

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan memberikan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol (Nazir, 1999). Pada penelitian ini digunakan medium *Luria Bertani Broth* (LB) yang sudah terdapat isolat bakteri *Chromobacterium violaceum* CV026 kemudian diberi ekstrak kasar supernatan bakteri endofit *Ageratum conyzoides* pada konsentrasi tertentu dan kontrol negatif menggunakan *dimethyl sulfoxide* (DMSO) 1% saja dan *N-Hexanoyl Homoserinelactone* (C6-HSL) $1.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ yang ditambah dengan DMSO 1%. Konsentrasi masing-masing ekstrak kasar supernatan bakteri endofit *A. conyzoides* yang diberikan adalah $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$ (0.25%), 3 mg ml^{-1} (0.3%), dan 3.5 mg ml^{-1} (0.35%). Pengulangan dalam penelitian ini dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan dimana masing-masing pengulangan dilakukan pengambilan data secara *duplo*.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah keseluruhan data pengukuran kadar violacein dan total jumlah bakteri *C. violaceum* CV026 yang diberikan ekstrak kasar supernatan bakteri endofit *A. conyzoides*. Sampel penelitian yang digunakan adalah penurunan kadar violacein dan total hitung jumlah bakteri *C. violaceum* CV026 yang diberikan ekstrak kasar supernatan bakteri endofit *A. conyzoides* yang sudah diketahui memiliki aktivitas antimikroba yaitu B15 (*Pseudomonas*), I13 (*Brochothrix*), dan I14 (*Kurthia*) (Fitriani *et al.*, 2013).

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dimulai dari bulan Maret 2014 sampai dengan November 2014 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Pendidikan Biologi, Program Studi Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA), Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.

D. Alat dan Bahan

Daftar alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran 1.

E. Langkah Kerja

1. Tahap Persiapan

Pada tahap persiapan ini, alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian diperiksa. Semua alat-alat dari bahan kaca dan plastik dibersihkan. Alat-alat dari bahan kaca dan plastik kemudian dibungkus dengan menggunakan kertas roti dan dimasukkan ke dalam plastik tahan panas. Larutan stok *cryo* yang digunakan untuk mengawetkan isolat bakteri dan larutan McFarland 0.5 sebagai standar pengukuran bakteri dibuat untuk dapat digunakan saat penelitian berlangsung. Pembuatan medium *Luria Bertani Agar* (LBA), medium *Luria Bertani Broth* (LB), dan medium King's B dibuat untuk subkultur isolat bakteri endofit dari *A. conyzoides* dan *C. violaceum* CV026 dari *cryo* pertumbuhan isolat bakteri endofit *A. conyzoides* dalam menghasilkan metabolit sekunder. Selain itu, *Muller Hinton Agar* (MHA) juga dibuat untuk digunakan pada pengujian perhitungan jumlah bakteri *C. violaceum* CV026 dibuat. Semua medium dan bahan yang sudah dibuat disterilisasi terlebih dahulu. Proses sterilisasi yang digunakan adalah panas lembab menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15-20 menit dengan tekanan 1,5 atm.

2. Tahap Penelitian

a. Subkultur Bakteri

Sebanyak 3 isolat dari penelitian Fitriani *et al.* (2013) yaitu B15 (*Pseudomonas*), I13 (*Brochothrix*), dan I14 (*Kurthia*) dilakukan peremajaan pada medium LBA dan diinkubasi pada inkubator 37°C. Selain itu, disiapkan pula kultur *C. violaceum* CV026 pada medium LBA yang diinkubasi pada suhu 27°C.

b. Ekstraksi Supernatan Bakteri Endofit *A. conyzoides*

Ketiga isolat bakteri endofit *A. conyzoides* ditumbuhkan dalam medium King's B sampai mencapai fase stasioner. Waktu pencapaian fase stasioner dapat dilihat dari kurva tumbuh yang sudah diketahui. Kultur dalam medium King's B

Dora Syakina Desriana, 2015

POTENSI ANTI QUORUM SENSING DARI EKSTRAK KASAR SUPERNATAN BAKTERI ENDOFIT *Ageratum conyzoides*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

dipindahkan ke dalam tabung mikro steril dan disentrifugasi selama 10 menit pada 10.000 rpm. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke labu pemisah dan diberi etil asetat dengan rasio 1:1 (supernatan : etil asetat) lalu dikocok selama 15 menit dan didiamkan selama 15 menit. Setelah 15 menit akan terbentuk tiga lapisan pada labu pemisah. Pisahkan bagian tengah ke botol fial gelap steril. Lapisan tengah ini yang mengandung metabolit sekunder (Ahamed, 2012; Manjunathan & Kaviyaran, 2012).

Larutan ekstrak metabolit sekunder bakteri yang sudah diperoleh kemudian dievaporasi menggunakan evaporator dengan suhu 40°C hingga terbentuk ekstrak kering (Garcia *et al.*, 2012). Ekstrak kering yang sudah didapatkan kemudian dilarutkan dengan menggunakan DMSO 1% lalu disimpan dalam botol fial gelap pada suhu 4°C (Liang *et al.*, 2012).

c. Uji Aktivitas Anti *Quorum Sensing*

Uji cakram difusi digunakan untuk mendeteksi aktivitas anti *quorum sensing* dari ekstrak supernatan bakteri endofit *A. conyzoides* (Coyle, 2005; Sashidaran, 2011). Sebanyak 4 ml kultur *C. violaceum* CV026 dengan nilai absorbansi 1.2 pada OD 600 nm dicampurkan dengan LB agar sebanyak 20 ml. Kemudian dimasukkan *N-hexanoyl homoserinelactone* (C6-HSL) dengan konsentrasi akhir 1.2 µg ml⁻¹ pada campuran agar dan kultur bakteri. Masing-masing sebanyak 20 µl ekstrak kasar supernatan bakteri *A. conyzoides* dengan berbagai konsentrasi yang sudah ditentukan kemudian diteteskan pada kertas cakram steril (diameter 6 mm) yang terdapat di bagian atas medium LB agar. Kemudian diinkubasi semalaman pada suhu 27°C. Pelarut organik berupa DMSO 1%, aquades, dan etil asetat digunakan sebagai kontrol negatif dalam aktivitas penghambatan *quorum sensing* yang dideteksi dengan terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram (Norizan *et al.*, 2012).

d. Uji Kuantifikasi Produksi Violacein

Pengujian pada tabung inkubasi digunakan untuk melihat aktivitas anti *quorum sensing* oleh ekstrak kasar supernatan bakteri endofit *A. conyzoides* ini berdasarkan Choo *et al.* (2005) dengan modifikasi. Kultur *C. violaceum* CV026

diinkubasi selama 18 jam dan diinokulasi pada masing-masing tabung reaksi yang sudah diisi total volume 2 mL LB yang ditambahkan DMSO 1%, tabung reaksi dengan volume total 2 mL LB yang ditambahkan HSL $0.12 \mu\text{g ml}^{-1}$, dan tabung reaksi yang diisi dengan LB, HSL $0.12 \mu\text{g ml}^{-1}$, ekstrak kasar supernatan bakteri endofit *A. conyzoides* dengan konsentrasi yang berbeda (2.5 mg ml^{-1} , 3 mg ml^{-1} , dan 3.5 mg ml^{-1}). Tabung reaksi diinkubasi pada 27°C dengan 150 rpm diagitasi selama 24 jam (Choo *et al.*, 2005).

Sebanyak 1 ml kultur bakteri *C. violaceum* CV026 dari masing-masing tabung disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan violacein. Supernatan dari kultur tersebut dibuang dan ditambahkan 1 ml DMSO 100% pada *pellet*. Campuran tersebut dihomogenkan dengan menggunakan mesin *vortex* selama 30 detik sampai violacein tercampur. Kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 10 menit untuk menghilangkan sel-sel bakteri yang tersisa. Sebanyak 500 μl supernatan yang mengandung violacein dipindahkan ke dalam tabung mikro baru lain dan diencerkan dengan menggunakan DMSO 100% sebanyak 500 μl . Kemudian dihitung absorbansi larutan dengan panjang gelombang 585 nm. Dilakukan pencatatan hasil dari masing-masing pengukuran kadar violacein.

e. Uji Kuantifikasi Jumlah Bakteri *C. violaceum* CV026

Sebanyak 1 ml masing-masing kultur bakteri *C. violaceum* CV026 yang sudah diinkubasi dalam tabung inkubasi disuspensikan berdasarkan faktor pengenceran 10^{-1} sampai dengan faktor pengenceran 10^{-8} . Dari setiap faktor pengenceran diambil 1 ml masing-masing kultur bakteri *C. violaceum* CV026 dimasukkan ke dalam cawan petri steril kemudian sebanyak 10 ml medium MHA dituangkan untuk mengonfirmasi adanya aktivitas antibakteri dari masing-masing sampel. Masing-masing kultur tersebut kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 27°C . Kemudian hitung total bakteri menggunakan *colony counter* dan dibandingkan dengan kontrol (Choo *et al.*, 2005). Hasil yang diperoleh kemudian dicatat.

f. Uji Aktivitas Antibakteri terhadap *C. violaceum* CV026

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode cakram difusi. *C. violaceum* CV026 diinkubasi selama 16-18 jam. Sebanyak 100 µl kultur bakteri *C. violaceum* CV026 diukur turbiditasnya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm dengan nilai absorbansi 0.1 dengan LB tanpa isolat sebagai *blanko* (Garcia *et al.*, 2014; Matlock *et al.*, 2011). Kemudian 100 µl kultur bakteri *C. violaceum* CV026 disebar pada medium MHA. Setelah disebar kemudian diletakkan cakram steril (diameter 6 mm) di bagian atas medium MHA. Sebanyak 10 µl ekstrak kasar supernatan bakteri *A. conyzoides* pada konsentrasi 2.5 mg ml⁻¹, 3 mg ml⁻¹, dan 3.5 mg ml⁻¹ diletakkan di atas cakram difusi. Kemudian medium diinkubasi selama 24 jam pada suhu 27°C. Amati zona hambat pertumbuhan bakteri (Choo *et al.*, 2005).

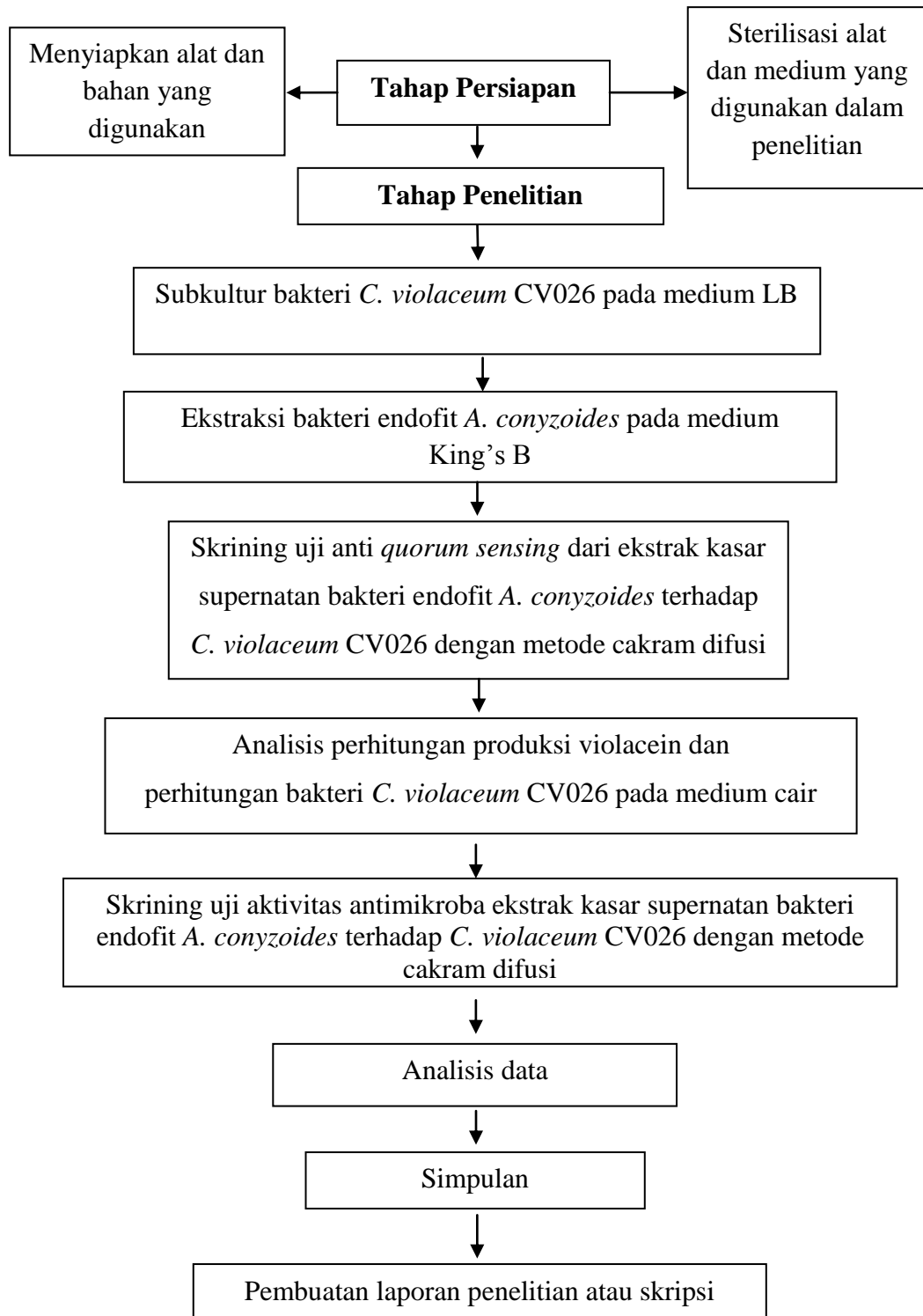
g. Pengolahan Data

Pada penelitian ini, data yang disajikan dalam hasil dan pembahasan direpresentasikan dalam bentuk rata-rata ± standar deviasi (SD). Pengujian statistik yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan program SPSS *version* 16.0. Pada penelitian ini, dilakukan uji statistik normalitas dan homogenitas terhadap hasil penurunan kadar violacein. Berdasarkan hasil uji *Shapiro Wilk* diketahui bahwa data penurunan kadar violacein tidak seluruhnya terdistribusi normal. Oleh karena itu, dilakukan uji statistik dengan menggunakan pengujian nonparametrik uji *Kruskal Wallis* dan uji *Mann-Whitney* secara konvensional untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok perlakuan.

Pada pengujian statistik untuk hasil jumlah bakteri *C. violaceum* CV026 diuji homogenitas dan normalitas dengan menggunakan uji *Saphiro-Wilk*. Berdasarkan hasil uji statistik tersebut diketahui bahwa data terdistribusi normal. Oleh karena itu, dilakukan uji *One Way ANOVA* dengan uji lanjutan menggunakan uji *Duncan* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan.

3. Alur Penelitian

Alur penelitian yang dilakukan selama penelitian, dapat dilihat pada Gambar 3.1 di bawah ini:



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian