

LAPORAN AKHIR PENELITIAN
PROGRAM PENELITIAN UNGGULAN BERORIENTASI
HAK KEKAYAAN INTELEKTUAL (HKI)

Anti Quorum Sensing Supernatan Bakteri
Endofit Akar *Vetiveria zizanioides* L.



Dr. Any Fitriani, M.Si.
Dr. Riandi, M.Si.
dr. Rita Shintawati, M.Kes
Any Aryani, S.Si. M.Si.

PROGRAM STUDI BOLOGI
JURUSAN PENDIDIKAN BIOLOGI
FAKULTAS PENDIDIKAN MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PENDIDIKAN INDONESIA
Jl. Dr. Setiabudhi 229 Bandung 40154
022-2001937
Oktober, 2014

**Lembar Pengesahan Program Penelitian Unggulan Berorientasi
Hak Kekayaan Intelektual (HKI)**

Judul Penelitian : Anti quorum sensing supernatan bakteri endofit akar *Vetiveria zizanioides* L.
Nama Ketua Peneliti : Dr. Any Fitriani, M.Si.
NIP : 196502021991032001
Pangkat/Gol./Jabatan : Lektor Kepala/IV a/Pembina
Program Studi : Biologi
Jurusan/Fakultas : Pendidikan Biologi/FPMIPA
Alamat Rumah : Kompleks Nata Endah C-44 Kopo Bandung 40228
Telepon/HP/Fax/email : 22-5416205/+8122380657/22-5416205/
anyfitriani@yahoo.com
Nama anggota peneliti :

No.	Nama dan Gelar	Bidang Keahlian	Instansi Jurusan/Fakultas/Asal PT
1	Dr. Riandi, M.Si.	Genetika	Jurusan Pend.Biologi/FPMIPA/UPI
2	dr.Rita Shintawati, M.Kes	Mikrobiologi Kesehatan	Jurusan Pend.Biologi/FPMIPA/UPI
3	Any Aryani, S.Si, M.Si.	Genetika Molekuler	Jurusan Pend.Biologi/FPMIPA/UPI

Jangka waktu penelitian : 1 tahun
Biaya yang dibutuhkan : 45.000.000,00 (empat puluh lima juta rupiah)

Mengetahui,
Dekan FPMIPA,

Bandung, Desember 2014
Ketua Peneliti,

Prof. Dr. Asep Kadarohman, M.Si.
NIP. 196305091987031002

Dr. Any Fitriani, M.Si.
NIP. 196502021991032001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat

Prof. Dr. H. Sumarto, MSIE
NIP. 195507051981031005

ABSTRAK

Bakteri endofit sebagai salah satu agen simbiosis pada tumbuhan mempunyai karakter khusus, terutama fungsi bagi inang. Bakteri endofit pada tumbuhan obat memiliki metabolisme sekunder serupa dengan inangnya. Demikian juga dengan bakteri endofit pada *Vetiveria zizanioides*, sudah dilakukan isolasi bakteri, karakterisasi morfologi, biokimia, fisiologi, dan genetika, yang berkaitan sintesis senyawa antibakteri. Dari 17 isolat bakteri endofit yang terisolasi, hanya 5 isolat yang menunjukkan hasil positif sebagai antibakteri dan terbukti secara genetika. Namun, *Mode of action* senyawa antibakteri dari bakteri endofit *V. zizanioides* masih perlu diteliti, salah satunya dengan analisis anti *quorum sensing* dengan *Chromobacter violaceum* CV026. Tujuan dari penelitian ini adalah mengkarakterisasi dan menganalisis lima bakteri endofit sehingga diperoleh spesies bakteri endofit yang memiliki sifat anti *quorum sensing*. Metode penelitian meliputi pengkulturan lima spesies bakteri endofit *V. zizanioides*, ekstraksi metabolit sekunder dari masing-masing supernatan bakteri, uji anti *quorum sensing*, dan kuantifikasi senyawa violacein dari *C. violaceum* CV026. *Bacillus* dan *Pseudomonas aeruginosa* mempunyai kemampuan sebagai anti Quorum Sensing.

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
A.PENDAHULUAN	1
B.ROADMAP PENELITIAN	3
C.TINJAUAN PUSTAKA	9
D.METODE PENELITIAN	14
E.HASIL DAN PEMBAHASAN	15
F.KESIMPULAN	30
G.PUSTAKA RUJUKAN	30

1. Latar Belakang Masalah

Tanaman akar wangi (*Vetiveria zizanioides* L.) merupakan tanaman herba yang banyak digunakan sebagai pengharum karena dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti minyak atsiri yang juga dapat berfungsi sebagai obat (Champagnant *et al.* 2006). Selama ini, pemanfaatan dan pengetahuan mengenai potensi tanaman akar wangi masih terbatas pada pengolahan minyak atsiri dan kerajinan dari akar wangi. Tanaman akar wangi sendiri dewasa ini banyak digunakan dalam pengobatan herbal, hal tersebut mengindikasikan adanya kandungan senyawa metabolit yang berguna dalam bidang farmakologi. Potensi terbentuknya metabolit sekunder pada tanaman akar wangi, beberapa terkait dengan aktivitas bakteri endofit yang berada pada organ tanaman dimana bakteri mampu merombak senyawa kompleks menjadi lebih sederhana yang dapat memicu tanaman menghasilkan metabolit sekunder (Fitriani *et al.* 2013).

Hampir setiap tanaman tingkat tinggi memiliki bakteri endofit yang berada pada jaringan tanaman baik batang, daun, maupun akar, dari berbagai jenis tanaman yang tersebar di muka bumi ini, masing-masing tanaman memiliki satu atau lebih mikroba endofit yang terdiri dari jamur dan bakteri (Rosenblueth & Romero 2006). Kemampuan pembentukan senyawa metabolit sekunder oleh tanaman inang, juga dimiliki oleh mikroorganisme endofit, dimana bahan aktif yang dapat dibentuk oleh mikroorganisme endofit diperkirakan memiliki kemampuan yang sama dengan bahan aktif yang dihasilkan tanaman inang (Strobel *et al.* 2003). Kemampuan bakteri endofit dalam memproduksi senyawa metabolit sekunder merupakan potensi untuk dimanfaatkan sebagai sumber produksi dan sebagai upaya mengurangi pemanfaatan tanaman untuk ditebang.

Biosintesis metabolit sekunder pada bakteri endofit berperan sebagai antibakteri sudah dipelajari secara terstruktur. Lima spesies bakteri endofit yang diisolasi dari akar *V. zizanioides* sudah dipelajari dari berbagai aspek, yaitu morfologi, fisiologi, biokimia, genetika. Karakterisasi spesies dilakukan dengan analisis urutan DNA pada gen 16S rRNA. Ada lima spesies bakteri yang sedang dipelajari, yaitu *Lysinibacillus spaericus*, *Pantoea sp.*, *Bacillus sp.*, *Acinetobacter sp.* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Karakterisasi senyawa antibakteri dengan kromatografi gas (GC-MS) menunjukkan bahwa *L. spaericus* menghasilkan hydroxyacetic acid hydrazide, *Pantoea sp.* menghasilkan (N-methyl-N-[2'-(4pyridyl) ethyl]-2(2pyridyl), 5,6-(ethylene disulfonyl)-3a,4,7,7a,tetrahydroindene, (3R,4s)-3-(2-nitro-4-methoxyphenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)hexan, N-methyl-N-[2'-(4-pyridyl)ethyl amine, N-methyl-N-[2'-(4-pyridil)ethyl]-2(2pyridil)ethylamine, 5,6-(ethylene disulfonyl)-3a,4,7,7a-tetrahydroindene. *Bacillus sp.* menghasilkan 1,2-benzene

dicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl)ester. *Acinetobacter* sp. menghasilkan hydrazinecarboxylic acid dan ethyl ester. *Pseudomonas aeruginosa* menghasilkan 2-(5-chloro-2-methoxyphenyl)pyrole, 3-(1-phenyl-2,3 dihydro-1H-isoindol-2-yl)propan-1-ol, 1H-isoindole-1,3(2H)-dithion. Senyawa di atas berperan sebagai antimikroba pada bakteri patogen, yaitu *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Fitriani *et al.* Reviewed).

Senyawa antimikroba beragam dalam *mode of action*. Seperti pada ampicillin dan beberapa senyawa yang digunakan untuk pengobatan penyakit infeksi, senyawa tersebut dapat membunuh bakteri dengan cara merusak dinding sel atau mengganggu proses translasi pada sintesis protein. Senyawa antimikroba dengan mekanisme ini akan memusnahkan bakteri-bakteri lain yang sifatnya tidak patogen. Padahal banyak bakteri yang sifatnya menguntungkan bagi kesehatan manusia (probiotik) (Engleberg *et al.* 2013).

Alternatif lain dari *mode of action* senyawa antimikroba adalah dengan menekan jumlah individu dari bakteri patogen tersebut. Fenomena ini berkaitan dengan mekanisme *quorum sensing* (QS) pada bakteri patogen. Salah satu sistem yang dimiliki bakteri dalam mengekspresikan sifatnya dipengaruhi oleh QS, artinya jumlah bakteri yang ada sangat menentukan ekspresi gen tertentu, terutama gen virulensi. Banyak sekali sifat patogenisitas bakteri yang dipengaruhi oleh QS. Quorum Sensing mempengaruhi juga motilitas bakteri, karena motilitas merupakan salah satu sifat yang mempengaruhi patogenisitas. Motilitas pada bakteri diistilahkan sebagai *swarming*, yang dijelaskan sebagai pergerakan bakteri pada lingkungannya. Senyawa anti QS mampu menghambat *swarming* bakteri (Madigan *et al.* 2012).

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan permasalahannya sebagai berikut : “Bagaimana potensi anti Quorum Sensing (QS) bakteri endofit *Lysinibacillus spaericus*, *Pantoea* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp. dan *Pseudomonas aeruginosa* yang diisolasi dari akar *Vetiveria zizanioides* ?”

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mendapatkan spesies bakteri yang berpotensi sebagai anti QS.
2. Mendapatkan konsentrasi optimum ekstrak supernatan bakteri endofit sebagai anti QS.
3. Mendapatkan konsentrasi optimum ekstrak supernatan bakteri endofit yang dapat menghambat *swarming*.

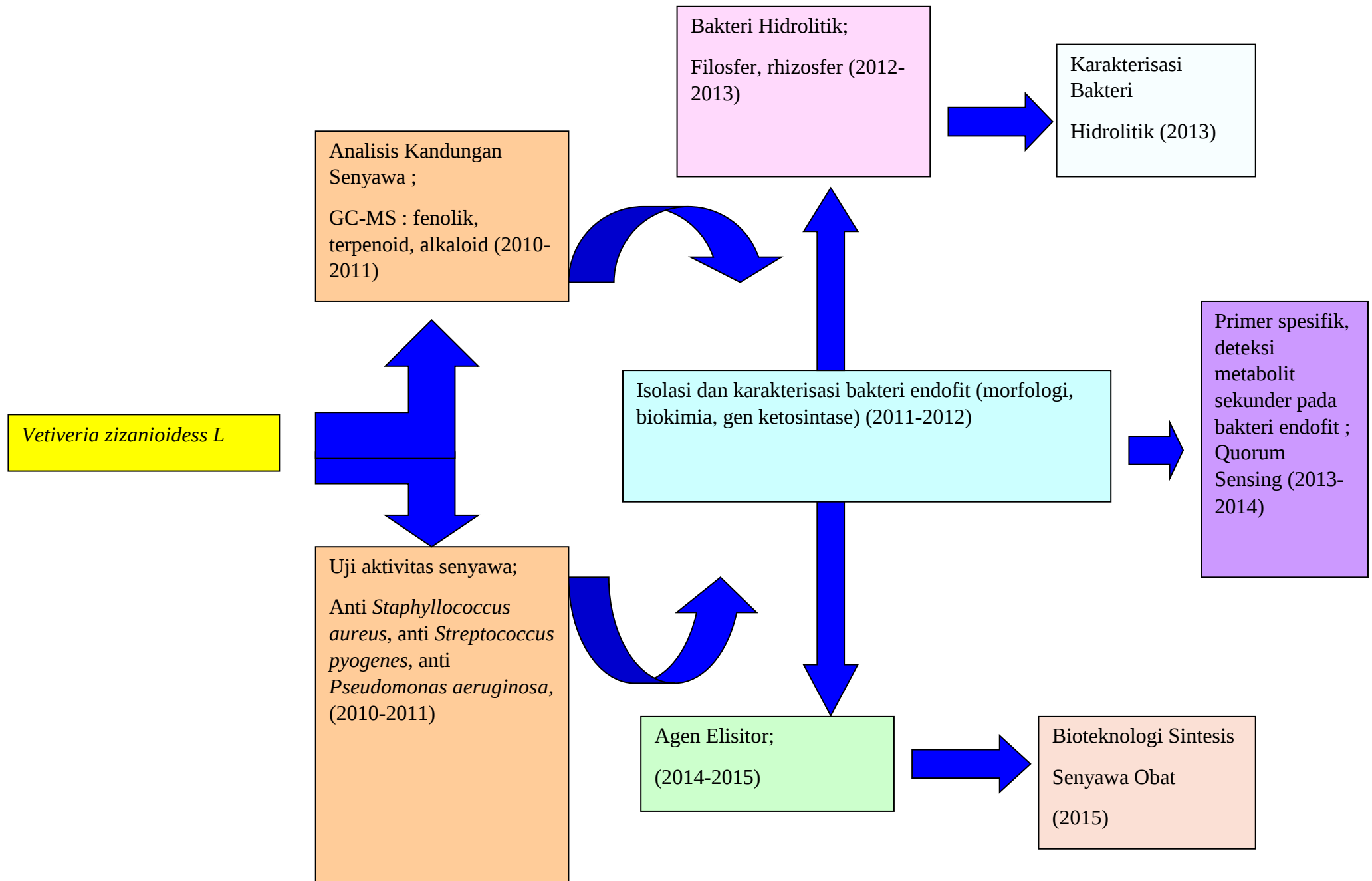
2. Urgensi dan Luaran Penelitian

Penelitian ini pada dasarnya adalah karakterisasi sifat senyawa antimikroba dari bakteri endofit. Karakterisasi ini sangat penting dilakukan berkaitan dengan eksplorasi sifat senyawa sebagai antimikroba yang mengarah ke *mode of action*. Hasil penelitian ini melengkapi hasil-hasil penelitian sebelumnya yang berkaitan dengan karakterisasi morfologi, fisiologi, biokimia, dan genetika.

Luaran penelitian akan menghasilkan paten (HKI) yang berkaitan dengan ***potensi jasad mikroorganisme***. Selain itu, sebagai bahan buku ajar pada matakuliah ***Mikrobiologi***.

B. ROADMAP PENELITIAN

Tema penelitian yang akan dilakukan merupakan bagian dari payung penelitian Kelompok Bidang Keilmuan (KBK) Bioteknologi, Prodi Biologi, Jurusan Pendidikan Biologi. Payung penelitian yang dikerjakan adalah Eksplorasi tumbuhan obat dan simbiionnya (bakteri endofit) sebagai antimikroba. Payung penelitian yang sedang dikerjakan sangat sesuai dengan salah satu payung Universitas Pendidikan Indonesia (UPI), yaitu Penelitian disiplin ilmu untuk pengokohan ilmu pendidikan. Penelitian yang sedang dilakukan merupakan media untuk pengembangan ilmu pendidikan, seperti untuk pengembangan strategi, metode, dan model pembelajaran yang diberikan pada mahasiswa pada matakuliah yang relevan.



Gambar 2.2 Roadmap Penelitian (Fitriani, 2010-2015)

C. TINJAUAN PUSTAKA

Vetiveria zizanioides pertama kali ditemukan di India dengan nama *Khas khas*. Tanaman ini merupakan rerumputan yang telah lama dimanfaatkan sebagai parfum dan obat-obatan serta memiliki peranan penting dalam kehidupan ekonomi sosial masyarakat India. Sejak lama, akarnya dimanfaatkan untuk membuat layar, matras, kipas, dan keranjang. Selain itu juga dimanfaatkan untuk mengatasi gigitan ular, kalajengking, mengobati demam, epilepsi, dan sariawan (Rao & Suseela 2004).

Secara ekologi, *V. zizanioides* memiliki adaptasi yang kuat terhadap kekeringan, basah, dingin, panas, asam, dan basa. Hal ini menunjukkan bahwa *V. zizanioides* memiliki sistem perakaran yang kuat, pertumbuhan yang cepat, mudah ditanam, mampu bertahan dalam lingkungan ekstrim. *V. zizanioides* tidak memiliki stolon namun memiliki rizoma yang sangat pendek dan besar. Perakaran tumbuh dengan sangat cepat. Akar dapat tumbuh hingga kedalaman 3 hingga 4 meter di bawah tanah. Tanaman ini juga memiliki batang yang tegak dan mampu bertahan dari arus air (Truong 1999).

Bakteri endofit merupakan bakteri yang berkoloni di dalam jaringan tumbuhan di mana biasanya tidak mempengaruhi perubahan secara morfologi dan gejala kelainan pada tumbuhan. Beberapa bakteri endofit dapat menunjang pertumbuhan tumbuhan dan melindunginya dari fitopatogen. Beberapa mekanisme dari bakteri endofit memberikan efek menguntungkan bagi tumbuhan (Malfanova 2013). Telah dibuktikan bahwa bakteri endofit juga meningkatkan hasil produksi pada tanaman ladang, menekan pertumbuhan patogen, menghilangkan kontaminasi, melarutkan fosfat, dan berkontribusi menyediakan nitrogen bagi tumbuhan (Rosenblueth & Romero 2006).

Bakteri endofit pada *Vetiveria zizanioides* ditemukan pertama kali melalui mikroskop elektron. Pengamatan sebelumnya ditujukan untuk mengamati minyak esensial yang dihasilkan oleh sel-sel korteks. Minyak esensial pada *V. zizanioides* banyak dihasilkan pada sel-sel korteks, di luar endodermis pada akar dewasanya. Bakteri endofit ditemukan pada tempat yang sama dengan tempat dihasilkannya banyak minyak esensial tersebut. Beberapa bakteri endofit yang ditemukan adalah *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas corrugate*, *Pseudomonas thivervalensis*, *Serratia grimesii*, dan *Duganella violaceusniger* (Pontieri 2005).

Fitriani *et al.* (2013) berhasil mengisolasi 17 jenis bakteri endofit dan 5 diantaranya diketahui memiliki gen *Ketosintase*. Gen ini merupakan gen yang mengendalikan produksi antibiotik dan produk lainnya yang diperlukan dalam industri medis. 5 bakteri yang

ditemukan tersebut adalah *Lysinibacillus sphaericus*, *Pantoea sp.*, *Bacillus sp.*, *Acinetobacter sp.*, dan *Pseudomonas aeruginosa*.

Metabolit sekunder yang dihasilkan dari bakteri endofit tanaman memiliki potensi sebagai komponen antimikroba yang melawan beberapa patogen pada tubuh manusia. Beberapa ekstrak dari bakteri endofit mampu menghambat pertumbuhan patogen. Selain itu juga ditemukan bahwa ekstrak tersebut mengandung senyawa metabolit sekunder yang besar (Kaaria *et al.* 2012).

Metabolit sekunder juga ditemukan dari bakteri laut, *Pseudomonas sp.*. Metabolit sekunder tersebut memiliki molekul ringan dengan aktivitas radikal bebas yang berperan dalam melisis beberapa bakteri patogen termasuk pada strain MRSA (*Metachillin Resistent Staphylococcus aureus*) (Charyulu 2009).

Quorum sensing (QS) merupakan mekanisme komunikasi antar sel dan koordinasi perilaku dalam merespon perubahan lingkungan. Komunikasi ini merupakan mekanisme yang sangat penting bagi pertahanan bakteri. Bakteri gram positif dan negatif menggunakan QS untuk mengatur berbagai aktivitas fisiologis. QS diantaranya mengatur aktivitas simbiosis, virulensi, kompetensi, konjugasi, produksi antibiotik, sporulasi, dan pembentukan biofilm (Miller dan Bassler, 2001). QS juga memungkinkan bakteri merespon perubahan lingkungan berupa ketersediaan nutrisi, keberadaan mikroba lain dan racun (Lal 2009).

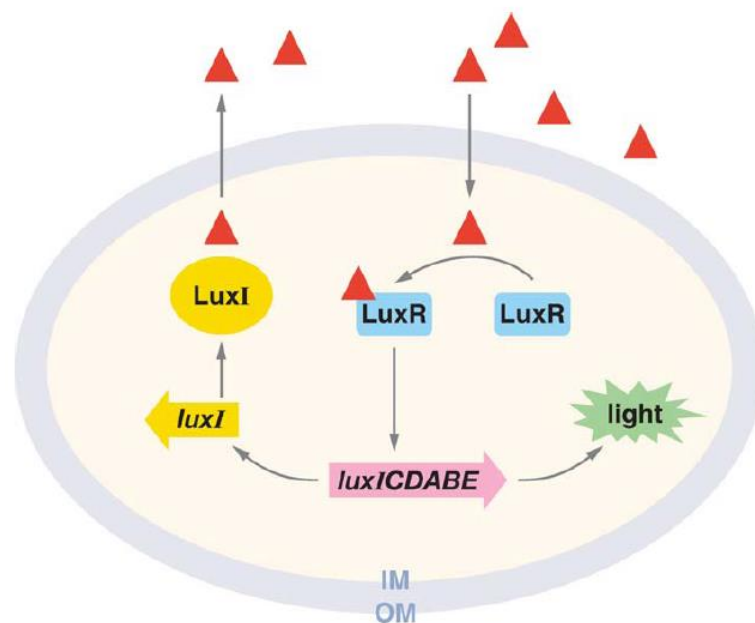
QS dimulai ketika sensor kinase atau protein pengatur respon teraktivasi oleh sinyal berupa molekul (*autoinducer*) (Camara *et al.* 2002). Setiap sel menghasilkan molekul-molekul dan ketika molekul telah mencapai konsentrasi yang cukup, transkripsi gen tertentu akan terinisiasi (Montgomery 2013). Seiring dengan meningkatnya pertumbuhan bakteri, konsentrasi molekul sinyal di sekitar akan semakin banyak dan menyebabkan sel menghasilkan molekul sebagai respon. Mekanisme ini disebut sebagai *feedback* positif. Sehingga dapat dikatakan bahwa jumlah sinyal molekul berbanding lurus dengan kepadatan populasi bakteri (kuorum) (Lal 2009).

Pada bakteri Gram negatif, meskipun banyak ditemukan beberapa kelompok molekul sinyal, namun molekul sinyal yang paling sering diteliti dan dipelajari adalah molekul sinyal dari kelompok *N-acylhomoserine Lactone* (AHL). AHL selama bertahun-tahun telah dianggap sebagai molekul sinyal yang berkaitan dengan bioluminansi pada bakteri laut. Pada beberapa bakteri patogen manusia seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium violaceum*, *Yersinia pseudotuberculosis*, dan *Serratia marcescens*, produksi AHL dilakukan untuk mengatur berbagai macam aktivitas

fisiologis yang berkontribusi untuk menentukan virulensi dan menyebabkan kerusakan jaringan (Camara *et al.* 2002).

Mekanisme QS pada bakteri gram negatif pertama kali dikenal lewat bakteri Gram negatif laut yang memiliki kemampuan bioluminansi, *Vibrio fischeri*. Dua jenis protein yaitu *LuxI* dan *LuxR* yang mengendalikan ekspresi dari operon *luciferase* (*luxICDABE*) diperlukan dalam menghasilkan cahaya (Waters dan Bassler, 2005). Sintesis AHL sangat bergantung pada interaksi sinyal molekul dengan protein *LuxR* (Chan *et al.* 2011).

Protein *LuxI* bertanggung jawab dalam biosintesis HSL spesifik yang dikenal sebagai *autoinducer*. Konsentrasi *autoinducer* meningkat seiring dengan meningkatnya kepadatan populasi sel bakteri. Protein *LuxR* berikatan dengan *autoinducer* (HSL) setelah *autoinducer* tersebut telah mencapai ambang konsentrasi yang cukup. Kompleks *LuxR*-*autoinducer* kemudian mengaktifkan transkripsi gen tertentu yang kemudian akan diekspresikan (Engerbrecht 1983).



Gambar 3. Mekanisme QS pada *Vibrio fischeri*
(Waters & Bassler, 2005)

Setiap sel bakteri menghasilkan sejumlah kecil AHLs yang kemudian ditransport dari luar ke dalam sel melalui membran secara transport aktif. Sel bakteri hanya dapat terstimulasi oleh jumlah tertentu (kuorum) dari peningkatan kepadatan populasi untuk merespon informasi. Pada konsentrasi AHL yang tinggi, kompleks *autoinducer* dan protein akan menjadi stabil di dalam sel dan menginisiasi ekspresi gen tertentu (Kato *et al.* 2006).

Pada bakteri gram-negatif juga ditemukan sistem QS yang responsif terhadap lebih dari satu jenis *autoinducer*. Dua jenis bakteri yang diketahui memiliki sistem QS ini adalah *Vibrio harveyi* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Waters & Bassler 2005). Tidak seperti *V. fischeri*, *V. harveyi* memiliki dua jalur paralel. *V. harveyi* menghasilkan sinyal AHL yang disebut HAI-1. Produksi HAI-1 dikendalikan oleh gen *LuxM*. HAI-1 berikatan dengan sensor pada membran, sensor histidin-kinase (*LuxN*) yang serupa dengan jalur *signaling* pada bakteri Gram-positif (Bassler, 1993). Molekul sinyal kedua *V. harveyi* adalah furanosyl borate disaster yang dikenal sebagai AI-2. Produksi AI-2 melibatkan enzim *LuxS*. AI-2 berikatan pada periplasma melalui protein *LuxP*. Kompleks *LuxP*-AI-2 berhubungan dengan sensor *histidin kinase* lainnya (Henke & Bassler 2004).

Tidak seperti bakteri Gram-negatif, bakteri Gram-positif menggunakan peptida sebagai molekul sinyal *quorum sensing*. Molekul tersebut dikenal sebagai AIP (*autoinducer peptide*) dan telah diketahui digunakan oleh beberapa bakteri patogen untuk mengatur beberapa proses fisiologis selnya. *Bacillus subtilis* dan *Streptococcus pneumoniae* menggunakannya untuk mengatur sifat kompetensi dan sporulasi. Selain itu, sama seperti molekul sinyal pada bakteri Gram-negatif, molekul ini juga menentukan sifat virulensi (Camara *et al.* 2002).

AIP merupakan senyawa yang disintesis oleh ribosom sebagai peptida prekursor dan dikeluarkan dari sel. Selama proses berlangsung, prekursor dapat menargetkan lebih dari satu gen untuk ditranslasi. Pada kebanyakan kasus, AIP hanya dikenal sebagai molekul komunikasi. Namun sebenarnya AIP juga memiliki aktivitas antimikroba (Sturme 2002).

AIP disekresi melalui transporter *ATP-binding cassette* (ABC). Mekanisme sinyal terdiri dari jalur fosforilasi dan defosforilasi. Pada bakteri gram-positif, lokus peptida sinyal prekursor ditranslasi menjadi protein prekursor yang kemudian mengarahkannya untuk memproduksi sinyal *autoinducer*. Ketika konsentrasi AIP di luar sel terakumulasi dalam jumlah yang sedikit, sensor kinase histidin akan mendeteksinya. Sensor kinase kemudian melakukan fosforilasi pada residu histidin (H) dan kemudian grup fosforil dipindahkan menuju protein regulator respon. Regulator tersebut difosforilasi pada residu aspartat (D). kemudian, regulator yang telah difosforilasi tersebut mengaktifasi transkripsi pada gen tertentu (Miller & Bassler 2001).

Chromobacterium violaceum merupakan bakteri gram-negatif, fakultatif anaerob, motil, dan dapat ditemukan pada tanah dan air. *C. violaceum* memiliki kemampuan untuk memproduksi pigmen berwarna ungu yang disebut dengan violacein (Antunes *et al.* 2006). Violacein yang dihasilkan oleh *C.violaceum* diketahui dikendalikan oleh QS. Ekstrak

supernatan dari kultur *C.violaceum* sebelumnya telah ditemukan dapat menginduksi bioluminansi pada *E. coli* rekombinan. Seperti yang diketahui bioluminansi pada bakteri juga diatur melalui QS yang diinduksi oleh AHL. Dengan ditemukannya bahwa ekstrak supernatan dari *C. violaceum* dapat menginduksi QS pada *E. coli*, peneliti menyimpulkan bahwa *C.violaceum* dapat menghasilkan senyawa AHL (McClean *et al.* 1997). *C. violaceum* kemudian terbukti dapat menjadi strain indikator penghambatan terhadap QS yang lebih efektif dibandingkan dengan bakteri-bakteri strain indikator yang lain seperti *Pseudomonas aureofasciens* (McLean. 2004).

Swarming merupakan pergerakan terkoordinasi dari sel-sel bacteria dalam jumlah yang sangat banyak. *Swarming* terlihat sebagai sebaran pada permukaan medium. Pergerakan ini sangat penting bagi bakteri untuk dapat mencapai nutrisi yang tidak dapat dicapai oleh sel-sel bakteri yang terisolasi. Selain itu, *swarming* juga penting untuk mempertahankan diri melawan predator. Pada jaringan inang, *swarming* dilakukan bakteri untuk membentuk biofilm dan untuk memperluas infeksi (Kaiser 2007).

Swarming merupakan pergerakan bakteri yang dibantu oleh flagel. Pergerakan ini dimediasi oleh matriks berupa surfaktan, oligopeptida, protein, dan lain-lain yang dikeluarkan oleh bakteri. Pengeluaran matriks ini diatur oleh sistem komunikasi antar sel, yaitu *quorum sensing* (Daniels *et al.* 2004).

D. METODE PENELITIAN

1. Persiapan Sampel

Persiapan sampel diawali dengan sub-kultur dan pengawetan kelima sampel bakteri yang telah diisolasi sebelumnya. Sub-kultur dilakukan dari *cryo* ke medium padat *Luria Bertani*. Kultur kemudian akan disimpan pada suhu 37°C pada inkubator dan dimudakan setiap 2 minggu sekali.

2. Persiapan Kultur *C. violaceum*

Chromobacterium violaceum CVO26 akan digunakan sebagai bioindikator aktivitas anti- Quorum Sensing. Bakteri akan dikultur dalam medium *Luria Bertani Broth* dan diinkubasi pada suhu 30°C dengan agitasi selama 24 jam pada *water bath* dengan *shaker*. HSL dengan konsentrasi 0,12µL/ ml, ditambahkan ke dalam kultur untuk menginduksi pengeluaran *violacein*. HSL didapatkan dari SIGMA Aldrich Singapura.

3. Ekstraksi Supernatan Bakteri Sampel

Kelima isolat bakteri akan ditumbuhkan dalam medium cair hingga fase stasionernya. Kultur kemudian akan dipindahkan ke dalam tabung mikro dan disentrifugasi dengan

kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Setelah didapatkan supernatan, kemudian dipindahkan dan ditambahkan etil asetat dengan perbandingan 1:1. Kemudian dikocok selama 15 menit dan didiamkan selama 20 menit. Kemudian lapisan atas yang terbentuk akan dipekatkan dalam *vacuum evaporator* pada suhu 40°C. Ekstrak yang didapat kemudian akan dilarutkan dalam DMSO dan disimpan dalam suhu 4°C (Ahamed 2012).

4. Uji Aktivitas Anti-QS

Pengujian dilakukan berdasarkan prosedur McLean (2004) dengan beberapa modifikasi. Langkah pertama dalam uji ini adalah mempersiapkan kultur *Chromobacterium violaceum* CV026 pada medium LB Broth. *C. violaceum* diinkubasi pada suhu 30°C sambil diagitasi semalaman hingga .

Medium yang digunakan untuk uji anti-QS ini merupakan medium LB *double layer*. Medium akan dibuat menjadi 2 lapisan. Lapisan bawah bertekstur lebih padat dengan komposisi agar sebanyak 1,5%. Sedangkan lapisan atas bertekstur lebih cair dengan komposisi agar sebanyak 0,8%. Uji anti-QS akan dilakukan dengan menggunakan metode cakram difusi sesuai metode yang dilakukan Song *et al.* (2012).

Kultur akan diambil sebanyak 50µL dan dipindahkan ke 15 ml medium plat agar LB pada lapisan atas (dengan komposisi agar 0,8%) yang juga mengandung HSL 0,12 µg/ mL. Kelima ekstrak supernatan bakteri kemudian akan diteteskan sebanyak 20 µL pada masing-masing cakram yang telah diletakkan di atas medium. Aktivitas anti-QS akan ditunjukkan oleh zona yang bening di sekitar cakram.

5. Kuantifikasi Produksi Violacein

Kuantifikasi terhadap produksi violacein akan dilakukan untuk mengetahui seberapa banyak ekstrak kasar supernatan bakteri dapat menghambat produksi violacein. Langkah kerja ini akan dilakukan sesuai prosedur Choo *et al.* (2005) dengan beberapa modifikasi. *C. violaceum* sebelumnya diinkubasi selama 16-18 jam hingga mencapai $OD_{600nm} = 0.1$. Inkubasi dilakukan pada tabung reaksi (Merk Pyrex) berisi 3 ml LB dengan penambahan HSL (0,12 µg/mL) dan DMSO, LB dengan penambahan DMSO saja, serta LB dengan penambahan HSL (0,12 µg/mL) serta ekstrak kasar supernatan bakteri. Kultur diinkubasi pada suhu 27°C dan diagitasi dengan kecepatan 150 rpm/menit selama 24 jam. Masing-masing kultur kemudian diambil sebanyak 1 ml untuk dimasukkan ke dalam *cuvette* steril untuk kemudian dihitung jumlah *violacein*-nya dengan menggunakan alat spektrofotometer. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan panjang gelombang 585nm.

6. Perhitungan Jumlah Pertumbuhan Bakteri Strain Indikator

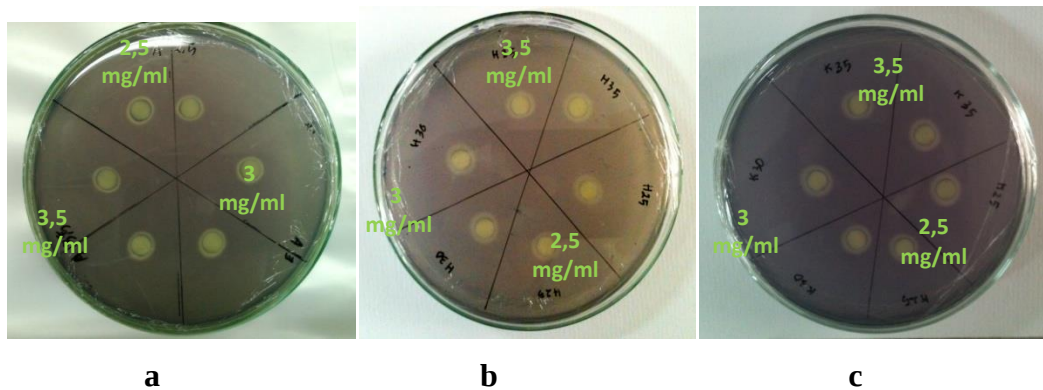
Perhitungan jumlah pertumbuhan bakteri *C. violaceum* dilakukan untuk mengetahui pengurangan jumlah produksi violacein oleh bakteri yang disebabkan oleh aktivitas antibakteri dari ekstrak kasar supernatan. Sampel diambil dari kultur yang sama dengan yang digunakan pada kuantifikasi total violacein. Sebanyak 1 ml kultur yang telah diinkubasi diambil ke dalam tabung kuvet mikro. Kultur kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm.

E. HASIL DAN PEMBAHASAN

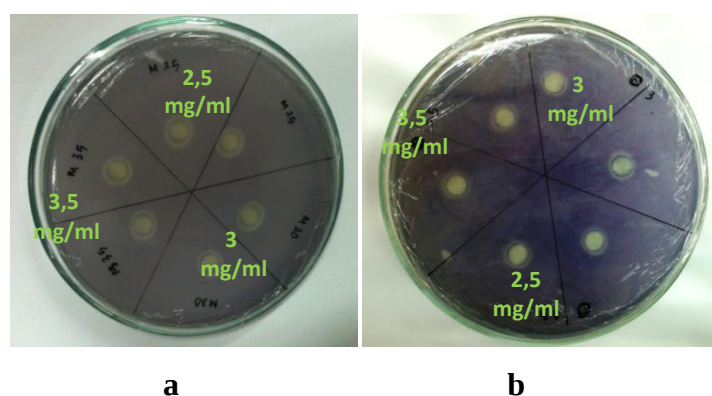
1. Skrining Aktivitas anti- Quorum Sensing dengan Cakram Difusi

Pengujian aktivitas anti-quorum sensing pertama dilakukan dengan menggunakan cakram difusi di atas plat berisi campuran medium agar dengan biakan *Chromobacterium violaceum* CV026 dan C6-HSL dengan konsentrasi $1.2 \mu\text{g ml}^{-1}$. Pemberian C6-HSL pada campuran kultur bertujuan untuk menginduksi pengeluaran violacein. Sebagaimana telah dijelaskan (McLean, 2004), *Chromobacterium violaceum* CV026 tidak dapat menghasilkan sinyal *autoinducer*-nya sendiri sehingga harus diinduksi oleh sinyal *autoinducer* dari luar yang mampu direspon, yaitu N-hexanoyl homoserine lactone (C6-HSL atau HHL). Berikut merupakan hasil skrining aktivitas anti- quorum sensing ekstrak terhadap *Chromobacterium violaceum* CV026.

Hasil dari uji ini adalah berupa zona hambat yang muncul di sekitar cakram. Uji dengan menggunakan plat ini hanya dapat mengetahui apakah ekstrak kasar supernatan mampu menghambat produksi violacein dari *Chromobacterium violaceum* CV026. Namun sulit untuk mengetahui apakah penghambatan ini diakibatkan karena aktivitas anti quorum sensing atau aktivitas antimikroba ekstrak kasar supernatan endofit terhadap *Chromobacterium violaceum* CV026. Hal ini diakibatkan karena sulitnya membedakan warna medium dengan biakan.



Gambar 1. Hasil Skrining Aktivitas Anti-Quorum Sensing ekstrak kasar supernatan *Lysinibacillus sphaericus* (a); *Pantoea* sp. (b); dan *Bacillus* sp. (c) terhadap *Chromobacterium violaceum* CV026.



Gambar 2. Hasil Skrining Aktivitas Anti-Quorum Sensing ekstrak kasar supernatan *Acinetobacter* sp. (a); dan *Pseudomonas aeruginosa*. (b) terhadap *Chromobacterium violaceum* CV026.

Hasil uji ini menunjukkan adanya aktivitas penghambatan dari ekstrak kasar supernatan bakteri endofit *L. sphaericus*, *Pantoea* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp., dan *Pseudomonas aeruginosa* terhadap produksi pigmen ungu violacein dari *Chromobacterium violaceum*. Namun, diperlukan uji lanjutan untuk mengetahui seberapa besar ekstrak kasar supernatan dari bakteri-bakteri endofit ini mampu menghambat produksi violacein sekaligus membuktikan bahwa pengurangan kadar violacein diakibatkan oleh aktivitas anti-quorum sensing dan bukan anti-mikroba melawan *Chromobacterium violaceum* CV026.

2. Perhitungan Kadar Violacein dan Bakteri Viabel (*Chromobacterium violaceum* CV026)

Perhitungan kadar violacein dilakukan sesuai dengan metode oleh Cho *et al.*, (2005) dengan modifikasi. Sebelumnya sebanyak 2 ml kultur CV026 dengan berbagai perlakuan (kontrol dengan penambahan C6-HSL dan DMSO 1%, kontrol dengan penambahan DMSO 1% dan tanpa penambahan C6-HSL, serta perlakuan dengan penambahan berbagai konsentrasi ekstrak kasar supernatan dari kelima bakteri) diinkubasi selama 24 jam.

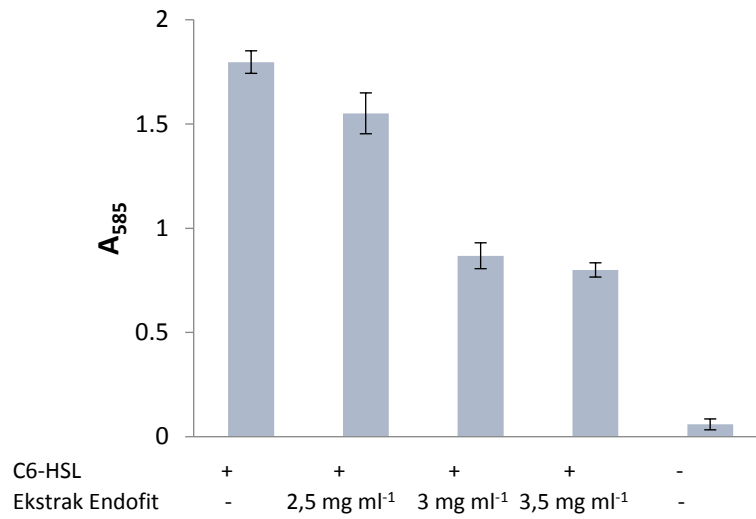
Hasil perhitungan kadar violacein menunjukkan terjadinya penurunan jumlah violacein dari semua kultur yang diberi perlakuan penambahan ekstrak kasar supernatan endofit (2,5 mg ml⁻¹; 3 mg ml⁻¹; 3,5 mg ml⁻¹). Hal ini menunjukkan adanya penghambatan terhadap produksi violacein pada *Chromobacterium violaceum* CV026. Berikut merupakan hasil perhitungan kadar violacein yang dilakukan.

Tabel 1. Hasil Perhitungan Kadar Violacein dari Beberapa Kultur dengan Berbagai Perlakuan.

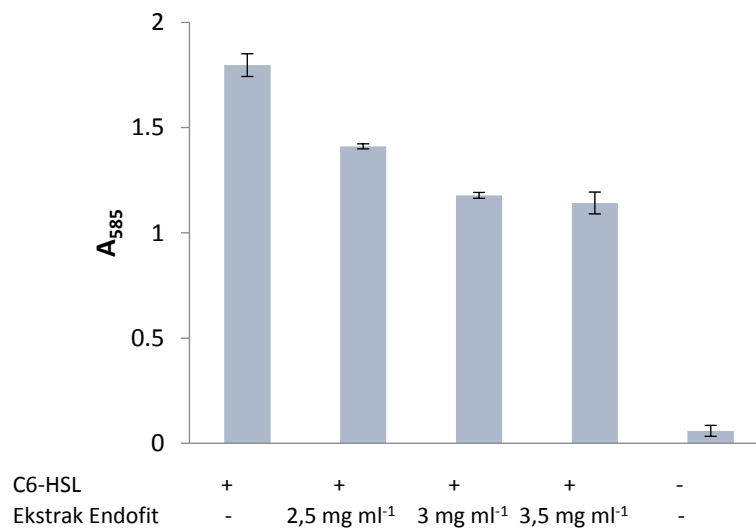
Ekstrak Endofit	Absorbansi 585 nm ± SD		
	2,5 mg ml ⁻¹	3 mg ml ⁻¹	3,5 mg ml ⁻¹
<i>L. sphaericus</i>	1.551 ± 0.098 ^b	0.868 ± 0.062 ^e	0.800 ± 0.034 ^e
<i>Pantoea</i> sp.	1.411 ± 0.012 ^c	1.178 ± 0.014 ^d	1.142 ± 0.052 ^{de}
<i>Bacillus</i> sp.	1.528 ± 0.045 ^b	0.937 ± 0.022 ^e	0.781 ± 0.027 ^f
<i>Acinetobacter</i> sp.	1.138 ± 0.069 ^{de}	1.134 ± 0.038 ^{de}	1.132 ± 0.126 ^{de}
<i>P. aeruginosa</i>	1.418 ± 0.0085 ^c	1.129 ± 0.035 ^{de}	1.113 ± 0.003 ^{de}
Kontrol (+C6-HSL +DMSO 1%)	1.797 ± 0.054 ^a		
Kontrol (- C6-HSL + DMSO 1%)	0.059 ± 0.026 ^g		

Keterangan: Hasil analisis dengan Uji Mann-Whitney U. Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan pengaruh yang nyata ($P \leq 0.05$).

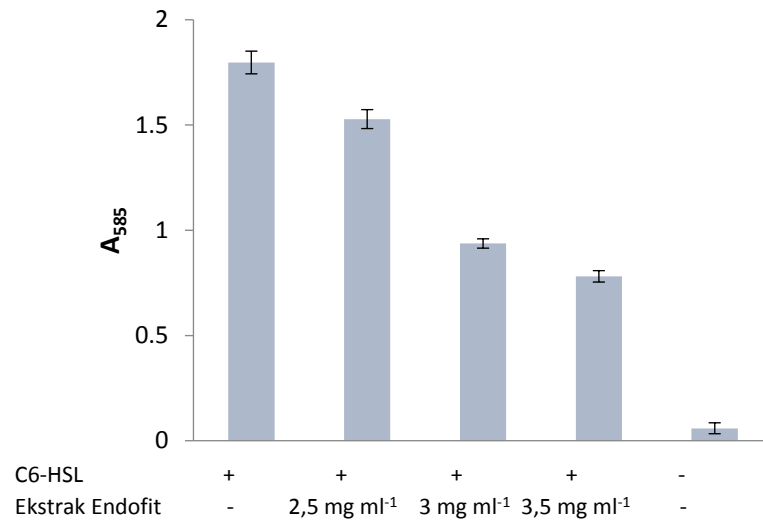
Hasil menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kontrol dengan kelompok perlakuan dengan ekstrak. Untuk mengetahui penurunan kadar violacein pada berbagai perlakuan dengan lebih jelas, berikut ditampilkan diagram yang menunjukkan besaran kadar violacein dari masing-masing perlakuan.



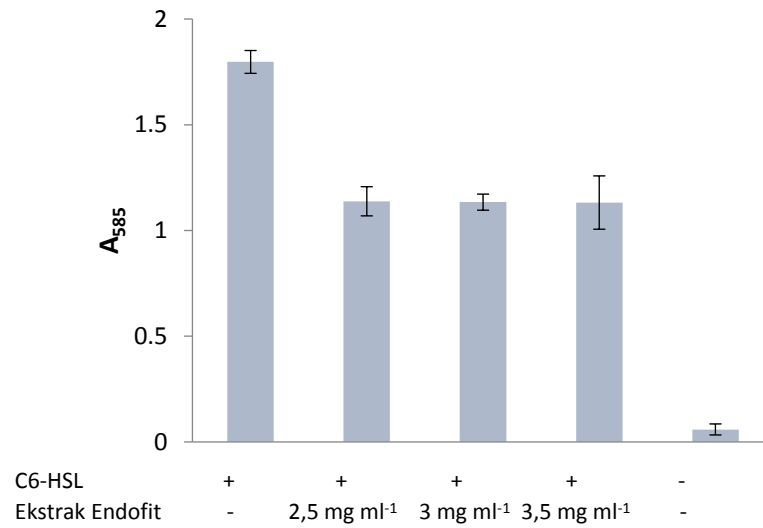
Gambar 3. Penurunan Kadar Violacein oleh Ekstrak Kasar Supernatan *Lysinibacillus sphaericus*.



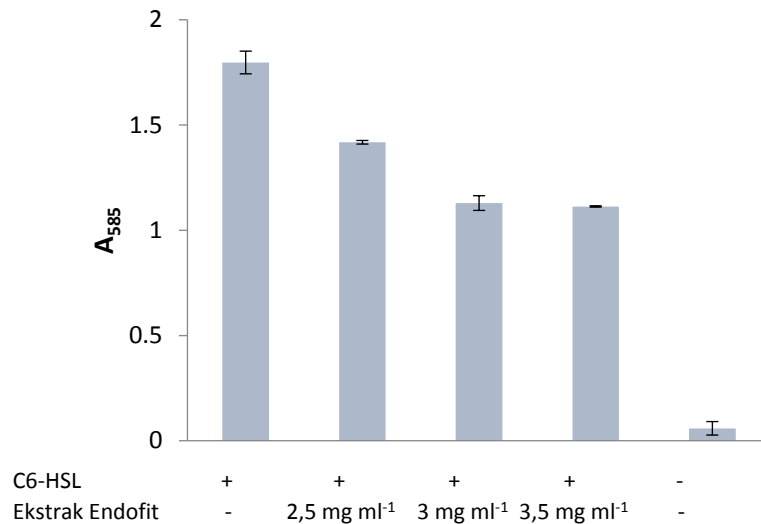
Gambar 4. Penurunan Kadar Violacein oleh Ekstrak Kasar Supernatan *Pantoea* sp.



Gambar 5. Penurunan Kadar Violacein oleh Ekstrak Kasar Supernatan *Bacillus* sp.



Gambar 6. Penurunan Kadar Violacein oleh Ekstrak Kasar Supernatan *Acinetobacter* sp.



Gambar 7. Penurunan Kadar Violacein oleh Ekstrak Kasar Supernatan *Pseudomonas aeruginosa*.

Hasil perhitungan kadar violacein menunjukkan adanya penurunan kadar violacein yang signifikan. Penurunan paling signifikan terjadi pada kultur dengan perlakuan ekstrak kasar supernatan *Bacillus* sp. dengan konsentrasi 3,5 mg ml⁻¹. Rata-rata besar absorbansi yang dihitung pada perlakuan ini adalah sebesar 0,781. Angka ini sangat signifikan berbeda dengan absorbansi yang terukur pada kontrol, yaitu sebesar 1,797. Selain ekstrak kasar supernatan *Bacillus* sp., ekstrak kasar supernatan *Lysinibacillus sphaericus* dengan konsentrasi 3,5 mg ml⁻¹ juga menunjukkan penurunan yang sangat signifikan dibandingkan dengan kontrol. Rata-rata besaran absorbansi yang dihitung pada perlakuan ini sebesar 0,800. Sedangkan perlakuan dengan ekstrak kasar supernatan bakteri *Acinetobacter*, meskipun menunjukkan penurunan yang signifikan dari kontrol, tidak terlihat adanya perbedaan yang berarti antara perbedaan konsentrasinya. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak supernatan *Acinetobacter* sp. dengan kisaran konsentrasi 2,5 mg ml⁻¹, 3 mg ml⁻¹, dan 3,5 mg ml⁻¹ menyebabkan penurunan kadar violacein yang relatif sama.

Meskipun demikian, hasil yang telah dijabarkan di atas juga belum dapat memastikan penurunan kadar violacein diakibatkan karena aktivitas anti-quorum sensing dan bukan akibat aktivitas anti-mikroba. Oleh karena itu, dilakukan perhitungan bakteri viabel dari kultur yang diberi perlakuan. Berikut merupakan hasil perhitungan bakteri viabel *Chromobacterium violaceum*.

Tabel 2. Hasil Perhitungan *Chromobacterium violaceum* viabel dari beberapa kultur dengan berbagai perlakuan.

Ekstrak Endofit	Jumlah Bakteri Viabel (Log CFU/ml $\pm$ SD)		
	2.5 mg/ml	3 mg/ml	3.5 mg/ml
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	8.789 $\pm$ 0.084 ^b	8.626 $\pm$ 0.048 ^d	8.690 $\pm$ 0.072 ^c
<i>Pantoea</i> sp.	8.650 $\pm$ 0.050 ^{cd}	8.755 $\pm$ 0.070 ^b	8.738 $\pm$ 0.045 ^{bc}
<i>Bacillus</i> sp.	9.366 $\pm$ 0.072 ^a	9.325 $\pm$ 0.044 ^a	9.360 $\pm$ 0.114 ^a
<i>Acinetobacter</i> sp.	8.495 $\pm$ 0.142 ^d	8.595 $\pm$ 0.090 ^d	8.595 $\pm$ 0.090 ^d
<i>Pseudomonas</i> sp.	9.382 $\pm$ 0.050 ^a	9.397 $\pm$ 0.031 ^a	9.417 $\pm$ 0.049 ^a
Kontrol (+DMSO +HHL)	9.418 $\pm$ 0.028 ^a		
Kontrol (-DMSO)	9.414 $\pm$ 0.073 ^a		

Keterangan: Hasil analisis dengan berganda Duncan.

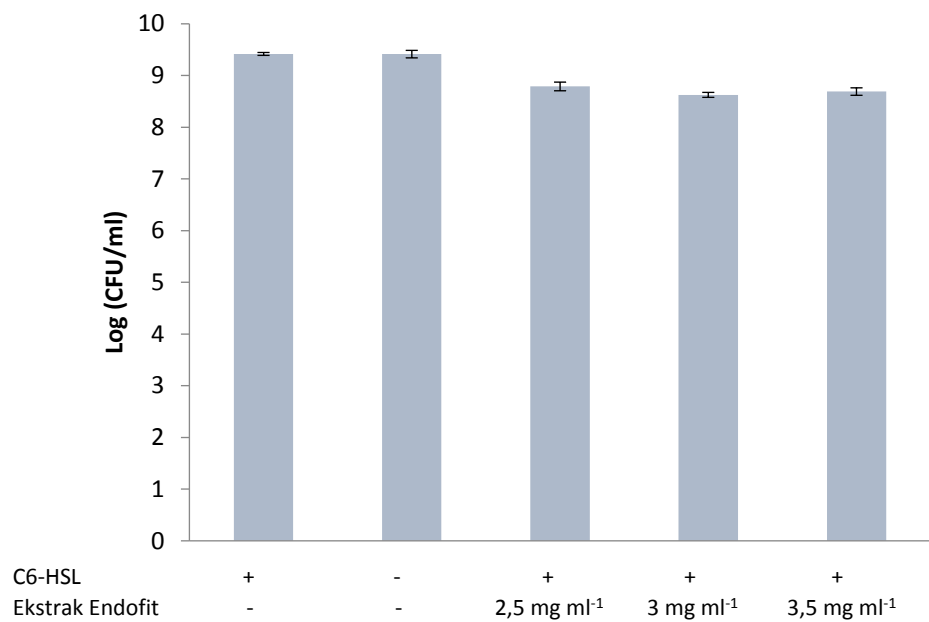
Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan pengaruh yang nyata ($P \leq 0.05$).

Hasil perhitungan terhadap bakteri viabel dari seluruh kultur dengan berbagai perlakuan menunjukkan adanya beberapa kelompok perlakuan yang memiliki jumlah bakteri viabel yang berbeda signifikan dibandingkan jumlah bakteri viabel dari kedua kelompok kontrol. Jumlah bakteri viabel dari kultur yang diberikan perlakuan ekstrak kasar supernatan bakteri *Lysinibacillus sphaericus*, *Pantoea* sp., dan *Acinetobacter* sp. pada semua konsentrasi lebih rendah dibandingkan dengan kultur yang tidak diberi perlakuan ekstrak. Hal ini menunjukkan adanya aktivitas anti-mikroba dari ekstrak-ekstrak tersebut terhadap *Chromobacterium violaceum* CV026.

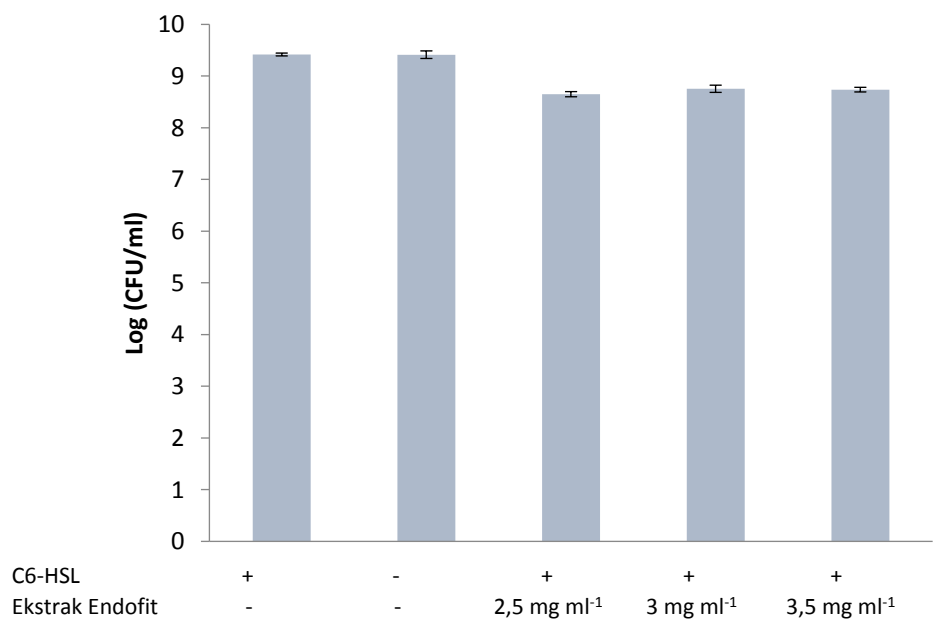
Penurunan jumlah bakteri pada kultur dengan perlakuan ketiga jenis ekstrak tersebut hampir mencapai sebanyak 1 log. Jumlah bakteri viabel paling rendah ditemukan pada kultur yang diberi perlakuan oleh ekstrak kasar supernatan *Acinetobacter* sp., yaitu sekitar 8,495 hingga 8,595 log CFU ml⁻¹.

Berbeda dengan kultur yang diberikan perlakuan ekstrak kasar supernatan *Lysinibacillus sphaericus*, *Pantoea* sp., dan *Acinetobacter* sp., jumlah bakteri viabel dari kultur yang diberikan perlakuan ekstrak kasar supernatan *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas aeruginosa* tidak mengalami penurunan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa kedua jenis ekstrak tersebut tidak memiliki aktivitas anti-mikroba melawan *Chromobacterium violaceum* CV026. Dengan kata lain, penurunan kadar violacein yang sebelumnya ditemukan pada kultur dengan perlakuan kedua jenis ekstrak ini merupakan akibat aktivitas anti quorum sensing dan bukan aktivitas anti-mikroba melawan *Chromobacterium*

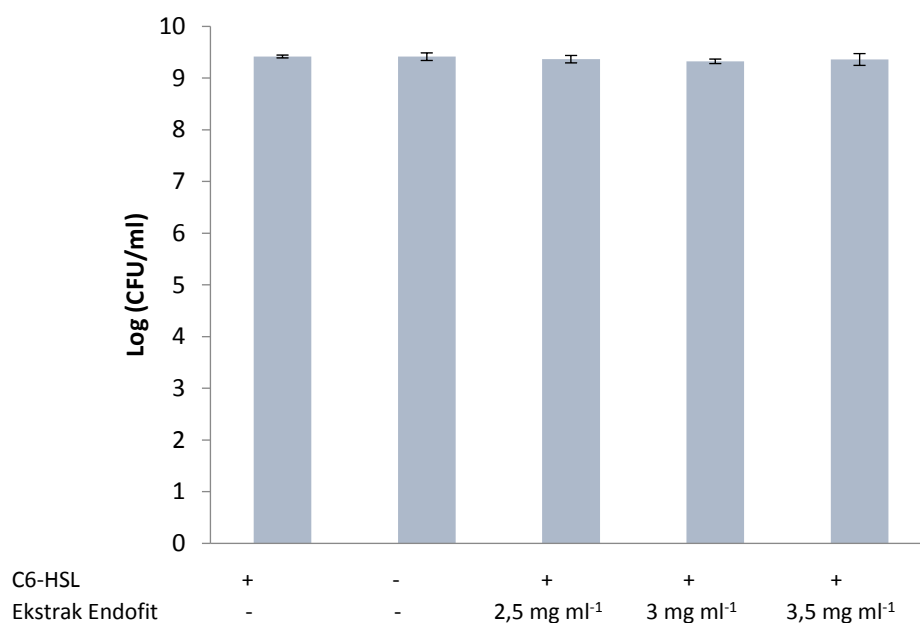
violaceum CV026. Untuk melihat lebih jelas mengenai perbedaan jumlah bakteri viabel antara perlakuan, berikut disajikan diagram yang menunjukkan perbandingan jumlah bakteri viabel antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dengan penambahan ekstrak kasar supernatan bakteri endofit.



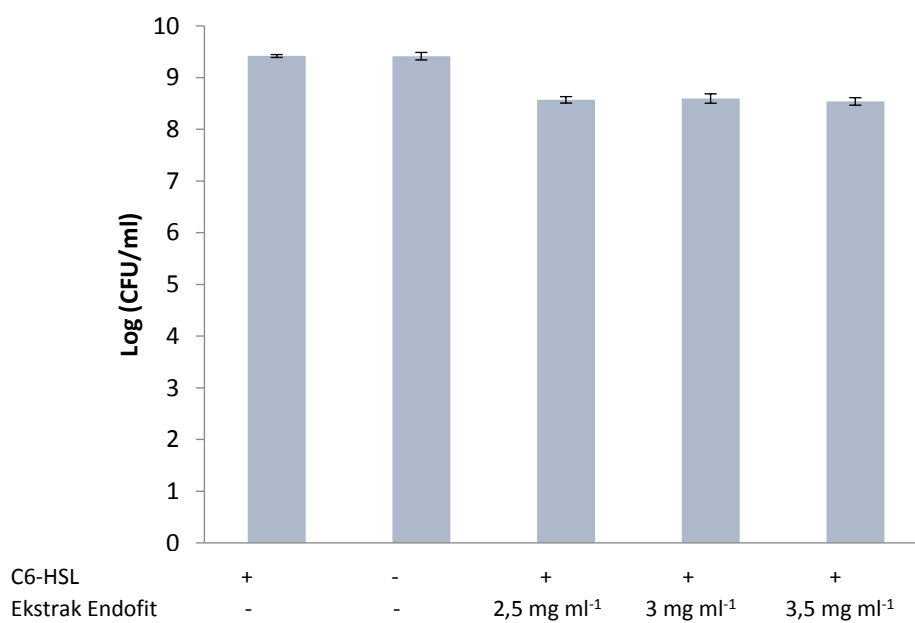
Gambar 8. Perbandingan Jumlah Bakteri Viabel Kontrol dengan Perlakuan Ekstrak *Lysinibacillus sphaericus*



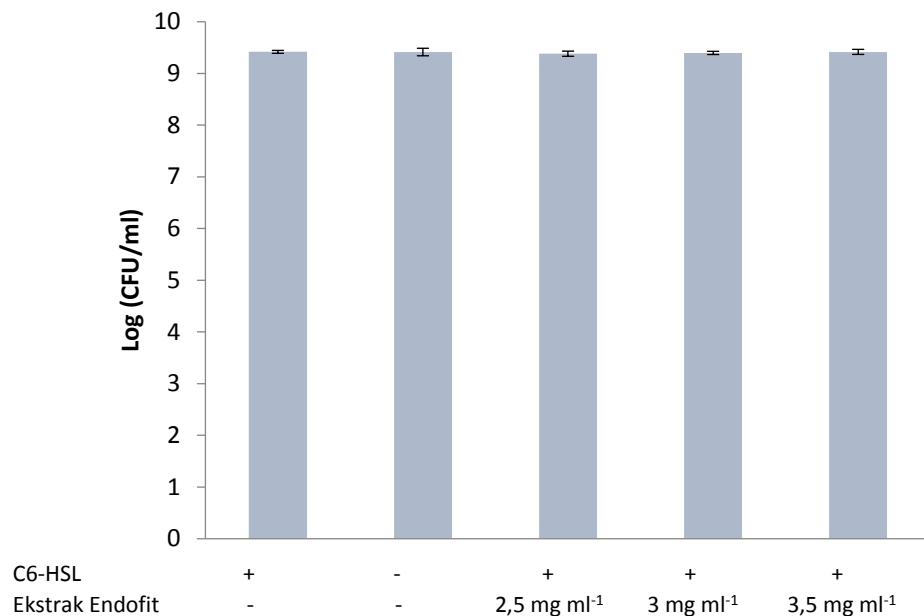
Gambar 9. Perbandingan Jumlah Bakteri Viabel Kontrol dengan Perlakuan Ekstrak *Pantoea* sp.



Gambar 10 Perbandingan Jumlah Bakteri Viabel Kontrol dengan Perlakuan Ekstrak *Bacillus* sp.



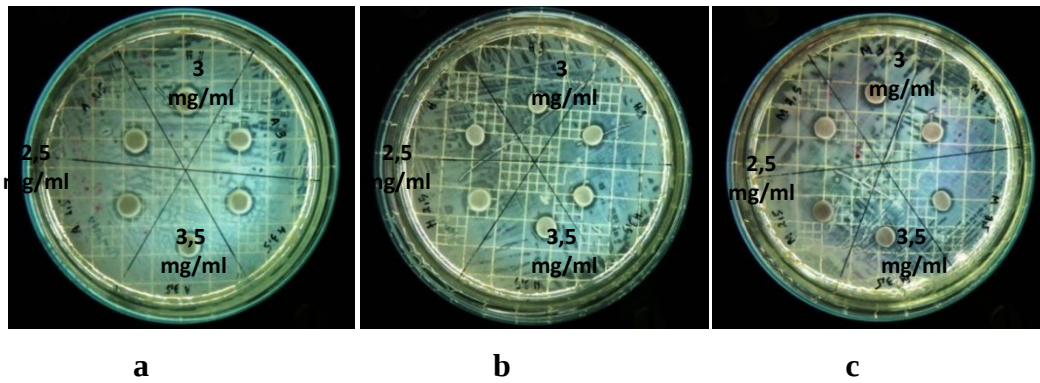
Gambar 11 Perbandingan Jumlah Bakteri Viabel Kontrol dengan Perlakuan Ekstrak *Acinetobacter* sp.



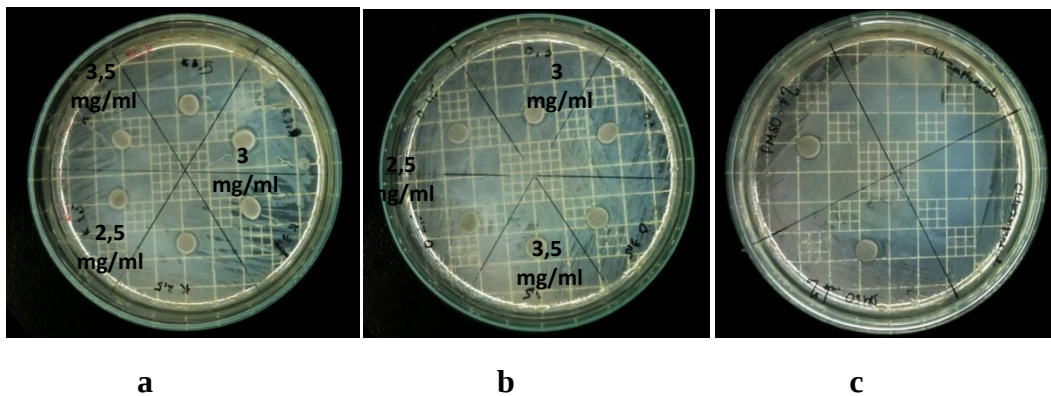
Gambar 12 Perbandingan Jumlah Bakteri Viabel Kontrol dengan Perlakuan Ekstrak *Pseudomonas aeruginosa*.

Penurunan jumlah bakteri secara nyata terlihat pada gambar 4.11, gambar 4.12, dan gambar 4.14 yang merupakan diagram untuk perbandingan jumlah bakteri viabel antara kontrol dengan perlakuan ekstrak kasar supernatan bakteri endofit *Lysinibacillus sphaericus*, *Pantoea* sp., dan *Acinetobacter* sp. Sedangkan diagram perbandingan antara jumlah bakteri viabel kontrol dengan perlakuan dengan penambahan ekstrak kasar supernatan bakteri endofit *Bacillus* sp., dan *Pseudomonas aeruginosa* tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Perbedaan yang tidak signifikan inilah yang menunjukkan bahwa ekstrak kasar supernatan bakteri endofit *Bacillus* sp., dan *Pseudomonas aeruginosa* tidak memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Chromobacterium violaceum*. Hal ini juga sekaligus menunjukkan bahwa penurunan kadar violacein pada perlakuan kedua jenis ekstrak tersebut terjadi karena aktivitas anti- quorum sensing.

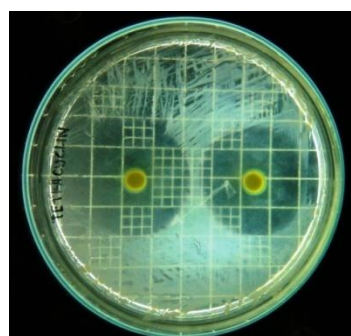
Selain dilakukan perhitungan terhadap bakteri viabel, uji anti-mikroba dengan menggunakan metode cakram difusi juga dilakukan. Uji ini dilakukan sebagaimana yang telah dijabarkan pada bab 3. Aktivitas anti-mikroba melawan *Chromobacterium violaceum* ditunjukkan oleh adanya zona hambat di sekitar cakram yang telah diberi ekstrak kasar supernatan bakteri endofit. Berikut merupakan hasil uji anti-mikroba dengan cakram difusi.



Gambar 13 Hasil Uji Anti-mikroba Ekstrak Kasar Supernatan Bakteri Endofit *Lysinibacillus sphaericus* (a); *Pantoea* sp. (b); dan *Acinetobacter* sp. (c) terhadap *Chromobacterium violaceum* CV026.



Gambar 14 Hasil Uji Anti-mikroba Ekstrak Kasar Supernatan Bakteri Endofit *Bacillus* sp. (a); *Pseudomonas aeruginosa* (b); dan kontrol dmsu 1% (c) terhadap *Chromobacterium violaceum* CV026.



Gambar 15 Hasil Uji Anti-mikroba Antibiotik Tetracyclin terhadap *Chromobacterium violaceum* CV026.

Dari uji anti-mikroba menggunakan cakram difusi, ketiga jenis ekstrak, yaitu ekstrak kasar supernatan bakteri endofit *Lysinibacillus sphaericus*, *Pantoea* sp., dan *Acinetobacter* sp. menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap *Chromobacterium violaceum*

CV026. Hasil ini menjelaskan penurunan jumlah bakteri viabel yang terjadi pada uji dengan menghitung jumlah bakteri viabel. Berbeda dengan ketiga jenis ekstrak tersebut, ekstrak kasar supernatan bakteri endofit *Bacillus* sp., dan *Pseudomonas aeruginosa* tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *Chromobacterium violaceum*. Hal ini pula yang sekaligus menjelaskan tidak berbedanya jumlah bakteri viabel antara kultur dengan perlakuan kedua jenis ekstrak ini dan kultur kontrol (penambahan ekstrak 0 mg ml⁻¹). Dari hasil di atas, juga dapat dikatakan bahwa *Chromobacterium violaceum* sensitif terhadap ekstrak kasar supernatan bakteri endofit *Lysinibacillus sphaericus*, *Pantoea* sp., dan *Acinetobacter* sp. dan sebaliknya tidak sensitif terhadap ekstrak kasar supernatan *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus* sp.

Aktivitas antimikroba dari ketiga jenis ekstrak kasar supernatan (*Lysinibacillus sphaericus*, *Pantoea* sp., dan *Acinetobacter* sp.) dapat disebabkan karena kandungan senyawa metabolit yang dihasilkannya. Pratiwi (2013) telah melakukan analisis GC-MS terhadap ketiga jenis ekstrak tersebut dan menemukan beberapa senyawa. *Lysinibacillus sphaericus* menghasilkan senyawa metabolit Hydroxyacetic acid hydrazide. Senyawa ini merupakan turunan dari protein intermediat, hydrazine (Hojo *et al.*, 2012). *Acinetobacter* sp. juga menghasilkan senyawa turunan dari hydrazine yaitu Hydrazinecarboxylic acid, ethyl ester. Sebelumnya, senyawa dari turunan yang sama, yaitu N'-(4-(arylamino)-6-(pyridin-2-ylamino) -1,3,5-triazin-2-yl) benzohydrazide ditemukan memiliki aktivitas antimikroba terhadap beberapa patogen seperti *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, dan *Chromobacterium violaceum* (Raval *et al.*, 2009).

Pantoea sp. dari akar *V. zizanioides* menghasilkan senyawa metabolit N-methyl-N-[2'-(4pyridyl) ethyl]-2 (2pyridyl) ethylamine. Senyawa ini mengandung gugus pyridyl. Sebelumnya, senyawa novel Bis[4-methoxy-3-(6-(3-pyridyl)[1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazol)phenyl]methane yang disintesis terbukti memiliki aktivitas antimikroba melawan *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella aerogenes*, dan *Chromobacterium violaceum* (Reddy *et al.*, 2010).

Aktivitas ekstrak kasar supernatan *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus* sp. yang menurunkan kadar violacein dari kultur *Chromobacterium violaceum* tanpa diikuti oleh aktivitas antimikroba, menunjukkan adanya aktivitas quorum sensing. Sebelumnya, kedua genus baik *Pseudomonas* dan *Bacillus* telah ditemukan sebagai bakteri tanah yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan metabolit yang menghambat quorum sensing (Chen *et al.*, 2013).

Mekanisme penghambatan quorum sensing dari *Chromobacterium violaceum* oleh ekstrak kasar supernatan bakteri endofit *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus* sp. dapat diperkirakan dengan melihat senyawa-senyawa metabolit yang kemungkinan dihasilkan oleh kedua bakteri tersebut.

Bacillus merupakan genus bakteri yang pertama kali ditemukan memiliki kemampuan menghasilkan enzim yang dapat mendegradasi sinyal *autoinducer* yang penting bagi sistem komunikasi antar sel pada bakteri (quorum sensing). Dong *et al.* (2000) menemukan bahwa *Bacillus* menghasilkan enzim yang termasuk ke dalam kelompok enzim AHL-lactonase. Produksi enzim ini oleh *Bacillus* diketahui dikendalikan oleh gen *aiiA*. Selanjutnya genus-genus *Bacillus* lainnya seperti *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, dan *Bacillus anthracis* ditemukan juga menghasilkan enzim yang sama. Produksi enzim ini dikendalikan oleh gen yang homolog dengan *aiiA* (Dong *et al.*, 2002 & Reimann *et al.*, 2002).

Genus *Pseudomonas* ditemukan menghasilkan beberapa jenis enzim AHL -acylase yang mampu mendegradasi sinyal *autoinducer* AHL pada bakteri gram negatif. *Pseudomonas aeruginosa* misalnya, menghasilkan enzim acyl- homoserine lactone yang dapat mendegradasi sinyal *autoinducer* AHL (Huang *et al.*, 2003). Enzim ini mampu mendegradasi sinyal AHL dengan panjang rantai acyl dari 6 hingga 14 karbon (Wahjudi *et al.*, 2013). *Chromobacterium violaceum* CV026 merupakan bakteri yang menghasilkan sinyal *autoinducer* AHL dengan panjang rantai acyl sebanyak 6 karbon (McClean *et al.*, 1997). Sehingga dapat dikatakan bahwa enzim ini mampu menghambat quorum sensing pada *Chromobacterium violaceum*. Weng *et al.* (2009) juga menemukan bahwa banyak bakteri yang diisolasi dari tanah merupakan genus *Pseudomonas* dan mampu menghambat quorum sensing pada *Chromobacterium violaceum*. McLean (2004) membuktikan bahwa kultur plat dari *Chromobacterium violaceum* menunjukkan penghambatan pengeluaran violacein saat di atas plat yang sama digoreskan biakan dari *Pseudomonas aeruginosa*. McLean (2004) kemudian menduga bahwa *Pseudomonas aeruginosa* memang mampu menghasilkan metabolit sekunder yang dapat menghambat pengeluaran violacein sebagai akibat dari penghambatan terhadap quorum sensingnya.

Meskipun kedua jenis bakteri, baik *Pseudomonas aeruginosa* maupun *Bacillus* sp. telah banyak ditemukan memiliki kemampuan menghasilkan enzim pendegradasi AHL, yaitu AHL-lactonase dan AHL- acylase, penelitian sebelumnya yang melakukan analisis GC-MS pada ekstrak kasar supernatan dari kedua bakteri ini belum menemukan keberadaan enzim-enzim tersebut.

Dari hasil analisis GC-MS yang dilakukan terhadap kedua jenis bakteri ini pada penelitian sebelumnya, diketahui adanya beberapa senyawa metabolit sekunder selain enzim. Dari hasil-hasil yang ada, penulis mencoba menganalisis potensi-potensi dari senyawa metabolit yang ditemukan sebagai penghambat quorum sensing. Berikut merupakan hasil analisis GC-MS yang dilakukan oleh Pratiwi (2013).

Tabel 3. Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder dari *Bacillus* sp. dan *Pseudomonas aeruginosa* yang Diisolasi dari Akar Tanaman *Vetiveria zizanioides*.

Ekstrak Kasar	Senyawa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2-(5-chloro-2-methoxyphenyl) pyrrole
	3-(1- phenyl - 2,3 dihydro - 1H - isoindol - 2 -yl) propan-1-ol.
	1H-Isoindole-1,3(2H)-dithione
<i>Bacillus</i> sp.	1,2-Benzene dicarboxylic acid, mono (2-ethylhexyl) ester

(Sumber: Pratiwi, 2013)

Dari beberapa senyawa yang terdeteksi dari ekstrak kasar supernatan bakteri-bakteri di atas, diketahui bahwa bakteri endofit *Pseudomonas aeruginosa* menghasilkan senyawa metabolit 3-(1- phenyl - 2,3 dihydro - 1H - isoindol - 2 -yl) propan-1-ol dan 1H-Isoindole-1,3(2H)-dithione. Keduanya merupakan senyawa turunan alkaloid indole. Senyawa indole banyak dihasilkan oleh bakteri-bakteri enterik. Produksi senyawa indole oleh bakteri diperantarai oleh enzim tryptophanase yang memecah tryptophan menjadi indole, piruvat, dan ammonia (Hopkins & Cole, 1903). Beberapa senyawa turunan dari indole banyak ditemukan, seperti isatin, hydroxyindole, dan indole-3-acetic-acid (Lee & Lee, 2010).

Senyawa indole dari bakteri pernah diisolasi dari bakteri *Escherichia coli* (Li dan Young, 2013). Senyawa indole dari *Escherichia coli* ternyata ditemukan menghambat quorum sensing yang dimediasi oleh sinyal *autoinducer* AHL pada beberapa bakteri gram negatif, termasuk pada *Chromobacterium violaceum*. Penghambatan quorum sensing oleh senyawa indole dari *Escherichia coli* ini ditunjukkan dengan penghambatan produksi pigmen violacein (Romano *et al.*, 2014).

Mekanisme penghambatan senyawa indole terhadap mekanisme quorum sensing kemudian diselidiki. Dari hasil penelitian yang dilakukan Romano *et al* (2014), senyawa indole yang dihasilkan *Escherichia coli* terlibat dalam menghambat transkripsi gen *vioA*

pada *Chromobacterium violaceum*. Sebelumnya, diketahui bahwa produksi violacein dikendalikan oleh operon *vioABCD*. Aktifnya transkripsi operon ini ditentukan oleh ikatan sinyal molekul *autoinducer* dengan protein reseptornya, yaitu CviI/ CviR (August *et al.*, 2000).

Selain menghambat quorum sensing pada *Chromobacterium violaceum*, senyawa ini juga ditemukan sebelumnya menghambat quorum sensing pada *Acinetobacter oleivorans*. Penghambatan indole terhadap quorum sensing pada *Acinetobacter oleivorans* diakibatkan oleh terganggunya pengikatan *autoinducer* dengan protein reseptornya, yaitu AqsR yang homolog dengan LuxR (Kim & park, 2013).

Penyelidikan mengenai senyawa metabolit dari *Bacillus* sp. yang pada penelitian sebelumnya yang telah dideteksi melalui analisis GC-MS, yaitu 1,2-Benzene dicarboxylic acid, mono (2-ethylhexyl) ester memiliki kemampuan dalam menghambat quorum sensing pada *Chromobacterium violaceum* belum ditemukan. Meskipun demikian, dari hasil penelitian ini ekstrak kasar supernatan dari *Bacillus* sp. terbukti memiliki aktivitas anti-quorum sensing pada *Chromobacterium violaceum*. Penyelidikan mengenai apakah senyawa ini terlibat dalam penghambatan quorum sensing perlu dilakukan dengan metode yang memungkinkan.

Eksperimen lebih lanjut dapat dilakukan dengan mengisolasi dan mengkarakterisasi senyawa tunggal dari metabolit sekunder *Bacillus* sp. ini. Seperti yang dilakukan oleh peneliti lainnya (Romano *et al.*, 2014), pengujian untuk mengetahui mekanisme penghambatan dari senyawa indole yang dihasilkan *Escherichia coli* pada transkripsi gen *vioA* dibuktikan dengan menggunakan RTq-PCR (*real time- quantitative polymerase chain reaction*). Pengujian dilakukan dengan melihat penurunan level transkripsi dari gen-gen yang ekspresinya dikendalikan oleh quorum sensing.

Penemuan mengenai potensi senyawa-senyawa metabolit dari bakteri endofit *Vetiveria zizanioides* ini telah sekali lagi menguatkan bahwa bakteri-bakteri tanah memiliki kemampuan tinggi dalam menghasilkan senyawa-senyawa metabolit yang sangat bermanfaat. Bakteri endofit menghasilkan banyak senyawa yang berfungsi untuk melindungi tanaman dari patogen. Bahkan, bakteri endofit juga mampu menghasilkan senyawa metabolit yang memodulasi tanaman untuk juga menghasilkan metabolit sekunder tersebut. Produksi senyawa-senyawa metabolit sekunder bakteri endofit juga diperlukan untuk mekanisme interaksi dan komunikasi antara bakteri endofit dengan tanaman inangnya (Brader *et al.*, 2013).

Komunikasi antara sel bakteri dengan sel eukariot, dalam hal ini tanaman juga berkaitan dengan quorum sensing. Telah diketahui sebelumnya bahwa *Delisha pulchra* menghasilkan senyawa furanone yang secara struktural sama dengan sinyal *autoinducer* pada bakteri gram negatif, yaitu AHL (Manefield *et al.*, 2002). Selain itu, *Medicago truncatula* memiliki 150 jenis protein yang produksinya dikendalikan oleh AHL yang dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* dan *Sinorhizobium meliloti* (Mathesius *et al.*, 2003). Hal ini menunjukkan bahwa tanaman juga memiliki kemampuan untuk merespon sinyal komunikasi dari bakteri dan sekaligus menjelaskan mengenai interaksi antara bakteri endofit dengan tanaman inangnya.

F. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang didapatkan, dapat diketahui bahwa ekstrak kasar supernatan dua bakteri dari lima bakteri endofit akar *Vetiveria zizanioides* ditemukan memiliki aktivitas anti quorum sensing terhadap *Chromobacterium violaceum*. Bakteri-bakteri tersebut adalah *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus* sp. Sedangkan ketiga bakteri endofit lainnya yaitu *Lysinibacillus sphaericus*, *Pantoea* sp., dan *Acinetobacter* sp., lebih menunjukkan aktivitas antibakteri melawan *Chromobacterium violaceum* CV026. Aktivitas penghambatan quorum sensing paling optimum didapatkan dari ekstrak kasar supernatan bakteri endofit *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus* dengan konsentrasi 3,5 mg ml⁻¹. Namun, pada konsentrasi yang sama, ekstrak kasar supernatan *Bacillus* sp. lebih menunjukkan aktivitas anti quorum sensing yang lebih optimum dibandingkan dengan ekstrak kasar supernatan *Pseudomonas aeruginosa*.

G. PUSTAKA RUJUKAN

- Ahamed, N. 2012. Isolation and Identification Of Secondary Metabolites Producing Organisms from Marine Sponge. *Discovery*.1, (1), 14-17.
- Antunes, A., A., Silva, m., L., R., B., da Silva, C., A., a., Takaki, G., M., C. 2006. Characterization of *Chromobacterium violaceum* Isolated from Paca River, Pernambuco, Brazil. *Revista de Bologia e Ciencias da Terra*, 2, (1), 1519-5228.
- Camara, M., Williams, P., Hardman, A. 2002. Controlling Infection by Tuning In and Tuning Down the Volume of Bacterial Small-talk. *Lancet Infect*, 2, (1), 667-676.
- Champagnat, P., Figueredo, G.C , Bessière, J.E. (2006). "Essential Oil Composition of *Vetiveria nigriflora* from Mali". *Journal of Essential Oil Research: JEOR*.
- Chan, K., G., Atkinson, S., Mathee, K., Sam, C.,K., Chhabra, S., R., Camara, M., Koh, C.,L., William, P. 2011. Characterization of N-acylhomoserine Lactone Degrading

Bacteria Associated with *Zingiber officinale* (Ginger) Rhizosphere: Co-existence of Quorum Quenching and Quorum Sensing in *Acinetobacter* and *Burkholderia*. *BMC Microbiology*, **11**, (1), 11-51.

- Charyulu, E., M., Sakaran, G., Rajakumar, G., S., Gnanamani, A. 2009. Antimicrobial Activity of Secondary Metabolite from Marine Isolate, *Pseudomonas* sp. Against Gram Positive and Negative Bacteria including MRSA. *Indian Journal of Experimental Biology*, **24**, (1), 964-968.
- Choo, J., H., Rukayadi, Y., Hwang, J., K. 2005. Inhibition of Bacterial Quorum Sensing by Vanilla Extract. *Letters in Applied Microbiology*, **42**, (1), 637-641.
- Daniels, R., Vanderleyden, J., Michiels, J. 2004. Quorum Sensing and Swarming Migration in Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, **28**, (1), 261-289.
- Engebrecht, J., Nealson, K., Silverman, M. 1983. Bacterial Bioluminescence: Isolation and Genetic Analysis of Functions from *Vibrio fischeri*. *Cell*, **32**, (1), 773-781.
- Engleberg, NC., DiRita, V., Dermody, TC. 2013. Mechanism of Microbial Disease. Walters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins. Tokyo.
- Fitriani, A., Aryani, A., Yusuf, H., Permatasari, Y. 2013. The Exploration of Ketosynthase Gene on Endophytic Bacterial Root of *Vetiveria zizanioides* L. *International Journal of Basic and Applied Sciences IJBAS-IJENS*. **13**, (4), 112-119.
- Fitriani, A., Ihsan F., Fauziah N., Hamdiyanti Y. Antibacterial activity of crude extract endophytic bacteria from the roots of *Ageratum conyzoides* L. *International Journal of Agriculture and Biology*. Reviewed.
- Henke, J., M., and Bassler, B., L. 2004. Quorum Sensing Regulates Type III Secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol*, **186**, (12), 3794-3805.
- Kaaria, P., Matiru, V., Ndungu, M. 2012. Antimicrobial Activities of Secondary Metabolites Produced by Endophytic Bacteria from Selected Indigenous Kenyan Plants. *African Journal of Microbiology Research*. **6**, (45), 7253-7258.
- Kato, N., Morohoshi, T., Nozawa, T., Matsumoto, H., Ikeda, T. 2006. Control of Gram-Negative Bacterial Quorum Sensing with Cyclodextrin Immobilized Cellulose Ether Gel. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **56**, (1), 55-59.
- Lal, A. 2009. Quorum Sensing: How Bacteria Talk to Each Other. *Resonance*, 2009 (1), 866-871.
- Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., Clark, D. 2012. Biology of Microorganism. Pearson Education. San Francisco.
- Malfanova, N., V. 2010. Bacterial Endophytes: Who and Where, and What are They Doing There?. [Online]. Tersedia: <http://hdl.handle.net/1887/20732>. (12 Oktober 2013)
- McClean, K., H., Winson, M., K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S., R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J., H., Swift, S., Bycroft, B., W., Stewart G., S., A., B., Williams, P. (1997). Quorum Sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of Violacein Production and Inhibition for the Detection of N-acyl Homocerine Lactones. *Microbiology*. **143**, 3703-3737.
- McLean, R., J., C., Pierson, L., S., Fuqua, C. 2004. A Simple Screening Protocol for the Identification of Quorum Signal Antagonists. *Journal of Microbiological methods*, **58**, (1), 351-360.

- Miller, M., B., Bassler, B., L. 2001. Quorum Sensing in Bacteria. Annual Review. Microbiology, 55, (1), 165-199.
- Montgomery, K., Charlesworth J., C., LeBard, R., Visscher, P., T., Burns, P., B. (2013). Quorum Sensing in Extreme Environments. Life. 3, (1), 131-148.
- Norizan, S., N., M., Yin W., F., Chan, K., G. (2013). Caffeine as a Potential Quorum Sensing Inhibitor. Sensor. 13, 5117-5129.
- Pontieri, P., Massardo, D., R., Senatore, F., Tredici, M., Vigliotta, G., Alifano, P., Del Giudice, L. (2005). Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria in *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash Roots. Annual Congress Potenza, Italy – 12/15 September, 2005.
- Rao, R., & Suseela, M. (2000). *Vetiveria zizanioides* (Linn.) Nash A Multipurpose Eco-Friendly Grass Of India. Proceedings of the 3rd International Vetiver Conference, Thailand, January 2000.
- Rosenblueth, M., and Romero E., M. 2006. Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. The American Phytopathological Society. 19, (8), 827-837.
- Rutherford, S., T., and Bassler, B., L. 2012. Bacterial Quorum Sensing: It's Role in Virulence and Possibilities for It's Control. Cold Spring Harb Perspect Medical, 10, (1), 1101-1126.
- Song, C., Ma, H., Zhao, Q., Song, S., Jia, Z. 2012. Inhibition of Quorum Sensing Activity by Ethanol Extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi. Journal of Plant Pathology and Microbiology. 7, (1), 1-4.
- Strobel, G., Daisy, B. (2003). "Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. p. 491–502.
- Sturme, M., H., J., Kleerebezem, M., Nakayama, J., Akkermans, A., D., L., Vaughan, E., E., deVos, W., M. 2002. Cell to Cell communication by Autoinducing Peptides in Gram-Positive Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, (1), 233-243.
- Truong, P., N. 1999. Vetiver Grass Technology for land stabilisation, erosion and sediment control in the Asia Backer, C.A. & Brink, R.C.B.V.D. (1968). "Flora of Java (Spermatophytes only) Vol III". Netherland :Wolters-Noordhoff N.V. Groningen.
- Waters, C., M., and Bassler, B., L. 2005. Quorum Sensing: Cell to Cell Communication in Bacteria. Annual Review. Cellular Devison. Biol. 21, (1), 319-346.