

**APLIKASI *IN-VITRO* BAKTERI MANGROVE (*Bacillus megaterium*)
DAN BAKTERI LIMBAH PEMINDANGAN (*Enterobacter gergoviae*)
PADA PENGURAIAN HISTIDIN MURNI MENJADI HISTAMIN DENGAN pH
YANG BERBEDA**

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

Oleh:
MIRSA KARTIKASARI
NIM. 0710830012



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012**

**APLIKASI *IN-VITRO* BAKTERI MANGROVE (*Bacillus megaterium*)
DAN BAKTERI LIMBAH PEMINDANGAN (*Enterobacter gergoviae*)
PADA PENGURAIAN HISTIDIN MURNI MENJADI HISTAMIN DENGAN pH
YANG BERBEDA**

Oleh:

MIRSA KARTIKASARI

NIM. 0710830012

Menyetujui,

Dosen Penguji I

Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP

NIP. 19680919 200501 1 001

Tanggal :

Dosen Penguji II

Asep Awaludin P, S.Pi, MP

NIP. 19810602 200604 1 001

Tanggal :

Dosen Pembimbing I

Ir. Darius, M. Biotech

NIP. 19500531 198103 1 003

Tanggal :

Dosen Pembimbing II

Ir. Yahya, MP

NIP. 19630706 199003 1 003

Tanggal :

**Mengetahui,
Ketua Jurusan**

Dr. Ir. Happy Nursyam, MS

NIP. 19600322 198601 1 001

Tanggal :

RINGKASAN

MIRSA KARTIKASARI. Laporan Skripsi dengan judul Aplikasi In-Vitro Bakteri Mangrove (*Bacillus megaterium*) dan Bakteri Limbah Pemandangan (*Enterobacter gergoviae*) pada Penguraian Histidin Murni Menjadi Histamin dengan pH yang Berbeda (di bawah bimbingan **Ir. Darius, M. Biotech** dan **Ir. Yahya, MP**).

Histidin adalah asam amino esensial, yang mempunyai residu (R) bermuatan positif sebagai gugus fungsional yang berisi imidazole. Histidin adalah satu dari 22 jenis asam amino dan merupakan asam amino esensial yang terdapat pada manusia dan mamalia lainnya. Perubahan histidin menjadi histamin dikatalis oleh histidin dekarboksilase (HDC) dengan bantuan vitamin B. Dekarboksilasi histidin membentuk histamin, yaitu suatu reaksi di jaringan tubuh mamalia yang dikatalis oleh enzim dekarboksilase asam L-amino aromatik. Seperti protein pada umumnya, struktur ion enzim tergantung pada pH lingkungannya. Enzim dapat berbentuk ion positif, ion negatif, atau ion bermuatan ganda. Dengan demikian perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat.

Maksud dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pH pada proses penguraian histidin murni menjadi histamin oleh bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae*. Dan tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah untuk mengetahui diantara bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae*, bakteri manakah yang dapat menguraikan histidin murni paling tinggi.

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2012 di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang dan BLPMP (Balai Laboratorium Pengujian Mutu Hasil Perikanan) Surabaya.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah kegiatan percobaan untuk melihat hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki. Tujuan dari penelitian eksperimen adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen. Pengujian histamin pada penelitian ini menggunakan metode spektrofotometri dan pengujian CO₂ menggunakan metode titrasi.

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan bakteri berbeda nyata terhadap kandungan histamin. Sedangkan perlakuan pH dan interaksi antara bakteri dan pH memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap kadar histamin yang dihasilkan dari penguraian histidin murni oleh bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae*. Apabila dilihat dari banyaknya histamin yang dihasilkan pada kondisi pH maka, pada pH 6 menghasilkan total histamin paling tinggi yaitu sebesar 77,8 mg/l dibandingkan pada kondisi pada pH 7 sebesar 12,99 mg/l dan pH 8 sebesar 45,69 mg/l. Dari jumlah histamin yang dihasilkan dari penguraian histidin murni menunjukkan bahwa bakteri *Enterobacter gergoviae* dapat menghasilkan histamin lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri *Bacillus megaterium*. Bakteri *Enterobacter gergoviae* menghasilkan histamin keseluruhan sebanyak 75,77 mg/l sedangkan bakteri *Bacillus megaterium* hanya menghasilkan histamin 60,71 mg/l.

Dari penelitian ini saran yang dapat diberikan adalah perlu diadakan penelitian yang lebih lanjut mengenai karakteristik enzim histidin dekarboksilase (HDC) dari bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae*.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “ Aplikasi In-Vitro Bakteri Mangrove (*Bacillus megaterium*) dan Bakteri Limbah Pemandangan (*Enterobacter gergoviae*) pada Penguraian Histidin Murni Menjadi Histamin dengan pH yang Berbeda” sebagai tugas akhir dalam rangka menyelesaikan studi di Universitas Brawijaya Malang, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Program Studi Teknologi Hasil Perikanan.

Pada kesempatan ini, penyusun ingin menyampaikan penghargaan dan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini kepada :

1. Bapak Ir. Darius, M. Biotech selaku dosen pembimbing pertama dan Bapak Ir. Yahya, MP selaku dosen pembimbing kedua. Terimakasih atas bimbingan, saran dan motivasi yang diberikan dalam penyelesaian skripsi penulis.
2. Bapak Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP dan Bapak Asep Awaludin P, S.Pi, MP selaku dosen penguji. Terimakasih atas segala saran dan masukan yang diberikan.
3. Ayah dan Ibu tercinta, terimakasih atas doa di setiap malam-malam panjang yang tak pernah henti. Mas Ari, mbk Dewi, Si kecil Rafif dan Pak Jayus terima kasih atas semangat dan dukungannya.
4. *Special for Yanti (thx dah jadi temen diskusi, curhat and berfilosofi gak jelas tapi cukup membantu dalam menemukan jati diri dan menjadi lebih dewasa, kan slalu ku ingat misi Kita...”Belajar ihklas seumur hidup he..he..”). Untuk Ari teman seperjuangan, thx untuk semua bantuan dan motivasinya..” Do The Best and We Will Get The Best”. Buat semua penghuni Sumpersari 40A makasih dah memberiku kenangan indah di saat2 terakhir... I will miss u*
5. *For my best friends (Rahma, Datik, Risa) thx for every beautiful moment we spent together and for being a sun when the rain just won't stop. Teman-teman THP'07 terimakasih atas bantuan dan dukungannya. Tetep kompak dan semangat terus...*
6. Makasih banget... buat Bu. Iwin yang dah banyak bantuin dalam penelitian, ngasih kritik, saran, semangat, motivasi dan curhat2an yang menarik.he..he..
7. Semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, Mei 2012

Penulis,

*Alhamdulillah,,, Puji syukur kepada-Mu Ya Allah
Pelindung, Penguat dan Penolong di setiap langkah.....*

*This little masterpiece I dedicate to
My beloved mother and my beloved father.....*

My Brother and My Sister

And all my best friends...

That always keep pray for me



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSEMBAHAN	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian	4
1.4 Kegunaan Penelitian	4
1.5 Waktu dan Tempat	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Histidin	5
2.2 Histidin Dekarboksilase	6
2.3 Pengaruh pH Terhadap Enzim	7
2.4 Histamin	7
2.5 <i>In-Vitro</i>	10
2.6 <i>Bacillus megaterium</i>	11
2.7 <i>Enterobacter gergoviae</i>	12
2.8 Spektrofourometri	14
3. METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	16
3.1.1 Bahan penelitian.....	16
3.1.2 Alat Penelitian	16
3.2 Metode Penelitian.....	17
3.2.1 Metode Eksperimen.....	17
3.2.2 Variabel Penelitian.....	18
3.2.3 Rancangan Penelitian	18
3.3 Prosedur Penelitian	19
3.3.1 Skema Kerja.....	20
3.3.2 Pembuatan Media	20
3.3.3 Peremajaan Bakteri	23
3.3.4 Pengamatan Fase-Fase Pertumbuhan Bakteri	26
3.3.5 Pembuatan Larutan Histidin Murni.....	27
3.3.6 Pengujian Histamin.....	28
3.3.7 Pengujian CO ₂	32
3.4 Analisa Data.....	32
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Fase Pertumbuhan Bakteri	33
4.2 Hasil Penelitian	36
4.3 Pembahasan	37

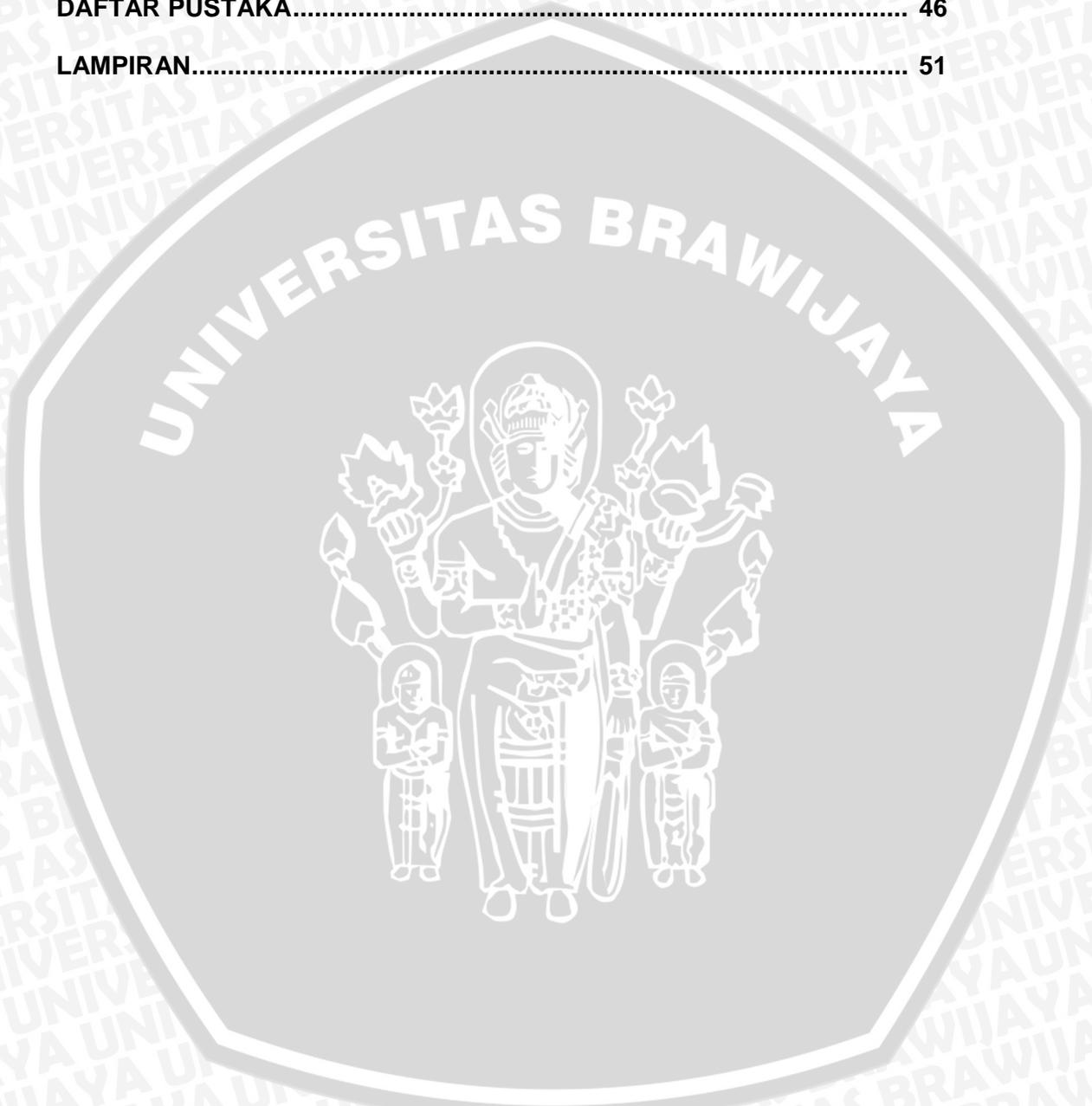
4.3.1 Uji Histamin	36
4.3.2 Uji Total CO ₂	42

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan.....	45
5.2 Saran.....	45

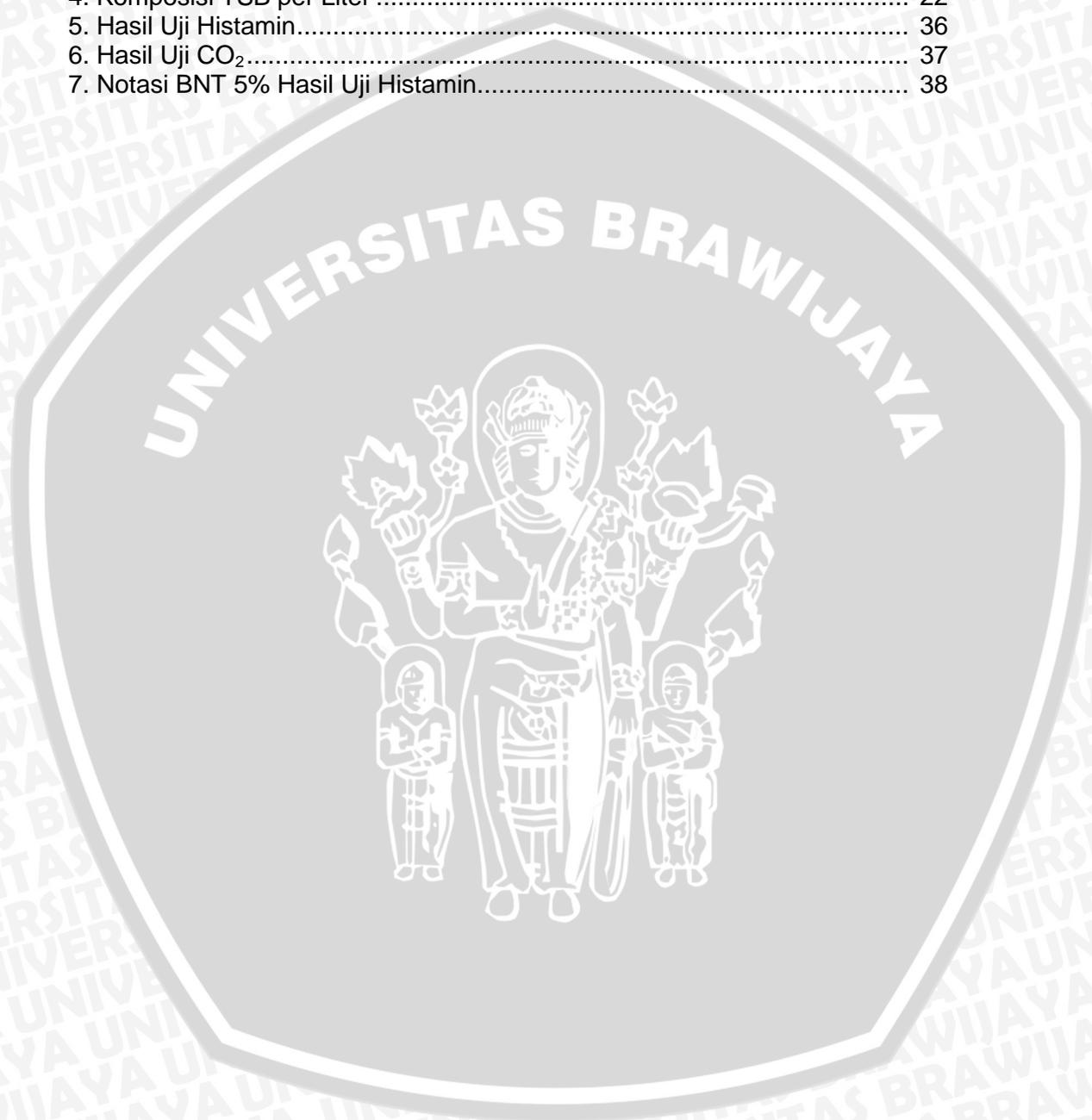
DAFTAR PUSTAKA..... 46

LAMPIRAN..... 51



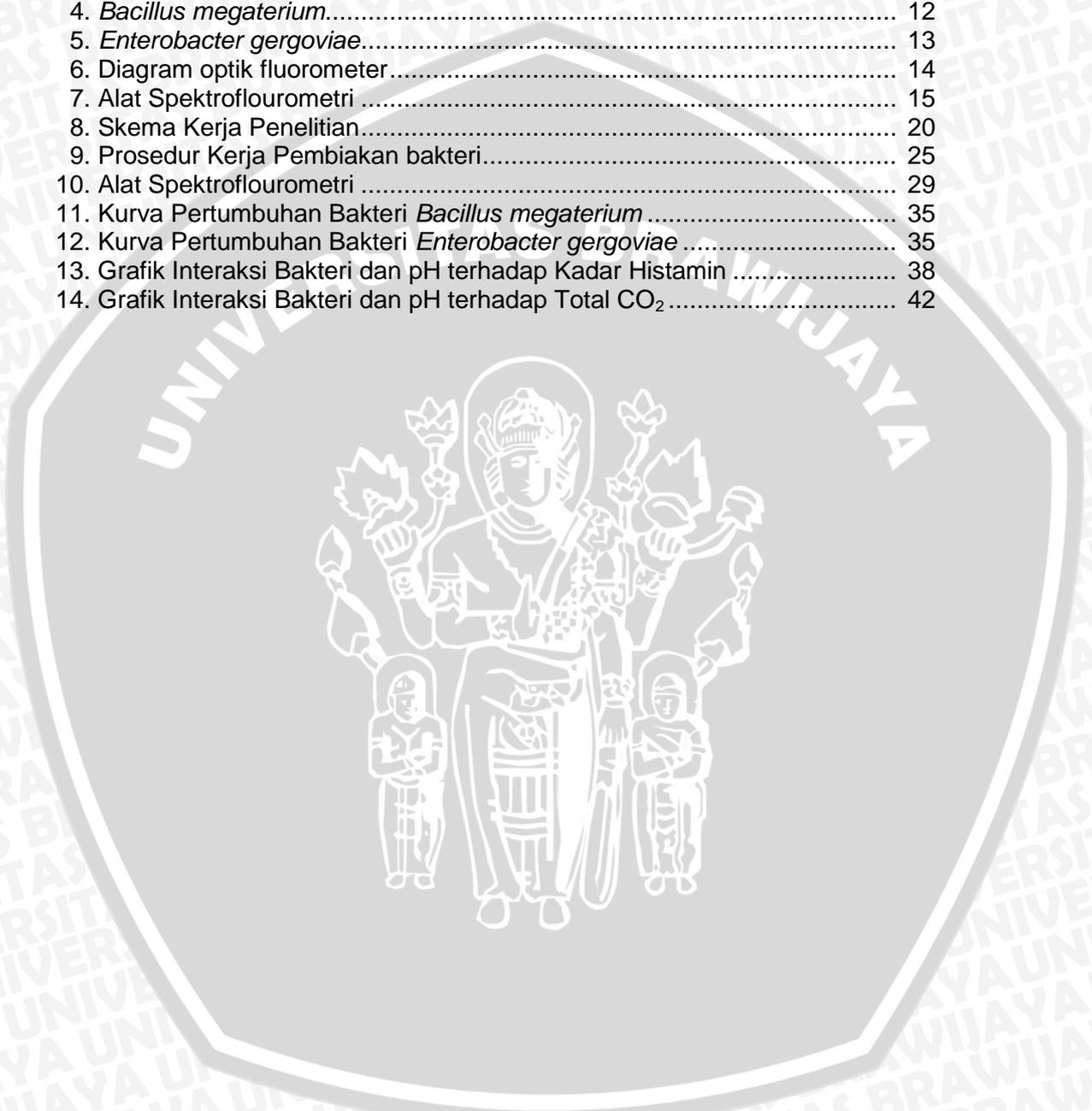
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Karakteristik Histidin	5
2. Rancangan Penelitian	19
3. Komposisi TSA per Liter	21
4. Komposisi TSB per Liter	22
5. Hasil Uji Histamin	36
6. Hasil Uji CO ₂	37
7. Notasi BNT 5% Hasil Uji Histamin	38



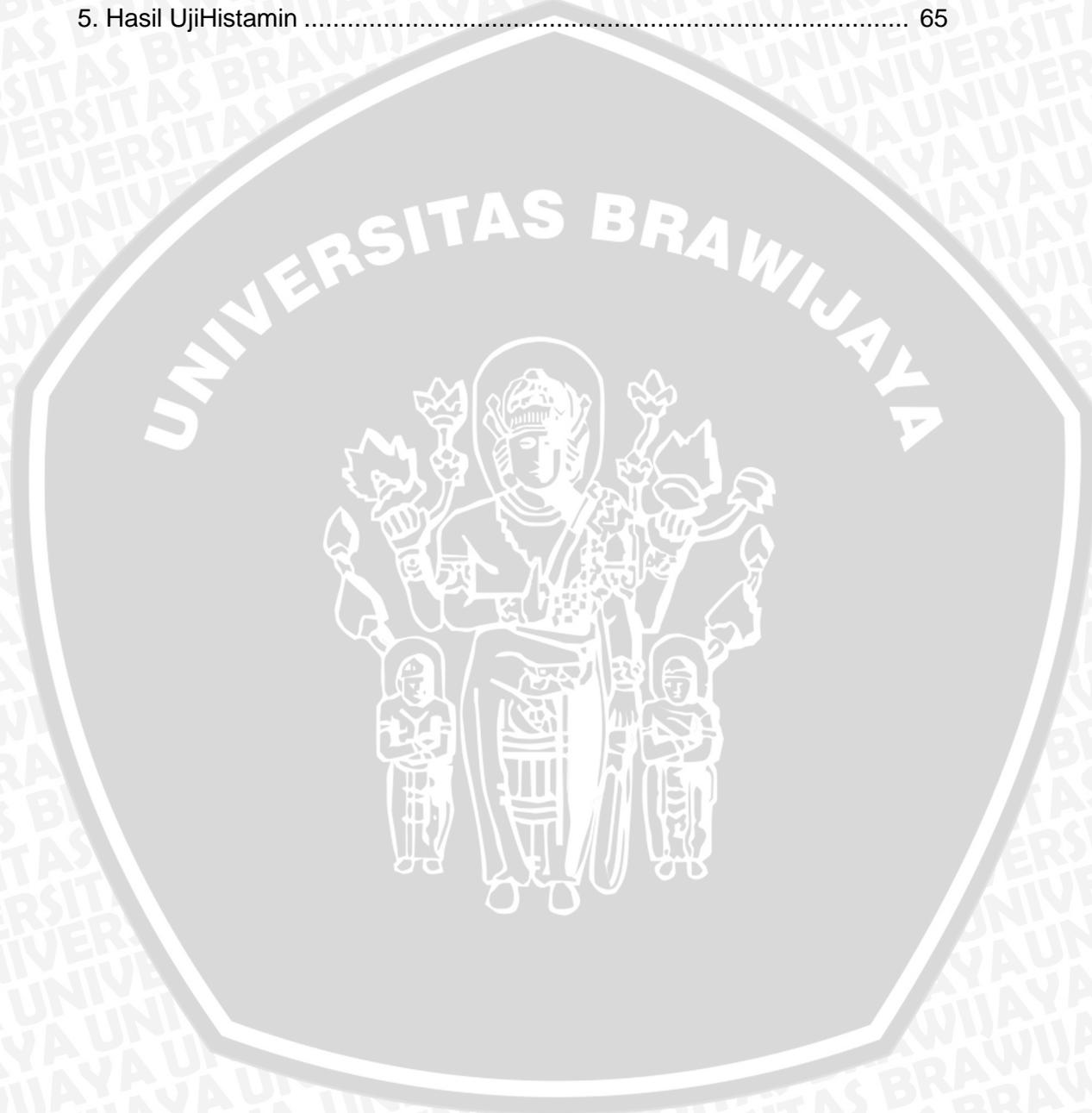
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Histidin	6
2. Perubahan asam amino menjadi biogenik amin	9
3. Perubahan histidin menjadi histamine	10
4. <i>Bacillus megaterium</i>	12
5. <i>Enterobacter gergoviae</i>	13
6. Diagram optik fluorometer	14
7. Alat Spektrofourometri	15
8. Skema Kerja Penelitian	20
9. Prosedur Kerja Pembiakan bakteri	25
10. Alat Spektrofourometri	29
11. Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus megaterium</i>	35
12. Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Enterobacter gergoviae</i>	35
13. Grafik Interaksi Bakteri dan pH terhadap Kadar Histamin	38
14. Grafik Interaksi Bakteri dan pH terhadap Total CO ₂	42



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Dokumentasi Foto Prosedur Penelitian.....	51
2. Tabel Hasil Pengamatan Fase Pertumbuhan Bakteri.....	56
3. Analisis Sidik Ragam.....	58
4. Hasil Teoritis dan Persen Hasil dari Reaksi Kimia.....	63
5. Hasil UjiHistamin.....	65



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Histidin adalah asam amino esensial, yang mempunyai residu (R) bermuatan positif sebagai gugus fungsional yang berisi imidazole. Histidin adalah satu dari 22 jenis asam amino dan merupakan asam amino esensial yang terdapat pada manusia dan mamalia lainnya. Perubahan histidin menjadi histamin dikatalis oleh histidin dekarboksilase (HDC) dengan bantuan vitamin B dan dengan reaksi sebagai berikut:



Histamin mempunyai fungsi penting dalam tubuh bila dihubungkan dengan fenomena fisiologis dan patologis terutama dengan pelepasan histamin pada reaksi alergi. Alergi berarti masuknya suatu bahan asing yang menyebabkan reaksi tidak menyenangkan di dalam jaringan tubuh (Wikipedia, 2011).

Dekarboksilasi histidin membentuk histamin, yaitu suatu reaksi di jaringan tubuh mamalia yang dikatalis oleh enzim dekarboksilase asam L-amino aromatik yang memiliki spesifitas yang luas. Enzim ini juga mengkatalis reaksi dekarboksilasi dopa, 5-hidroksi-triptofan, fenilalanin, tirosin dan triptofan. (Rodwell *et al.* 2003). Ditambahkan oleh Sims *et al* (1992), histamin dihasilkan dari perombakan histidin yang merupakan prekursor histamin.

Histamin adalah senyawa biogenic amin yang berada dalam daging ikan yang diproduksi secara biologis melalui proses dekarboksilasi dari asam amino bebas serta terdapat pada berbagai bahan pangan seperti ikan, daging merah, keju, dan makanan fermentasi (Keer *et al.* 2002). Pembentukan biogenic amin ini tergantung dari ketersediaan asam amino bebas, keberadaan dekarboksilase yang dikandung oleh mikroorganisme (bakteri dengan enzim yang dapat

menyebabkan dekarboksilasi asam amino bebas) dan kondisi yang mendukung pertumbuhan mikroba dan aktivitas enzimatis (Putro, 2002).

Seperti protein pada umumnya, struktur ion enzim tergantung pada pH lingkungannya. Enzim dapat berbentuk ion positif, ion negatif, atau ion bermuatan ganda. Dengan demikian perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. Disamping pengaruh terhadap struktur ion pada enzim, pH rendah, atau pH tinggi dapat pula menyebabkan terjadinya proses denaturasi dan ini akan mengakibatkan menurunnya aktifitas enzim. Terdapat suatu nilai pH tertentu atau daerah pH yang dapat menyebabkan kecepatan reaksi paling tinggi. pH tersebut dinamakan pH optimum (Poedjadi *et al.* 2006).

Berbagai jenis bakteri yang mampu menghasilkan enzim histidin dekarboksilase (HDC) termasuk famili *Enterobacteriaceae* dan *Bacillaceae* (Staruszkiewicz, 2002). Umumnya spesies *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pedicoccus*, *Photobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, dan *Streptococcus* menunjukkan aktivitas dekarboksilase asam amino (Kanki *et al.* 2002).

Penelitian ini merupakan rangkaian dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh tim penelitian mengenai Isolasi dan identifikasi bakteri *endogenous* dari limbah pemindangan dan bakteri *endogenous* mangrove di Kecamatan Nguling, Pasuruan yang dilanjutkan dengan penelitian mengenai bioaugmentasi limbah cair industri pemindangan menggunakan konsorsium bakteri *endogenous* limbah pemindangan (*Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter gergoviae*,) dan *endogenous* mangrove (*Bacillus megaterium*, *Nitrococcus sp.*, *Pseudomonas putida*) secara aerob. Dasar pemikiran dari penelitian sebelumnya adalah karena salah satu cara untuk mendegradasi limbah yang ramah lingkungan ialah menggunakan teknologi

bioaugmentasi. Bioaugmentasi didefinisikan sebagai penggunaan organisme hidup, terutama mikroorganisme, untuk mendegradasi pencemar lingkungan yang merugikan ke tingkat atau bentuk yang lebih aman yaitu dengan penambahan atau introduksi satu jenis atau lebih mikroorganisme baik yang alami maupun yang sudah mengalami perbaikan sifat. Bioaugmentasi digunakan untuk menyingkirkan produk sampingan dari bahan mentah dan polutan potensial dari limbah. Organisme yang biasa digunakan dalam proses ini adalah bakteri.

Rangkaian penelitian sebelumnya dilakukan secara *In-situ* dan *in-vivo* maka pada penelitian kali ini akan diuji secara *in-vitro*. Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae* menghasilkan histamin paling tinggi. Oleh sebab itu maka bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae* dipilih dalam penelitian ini yaitu penguraian histidin murni menjadi histamin secara *in-vitro* yang dilakukan dengan pH yang berbeda.

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian diatas didapatkan permasalahan sebagai berikut :

- Apakah perlakuan pH yang berbeda mempengaruhi proses penguraian histidin murni menjadi histamin oleh bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae*?
- Diantara bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae* bakteri manakah yang dapat menghasilkan histamin lebih tinggi ?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah :

- Untuk mengetahui pengaruh pH pada proses penguraian histidin murni menjadi histamin oleh bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae*.

Tujuan dari penelitian ini adalah :

- Untuk mendapatkan bakteri yang dapat menguraikan histidin murni paling tinggi diantara bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae*.

1.4 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini adalah untuk memanfaatkan bakteri yang terbaik dalam menguraikan histidin untuk digunakan sebagai bakteri agen untuk penelitian lebih lanjut mengenai karakteristik metabolit ekstraseluler dari bakteri yang dapat menguraikan histidin paling tinggi.

1.5 Tempat dan Waktu

Penelitian pendahuluan dilaksanakan pada 16-18 Agustus 2011 dan dilanjutkan dengan penelitian inti pada bulan Januari 2012 di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang dan BLPMHP (Balai Laboratorium Pengujian Mutu Hasil Perikanan) Surabaya.

2. TINJAUAN PUSTAKA

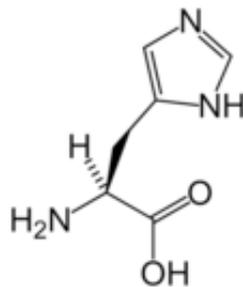
2.1 Histidin

Histidin merupakan salah satu asam amino esensial. Histidin pertama kali diisolasi oleh seorang fisikawan asal Jerman yang bernama Albrecht Kossel pada tahun 1896. Histidin memiliki harga pKa yang relatif netral (yaitu 6,04). Terdapat dua enantiomer histidin yaitu D-histidin dan L-histidin, namun umumnya histidin memiliki konfigurasi L. (Poedjiadi, 2006). Karakteristik histidin ditunjukkan pada tabel dibawah ini :

Tabel 1. Karakteristik Histidin

Simbol	His
Nama sistematis	Asam S-2-amino-3-(3H-imidazol-4-il) propanoat
Sinonim	Asam α -amino-1H-imidazol-4 propanoat, asam α -amino-4-imidazol propanoat
Rumus molekul	$C_6H_9N_3O_2$
Massa molekul	155,16 g/mol
Titik lebur	287°C
Titik isoelektrik (pI)	7,59
Tetapan disosiasi (pKa)	1,70; 6,04; 9,09

Sumber : (<http://id.wikipedia.org/wiki/histidin.htm>)



Gambar 1. Struktur Histidin

Histidin bersifat amfoter karena adanya gugus NH_3^+ dan gugus $-\text{COO}^-$. Apabila histidin berada dalam larutan yang bersifat asam ($\text{pH} < \text{pI}$) maka gugus $-\text{COO}^-$ akan cenderung mengikat ion hidrogen sehingga histidin akan bermuatan positif atau bersifat kationik. Jika histidin berada dalam larutan yang bersifat basa ($\text{pH} > \text{pI}$) maka gugus NH_3^+ cenderung melepaskan proton sehingga histidin akan bermuatan negatif atau bersifat anionik. Sedangkan apabila histidin dilarutkan dengan pelarut yang memiliki pH yang sama dengan pH titik isolistriknya akan membentuk zwitter ion (Sunarya, 2003).

2.2 Histidin Dekarboksilase

Histidin dekarboksilase (HDC) adalah enzim yang mengkatalis reaksi pada produksi histamin dari histidin dengan bantuan dari vitamin B6 adalah sebagai berikut :



Pada manusia, enzim histidin dekarboksilase disandikan oleh gen HDC. Biogenic amin histamin merupakan modulator penting untuk beberapa proses fisiologis dalam tubuh, termasuk neurotransmisi, sekresi asam lambung, dan kesehatan otot polos. Biosintesis histamin dari histidin dikatalis oleh enzim L-histidin dekarboksilase (Wikipedia, 2011).

Banyak zat telah diuji untuk diketahui kemampuannya untuk menghambat enzim histidin dekarboksilase. Walaupun beberapa inhibitor kuat telah ditemukan, tidak satupun yang sepenuhnya spesifik untuk menghambat histidin dekarboksilase tanpa secara bersamaan menghambat enzim lain. Pada faktanya, senyawa yang dibentuk dari pengaruh ketersediaan dari co-decarboxylase pyridoxal 5 – phosphate tidak hanya akan menghambat histidine decarboxylase tetapi seluruh asam aminodecarboxylase dan transaminase, untuk pyridoxal phosphat co-enzyme juga dihambat (Mackay and Shepherd, 1960).

2.3 Pengaruh pH Terhadap Enzim

Efek pH pada enzim berkaitan dengan keadaan ionisasi dari sistem yang dikatalisis, termasuk substrat, dan enzim itu sendiri. Perubahan pH dapat mempengaruhi keadaan ionisasi dari asam-asam amino pada sisi aktif enzim sehingga akan mempengaruhi interaksinya dengan molekul substrat. Kadar pH yang terlalu tinggi atau terlalu rendah akan menyebabkan ketidakstabilan pada konformasi enzim sehingga menyebabkan struktur pada enzim rusak. Enzim mempunyai pH optimum yang khas yang akan menyebabkan aktivitas maksimal. Keadaan optimum ini dihubungkan dengan saat gugus pemberi proton atau penerima proton yang aktif pada sisi enzim berada pada kondisi ionisasi yang tepat. Keadaan optimum tidak harus sama dengan pH lingkungannya. Aktivitas enzim dalam sel sebagian diatur oleh pH media kulturnya (Lehninger 2004).

2.4 Histamin

Biogenic Amine adalah bagian dari berbagai senyawa asam amino dengan kehadiran kelompok *biogenic amine* tertentu terjadi secara alami diberbagai tumbuhan dan hewan. Biogenik amin berkembang sebagai hasil dari

dekarboksilasi asam amino bebas melalui aksi anaerob (Sander, 1996). Biogenik amin merupakan molekul organik berbobot rendah yang diproduksi oleh sebagian besar dekarboksilasi asam amino dari beberapa aksi mikroba tertentu (Munoz, 2008).

Biogenik amina merupakan komponen dasar nitrogen yang dibentuk terutama oleh dekarboksilasi asam amino atau dengan transminasi dari Aldehid dan keton. Biogenik amin 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).

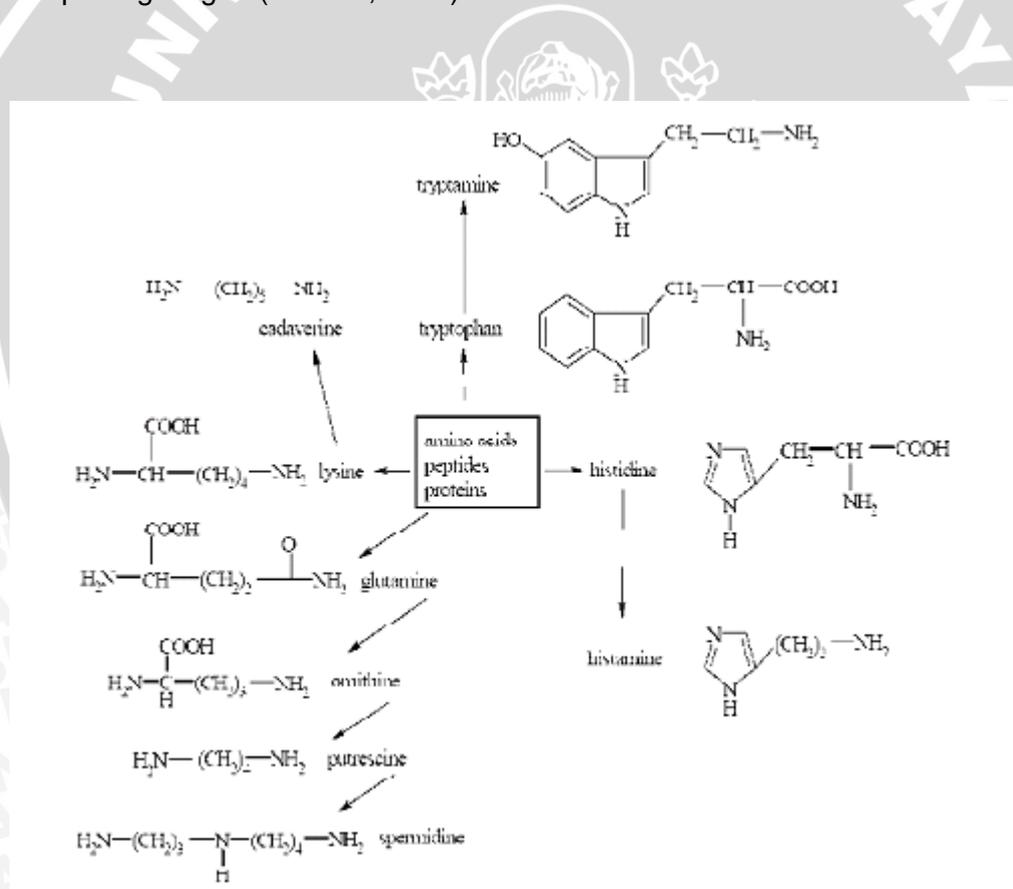
Histamin adalah senyawa biogenic amin hasil perombakan asam amino histidin bebas yang berada dalam daging ikan yang diproduksi secara biologis melalui proses dekarboksilasi dari asam amino bebas serta terdapat pada berbagai bahan pangan seperti ikan, daging merah, keju, dan makanan fermentasi (Keer *et. al.* 2002).

Histamin merupakan komponen yang kecil, mempunyai berat molekul rendah yang terdiri atas cincin imidazol dan sisi rantai etilamin. Histamin juga merupakan komponen yang tidak larut air. Histamin merupakan salah satu amin biogenik yang mempunyai pengaruh terhadap efek fisiologis manusia (Afilal *et. al.* 2006). Histamin merupakan perubahan dari histidin yang terbentuk di dalam makanan karena aktivitas bakteri penghasil enzyme histidin dekarboksilase (Taylor dan Behling, 1982).

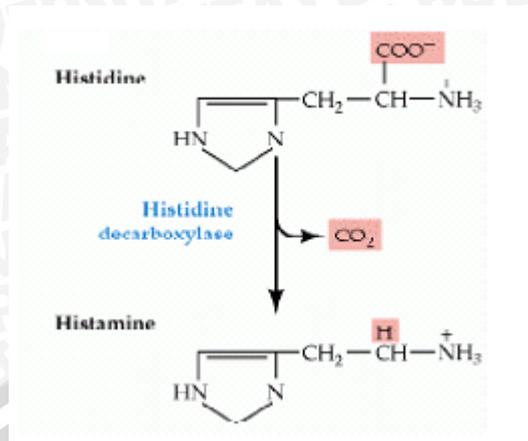
Histamin adalah senyawa amina biogenik yang terbentuk dari asam amino histidin akibat reaksi dengan enzim decarboxylase. Amina biogenik diproduksi pada jaringan ikan oleh bakteri dari famili *Enterobacteriaceae*, seperti *Morganella*, *Klebsiella*, dan *Hafnia* yang menghasilkan enzim histidin decarboxylase. Bakteri yang secara alami terdapat pada insang dan usus ikan

akan menyebar ke seluruh bagian tubuh selama proses penanganan (Sumner *et al.* 2004).

Histamin atau dikenal sebagai [2-(4-imidazolyl)ethylamine] terbentuk dari dekarboksilasi oleh enzim yang terdapat secara alami dalam jaringan daging ikan. Jumlah histamin yang dihasilkan melalui aktivitas enzim selama proses autolisis sangat rendah bila dibandingkan dengan histamin yang dihasilkan oleh aktivitas bakteri selama proses pembusukan berlangsung. Di bawah kondisi optimum, jumlah histamin dihasilkan melalui autolisis biasanya kurang dari 10-5 mg/100 g daging ikan. Selain itu produksi histamin juga dipengaruhi oleh suhu dan pH lingkungan (Kimata, 1961).



Gambar 2. Perubahan asam amino menjadi biogenik amin (Ko, 2006)



Gambar 3. Perubahan histidin menjadi histamine (Purves, et al,2001)

2.5 *In-Vitro*

In vitro adalah istilah yang dipakai dalam biologi untuk menyebutkan kultur suatu sel, jaringan, atau bagian organ tertentu di dalam laboratorium. Istilah ini dipakai karena kebanyakan kultur artifisial ini dilakukan di dalam alat-alat laboratorium yang terbuat dari kaca, seperti cawan petri, labu Erlenmeyer, tabung kultur, botol, dan sebagainya. Kultur jaringan dan berbagai variasinya biasa disebut sebagai pembiakan *in vitro* (Wikipedia, 2011).

Sebuah penelitian dilakukan secara *in vitro*, penelitian dilakukan tidak dalam organisme hidup tetapi di dalam lingkungan yang terkontrol, misalnya dalam tabung reaksi atau cawan petri. Banyak percobaan biologi seluler yang dilakukan diluar organisme atau sel, karena kondisi pengujian mungkin tidak sesuai dengan kondisi di dalam organisme, hal ini dapat mengakibatkan hasil yang tidak sesuai dengan hasil yang muncul dalam organisme hidup. Akibatnya, hasil eksperimen tersebut sering bertentangan dengan hasil eksperimen secara *in vivo*. Jenis penelitian ini bertujuan untuk menjelaskan pengaruh dari variabel eksperimental pada subset dari bagian pokok suatu organisme. Hal ini

cenderung untuk memfokuskan pada organ, jaringan, sel, komponen sel, protein dan atau biomolekul. Penelitian in vitro lebih cocok digunakan dibandingkan penelitian in vivo untuk menyimpulkan mekanisme tindakan biologis. Dengan variabel yang lebih sedikit dan perseptual yang kuat menyebabkan reaksi halus dan hasil yang umumnya lebih jelas (Pharmacy Education, 2010).

2.6 *Bacillus megaterium*

Bacillus merupakan bakteri yang berbentuk basil dimana bakteri jenis ini merupakan bakteri pengurai dari protein menjadi senyawa sederhana, *Bacillus* sendiri terbagi atas 2 golongan yaitu yang bersifat proteolitik dan patogen dimana bakteri jenis patogen seperti *Bacillus antraks* yang merupakan bakteri berbahaya pembawa penyakit antraks khususnya pada hewan ternak seperti sapi, sedangkan yang bersifat proteolitik yaitu yang mampu menguraikan protein.

Sebagai contoh sebagai berikut :

- *Bacillus brevis*, menghasilkan terotrisin
- *Bacillus subtilis*, menghasilkan basitrosin
- *Bacillus polymyxa*, menghasilkan polymixin (Wikipedia,2011^a)

Adapun klasifikasi bakteri *Bacillus megaterium* dalam Zipcodezoo

(2011^a) adalah sebagai berikut :

Kerajaan	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacili
Ordo	: Bacilliales
Famili	: Bacillaceae
Genus	: <i>Megaterium</i>
Spesies	: <i>Bacillus megaterium</i>



Gambar 4. *Bacillus megaterium* (Wikipedia,2010^o)

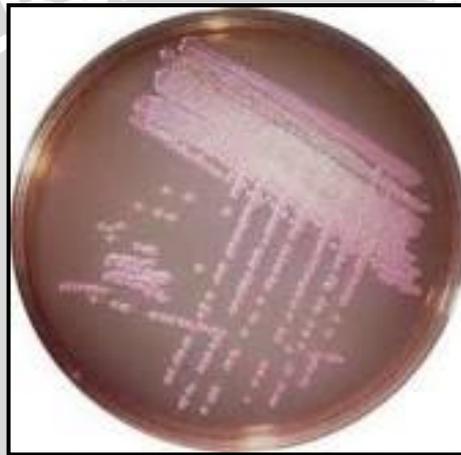
Pada beberapa penelitian ditemukan bahwa penambahan bakteri *Bacillus megaterium* di perairan dapat meningkatkan kualitas perairan dengan mengurangi konsentrasi CO₂ perairan. Penggunaan *Bacillus megaterium* pada tambak udang menunjukkan bahwa *megaterium* mampu meningkatkan kesintasan larva udang windu dan mencegah dari penyakit vibriosis akibat *Vibrio harveyi*. Selain itu *megaterium* secara alami bersimbiosis pada saluran pencernaan udang windu (Kungvankij *et al*, 1985).

2.7 *Enterobacter gergoviae*

Enterobacter gergoviae adalah bakteri gram negatif, sitrat dan asetat dapat digunakan sebagai sumber karbon satu – satunya. Suhu optimum pertumbuhannya 37°C. dijumpai dalam limbah, tanah dan beberapa perairan alamiah. *Enterobacter gergoviae* berbentuk bulat, dengan diameter 0.6-1µm, merupakan jenis bakteri fakultatif anaerobik (Pelezar dan Chan,2009).

Enterobacter gergoviae adalah bakteri gram-negatif, fakultatif-anaerob, berbentuk batang dan merupakan bakteri dari keluarga *Enterobacteriaceae*. Beberapa koloni dari bakteri ini patogen dan menyebabkan infeksi oportunistik dalam kantung kemih dan saluran pernafasan adalah bagian yang sering terinfeksi (Wikipedia, 2010^d). *Enterobacter gergoviae* adalah urease-positif, sedangkan spesies *Enterobacter* lainnya adalah urease-negatif. *Enterobacter*

gergoviae kadang muncul menjadi patogen oportunistik dan telah diisolasi dari urin, nanah, dahak, darah dan spesimen klinis lainnya. Spesies ini telah terlibat dalam sebuah wabah nosokomial infeksi saluran kemih (Krieg, 1989). Akan tetapi, bakteri *Enterobacter gergoviae* juga mempunyai manfaat lain yaitu sebagai pelarut zat fosfor dalam meremediasi tanah tercemar. Nursanti dan Madjid (2009) mengatakan bahwa, bakteri pelarut fosfor (*Pseudomonas puptida* dan *Enterobacter gergoviae*) mampu meningkatkan kelarutan fosfor pada tanah ultisol. *Enterobacter gergoviae* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 5. *Enterobacter gergoviae* (Wikipedia,2010^d)

Klasifikasi bakteri *Enterobacter gergoviae* dalam Zipcodezoo (2011^b),

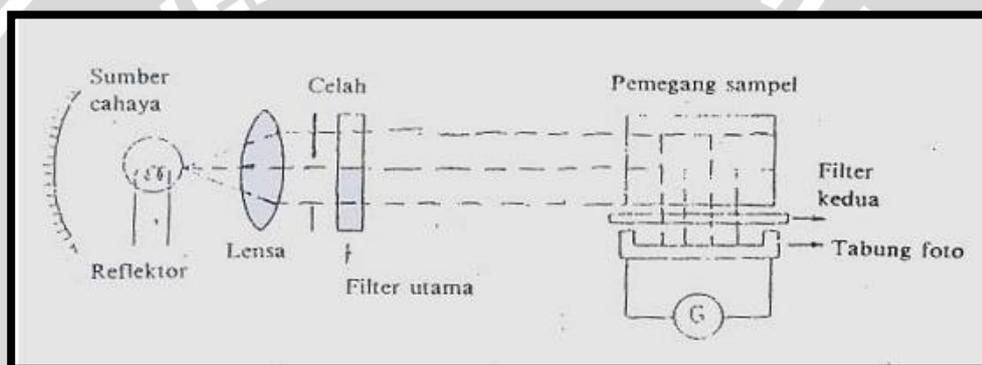
adalah sebagai berikut :

- Kerajaan : Bacteria
- Filum : Proteobacteria
- Kelas : Gammaproteobacteria
- Ordo : Enterobacteriales
- Famili : Enterobacteriaceae
- Genus : *Enterobacter*
- Spesies : *Enterobacter gergoviae*

2.8 Spektrofluorometri

Spektrofluorometri adalah metode analisis kimia kuantitatif yang berdasarkan *fluorescence*. *Fluorescence* dan *phosphorescence* adalah bagian dari *photoluminescence*, yaitu tipe spektroskopi optik dimana sebuah molekul tereksitasi dengan mengabsorpsi ultraviolet, sinar tampak dan radiasi inframerah dekat. Molekul tereksitasi akan kembali kepada keadaan dasar atau ke tingkat eksitasi lebih rendah, dengan mengemisikan sinar. Sinar yang diemisikan inilah yang akan diukur (Widodo, 2010).

Komponen-komponen utama dari masing-masing instrument ini yaitu:



Gambar 6. Diagram optik fluorometer

Menurut Sudarmadji (1996), peralatan pokok spektrofluorometer adalah :

- Sumber spektrum yang kontinyu misalnya dari jenis lampu merkuri atau xenon.
- Monokromator (M1) untuk menyinari sampel dengan panjang gelombang tertentu.
- Monokromator kedua (M2) yang pada iradiasi konstan dapat dipakai menentukan panjang gelombang spectrum fluoresensi sampel.
- Detector berupa fotosel yang sangat peka misalnya fotomultiplier merah untuk panjang gelombang lebih besar dari pada 500 nm.
- Amplifier untuk mengandakan radiasi dan meneruskan ke pembacaan.

Metoda spektrofotometri mempunyai limit deteksi yang rendah dengan kemampuan analisis kimia relatif kecil sekitar sepersepuluh metoda spektrometri biasa, dan daerah pengukurannya sekitar 0,1 sampai 0,001 ppm. Namun walaupun metoda analisis kimia fluorometri ini sangat selektif, pemakaiannya terbatas pada senyawa-senyawa yang berfluoresensi atau yang dapat dibuat berfluoresensi (Noviarty, 2007).



Gambar 7. Alat Spektrofourometri (Perkin; Elmer, 1981)



3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan kimia serta isolat murni bakteri. Bahan utama yang digunakan adalah larutan histidin murni sebanyak 500 mg. Bahan lain yang digunakan adalah isolat murni bakteri *Bacillus megaterium* (bakteri mangrove) dan *Enterobacter gergoviae* (bakteri limbah pemindangan) dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Lia dan Anam (2010) dan disimpan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pemilihan jenis bakteri ini didasarkan pada hasil penelitian pendahuluan mengenai penguraian histidin menjadi histamin pada limbah pemindangan. Bakteri yang dipilih adalah 2 jenis bakteri yang menguraikan histamin paling tinggi yaitu *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae*. Bahan lain yang digunakan yaitu TSB, TSA, larutan NaCl, aquadest, HCL 0,1 N, NaOH 0,1 N, air, kertas saring, tissue, aluminium foil, alkohol 70 %, sarung tangan, masker, tissue dan sabun cair. Sedangkan untuk pengujian histamin dibutuhkan : metanol, aquadest, *glasswool*, NaOH 1 N, HCl 0,1 N, *Ortophtalatdikarbosildehyd* (OPT) 0,1 %, asam fosfat (H_3PO_4) 3,57 N, resin penukar ion jenis *Dowex 1-X8 50-10 mesh*, larutan standart histamin, dan larutan kerja.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari peralatan pembiakan bakteri dan pengamatan fase, pembuatan larutan histidin 500 mg dengan pH berbeda, inkubasi bakteri pada larutan histidin murni dan peralatan analisa histamin. Peralatan pembiakan dan pengamatan fase bakteri, antara lain: kulkas, cawan petri, kuvet, tabung reaksi, rak tabung reaksi bertutup, erlenmeyer, pipet volum, beaker glass, timbangan digital, gelas arloji, osse, laminaran, gelas

ukur, spatula, bunsen, botol semprot, nampan, inkubator, autoklaf. Peralatan pembuatan laurutan histidin 500 mg dengan pH berbeda adalah beaker glass, timbangan digital, spatula, pipet, pH meter dan *magnetic stirer*. Peralatan inkubasi bakteri pada larutan histidin murni adalah erlenmeyer atau botol tahan panas, *waterbath* dan *shaker*. Sedangkan untuk pengujian kadar histamin, antara lain : corong dan botol *filtrat* contoh, kertas saring kasar, plastik, karet pengikat, kolom resin 20 cm x 0,8 cm, *reservoar* 2 cm x 5 cm; labu takar 25 ml, 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml; pipet *volumetric*, spektrofлуorometer, *stirer-plate*, tabung reaksi 5 ml bertutup, timbangan analitis, *waterbath*.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Metode Eksperimen

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah kegiatan percobaan untuk melihat hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki (Suryabrata,1992). Tujuan dari penelitian eksperimen adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen (Nazir,1988). Menurut Singarimbun dan Effendi (1983), penelitian eksperimental lebih mudah dilakukan di laboratorium karena alat-alat yang khusus dan lengkap dapat tersedia, dimana pengaruh luar dapat dengan mudah dicegah selama eksperimen. Penelitian dapat dilakukan tanpa atau dengan kelompok pembanding.

Pada dasarnya bakteri dekarboksilase mempunyai kemampuan untuk menguraikan histidin menjadi histamin. Untuk membuktikan bahwa *Bacillus megaterium* (bakteri mangrove) dan *Enterobacter gergoviae* (bakteri limbah pemandangan) benar mempunyai kemampuan mendegradasi histidin menjadi histamin maka perlu dilakukan pengujian. Proses penguraian histidin menjadi

histamin tidak terlepas dari reaksi enzimatik yang sangat dipengaruhi oleh pH. Maksud dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pH pada proses penguraian histidin murni menjadi histamin oleh bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae*. Dan tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah untuk mengetahui diantara bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae*, bakteri manakah yang dapat menguraikan histidin murni paling tinggi.

3.2.2 Variabel Penelitian

Menurut Surachmad (1994), ada dua macam variabel dalam penelitian, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah variabel yang diselidiki pengaruhnya, sedangkan variabel terikat adalah variabel yang diperkirakan akan timbul sebagai pengaruh dari variabel bebas. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah bakteri dan pH pada larutan histidin murni. Sedangkan sebagai variabel terikat adalah jumlah histamin yang dihasilkan dari penguraian histidin murni oleh bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae* pada pH yang berbeda.

3.2.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok Faktorial (RAK Faktorial) dengan 6 perlakuan dan 4 ulangan. Faktor-faktor yang digunakan adalah sebagai berikut :

Faktor 1: Bakteri yang akan digunakan

$B_1 = \textit{Bacillus megaterium}$

$B_2 = \textit{Enterobacter gergoviae}$

Faktor 2: Perbedaan pH

$P_1 = 6$

$P_2 = 7$

$P_3 = 8$

Dari dua faktor tersebut dapat diperoleh kombinasi perlakuan sebagai berikut :

B₁P₁ : Bakteri *Bacillus megaterium* pada larutan histidin pH 6

B₁P₂ : Bakteri *Bacillus megaterium* pada larutan histidin pH 7

B₁P₃ : Bakteri *Bacillus megaterium* pada larutan histidin pH 8

B₂P₁ : Bakteri *Enterobacter gergoviae* pada larutan histidin pH 6

B₂P₂ : Bakteri *Enterobacter gergoviae* pada larutan histidin pH 7

B₂P₃ : Bakteri *Enterobacter gergoviae* pada larutan histidin pH 8

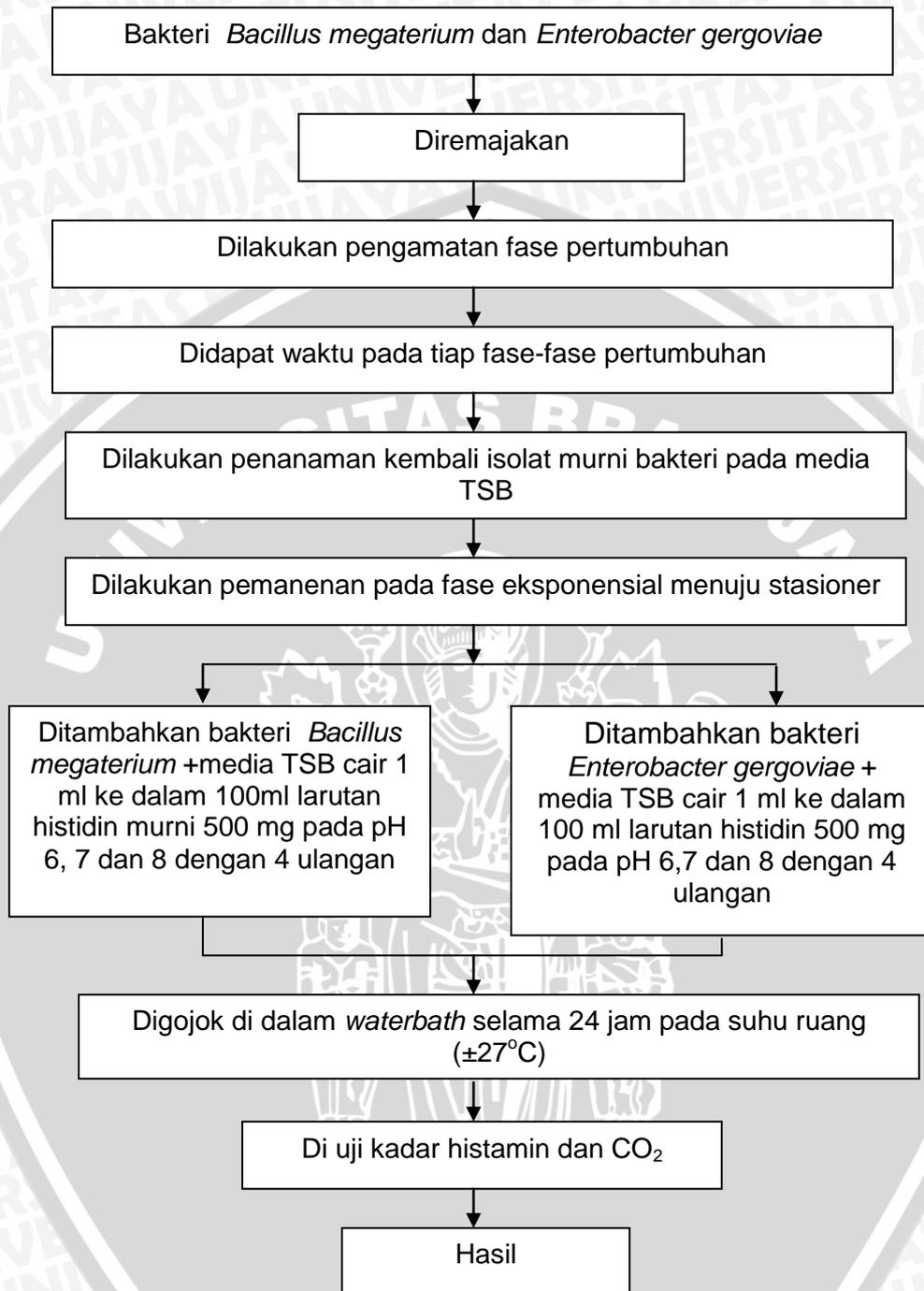
Tabel 2. Rancangan Penelitian

Perlakuan		Ulangan			
Bakteri	pH	1	2	3	4
<i>Bacillus megaterium</i>	6	(B ₁ P ₁)1	(B ₁ P ₁)2	(B ₁ P ₁)3	(B ₁ P ₁)4
	7	(B ₁ P ₂)1	(B ₁ P ₂)2	(B ₁ P ₂)3	(B ₁ P ₂)4
	8	(B ₁ P ₃)1	(B ₁ P ₃)2	(B ₁ P ₃)3	(B ₁ P ₃)4
<i>Enterobacter gergoviae</i>	6	(B ₂ P ₁)1	(B ₂ P ₁)2	(B ₂ P ₁)3	(B ₂ P ₁)4
	7	(B ₂ P ₂)1	(B ₂ P ₂)2	(B ₂ P ₂)3	(B ₂ P ₂)4
	8	(B ₂ P ₃)1	(B ₂ P ₃)2	(B ₂ P ₃)3	(B ₂ P ₃)4

3.3 Prosedur Penelitian

Pada penelitian ini prosedur awal yang dilakukan adalah peremajaan bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae* pada media TSB, melakukan pengamatan fase pertumbuhan bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae*. Selanjutnya penambahan bakteri pada fase eksponensial ke dalam larutan histidin murni 500 mg pada pH yang berbeda dan digojok dalam *waterbath*, dilanjutkan dengan uji histamin secara kuantitatif menggunakan metode Spektrofluorometri dan uji CO₂ menggunakan metode titrasi.

3.3.1 Skema Kerja



Gambar 8. Skema Kerja Penelitian

3.3.2 Pembuatan Media

Media TSA digunakan untuk mengkultur bakteri dari stok sebelum dilakukan peremajaan.

A. Media TSA (Tryptone Soya Agar)

Tabel 3. Komposisi TSA per liter

Formula	Gram per liter
Tryptone	15
Soya Peptone	5
Sodium Chloride	5
Agar	15

Adapun langkah-langkah dalam pembuatan media TSA adalah sebagai berikut :

1. Ditimbang bubuk/powder media TSA sebanyak 40 gr
2. Masukkan erlenmeyer 2 liter
3. Ditambahkan aquadest sedikit-sedikit sambil digoyang sampai 1 liter
4. Dimasukkan dalam waterbath suhu 100 °C selama 15 menit
5. Selama pemanasan di waterbath sesekali erlenmeyer digoyang untuk membantu pelarutan (homogen)
6. Tanda sudah larut sempurna adalah tidak adanya agar yang menempel pada dinding erlenmeyer
7. Media dalam erlenmeyer tersebut disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit
8. Setelah disterilisasi, media didinginkan sampai suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$
9. Media dituangkan pada cawan steril ± 20 ml per cawan petri
10. Jika sudah mengeras media dalam cawan tersebut diinkubasi 37°C selama 24 jam untuk uji sterilitas media
11. Jika melewati uji sterilitas media sudah siap untuk digunakan

B. Media TSB (Tryptone Soya Broth)

Tryptone Soya Broth merupakan media cair yang digunakan dalam penelitian ini pada tahap peremajaan dan pengamatan fase pertumbuhan bakteri.

Bakteri yang didapatkan dari isolat murni dimasukkan kedalam media TSB kemudian dilakukan peremajaan dan pengamatan fase-fase pertumbuhan bakteri sehingga diketahui pada jam ke berapakah bakteri tersebut memasuki fase eksponensial yang nantinya digunakan sebagai waktu pemanenan.

Tabel 4. Komposisi TSB per liter

Formula	Gram per Liter
Pandreatic Digest of Casein	17
Papaic Digest of Soybean Meal	3
Sodium Chloride	5
Dibasic Potassium phosphate	2,5
Dextrose	2,5

Prosedur pembuatan media TSB hampir sama dengan prosedur pembuatan media pada umumnya. Adapun langkah-langkah dalam pembuatan media TSB adalah sebagai berikut :

1. Ditimbang 40 gram bubuk/powder media TSB
2. Masukkan erlenmeyer 1 liter
3. Ditambahkan aquadest sedikit-sedikit sambil digoyang sampai 1 liter
4. Dimasukkan dalam waterbath suhu 100 °C selama 15 menit
5. Selama pemanasan diwaterbath sesekali digoyang erlenmeyer untuk membantu pelarutan (homogen)
6. Jika sudah larut sempurna ditandai dengan tidak adanya agar yang menempel pada dinding erlenmeyer
7. Media dalam erlenmeyer tersebut disterilisasi dalam autoklaf suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit
8. Jika melewati uji sterilitas media sudah siap untuk digunakan.

3.3.3 Peremajaan Bakteri

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari penelitian sebelumnya oleh Lia (2010), mengenai "Identifikasi Bakteri Dari Limbah Cair Pemandangan Di Sungai Boni Desa Mlaten Kecamatan Nguling Kabupaten Pasuruan Jawa Timur" dan bakteri *endogenous* mangrove yang digunakan dalam penelitian sebelumnya oleh Anam (2010), mengenai "Isolasi dan Identifikasi Bakteri Di Perairan Mangrove Pasuruan, Jawa Timur" yang disimpan dan dibiakkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya .

Sebelum melakukan penelitian terlebih dahulu dilakukan sterilisasi alat. Sterilisasi adalah suatu proses penguapan yang digunakan untuk beberapa produk dalam situasi dimana produk-produk tersebut terhindar dari infeksi (Dart, 2003). Karena stabilitas panas dari bakteri yang tidak bisa dihilangkan dengan cara direbus, sterilisasi menggunakan uap panas dilakukan pada suhu dan tekanan yang tinggi di dalam autoklaf. Mesin ini beroperasi pada suhu 121⁰ C dan dapat membunuh mikroba (Nicklin *et al*,1999)

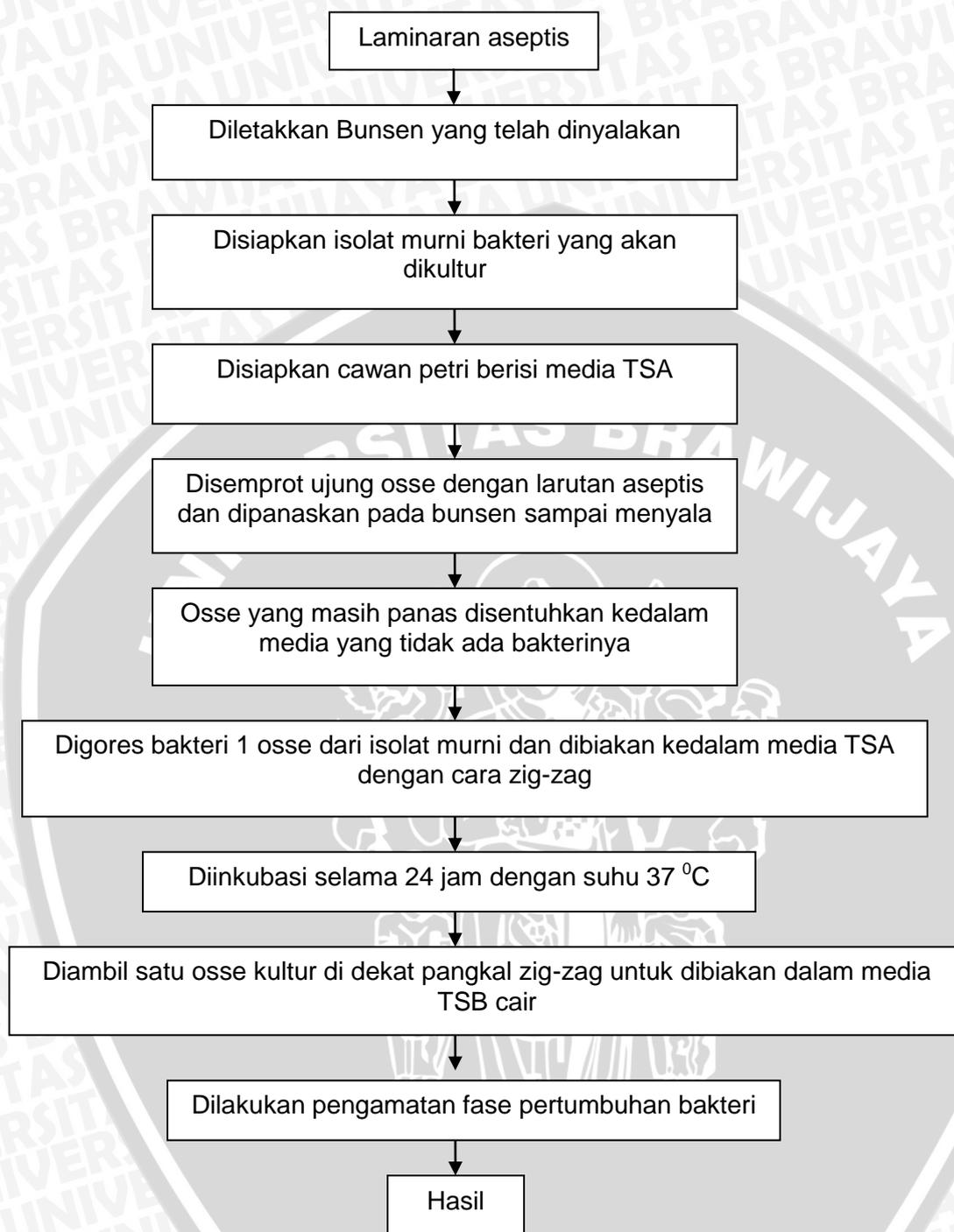
Laminaran yang akan digunakan sebagai tempat pembiakan bakteri disterilkan dengan cara menyemprot bagian dalamnya dengan cairan aseptis (alkohol 70%), kemudian lap semua bagiannya menggunakan serbet makan bersih agar aseptis, ditutup kaca laminaran dan menekan tombol UV untuk menghidupkan sinar UV pada alat yang berfungsi sebagai pensteril laminaran selama 1 malam.

Sinar UV pada laminaran dimatikan setelah 1 malam, dan lampu pada laminaran dinyalakan untuk memudahkan penglihatan pada saat penanaman bakteri. Bagian dalam laminaran disemprot dengan cairan aseptis, kemudian tangan yang telah dipasang sarung tangan disemprot juga agar tidak ada kontaminasi saat penanaman bakteri. Bunsen yang telah dinyalakan diletakkan

kedalam laminaran beserta isolat murni bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae* serta media TSA pada cawan petri untuk kultur bakteri.

Mengkultur bakteri dari isolat murni yang dilakukan pertama adalah osse pada bagian ujungnya disemprot dengan cairan aseptis dan dipanaskan di atas Bunsen sampai osse menyala. Hal tersebut dilakukan untuk menghindari kontaminasi alat pada saat penanaman bakteri. Diambil sampel bakteri yang akan dikultur, dibuka tutup tabung sambil dipanaskan di atas Bunsen untuk menjaga kesterilan/kondisi tetap aseptis. Osse disentuh di media isolat bakteri untuk mengurangi panas dari osse sehingga bakteri yang diambil tidak mati. Langkah selanjutnya yaitu mengambil sebanyak 1 osse bakteri dengan cara menggores isolat dan dibiakkan pada media TSA baru yang telah disiapkan dengan cara digoreskan secara zig-zag dan setiap pangkalnya tidak terputus. Selanjutnya cawan petri yang setengah terbuka dipanaskan didekat bunsen untuk kondisi aseptis. Cawan petri yang telah berisi kultur bakteri selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Setelah 24 jam kultur bakteri diambil dan siap dibiakkan dalam media TSB untuk digunakan dalam pengamatan fase pertumbuhan bakteri. Cara pengambilan koloni murni bakteri dengan cara koloni diambil pada daerah dekat pangkal kultur zig-zag bakteri dengan menggunakan osse yang telah aseptis. Kemudian dimasukkan ke dalam media TSB steril yang telah disiapkan. Langkah pembiakan yang sama juga dilakukan pada isolat murni bakteri yang lain. Prosedur kerja pembiakan bakteri dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Prosedur Kerja Pembiakan Bakteri

3.3.4 Pengamatan Fase-Fase Pertumbuhan Bakteri

Setelah dilakukan peremajaan bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae*. Selanjutnya dilakukan tahap pengamatan fase-fase pertumbuhan bakteri. Menurut Soeksmanto *et al.* (1998), pertumbuhan mikroba adalah meningkatnya jumlah kuantitas massa sel dengan cara terbentuknya sel-sel baru. Terjadinya proses pertumbuhan tergantung dari nutrient yang tersedia di lingkungannya. Pada setiap pertumbuhan bakteri dalam suatu medium terdapat fase-fase atau tahapan pertumbuhan mulai dari fase adaptasi hingga fase kematian.

Pengamatan fase dilakukan untuk mendapatkan bakteri pada kondisi yang potensial sehingga diharapkan dapat bekerja secara optimal dalam penguraian histidin menjadi histamin. Langkah pertama adalah gores satu osse bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae*, dan dibiakkan dalam media TSB di dalam erlenmeyer 250 ml. Selanjutnya di gojok dalam *waterbath* pada suhu 30°C. Setiap 1 jam sekali sampel bakteri diambil dan dihitung kepadatan bakteri dengan menggunakan hemositometer atau metode kamar hitung. Pengamatan dan perhitungan fase bakteri dilakukan selama 1X24 jam dan dihitung setiap satu jam sekali.

Setelah dilakukan pengamatan fase-fase pertumbuhan bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae* maka kita dapat mengetahui pada jam ke berapakah bakteri tersebut memasuki fase eksponensial. Bakteri dipanen pada fase eksponensial. Fase eksponensial dipilih karena pada fase ini merupakan fase pertumbuhan tertinggi dari bakteri itu sendiri. Menurut Nurwantoro *et al* (2003), populasi total bakteri cenderung meningkat seiring dengan pertambahan lama waktu penyimpanan. Hal ini dapat diakibatkan bakteri sedang berada dalam fase eksponensial. Semakin banyak bakteri yang

dihasilkan maka akan semakin banyak pula bioaktif yang dapat dihasilkan dari bakteri tersebut.

Koloni murni yang telah di stok dan dikultur, ditumbuhkan kembali pada medium TSB dan dipanen pada fase eksponensial berdasarkan data yang didapatkan pada pengamatan fase yang telah dilakukan sebelumnya. Pada jam yang menunjukkan fase eksponensial tersebut, media TSB yang telah ditumbuhi bakteri diambil dari dalam inkubator dan siap untuk dimasukkan ke dalam larutan histidin murni 500 mg.

3.3.5 Pembuatan Larutan Histidin Murni

Untuk membuat larutan histidin murni digunakan histidin sebanyak 500 mg yang dilarutkan dengan aquabides hingga 1000 ml. Hal yang pertama kali dilakukan adalah menimbang serbuk histidin sebanyak 500 mg menggunakan timbangan digital. Kemudian serbuk histidin dimasukkan ke dalam *beakerglass* dan ditambahkan aqubidests sampai volume 1000 ml dan dihomogenkan menggunakan *stirer*.

Perlakuan pH pada penelitian ini adalah perlakuan pada pH asam, netral dan basa. Untuk mengkondisikan asam yaitu pH 6 pada larutan histidin murni ditambahkan HCL 0,1 N. Sedangkan untuk kondisi basa yaitu pH 8 ditambahkan NaOH 0,1 N dan untuk pH netral menggunakan pH sebenarnya pada larutan histidin murni, karena pH larutan histidin murni adalah 7. Penghomogenan HCL 0,1 N dan NaOH 0,1 N menggunakan *stirer* dan pH meter untuk mengukur pH yang diinginkan.

Sementara itu, laminaran dan bakteri yang akan ditambah kedalam larutan histidin disiapkan. Laminaran harus dalam keadaan aseptis. Cara mensterilkan laminaran adalah sinar UV pada laminaran dinyalakan selama 1 malam sebelum pemakaian, selanjutnya laminaran disemprot dengan alkohol 70 %, didiamkan kurang lebih 10 menit kemudian dilap menggunakan tisu,

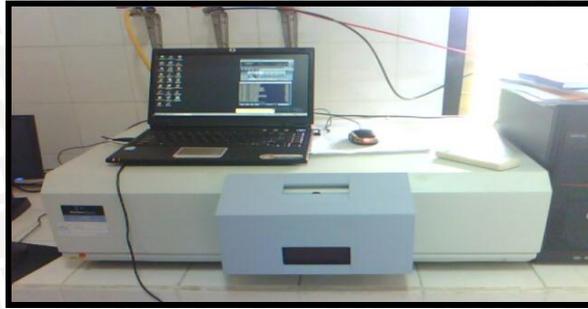
dinyalakan bunsen dan laminaran siap digunakan. Bakteri yang akan digunakan diletakkan diantara es batu untuk menjaga agar bakteri tetap berada pada fase eksponensial. Semua alat dan bahan yang diperlukan dimasukkan ke dalam laminaran.

Larutan histidin sebanyak 100 ml dengan pH 6, 7 dan 8, masing-masing ditambahkan dengan bakteri *Bacillus megaterium* beserta media TSB cair sebanyak 1 ml. Proses yang sama juga dilakukan pada bakteri *Enterobacter gergoviae* dan semua perlakuan dilakukan dengan 4 kali ulangan. Proses pencampuran bakteri ke dalam larutan histidin murni dilakukan di dalam laminaran. Setelah semua proses pencampuran selesai erlenmeyer yang berisi larutan histidin dan bakteri diinkubasi di dalam *waterbath* dengan *shaker*, digojok selama 24 jam dan diamati perubahan yang terjadi selanjutnya dilakukan uji histamin menggunakan metode spektrofotometri dan uji CO₂ dengan metode titrasi.

3.3.6 Pengujian Histamin

Menurut Sudarmadji (1996), metode spektrofotometri adalah suatu metode pengukuran berdasarkan sinar yang berfluoresensi. Fluoresensi adalah gejala dari suatu molekul setelah radiasi cahaya, melepas kembali radiasi tadi dengan panjang gelombang yang lebih panjang. Fluoresensi akan nampak jelas apabila penyerapan sinar pada daerah ultraviolet dan melepaskannya dalam daerah gelombang nampak.

Untuk uji biogenik amin itu sendiri, terutama histamin menggunakan Spektrofotometri. Analisis pengujian histamin secara kuantitatif ini menggunakan metode Spektrofotometri sesuai SNI 2354. 10 tahun 2009. Besarnya *fluoresensi* histamin diukur secara fluorometri pada panjang gelombang eksitasi 350 nm dan emisi 444 nm. Alat spektrofotometri dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Alat Spektrofluorometri

Dalam melakukan uji histamin menggunakan metode spektrofluorometri sesuai dengan standar SNI, 01-2354.10-2009 dilakukan langkah-langkah sebagai berikut :

- **Prosedur Analisis**

- Timbang ± 10 ml sampel dalam beaker glass 250 ml dan tambahkan 50 ml methanol
- Panaskan di atas waterbath selama 15 menit pada suhu 60°C dijaga sampel dalam kondisi tertutup, dinginkan hingga suhu kamar
- Tuangkan sampel ke dalam labu takar 100 ml dan tepatkan hingga volume labu dengan methanol
- Saring menggunakan kertas saring dan filtratnya ditampung dalam botol sampel. Pada tahap ini *filtrate* sampel dapat disimpan dalam refrigerator

- **Persiapan Resin**

- Timbang 3 gr *resin* untuk setiap kolom dalam *beaker glass* 250 ml
- Tambahkan 15 ml NaOH 2 N/gr resin untuk mengubah resin menjadi bentuk OH
- Aduk menggunakan *stirrer-plate* selama 30 menit
- Tuang cairan pada bagian atas dan ulangi penambahan NaOH 2 N dengan jumlah yang sama
- Cuci/bilas *resin* dengan aquades sebanyak 3 kali

- Saring melalui kertas saring No. 588 atau yang setara dan cuci kembali dengan aquades. Siapkan *resin* setiap minggu dan simpan dalam aquades

- **Persiapan Kolom Resin**

- Masukkan *glasswool* ke dalam kolom *resin* setinggi $\pm 1,5$ cm
- Masukkan *resin* dalam medium air ke kolom *resin* setinggi ± 8 cm, pertahankan volume air yang berada di atas *resin* ± 1 cm, jangan dibiarkan kering
- Letakkan labu takar 50 ml yang sudah berisi 5 ml HCl 1 N di bawah kolom *resin* guna menampung *elusi* sampel yang dilewatkan pada kolom *resin*.

- **Pemurnian Sampel**

- Pipet 1 ml *filtrate* contoh , masukkan dalam kolom *resin*, kran kolom *resin* dalam posisi terbuka biarkan aliran menetes (hasil elusi) ditampung dalam labu takar 50 ml
- Tambahkan aquades pada saat tinggi cairan ± 1 cm di atas *resin* dan biarkan cairan terelusi. Lakukan seterusnya hingga hasil elusi dalam labu takar tepat 50 ml. Hasil elusi (contoh) dapat disimpan dalam refrigerator

- **Pembentukan Senyawa Turunan (derivatisasi)**

- Siapkan tabung reaksi 50ml masing-masing untuk contoh, standar dan blanko.
- Pipet masing-masing 5 ml *filtrate* contoh, larutan standar kerja dan *blanko* (HCl 0,1 N)
- Tambahkan ke dalam tabung reaksi diatas berturut-turut :
 - 10 ml HCl 0,1 N, kocok
 - 3 ml NaOH 1 N, kocok, dalam waktu 5 menit harus sudah ditambah 1 ml OPT (orto-ftalatdikarboksilaldehid) 0,1% kocok dan biarkan selama 4 menit

- 3 ml H₃PO₄ 3,57 N, kocok

- Lakukan pengukuran *fluorescence* terhadap sampel, standar dan blanko sesegera mungkin dengan alat spectrofluorometer pada panjang gelombang excitation : 350 nm dan emisi : 444 nm dalam jangka waktu 90 menit.

- **Perhitungan**

- Masukkan harga konsentrasi dan fluoresensi dan larutan standar kerja ke dalam program linier kalkulator. Nilai : koefisien korelasi *regresi* (r), *slope* (b) dari intersep (a) digunakan untuk menghitung konsentrasi sampel. Masukkan harga fluoresensi sampel ke dalam persamaan regresi standar :

$$y = a + bx$$

keterangan :

y = fluoresensi sampel;

a = intersep;

b = *slope*;

x = konsentrasi sampel yang akan dihitung

- Setelah didapat harga x, kalikan dengan faktor pengenceran dan kembalikan ke berat sampel. Nyatakan kandungan histamine dalam (µg/ml) atau mg/l sampel.

- Konsentrasi histamine (µg/ml) sampel = A x $\frac{\text{(volume akhir (ml) x fp)}}{\text{volume sampel}}$

Keterangan :

A = konsentrasi (X) yang akan didapat dalam perhitungan (µg/ml)

3.3.7 Pengujian CO₂

Karbon dioksida adalah komponen udara yang umum terdapat baik di air maupun di udara. Gas ini dapat dihasilkan oleh proses respirasi maupun proses penguraian bahan organik (Afianto dan Liviawaty, 1993).

Menurut Hariyadi, *et al* (1992) prosedur pengukuran CO₂ adalah sebagai berikut :

1. Mengusahakan pengambilan air contoh sedemikian rupa sehingga terhindar kontak antara air contoh dengan udara. Analisa harus dilakukan segera, yaitu dalam waktu 2 – 3 jam setelah pengambilan contoh.
2. Memasukkan 25 ml air sampel ke dalam erlenmeyer dengan hati-hati, sedapat mungkin kurangi pengaruh aerasi.
3. Menambahkan 3 – 4 tetes indikator PP, jika berwarna pink berarti tidak ada CO₂, jika tidak berwarna pink berarti ada CO₂ dan dilanjutkan ke prosedur 4.
4. Menitrasi segera dengan natrium karbonat (Na₂CO₃) 0,0454 N sampai berwarna pink yang stabil selama 30 detik. Catat titran yang digunakan.
5. Menghitung kandungan CO₂ bebas dengan rumus :

$$\text{CO}_2 \text{ (mg/l)} = \frac{\text{ml titran} \times \text{N titran} \times 44,2 \times 1000}{\text{Volume sampel}}$$

3.4 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil pengujian kadar histamin dan CO₂ dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA) dengan selang kepercayaan 95%. Jika analisis ragam menunjukkan pengaruh nyata pada faktor-faktor perlakuan maka akan dilanjutkan dengan uji BNT.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Fase Pertumbuhan Bakteri

Menurut Fardiaz (1992), pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai pertambahan secara teratur semua komponen di dalam sel hidup. Pada organisme multiseluler, yang disebut pertumbuhan adalah peningkatan jumlah sel perorganisme, dimana ukuran sel juga menjadi lebih besar. Pada organisme uniseluler (bersel tunggal) pertumbuhan adalah pertambahan jumlah sel.

Menurut Purnomo (2004), Pertumbuhan mikroorganisme dimulai dari awal pertumbuhan sampai dengan berakhirnya aktivitas merupakan proses bertahap yang dapat digambarkan sebagai kurve pertumbuhan. Kurve pertumbuhan umumnya terdiri atas 7 fase pertumbuhan, tetapi yang utama hanya 4 fase yaitu : lag, eksponensial, stasioner, dan kematian. Kurve pertumbuhan yang lengkap merupakan gambaran pertumbuhan secara bertahap (fase) sejak awal pertumbuhan sampai dengan terhenti mengadakan kegiatan.

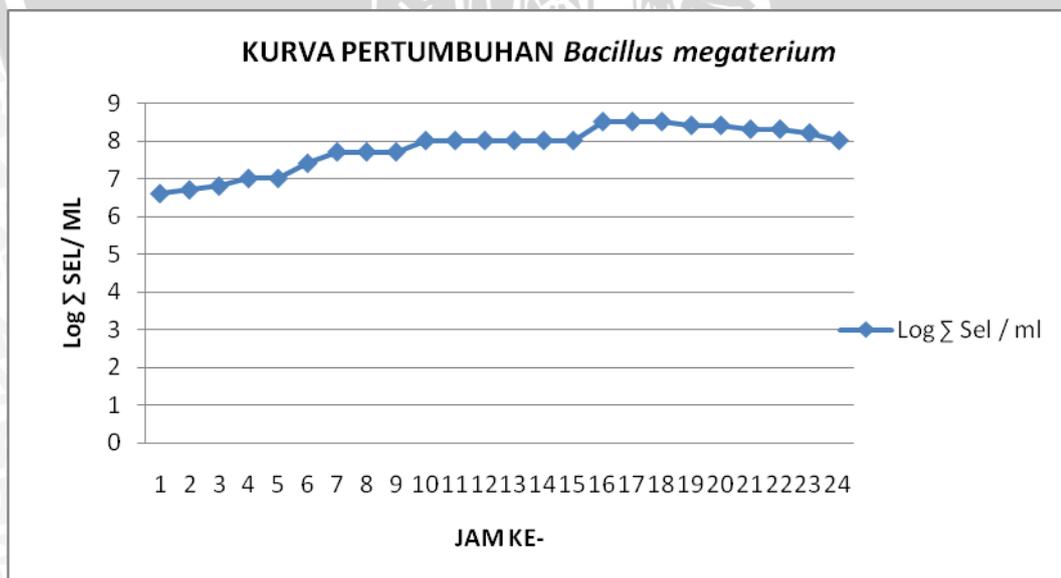
Pengamatan fase-fase pertumbuhan bakteri dilakukan untuk mengetahui pada jam ke berapa akan terjadi fase eksponensial dimana bakteri akan dipanen sebagai sampel bakteri yang akan digunakan untuk menguraikan larutan histidin murni. Pengamatan fase dilakukan untuk mendapatkan bakteri pada kondisi yang potensial sehingga diharapkan dapat bekerja secara optimal dalam penguraian histidin menjadi histamin. Menurut Nurwantoro *et al* (2003), populasi total bakteri cenderung meningkat seiring dengan pertambahan lama waktu penyimpanan. Hal ini dapat diakibatkan bakteri sedang berada dalam fase eksponensial. Semakin banyak bakteri yang dihasilkan maka akan semakin banyak pula bioaktif yang dapat dipanen dari bakteri tersebut.

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Bacillus megaterium* dan bakteri *Enterobacter gergoviae*. Metode yang digunakan dalam

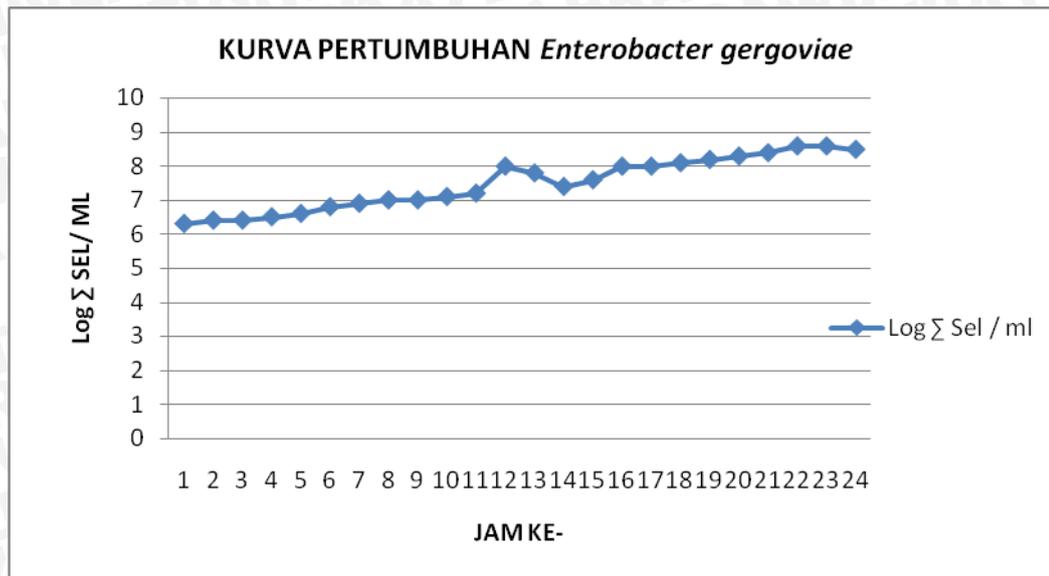
pengamatan fase-fase bakteri adalah metode hemositometer atau metode kamar hitung. Dari hasil pengamatan didapatkan bakteri *Bacillus megaterium* mengalami fase eksponensial pada jam ke-16. Sedangkan bakteri *Enterobacter gergoviae* mengalami fase eksponensial pada jam ke-22. Bakteri gram positif seperti *Bacillus megaterium* akan lebih cepat mengalami fase eksponensial dibandingkan dengan bakteri gram negatif seperti *Enterobacter gergoviae*.

Menurut Purnomo (2004), Pada kenyataannya bahwa gambaran kurva pertumbuhan mikroorganisme tidak linear seperti teori jika faktor-faktor lingkungan yang menyertainya tidak memenuhi persyaratan. Beberapa penyimpangan yang sering terjadi, misalnya : fase lag yang terlalu lama karena faktor lingkungan kurang mendukung, tanpa fase lag karena pemindahan ke lingkungan yang identik, fase eksponensial berulang-ulang karena medium kultur kontinyu, dan lain sebagainya.

Tabel hasil pengamatan fase bakteri dapat dilihat pada lampiran 1. Berikut adalah kurva hasil pengamatan fase bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae* :



Gambar 11. Kurva Pertumbuhan Bakteri *Bacillus megaterium*



Gambar 12. Kurva Pertumbuhan Bakteri *Enterobacter gergoviae*

4.2 Hasil Penelitian

Hasil pengamatan dari penelitian yang berjudul “Aplikasi *in-vitro* Bakteri Mangrove (*Bacillus megaterium*) dan Bakteri Limbah Pemandangan (*Enterobacter gergoviae*) pada Penguraian Histidin Murni Menjadi Histamin dengan pH yang Berbeda” adalah seperti yang tertera pada tabel dibawah ini . Adapun analisa yang dilakukan adalah perhitungan kadar histamin yang terbentuk dengan menggunakan metode spektrofourometri dan penghitungan kadar CO₂ menggunakan metode titrasi.

Spektrofluorometri adalah metode analisis kimia kuantitatif yang berdasarkan *flourecence*. *Flourecence* dan *phosporecence* adalah bagian dari *photoluminence*, yaitu tipe spektroskopi optik dimana sebuah molekul tereksitasi dengan mengabsorpsi ultraviolet, sinar tampak dan radiasi inframerah dekat. Molekul tereksitasi akan kembali kepada keadaan dasar atau ke tingkat eksitasi lebih rendah, dengan mengemisikan sinar. Sinar yang diemisikan inilah yang akan diukur (Widodo, 2010).

Tabel 5. Hasil uji histamin dari pengurian histidin murni 500 mg oleh bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae*

Perlakuan		Ulangan				Total	Rata-rata (mg/l)
Bakteri	pH	1	2	3	4		
<i>Bacillus megaterium</i>	6	6,64	5,08	3,27	8,11	23,1	5,77
	7	1,10	0,78	1,20	1,14	4,22	1,05
	8	9,64	6,86	9,25	7,64	33,39	8,30
<i>Enterobacter gergoviae</i>	6	14,02	12,94	12,17	15,57	54,7	13,67
	7	2,44	2,95	1,45	1,93	8,77	2,19
	8	4,13	3,89	1,97	2,31	12,3	3,07
Total		37,97	32,5	29,31	36,7	136,48	

Tabel 6. Hasil uji CO₂ dari penguraian histidin murni 500 mg oleh bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae*

Perlakuan		Ulangan				Total	Rata-rata (mg/l)
Bakteri	pH	1	2	3	4		
<i>Bacillus megaterium</i>	6	9,98	13,62	13,62	14,98	52,2	13,05
	7	12,48	19,02	14,98	13,62	60,1	15,02
	8	14,98	14,98	21,40	19,97	71,33	17,83
<i>Enterobacter gergoviae</i>	6	13,62	11,52	19,97	19,97	65,08	16,27
	7	9,98	20,80	14,98	14,98	60,74	15,18
	8	12,48	14,98	20,80	14,98	63,24	15,81
Total		73,52	94,92	105,75	98,5	372,69	

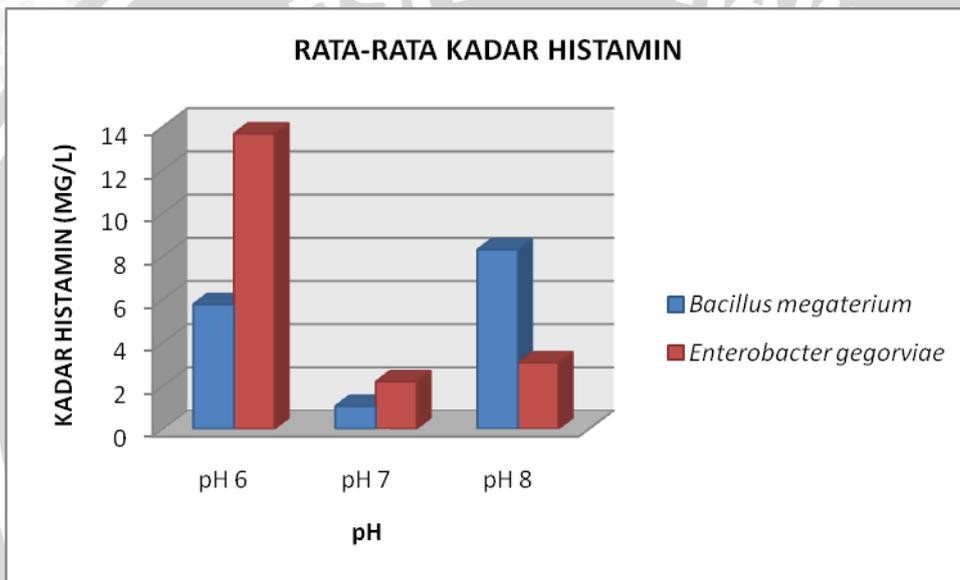
4.3 Pembahasan

4.3.1 Uji Histamin

Pengujian histamin ini berdasarkan SNI (2009) yang dilaksanakan di Laboratorium Pengujian dan Pengawasan Mutu Hasil Perikanan Surabaya.

Pengujian histamin ini menggunakan metode spektrofotometri. Prinsip

pengujian histamin menurut SNI (2009), histamin diekstrak dari jaringan daging contoh menggunakan metanol dan sekaligus mengkonversi histamin ke dalam bentuk OH. Zat-zat histamin selanjutnya dimurnikan melalui resin penukar ion dan diubah ke bentuk derivatnya dengan senyawa OPT (*Ortoptalatdikarbosildehid*). Besarnya fluoresensi histamin diukur secara fluorometri pada panjang gelombang exitasi 350 nm dan emisi 444 nm. Hasil uji histamin dari penguraian histidin murni 500 mg pada pH 6,7 dan 8 oleh bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae* dapat dilihat pada tabel 5.



Gambar 13. Grafik Interaksi Bakteri dan pH terhadap Kadar Histamin
Tabel 7. Notasi BNT 5% Hasil Uji Histamin

Perlakuan		Rata-rata (mg/l)	Lambang perlakuan
Bakteri	pH		
<i>Bacillus megaterium</i>	6	5,77	c
	7	1,05	a
	8	8,3	d
<i>Enterobacter gergoviae</i>	6	13,67	e
	7	2,19	ab
	8	3,07	b
BNT 5%		1,81	

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa F hitung bakteri > F 5 % maka perlakuan bakteri berbeda nyata terhadap kandungan

histamin. Sedangkan F hitung pH dan F hitung interaksi bakteri dan pH > dari F 1% maka perlakuan pH dan interaksi antara bakteri dan pH berbeda sangat nyata terhadap kandungan histamin. Maka perlu dilakukan uji BNT untuk perlakuan interaksi dan kesimpulan dari uji BNT 5 % untuk perlakuan interaksi bakteri dan pH adalah interaksi bakteri *Enterobacter gergoviae* dan pH 6 mempunyai potensi produksi histamin paling tinggi.(Lampiran 3)

Penguraian histidin murni menggunakan bakteri *Enterobacter gergoviae* pada pH 6 menghasilkan histamin paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Rata-rata kadar histamin adalah 13,67 mg/l. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Enterobacter gergoviae* pada pH 6 memiliki aktivitas enzim histidin dekarboksilase paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Sedangkan hasil penguraian histidin oleh bakteri *Bacillus megaterium*, histamin paling tinggi terjadi pada pH 8 yaitu sebesar 8,30 mg/l. Sedangkan untuk perlakuan dengan menambahkan bakteri *Bacillus megaterium* pada larutan histidin pH 6 sebesar 5,77 mg/l, bakteri *Bacillus megaterium* pada larutan histidin pH 7 sebesar 1,05 mg/l dan bakteri *Enterobacter gergoviae* pada larutan histidin pH 7 sebesar 2,19 mg/l, bakteri *Enterobacter gergoviae* pada larutan histidin pH 8 sebesar 3,07 mg/l.

Apabila dilihat dari banyaknya histamin yang dihasilkan pada kondisi pH maka, pada pH 6 menghasilkan total histamin paling tinggi yaitu sebesar 77,8 mg/l dibandingkan pada kondisi pada pH 7 sebesar 12,99 mg/l dan pH 8 sebesar 45,69 mg/l. Menurut Afilal et al (2006), produksi histamin lebih aktif pada pH asam dan pH optimum untuk histidin dekarboksilase antara 2,5 – 6,5 tergantung dari jenis mikroorganismenya.

pH optimum bakteri jenis *Bacillaceae* adalah 7 – 8 (Graumann,2007) sedangkan menurut Ababouch (1992) bakteri pembentuk histamin dari jenis *Enterobacteriaceae* kondisi optimum bagi pertumbuhan bakteri tersebut adalah pH

5 dengan suhu 25°C. Bakteri penghasil histamin pada prinsipnya dapat tumbuh dengan baik pada pH netral. Tetapi mereka juga dapat tumbuh pada pH 4,7-8,1 (Huss, 1994). Selama proses pertumbuhan, bakteri mengeluarkan bioaktif dari hasil metabolisme. Senyawa bioaktif hasil dari metabolisme bakteri *Bacillus megaterium* dan bakteri *Enterobacter gergoviae* salah satunya adalah enzim histidin dekarboksilase karena kedua bakteri tersebut termasuk dalam bakteri dekarboksilase histidin. Menurut Jay (1996), bakteri yang memiliki enzim histidin dekarboksilase atau biasa disebut bakteri penghasil histamin, sebagian besar termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae*. Ditambahkan pula oleh Staruszkiewicz (2002), berbagai jenis bakteri yang mampu menghasilkan enzim histidin dekarboksilase (HDC) termasuk famili *Enterobacteriaceae* dan *Bacillaceae*.

Menurut Lehninger (2004) efek pH pada enzim berkaitan dengan keadaan ionisasi dari sistem yang dikatalisis, termasuk substrat, dan enzim itu sendiri. Perubahan pH dapat mempengaruhi keadaan ionisasi dari asam-asam amino pada sisi aktif enzim sehingga akan mempengaruhi interaksinya dengan molekul substrat. Kadar pH yang terlalu tinggi atau terlalu rendah akan menyebabkan ketidakstabilan pada konformasi enzim sehingga menyebabkan struktur pada enzim rusak. Enzim mempunyai pH optimum yang khas yang akan menyebabkan aktivitas maksimal. Keadaan optimum ini dihubungkan dengan saat gugus pemberi proton atau penerima proton yang aktif pada sisi enzim berada pada kondisi ionisasi yang tepat. Keadaan optimum tidak harus sama dengan pH lingkungannya. Aktivitas enzim dalam sel sebagian diatur oleh pH media kulturnya.

Dari hasil penelitian ini apabila dilihat dari banyaknya histamin yang dihasilkan oleh bakteri maka bakteri *Enterobacter gergoviae* berhasil menguraikan histidin menjadi histamin lebih banyak dibandingkan dengan bakteri *Bacillus megaterium*. Hal ini dapat dilihat dari jumlah kadar histamin yang

dihasilkan oleh penguraian bakteri *Enterobacter gergoviae* yaitu pada pH 6 sebesar 54,7 mg/l, pada pH 7 sebesar 8,77 mg/l dan pada pH 8 sebesar 12,3 mg/l. Sedangkan bakteri *Bacillus megaterium* menghasilkan histamin pada pH 6 sebesar 21,3 mg/l, pada pH 7 sebesar 4,22 mg/l dan 33,39 mg/l pada pH 8. Dari hasil ini apabila dijumlahkan berdasarkan bakteri pengurai maka bakteri *Bacillus megaterium* menghasilkan histamin sebesar 60,71 mg/l. Sedangkan bakteri *Enterobacter gergoviae* menghasilkan histamin sebesar 75,77 mg/l. Hal ini dikarenakan bakteri *Enterobacter gergoviae* yang termasuk famili *Enterobacteriaceae* mampu menghasilkan histamin lebih tinggi. Hal ini sesuai dengan pendapat Keer *et al* (2002) jenis bakteri yang mampu memproduksi histamin dari histidin dalam jumlah tinggi yaitu *Proteus morganii*, *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium perfringens*. Ditambahkan oleh Mangunwardoyo *et al* (2007), *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter intermedium*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Morganella morganii*. *Morganella morganii* merupakan bakteri yang sering digunakan dalam penelitian mengenai histamin dan enzim HDC.

Menurut Kusmarwati (2008), diketahui banyak jenis bakteri yang mampu menghasilkan histidin dekarboksilase, enzim yang mengubah histidin menjadi histamin, seperti *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumonii*, *Clostridium perfringens*, *Lactobacillus spp.*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella spp.*, *Aeromonas spp.*, *Eschericia spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Photobacterium spp.*, dan *Vibrio spp.* Bakteri-bakteri tersebut umumnya termasuk dalam kelompok *Enterobacteriaceae*.

Sedangkan menurut Huss (1994), bakteri penghasil histamin termasuk pada golongan *Enterobacteriaceae*, beberapa *vibrio sp*, *Clostridium* dan *Lactobacillus sp*. Penghasil histamin paling banyak adalah *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Hafina alvei*. Bakteri dari famili *Enterobacteriaceae*

lebih sering digunakan dalam penelitian mengenai enzim HDC maka dalam penelitian ini bakteri *Enterobacter gergoviae* terbukti mampu mengurai histidin lebih besar dibanding bakteri *Bacillus megaterium*.

Enzim histidin dekarbosilase tetap aktif walaupun bakteri penghasilnya telah mati. Menurut Pramono *et al.* (2007), Kandungan bioamin yang dihitung sebagai histamin cukup tinggi, diduga karena oleh beberapa sebab; pertama aktivitas dekarbosilasi histidin menjadi histamin dilakukan oleh enzim histidin dekarbosilase, sehingga walaupun bakteri pembentuk histamin sudah mati tetapi aktivitas enzim histidin dekarbosilase masih tetap berlangsung, kedua akibat akumulasi jumlah bioamin yang dihitung sebagai histamin selama proses fermentasi karena bioamin bersifat stabil dari berbagai perubahan.

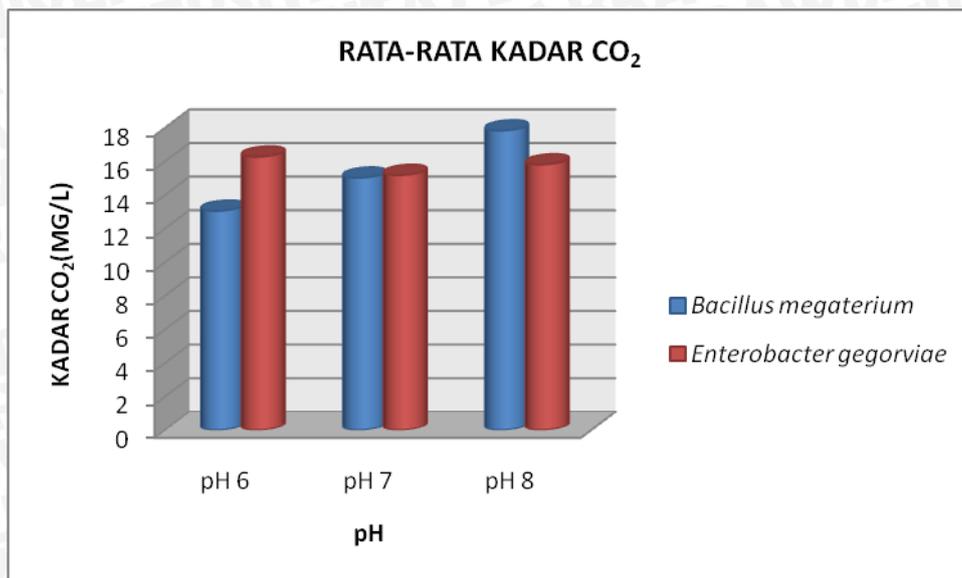
4.3.2 Uji Total CO₂

Karbon dioksida adalah komponen udara yang umum terdapat baik di air maupun di udara. Gas ini dapat dihasilkan oleh proses respirasi maupun proses penguraian bahan organik (Afianto dan Liviawaty, 1993).

Pengujian total CO₂ dilakukan dengan menggunakan metode titrasi dengan menambahkan indikator pp pada sampel sebanyak 20-30 ml, jika berwarna pink menandakan tidak ada CO₂, jika tidak berwarna pink berarti ada CO₂. Apabila tidak berwarna pink maka dilanjutkan dengan titrasi menggunakan natrium karbonat (Na₂CO₃) 0,0454 N sampai warna pink yang stabil selama 30 detik. Dicatat ml titran dan dihitung dengan rumus :

$$\text{CO}_2 \text{ (mg/l)} = \frac{\text{ml titran} \times \text{N titran} \times 44/2 \times 1000}{\text{Volume sampel}}$$

Dari hasil Pengujian total CO₂ terlarut semua perlakuan menghasilkan CO₂. Hasil dari uji total CO₂ terlarut dapat dilihat pada tabel 6.



Gambar 14. Grafik Interaksi Bakteri dan pH terhadap Total CO₂

Grafik di atas menunjukkan bahwa pada penguraian histidin murni 500 mg dengan perlakuan Bakteri *Bacillus megaterium* pada larutan histidin pH 8 menghasilkan rata-rata total CO₂ sebesar 17,83 mg/l. Nilai tersebut paling tinggi diantara nilai rata-rata perlakuan yang lain.

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa F hitung bakteri, F hitung pH dan F hitung interaksi semua < F 5% . Interaksi pH dan bakteri yang berbeda pada penguraian histidin murni 500 mg tidak memberikan pengaruh pada hasil uji CO₂ terlarut. (Lampiran 3)

Reaksi kimia yang terjadi dari penguraian histidin murni adalah sebagai berikut :



Dari reaksi diatas berarti terdapat 1 mol C₆H₉N₃O₂ (histidin), 1 mol C₅H₉N₃ (histamin) dan 1 mol CO₂ (karbondioksida). Maka dalam reaksi ini terdapat 155 gram C₆H₉N₃O₂, 111 gram C₅H₉N₃ dan 44 gram CO₂. Dalam penelitian ini massa histidin (C₆H₉N₃O₂) sebesar 500 mg, maka berdasarkan hitungan reaksi kimia didapat massa C₅H₉N₃ sebesar 358 mg dan CO₂ sebesar 142 mg (lampiran 4).

Tetapi pada kenyataannya hasil pengujian dari histamin dan karbondioksida menunjukkan hasil yang lebih kecil, hal ini dikarenakan beberapa faktor diantaranya adalah lama waktu penguraian histidin oleh bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae* yang hanya berlangsung selama 24 jam pada suhu ruang yaitu pada suhu 22°C- 27°C. Oleh sebab itu maka, aktivitas enzim histidin dekarboksilase tidak maksimal. Menurut Kim *et al* (2004), aktivitas bakteri dan pembentukan histamin dipengaruhi oleh suhu dan waktu inkubasi. Bakteri akan membentuk histamin > 25 ppm setelah diinkubasi pada temperatur 30 °C selama > 48 jam. Faktor selanjutnya mengenai sifat karbondioksida yang mudah menguap. Sehingga selama proses pengujian karbondioksida ketika terjadi kontak dengan udara bebas menyebabkan sebagian karbondioksida menguap.

Pada suatu reaksi kimia, ada reaksi yang hasilnya hampir sama dengan hasil teoritis dan reaksi tersebut dikatakan bereaksi secara kuantitatif. Pada reaksi-reaksi senyawa organik, kebanyakan hasil reaksi yang nyata lebih kecil dibandingkan hasil teoritis. Hal ini karena reaksi tidak berjalan secara sempurna, ada reaksi-reaksi saingan yang dapat mengurangi hasil reaksi atau dapat juga terjadi kehilangan zat selama penanganan (Elida,1994).

5. PENUTUP

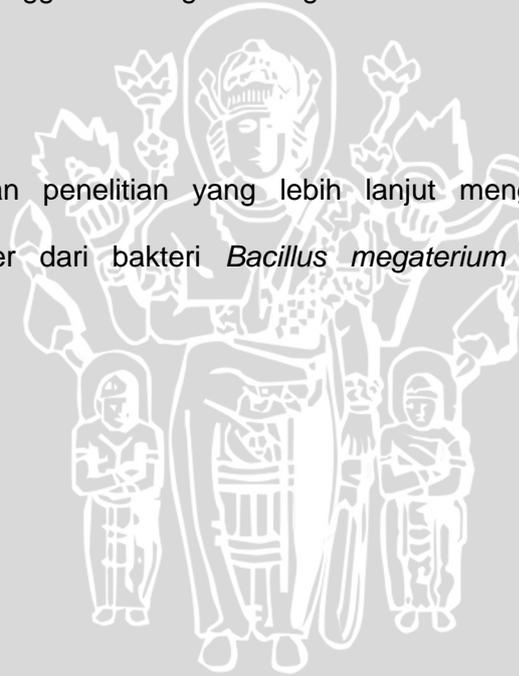
5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Perlakuan pH yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap kadar histamin yang dihasilkan dari penguraian histidin murni oleh bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae*.
2. Dari jumlah histamin yang dihasilkan dari penguraian histidin murni menunjukkan bahwa bakteri *Enterobacter gergoviae* dapat menghasilkan histamin lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri *Bacillus megaterium*.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian yang lebih lanjut mengenai karakteristik metabolit ekstraseluler dari bakteri *Bacillus megaterium* dan *Enterobacter gergoviae* .



DAFTAR PUSTAKA

- Ababouch, L, Afilal, M.E, Rhafiri, S Busta, FF. 1992. **Identification Of histamine-producing bacteria isolated from sardine (*Scomber pilchards*) stored in ice & ambient temperature.**J.Microbiol. 8(2):127-136.
- Afilal, M.A., Daoudi, H. Jdaini, S., Asehraou., dan Bouali, A. 2006. **Study of The Histamine Production in a Red Flesh Fish (*Sardina pilchardus*) and a White Flesh Fish (*Dicentrarchus punctatus*).** J. of Fish And Aquatic Science 6.
- Afrianto, E dan E, Liviawaty 1993. **Teknik Pembuatan Tambak Udang .** Kanisius. Yogyakarta
- Dart, R.K. 2003. **Microbiology For The Analytical Chemist.** Loughborough University.
- Elida, T.S. 1994. **Pengantar Kimia.** Gunadarma. Jakarta
- Fardiaz, S. 1992. **Mikrobiologi Pangan.** Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Graumann P. 2007. **Bacillus: Cellular and Molecular Biology.** Norfolk, UK: Caister Academic Press
- Hariyadi, S,I. N.N. suryadiputra dan B. Widigdo. 1993. **Limnologi Metode Kualitas Air.** IPB. Bogor.
- Huss.HH. 1994. Assurance Of Seafood Quality. Technological Laboratory. Ministry Of Agriculture And Fisheries. Denmark. FAO Corporate Document Repository.
- Jay, W.C. 1996. **Modern Food Microbiology. 4th.ed.** International Thompson Publishing.
- Kanki.M, Yoda.T, Tsukamoto.T, Shibata.T.2002. ***Klebsilla pneumoniae* produces no histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* strains are histamine producers.** Applied and Environmental mycobiology
- Karovicova, J and Z. Kohajdova, 2003. **Biogenic Amine in Food.** Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology.
- Keer, M. Lawicki, P. Aguirre, S. And Rayner, C. 2002. **Effect of Storage Condition on Histamine Formation in Fresh and Canned Tuna.** State Chemistry Laboratory, Werrbee. Victorian Government Departement of Human Service. www.foodsafety.vic.gov.au.
- Kim SH, Eun JB, Chan TY, Wei CI, Clemens RA, An H. 2004. **Evaluation of histamine and other biogenic amines and bacterial isolation in canned anchovies recalled by the USFDA.** *Journal of Food Science.* 69: M157-M162.

- Kimata, M. 1961. **The histamine problem**. In G. Borgstrom (editor), Fish as food. Vol. I Pro-duction, biochemistry, and microbiology, p. 329-352. Acad. Press, N.Y.
- Ko I.S. 2006. **Factors Affectings Histamine Level In Indonesian Canned Albacore Tuna (*Thunnus alalunga*)**. Thesis. Departement of Marine Biotechnology. University Of Tromso. Norway
- Krieg, N. R. 1989. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1**. Williams & Wilkins Baltimore. London.
- Kungvankij, P.; Tiro, L. B.; Pudadera, B. J.; Potestas, I. O.; Corre, K. G.; Borlongan, E.; Talean, G. A.; Bustilo, L. F.; Tech, E. T.; Unggui, A.; Chua, T. E. 1985. **Shrimp hatchery design, operation and management – Training manual**. FAO Corporate Document Repository. Fisheries and Aquaculture Department. Network of Aquaculture Centres in Asia. Bangkok. Thailand.
- Kusmarwati, A. dan Ninoek, I. 2008 . **Daya Hambat Ekstrak Bahan Aktif Biji Picung (*Pangium edule Reinw*)**. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Vol.3.
- Lehninger AL. 2004. **Principles of Biochemistry 4rd Edition**. Amhrest: Elsevier Science.
- Mackay, D and Shepherd, D. M.1960. **A Study of Potential Histidine Decarboxylase Inhibitors**. Department of Pharmacology and Therapeutics, University of Saint. Andrews, Queen's College, Dundee.
- Mangunwardoyo.W, Sophia.R.A, dan Heruwati, E.S. 2007. **Seleksi dan Pengujian Aktivitas Enzim *L-Histidine Decarboxylase* dari Bakteri Pembentuk Histamin**. Makara, Sains, Vol 11, No. 2
- Munoz. R. 2008. **Bacterial Biogenic Amine Production**. Spanish Research Council (CSIC) - Instituto de Fermentaciones Industriales. <http://www.scitopics.com>. Diakses tanggal 15 Juli 2010.
- Nazir, M. 1989. **Metode Penelitian**. PT. Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Nicklin, Y. K., Gloema, C and T. Fogel. 1999. **Microbiology**. Blog Scientist Publisher.
- Noviarty. 2007. **Kalibrasi Alat Spektrofluorometer Luminesen Ls-5b Menggunakan Bahan Standar Ovalen**. Pusat Teknologi Bahan Bakar Nuklir, BATAN. Tangerang
- Nursanti dan Madjid, A. 2009. **Dasar-dasar Ilmu Tanah**. http://dasar2ilmutanah.blogspot.com/2009_05_24_archive.html. Diakses pada Tanggal 22 Oktober 2011.

- Nurwantoro, Prastiwi, WD., Achmadi, J. 2003. **Populasi Mikrobialisa Susu pada Peralatan Unit Pendingin Susu Akibat Lama Penyimpanan dan Aras Penambahan Dedak Padi**. Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro, Semarang
- Pelczar, M.J dan Chan, E.C.S. 2009. **Dasar-dasar Mikrobiologi 2**. Penerjemah Hadioetomo, R.S; Imas, T;Tjotrosomo, S.S; Angka, S.L. Penerbit Universitas Indonesia (UI Press). Jakarta.
- Perkin; Elmer. 1981. **Operator's Manual Luminescence Spectrometer LS-5**. Beaconsfield, Bucking-hamshire. England.
- Pharmacy Education. 2010. **Perbedaan In Vivo, In Vitro dan Ex vivo**. perbedaan-in-vivo-in-vitro-dan-ex-vivo.html
- Pramono, Y.B, Rahayu, E.S, Suparmo dan T. Utami. 2007. **Perubahan Mikrobiologis, Fisik, Dan Kimiawi Cairan Bakal Petis Daging Selama Fermentasi Kering Spontan**. Universitas Diponegoro. Semarang dan Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta
- Poedjiadi, Anna dan F.M. Titin Sufriyanti. 2006. **Dasar-Dasar Biokimia**. UI Press. Jakarta
- Purnomo. B. 2004. **Bahan Kuliah Dasar-dasar Mikrobiologi**. Laboratorium Penyakit Tumbuhan. Fakultas Pertanian. Universitas Bengkulu. Bengkulu.
- Purves, D., David, F.S, Mark, W., James, O.M, George, J.A, Lawrence, C.K, Anthony, S.L. 2001. **Neuro Science 2nd ed**. Sinauer Associates.
- Putro, S. 2002. **Handling And Processing of Tuna For Sashimi and Fresh/Chilled Products**. 3rd reprint. Infofish Technical Handbook Series.
- Rodwell, V. W; Robert, K. M; Peter, A. M; dan Daryl, K. G. 2003. **Biokimia Harper**. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Sander, J.E. 1996. **Development of Biogenic Amine During Fermentation of Poultry Carcasses**. Department of Avian Medicine, College of Veterinary Medicine, The University of Georgia, Athens, GA 30602-4875.
- Sastrosupadi. A. 2000. **Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian**. Kanisius. Yogyakarta.
- Sims, G. G, G. Farn and R. K. York. 1992. **Quality Indices for Canned Skipjack Tuna : Correlation of Sensory Attributes with Chemical Indices**. Journal of Food Science 57 (5).
- Singarimbun, M. dan Effendi, S. 1989. **Metode Penelitian Survei**. Edisi Revisi. LP3ES. Jakarta.

- [SNI] Standard Nasional Indonesia. 2009. SNI: 10-2354-2009. **Pengujian Kimia Produk Perikanan dan Penentuan Kadar Histamin**. Badan Standardisasi Nasional. Jakarta
- Soeksmanto., D. Tisnadjaja, M.A. Subroto. 1998. **Penelitian Produk/Teknik Produksi Bioremediasi Limbah Pesticida dengan Mikroba Indigen**. Institut Teknologi Bandung (ITB). Bandung.
- Sudarmadji, S., 1996, **Teknik Analisa Biokimia**. Liberty. Yogyakarta
- Sumner J, Ross T, Ababouch L. 2004. **Application of Risk Assessment in the Fish Industry**. Roma: Food and Agriculture Organization of The United. Nation.
- Sunarya, Yayan. (2003). **Kimia Dasar 2 Berdasarkan Prinsip-Prinsip Kimia Terkini (edisi kedua)**. Alkemi Grafisindo Press. Bandung.
- Surakhmad, W. 1989. **Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar**. Tarsito. Bandung.
- Suryabrata, S. 1992. **Metodologi Penelitian**. CV Rajawali. Jakarta
- Staruszkiewicz, W. 2002. **Seafood HACCP alliance update session: "Scombrotoxins" : Scientific Status. 2002. Proceedings of the 26th Annual Seafood Science and Technology Society of the Americas Meeting**. October 9-11, Orlando, Fl. Florida Sea Grant Program, <http://www.sst.ifas.ufl.edu>
- Taylor, S. L dan Behling, A. R. 1982. **Bacterial Histamine Production as a Function of Temperature and Time of Incubation**. Journal of Food Science, Volume 4.
- Widodo. W. E. 2010. **Spektrofluorometri untuk Mengukur Kadar Kinin Sulfat**. <http://wordpress.com>. Diakses tanggal 03 Desember 2011
- Wikipedia. 2010^a. **Histidin** . <http://id.wikipedia.org/wiki/histidin>. Diakses pada tanggal 22 Agustus 2011.
- _____. 2010^b. **In Vitro**. <http://id.wikipedia.org/wiki/invitro> Diakses pada Tanggal 14 Desember 2010.
- _____. 2010^c. **Bakteri Bacillus meganterium**. [http://id.wikipedia.org/wiki/Bakteri Bacillus meganterium](http://id.wikipedia.org/wiki/Bakteri_Bacillus_meganterium). Diakses pada Tanggal 14 Desember 2010.
- _____. 2010^d. **Bakteri Enterobacter gergoviae**. [http://id.wikipedia.org/wiki/Bakteri Enterobacter gergoviae](http://id.wikipedia.org/wiki/Bakteri_Enterobacter_gergoviae). Diakses pada Tanggal 14 Desember 2010.
- _____. 2011. **Histidin Dekarboksilase**. [http://id.wikipedia.org/wiki/histidin decarboxylase](http://id.wikipedia.org/wiki/histidin_decarboxylase). diakses pada tanggal 12 Agustud 20011.

Zipcodezoo. 2011^a. ***Bacillus megaterium***.http://www.zipcodezoo.com/Bacteria/B/Bacillus_megaterium/. Diakses pada tanggal 14 Desember 2011 pukul 14.23 WIB

_____. 2011^b. ***Enterobacter gergoviae***.http://www.zipcodezoo.com/Bacteria/E/Enterobacter_gergoviae/. Diakses pada tanggal 14 Desember 2011 pukul 14.23 WIB



LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Foto Prosedur Penelitian

- Pembuatan Media



A



B



C

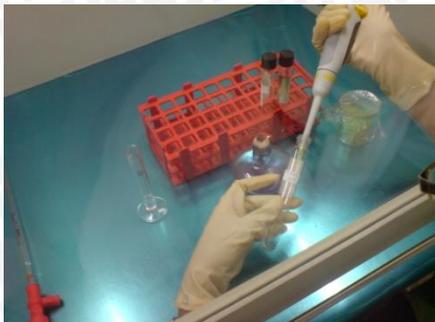


D

Keterangan :

- A : Penimbangan media
- B : Dilarutkan dalam aquades
- C : Dimasukkan dalm tabung reaksi
- D : Disterilisasi dengan autoklaf

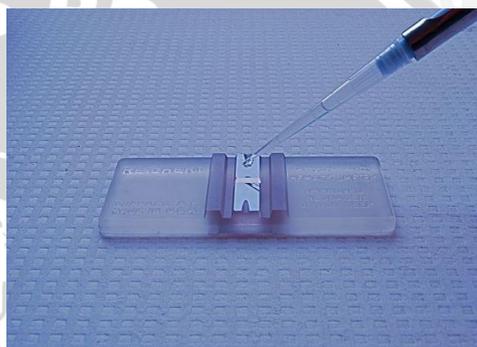
- Peremajaan Bakteri



- Pengamatan Fase Bakteri



Inkubasi bakteri



Hemositometer

- Pembuatan Larutan Histidin Murni 500 mg



A



B



C

Keterangan :

A : Penimbangan histidin murni

B : Melarutkan histidin murni ke dalam aquabidest

C : Penentuan pH larutan histidin

- Penggojokan histidin + bakteri dalam waterbath shaker



Waterbath shaker



Freezer untuk penyimpanan sementara sampel sebelum dilakukan uji histamin

- Pengujian Histamin



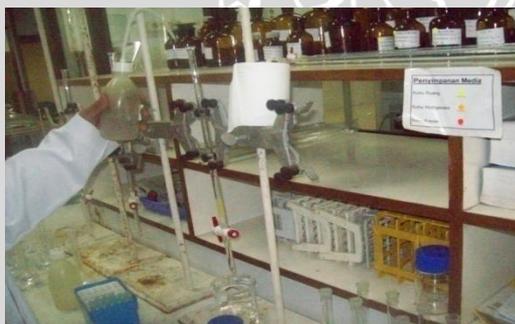
Spektrofluorometer



Resin penukar ion



Glass wool

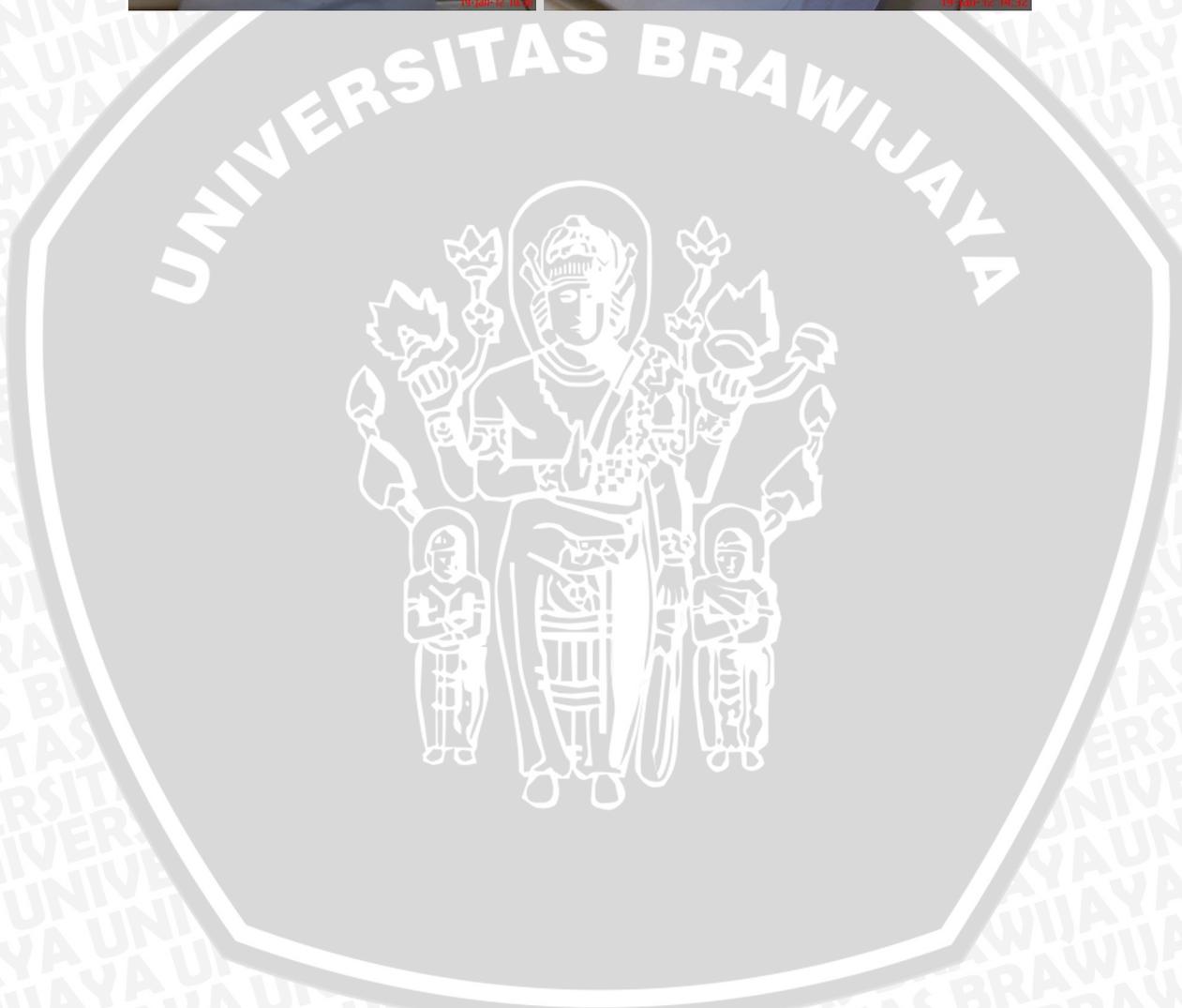


Tahap pemurnian



Tahap pembentukan

- Pengujian CO₂ terlarut



Lampiran 2: Tabel Hasil Pengamatan Fase Pertumbuhan Bakteri1. Tabel pengamatan fase pertumbuhan bakteri *Bacillus megaterium*

JAM KE	X1	X2	RATA2	Σ Sel / ml	Log Σ Sel / ml
1	385	396	390,5	$3,9 \cdot 10^6$	6,6
2	469	482	475,5	$4,8 \cdot 10^6$	6,7
3	599	616	607,5	$6,1 \cdot 10^6$	6,8
4	798	899	848,5	$8,5 \cdot 10^6$	7
5	1040	1037	1038,5	$1,0 \cdot 10^7$	7
6	2640	2850	2745	$2,7 \cdot 10^7$	7,4
7	4270	4690	4480	$4,5 \cdot 10^7$	7,7
8	4480	4740	4610	$4,6 \cdot 10^7$	7,7
9	6240	5030	5635	$5,6 \cdot 10^7$	7,7
10	8350	8880	8615	$8,6 \cdot 10^7$	8
11	9580	9940	9760	$9,8 \cdot 10^7$	8
12	9760	8920	9340	$9,3 \cdot 10^7$	8
13	10740	11770	11255	$1,1 \cdot 10^8$	8
14	14830	14580	14705	$1,4 \cdot 10^8$	8
15	15400	15390	15395	$1,5 \cdot 10^8$	8
16	30320	30970	30645	$3,1 \cdot 10^8$	8,5
17	31250	31260	31255	$3,1 \cdot 10^8$	8,5
18	30210	30940	30575	$3,1 \cdot 10^8$	8,5
19	27430	28150	27790	$2,8 \cdot 10^8$	8,4
20	25270	25310	25290	$2,5 \cdot 10^8$	8,4
21	19120	20170	19645	$2,0 \cdot 10^8$	8,3
22	18050	17100	17575	$1,8 \cdot 10^8$	8,3
23	15818	15650	15734	$1,6 \cdot 10^8$	8,2
24	9650	8720	9185	$9,2 \cdot 10^7$	8

2. Tabel pengamatan fase pertumbuhan bakteri *Enterobacter gergoviae*

JAM KE	X1	X2	RATA2	Σ Sel / ml	Log Σ Sel / ml
1	138	293	215,5	$2,1 \cdot 10^6$	6,3
2	246	248	247	$2,5 \cdot 10^6$	6,4
3	298	215	256,5	$2,6 \cdot 10^6$	6,4
4	379	358	368,5	$3,7 \cdot 10^6$	6,5
5	304	537	420,5	$4,2 \cdot 10^6$	6,6
6	645	618	631,5	$6,3 \cdot 10^6$	6,8
7	742	696	719	$7,2 \cdot 10^6$	6,9
8	844	870	857	$8,6 \cdot 10^6$	7
9	1024	903	963,5	$9,6 \cdot 10^6$	7
10	1330	1380	1355	$1,4 \cdot 10^7$	7,1
11	1758	1740	1749	$1,8 \cdot 10^7$	7,2
12	9760	8920	9340	$9,3 \cdot 10^7$	8
13	1740	11770	6755	$6,8 \cdot 10^7$	7,8
14	2413	2445	2429	$2,4 \cdot 10^7$	7,4
15	4514	4539	4526,5	$4,5 \cdot 10^7$	7,6
16	8630	8290	8460	$8,5 \cdot 10^7$	8
17	10820	10380	10600	$1,0 \cdot 10^8$	8
18	13510	14540	14025	$1,4 \cdot 10^8$	8,1
19	16270	16810	16540	$1,7 \cdot 10^8$	8,2
20	19420	19430	19425	$1,9 \cdot 10^8$	8,3
21	23120	25400	24260	$2,4 \cdot 10^8$	8,4
22	43200	47700	45450	$4,5 \cdot 10^8$	8,6
23	41580	40560	41070	$4,1 \cdot 10^8$	8,6
24	36690	37750	37220	$3,7 \cdot 10^8$	8,5

Lampiran 3 : Analisis Sidik Ragam

1. Hasil Uji Histamin dari penguraian histidin murni

Perlakuan		Ulangan				Total	Rata-rata (mg/l)
Bakteri	pH	1	2	3	4		
<i>Bacillus megaterium</i>	6	6,64	5,08	3,27	8,11	23,1	5,77
	7	1,10	0,78	1,20	1,14	4,22	1,05
	8	9,64	6,86	9,25	7,64	33,39	8,30
<i>Enterobacter gergoviae</i>	6	14,02	12,94	12,17	15,57	54,7	13,67
	7	2,44	2,95	1,45	1,93	8,77	2,19
	8	4,13	3,89	1,97	2,31	12,3	3,07
Total		37,97	32,5	29,31	36,7	136,48	

$$FK = \frac{(\sum \text{total})^2}{n} = \frac{136,48^2}{24} = 776,11$$

JK total = Jumlah kuadrat masing - masing pengulangan n - FK

$$= (6,64^2 + 5,08^2 \dots + 2,31^2) - 776,11 = 475,15$$

$$JK \text{ ulangan} = \frac{(37,97^2 + 32,5^2 + 29,31^2 + 36,7^2)}{6} - 776,11 = 7,87$$

$$JK \text{ perlakuan} = \frac{(23,1^2 + 4,22^2 + 33,39^2 + 54,7^2 + 8,77^2 + 12,3^2)}{4} - 776,11$$

$$= 445,54$$

JK galat = JK total - JK ulangan - JK perlakuan

$$= 475,15 - 7,87 - 445,54 = 21,74$$

Karena percobaan faktorial, maka JK perlakuan harus diuraikan menjadi JK komponen penyusun (JK bakteri dan JK pH) dan JK interaksi bakteri-pH.

Bakteri	pH			Σ histamin dari bakteri
	6	7	8	
<i>B. megaterium</i>	23,1	4,22	33,39	60,71
<i>E. gregorviae</i>	54,7	8,77	12,3	75,77
Σ histamin pada pH	77,8	12,99	45,69	136,48

$$JK \text{ bakteri} = \frac{(60,71^2 + 75,77^2)}{3 \times 4} - 776,11 = 9,45$$

$$JK \text{ pH} = \frac{(77,8^2 + 12,99^2 + 45,69^2)}{2 \times 4} - 776,11 = 262,53$$

$$JK \text{ interaksi} = JK \text{ perlakuan} - JK \text{ bakteri} - JK \text{ pH} \\ = 445,54 - 9,45 - 262,53 = 173,56$$

Anova

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Ulangan	3	7,87	2,62	1,8	3,29	5,42
Perlakuan :						
Bakteri	1	9,45	9,45	6,51*	4,54	8,68
pH	2	262,53	131,36	90,52**	3,68	6,36
Interaksi	2	173,56	86,78	59,84**	3,68	6,36
Galat	15	21,74	1,45			
Total	23	475,15				

Keterangan : ** → berbeda sangat nyata
 : * → berbeda nyata

Kesimpulan : Berdasarkan hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa F hitung bakteri > F 5 % maka dikatakan berbeda nyata pada taraf 5 % sedangkan F hitung pH dan F hitung interaksi bakteri dan pH > dari F 1% maka dikatakan berbeda nyata pada taraf 1%. Interaksi bakteri dan pH yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap kadar histamin dari hasil penguraian histidin murni.

Menentukan perlakuan yang paling potensial dengan menggunakan uji BNT

a. BNT 5% untuk interaksi

$$BNT_a = t_{\alpha, dbgalat} \times \sqrt{\frac{2KT \text{ galat}}{\text{ulangan}}}$$

$$BNT_{0,05} = t_{0,05(15)} \times \sqrt{\frac{2 \times 1,45}{4}} \\ = 2,131 \times 0,85 = 1,81$$



Perlakuan		Rata-rata (mg/l)	Lambang perlakuan
Bakteri	pH		
<i>Bacillus megaterium</i>	6	5,77	c
	7	1,05	a
	8	8,3	d
<i>Enterobacter gergoviae</i>	6	13,67	e
	7	2,19	ab
	8	3,07	b
BNT 5%		1,81	

Kesimpulan : interaksi bakteri *Enterobacter gergoviae* dan pH 6 mempunyai potensi produksi histamin paling tinggi.

b. BNT 5% untuk perlakuan bakteri

$$BNT_a = t_{\alpha, dbgalat} \times \sqrt{\frac{2KT \text{ galat}}{\text{ulangan} \times \text{level pH}}}$$

$$BNT_{0,05} = t_{0,05(15)} \times \sqrt{\frac{2 \times 1,45}{4 \times 3}}$$

$$= 2,131 \times 0,49 = 1,04$$

Perlakuan Bakteri	Total	Rata-rata (mg/l)	Notasi
<i>Bacillus megaterium</i>	60,71	60,71/12 = 5,06	a
<i>Enterobacter gergoviae</i>	75,77	75,77/8 = 6,31	b
BNT 5%	= 1,04		

Kesimpulan : perlakuan bakteri *Enterobacter gergoviae* mempunyai potensi produksi histamin paling tinggi.

c. BNT 5% untuk perlakuan pH

$$BNT_a = t_{\alpha, dbgalat} \times \sqrt{\frac{2KT \text{ galat}}{\text{ulangan} \times \text{level bakteri}}}$$

$$BNT_{0,05} = t_{0,05(15)} \times \sqrt{\frac{2 \times 1,45}{4 \times 2}}$$

$$= 2,131 \times 0,6 = 1,28$$

Perlakuan pH	Total	Rata-rata (mg/l)	Notasi
6	77,8	77,8/8 = 9,72	c
7	12,99	12,99/8 = 1,62	a
8	45,69	45,69/8 = 5,71	b
BNT 5%	= 1,28		

Kesimpulan : perlakuan pH 6 mempunyai potensi produksi histamin paling tinggi.

2. Hasil Uji CO₂ dari penguraian histidin murni

Perlakuan		Ulangan				Total	Rata-rata (mg/l)
Bakteri	pH	1	2	3	4		
<i>Bacillus megaterium</i>	6	9,98	13,62	13,62	14,98	52,2	13,05
	7	12,48	19,02	14,98	13,62	60,1	15,02
	8	14,98	14,98	21,40	19,97	71,33	17,83
<i>Enterobacter gergoviae</i>	6	13,62	11,52	19,97	19,97	65,08	16,27
	7	9,98	20,80	14,98	14,98	60,74	15,18
	8	12,48	14,98	20,80	14,98	63,24	15,81
Total		73,52	94,92	105,75	98,5	372,69	

$$FK = \frac{(\sum \text{total})^2}{n} = \frac{372,69^2}{24} = 5.787,4$$

JK total = Jumlah kuadrat masing - masing pengulangan n - FK

$$= (9,98^2 + 13,62^2 \dots + 14,98^2) - 5.787,4 = 274,63$$

$$JK \text{ ulangan} = \frac{(73,52^2 + 94,92^2 + 105,75^2 + 98,5^2)}{6} - 5.787,4 = 95,98$$

$$JK \text{ perlakuan} = \frac{(52,2^2 + 60,1^2 + 71,33^2 + 65,08^2 + 60,74^2 + 63,24^2)}{4} - 5.787,4$$

$$= 49,81$$

JK galat = JK total - JK ulangan - JK perlakuan)

$$= 274,63 - 95,98 - 49,81 = 128,84$$

Karena percobaan faktorial, maka JK perlakuan harus diuraikan menjadi JK komponen penyusun (JK bakteri dan JK pH) dan JK interaksi bakteri-pH.

Bakteri	pH			Σ histamin dari bakteri
	6	7	8	
<i>B. megaterium</i>	52,2	60,1	71,33	183,63
<i>E. gregorviae</i>	65,08	60,74	63,24	189,06
Σ histamin pada pH	117,28	120,84	134,57	372,69

$$JK \text{ bakteri} = \frac{(183,63^2 + 189,06^2)}{3 \times 4} - 5.787,4 = 1,23$$

$$JK \text{ pH} = \frac{(117,28^2 + 120,84^2 + 134,57^2)}{2 \times 4} - 5.787,4 = 20,84$$

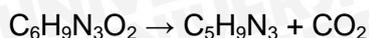
$$JK \text{ interaksi} = JK \text{ perlakuan} - JK \text{ bakteri} - JK \text{ pH} \\ = 49,81 - 1,23 - 20,84 = 27,74$$

Anova

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Ulangan Perlakuan :	3	95,98	32	3,72	3,29	5,42
Bakteri	1	1,23	1,23	0,14	4,54	8,68
pH	2	20,84	10,42	1,21	3,68	6,36
Interaksi	2	27,74	13,87	1,61	3,68	6,36
Galat	15	128,84	8,59			
Total	23	274,63				

Kesimpulan : Berdasarkan hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa F hitung bakteri, F hitung pH dan F hitung interaksi semua < F 5% . Interaksi pH dan bakteri yang berbeda pada penguraian histidin murni 500 mg tidak memberikan pengaruh pada hasil uji CO₂ terlarut.

Lampiran 4 : Hasil Teoritis dan Persen Hasil dari Reaksi Kimia



Unsur	Ar
C	12
H	1
O	16
N	14

$$\text{Mr C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2 = (6 \times 12) + (9 \times 1) + (3 \times 14) + (2 \times 16) = 155$$

$$\text{Mr C}_5\text{H}_9\text{N}_3 = (5 \times 12) + (9 \times 1) + (3 \times 14) = 111$$

$$\text{Mr CO}_2 = (1 \times 12) + (2 \times 16) = 44$$

Mol = massa zat / massa molekul relatif (Mr)

Massa zat (gr) = Mol x massa molekul relatif (Mr)

$$\text{Massa C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2 = 1 \times 155 \text{ gr}$$

$$\text{Massa C}_5\text{H}_9\text{N}_3 = 1 \times 111 \text{ gr}$$

$$\text{Massa CO}_2 = 1 \times 44 \text{ gr}$$

Dalam reaksi ini kadar histidin ($\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$) sebesar 0,5 gr, maka berdasarkan hitungan reaksi kimia massa $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3$ dan CO_2 :

$$\begin{aligned} \text{Massa C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2 &= 0,5/155 \times 155 \text{ gr} \\ &= 0,5 \text{ gr} \\ &= 500 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa C}_5\text{H}_9\text{N}_3 &= 0,5/155 \times 111 \text{ gr} \\ &= 0,358 \text{ gr} \\ &= 358 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa CO}_2 &= 0,5/155 \times 44 \text{ gr} \\ &= 0,142 \text{ gr} \\ &= 142 \text{ mg} \end{aligned}$$

Tabel Hasil Penguraian Histidin Menjadi Histamin dan Karbondioksida

Perlakuan	Rata-rata	
	Histamin (mg/l)	Karbondioksida (mg/l)
A	5,77	13,05
B	1,05	15,02
C	8,30	17,83
D	13,67	16,27
E	2,19	15,18
F	3,07	15,81

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 5 : Hasil Uji Histamin

FORM : LPPMHP BWI

FAX NO. : 0333417846

Feb. 27 2012 02:16:11 P2

REPORT OF HISTAMINE DETERMINATION (SNI 2354.10-2009)

Prepared By Chemistry Laboratory

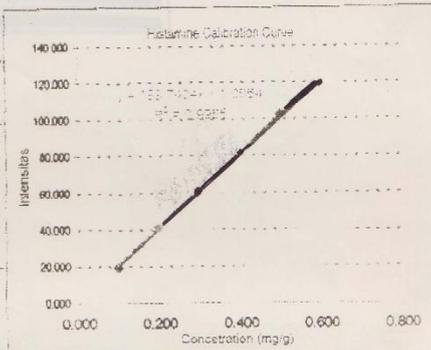
Quantitation results file:C:\FLWINLAB\DATA\Uji Histamine.rpt
Generated on :23-02-2012 at time:13:01:39

Measurement conditions
Method: C:\FLWINLAB\METHODS\CONC.MTH
Comments: Default concentration method

Ex.wavelength (nm): 350
Em.wavelength (nm): 444
Ex.slit (nm): 10
Em. slit (nm): 10
Em. filter: open

Reference sample results

Std#	Conc	Fact	Intens.	Factor	
	(mg/kg)				
STD 1	0.100		19.718	2.661	1
STD 2	0.200		41.597	2.661	1
STD 3	0.300		61.228	2.661	1
STD 4	0.400		82.160	2.661	1
STD 5	0.500		102.557	2.661	1
STD 6	0.600		119.774	2.661	1



Fit equation:
Y = 199.7404 X + 1.0964
a = 1.0964 b = 199.7404
X (mg/kg) = ((Y - a) / b) x 5000 / (wxb)

Test Number	Test Code	Intensity	Weight (Grams)	Conc. (mg/kg)	Test Decision
1	B1P1-1	3.759	10.0357	6.6414	Accepted
2	B1P1-2	3.126	10.0394	5.0607	Accepted
3	B1P1-3	2.407	10.0239	3.2729	Accepted
4	B1P1-4	4.351	10.0449	8.1107	Accepted
5	B1P2-1	1.539	10.0346	1.1041	Accepted
6	B1P2-2	1.409	10.0747	0.7767	Accepted
7	B1P2-3	1.579	10.0505	1.2020	Accepted
8	B1P2-4	1.557	10.0768	1.1442	Accepted
9	B1P3-1	4.986	10.0959	9.6442	Accepted
10	B1P3-2	3.850	10.0418	6.8543	Accepted
11	B1P3-3	4.814	10.0574	9.2530	Accepted
12	B1P3-4	4.159	10.0342	7.6403	Accepted
13	B2P1-1	6.703	10.0136	14.0157	Accepted
14	B2P1-2	6.282	10.0350	12.9356	Accepted
15	B2P1-3	5.997	10.0790	12.1713	Accepted
16	B2P1-4	7.330	10.0240	15.5669	Accepted
17	B2P2-1	2.077	10.0589	2.4403	Accepted
18	B2P2-2	2.287	10.1174	2.9458	Accepted
19	B2P2-3	1.679	10.0897	1.4454	Accepted
20	B2P2-4	1.869	10.0238	1.9294	Accepted
21	B2P3-1	2.761	10.0784	4.1345	Accepted
22	B2P3-2	2.653	10.0256	3.8866	Accepted
23	B2P3-3	1.889	10.0706	1.9702	Accepted
24	B2P3-4	2.025	10.0653	2.3094	Accepted

