

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Bakteri *Acinetobacter sp*

*Acinetobacter sp* adalah jenis bakteri patogen yang bersifat aerobik gram-negatif baksilus dan secara alami relatif peka terhadap beberapa antibiotik. Bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 44 °C, menggunakan berbagai jenis karbohidrat sebagai sumber nutrisi, dan mampu melekat pada sel epitelial manusia (Wikipedia, 2012<sup>a</sup>).

Genus *Acinetobacter* berbentuk batang dengan diameter 0,9-1,6 µm dan panjang 1,5-2,5 µm menjadi bola dalam fase pertumbuhan stasioner. Sel tidak membentuk spora, genus ini tumbuh dengan baik pada semua media yang kompleks umum. Kebanyakan koloni tumbuh dalam media yang mengandung karbon tunggal dan sumber energi nitrogen. Bakteri ini secara alami ada di dalam tanah, air dan limbah (Holt *et al.*, 2000).

Klasifikasi bakteri *Acinetobacter sp* dalam Zipcodezoo (2011), adalah sebagai berikut :

Kerajaan	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Pseudomonadales
Famili	: Moraxellaceae
Genus	: <i>Acinetobacter</i>
Spesies	: <i>Acinetobacter sp</i>



Gambar 1. *Acinetobacter sp* (Wikipedia, 2012<sup>b</sup>)

Menurut Asa (2010), *Acinetobacter* biasanya berbentuk kokobasil atau kokus, pada hapusan terlihat menyerupai neisseria, karena bentuk diplokokus sangat banyak pada tubuh dan media padat. Bentuk batang juga terjadi dan kadang-kadang bakteri tampak menjadi gram positif. *Acinetobacter* tumbuh baik pada sebagian besar media yang digunakan untuk pembiakan bakteri. *Acinetobacter* yang dipisahkan dari meningitis dan sepsis, disalahartikan dengan *Neisseria meningitidis*, juga *Acinetobacter* yang dipisahkan dari sistem alat kelamin perempuan disalahartikan dengan *Neisseria gonorrhoeae*. Namun *Neisseria* menunjukkan oksidase positif sedangkan *Acinetobacter* menunjukkan oksidase negatif.

*Acinetobacter* adalah bakteri yang hidup di tanah dan air. Bakteri ini juga dapat ditemukan pada kulit orang sehat, pasien yang sakit di rumah sakit mendapatkan tularan oleh infeksi *Acinetobacter*. Orang yang sehat biasanya juga dapat tertular bakteri *Acinetobacter*. *Acinetobacter* dapat menyebar dari orang ke orang dengan menyentuh cairan tubuh (darah dan urin) atau item yang telah di kontak dengan pasien (stetoskop, manset tekanan darah, dll). Biasanya pasien yang tertular terdapat bakteri *Acinetobacter sp* di paru-parunya, yang dapat menyebar melalui batuk, bersin atau penyedotan. *Acinetobacter* dapat dihilangkan dari tangan dengan pembersih tangan yang benar (*Center for disease control, 2005*).

Bakteri dari genus *Acinetobacter* merupakan bakteri gram negatif basil atau coccobacilli, sering digunakan fermentasi glukosa dan aerob ketat, bergerak, katalase positif dan oksidase negatif. Mereka tumbuh dengan baik di semua media, dan suhu pertumbuhan optimal 33-35°C (Angeles, 1993).



## 2.2 Metabolit

Proses sintesis yang terjadi pada makhluk hidup termasuk bakteri adalah untuk menghasilkan metabolit primer dan metabolit sekunder. Kedua senyawa inilah yang diproduksi oleh bakteri dalam siklus hidupnya.

### 2.2.1 Metabolit Primer

Metabolit primer adalah senyawa yang termasuk produk akhir yang mempunyai berat molekul rendah dan dihasilkan pada fase eksponensial oleh mikroba. Senyawa digunakan sebagai bahan dasar pembangun makromolekul atau dikonversikan menjadi koenzim. Contohnya asam-asam organik seperti asam sitrat, asam fumarat dan asam amino. Dalam memproduksi senyawa metabolit primer harus dipilih mikroba yang potensial untuk digunakan sebagai bacteriosin (Dharma, 2005).

Metabolit primer adalah senyawa-senyawa kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dibutuhkan oleh mikroba tersebut untuk pertumbuhannya. Metabolit primer antara lain asam laktat dan alkohol (Kunaepah, 2008).

### 2.2.2 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder pada suatu organisme hidup (natural product) merupakan suatu senyawa kimia yang diproduksi sebagai respon terhadap lingkungannya, salah satunya sebagai sistem pertahanan diri (Sijabat, 2009). Wibowo (2006), menambahkan bahwa metabolit sekunder merupakan hasil metabolisme yang tidak digunakan untuk proses pertumbuhan, tetapi misalnya untuk pertahanan diri, contohnya adalah protein, asam lemak, karbohidrat, senyawa antimikroba, dan lain-lain. Umumnya metabolit sekunder berasal dari metabolit primer dimana memiliki karakter yang unik pada setiap mikroorganisme

karena bergantung pada lingkungan tempat hidupnya. Contoh metabolit sekunder dari mikroorganisme antara lain antibiotik, pigmen dan vitamin.

Menurut Dharma (2005), mikroba mampu mensintesis senyawa metabolit sekunder pada fase pertumbuhan stasioner. Senyawa metabolit sekunder tersebut digunakan sebagai nutrisi darurat untuk mempertahankan hidupnya. Metabolit sekunder dapat tergolong sebagai antibiotik biopestisida, mikotoksin, pigmen, alkaloid dan enzim.

### 2.3 Histidin

Ada dua macam histidin dalam daging ikan yaitu histidin bebas yang akan diubah menjadi histamin dan histidin terikat dalam protein (Sims *et al.*, 1992). Histidin bebas yang terdapat dari daging ikan erat sekali hubungannya dengan terbentuknya histamin dalam daging. Semua daging yang berwarna gelap tinggi kandungan histidin bebasnya (Keer *et al.*, 2002).

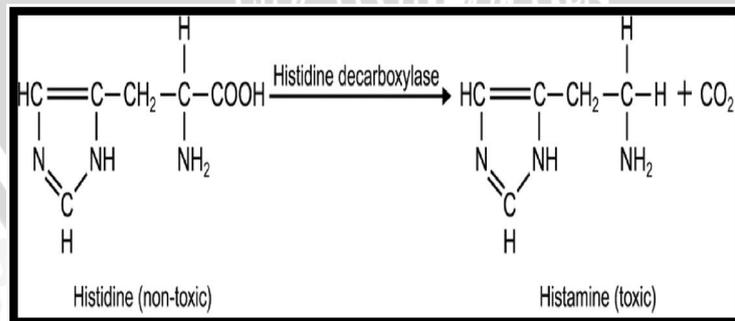
Histidin merupakan satu dari 20 asam amino dasar yang ada dalam protein. Bagi manusia histidin merupakan asam amino yang esensial bagi anak-anak. Rantai samping imidazol dan nilai  $pK_a$  yang relative netral (yaitu 6,0) berarti bahwa perubahan sedikit saja pada pH sel akan mengubah muatannya. Sifat ini menjadikan histidin sering menjadi bagian dari gugus katalitik pada enzim maupun ligan koordinasi pada metaloprotein. Histidin menjadi prekursor histamin, suatu amina yang berperan dalam system saraf dan karnosin suatu asam amino. Terdapat dua enantiomer histidin yaitu D-histidin dan L-histidin, namun yang lebih dominan adalah L-histidin (Agustiana, 2010).

Asam amino ini diperlukan pada saat pertumbuhan untuk memperbaiki jaringan tubuh dan mengubah kelebihan glukosa menjadi glikogen yang diproses di dalam hati. Histidin dikonversi tubuh menjadi histamin, yang merangsang

pengeluaran asam lambung. Tetapi juga sering diperlukan suplementasi histidin sendiri pada usia lanjut, karena terjadi gangguan sintesa dan penyerapannya oleh tubuh. Defisiensi histidin dapat berakibat rasa nyeri pada sendi, dan urine yang mengandung histidin menunjukkan adanya gejala artritis rheumatoid (Wikipedia, 2011<sup>o</sup>).

Senyawa yang bersifat racun tersebut adalah histamin, yang merupakan suatu senyawa hasil perombakan asam amino bebas histidin. Histidin diubah menjadi histamin oleh enzim histidine decarboxylase yang dihasilkan oleh bakteri-bakteri pembentuk histamin (Rawles *et al.*, 1995). Ditambahkan menurut Guizani *et al.*, (2005), histidin dapat diubah menjadi histamin selama proses pembusukan oleh bakteri pembentuk histamin yang mengandung enzim histidin dekarboksilase. Pembentukan histamin sering disebabkan oleh suhu ikan yang tinggi setelah penangkapan.

Ditambahkan pula oleh Taylor dan Behling (1982), bahwa histamin merupakan perubahan dari histidin yang terbentuk di dalam makanan karena aktivitas bakteri penghasil enzim histidin dekarboksilase. Perubahan histidin menjadi histamin dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2. Perubahan Histidin Menjadi Histamin (Mc Lauchlin *et al.* 2005)**



## 2.4 Histamin

Histamin merupakan komponen dasar nitrogen yang dibentuk terutama oleh dekarboksilasi asam amino atau dengan transminasi dari Aldehid dan keton. Histamin merupakan sumber nitrogen dan prekursor untuk sintesis hormon, alkaloid, asam nukleat dan protein. mereka juga dapat mempengaruhi proses dalam organisme seperti pengaturan suhu tubuh, asupan gizi, kenaikan atau penurunan tekanan darah (Karovicova *et. al.*, 2003).

Histamin adalah senyawa amin yang terbentuk sebagai hasil proses dekarboksilasi asam amino bebas yang terdapat di dalam tubuh ikan. Masalah yang dihadapi dalam pembuatan ikan pindang adalah terbentuknya suatu senyawa yang dapat menyebabkan keracunan yaitu histamin akibat sanitasi yang buruk selama pengolahan maupun penyimpanan. Senyawa histamin yang sering terbentuk pada ikan pindang adalah histamin (Danur, 1993).

Histamin merupakan molekul organik berbobot rendah yang diproduksi oleh sebagian besar dekarboksilasi asam amino dari beberapa aksi mikroba tertentu. beberapa diantaranya berperan dalam fungsi fisiologis tubuh manusia dan hewan, seperti regulasi suhu tubuh, volume lambung, ph lambung dan aktivitas otak (Munoz, 2008).

Kandungan histamin pada makanan bergantung pada proses bioteknologi yang ruwet dalam prosedur produksi. Ini dipengaruhi oleh faktor tertentu seperti pertumbuhan bakteri, tersedianya asam-asam amino bebas, perkembangan mikrobial seperti itu, availabilitas dari amino asam bebas, adanya enzim dekarboksilasi dan kondisi suhu yang ditinggikan. Enzim yang dilibatkan dalam produksi histamin, *histidine decarboxylase*, memerlukan suhu lebih besar dari 15° C dan 30° C adalah suhu optimum. Pada area tropis di dunia, ikan sering tertangkap di suhu melebihi 20° C. apabila ikan tidak didinginkan dengan seketika, kondisi baik untuk produksi histamin asalkan bakteri mengandung

enzim histidin dekarboksilase. Pertumbuhan bakteri akan terhenti pada suhu rendah dari 5° C, bagaimanapun aktivitas enzimatis akan tetap berlanjut, menghasilkan dalam produksi amin selanjutnya (Ahmed, 1991).

Histamin merupakan perubahan dari histidin yang terbentuk di dalam makanan karena aktivitas bakteri penghasil enzim histidin dekarboksilase. Beberapa bakteri dilaporkan memiliki aktivitas histidin dekarboksilase yang terbatas, tetapi hanya *Proteus morgani*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Hafnia alvei* telah diteliti merupakan anggota organisme beracun pada histamin. Namun, usaha isolasi dan identifikasi bakteri penghasil histamin dicoba pada sampel yang didapat dari kasus keracunan makanan. Ada kemungkinan sejumlah jenis bakteri diidentifikasi tetap memproduksi histamin (Taylor dan Behling, 1982).

Tingginya kadar histamin dalam makanan ini merupakan dampak aktivitas bakteri pada asam amino histidin. Histamin sesungguhnya bukan zat yang asing pada tubuh manusia. Dalam takaran fisiologis, histamin memikul tugas sebagai substansi yang berperan dalam sekresi asam lambung, tetapi dengan dosis tinggi, zat ini berubah sifat menjadi racun (Arisman, 2009).

## 2.5 Tahap-tahap Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim adalah salah satu cara untuk memisahkan protein enzim dari protein jenis lain dan kontaminan. Secara umum, pemurnian enzim dibagi dalam tiga tahap, yaitu ekstraksi, pemekatan, dan fraksinasi. Menurut Scopes (1987), tujuan pemurnian enzim salah satunya adalah untuk mengidentifikasi fungsi dan struktur protein. Enzim yang murni dari senyawa pengotor dapat digunakan untuk keperluan medis, farmasi, dan penelitian biokimia karena spesifitasnya yang tinggi (Lehninger, 1993).

Tahap awal dalam pemurnian protein atau enzim ekstraseluler adalah tahap isolasi yang bertujuan memisahkan biomassa sel serta senyawa pengotor

yang berasal dari media pertumbuhan. Pemisahan dilakukan dengan sentrifugasi dengan kecepatan tertentu. Enzim yang diisolasi akan tertinggal dalam filtrat (supernatan) dan endapan yang terbentuk adalah zat-zat pengotor yang tidak diinginkan (Scopes, 1987).

Pemekatan enzim dilakukan untuk memisahkan konsentrat protein dari komponen biomolekul lainnya (karbohidrat, lipid, dan asam nukleat). Berbagai metode pemekatan enzim yang lazim digunakan adalah presipitasi dengan garam, pelarut organik, polimer, dialisis, dan ultrafiltrasi (Scopes, 1989).

Presipitasi dengan garam (amonium sulfat, sodium sulfat) lebih disukai daripada presipitasi dengan pelarut organik (aseton dan etanol), dengan alasan pelarut organik cenderung mendenaturasi protein pada suhu agak tinggi, relatif mahal, dan mudah terbakar. Selain itu, presipitasi dengan pelarut organik sangat dipengaruhi oleh konsentrasi pelarut organik, konsentrasi protein, kekuatan ionik, pH, dan suhu (Suhartono, 1989).

Beberapa keuntungan menggunakan ammonium sulfat antara lain mudah larut, tidak toksik, murah, dan stabilitasnya terhadap enzim karena tidak mempengaruhi struktur protein (Webb dan Dixon, 1979). Selain keuntungan yang diperoleh, penggunaan ammonium sulfat juga menimbulkan kerugian antara lain konsentrasi garam yang tertinggal dalam produk tinggi, kurang efisien dalam menghilangkan impuritis, dan ammonium sulfat tidak bersifat buffer sehingga dapat membebaskan ammonia yang mengakibatkan kemungkinan penambahan nilai pH (Suhartono *et al.*, 1992).

Menurut Davidson dan Sittman (1999), penambahan amonium sulfat berpengaruh terhadap protein yang terendapkan selama proses pemurnian. Ion-ion garam amonium sulfat akan berkompetisi dengan protein untuk menarik molekul air. Ion-ion garam memiliki kelarutan lebih besar dibandingkan dengan protein sehingga ion garam akan menarik molekul air dari protein enzim. Protein

akan berinteraksi membentuk gumpalan dan mengendap. Proses ini dilakukan pada suhu ( $4^{\circ}\text{C}$ ) sehingga protein akan mengendap tanpa terdenaturasi.

Selanjutnya menurut Angky (2011), dilakukan dialisis untuk menghilangkan garam-garam yang terikat pada endapan protein. Dialisis dilakukan dengan memasukkan larutan ke kantong dialisis (selofan) dengan pori-pori 10 kD dalam larutan buffer.

Dialisis merupakan proses pemisahan molekul yang lebih besar melalui membran semipermeabel. Membran ini dapat dilewati oleh molekul-molekul kecil saja tapi tidak untuk molekul-molekul besar. Pada proses ini terjadi perpindahan garam amonium sulfat yang mempunyai berat molekul lebih kecil dari satu sisi membran ke sisi yang lain terjadi karena adanya gradien konsentrasi. Perbedaan kecepatan difusi melalui membran timbul karena adanya perbedaan ukuran molekul yang menyebabkan garam terpisah dari protein (Sorensen *et al.*1999). Membran dialisis untuk protein mempunyai ukuran bervariasi dan yang biasa digunakan adalah ukuran 10-100  $\mu\text{m}$  (Janson dan Ryden, 1998).

## 2.6 Karakteristik Dialisat

Karakteristik dialisat bergantung pada pengukuran sifat dan dan ciri lain yang dibandingkan dengan data pustaka. Pengujian yang dapat dilakukan untuk mengetahui karakteristik dialisat adalah *Bovine Serum Albumin* (BSA) untuk mengetahui ukuran kadar protein (Nurhasanah dan Herasari, 2008), *Sodium Dedosil Sulfat Poliakrilamid Gel elektroforesis* (SDS-PAGE) untuk mengetahui berat molekul protein (Rachmadani, 2007) (Day dan Underwood, 1989).

### 2.6.1 *Bovine Serum Albumin* (BSA)

Penentuan konsentrasi protein khamir laut menggunakan metode biuret dengan BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai standar. Prinsip kerja metode biuret adalah senyawa dengan 2 atau lebih ikatan peptida apabila direaksikan

dengan garam kupri dalam suasana basa akan membentuk warna violet. Reaksi biuret bergantung pada pembentukan suatu kompleks antara ion  $\text{Cu}^{++}$  dengan 4 atom N-peptida pada suasana basa, maka akan membentuk suatu kompleks warna ungu yang absorbansinya dapat dibaca pada panjang gelombang 540 nm. Pada metode menggunakan larutan BSA (Holme dan Peck, 1993).

Kelebihan BSA adalah larutan stabil pada pemanasan  $70^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit, lebih spesifik karena 95 % protein terdiri dari albumin. Adapun kelebihan biuret ini sendiri adalah lebih spesifik untuk peptida, polipeptida, dan protein, tidak bereaksi dengan ammonia, urea, dan senyawa nitrogen sederhana (Wiseman, 1985).

### 2.6.2 Uji SDS-PAGE

Banyak molekul biologi yang bermuatan listrik yang besarnya tergantung pada pH dan komposisi medium dimana molekul biologi tersebut terlarut. Bila berada dalam suatu medan listrik, molekul biologi yang bermuatan positif akan bermigrasi ke elektroda negatif dan sebaliknya. Prinsip inilah yang dipakai dalam elektroforesis untuk memisahkan molekul-molekul berdasarkan muatannya.

Metode elektroforesis protein dengan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) merupakan salah satu metode untuk menganalisis protein dengan memisahkan pita-pita protein yang ada di dalam sampel berdasarkan berat molekulnya (Utami *et al.*, 2007).

Elektroforesis dipergunakan untuk memisahkan campuran protein, baik pada larutan bebas maupun pada larutan dengan matriks berpori solid seperti pati. SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-polyacrilamide-gel electrophoresis*) menggunakan cross-linked gel poliakrilamid sebagai matriks inert di mana protein akan bermigrasi. Gel biasanya disiapkan sebelum dipergunakan. Ukuran pori gel dapat disesuaikan sehingga cukup kecil untuk memperlambat migrasi molekul protein yang dikehendaki. Protein-protein tersebut tidak berada pada larutan

biasa tetapi pada larutan yang mengandung deterjen yang bermuatan negatif sangat kuat, yakni *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS). Deterjen tersebut mengikat daerah hidrofobik molekul protein sehingga menyebabkannya terurai menjadi rantai polipeptida yang panjang. Molekul protein individu dilepaskan dari asosiasinya dengan protein lain dan lipid, serta bebas terlarut pada larutan deterjen. Agen reduksi seperti merkaptoetanol ditambahkan untuk mengurai pautan S-S protein sehingga semua konstituen polipeptida pada molekul multisubunit dapat dianalisis secara terpisah. SDS-PAGE merupakan prosedur yang lebih baik daripada analisis protein lainnya karena dapat dipergunakan untuk memisahkan semua jenis protein, termasuk protein yang tidak dapat larut dalam air. Protein membran, komponen protein sitoskeleton, dan protein yang merupakan bagian agregat molekul besar dapat pula diresolvasi. Metode ini memisahkan polipeptida berdasarkan ukurannya sehingga metode ini juga memberikan informasi tentang berat molekul dan komposisi subunit dari setiap kompleks protein (Alberts *et al.*, 1994 dalam Rizki, 2010).