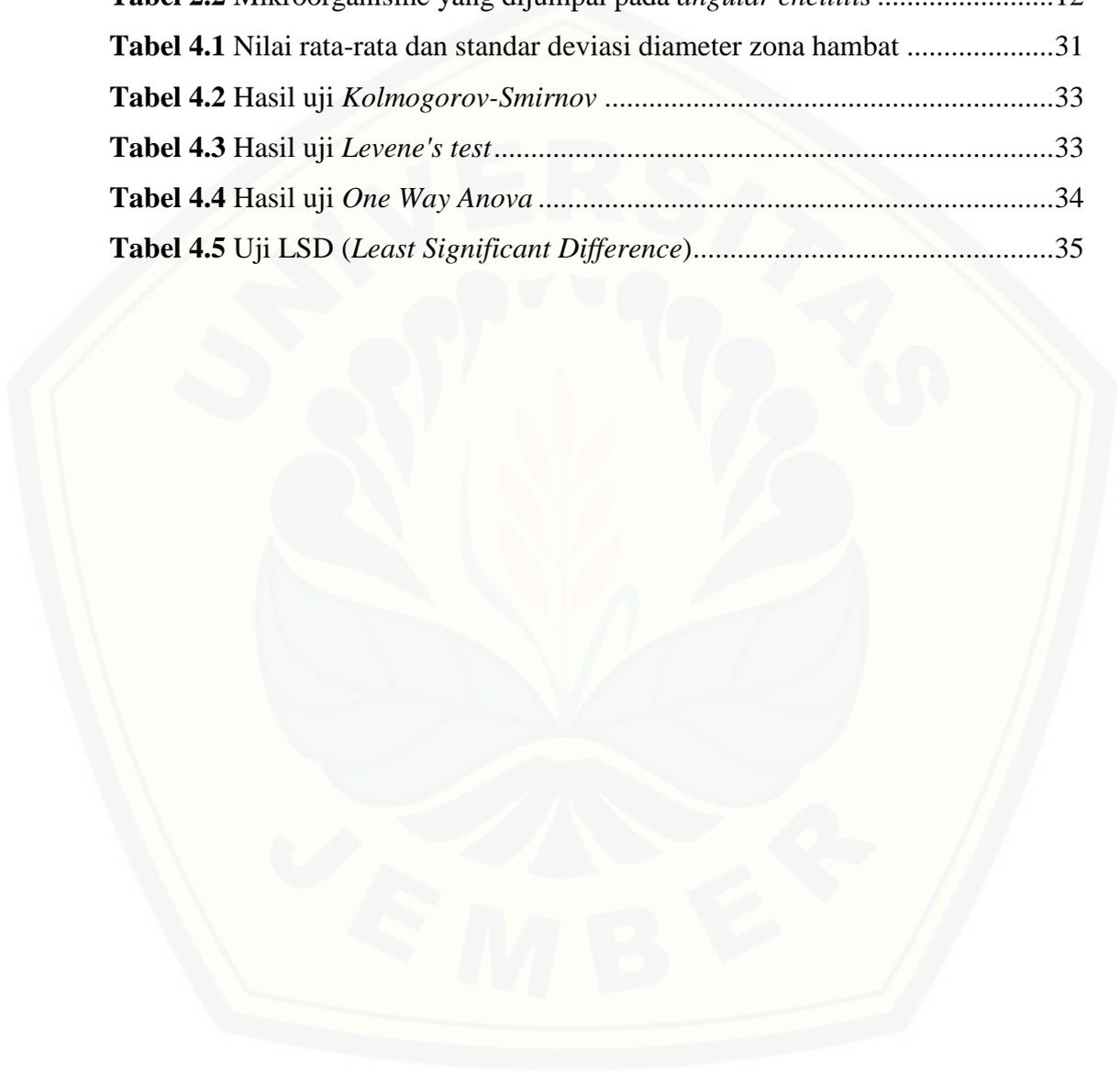
| | Halaman |
|--|---------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PERSEMBAHAN | ii |
| HALAMAN MOTO | iii |
| HALAMAN PERNYATAAN | iv |
| HALAMAN PEMBIMBINGAN | v |
| HALAMAN PENGESAHAN | vi |
| RINGKASAN | vii |
| PRAKATA | ix |
| DAFTAR ISI | xi |
| DAFTAR TABEL | xiv |
| DAFTAR GAMBAR | xv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xvi |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Perumusan Masalah | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 4 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 4 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA | 5 |
| 2.1 Buah Delima | 5 |
| 2.1.1 Morfologi Buah Delima | 5 |
| 2.1.2 Taksonomi Buah Delima Merah | 6 |
| 2.1.3 Komponen Bioaktif Buah Delima Merah | 7 |
| 2.2 Asam Fusidat | 9 |
| 2.3 <i>Angular cheilitis</i> | 10 |
| 2.3.1 Definisi <i>Angular cheilitis</i> | 10 |
| 2.3.2 Etiologi <i>Angular cheilitis</i> | 11 |
| 2.4 <i>Staphylococcus aureus</i> | 13 |
| 2.4.1 Taksonomi <i>Staphylococcus aureus</i> | 13 |

| | |
|---|----|
| 2.4.2 Morfologi <i>Staphylococcus aureus</i> | 13 |
| 2.4.3 Pertumbuhan dan Pembenuhan <i>Staphylococcus aureus</i> | 14 |
| 2.4.4 Patogenesis dan Infeksi <i>Staphylococcus aureus</i> | 15 |
| 2.5 Kerangka Konseptual | 16 |
| 2.6 Penjelasan Kerangka Konseptual | 16 |
| 2.7 Hipotesis | 17 |
| BAB 3. METODE PENELITIAN | 18 |
| 3.1 Jenis Penelitian | 18 |
| 3.2 Tempat Penelitian | 18 |
| 3.3 Waktu Penelitian | 18 |
| 3.4 Identifikasi Variabel Penelitian | 18 |
| 3.4.1 Variabel Bebas..... | 18 |
| 3.4.2 Variabel Terikat..... | 18 |
| 3.4.3 Variabel Kendali..... | 18 |
| 3.5 Definisi Operasional | 19 |
| 3.5.1 Ekstrak Buah Delima Merah (<i>Punica granatum Linn</i>) | 19 |
| 3.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i> | 19 |
| 3.5.3 Hambatan Pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i> | 19 |
| 3.5.4 Media Biakan Bakteri..... | 19 |
| 3.5.5 Suspensi <i>Staphylococcus aureus</i> | 20 |
| 3.5.6 Suhu dan Durasi Inkubasi..... | 20 |
| 3.5.7 Alat Ukur | 20 |
| 3.6 Sampel Penelitian | 20 |
| 3.6.1 Sampel Penelitian | 20 |
| 3.6.2 Besar Sampel Penelitian | 20 |
| 3.6.3 Pembagian Kelompok Sampel | 21 |
| 3.7 Alat dan Bahan | 21 |
| 3.7.1 Alat | 21 |
| 3.7.2 Bahan | 22 |
| 3.8 Prosedur Penelitian | 23 |
| 3.8.1 Tahap Persiapan..... | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 3.8.2 Tahap Perlakuan | 26 |
| 3.8.3 Tahap Pengamatan..... | 28 |
| 3.9 Analisa Data | 29 |
| 3.10 Alur Penelitian | 30 |
| BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 31 |
| 4.1 Hasil Penelitian | 31 |
| 4.2 Pembahasan | 35 |
| BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN..... | 40 |
| 5.1 Kesimpulan | 40 |
| 5.2 Saran..... | 40 |
| DAFTAR PUSTAKA | 41 |
| LAMPIRAN..... | 47 |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|---|---------|
| Tabel 2.1 Komponen bioaktif buah delima | 7 |
| Tabel 2.2 Mikroorganisme yang dijumpai pada <i>angular cheilitis</i> | 12 |
| Tabel 4.1 Nilai rata-rata dan standar deviasi diameter zona hambat | 31 |
| Tabel 4.2 Hasil uji <i>Kolmogorov-Smirnov</i> | 33 |
| Tabel 4.3 Hasil uji <i>Levene's test</i> | 33 |
| Tabel 4.4 Hasil uji <i>One Way Anova</i> | 34 |
| Tabel 4.5 Uji LSD (<i>Least Significant Difference</i>)..... | 35 |



DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|---|---------|
| Gambar 2.1 Buah delima merah..... | 6 |
| Gambar 2.2 Struktur dasar dari <i>flavonoid</i> | 8 |
| Gambar 2.3 <i>Angular cheilitis</i> | 10 |
| Gambar 2.4 Etiologi <i>angular cheilitis</i> | 11 |
| Gambar 2.5 <i>Staphylococcus aureus</i> | 14 |
| Gambar 2.6 Kerangka konseptual | 16 |
| Gambar 3.1 Perbandingan ekstrak buah delima merah dengan aquades | 25 |
| Gambar 3.2 Peletakan disk pada media..... | 27 |
| Gambar 3.3 Cara pengukuran diameter zona hambat | 28 |
| Gambar 3.4 Alur penelitian | 30 |
| Gambar 4.1 Zona hambat yang terbentuk di sekitar disk | 31 |
| Gambar 4.2 Histogram nilai rata-rata diameter zona hambat | 32 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|---|---------|
| Lampiran A. Surat Keterangan Identifikasi Buah Delima Merah..... | 47 |
| Lampiran B. Surat Keterangan Identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i> | 48 |
| Lampiran C. Penghitungan Pengenceran Ekstrak..... | 49 |
| Lampiran D. Penghitungan Pembuatan Ekstrak..... | 51 |
| Lampiran E. Penghitungan Rendemen Ekstrak..... | 51 |
| Lampiran F. Dokumentasi Penelitian..... | 52 |
| Lampiran G. Alat dan Bahan..... | 58 |
| Lampiran H. Data Hasil Penelitian..... | 62 |
| Lampiran I. Analisis Data..... | 63 |

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif, berbentuk kokus dan tersusun seperti buah anggur (Jawetz, 2005). Bakteri ini merupakan salah satu mikroflora normal yang berada di dalam mulut, bilamana dipengaruhi oleh faktor predisposisi seperti perubahan kuantitas mikroorganisme menjadi tidak seimbang dan penurunan daya tahan tubuh *host*, maka dapat menyebabkan infeksi (Syahrurachman, 2010). Salah satu infeksi pada rongga mulut dan sekitarnya yang dapat disebabkan oleh *S. aureus* adalah *angular cheilitis* (Smith, 2001). Hal ini sesuai dengan hasil suatu penelitian menemukan bahwa *S. aureus* menjadi mikroorganisme yang paling banyak dijumpai pada penderita *angular cheilitis* dengan 33,3%, sedangkan *Candida tropicalis* merupakan mikroorganisme yang paling sedikit dijumpai dengan 3,3% (Yusran, 2011).

Angular cheilitis yang juga disebut *perleche* adalah peradangan pada salah satu sudut mulut atau kedua sudut mulut dapat meluas melibatkan komisura bibir dan kulit sekitarnya (Gandolfo, 2006). Karakteristik dari *angular cheilitis* adalah terdapat erosi, fissure, ulserasi, dan kemerahan disertai sensasi terbakar, nyeri dan kekeringan di sudut mulut. Pada kasus yang parah, sudut mulut bisa berdarah saat membuka mulut dan menyebabkan krusta. Perkembangan penyakit ini sangat cepat. Oleh karena itu, seharusnya tidak ada penundaan dalam pengobatan jika gejala *angular cheilitis* terjadi dan sangat jelas (Fajriani, 2017). Etiologi *angular cheilitis* biasanya dikarenakan infeksi *Staphylococcus aureus* atau *Candida albicans* dengan faktor predisposisi multipel lokal dan sistemik yang terlibat dalam inisiasi dan persistensi dari lesi. Beberapa faktor predisposisi tersebut di antaranya yaitu, defisiensi zat besi, kekurangan vitamin B, malabsorpsi (seperti *Crohn's disease*), diabetes, dan menurunnya dimensi vertikal karena penggunaan gigi tiruan (Gandolfo, 2006). *Angular cheilitis* merupakan kondisi umum, terhitung antara 0,2-15,1% lesi mukosa oral pada anak-anak dan antara 0,7-3,8% pada orang dewasa, walaupun kebanyakan lesi ini muncul pada orang dewasa usia

30-60 tahun. Lesi ini memiliki prevalensi di seluruh dunia, dan dapat terjadi pada laki laki maupun perempuan (Shahzad, 2014).

Selama ini perawatan yang dianggap sangat efektif terhadap *angular cheilitis* yang disebabkan oleh *S. aureus* adalah antibiotik asam fusidat. Obat ini dapat diaplikasikan pada sudut mulut (Shahzad, 2014). Antibiotik asam fusidat adalah derivat antibiotik dari jamur *Fusidium coccineum*. Aktivitasnya mirip dengan penisilin tetapi lebih sempit. Asam fusidat bersifat bakterostatik dengan mekanisme kerja yaitu menghambat sintesis protein bakteri. Zat ini aktif terhadap berbagai bakteri Gram positif terutama bakteri *S. aureus*. Namun asam fusidat dapat meningkatkan resiko resistensi apabila pemakaian jangka panjang. Selain itu, juga memiliki efek samping seperti *skin rash*, *urticaria*, dan iritasi pada sekitar infeksi (Umar, 2012). Dalam mengatasi resiko resistensi serta efek samping dari antibiotik tersebut, maka diperlukan alternatif pengobatan alami.

Delima (*Punica granatum Linn*) merupakan salah satu tanaman herbal yang telah lama dimanfaatkan buahnya sebagai pengobatan dan pencegahan berbagai penyakit, di antaranya untuk terapi pencegahan kanker, penyakit kardiovaskuler, penyakit gigi dan mulut, dan proteksi terhadap radiasi ultraviolet (Jurenka, 2008). Delima adalah tanaman buah-buahan yang dapat tumbuh hingga 5–8 m. Tanaman ini diperkirakan berasal dari Iran, namun telah lama dikembangbiakan di daerah Mediterania. Tanaman ini juga banyak ditanam di daerah Cina Selatan dan Asia Tenggara (Hardana, 2015). Delima yang tersebar di Indonesia dikelompokkan berdasarkan warna buahnya, yakni delima putih, delima merah, dan delima hitam. Delima merah memiliki rasa lebih manis dan kandungan *flavonoid* lebih tinggi dibandingkan dengan delima putih (Asthon dkk., 2006; Astawan, 2008). Penelitian Ahmet dkk (2009) mendapati bahwa buah delima merah (*Punica granatum Linn*) mengandung *flavonoid* dan *phenol* yang diduga efektif sebagai antibakteri.

Kandungan *flavonoid* pada delima mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menghambat proses DNA gyrase pada bakteri. *Quercetin* (salah satu *flavonoid* pada delima) mampu membunuh bakteri dengan cara meningkatkan permeabilitas dari membran di dalam bakteri dan merusak

potensial membran, menyebabkan produksi ATP bakteri terganggu, mengganggu transport membran dan pergerakan dari bakteri. Kandungan *polifenol* pada delima dapat berperan sebagai antibakteri dengan cara mendenaturasi enzim, selain itu juga dapat melekat pada substrat seperti mineral, vitamin, karbohidrat sehingga tidak bisa digunakan bakteri untuk metabolismenya. *Polifenol* juga dapat terserap pada dinding sel menyebabkan gangguan pada struktur dan fungsi membran sel. (Parseh dkk, 2012; Lamb, 2005)

Pada saat ini telah banyak penelitian yang membuktikan bahwa buah delima merah (*Punica granatum Linn*) memiliki daya antibakteri. Pada penelitian yang dilakukan Prityhari (2017) dan Susetyo (2017), ekstrak buah delima merah terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Fusobacterium nucleatum* dan *Porphyromonas gingivalis*. Berdasarkan kedua penelitian pendahulu tersebut, maka dapat diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak buah delima merah, maka semakin besar pula diameter zona hambat yang dibentuk. Selain itu juga diketahui bahwa ekstrak buah delima merah memiliki besar daya hambat yang berbeda terhadap bakteri yang berbeda. Diameter zona hambat yang dihasilkan dengan pemberian ekstrak buah delima merah konsentrasi 100% yaitu 16,46 mm terhadap bakteri *Fusobacterium nucleatum* dan 19,10 mm terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Prityhari, 2017; Susetyo, 2017). Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penulis bermaksud melakukan penelitian lanjutan mengenai daya hambat ekstrak buah delima merah terhadap pertumbuhan *S. aureus* dengan menggunakan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%.

1.2 Perumusan Masalah

1. Apakah ekstrak buah delima merah mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*?
2. Jika ekstrak buah delima merah terbukti mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, berapakah konsentrasi yang memiliki kemampuan menghambat terbesar terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui kemampuan daya hambat ekstrak buah delima merah terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.
2. Mengetahui konsentrasi ekstrak buah delima merah yang memiliki kemampuan menghambat terbesar terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi tentang penggunaan ekstrak buah delima merah sebagai antibakteri di bidang kedokteran gigi.
2. Memberikan informasi tambahan dan menjadi acuan untuk melakukan penelitian lebih lanjut dalam mengembangkan pengetahuan di bidang kedokteran gigi.
3. Memberikan informasi kepada masyarakat dan tenaga kesehatan khususnya dalam mendukung upaya kesehatan gigi dan mulut dengan cara pemanfaatan salah satu tanaman herbal yaitu buah delima merah.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Buah Delima

Buah delima (*Punica granatum*) adalah tanaman yang berasal dari Iran, namun telah lama dikembangkan di daerah Mediterania. Bangsa Moor memberi nama salah satu kota kuno di Spanyol, Granada berdasarkan nama buah ini. Tanaman ini juga banyak ditanam di daerah Cina Selatan dan Asia Tenggara. Delima berasal dari Timur Tengah, tersebar di daerah subtropik sampai tropik. Buah delima telah digunakan sebagai obat tradisional di Amerika, Asia, Afrika dan Eropa untuk pengobatan berbagai jenis penyakit. Merujuk Papyrus Eber (salah satu tulisan medis tertua, dari sekitar tahun 1500-an), bangsa Mesir kuno menggunakan tumbuhan ini untuk mengobati infeksi cacing dan parasit lain (Hardana, 2015).

2.1.1 Morfologi Buah Delima

Delima (*Punica granatum*) merupakan tanaman semak atau perdu meranggas yang dapat tumbuh dengan tinggi mencapai 5-8 meter. Tanaman buah delima tersebar mulai dari daerah subtropik hingga tropik, dari dataran rendah hingga ketinggian di bawah 1000 m dpl. Tanaman ini sangat cocok untuk ditanam di tanah yang gembur dan tidak terendam oleh air, serta air tanahnya tidak dalam (Madhawati, 2012).

Batang tanaman delima berbentuk kayu ranting yang bersegi, dan percabangan banyak tetapi lemah. Pada nodus (buku), terdapat duri. Saat masih muda, batang berwarna coklat dan berubah menjadi hijau kotor setelah tua. Daunnya tunggal dengan tangkai yang pendek dan letaknya berkelompok. Daun delima memiliki bentuk yang lonjong dengan pangkal yang lancip, ujung tumpul, tepi rata, pertulangan menyirip, dan permukaan mengkilap. Panjang daun bisa mencapai 1-9 cm dengan lebar 0,5-2,5 cm (Savitri, 2008).

Delima dapat berbunga sepanjang tahun, bunganya tunggal dengan tangkai pendek, serta keluar di ujung ranting yang paling atas. Bunga delima biasanya 1-5 kuntum berada di ujung ranting, berlilin, panjang dan lebarnya masing-masing 4-5

cm, daun kelopak dan penyangganya sama-sama 2-3 cm panjangnya. Bunga delima biasanya berwarna merah, putih dan ungu. Warna bunga dapat menentukan warna daging buah delima di dalamnya (Madhawati 2012).

Buah delima berbentuk bulat dengan diameter 5-12 cm, beratnya kurang lebih 100-300 gram, terdiri dari biji-biji kecil yang tersusun tidak beraturan (Desmond, 2000). Berdasarkan warna buahnya, buah delima dikelompokkan menjadi tiga yakni delima merah, delima putih, dan delima hitam. Dari ketiga jenis itu yang paling terkenal adalah delima merah (Gambar 2.1). Delima merah memiliki rasa lebih manis dan segar, sedangkan delima putih lebih sepat, kesat, dan kurang manis (Astawan, 2008).



Gambar 2.1 Buah delima merah (*Punica granatum Linn*) (Asthon, 2006)

2.1.2 Taksonomi Buah Delima Merah

Berdasarkan taksonominya, delima merah diklasifikasikan sebagai berikut.

Kingdom : *Plantae*
Division : *Magnoliophyta*
Class : *Magnoliopsida*
Subclass : *Rosidae*
Ordo : *Myrtales*
Family : *Lythraceae*
Genus : *Punica*
Species : *Punica granatum Linn*
(Yuniarti, 2008)

2.1.3 Komponen Bioaktif Buah Delima Merah

Selama dekade terakhir, telah banyak penelitian dilakukan untuk mengetahui efek terapi dari ekstrak buah, dahan, akar dan daun delima serta mengidentifikasi unsur bioaktif yang berperan di dalamnya (Tabel 2.1). Senyawa fenolik (*ellagic acid*, *ellagitannins* termasuk *punicalgin*), *punicic acid*, *flavonoid*, *anthosianidin*, *antosianin*, *flavones* dan *flavonols* memiliki efek terapi paling besar yang terdapat dalam buah delima (Jurenka, 2008).

Tabel 2.1 Komponen bioaktif buah delima (*Punica granatum* Linn)

| Bagian Tumbuhan | Zat Aktif |
|-----------------|---|
| Buah | Antosianin (<i>cyandinin</i> , <i>delphinidin</i>), asam askorbat, <i>caffeic acid</i> , <i>flavan-3-ols</i> (<i>catechin</i> , <i>epicatechin</i>), <i>flavonols</i> (<i>quercetin</i> , <i>rutin</i>), beberapa asam amino, Fe dan mineral lainnya. |
| Biji | <i>Punicic acid</i> , senyawa fenolik (<i>ellagic acid</i>), sterol dan <i>triterpenoids</i> (asam ursolat) |
| Pericarp | <i>Ellagitannins</i> (<i>punicalgins</i> , <i>punicalin</i>), <i>tannin</i> (asam gallic), <i>flavan-3-ols</i> (<i>Catechin</i> , <i>Epigallocatechin gallate</i>), <i>flavonols</i> (<i>quercetin</i> , <i>kaempferol</i> , <i>rutin</i>), <i>flovones</i> (<i>luteolin</i>), <i>flavonones</i> , <i>anthosianidin</i> |
| Daun | <i>Tanin</i> (<i>punicalin</i> dan <i>punicafolin</i>), dan <i>flavon glikosida</i> , termasuk <i>luteolin</i> dan <i>apigenin</i> |
| Bunga | asam gallic, asam ursolat; <i>triterpenoid</i> , termasuk <i>maslinic</i> dan asam asiatic; unsur lain yang tidak teridentifikasi |
| Akar | <i>Ellagitannin</i> , termasuk <i>punicalin</i> dan <i>punicalagin</i> ; alkaloid piperidin |

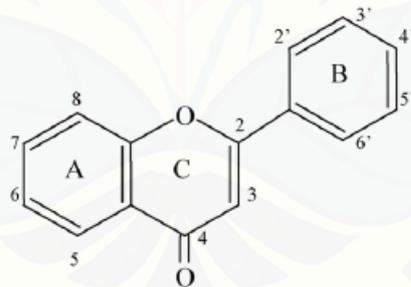
(Lansky, 2007; Jurenka, 2008)

Efek terapeutik delima erat hubungannya dengan senyawa kimia yang terkandung di dalamnya. Penelitian terkini mengungkapkan bahwa bahan yang paling memiliki nilai terapeutik di dalam delima adalah senyawa polifenol atau *phenolic*. Selain itu, senyawa kimia lain yang berperan yaitu asam *ellagic*, *tannin ellagic* atau *hydrolyzable* (termasuk *punicalagin*), asam lemak, *katekin*, *quercetin*, *antosianidin*, *antosianin*, asam *punicic*, *flavonoid*, dan *estyrogenic flavonols* dan *flavon* dan *alkaloid pelletierine* (Gunawan, 2004).

Phenolic adalah senyawa yang paling penting dalam aktifitas terhadap bakteri, contohnya adalah asam *gallic* yang diidentifikasi sebagai senyawa yang

paling aktif untuk uji penghambatan bakteri. Efek penghambatan senyawa *phenolic* dapat dijelaskan oleh adsorpsi ke membran sel, interaksi dengan enzim substrat dan mengurangi komposisi ion logam bakteri (Gunawan, 2004).

Flavonoid dilaporkan menunjukkan kemampuan aktifitas anti-inflamasi, *oestrogenic*, enzim *inhibition*, antimikroba, antialergi, antioksidan, dan aktifitas sitotoksis antitumor. Ekstrak *flavonoid* dari tanaman ini telah banyak digunakan dalam penelitian efek terhadap berbagai bakteri secara *in vitro*. *Flavonoid* memiliki mekanisme antibakteri dengan berbagai aktifitas, diantaranya dengan menghambat sintesis dari asam nukleat bakteri, menghambat fungsi membran sitoplasmik bakteri, dan menghambat metabolisme energi bakteri (Gunawan, 2004). Struktur dasar dari *flavonoid* adalah *2-phenyl-benzo[α]pyrane* atau inti *flavane*, yang terdiri dari 2 cincin benzena yang terhubung oleh cincin *pyrane* (Gambar 2.2). *Flavonoid* dapat diklasifikasikan berdasarkan biosintesisnya yaitu *calcones*, *flavanones*, *flavan-3-ols*, *flavan-3,4-diols* sementara klasifikasi lainnya merupakan proses akhir dari biosintesis yaitu *anthosianidin*, *proanthosianidin*, *flavones* dan *flavonol* (Cushnie dan Lamb, 2005).



Gambar 2.2 Struktur dasar dari *flavonoid* yang terdiri dari 2 cincin benzena (A dan B) serta cincin *pyrene* (C) (Cushnie dan Lamb, 2005)

Tannin merupakan senyawa fenolik yang larut dalam air dan biasanya memiliki berat molekul tinggi. Buah delima memiliki kandungan tannin yang sangat tinggi terutama *ellagic acid* dan *ellagitannin*. *Tannin* memiliki aktifitas antibakteri dengan mengikat makromolekul sehingga tidak tersedia bagi bakteri (Parseh dkk, 2012). *Tannin* juga mengikat ion besi, mengikat hidrogen, dan interaksi non-spesifik dengan protein vital misalnya enzim. (Karou dkk.,2005)

Senyawa lain yang berperan sebagai antibakteri yaitu *alkaloid*. *Alkaloid* memiliki aktivitas sebagai antibakteri karena senyawa ini dikenal sebagai interkalator DNA dan penghambatan sintesis DNA (Karou dkk., 2005). *Alkaloid* merupakan senyawa nitrogen heterosiklik yang mengandung paling sedikit satu atom nitrogen dan bersifat basa (Lenny, 2006). Gugus basa ini akan bereaksi dengan senyawa asam yang ada pada sel bakteri seperti DNA yang merupakan penyusun utama inti sel. Dengan terganggunya DNA, maka sintesis protein dan asam nukleat dalam sel akan terganggu (Cowan, 1999).

2.2 Asam Fusidat

Asam fusidat adalah sediaan topikal yang tidak tersedia di Amerika Serikat, tetapi terdapat di Kanada dan Eropa sebagai antibakteri. Asam fusidat adalah antibiotika steroidal dengan mekanisme kerja mempengaruhi fungsi faktor elongasi (EF-G) dengan menstabilkan EF-G-GDP-ribosome complex, mencegah translokasi ribosom dan daur ulang bentuk EF-G (Bonner, 2008).

Asam fusidat adalah derivat antibiotik dari jamur *Fusidium coccineum*. Aktivasinya mirip dengan penisilin tetapi lebih sempit. Asam fusidat bersifat bakteristatik dengan mekanisme kerja asam fusidat yaitu menghambat sintesis protein bakteri. Zat ini aktif terhadap berbagai bakteri Gram positif terutama bakteri *Staphylococcus aureus*. Asam fusidat tersedia dalam sediaan krim dengan komposisi tiap gram krim mengandung asam fusidat 20 mg. Krim dioleskan pada daerah yang terinfeksi 3-4 kali sehari dengan lama pengobatan sekitar 7 hari dan dapat digunakan dengan atau tanpa pembalut. Namun asam fusidat memiliki resistensi apabila pemakaian jangka panjang atau pemakaian berulang dapat meningkatkan resiko sensitisasi dan terjadinya resistensi antibiotik. Obat ini mempunyai sifat seperti sulfonamid yaitu mendesak bilirubin dari ikatannya dengan albumin sehingga terjadi ikterus pada neonatus. Oleh karena itu, sedapat mungkin pemberian obat ini harus dihindari pada bulan terakhir kehamilan (Umar, 2012).

2.3 *Angular cheilitis*

2.3.1 Definisi *Angular cheilitis*

Angular cheilitis atau disebut juga *perleche* atau *angular cheilosis* merupakan suatu lesi yang ditandai dengan adanya fisur, pecah-pecah pada sudut bibir, berwarna kemerahan, mengalami ulserasi serta disertai rasa terbakar, nyeri dan rasa kering pada sudut mulut (Gambar 2.3). Pada kasus yang parah, retakan tersebut dapat berdarah ketika membuka mulut dan menimbulkan ulser dangkal atau krusta (Burket's. 1994).



Gambar 2.3 *Angular cheilitis* (Farah, 2010)

Gejala awal *angular cheilitis* ialah rasa gatal pada sudut mulut dan terlihat tampilan kulit yang meradang dan bintik merah. Pada awalnya, hal ini tidak berbahaya, tetapi akan terasa nyeri di sudut mulut dan mudah berdarah yang dikarenakan oleh gerakan mulut seperti tertawa ataupun berbicara. Tingkat keparahan inflamasi ini ditandai dengan retakan sudut mulut dan beberapa pendarahan saat mulut dibuka (Murray, J.J. 2003).

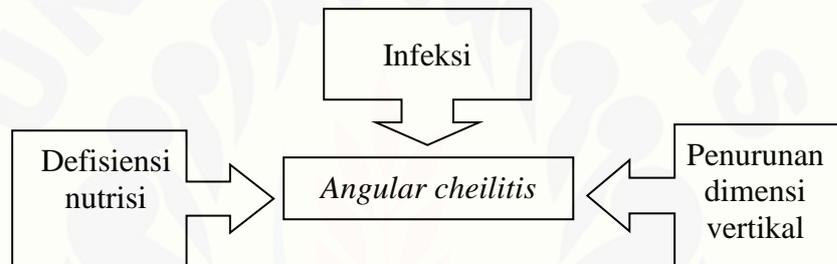
Angular cheilitis bisa menjadi masalah yang serius jika tidak ditangani dengan tepat. Perkembangan penyakit ini sangat cepat. Oleh karena itu, seharusnya tidak boleh ada keterlambatan dalam pengobatan jika gejala *angular cheilitis* telah terjadi dan sangat jelas. Hal ini tidak terbatas pada kelompok usia tertentu, baik usia anak-anak, remaja, maupun dewasa dapat terkena *angular cheilitis* tanpa melihat jenis kelamin (Fajriani, 2017).

Kasus unilateral pada *angular cheilitis* sering terjadi dikarenakan trauma perawatan dental dan trauma pada sudut bibir, sedangkan kasus bilateral terjadi jika penderita dengan penyakit sistemik seperti anemia, diabetes mellitus, dan

infeksi monomial yang kronis. Lama penyakit bisa bervariasi dari beberapa hari hingga beberapa tahun, tergantung etiologinya (Murray, J.J. 2003).

2.3.2 Etiologi *Angular cheilitis*

Etiologi *angular cheilitis* biasanya dikarenakan infeksi *Staphylococcus aureus* atau *Candida albicans* dengan faktor predisposisi multipel lokal dan sistemik yang terlibat dalam inisiasi dan persistensi dari lesi (Gambar 2.4). Beberapa faktor predisposisi tersebut di antaranya yaitu, defisiensi zat besi, kekurangan vitamin B, malabsorpsi (seperti *Crohn's disease*), diabetes, dan menurunnya dimensi vertikal karena penggunaan gigi tiruan (Gandolfo, 2006).



Gambar 2.4 Etiologi *angular cheilitis* (Scully, 2010)

a. Infeksi

Pada tahun 1986, Ohman melakukan penelitian mikrobiologi klinis yang melibatkan 64 pasien (31 pria dan 33 wanita) usia 18-89 tahun yang menderita *angular cheilitis* unilateral dan bilateral. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan tersebut didapatkan hasil bahwa *angular cheilitis* 20% disebabkan oleh kandidiasis, 60% oleh infeksi campuran antara *Candida* dengan bakteri, dan 20% disebabkan oleh bakteri saja. Meskipun *Candida* terdiri dari banyak spesies, namun *Candida albicans* diketahui sebagai mikroorganisme jamur yang paling sering menginfeksi manusia (Yusran, 2011).

Pada tahun 2011, Yusran dkk juga melakukan penelitian pada pasien *angular cheilitis* yang datang ke bagian Penyakit Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin dengan kriteria usia kurang dari 12 tahun. Berdasarkan penelitian yang melibatkan 30 sampel tersebut, nampak bahwa *Staphylococcus*

aureus menjadi mikroorganisme yang paling banyak dijumpai dengan 33,3%, sedangkan *Candida tropicalis* merupakan mikroorganisme yang paling sedikit dijumpai dengan 3,3% (Tabel 2.2).

Tabel 2.2 Mikroorganisme yang dijumpai pada *angular cheilitis*

| No | Mikroorganisme | Dijumpai pada (sampel) |
|---------------------|------------------------------------|------------------------|
| 1. | <i>Staphylococcus aureus</i> | 10 (33,3%) |
| 2. | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 8 (26,6%) |
| 3. | <i>Staphylococcus saproforicus</i> | 5 (16,6%) |
| 4. | <i>Streptococcus sp</i> | 3 (10%) |
| 5. | <i>Basil negative</i> | 3 (10%) |
| 6. | <i>Candida tropicalis</i> | 1 (3,3%) |
| Total Sampel | | 30 |

(Yusran dkk, 2011)

b. Defisiensi Nutrisi

Menurut *World Health Organization* (WHO), defisiensi nutrisi adalah ketidakseimbangan selular antara suplai makanan dan energi dengan kebutuhan tubuh untuk menjamin pertumbuhan, pemeliharaan, dan fungsi-fungsi spesifik. Defisiensi nutrisi yang sering terjadi pada penderita *angular cheilitis* antara lain adalah defisiensi vitamin B12 (*cobalamin*), vitamin B2 (*riboflvine*), vitamin B6 (*pyridoxine*), asam nikotinat (*niacin*), vitamin C (asam askorbat), dan Fe (besi) (Murray, 2003).

Anemia defisiensi besi tampaknya juga menjadi faktor predisposisi pada *angular cheilitis*. Berdasarkan hasil penelitian Zaidan tahun 2008, menunjukkan bahwa 35,3% pasien dengan *angular cheilitis* adalah anemia defisiensi besi yang serupa dengan hasil penelitian lain yang menemukan penurunan konsentrasi besi dalam plasma secara signifikan pada kelompok pasien dengan *angular cheilitis*.

Anemia defisiensi besi lebih sering terjadi pada wanita dibandingkan laki-laki. Hal ini dapat terjadi akibat kehilangan darah seperti pada pendarahan menstruasi. Dalam penelitian ini anemia defisiensi besi meningkat pada wanita pada kelompok umur 25-34 tahun dan pada kelompok ini empat pasien adalah wanita hamil yang mengeluhkan *angular cheilitis* dan merupakan pasien anemia defisiensi besi (Zaidan, 2008).

c. Penurunan Dimensi Vertikal

Angular cheilitis sering terlihat pada pengguna gigi tiruan dalam jangka waktu panjang dikarenakan hilangnya dimensi oklusal atau menurunnya *inter maxillary space* (ruang antar rahang) atau menurunnya dimensi vertikal. Apabila dimensi vertikal menurun, maka akan menyebabkan sudut mulut turun dan membentuk lipatan-lipatan pada sudut mulut. Pada lipatan sudut mulut tersebut akan menyebabkan penumpukan saliva sehingga menciptakan suasana yang sesuai untuk pertumbuhan mikroorganisme agen infeksi (Sharmila, 2015).

2.4 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus berasal dari perkataan *staphyle* yang berarti kelompok buah anggur dan *coccus* yang berarti benih bulat. Bakteri ini sering ditemukan sebagai bakteri flora normal pada kulit dan selaput lendir pada manusia. Bakteri ini dapat menjadi penyebab infeksi baik pada manusia maupun hewan (Syahrurachman, 2010).

2.4.1 Taksonomi *Staphylococcus aureus*

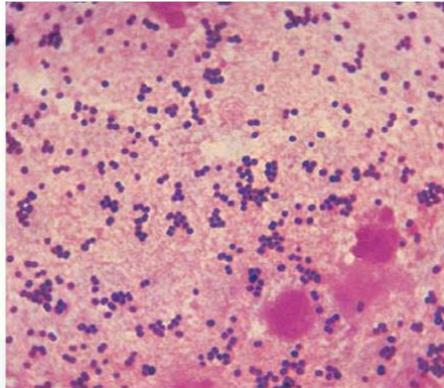
Berdasarkan sistem hierarki dalam klasifikasi organisme, taksonomi *Staphylococcus aureus* yaitu:

Ordo : *Eubacteriales*
Family : *Micrococcaceae*
Genus : *Staphylococcus*
Species : *Staphylococcus aureus*
(Syahrurachman, 2010)

2.4.2 Morfologi *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif, tidak berspora dan tidak bergerak (Gambar 2.5). Bakteri ini berbentuk sferis, bila menggerombol dalam susunan yang tidak teratur mungkin sisinya agak rata karena tertekan. Diameter bakteri antara 0,8-1,0 mikron. Pada sediaan langsung yang berasal dari

nanah dapat terlihat sendiri, berpasangan, menggerombol dan bahkan dapat tersusun seperti rantai pendek. Susunan gerombolan yang tidak teratur biasanya ditemukan pada sediaan yang dibuat dari perbenihan padat, sedangkan dari perbenihan kaldu biasanya ditemukan tersendiri atau tersusun sebagai rantai pendek (Syahrurachman, 2010).



Gambar 2.5 Gambaran mikroskopis *Staphylococcus aureus* dengan pewarnaan Gram pada perbesaran 1000x (Kayser, 2005)

2.4.3 Pertumbuhan dan Pembentukan *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus tumbuh dengan baik dalam kaldu biasa pada suhu 37°C. Batas-batas suhu untuk pertumbuhannya ialah 15°C dan 40°C, sedangkan suhu pertumbuhan optimum ialah 35°C. Pertumbuhan terbaik dan khas ialah pada suasana aerob; bakteri ini pun bersifat anaerob fakultatif dan dapat tumbuh dalam udara yang hanya mengandung hidrogen dan pH optimum untuk pertumbuhan ialah 7,4. Pada lempeng agar, koloninya berbentuk bulat, diameter 1-2 mm, cembung, mengkilat dan konsistensinya lunak. Warna khas ialah kuning keemasan, hanya intensitas warnanya dapat bervariasi. Pada lempeng agar darah umumnya koloni lebih besar dan pada varietas tertentu koloninya dikelilingi oleh zona hemolisis (Syahrurachman, 2010; Amanati, 2014).

Koloni yang masih sangat muda tidak berwarna, tetapi dalam pertumbuhannya terbentuk pigmen yang larut dalam alkohol, eter, khloroform dan benzol. Pigmen ini termasuk dalam golongan lipokhrom dan akan tetap dalam koloni, tidak meresap ke dalam perbenihan, tetapi larut dalam eksudat jaringan

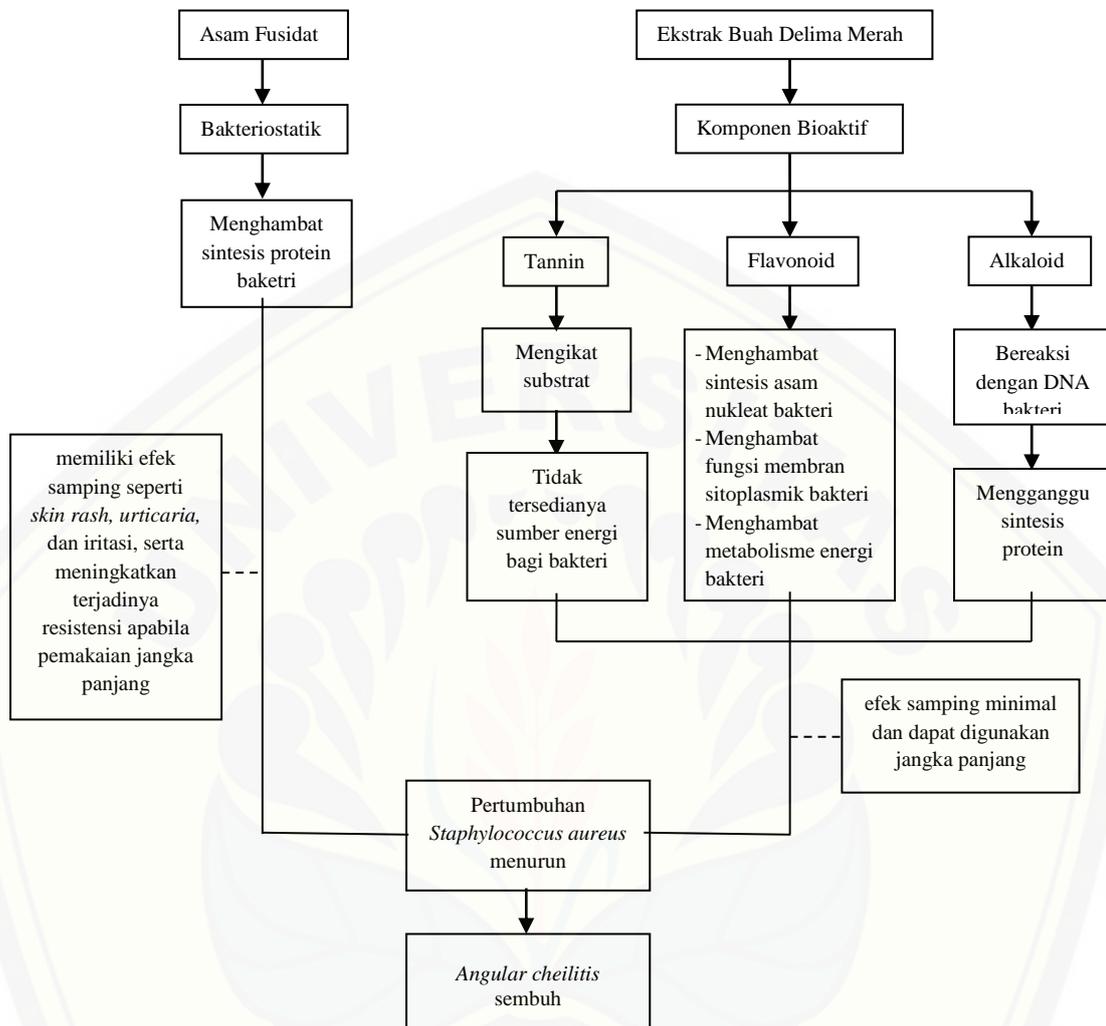
sehingga nanah berwarna sedikit kuning keemasan yang dapat merupakan petunjuk tentang adanya infeksi oleh bakteri ini (Syahrurachman, 2010).

2.4.4 Patogenesis dan Infeksi *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus merupakan sebagian dari flora normal pada kulit manusia, saluran pernapasan dan saluran pencernaan makanan. Pada 6,6% dari bayi yang berumur 1 hari telah dapat ditemukan *Staphylococcus* di hidungnya, 50% pada umur 2 hari, 62% pada umur 3 hari dan 88,8% pada umur 4-8 hari. Bakteri ini juga dapat ditemukan di udara dan lingkungan di sekitar kita. Patogenitasnya merupakan efek gabungan dari berbagai macam metabolit yang dihasilkannya.

Staphylococcus aureus dapat menjadi patogen apabila dipengaruhi oleh faktor predisposisi seperti perubahan kuantitas mikroorganisme menjadi tidak seimbang dan penurunan daya tahan tubuh *host*. *Staphylococcus aureus* bersifat invasif, penyebab hemolisis, membentuk koagulasi, mencairkan gelatin, membentuk pigmen kuning emas dan meragi manitol. Selain itu bakteri ini dapat pula menyebabkan terjadinya sistitis dan pielitis, bahkan dapat pula menyebabkan terjadinya septikemia, endokarditis, meningitis, abses serebri, sepsis puerpuralis, trombosis sinus kaverosus dan orbitalis, osteomielitis dan pneumonia. (Syahrurachman, 2010). Beberapa penyakit dalam rongga mulut dan sekitarnya yang dapat disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* yaitu abses, gingivitis, *angular cheilitis*, parotitis, *staphylococcal mucositis* dan *denture stomatitis* (Smith, 2011).

2.5 Kerangka Konseptual



Gambar 2.6 Kerangka konseptual

2.6 Penjelasan Kerangka Konseptual

Angular cheilitis adalah peradangan pada salah satu sudut mulut atau kedua sudut mulut dapat meluas melibatkan komisura bibir dan kulit sekitarnya. Salah satu penyebab *angular cheilitis* adalah infeksi *Staphylococcus aureus*. Pengobatan *angular cheilitis* yang dianggap paling efektif saat ini adalah krim asam fusidat. Asam fusidat bersifat bakteriostatik dengan mekanisme kerja yaitu menghambat sintesis protein bakteri. Zat ini aktif terhadap berbagai bakteri Gram positif terutama bakteri *Staphylococcus aureus*. Namun asam fusidat dapat meningkatkan

resiko terjadinya resistensi apabila pemakaian jangka panjang atau pemakaian berulang. Selain itu, juga memiliki efek samping seperti *skin rash*, *urticaria*, dan iritasi pada sekitar infeksi. Sehingga digunakan alternatif pengobatan alami, salah satunya dengan ekstrak buah delima merah. Ekstrak buah delima merah memiliki komponen bioaktif yaitu *tannin*, *flavanoid*, dan *alkaloid* yang diduga efektif sebagai antibakteri. *Tannin* mampu mengikat substrat, sehingga menyebabkan tidak tersedianya sumber energi bagi bakteri. *Flavanoid* mampu menghambat sintesis asam nukleat bakteri, menghambat fungsi membran sitoplasmik bakteri, serta menghambat metabolisme energi bakteri. *Alkaloid* mampu bereaksi dengan DNA bakteri yang selanjutnya mengganggu sintesis protein bakteri. Selain memiliki kemampuan sebagai antibakteri, ekstrak buah delima merah memiliki efek samping minimal dan dapat digunakan dalam jangka panjang.

2.7 Hipotesis

1. Ekstrak buah delima merah (*Punica granatum Linn*) memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.
2. Ekstrak buah delima merah (*Punica granatum Linn*) konsentrasi 100% memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* terbesar.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian *experimental laboratories* dengan menggunakan rancangan *the post test only control group design*.

3.2 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Bioscience*, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.

3.3 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober sampai November 2017.

3.4 Identifikasi Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah ekstrak buah delima merah (*Punica granatum Linn*) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% (Al-Hassnawi, 2017).

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah hambatan pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

3.4.3 Variabel Kendali

- a. Media biakan bakteri
- b. Suspensi *Staphylococcus aureus*
- c. Suhu dan durasi inkubasi
- d. Alat ukur (jangka sorong)

3.5 Definisi Operasional

3.5.1 Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum Linn*)

Ekstrak buah delima merah (*Punica granatum Linn*) adalah hasil ekstraksi buah delima merah (terdiri dari kulit, buah, dan biji) dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan simplisia dan etanol sebesar 1 : 3. Maserat diuapkan sampai didapatkan ekstrak kental dengan rendemen 22,52%. Ekstrak kental tersebut digunakan dalam penelitian sebagai konsentrasi 100%. Kemudian ekstrak diencerkan dengan aquades steril untuk mendapat konsentrasi 75%, 50%, dan 25%. Buah delima merah yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari lereng Gunung Muria, Kecamatan Dawe, Kabupaten Kudus.

3.5.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif. *S. aureus* yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

3.5.3 Hambatan Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*

Hambatan pertumbuhan *Staphylococcus aureus* adalah terganggunya pertumbuhan bakteri pada media biakan yang dapat diukur melalui diameter zona hambat. Diameter zona hambat diukur dari tepi ke tepi zona hambat yang bersebrangan melewati pusat cakram. Zona hambat merupakan daerah di sekitar cakram yang tidak ditumbuhi bakteri sehingga terlihat lebih bening dibandingkan daerah lainnya pada petridish. Jika tidak terdapat zona hambat di sekitar cakram maka dikatakan nilai zona hambat adalah sebesar 0,00 mm.

3.5.4 Media Biakan Bakteri

Media biakan bakteri adalah suatu media yang digunakan untuk menumbuhkan dan membiakkan bakteri. Media biakan yang digunakan dalam

penelitian ini adalah media MHA (*Meuller-Hinton Agar*). Media MHA yang telah disterilisasi dituangkan pada masing-masing petridish hingga kedalaman 4 mm.

3.5.5 Suspensi *Staphylococcus aureus*

Suspensi *Staphylococcus aureus* adalah sediaan cair yang terbuat dari salin steril atau MHB (*Mueller-Hinton Broth*) kemudian ditambah koloni *S. aureus*. Kekeruhan suspensi disesuaikan dengan 0,5 standar McFarland.

3.5.6 Suhu dan Durasi Inkubasi

Suhu dan durasi inkubasi adalah temperatur dan lamanya waktu yang digunakan dalam memelihara kultur bakteri untuk memantau pertumbuhan bakteri yaitu 35°C selama 24 jam.

3.5.7 Alat Ukur

Alat ukur adalah alat yang digunakan untuk menentukan besar objek pengukuran. Alat ukur yang digunakan dalam penelitian ini yaitu jangka sorong dengan ketelitian 0,01 mm. Alat ini digunakan untuk mengukur besar zona hambat yang terbentuk pada media MHA yang telah diinokulasi *S. aureus*

3.6 Sampel Penelitian

3.6.1 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah *blank paper disk* yang telah ditetesi ekstrak *Punica granatum Linn*, kemudian diletakkan pada petridish yang telah diinokulasi bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.6.2 Besar Sampel Penelitian

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan rumus Federer sebagai berikut (Nugraha dkk, 2017)

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Keterangan :

t = Jumlah kelompok perlakuan

n = Jumlah sampel per kelompok perlakuan

Perhitungan jumlah sampel per kelompok perlakuan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

$$(6-1)(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 3$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan rumus Federer, jumlah sampel pada masing-masing kelompok perlakuan yaitu minimal 4 sampel. Peneliti menggunakan 6 sampel pada masing-masing kelompok perlakuan. Sehingga jumlah keseluruhan sampel penelitian yang digunakan sebanyak 36 sampel.

3.6.3 Pembagian Kelompok Sampel

Kelompok sampel dibagi menjadi 6, yaitu :

- a. Kelompok M100 : ekstrak buah delima merah dengan konsentrasi 100%
- b. Kelompok M75 : ekstrak buah delima merah dengan konsentrasi 75%
- c. Kelompok M50 : ekstrak buah delima merah dengan konsentrasi 50%
- d. Kelompok M25 : ekstrak buah delima merah dengan konsentrasi 25%
- e. Kelompok K(+) : kontrol positif, asam fusidat
- f. Kelompok K(-) : kontrol negatif, aquades steril

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat

- | | |
|--|-------------------------------|
| 1) Petridish (Duran, Jerman) | 5) Autoclave (ALP, Jepang) |
| 2) Disposable syringe (Terumo) | 6) Ose |
| 3) Filter syringe (Millex) | 7) Oven (Binder, Jerman) |
| 4) Laminar flow (Dwyer Mark II, Korea) | 8) Tabung reaksi (Pyrex, USA) |

- 9) *Rotary evaporator* (Heidolph G3, Jepang)
- 10) Neraca analitik (Boeco, Jerman)
- 11) Jangka sorong (Kenmaster)
- 12) *Vortex* (Labinco, Belanda)
- 13) Kertas label
- 14) Spidol (Shachihata)
- 15) Inkubator (Labtech, Korea)
- 16) *Cotton swab*
- 17) Wadah kaca tertutup
- 18) Gelas ukur (Iwaki Pyrex, Jepang)
- 19) *Aluminium foil* (Klin Pak, Indonesia)
- 20) *Microtube* (Eppendorf, Jerman)
- 21) Desikator (Duran, Jerman)
- 22) Mikropipet (Humapette, Jerman)
- 23) *Yellow tip*
- 24) *Blue tip*
- 25) *Blender* (Panasonic, Jepang)
- 26) Spatula kaca
- 27) Bunsen
- 28) Korek api
- 29) *Water bath* (GFL, Jerman)
- 30) *Hotplate stirrer* (Labtech, Korea)
- 31) Mikroskop (Olympus 1x51, China)
- 32) Spektrofotometer (Biomerieux Plus, USA)
- 33) *Handsocon* (Maxter, Malaysia)
- 34) Masker (One Med)
- 35) Tisu (Passeo, Indonesia)

3.7.2 Bahan

- a. Media MHA (*Meuller-Hinton Agar*) (Merck, Jerman)
- b. Media MHB (*Meuller-Hinton Broth*) (Merck, Jerman)
- c. Aquades steril
- d. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- e. Simplisia *Punica granatum* Linn
- f. Ekstrak *Punica granatum* Linn
- g. Asam fusidat
- h. Etanol 70%
- i. Larutan salin steril
- j. *Blank paper disk* (Oxoid, UK)

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Tahap Persiapan

a. Uji identifikasi tanaman

Buah delima merah yang diambil dari lereng Gunung Muria, Kecamatan Dawe, Kabupaten Kudus dilakukan uji identifikasi di Kebun Raya Purwodadi, Kabupaten Malang sebelum diekstrak.

b. Sterilisasi alat

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini harus disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi merupakan proses menghilangkan semua mikroorganisme (bakteria, virus, fungi dan parasit) termasuk endospora menggunakan uap tekanan tinggi (autoklaf) atau panas kering (oven) (PERMENKES No 27, 2017).

1) Sterilisator Uap Tekanan Tinggi (autoklaf)

Sterilisasi alat menggunakan sterilisator uap tekanan tinggi (autoklaf) pada suhu 121°C; tekanan harus berada pada 106 kPa; selama 20 menit untuk alat tidak terbungkus dan 30 menit untuk alat terbungkus. Semua peralatan dibiarkan hingga kering sebelum diambil dari sterilisator. Set tekanan kPa atau lbs/in² mungkin berbeda tergantung pada jenis sterilisator yang digunakan. Ikuti rekomendasi pabrik, jika mungkin (PERMENKES No 27, 2017).

2) Sterilisator Panas Kering (Oven)

Sterilisasi panas kering yang membutuhkan suhu lebih tinggi hanya dapat digunakan untuk benda-benda dari gelas atau logam karena akan melelehkan bahan lainnya. Instrumen diletakkan di oven dengan suhu 170°C, selama 1 jam dan kemudian didinginkan selama 2-2,5 jam atau 160°C selama 2 jam (PERMENKES No 27, 2017).

c. Ekstraksi buah delima merah

Pembuatan ekstrak buah delima merah dilakukan di Laboratorium *Bioscience*, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember. Buah delima merah dipilih yang matang sempurna usia 3-4 bulan, kulit mengkilap, warna cerah, masih dalam keadaan utuh, tidak rusak karena serangan ulat atau hama lainnya dan tidak berjamur. Delima merah sebanyak 2 kg dicuci bersih dengan air mengalir kemudian dipisahkan antara buah dan kulit. Kemudian buah dan kulit delima merah dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama 2 hari lalu dioven pada suhu 50°C selama 6 hari sampai kering. Buah dan kulit delima merah yang sudah kering kemudian dipotong-potong dan di-*blender* lalu diayak sehingga didapatkan bubuk halus. Bubuk tersebut direndam dengan etanol 70% selama 72 jam dalam toples tertutup dan diaduk secara manual sampai homogen setiap 24 jam. Hasil rendaman disaring dengan menggunakan kertas saring.

Kemudian etanol diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* selama 8 jam dan dioven pada suhu 50°C selama 12 jam. Hasil akhir didapatkan ekstrak buah delima merah kental dengan rendemen 22,52%. Ekstrak kental tersebut digunakan dalam penelitian sebagai konsentrasi 100%.. Ekstrak disimpan dalam kulkas bersuhu 2°C sampai pemakaian.

d. Pengenceran ekstrak buah delima merah

Setelah didapatkan ekstrak buah delima merah konsentrasi 100%, kemudian ekstrak tersebut diencerkan dengan aquades steril untuk mendapatkan konsentrasi 75%, 50% dan 25%. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Tampedje dkk, 2016)

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Keterangan:

V1 : Volume awal ekstrak buah delima merah

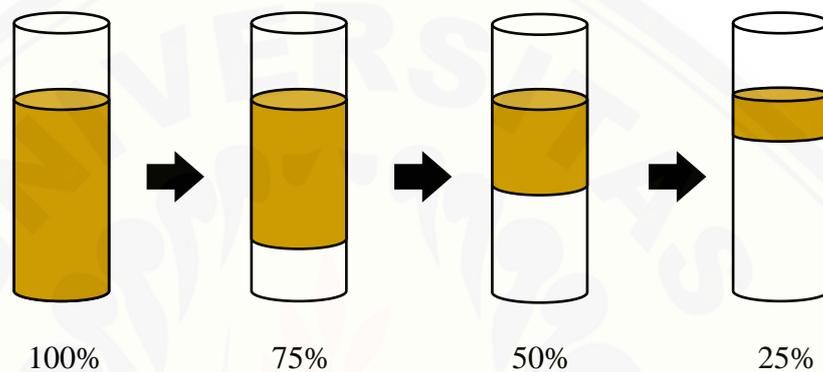
M1 : Konsentrasi awal ekstrak buah delima merah

V2 : Volume akhir ekstrak buah delima merah

M2 : Konsentrasi akhir ekstrak buah delima merah

Dari rumus pengenceran tersebut, maka dilakukan pengenceran sebagai berikut:

- 1) Ekstrak 100% diambil 2000 μ l
- 2) Ekstrak 75% diperoleh dari 1500 μ l EBDM ditambah 500 μ l aquades
- 3) Ekstrak 50% diperoleh dari 1000 μ l EBDM ditambah 1000 μ l aquades
- 4) Ekstrak 25% diperoleh dari 500 μ l EBDM ditambah 1500 μ l aquades



Gambar 3.1 Perbandingan EBDM (ekstrak buah delima merah) dengan aquades

e. Mempersiapkan suspensi bakteri

Biakan murni *Staphylococcus aureus* yang digunakan didapatkan dari laboratorium Mikrobiologi, FMIPA, Universitas Jember. Suspensi *Staphylococcus aureus* dibuat dengan cara mengambil empat atau lima koloni *Staphylococcus aureus* dari biakan ditambahkan 2 ml salin steril atau MHB (*Mueller-Hinton Broth*). Pembuatan suspensi dilakukan dalam *laminar flow*, setelah itu dikocok dengan *vortex*. Sesuaikan kekeruhan suspensi dengan 0,5 standar McFarland dengan menambahkan lebih banyak koloni jika suspensi kurang keruh atau diencerkan dengan salin steril jika suspensi terlalu keruh. Suspensi ini dapat digunakan dalam waktu 15 menit setelah persiapan (Hudzicki, 2009; Cavalieri dkk, 2005).

f. Mempersiapkan media MHA

Sebanyak 3,8 gram bubuk MHA (*Meuller-Hinton Agar*) ditambahkan 100 ml aquades dan dipanaskan dalam air mendidih sampai homogen. Disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, liquid agar dituangkan pada petridish hingga kedalaman 4 mm. Biarkan mengeras pada suhu kamar, kemudian simpan pada suhu 4 sampai 8°C (Hudzicki, 2009).

g. Mempersiapkan *disk*

Masing-masing kelompok perlakuan (ekstrak *Punica granatum Linn* dengan konsentrasi 100%, 75%, 50% dan 25%), kontrol positif (asam fusidat), dan kontrol negatif (aquades steril) diteteskan pada *blank paper disk* sebanyak 20µL dengan menggunakan mikropipet. Disk dibiarkan kering sebelum diletakkan pada petridish (Liliwirianis dkk, 2011).

3.8.2 Tahap Perlakuan

a. Pemberian suspensi bakteri pada media MHA

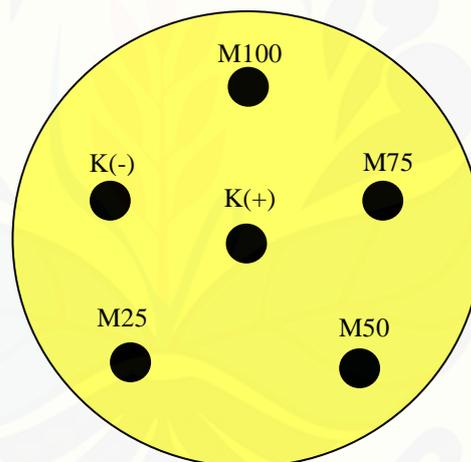
Cotton swab steril dicelupkan ke dalam suspensi yang telah disesuaikan kekeruhannya. Kemudian diputar beberapa kali dan tekan dengan kuat ke bagian dalam tabung di atas suspensi untuk menghilangkan kelebihan cairan pada *cotton swab*. Setelah itu inokulasikan pada permukaan media MHA dengan cara melakukan *streaking* dari ujung ke ujung petridish. Petridish diputar sekitar 60° dan dilakukan *streaking* kembali. Hal itu dilakukan sebanyak tiga kali untuk memastikan distribusi inokulum yang merata. Tutup petridish dibiarkan terbuka selama tiga sampai lima menit, tetapi tidak lebih dari 15 menit, supaya permukaan agar menjadi kering sebelum melanjutkan ke langkah selanjutnya (Cockerill dkk, 2012).

b. Meletakkan disk atau cakram pada media biakan

Disk atau cakram yang telah ditetesi ekstrak buah delima merah, asam fusidat dan aquades steril diletakkan pada media yang telah diberi suspensi bakteri dengan menggunakan pinset steril. Setiap disk diletakkan dengan jarak minimal 24 mm dari pusat disk yang satu ke pusat disk lainnya. Hal tersebut bertujuan untuk menghindari terjadinya tumpang tindih zona hambat yang akan terbentuk (Cockerill dkk, 2012).

c. Diberi label pada bagian bawah petridish

Pemberian label diletakkan pada bagian bawah petridish supaya tidak terjadi pergeseran. Posisi dan letak dari cakram adalah sebagai berikut:



Gambar 3.2 Peletakan disk pada media yang sudah diinokulasikan *Staphylococcus aureus*

d. Inkubasi selama 24 jam

Setelah semua disk diletakkan pada media agar, pasang kembali tutup petridish. Kemudian untuk menciptakan kondisi anaerob dimasukkan dalam desikator dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C menggunakan inkubator (Patel dkk, 2016).

3.8.3 Tahap Pengamatan

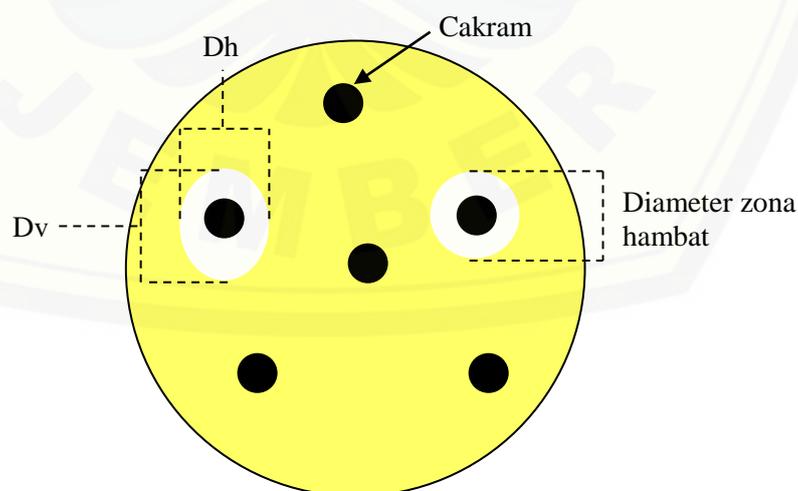
- a. Pengukuran diameter zona hambat pada petridish dilakukan beberapa inci di atas latar belakang hitam yang diterangi dengan cahaya. Diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong dari tepi (*break point*) ke tepi (*break point*) zona hambat yang bersebrangan melewati pusat *paper disk*. Jika tidak terdapat zona hambat di sekitar *paper disk*, maka dapat dikatakan bahwa nilai diameter zona hambat sebesar 0,00 mm. Jika terdapat zona hambat yang saling tumpang tindih antar kelompok penelitian, maka zona hambat diukur dari pusat *paper disk* ke tepi zona hambat sehingga didapatkan jari-jari zona hambat, kemudian pengukuran dikalikan dua untuk menentukan diameter zona hambat (Hudzicki, 2009). Jika terdapat zona hambat yang berbentuk lonjong (Gambar 3.3), maka pengukuran dilakukan pada diameter yang panjang (D_v) dan diameter yang pendek (D_h), kemudian keduanya dijumlahkan dan dibagi dua (Pormes, 2016).

$$\frac{D_v + D_h}{2}$$

Keterangan:

D_v = Diameter vertikal

D_h = Diameter horizontal



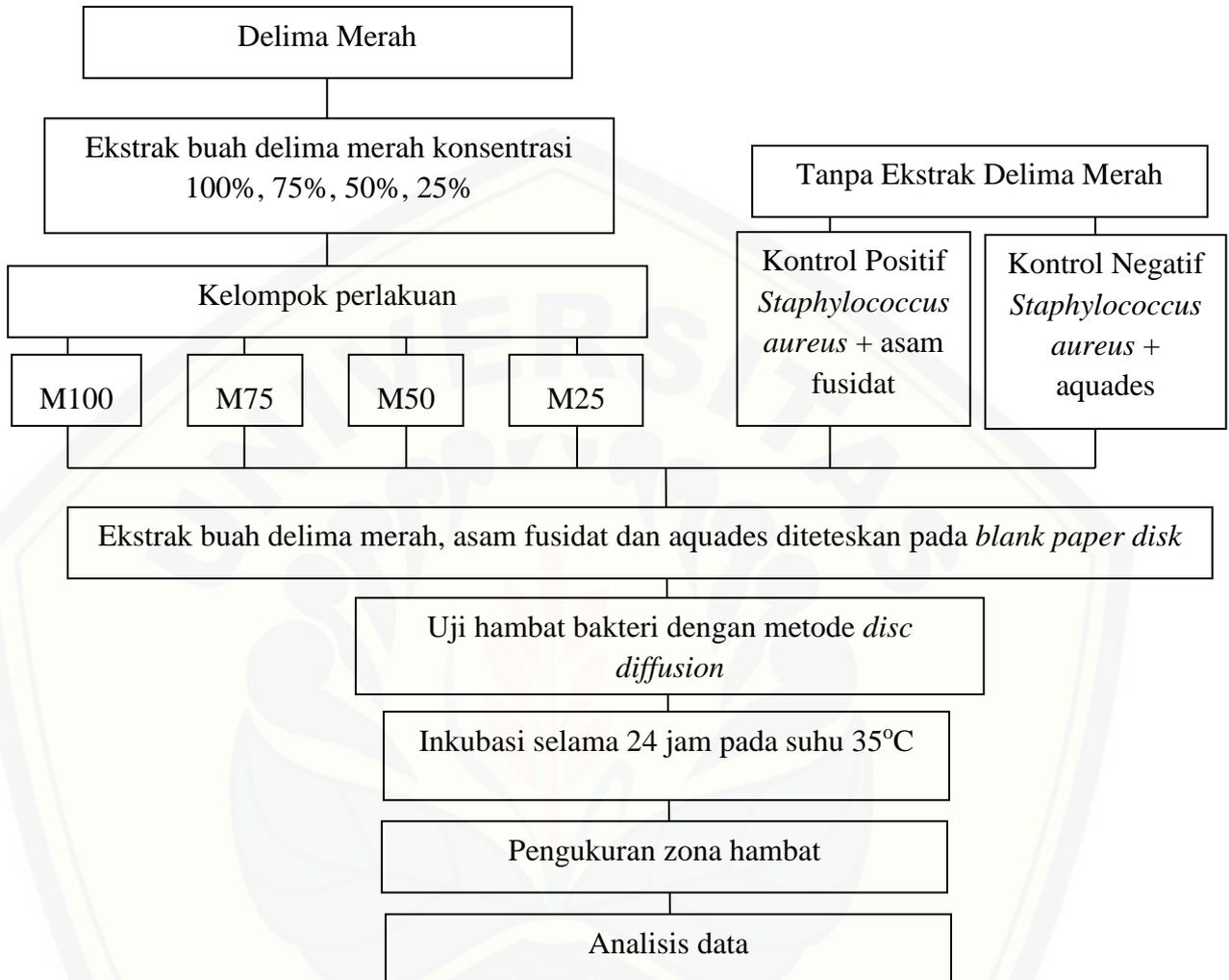
Gambar 3.3 Cara pengukuran diameter zona hambat ekstrak buah delima merah

- b. Pengamatan dilakukan oleh 3 orang pengamat kemudian data yang didapat dirata-rata untuk mendapatkan hasil diameter zona hambat.

3.9 Analisa Data

Analisa data pada uji hambat ekstrak buah delima merah terhadap *Staphylococcus aureus* berdasarkan zona hambat yang dihasilkan di sekitar disk atau cakram. Diameter zona hambat diukur dalam milimeter (mm). Uji normalitas menggunakan *Kolmogorov-Smirnov* dan uji homogenitas menggunakan *Levene's test*. Apabila hasil menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$) maka dilakukan uji statistik parametrik *One Way Anova* dilanjutkan dengan *LSD* (*least significant differences*). Apabila hasil uji menunjukkan data tidak terdistribusi normal dan/atau tidak homogen maka dapat dilakukan uji statistik non parametrik *Kruskal-Wallis* dilanjutkan dengan *Mann-Whitney*.

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.4 Alur penelitian daya hambat ekstrak buah delima merah terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*

I.4 Hasil Uji LSD (*Least Significant Differences*)

Multiple Comparisons

LSD

| (I) Perlakuan | (J) Perlakuan | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|------------------|------------------|-----------------------------|---------------|------|-------------------------|----------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| M100 | M75 | ,12833 | ,54122 | ,814 | -,9770 | 1,2336 |
| | M50 | 2,62333* | ,54122 | ,000 | 1,5180 | 3,7286 |
| | M25 | 3,76667* | ,54122 | ,000 | 2,6614 | 4,8720 |
| | K(+) | -9,34500* | ,54122 | ,000 | -10,4503 | -8,2397 |
| | K(-) | 19,66500* | ,54122 | ,000 | 18,5597 | 20,7703 |
| M75 | M100 | -,12833 | ,54122 | ,814 | -1,2336 | ,9770 |
| | M50 | 2,49500* | ,54122 | ,000 | 1,3897 | 3,6003 |
| | M25 | 3,63833* | ,54122 | ,000 | 2,5330 | 4,7436 |
| | K(+) | -9,47333* | ,54122 | ,000 | -10,5786 | -8,3680 |
| | K(-) | 19,53667* | ,54122 | ,000 | 18,4314 | 20,6420 |
| M50 | M100 | -2,62333* | ,54122 | ,000 | -3,7286 | -1,5180 |
| | M75 | -2,49500* | ,54122 | ,000 | -3,6003 | -1,3897 |
| | M25 | 1,14333* | ,54122 | ,043 | ,0380 | 2,2486 |
| | K(+) | -11,96833* | ,54122 | ,000 | -13,0736 | -10,8630 |
| | K(-) | 17,04167* | ,54122 | ,000 | 15,9364 | 18,1470 |
| M25 | M100 | -3,76667* | ,54122 | ,000 | -4,8720 | -2,6614 |
| | M75 | -3,63833* | ,54122 | ,000 | -4,7436 | -2,5330 |
| | M50 | -1,14333* | ,54122 | ,043 | -2,2486 | -,0380 |
| | K(+) | -13,11167* | ,54122 | ,000 | -14,2170 | -12,0064 |
| | K(-) | 15,89833* | ,54122 | ,000 | 14,7930 | 17,0036 |
| K(+) | M100 | 9,34500* | ,54122 | ,000 | 8,2397 | 10,4503 |
| | M75 | 9,47333* | ,54122 | ,000 | 8,3680 | 10,5786 |
| | M50 | 11,96833* | ,54122 | ,000 | 10,8630 | 13,0736 |
| | M25 | 13,11167* | ,54122 | ,000 | 12,0064 | 14,2170 |
| | K(-) | 29,01000* | ,54122 | ,000 | 27,9047 | 30,1153 |
| K(-) | M100 | -19,66500* | ,54122 | ,000 | -20,7703 | -18,5597 |
| | M75 | -19,53667* | ,54122 | ,000 | -20,6420 | -18,4314 |
| | M50 | -17,04167* | ,54122 | ,000 | -18,1470 | -15,9364 |
| | M25 | -15,89833* | ,54122 | ,000 | -17,0036 | -14,7930 |
| | K(+) | -29,01000* | ,54122 | ,000 | -30,1153 | -27,9047 |

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.