

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian merupakan penelitian eksperimental karena memanipulasi kondisi untuk melihat pengaruh terhadap respon tertentu. Penelitian terdiri dari 17 unit percobaan meliputi Pemberian ekstrak kasar supernatan bakteri endofit *Lysinibacillus sphaericus*, *Pantoea* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan konsentrasi masing-masing 0 mg ml⁻¹; 2,5 mg ml⁻¹; 3 mg ml⁻¹; dan 3,5 mg ml⁻¹. Pemberian perlakuan-perlakuan ini dilakukan terhadap kultur *Chromobacterium violaceum* CV026 yang ditambahkan N-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) untuk menginduksi pengeluaran violacein. Selain itu terdapat kelompok perlakuan dengan penambahan 0 mg ml⁻¹ ekstrak dan tanpa penambahan C6-HSL. Percobaan dilakukan dengan dua kali pengulangan dan tiap pengulangan diulang secara duplo untuk perhitungan kadar violacein dan perhitungan total bakteri.

B. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini merupakan keseluruhan kadar pigmen violacein dan total bakteri *C. violaceum* CV026 viabel dari semua kultur. Sedangkan sampel merupakan kadar pigmen terukur dan total bakteri *C. violaceum* CV026 viabel dari masing-masing kultur yang diberikan perlakuan.

C. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium mikrobiologi dan fisiologi, Jurusan Pendidikan Biologi, FPMIPA, JICA, Universitas Pendidikan Indonesia.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari laboratorium mikrobiologi dan fisiologi, Jurusan Pendidikan Biologi, FPMIPA, JICA, Universitas Pendidikan Indonesia. Khusus untuk bahan yang tidak tersedia,

yaitu N- hexanoyl- L- homoserine lactone (C6-HSL) didapatkan dari Sigma-Aldrich, Singapura.

Alat-alat yang digunakan dalam laboratorium meliputi *autoclave* yang digunakan untuk sterilisasi baik alat maupun medium, inkubator yang digunakan untuk menginkubasi biakan mikroba, *waterbath* dengan *shaker* untuk menginkubasi biakan cair mikroba, LAF (*laminar air flow*) yang digunakan sebagai ruang bekerja steril, *colony counter* untuk menghitung jumlah bakteri viabel dan mengamati zona hambat pertumbuhan bakteri, serta *vacuum evaporator* untuk memekatkan ekstrak. Selain alat-alat besar, alat-alat kecil lain yang digunakan dalam penelitian diantaranya adalah gelas erlenmeyer, gelas beaker, tabung reaksi, dan cawan petri. Untuk jumlah dan spesifikasi alat yang digunakan dapat dilihat pada lembar lampiran.

Beberapa bahan yang digunakan diantaranya adalah bahan-bahan untuk pembuatan medium Luria Bertani dan King's B, yaitu tripton, *yeast extract*, NaCl, agar bakteriologi, pepton, gliserol, KH_2PO_4 , MgSO_4 , serta aquades. Selain bahan-bahan yang digunakan untuk medium, beberapa bahan lain yang dibutuhkan adalah alkohol 70%, spirtus, serta molekul N- hexanoyl- homoserine- lactone (C6-HSL). Jumlah bahan dan spesifikasi bahan-bahan yang digunakan dapat dilihat pada lembar lampiran.

E. Langkah Kerja

1. Persiapan Alat dan Bahan Penelitian

Tahap ini dilakukan dengan mensterilkan seluruh alat dan bahan yang akan dibutuhkan dalam keadaan steril. Seluruh alat dan bahan (medium) disterilkan dengan menggunakan alat *auto clave* dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm, selama 15 menit. Setelah itu peralatan yang sudah steril disimpan dalam box yang bersih, sedangkan medium disimpan dalam lemari es dengan suhu 4°C .

2. Persiapan Bakteri Endofit

Persiapan diawali dengan subkultur dan pengawetan kelima bakteri endofit *V. zizanioides*, yaitu *Lysinibacillus*, *Pantoea* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., dan *Pseudomonas aeruginosa*. Subkultur dilakukan dari awetan *cryo* yang

tersedia ke medium padat Luria Bertani agar (Trypton 1%; NaCl 1%; *yeast extract* 0,5%; agar 2%) dan King's B (Pepton 2%; KH_2PO_4 0,15%; MgSO_4 0,15%; gliserol (85%) 1,5% (v/v); Agar bakteriologi 2%). Kultur diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C dan dimudakan setiap 2 minggu sekali.

3. Persiapan Strain Indikator *Quorum Sensing*

C. violaceum CVO26 digunakan sebagai strain indikator aktivitas anti-*Quorum Sensing*. Bakteri dikultur pada medium *Luria Bertani Agar* (Trypton 1%; NaCl 1%; *yeast extract* 0,5%, Agar 2%) dan diinkubasi pada suhu 27°C-30 °C. Kultur dimudakan setiap 4 hari sekali. Khusus sebelum perlakuan, bakteri dikultur pada medium *Luria Bertani Broth* (Trypton 1%; NaCl 1%; *yeast extract* 0,5%) pada suhu 27°C dengan agitasi selama 18 jam pada *water bath* dengan *shaker*.

4. Ekstraksi Supernatan Bakteri Endofit

Ekstraksi dilakukan sesuai dengan metode oleh Ahamed (2012). Kelima isolat bakteri ditumbuhkan dalam medium cair King's B pada suhu 37°C dengan agitasi 120 rpm hingga fase stasionernya. *L. sphaericus* dikultur selama 31 jam, *Pantoea* sp. selama 24 jam, *Acinetobacter* sp. selama 26 jam, *Bacillus* sp. selama 23 jam, dan *P. aeruginosa* selama 27 jam.

Kultur yang telah ditumbuhkan sesuai fase stasionernya kemudian dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Setelah didapatkan supernatan, kemudian dipindahkan ke dalam corong pemisah dan ditambahkan oleh pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:1. Kemudian campuran dikocok selama 15 menit secara konstan dan didiamkan selama 20 menit. Lapisan tengah yang terbentuk dipisahkan dan diambil. Lapisan ini lalu dipekatkan dengan menggunakan *vacuum evaporator* pada suhu 50°C.

Pemekatan dilakukan hingga terbentuk pasta. Pasta yang terbentuk diambil dan ditimbang menggunakan vial. Ekstrak yang didapat kemudian dilarutkan dalam DMSO 1 % dan disimpan dalam suhu 4°C untuk proses pemakaian selanjutnya.

5. Skrining Anti-Quorum Sensing dengan Cakram Difusi

Uji ini dilakukan untuk mengetahui adanya aktivitas penghambatan terhadap pengeluaran pigmen violacein pada *C. violaceum* CV026. Percobaan dilakukan sesuai yang dijabarkan Krishnan *et al* (2012). Sebanyak 1 ose biakan *C. violaceum* CV026 pada medium agar miring Luria Bertani diinokulasikan pada 50 ml medium cair Luria Bertani. Kultur lalu diinkubasi selama 18 jam pada suhu 27°C dan diagitasi dengan kecepatan 110 rpm. Kemudian sebanyak 4 ml kultur ($OD_{600nm}=1.2$) dicampurkan dengan 20 ml medium agar Luria Bertani yang masih cair pada cawan petri. N-hexanoyl-L-homoserine-lactone (C6-HSL) juga ditambahkan ke dalam agar dengan konsentrasi akhir 1,2 $\mu g\ ml^{-1}$. Pemberian C6-HSL bertujuan untuk menginduksi pengeluaran violacein pada *C. violaceum* CV026. Campuran medium kemudian ditunggu hingga kering atau memadat. Cakram difusi berukuran 6 mm yang sebelumnya telah direndam dalam ekstrak kasar supernatan lima bakteri endofit dengan beberapa konsentrasi (0 $mg\ ml^{-1}$; 2,5 $mg\ ml^{-1}$; 3 $mg\ ml^{-1}$; dan 3,5 $mg\ ml^{-1}$) dan ditiriskan kemudian diletakkan di atas plat. Cawan kemudian diinkubasi selama 24 jam untuk kemudian diamati adanya zona hambat.

6. Kuantifikasi Violacein

Perhitungan kadar violacein dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometri seperti yang dilakukan Choo *et al* (2005). Sebanyak 1 ose biakan *C. violaceum* CV026 pada medium agar miring Luria Bertani diinokulasikan pada 100 ml medium cair Luria Bertani. Kultur lalu diinkubasi selama 18 jam dan kemudian diinokulasikan ke dalam 2 mL medium cair Luria Bertani yang mengandung C6-HSL (1,2 $\mu g\ ml^{-1}$) dalam tabung reaksi hingga absorbansi $OD_{600nm}=0.1$. Ekstrak kemudian ditambahkan dengan konsentrasi akhir dalam medium sebanyak 2,5 $mg\ ml^{-1}$; 3 $mg\ ml^{-1}$; dan 3,5 $mg\ ml^{-1}$. Komposisi kultur secara detail dituangkan dalam Tabel 3.1.

Kultur kemudian diinkubasi dalam suhu 27°C selama 24 jam. Kemudian, sebanyak 1 ml kultur diambil dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi. Tabung disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan medium dengan sel bakteri. Setelah terpisah, supernatan yang

merupakan medium dibuang dan pelet yang terbentuk diambil. Pelet ini merupakan endapan sel-sel bakteri bersama pigmen violacein yang dihasilkan. Violacein tidak larut dalam air, sehingga harus dilarutkan dengan pelarut lain. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah DMSO. Sebanyak 1 ml DMSO kemudian ditambahkan ke tabung berisikan pelet yang terpisah. Campuran kemudian divorteks untuk melarutkan violacein pada sel dalam DMSO.

Tabel 3.1 Komposisi Kultur untuk Masing-masing Kelompok Percobaan

Kelompok Percobaan	Komposisi Kultur	Volume	Konsentrasi Akhir	Volume Total
Kontrol I	Medium LB	-	-	2 mL
	CVO26 (OD ₆₀₀ 0,1)	1,857 ml	OD _{600nm} = 0,1	
	HSL (1mg ml ⁻¹)	2,4 µL	0,12 µL ml ⁻¹	
	DMSO 1%	140 µL	0,07 % (v/v)	
Kontrol II	Medium LB	-	-	2 mL
	CVO26 (OD ₆₀₀ 0,1)	1.860 ml	OD _{600nm} = 0,1	
	DMSO 1%	140 µL	0,07 % (v/v)	
Perlakuan	Medium LB	-	-	2 mL
	CVO26 (OD ₆₀₀ 0,1)	1,857 ml	OD _{600nm} = 0,1	
	HSL (1mg ml ⁻¹)	2,4 µL	0,12 µL ml ⁻¹	
	Ekstrak Kasar	140 µL	2,5; 3; dan 3,5 mg ml ⁻¹	

Tabung kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit kembali untuk memisahkan violacein terlarut dengan sel-sel bakteri yang sudah terpisah dengan pigmennya. Supernatan yang merupakan violacein yang larut kemudian diambil sebanyak 0,5 ml untuk kemudian ditambahkan dengan DMSO kembali sebanyak 0,5 ml. Larutan kemudian dipindahkan dan diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 585 nm.

Kadar violacein pada kelompok perlakuan ekstrak dibandingkan dengan kontrolnya. Perbedaan signifikan menunjukkan adanya pengaruh pemberian ekstrak terhadap produksi violacein pada *C. violaceum* CV026.

7. Uji Antimikroba terhadap CV026

Uji ini dilakukan untuk mengetahui pengurangan kadar violacein disebabkan karena aktivitas anti- *quorum sensing* atau antimikroba terhadap *C. violaceum* CV026. Pengamatan dilakukan dengan melakukan prosedur ALT (Angka Lempeng Total) dari kultur uji untuk perhitungan kadar violacein. Kultur diencerkan dengan faktor pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-8} . Kemudian sebanyak 1 ml dari kultur yang telah diencerkan pada faktor pengenceran 10^{-6} hingga 10^{-8} dituang ke dalam cawan petri dan dicampur dengan 10 ml medium Muller Hinton Agar yang telah dicairkan dan tidak terlalu panas. Cawan diinkubasi pada suhu 27°C selama 24 jam untuk kemudian dihitung jumlah koloninya. Jumlah koloni dibandingkan antara kelompok perlakuan dan kontrol. Penurunan signifikan jumlah koloni kelompok perlakuan dari kelompok kontrol menunjukkan adanya aktivitas anti-bakteri ekstrak terhadap *C. violaceum*.

Selain itu, untuk mengamati dan memastikan adanya penghambatan terhadap pertumbuhan *C. violaceum* CV026, dilakukan uji menggunakan cakram difusi. *C. violaceum* CV026 diinkubasi selama 18 jam dalam medium cair Luria Bertani. Kemudian sebanyak 100 μL kultur ($\text{OD}_{600\text{nm}}=0,1$) disebar pada permukaan Muller Hinton Agar (MHA). Cakram dengan diameter 6 mm yang sebelumnya direndam pada ekstrak kasar supernatan bakteri endofit dengan beberapa konsentrasi ($2,5 \text{ mg ml}^{-1}$; 3 mg ml^{-1} ; dan $3,5 \text{ mg ml}^{-1}$) dan ditiriskan diletakkan di atas cawan yang telah berisikan *C. violaceum* CV026 dan medium agar.

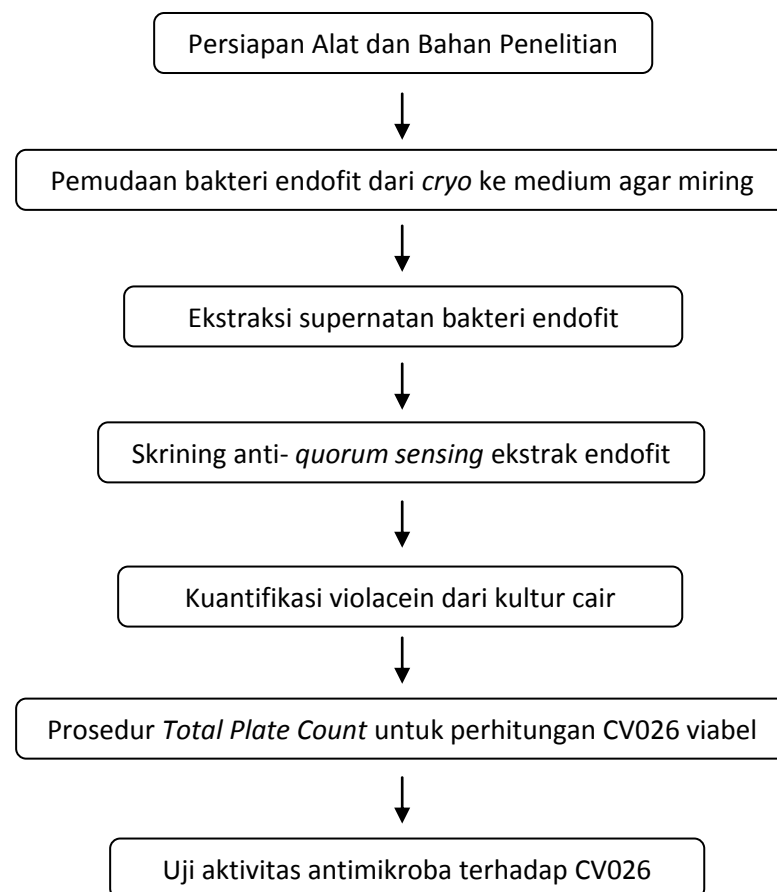
Cawan diinkubasi selama 24 jam untuk kemudian diamati adanya zona inhibisi. Adanya zona hambat di sekitar cakram menunjukkan aktivitas antimikroba dari ekstrak. Sehingga, ekstrak yang memiliki aktivitas demikian tidak dapat dikatakan menurunkan kadar violacein dengan menghambat *quorum sensing*.

G. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan bantuan *software* SPSS 16.0. Data kadar violacein dianalisis dengan uji non-parametrik Kruskal-Walis dan kemudian dilanjutkan pada uji Mann-Whitney U. Sedangkan data bakteri *C. violaceum* CV026 viabel diuji menggunakan analisis varians (*One Way Anova*) dan kemudian dilanjutkan pada uji berganda Duncan.

H. Alur Penelitian

Alur penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada gambar di bawah ini:



Gambar 3.1 Skema Alur Penelitian