

**UJI AKTIVITAS METABOLIT BAKTERI PERAIRAN MANGROVE
(*Planococcus sp.*) YANG DIDIALISIS DENGAN KANTONG SELOFAN
SEBAGAI PENGURAI HISTIDIN MENJADI HISTAMIN**

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

Oleh:
ARI YUSUF BAHTIYAR
NIM. 0710830022



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

**UJI AKTIVITAS METABOLIT BAKTERI PERAIRAN MANGROVE
(*Planococcus sp.*) YANG DIDIALISIS DENGAN KANTONG SELOFAN
SEBAGAI PENGURAI HISTIDIN MENJADI HISTAMIN**

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

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan di
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya

Oleh:
ARI YUSUF BAHTIYAR
NIM. 0710830022



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

UJI AKTIVITAS METABOLIT BAKTERI PERAIRAN MANGROVE
(*Planococcus sp.*) YANG DIDIALISIS DENGAN KANTONG SELOFAN
SEBAGAI PENGURAI HISTIDIN MENJADI HISTAMIN

Oleh:
ARI YUSUF BAHTIYAR
NIM. 0710830022

Menyetujui,

Dosen Penguji I

Ir. Kartini Zaelanie, MP
NIP. 19550503 198503 2 001

Tanggal :

Dosen Penguji II

Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP
NIP. 19680919 200501 1 001

Tanggal :

Dosen Pembimbing I

Dr. Ir. Happy Nursyam, MS
NIP. 19600322 198601 1 001

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 :

Pernyataan Orisinalitas Skripsi

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 14 Juni 2012
Mahasiswa,

Ari Yusuf Bahtiyar



RINGKASAN

Ari Yusuf Bahtiyar. Laporan Skripsi dengan judul Uji Aktivitas Metabolit Bakteri Perairan Mangrove (*Planococcus sp*) Yang Didialisis Dengan Kantong Selofan Sebagai Pengurai Histidin Menjadi Histamin (dibawah bimbingan **Dr. Ir. Happy Nursyam, MS** dan **Ir. Yahya, MP**)

Histidin dekarboksilase (HDC) adalah enzim yang mengkatalis reaksi pada produksi histamin dari histidin dengan bantuan dari vitamin B6 adalah sebagai berikut : $C_6H_9N_3O_2 \rightarrow C_5H_9N_3 + CO_2$. Pada manusia, enzim histidin dekarboksilase disandikan oleh gen HDC. Histamin merupakan modulator penting untuk beberapa proses fisiologis, termasuk neurotransmisi, sekresi asam lambung, dan kesehatan otot polos. Biosintesis histamin dari histidin dikatalis oleh enzim L-histidin dekarboksilase (Wikipedia, 2011). *Planococcus sp* memiliki sel bulat, dengan ukuran diameter 1,0-1,2 μm , memiliki sel tunggal, motil, setiap sel biasanya memiliki satu atau dua flagella, tetapi ada juga yang memiliki tiga atau empat flagella, tidak ada pembentukan spora, dan termasuk gram positif. Bersifat *chemoorganotrophs* (sistem metabolisme berhubungan dengan pernafasan tidak pernah berfermentasi, tidak bisa memproduksi asam atau gas dari glukosa, maltose, laktosa, sukrosa). Hidup pada suhu 20°C - 37°C, dapat ditemukan di air laut, tetapi biasanya sering ditemukan di muara (Holt, *et al.*, 1994).

Penelitian pendahuluan dilaksanakan pada tanggal 16-18 Agustus 2011 dan pada bulan Desember 2011 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Dilanjutkan penelitian inti pada bulan Januari – Maret 2012 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya serta di Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif. Menurut Amirin (2009), metode eksploratif merupakan salah satu pendekatan dalam penelitian. Metode eksploratif berupaya menemukan informasi umum mengenai sesuatu topik/masalah yang belum dipahami sepenuhnya oleh seorang peneliti. Jadi, penelitian eksploratif merupakan salah satu pendekatan penelitian yang digunakan untuk meneliti sesuatu (yang menarik perhatian) yang belum diketahui, belum dipahami, belum dikenali, dengan baik.

Hasil rerata pendegradasian histidin menjadi histamin oleh metabolit kasar *Planococcus sp*. sebesar 4,39 mg/kg, Presipitasi 30% sebesar 1,95 mg/kg, presipitasi 40% sebesar 4,82 mg/kg, presipitasi 50% sebesar 2,44 mg/kg, presipitasi 60% sebesar 4,74 mg/kg, presipitasi 70% sebesar 3,56 mg/kg. Dan untuk dialisat mempunyai nilai rerata kadar histamin sebesar 20,37 mg/kg. Kemudian untuk hasil uji konsentrasi protein pada masing-masing tingkat pemurnian yaitu yang pertama adalah metabolit kasar sebesar 4,83 mg/ml, untuk presipitasi 40% sebesar 12,077 mg/ml dan untuk dialisat sebesar 99,033 mg/ml.

Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai karakteristik yang lebih spesifik lagi pada enzim *Planococcus sp*. semisal penguraian pada pH tertentu dan pada suhu tertentu. Serta perlu dilakukan teknik pemurnian enzim yang lebih murni semisal memakai filtrasi gel atau kromatografi lainnya sehingga karakter dari enzim bisa terlihat lebih spesifik.

KATA PENGANTAR

Atas berkat rahmat dan karunia Allah SWT, akhirnya penulis dapat menyelesaikan Laporan Skripsi dengan judul Uji Aktivitas Metabolit Bakteri Perairan Mangrove (*Planococcus sp*) Yang Didialisis Dengan Kantong Selofan Sebagai Pengurai Histidin Menjadi Histamin. Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Perikanan pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

Ucapan terimakasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada :

1. Allah S.W.T atas segala kemudahan dan rahmat yang telah diberikan.
2. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS selaku dosen pembimbing I dan Ir. Yahya, MP selaku dosen pembimbing II yang telah dengan sabar membimbing.
3. Keluarga Besar Bahtiyar, Ibuku tercinta Virdiatmi, Abah Indarto, Mbak Ika dan Adik Nana atas doa dan seluruh dukungannya.
4. Teman-teman Tim Histamin yang selalu bersama-sama dari pagi sampai larut malam. Terutama Mirsa & Etik terima kasih atas semangat dan kerja keras kalian.

Penulis menyadari bahwa laporan ini masih jauh dari sempurna. Akhirnya penulis berharap semoga Laporan Skripsi ini bermanfaat sebagai salah satu informasi bagi semua pihak yang memerlukan dan bagi yang membacanya.

Malang, 14 juni 2012

Penulis

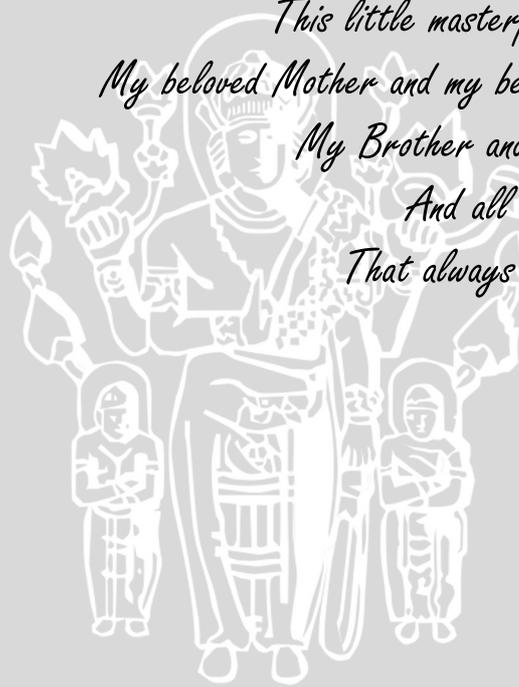
*Alhamdulillah,, Puji syukur kepada-Mu Ya Allah
Pelindung, Penguat dan Penolong di setiap langkah.....*

*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
HALAMAN 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 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Kegunaan Penelitian.....	4
1.5 Waktu dan Tempat.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Planococcus sp</i>	5
2.2 Histidin Dekarboksilase.....	6
2.3 Pemurnian Enzim Histidin Dekarboksilase.....	6
2.4 Histamin.....	9
2.5 Uji Spektrofluorometri.....	11
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian.....	14
3.1.1 Bahan Penelitian.....	14
3.1.2 Alat Penelitian.....	14
3.2 Metode Penelitian.....	15
3.3 Prosedur Penelitian.....	15
3.3.1 Pembiakan Bakteri.....	15
3.3.2 Pengamatan Fase-Fase Pertumbuhan Bakteri.....	18
3.3.3 Pemanenan Metabolit Kasar Bakteri.....	19
3.3.4 Pemurnian Enzim Kasar.....	20
3.3.4.1 Pengendapan dengan Amonium Sulfat.....	20
3.3.4.2 Dialisis.....	21
3.3.5 Uji Aktivitas Dekarboksilase.....	24
3.3.6 Uji Kadar Protein.....	26
3.3.8 Pengujian Histamin.....	28
3.3.9 Parameter Uji.....	32
3.4 Skema Kerja Penelitian.....	33
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Teknik Purifikasi Ekstrak Enzim.....	34
4.2 Analisis Aktivitas Dekarboksilase.....	37
4.3 Analisis Konsentrasi Protein.....	40

5. KESIMPULAN DAN SARAN	43
5.1 Kesimpulan.....	43
5.2 Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi Medium <i>Tryptone Soya Borth</i> (TSB)	16
2. Konsentrasi BSA dan Pengencerannya	27
3. Data Hasil Uji Kadar Histamin	37
4. Data Konsentrasi Protein	41



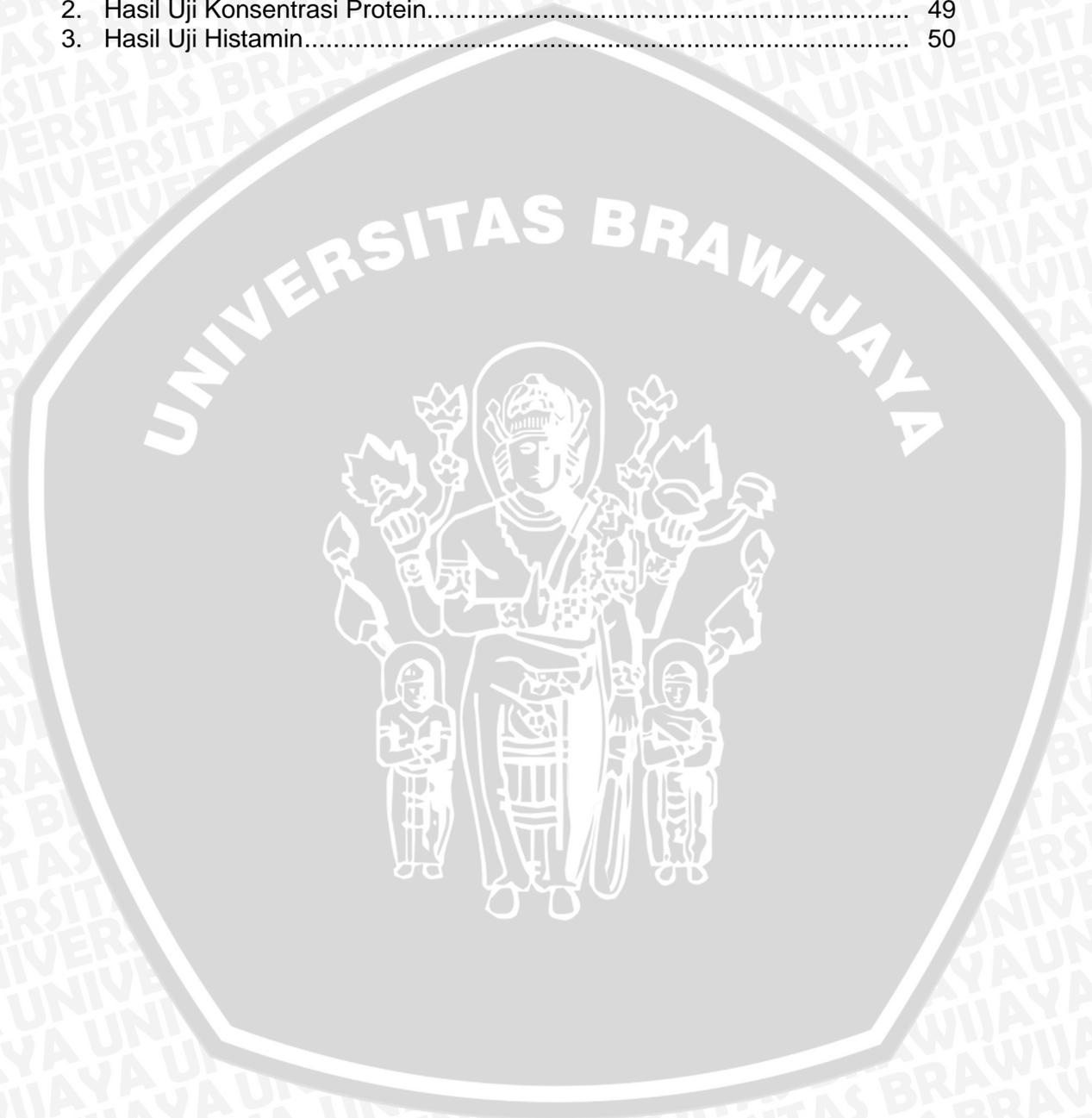
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Planococcus sp.</i>	5
2. Perubahan Histidin Menjadi Histamin	11
3. Diagram Optik Fluorometer.....	12
4. Alat Spektrofluorometri	13
5. Skema Pembuatan Media Cair	17
6. Skema Kerja Peremajaan Bakteri	18
7. Isolasi Metabolit Kasar Bakteri.....	20
8. Skema Kerja Presipitasi dengan Amonium Sulfat	21
9. Skema Kerja Dialisis	24
10. Skema Kerja Pembuatan Larutan Histidin.....	26
11. Alat Spektrofluorometri	28
12. Skema Kerja Penelitian.....	33
13. Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Planococcus sp.</i>	34
14. Fraksi Presipitat Sampel	36
15. Dialisis Sampel	36
16. Kadar Histamin dari Masing-Masing Tingkat Pemurnian.....	37
17. Presipitasi <i>Planococcus sp.</i>	39
18. Grafik Perbandingan Konsentrasi Protein Metabolit Kasar, Presipitat dan Dialisat.....	41



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil Perhitungan Bakteri <i>Planococcus sp.</i> pada Tiap Jam.....	48
2. Hasil Uji Konsentrasi Protein.....	49
3. Hasil Uji Histamin.....	50



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keberadaan bakteri di ekosistem mangrove memiliki arti yang sangat penting dalam menguraikan serasah daun-daun mangrove menjadi bahan organik yang digunakan sebagai sumber nutrisi bagi organisme yang mendiami hutan mangrove. Bakteri dan fungi merupakan mikroorganisme yang melakukan dekomposisi. Hasil dari dekomposisi merupakan makanan bagi organisme pemakan detritus yang kebanyakan terdiri atas hewan-hewan invertebrata. Organisme pemakan detritus yang selanjutnya akan dimakan oleh ikan dan Crustacea lainnya (Sikong, 1978).

Planococcus sp memiliki sel bulat, dengan ukuran diameter 1,0-1,2 μm , memiliki sel tunggal, motil, setiap sel biasanya memiliki satu atau dua flagella, tetapi ada juga yang memiliki tiga atau empat flagella, tidak ada pembentukan spora, dan termasuk gram positif. Bersifat *chemoorganotrophs* (sistem metabolisme berhubungan dengan pernafasan tidak pernah berfermentasi, tidak bisa memproduksi asam atau gas dari glukosa, maltose, laktosa, sukrosa). Hidup pada suhu 20°C - 37°C, dapat ditemukan di air laut, tetapi biasanya sering ditemukan di muara (Holt, *et al.*, 1994).

Histidin dekarboksilase (HDC) adalah enzim yang mengkatalis reaksi pada produksi histamin dari histidin dengan bantuan dari vitamin B6 adalah sebagai berikut : $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2 \rightarrow \text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3 + \text{CO}_2$. Pada manusia, enzim histidin dekarboksilase disandikan oleh gen HDC. Histamin merupakan modulator penting untuk beberapa proses fisiologis, termasuk neurotransmisi, sekresi asam lambung, dan kesehatan otot polos. Biosintesis histamin dari histidin dikatalis enzim *L-histidine decarboxylase*. Enzim yang berkaitan adalah pyridoxal

phosphate (PDP)- dekarboksilase terikat dan merupakan enzim paling spesifik untuk substrat histidin (Wikipedia, 2011).

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 histamin yang mempunyai pengaruh terhadap efek fisiologis manusia (Aflal *et al.* 2006). Histamin merupakan perubahan dari histidin yang terbentuk di dalam makanan karena aktivitas dari bakteri penghasil enzim histidin dekarboksilase (Taylor dan Behling, 1982).

Histamin adalah senyawa yang berada dalam daging ikan yang diproduksi secara biologis melalui proses dekarboksilase asam amino bebas (Keer, *et al.*, 2002). Histamin adalah bagian dari berbagai senyawa karakteristik terized dengan kehadiran kelompok histamin tertentu terjadi secara alami diberbagai tumbuhan dan hewan. histamin berkembang sebagai hasil dari dekarboksilasi asam amino melalui aksi anaerob (Karovicova, *et al.*, 2003). Pembentukan histamin ini tergantung dari ketersediaan asam amino bebas, keberadaan dekarboksilase yang dikandung oleh mikroorganisme (bakteri dengan enzim yang dapat menyebabkan dekarboksilase asam amino bebas) dan juga kondisi yang mendukung pertumbuhan mikroba dan aktivitas enzimatik (Putro, 2002)

Untuk memisahkan protein enzim tertentu dari ekstrak kasar yang mengandung banyak unsur lain maka dilakukan isolasi atau pemurnian enzim (Aulanni'am, 2004). Teknik pemisahan enzim dari sel dan komponen lain dipengaruhi oleh keberadaan enzim tersebut. Ekstraksi dan isolasi enzim ekstraseluler lebih mudah, karena telah berada diluar sel, sehingga tidak perlu memecah dinding sel. Sedangkan enzim intraseluler merupakan enzim yang melekat pada membran, dilindungi oleh dinding sel yang kuat, maka proses

pemisahan enzim harus memperhatikan metode – metode pemecahan sel untuk mengeluarkan enzim (Suhartono, 1989). Untuk mengekstrak enzim intraseluler diperlukan pengerusakan dan penghancuran dinding sel secara kimiawi yaitu dengan menambahkan gula, gliserol, asam atau basa maupun bahan organik lain. Bahan ini dipilih yang sesuai untuk menghasilkan pH dimana stabilitas enzim tetap maksimal (Othmer, 1987).

Pemurnian enzim dapat dilakukan berdasarkan sifat-sifat enzim sebagai protein yang berbeda dalam hal kelarutan, muatan serta ukuran atau berat molekulnya (Lehninger, 1995). Metode-metode pemurnian enzim antara lain pengendapan, filtrasi membran, kromatografi adsorpsi, kromatografi afinitas dan filtrasi gel (Smith, 1993). Metode yang paling sering digunakan adalah pengendapan dengan konsentrasi garam bervariasi (Aulanni'am, 2004).

1.2 Rumusan Masalah

Dalam penelitian sebelumnya (Nento, *et al.*, 2011) tentang penguraian histidin menjadi histamin oleh metabolit kasar bakteri didapatkan hasil kandungan histamin tertinggi yaitu dari larutan histidin yang ditambahkan dengan metabolit kasar *Planococcus sp.* Berdasarkan uraian diatas maka dapat permasalahan sebagai berikut :

- Apakah kadar histamin akan semakin tinggi seiring bertingkatnya pemurnian dari metabolit kasar *Planococcus sp* ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

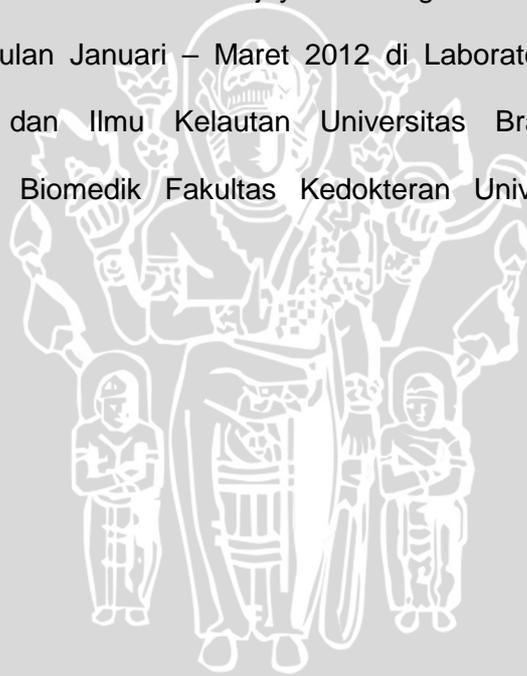
- Untuk menguji aktivitas penguraian histidin murni menjadi histamin dari masing-masing tingkat pemurnian metabolit kasar *Planococcus sp.*

1.4 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada pihak yang berkepentingan tentang aktivitas dari masing-masing tingkat pemurnian metabolit kasar *Planococcus sp.* dalam peranannya menguraikan histidin menjadi histamin.

1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian pendahuluan dilaksanakan pada tanggal 16-18 Agustus 2011 dan pada bulan Desember 2011 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Kemudian dilanjutkan penelitian inti pada bulan Januari – Maret 2012 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya serta di Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

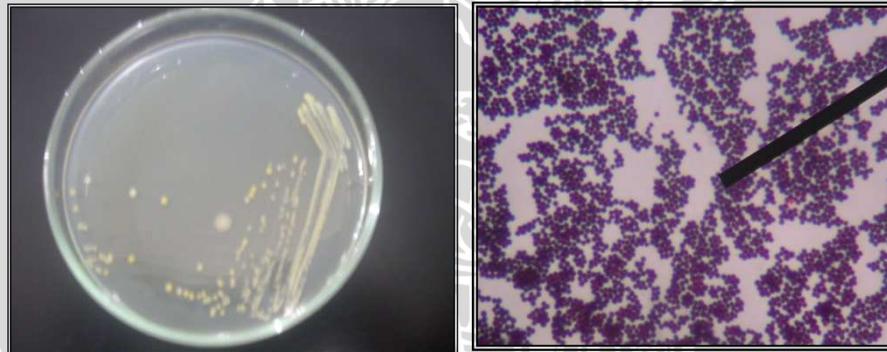


2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Planococcus sp.*

Klasifikasi *Planococcus sp* menurut *Bergey's Classification of Bacteria* (2012), adalah sebagai berikut :

Kerajaan : Bacteria
Filum : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Ordo : Bacillales
Famili : Planococcaceae
Genus : *Planococcus*
Spesies : *Planococcus sp.*



Gambar 1. *Planococcus sp.* (Anam, 2010)

Menurut Holt, *et al.*, 1994, bentuk sel *Planococcus citreus* adalah bulat, dengan ukuran diameter 1,0-1,2 μm , memiliki sel tunggal, motil, setiap sel biasanya memiliki satu atau dua flagella, tetapi ada juga yang memiliki tiga atau empat flagella, tidak ada pembentukan spora, dan termasuk gram positif. Bersifat *chemoorganotrophs* (sistem metabolisme berhubungan dengan pernafasan tidak pernah berfermentasi, tidak bisa memproduksi asam atau gas dari glukosa, maltose, laktosa, sukrosa). Hidup pada suhu 20°C - 37°C, dapat ditemukan di air laut, tetapi biasanya sering ditemukan di muara.

Planococcus sp. adalah bakteri gram positif berbentuk bulat atau kokus yang berhabitat di lautan yang sangat toleran dengan kondisi garam yang tinggi dan tidak bersifat patogen terhadap tanaman (Holt *et al.*, 1994).

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 : $C_6H_9N_3O_2 \rightarrow C_5H_9N_3 + CO_2$. Pada manusia, enzim histidin dekarboksilase disandikan oleh gen HDC. Histamin merupakan modulator penting untuk beberapa proses fisiologis, termasuk neurotransmisi, sekresi asam lambung, dan kesehatan otot polos. Biosintesis histamin dari histidin dikatalis enzim *L-histidine decarboxylase*. Enzim yang berkaitan adalah pyridoxal phosphate (PDP)- dekarboksilase terikat dan merupakan enzim paling spesifik untuk substrat histidin (Wikipedia, 2011).

Ikan-ikan golongan scombroid biasanya memiliki kandungan histidin dengan kadar tinggi yang akan diubah menjadi histamin oleh bakteri pembentuk histamin yang memiliki histidin dekarboksilase jika kondisi penyimpanan tidak dapat mengontrol pertumbuhan bakteri (Mc Lauchin *et al.*, 2005).

2.3 Pemurnian Enzim Histidin Dekarboksilase

Enzim pada umumnya dihasilkan di dalam sel, beberapa diekstrak melalui dinding sel dan dapat berfungsi di luar sel. Jadi dikenal 2 tipe enzim yaitu enzim ekstraselular (berfungsi di luar sel) dan enzim intraselular (berfungsi di dalam sel). Fungsi utama enzim ekstraselular adalah mengubah nutrisi disekitarnya sedemikian hingga nutrisi tersebut masuk ke dalam sel. Sedangkan enzim intraselular mensintesis bahan selular atau menguraikan nutrisi untuk menyediakan energi yang dibutuhkan sel. Untuk memisahkan protein enzim

tertentu dari ekstrak kasar yang mengandung banyak unsur lain maka dilakukan isolasi atau pemurnian enzim (Aulanni'am, 2004).

Isolasi enzim ekstraselular lebih mudah dibanding enzim intraselular karena tanpa pemecahan sel. Proses isolasi enzim mengandung pengertian pelepasan enzim dari sel yang dapat dilakukan secara mekanik, fisik, kimiawi, dan enzimatik melalui penghancuran membran dan dinding sel (Muchtadi, *et al.*, 1992).

Menurut Judoamidjojo *et al.* (1992) pemisahan partikel dari larutan pada metode sentrifugasi termasuk pemisahan sel-sel dari medium biakan atau penyingkiran hancuran sel serta pengumpulan endapan. Menurut Rahayu (1991) menjelaskan bahwa sentrifugasi dilakukan pada kecepatan dan gaya berat tertentu sehingga sel-sel mikroorganisme mengendap dan supernatan merupakan cairan yang berisi enzim. Isolasi enzim dilakukan pada suhu rendah dan campuran ditambah larutan penyangga (*buffer*) untuk mempertahankan kestabilan enzim. Enzim yang diharapkan nantinya akan berada pada lapisan air (supernatan).

Pemurnian enzim dapat dilakukan berdasarkan sifat-sifat enzim sebagai protein yang berbeda dalam hal kelarutan, muatan, dan ukuran atau berat molekulnya (Lehninger, 1982). Beberapa metode pemurnian enzim adalah pengendapan, filtrasi membran, kromatografi adsorpsi, kromatografi afinitas, dan filtrasi gel (McKee dan McKee, 2003).

Menurut Sorensen *et al.* (1999) metode pengendapan dengan konsentrasi garam bervariasi dilakukan dengan menambahkan garam amonium sulfat ke dalam ekstrak kasar enzim disertai dengan pengadukan pada suhu rendah. Garam yang ditambahkan dapat berupa amonium sulfat, natrium sulfat, natrium fosfat dan sebagainya tergantung pada jenis enzim.

Menurut Suhartono (1989) amonium sulfat lebih disukai karena kelarutannya tinggi, harga relatif murah, dan umumnya tidak mempengaruhi struktur protein. Konsentrasi garam amonium sulfat yang ditambahkan akan mempengaruhi kelarutan protein. Pada konsentrasi rendah, ion-ion garam akan mengelilingi molekul protein dan mencegah bersatunya molekul-molekul ini, sehingga protein melarut peristiwa ini disebut *salting in*. Pada konsentrasi tinggi, terjadi peningkatan muatan listrik di sekitar protein, yang akan menarik mantel air dari koloid protein. Interaksi hidrofobik diantara sesama molekul protein pada suasana ionik tinggi akan menurunkan kelarutan protein. Peristiwa ini disebut *salting out*. *Salting out* dengan garam ini dapat digunakan untuk memisahkan protein dari komponen terlarut lainnya. Seringkali penggumpalan dengan cara *salting out* dilakukan pada suhu rendah (4°C). Supaya enzim tidak rusak karena suhu tinggi diatas 4°C. Enzim yang telah menggumpal dipisahkan dari supernatan dengan sentrifus. Enzim ini masih belum murni dan tercampur dengan protein lainnya walaupun sudah bebas dari komponen non protein.

Menurut Davidson dan Sittman (1999) penambahan amonium sulfat berpengaruh terhadap protein yang terendapkan selama proses pemurnian. Ion-ion garam amonium sulfat akan berkompetisi dengan protein untuk menarik molekul air. Ion-ion garam memiliki kelarutan lebih besar dibandingkan dengan protein sehingga ion garam akan menarik molekul air dari protein enzim. Protein akan berinteraksi membentuk gumpalan dan mengendap. Proses ini dilakukan pada suhu (4°C) sehingga protein akan mengendap tanpa terdenaturasi.

Garam yang tersisa pada endapan enzim dipisahkan dengan dialisis (McKee dan McKee, 2003). Dialisis merupakan proses pemisahan molekul yang lebih besar melalui membran semipermeabel. Pada proses ini terjadi perpindahan, garam amonium sulfat yang mempunyai berat molekul lebih kecil dari sampel menuju dalam larutan buffer. Pada waktu garam bergerak melalui

pori-pori membran, garam teradsorpsi pada permukaan membran dan selanjutnya bergerak dari sisi membran yang satu ke sisi membran yang lain. Difusi garam terjadi karena adanya perbedaan ukuran molekul sehingga menyebabkan garam terpisah dari protein (Sorensen *et al.* 1999).

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

2.4 Histamin

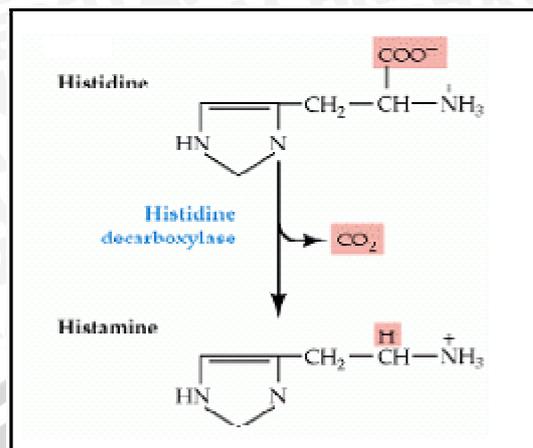
Histamin merupakan komponen dasar nitrogen yang dibentuk terutama oleh dekarboksilasi asam amino atau dengan transaminasi dari Aldehid dan keton. Histamin merupakan sumber nitrogen dan prekursor untuk sintesis hormon, alkaloid, asam nukleat dan protein. mereka juga dapat mempengaruhi proses dalam organisme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

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

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

Kandungan histamin pada makanan bergantung pada proses bioteknologi yang ruwet dalam prosedur produksi. Ini dipengaruhi oleh faktor tertentu seperti pertumbuhan bakteri, tersedianya asam-asam amino bebas, perkembangan mikroba seperti itu, avaiabilitas dari amino asam bebas, adanya enzim dekarboksilasi dan kondisi suhu yang ditinggikan. Enzim yang dilibatkan dalam produksi histamin, *histidine decarboxylase*, memerlukan suhu lebih besar dari 15° C dan 30° C adalah suhu optimum. Pada area tropis di dunia, ikan sering tertangkap di suhu melebihi 20° C. apabila ikan tidak didinginkan dengan seketika, kondisi baik untuk produksi histamin asalkan bakteri mengandung enzim histidin dekarboksilase. Pertumbuhan bakteri akan terhenti pada suhu rendah dari 5° C, bagaimanapun aktivitas enzimatik akan tetap berlanjut, menghasilkan dalam produksi amin selanjutnya (Ahmed, 1991).

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



Gambar 2. Perubahan Histidin Menjadi Histamin (Purves, et al., dalam Widiastuty, 2004)

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. Asam amino α -metil yang menghambat aktivitas dekarboksilasi digunakan di klinik sebagai anti-hipertensi (Rodwell, et al., 2003).

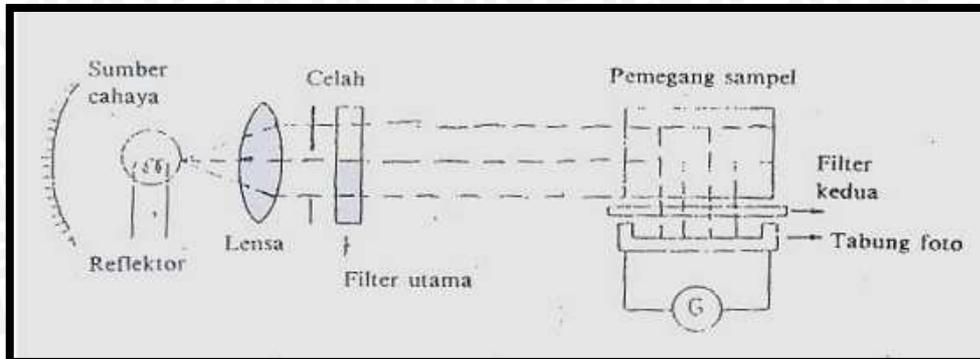
Tingginya kadar histamin dalam makanan ini merupakan dampak aktivitas bakteri pada asam amino histidin. Histamin sesungguhnya bukan zat yang asing pada tubuh manusia. Dalam takaran fisiologis, histamin memikul tugas sebagai substansi yang berperan dalam sekresi asam lambung, tetapi dengan dosis tinggi,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

2.5 Uji Spektrofluorometri

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).

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



Gambar 3. 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 spektrum 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.

Dalam Modul Kuliah (2007), spektrofotometri fluoresensi merupakan suatu prosedur yang menggunakan pengukuran intensitas cahaya fluoresensi yang dipancarkan oleh zat uji dibandingkan dengan yang dipancarkan oleh suatu baku tertentu. Pada umumnya cahaya yang diemisikan oleh larutan berfluoresensi mempunyai intensitas maksimum pada panjang gelombang yang biasanya 20 nm hingga 30 nm lebih panjang dari panjang gelombang radiasi eksitasi (gelombang pita penyerapan sinar yang membangkitkannya).

Pengukuran intensitas fluoresensi dapat dilakukan dengan suatu fluorometer filter sederhana. Instrument yang dipergunakan bermacam-macam mulai dari yang paling sederhana (filter fluorometer) sampai ke yang sangat kompleks yaitu spektrofotometer.

Metoda spektrofotometri mempunyai limit deteksi yang rendah dengan kemampuan analisis kimia reratif 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 alat spektrofourometer dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Alat Spektrofourometri (Perkin; Elmer, 1981)

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan adalah biakan murni bakteri *endogenous* mangrove yaitu *Planococcus sp.* dengan kepadatan 10^9 koloni/ml yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Bahan pendukung dalam penelitian ini antara lain : Media TSB untuk pertumbuhan bakteri, ammonium sulfat, larutan buffer fosfat, kantong selofan 10 kDa, larutan EDTA, aquadest. *Bovine Serum Albumin* (BSA), reagen biuret untuk pengujian kadar protein. Serbuk histidin murni dan aquabidest untuk uji aktivitas dekarboksilase.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan untuk penelitian ini antara lain : kulkas, laminaran, tabung reaksi, rak tabung reaksi tertutup, erlenmeyer, pipet volum, *beaker glass*, timbangan digital, arloji, jarum osse, gelas ukur, spatula, bunsen, botol semprot, nampan, inkubator, autoklaf, *waterbath shaker* dan sentrifuse dingin kecepatan sampai 20.000 rpm. Peralatan pendukung dalam penelitian ini antara lain : aerator, botol kaca 100 ml, botol vial, mikro pipet, *ependorf*, magnetik stirrer, pH meter, spektrofotometer (Shimadzu UV-VIS 1700).

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif. Menurut Amirin (2009), metode eksploratif merupakan salah satu pendekatan dalam penelitian. Metode eksploratif berupaya menemukan informasi umum mengenai sesuatu topik/masalah yang belum dipahami sepenuhnya oleh seorang peneliti. Jadi, penelitian eksploratif merupakan salah satu pendekatan penelitian yang digunakan untuk meneliti sesuatu (yang menarik perhatian) yang belum diketahui, belum dipahami, belum dikenali, dengan baik.

Metode eksploratif bertujuan untuk memperoleh pengetahuan tentang suatu gejala, sehingga setelah melalui tahap observasi, masalah serta hipotesisnya dapat dirumuskan. Dalam penelitian eksploratif ini pengetahuan tentang gejala yang hendak diteliti masih sangatlah terbatas dan juga merupakan langkah pertama bagi penelitian yang lebih mendalam lagi (Singarimbun dan Effendi, 1989).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembiakan Bakteri

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 121°C dan dapat membunuh mikroba (Nicklin, *et al.*, 1999). Selain itu alat yang harus disterilkan yaitu laminaran, 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 laminar *flow* selama 1 jam. Sambil menunggu laminar *flow* selesai disterilkan, kemudian membuat larutan untuk perkembangbiakan bakteri *Planococcus sp.* yaitu media TSB. Pertama yaitu menimbang media TSB sebanyak 18 gram menggunakan timbangan digital. Kemudian media TSB dimasukkan kedalam erlenmeyer 1000 ml dan diberi aquades sebanyak 600 ml, lalu diaduk dengan spatula sampai homogen. Kemudian didapatkan media cair, lalu dimasukkan ke dalam masing-masing erlenmeyer sebanyak 100 ml. Setelah itu disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121⁰ C tekanan 1 atm selama 15 menit dengan tujuan menghilangkan kontaminan yang ada pada media. Setelah disterilisasi, media cair didiamkan sampai dingin agar botol tidak pecah ketika diberi perlakuan lebih lanjut. Adapun komposisi dari media TSB dapat dilihat pada Tabel 1 di bawah ini :

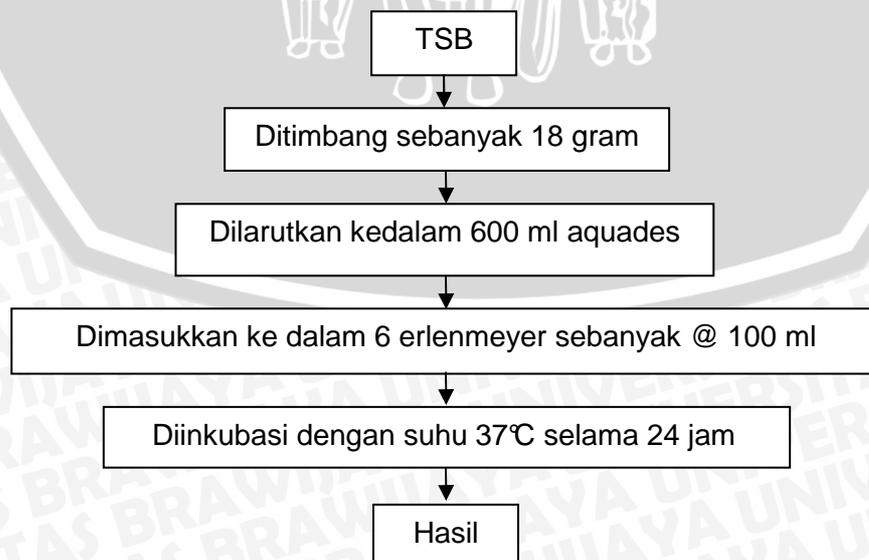
Tabel 1. Komposisi Medium *Tryptone Soya Broth* (TSB)

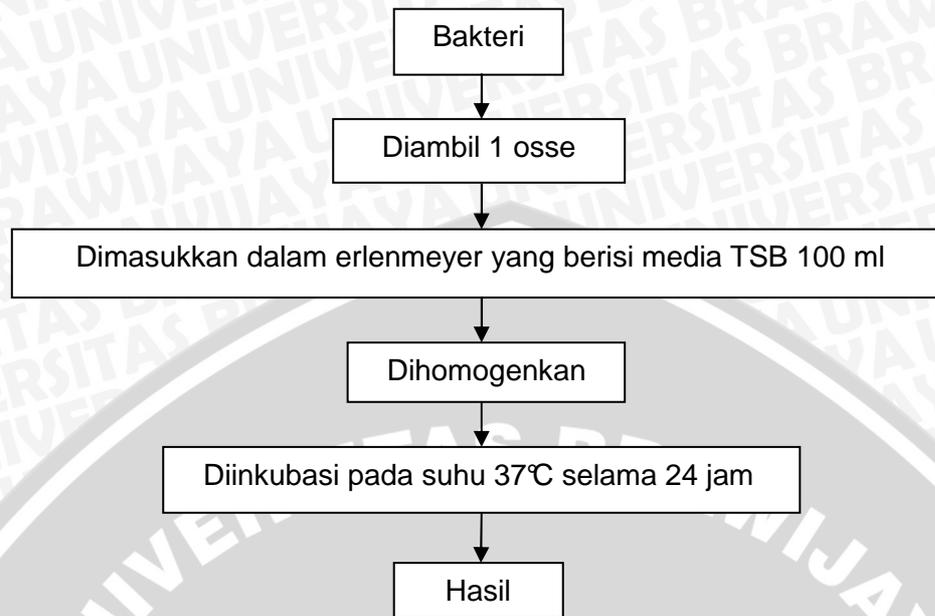
Formula	Gram per liter
Casein	17
Soybean Meal	3
Sodium Chloride	5
Dipotassium Phosphate	2,5
Dextrose	2,5

Setelah 1 jam, sinar UV pada laminar *flow* dimatikan lalu lampu laminar *flow* dinyalakan untuk memudahkan penglihatan pada saat penanaman bakteri. laminar *flow* bagian dalam disemprot dengan alkohol agar aseptis. Kemudian tangan yang telah dipasang dengan sarung tangan disemprot juga agar tidak ada kontaminasi saat penanaman bakteri. Kemudian bunsen dinyalakan dan diletakkan ke dalam laminar *flow* beserta isolat murni *Planococcus sp.* dan media cair yang diletakkan di rak tabung reaksi. Lalu jarum osse pada bagian ujungnya disemprot dengan alkohol dan dipanaskan di atas bunsen. Hal tersebut dilakukan untuk menghindari kontaminasi alat pada saat penanaman bakteri. Kemudian

diambil sampel bakteri yang akan dibiakkan, dibuka tutup tabung sambil dipanaskan diatas bunsen untuk menjaga kondisi tetap aseptis. Jarum osse disentuhkan di media isolat bakteri untuk mengurangi panas dari jarum osse, sehingga bakteri yang diambil tidak mati. Selanjutnya diambil sebanyak 1 osse bakteri dengan cara menggores isolat dan dimasukkan kedalam media cair baru yang telah disiapkan (jarum osse dimasukkan di permukaan saja agar tidak terjadi kontaminasi, karena hanya bagian ujung jarum osse yang disterilkan). Bakteri yang telah diinokulasi pada media baru, dipanaskan lagi diatas bunsen bagian permukaan erlenmeyernya dan segera ditutup. Jarum osse dipanaskan diatas bunsen lagi bagian ujungnya agar kembali steril saat digunakan untuk membiakkan bakteri yang lain. Setelah itu, bakteri dan media dihomogenkan, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, dilihat ada atau tidak endapan pada media, dimana adanya endapan berarti pembiakan telah berhasil dilakukan. Erlenmeyer diberi label nama bakteri yang telah dibiakkan agar tidak terjadi kesalahan pada saat pengamatan perlakuan. Prosedur kerja pembuatan media cair dan peremajaan bakteri dapat dilihat pada gambar 5 dan gambar 6 sebagai berikut.

Gambar 5. Skema Kerja Pembuatan Media Cair



Gambar 6. Skema Kerja Peremajaan Bakteri

3.3.2 Pengamatan Fase-Fase Pertumbuhan Bakteri

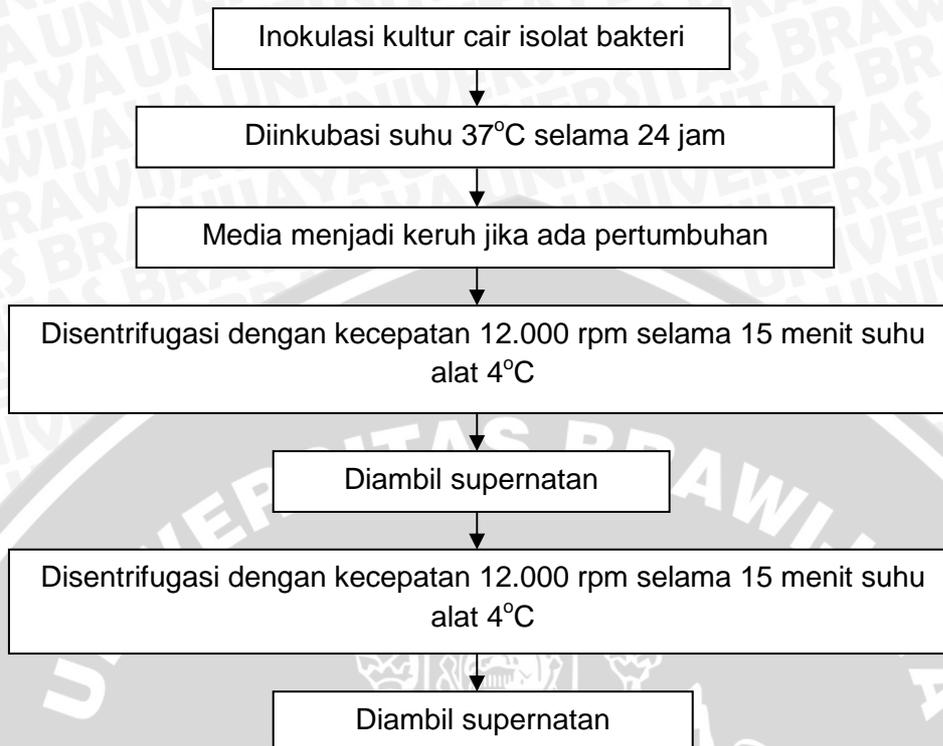
Menurut Soeksmanto, *et al.*, (1998), pertumbuhan mikroba adalah meningkatnya jumlah kuantitas massa sel dengan cara terbentuknya sel-sel baru. Terjadinya proses pertumbuhan tergantung dari nutrient yang tersedia di lingkungannya. Pada setiap pertumbuhan bakteri dalam suatu medium terdapat fase-fase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

Pengamatan fase dilakukan untuk mendapatkan sampel metabolit dari bakteri *Planococcus sp.* tersebut. Sebanyak 10 % dari hasil pengayaan, yang berarti sebanyak 10 ml bakteri dan 90 ml medium TSB + NaCl 2%, dicampur ke dalam erlenmeyer 250 ml. Selanjutnya di *shaker* 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.

3.3.3 Pemanenan Metabolit Kasar Bakteri

Setelah dilakukan pengamatan fase-fase pertumbuhan bakteri, maka kita dapat mengetahui pada jam ke berapakah bakteri tersebut memasuki fase eksponensial. Sampel metabolit 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 penambahan lama waktu penyimpanan. Hal ini dapat diakibatkan bakteri sedang berada dalam fase eksponensial. Semakin banyak bakteri yang dihasilkan maka akan semakin banyak pula senyawa bioaktif yang dapat dipanen dari bakteri tersebut.

Langkah pertama untuk pembuatan metabolit kasar yaitu menginokulasi kultur cair isolat bakteri pada Erlenmeyer dengan menggunakan media TSB kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah perlakuan tersebut media akan menjadi keruh hal ini dikarenakan bakteri tersebut mengalami pertumbuhan. Proses selanjutnya adalah disentrifugasi menggunakan alat sentrifuge dingin dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit dengan suhu alat 4°C, suhu ini digunakan pada alat tersebut dikarenakan dengan kecepatan 12.000 rpm sampel tersebut akan panas sehingga dapat merusak nutrisi-nutrisi yang ada di dalamnya, maka dari itu digunakan suhu ini untuk menghindari terjadinya kerusakan pada nutrisi yang ada di dalamnya. Proses sentrifugasi ini dilakukan dua kali, hal ini dikarenakan untuk mendapatkan metabolit kasar yang lebih murni. Menurut Heruwati *et al.*, (2007) sentrifugasi harus menggunakan kecepatan 11.000 rpm sampai dengan 15.000 rpm selama 15 menit, supaya ekstrak enzim dapat dipisahkan dari sel bakteri. Prosedur kerja isolasi metabolit kasar bakteri dapat dilihat pada Gambar 7.

Gambar 7. Isolasi Metabolit Kasar Bakteri

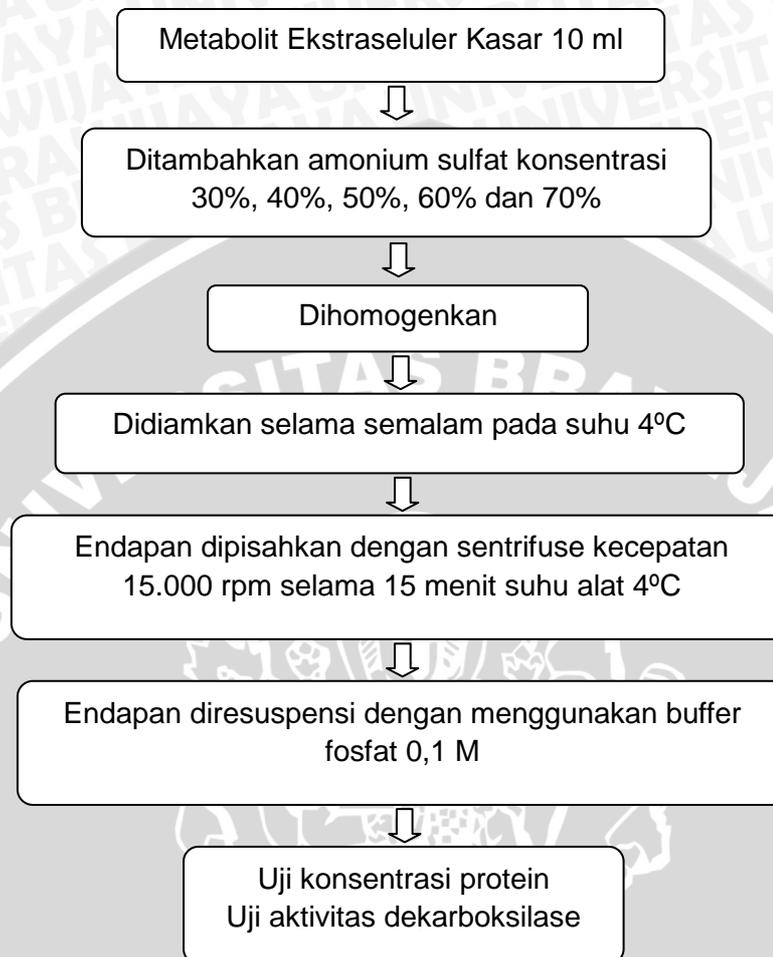
3.3.4 Pemurnian Enzim Kasar

3.3.4.1 Pengendapan dengan Amonium Sulfat

Memisahkan protein dari protein yang berbeda dan juga dengan non protein dari *crude* protein. Konsentrasi ammonium sulfat yang tinggi akan meningkatkan muatan listrik disekitar protein yang akan menarik mantel air dari koloid protein (Aulanni`am, 2004).

Penambahan amonium sulfat berpengaruh terhadap protein yang terendapkan selama proses pemurnian. Ion-ion garam amonium sulfat akan berkompetisi dengan protein untuk menarik molekul air. Ion-ion garam memiliki kelarutan lebih besar dibandingkan dengan protein sehingga ion garam akan menarik molekul air dari protein enzim. Protein-protein enzim akan berinteraksi membentuk gumpalan dan mengendap (Davidson dan Sittman, 1999). Endapan enzim yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi (Deustcher, 1990).

Skema pengendapan metabolit kasar *Planococcus sp.* dengan menggunakan ammonium sulfat ini bisa dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Skema Kerja Presipitasi dengan Amonium Sulfat

3.3.4.2 Dialisis

Prinsip dialisis adalah difusi garam amonium sulfat melalui membran semipermeabel. Pada proses dialisis terjadi pemisahan molekul yang lebih besar melalui membran semipermeabel, membran ini dapat dilewati oleh molekul-molekul kecil saja tapi tidak untuk molekul-molekul besar. Pada proses ini terjadi perpindahan garam amonium sulfat yang mempunyai berat molekul lebih kecil dari satu sisi membran ke sisi yang lain terjadi karena adanya gradien konsentrasi. Perbedaan kecepatan difusi melalui membran timbul karena adanya

perbedaan ukuran molekul yang menyebabkan garam terpisah dari protein (Sorensen *et al.*, 1999).

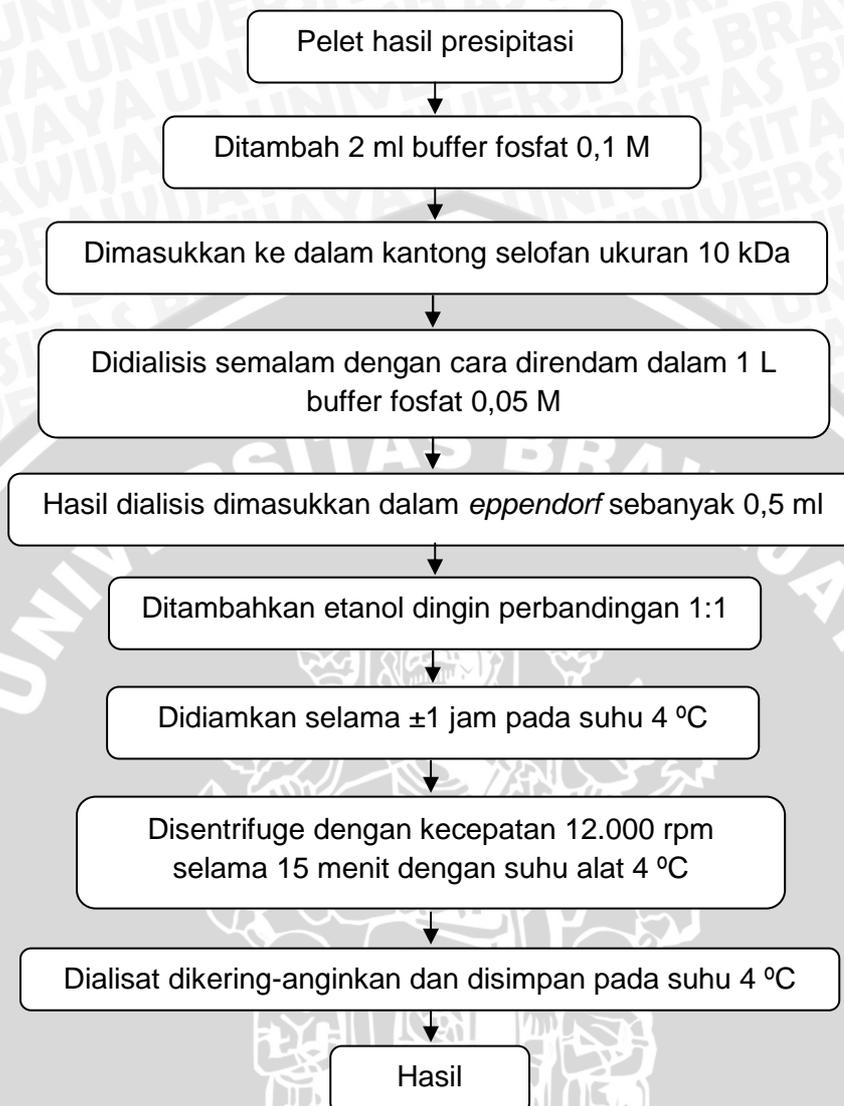
Preparasi Dialisis

- ❖ Pelet hasil endapan dengan ammonium sulfat
- ❖ Buffer fosfat 0,1 M pH 7 dibuat dengan cara sebagai berikut :
 - Larutan A = 0,028392 gr Na_2HPO_4 dilarutkan dalam 2 mL aquades
 - Larutan B = 0,143256 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 4 mL aquades
 - Diambil larutan A (1,95 mL) dan larutan B (3,05 mL), kemudian dicek pH 7 dan ditambahkan aquades hingga 10 mL
 - Perhitungan Na_2HPO_4 = $M \times V \times \text{BM}$
 = $0,1 \times 0,002 \text{ L} \times 141,96$
 = 0,028392 g
 - Perhitungan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ = $M \times V \times \text{BM}$
 = $0,1 \times 0,004 \text{ L} \times 358,14$
 = 0,143256 g
- ❖ Buffer fosfat 0,05 M pH 7 dibuat dengan cara sebagai berikut :
 - Larutan A = 1,41 gr Na_2HPO_4 dilarutkan dalam 200 mL aquades
 - Larutan B = 6,267 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 350 mL aquades
 - Diambil larutan A (195 mL) dan larutan B (305 mL), kemudian dicek pH 7 dan ditambahkan aquades hingga 1 L.
 - Perhitungan Na_2HPO_4 = $M \times V \times \text{BM}$
 = $0,05 \times 0,02 \text{ L} \times 141,96$
 = 1,41 g

- Perhitungan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} = M \times V \times \text{BM}$
 $= 0,05 \times 0,35 \text{ L} \times 358,14$
 $= 6,267 \text{ g}$

- ❖ Na_2CO_3 5% dibuat dengan cara 5 gr Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL aquades
- ❖ EDTA 50 mM pH 7 dibuat dengan cara 1,861 gr EDTA dilarutkan dalam 100 mL aquades
- ❖ Preparasi Kantong selofan 10 kDa
 - Didihkan 100 mL larutan Na_2CO_3 5% diatas hot plate kemudian masukkan kantong selofan selama 15 menit, kemudian dicuci dengan aquades.
 - Didihkan 100 mL larutan EDTA 50 mM pH 9 diatas hot plate kemudian masukkan kantong selofan selama 15 menit, kemudian dicuci dengan aquades.
 - Didihkan aquades steril diatas hot plate kemudian masukkan kantong selofan selama 15 menit, kemudian cuci dengan aquades.

Prosedur Dialisis Sampel



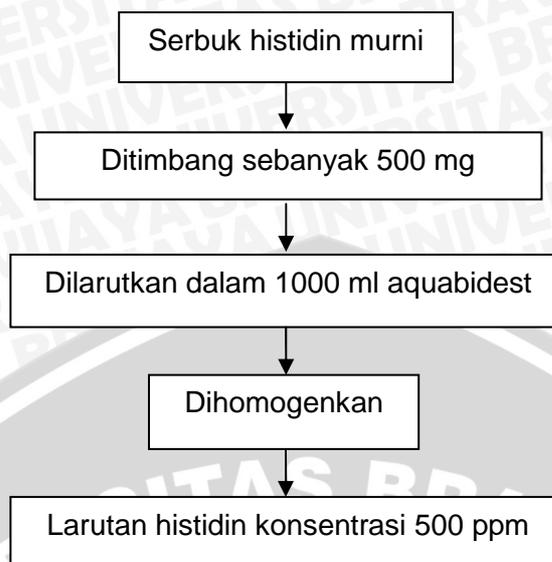
Gambar 9. Skema Kerja Dialisis

3.3.5 Uji Aktivitas Dekarboksilase

Hasil presipitasi dengan menggunakan ammonium sulfat bertingkat yaitu konsentrasi 30%, 40%, 50%, 60% dan 70% masing-masing diuji aktivitas dekarboksilasena dengan cara mereaksikan dengan 50 ml larutan L-Histidin konsentrasi 500 ppm. Hasil aktivitas dekarboksilase tertinggi digunakan untuk acuan pemurnian selanjutnya yaitu proses dialisis. Diambil sampel yang menunjukkan aktivitas dekarboksilase tertinggi karena diduga dengan aktivitas

dekarboksilase tertinggi pada sampel tersebut mengandung enzim histidin dekarboksilase dengan jumlah yang besar dibanding dengan presipitasi lainnya.

Prosedur pereaksian presipitat dengan L-Histidin adalah dimulai dengan pembuatan larutan histidin 500 ppm. Dalam pembuatan larutan histidin ini digunakan konsentrasi 500 ppm dengan cara menimbang serbuk histidin sebanyak 500 mg dengan menggunakan timbangan analitik. Serbuk histidin kemudian dilarutkan dalam 1000 ml aquabides. Dibutuhkan untuk masing-masing botol adalah 50 ml sebanyak 15 botol. Kemudian dihomogenkan dengan menggunakan magnetik stirrer. Kemudian setelah larutan histidin selesai dibuat, larutan histidin dimasukkan ke dalam botol masing-masing berisi 50 ml satu sampel diulang 3 kali sebagai perbandingan. Setelah itu masing-masing larutan histidin 50 ml ditambahkan sampel presipitat sebesar 0,5 ml dan diaerasi selama 24 Jam. Metode aerasi sudah dilakukan oleh Nento, *et al.*, (2011) untuk mempercepat proses pendegradasian histidin menjadi histamin. Setelah 24 jam aerasi dihentikan kemudian sampel dimasukkan kedalam freezer supaya kadar histamin tidak meningkat oleh aktivitas enzim. Histamin yang disimpan pada suhu 0° C memiliki kemungkinan untuk meningkat, bukan dikarenakan oleh aktivitas bakteri melainkan enzim yang dihasilkan oleh bakteri itu sendiri (Mahendradatta *et al.*, 2003). Adapun menurut Ahmed (1991), pertumbuhan bakteri akan terhenti pada suhu rendah dari 5° C, bagaimanapun aktivitas enzimatik akan tetap berlanjut, menghasilkan dalam produksi amin selanjutnya. Skema pembuatan larutan histidin 500 ppm bisa dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Skema Kerja Pembuatan Larutan Histidin

Pada proses dialisis setelah didapat dialisat maka juga perlu diuji aktivitas dekarboksilasenyanya untuk mengetahui perbandingan aktivitas dekarboksilase antara presipitat dengan dialisat dengan prosedur yang sama seperti sebelumnya.

3.3.6 Uji Kadar Protein

Penentuan konsentrasi protein menggunakan metode biuret dengan BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai standar. Prinsip kerja metode biuret adalah senyawa dengan 2 atau lebih ikatan peptida apabila direaksikan dengan garam kupri dalam suasana basa akan membentuk warna violet. Reaksi biuret bergantung pada pembentukan suatu kompleks antara ion Cu^{++} dengan 4 atom N-peptida pada suasana basa, maka akan membentuk suatu kompleks warna ungu yang absorbansinya dapat dibaca pada panjang gelombang 540 nm. Pada metode menggunakan larutan BSA. Kelebihan BSA adalah larutan stabil pada pemanasan 70°C selama 30 menit, lebih spesifik karena 95 % protein terdiri dari albumin. Adapun kelebihan biuret ini sendiri adalah lebih spesifik untuk peptida,

polipeptida, dan protein, tidak bereaksi dengan ammonia, urea, dan senyawa nitrogen sederhana.

Preparasi Uji Kadar Protein

- ❖ Sampel 6 μL dilarutkan dalam 994 μL *phosphate buffer saline* (PBS).
- ❖ Reagen biuret 50 mL dibuat dengan cara sebanyak tembaga (II) sulfat 0,075 gr CuSO_4 ; 0,3 gr kalium natrium tartat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$); 15 mL NaOH 2,5 M; 0,05 gr KI kemudian ditambahkan akuades sampai 50 mL.
- ❖ 2 mL larutan standar protein BSA 1.200 ppm (1,2 mg/mL), kemudian dilakukan pengenceran larutan stok.

Prosedur Kerja Uji Kadar Protein

- ❖ Dibuat larutan standar dengan pengenceran larutan stok. Konsentrasi standar protein BSA dan pengencerannya dapat dilihat pada Tabel 2 :

Tabel 2. Konsentrasi BSA dan Pengencerannya

Larutan stok BSA (μL)	3,13	6,25	12,5	25	50	100	200
Akuades (μL)	996,9	993,8	987,5	975	950	900	800
Konsentrasi protein ($\mu\text{g/mL}$)	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000

- ❖ Siapkan *ependorf* sebanyak 7 buah, isi masing-masing dengan aquades dan larutan stok (BSA) sehingga didapatkan konsentrasi yang diinginkan (sesuai perhitungan pengenceran), lalu vortex.
- ❖ Ambil 1 mL larutan dari masing-masing *ependorf* tadi lalu pindahkan ke dalam tabung reaksi.
- ❖ Tambahkan masing-masing tabung dengan 2 ml reagen biuret (1:2).
- ❖ Untuk sampel yang diuji juga ditambahkan dengan 2 ml reagen biuret (1:2).
- ❖ Inkubasi sampel dan larutan standard BSA pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$, selama 20 menit
- ❖ Baca absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm

Perhitungan Konsentrasi Protein

Setelah didapat nilai absorbansi dari larutan BSA maka dapat dibuat kurva standar, kemudian ditentukan persamaan $y = ax + b$ untuk menghitung konsentrasi protein dalam sampel (ppm)

Dimana : y = nilai absorbansi

x = konsentrasi protein

3.3.7 Pengujian Histamin

Sampel yang telah di aerasi selama 24 Jam diuji kadar histaminnya secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri, dimana menurut Wanenoor (2010), 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 histamin 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 excitation 350 nm dan emisi 444 nm. Alat spektrofotometri dapat dilihat pada gambar 11.



Gambar 11. Alat Spektrofotometri

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

- **Prosedur Analisis**

- Timbang \pm 10 ml sampel dalam beaker glass 250 ml dan tambahkan 50 ml metanol
- 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 metanol
- 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 50 ml 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 di atas 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 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 excitasi : 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 histamin dalam ($\mu\text{g/g}$) atau mg/kg sampel.

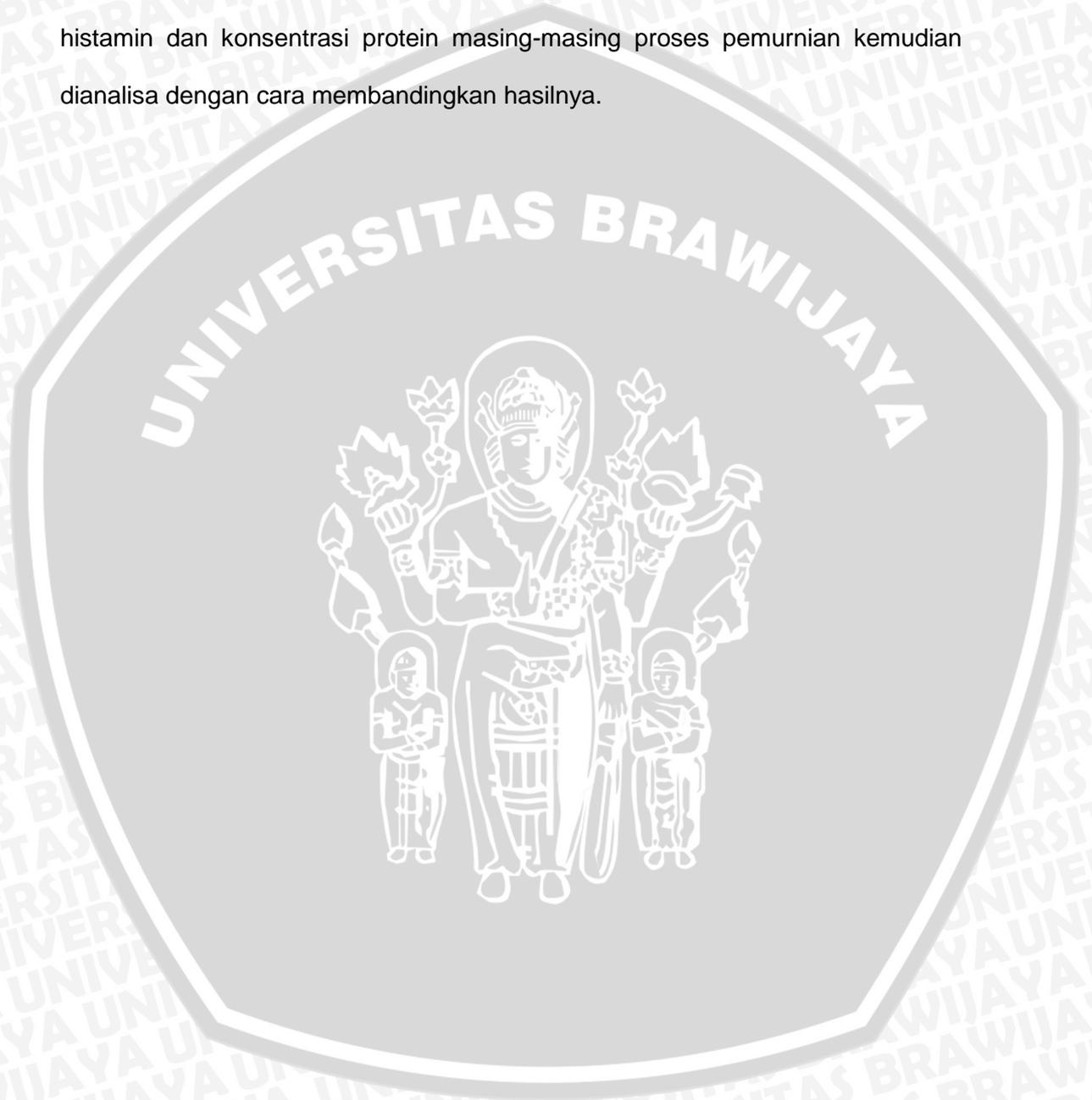
$$\text{Konsentrasi histamin } (\mu\text{g/g}) \text{ sampel} = Ax \frac{(\text{volume akhir (ml)} \times \text{fp})}{\text{gram sampel}}$$

Keterangan :

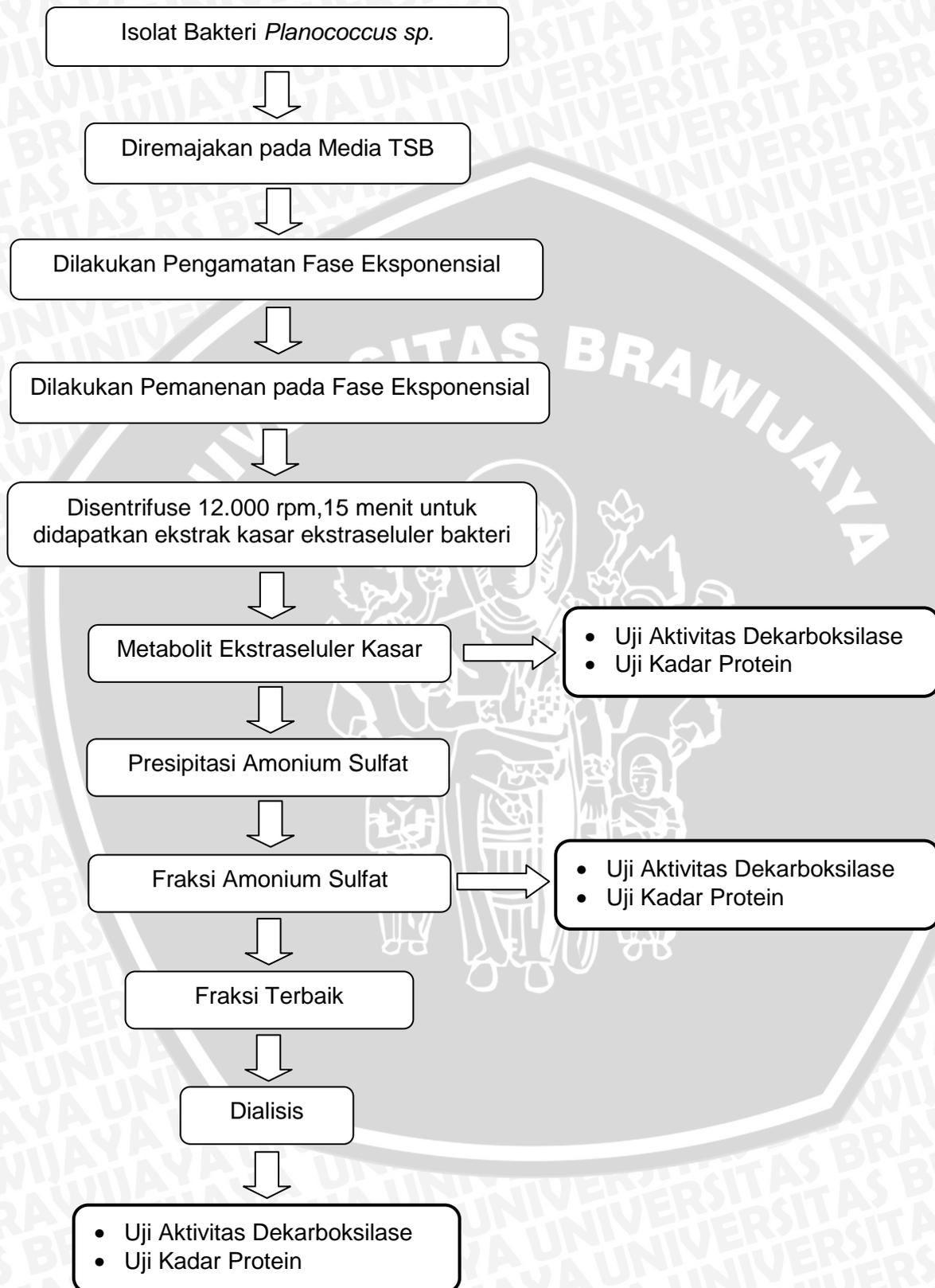
A = konsentrasi (*X*) yang akan didapat dalam perhitungan ($\mu\text{g/ml}$)

3.3.8 Parameter Uji

Parameter yang dilakukan adalah parameter kuantitatif, yaitu data yang diperoleh dari hasil uji aktivitas dekarboksilase ekstrak kasar ekstraseluler bakteri, presipitat dan dialisat enzim dalam mendegradasi histidin menjadi histamin dan konsentrasi protein masing-masing proses pemurnian kemudian dianalisa dengan cara membandingkan hasilnya.



3.4 Skema Kerja Penelitian

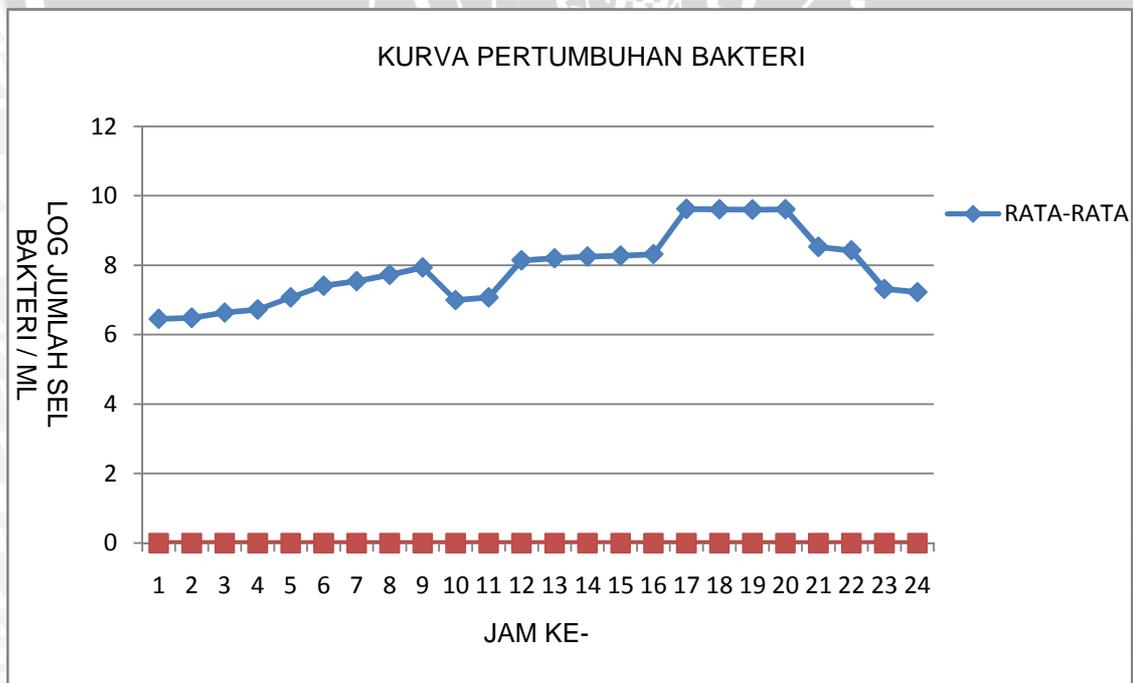


Gambar 12. Skema Kerja Penelitian

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Teknik Purifikasi Ekstrak Enzim

Purifikasi enzim ekstraseluler dimulai dengan menumbuhkan isolat murni bakteri *endogenous* mangrove yang memiliki sifat sebagai bakteri dekarboksilase yaitu *Planococcus sp.* yang telah diidentifikasi oleh Anam (2010) dari perairan mangrove pada media cair TSB (*Tryptone Soya Borth*). Setelah bakteri dipindahkan ke media TSB dan dihomogenkan kemudian diinkubator dalam suhu 37⁰ C selama 18-24 jam. Setelah diinkubator, dilihat ada atau tidak endapan pada media, dimana adanya endapan berarti pembiakan telah berhasil dilakukan. Untuk mendapatkan metabolit kasar ekstraseluler *Planococcus sp.* perlu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm dengan suhu alat 4°C selama 15 menit ketika bakteri berada pada fase eksponensial. Kurva pertumbuhan bakteri *Planococcus sp.* dapat dilihat pada Gambar 13.



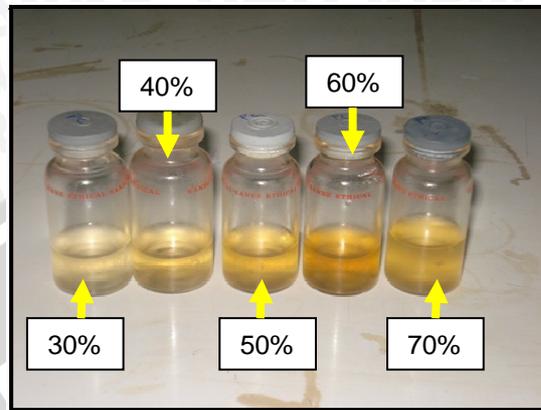
Gambar 13. Kurva Pertumbuhan Bakteri *Planococcus sp.*

Supernatan yang didapatkan dipisahkan dengan peletnya. Supernatan berisi enzim ekstraseluler dan peletnya berisi sel bakteri. Enzim ekstraseluler yang termasuk dalam golongan protein, masih terlarut dengan media bakteri, maka perlu dilakukan pengendapan enzim menggunakan ammonium sulfat. Endapan ini mengandung garam dalam konsentrasi tinggi yang akan mengganggu analisis selanjutnya, maka perlu dilakukan dialisis menggunakan kantong selofan di dalam akuadest. Dialisat yang diperoleh akan diuji aktivitas dan juga karakteristiknya.

Media TSB yang berisi bakteri perlu disentrifuge untuk mendapatkan ekstrak kasar enzim ekstraseluler bakteri *Planococcus sp* dan endapan berupa pelet. Menurut Farrell & Ranallo (2000), endapan ini merupakan sisa-sisa inti sel yang berbobot molekul besar. Namun ternyata supernatan coklat jernih itu diduga masih mengandung pengotor. Pengotor yang terdapat pada supernatan diperkirakan adalah hancuran mitokondria, peroksisom, lisosom, mikrosom, dan molekul-molekul yang terlarut dalam sitosol. Maka, perlu dilakukan langkah purifikasi selanjutnya untuk membebaskan protein dari pengotor tersebut.

Presipitasi adalah salah satu langkah purifikasi yang bertujuan mengendapkan protein yang terlarut dalam campuran ekstrak kasar menggunakan garam amonium sulfat. Garam ini digunakan karena memiliki daya larut yang tinggi di dalam air dan kepolarannya tinggi sehingga mudah mengikat air pada protein (Nelson & Cox ,2005 dalam Angky, 2011). Presipitasi yang digunakan adalah menggunakan garam ammonium sulfat dengan konsentrasi bertingkat yaitu 30%, 40%, 50%, 60% dan 70%. Kemudian dari masing-masing prosentase garam ammonium sulfat yang digunakan diuji aktivitas dekarboksilasena untuk mendapatkan konsentrasi terbaik. Hasil uji dekarboksilase menunjukkan kadar histamin tertinggi pada konsentrasi 40%, maka dimungkinkan pada konsentrasi tersebut terdapat endapan enzim histidin

dekarboksilase dengan jumlah yang lebih banyak dari pada konsentrasi yang lainnya. Pada konsentrasi presipitasi 40%, endapan coklat yang diduga merupakan protein kemudian disentrifugasi dan dikumpulkan untuk didialisis.



Gambar 14. Fraksi Presipitat Sampel

Sampel yang memiliki kandungan garam tinggi harus didialisis, karena berpotensi mengganggu hasil analisis selanjutnya, menggunakan kantung dialisis yang memiliki pori-pori berukuran 10 kDa yang dimasukkan ke dalam wadah berisi pelarut akuades yang digunakan untuk menciptakan lingkungan hipotonik di luar membran dialisis. Pori-pori ini menyebabkan molekul garam dan air yang kecil dapat bertukar dengan lingkungan, sementara protein yang berbobot molekul besar tidak dapat melewatinya (Nelson & Cox 2005 dalam Angky, 2011).



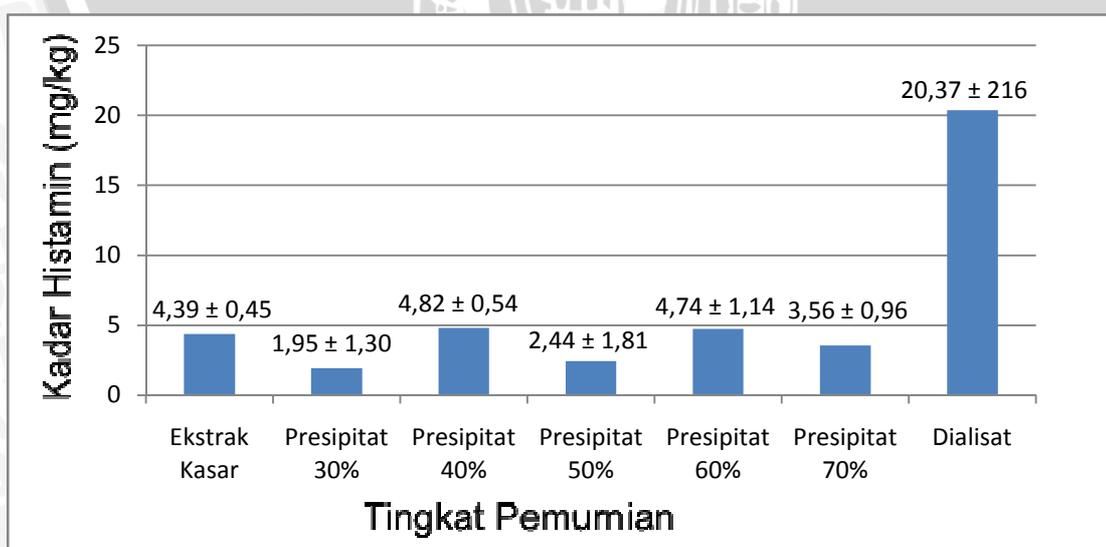
Gambar 15. Dialisis Sampel

4.2 Analisis Aktivitas Dekarboksilase

Aktivitas dekarboksilase enzim *Planococcus sp.* dalam mendegradasi histidin menjadi histamin dari tingkat pemurnian terendah sampai tertinggi dapat diketahui pada hasil pengamatan berupa kadar histamin. Data pengamatan aktivitas dekarboksilase yang ditunjukkan dengan parameter kadar histamin dengan metode spektrofotometri sesuai dengan SNI 01-2354.10-2009 dengan panjang gelombang eksitasi: 350 nm dan emisi: 444 nm pada masing-masing sampel dengan tingkat pemurnian berbeda yaitu metabolit kasar, presipitat dan dialisat dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Data Hasil Uji Kadar Histamin

No.	Sampel	Kadar Histamin (mg/kg)				
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Jumlah	Rerata
1.	Ekstrak kasar	4,66	4,65	3,86	13,17	4,39 ± 0,45
2.	Presipitat 30 %	0,63	3,23	1,99	5,85	1,95 ± 1,30
	Presipitat 40 %	4,62	4,4	5,44	14,46	4,82 ± 0,54
	Presipitat 50 %	1,16	1,63	4,52	7,31	2,44 ± 1,81
	Presipitat 60 %	4,6	3,67	5,94	14,21	4,74 ± 1,14
	Presipitat 70 %	2,46	3,98	4,24	10,68	3,56 ± 0,96
3.	Dialisat	22,82	18,73	19,57	61,12	20,37 ± 2,16

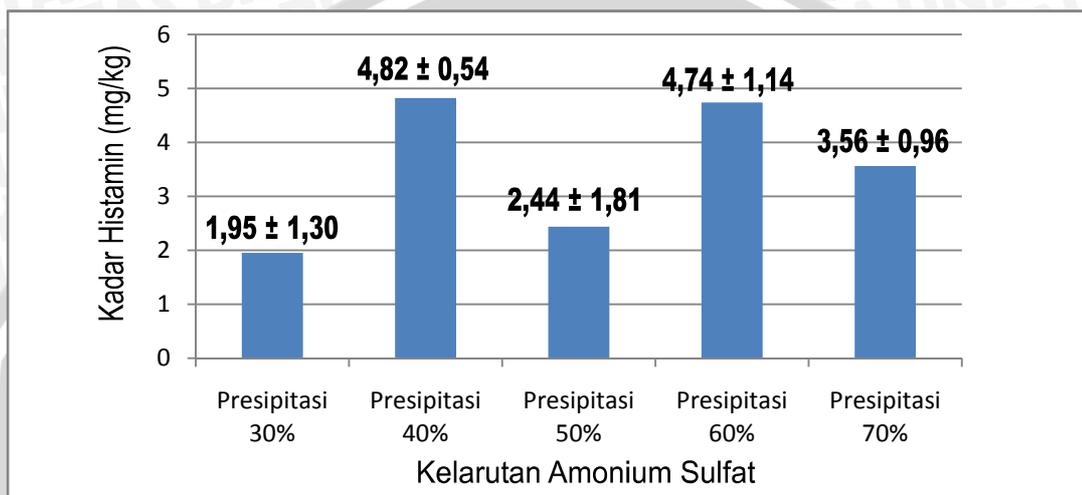


Gambar 16. Kadar Histamin dari masing-masing Tingkat Pemurnian

Tabel 3 menunjukkan bahwa kadar histamin pada ekstrak kasar mempunyai nilai rerata 4,39 mg/kg. Kemudian pada presipitasi berbeda, menghasilkan kadar histamin yang berbeda pula yaitu pada presipitasi dengan konsentrasi ammonium sulfat 30% didapat hasil rerata kadar histamin sebesar 1,95 mg/kg. Pada presipitasi dengan konsentrasi ammonium sulfat sebesar 40% didapat hasil rerata kadar histamin sebesar 4,82 mg/kg. Pada presipitasi dengan konsentrasi ammonium sulfat sebesar 50% didapat hasil rerata kadar histamin sebesar 2,44 mg/kg. Pada presipitasi dengan konsentrasi ammonium sulfat sebesar 60% didapat hasil rerata kadar histamin sebesar 4,74 mg/kg. Pada presipitasi dengan konsentrasi ammonium sulfat sebesar 70% didapat hasil rerata kadar histamin sebesar 3,56 mg/kg. Kemudian untuk sampel dialisis didapat hasil rerata kadar histamin sebesar 20,37 mg/kg.

Tabel 3 menunjukkan bahwa enzim yang dipresipitasi dengan konsentrasi 40% memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak kasar. Pada presipitasi dengan konsentrasi ammonium sulfat rendah yaitu 30% menunjukkan kadar histamin yang lebih rendah yaitu 1,95 mg/kg dibandingkan dengan konsentrasi ammonium sulfat 40% yaitu sebesar 4,82 mg/kg, hal ini berbanding lurus dengan konsentrasi ammonium sulfat 70% yang menunjukkan kadar histamin yang lebih rendah dibanding dengan konsentrasi ammonium sulfat 40% yaitu sebesar 3,56 mg/kg. Pada presipitasi dengan ammonium sulfat konsentrasi 40% menunjukkan hasil aktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan presipitasi lainnya disebabkan terdapat protein atau enzim yang mengendap dalam jumlah yang lebih banyak dibandingkan dengan presipitasi dengan konsentrasi rendah dan konsentrasi tinggi. Menurut Scopes (1987) Kelarutan protein (pada pH dan suhu tertentu) meningkat pada kenaikan konsentrasi garam (*salting in*). Kenaikan kelarutan protein akan meningkatkan kekuatan ion larutan. Penambahan garam tertentu akan menyebabkan kelarutan protein menurun (*salting out*). Molekul air

yang berikatan dengan ion-ion garam semakin banyak yang akhirnya menyebabkan penarikan selubung air yang mengelilingi permukaan protein, sehingga menyebabkan protein saling berinteraksi, beragregasi, dan kemudian mengendap. Perbandingan aktivitas presipitat dalam mendegradasi histidin menjadi histamin dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Presipitasi *Planococcus sp.*

Hasil presipitasi 40% ammonium sulfat menunjukkan aktivitas spesifik tertinggi yaitu menunjukkan tingginya kadar histamin dibandingkan dengan presipitasi lainnya yaitu sebesar 4,82 mg/kg, sehingga digunakan untuk pemurnian tahap selanjutnya yaitu dialisis. Pengaruh garam mineral dan kelebihan amonium sulfat dalam enzim dihilangkan dengan menggunakan metoda dialisis. Menurut Angky (2011) sampel yang memiliki kandungan garam tinggi harus didialisis, karena berpotensi mengganggu hasil analisis selanjutnya, menggunakan kantung dialisis yang memiliki pori-pori berukuran 10 kDa yang dimasukkan ke dalam wadah berisi pelarut akuades yang digunakan untuk menciptakan lingkungan hipotonik di luar membran dialisis.

Proses penghilangan garam (*desalting*) menggunakan metode dialisis dilakukan dalam waktu semalam untuk mendapatkan hasil enzim yang benar-benar murni. Tabel 3. menunjukkan bahwa peningkatan aktivitas enzim dialisis

Planococcus sp. 5 kali lebih besar (20,37 mg/kg) dibanding ekstrak kasar (4,39 mg/kg). Tingginya aktivitas enzim dialisat *Planococcus sp.* dikarenakan hilangnya molekul garam dan kontaminan yang menghalangi konformasi sisi aktif enzim (tingkat kemurnian menunjukkan besar aktivitas enzim yang dimurnikan dibandingkan dengan aktivitas enzim kasar). Proses pembentukan histamin sangat dipengaruhi oleh aktivitas enzim *L-histidin decarboxylase* (HDC), sehingga tingginya kadar histamin pada dialisat diharapkan akan mencerminkan tingginya kadar enzim HDC. Menurut Rochima (2009) keberhasilan suatu tahapan kemurnian ditandai dengan semakin meningkatnya aktivitas enzim setelah mengalami pemurnian.

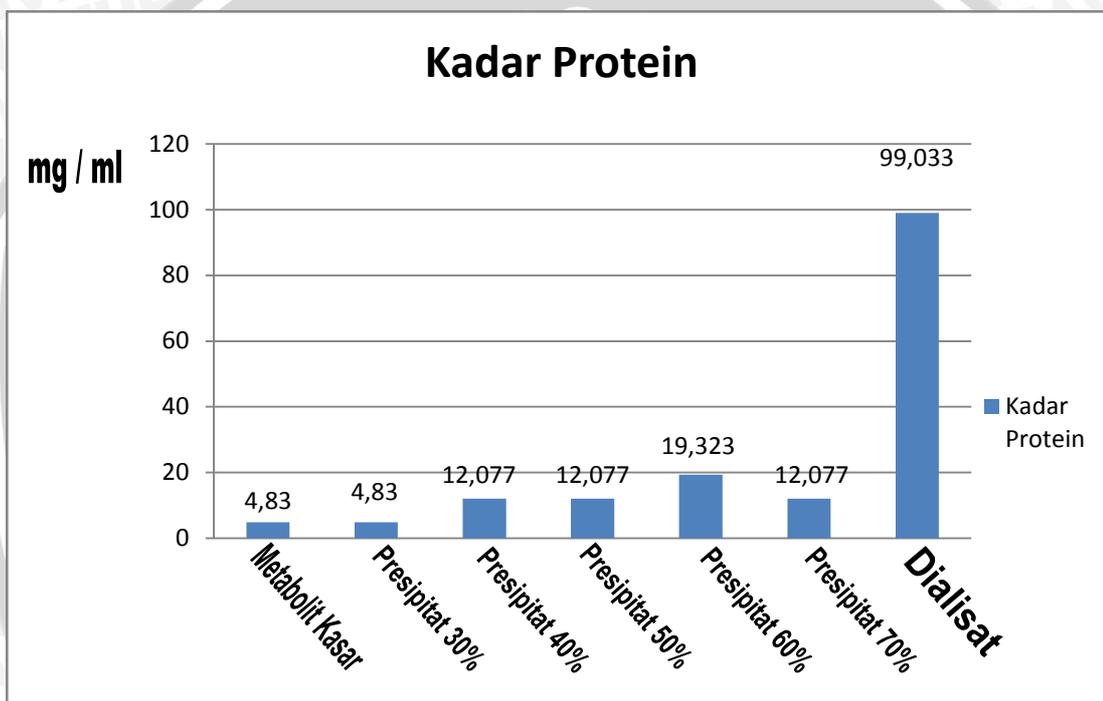
Ukuran kemurnian enzim dinyatakan sebagai aktivitas spesifik yang didefinisikan sebagai enzim per mg protein. Aktivitas dari enzim akan meningkat selama proses pemurnian dan akan mencapai nilai maksimal dan konstan jika enzim tersebut dalam keadaan murni (Lehninger, 1982). Aktivitas spesifik merupakan indikator tingkat kemurnian enzim. Semakin tinggi aktivitas enzim, maka kemurnian enzim tersebut meningkat (Lehninger, 1997).

4.3 Analisis Konsentrasi Protein

Konsentrasi protein diukur dengan menggunakan standard protein Bovine Serum Albumin (BSA) dengan konsentrasi 0,03125 hingga 2 mg/ml. Purifikasi protein dilakukan untuk menghilangkan pengotor-pengotor protein. Salah satu cara untuk mengetahui kemurnian sampel adalah melalui pengukuran konsentrasi protein (Angky, 2011). Data hasil pengukuran konsentrasi protein dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Data Konsentrasi Protein

No.	Sampel	Absorban	Konsentrasi Protein (mg / ml)
1.	Metabolit Kasar	0,045	4,83
2.	Presipitat 30 %	0,045	4,83
3.	Presipitat 40 %	0,048	12,077
4.	Presipitat 50 %	0,048	12,077
5.	Presipitat 60 %	0,051	19,323
6.	Presipitat 70 %	0,048	12,077
7.	Dialisat	0,084	99,033



Gambar 18. Grafik perbandingan konsentrasi protein metabolit kasar, presipitat dan dialisat

Tabel 4 memperlihatkan bahwa dialisat *Planococcus sp.* memiliki konsentrasi protein 23 kali lipat lebih tinggi dibandingkan dengan metabolit kasar *Planococcus sp.* yaitu 99,033 mg/ml untuk dialisat dan 4,83 mg/ml untuk sampel metabolit kasar. Kadar protein sampel adalah kadar protein yang telah dilarutkan dalam 1000 μ L pengencer atau PBS. Jadi setelah absorban di masukkan dalam persamaan, hasilnya dikalikan dengan 1000/6 karena sampel yang digunakan adalah 6 μ L yang telah diencerkan dengan 1000 μ L

Hal ini dimungkinkan karena dialisis *Planococcus* sp. telah mengalami pemurnian dengan dialisis sehingga terbebas dari kontaminan. Berdasarkan data tersebut, seperti dikemukakan Farrell & Ranallo (2000), setiap tahap purifikasi protein mampu memurnikan protein secara lebih baik dilihat dari kenaikan konsentrasi protein pada tiap tahapan. Selama dialisis, molekul yang lebih kecil dari 10 kDa akan keluar dari kantong dialisis. Sehingga molekul protein yang memiliki berat molekul tinggi akan tertahan dalam kantong selofan, dengan demikian terjadi pemekatan konsentrasi protein. Protein merupakan molekul yang mempunyai berat molekul 6 kDa dan beberapanya mempunyai berat molekul yang lebih dari 1000 kDa (Kimball, 1983).



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian mengenai uji aktivitas dialisat ekstraseluler bakteri *Planococcus sp.* dalam mendegradasi histidin murni diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

- Hasil rerata pendegradasian histidin menjadi histamin oleh metabolit kasar *Planococcus sp.* sebesar 4,39 mg/kg, Presipitasi 30% sebesar 1,95 mg/kg, presipitasi 40% sebesar 4,82 mg/kg, presipitasi 50% sebesar 2,44 mg/kg, presipitasi 60% sebesar 4,74 mg/kg, presipitasi 70% sebesar 3,56 mg/kg. Dan untuk dialisat mempunyai nilai rerata kadar histamin sebesar 20,37 mg/kg.
- Kemudian untuk hasil uji konsentrasi protein pada masing-masing tingkat pemurnian yaitu yang pertama adalah metabolit kasar sebesar 4,83 mg/ml, untuk presipitasi 40% sebesar 12,077 mg/ml dan untuk dialisat sebesar 99,033 mg/ml.

5.2 Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai karakteristik yang lebih spesifik lagi pada enzim *Planococcus sp.* semisal pendegradasian pada pH tertentu dan pada suhu tertentu. Serta perlu dilakukan teknik pemurnian enzim yang lebih murni semisal memakai filtrasi gel atau kromatografi lainnya sehingga karakter dari enzim bisa terlihat lebih spesifik.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, F. 1991. **Scombroid (histamine) fish poisoning**. Committee on evaluation of the safety of fishery products, National Academy Press, Washington, DC. Seafood Safety pp 93-96.
- Amirin, T. M. 2009. **Penelitian Eksploratori (Eksploratif)**. www.tatangmanguny.wordpress.com. Diakses pada Tanggal 25 Juli 2010.
- Anam, C. 2010. **Studi Karakterisasi Bakteri Perairan Dan Sedimen Mangrove (*Sonneratia alba*) di Muara Sungai Bulu Desa Bulukerto Kecamatan Kraton Kabupaten Pasuruan Jawa Timur**. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Keauatan Universitas Brawijaya. Malang.
- Angky, A. 2011. **Karakterisasi Aktivitas Dialisat Enzim Protease Fibrinolitik dari Cacing Tanah (*Eisenia foetida*) Galur Lokal**. Skripsi. Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Arisman. 2009. **Keracunan Makanan : Buku Ajar Ilmu Gizi**. Penerbit Buku Kedokteran EGC. <http://books.google.co.id/books>. Diakses pada Tanggal 20 Oktober 2010.
- Aulanni`am. 2004. **Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul**. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press. Malang.
- Dart, R.K. 2003. **Microbiology For The Analytical Chemist**. Loughborough University.
- Danur, I. A. I. 1993. **Mempelajari Metode Reduksi Kadar Histamin Dalam Pembuatan Pindang Tongkol**. Fakultas Teknologi Pertanian Institut_Pertanian_Bogor.http://iirc.ipb.ac.id/jspui/bitstream/123456789/30981/2/F93IAI_abstract.pdf. Diakses pada Tanggal 20 Oktober 2010.
- Davidson .V. L., and D. B. Sittman,. 1999. **Biochemistry**. Lipincott Williams and Wilkins. Maryland.
- Deutscher, MP. 1990. **Methods in Enzymology, vol. 182. Guide to Protein Purification, academic press**. Inc. san Diego, pp. 285-289.
- EncyclopediaofLife*. 2011. ***Planococcus sp***.<http://eol.org/pages/975907/overview>. Diakses pada tanggal 18 Juni 2012 pukul 14.23 WIB.
- Farrell SO, Ranallo RT. 2000. **Experiments in Biochemistry: A Hands-on Approach**. California: Thomson Learning.

- Holt JC, Bergey DH .1994. **Bergey's manual of determinative bacteriology (edisi ke-9th ed.)**. Baltimore: Williams & Wilkins. ISBN 0-683-00603-7.
- Heruwati, E.S., Sophia, R.A., dan Mangunwardoyo, W. 2007. **Seleksi dan Pengujian Aktivitas Enzim *L-Histidine Decarboxylase* dari Bakteri Pembentuk Histamin**. Makara Sains Vol. 11, No. 2, November 2007.
- Janson, J.C., and L. Ryden,. 1998. **Protein Purification Principles, High Resolution Methods and Applications 2nd Edition**. John Willey and Sons Inc. New York.
- Judoamidjojo, R. M., A. A. Darwis, dan E.G. Sa'id. 1992. **Teknologi Fermentasi. Rajawali Press**. Jakarta.
- 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.
- Kimball. J. W, 1983. **Biologi jilid 1**. Penerbit erlangga. Jakarta.
- Lehninger, A. L. 1997. **Dasar-Dasar Biokimia**. Jilid 2. Alih Bahasa Thenawidjaya. Erlangga. Jakarta.
- Lehninger. 1982. **Dasar-Dasar Biokimia**. Jilid 1. Alih bahasa : moggy Thenawidjaya. Erlangga. Jakarta.
- Lehninger. 1995. **Dasar-Dasar Biokimia**. Jilid 1. Alih bahasa : moggy Thenawidjaya. Erlangga. Jakarta.
- Mahendradatta, Risna A,M dan Langkong Jumriah. 2003. **Studi Perubahan Mutu Pada Burger Ikan Cakalang (*Katsuwonus pelamis L*) Selama Penyimpanan Dingin**. Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Mc Lauchlin, J; C. L. Little; K. A. Grant and V. Mithan. 2005. **Scombrotoxic Fish Poisoning**. Journal of Public Health 28 (1) : 61-62.
- McKee, T., and J. R. McKee. 2003. **Biochemistry : The Molecular Basic of Life. Third Edition**. Mc Graw Hill Companies Inc. New York. Hal. 79-84.
- Muchtadi, D., S. R. Palupi dan M. Astawan. 1992. **Enzim dalam Industri Pangan**. PAU. Pangan dan Gizi. IPB. Bogor. Hal. 55-58.

- Munoz, R. 2008. **Bacterial Biogenic Amine Production**. Spanish Research Council (CSIC) - Instituto de Fermentaciones Industriales. <http://www.scitopics.com>. Diakses tanggal 15 Juli 2010.
- Nicklin, Y. K., Gloema, C and T. Fogel. 1999. **Microbiology**. Blog Scientit Publisher.
- Nento, W. R, Bahctiar, T., Restu, F., dan Wowor, R. A. 2011. **Penguraian Histidin Menjadi Histamin oleh Bakteri Dekarboksilase, Non Dekarboksilase dan Crude Metabolit Ekstraseluler Bakteri**. Skripsi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang.
- Noviarty. 2007. **Kalibrasi alat spektrofotometer luminesen Is-5b menggunakan bahan standar ovalen**. Pusat Teknologi Bahan Bakar Nuklir, BATAN. Tangerang.
- Nurwantoro, Prastiwi, WD., Achmadi, J. 2003. **Populasi Mikrobia Isa Susu pada Peralatan Unit Pendingin Susu Akibat Lama Penyimpanan dan Aras Penambahan Dedak Padi**. Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro, Semarang.
- Othmer, K. 1987. **Encyclopedia of Chemical Technology**. John Wiley and Sons Inc. New York.
- Perkin; Elmer. 1981. **Operator's Manual Luminescence Spectrometer LS-5**. Beaconsfield, Bucking-hamshire. England.
- Putro, S. 2002. **Handling and Processing of Tuna For Sashimi and Fresh/Chilled Products**. 3rd reprint. Infofish Technical Hanbook Series.
- Rahayu, K. 1991. **Isolasi dan Pengujian Aktivitas Enzim**. PAU Pangan dan Gizi. UGM Press. Yogyakarta.
- Rochima, 2009. **Pemurnian Dan Karakterisasi Protein Deasitilase Termotabil dari Bacillus Papandayan Asal Kawah Kamojang Jawa Barat**. Fakultas perikanan dan ilmu kelautan universitas padjajaran. Jatinangor. Bandung.
- Rodwell, V. W; Robert, K. M; Peter, A. M; dan Daryl, K. G. 2003. **Biokimia Harper**. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal 333.
- Sikong, M. 1978. **Peranan Hutan Mangrove Sebagai Tempat Asuhan Berbagai Jenis Ikan dan Crustacea dalam Prosiding Seminar Ekosistem Mangrove**. Jakarta 27 Februari . 1 Maret 1978. Hlm 106 - 108.
- Scopes RK. 1987. **Protein Purification Principles and Practice**. Edisi ke-2. New York: SpringerVerlag.

- Singarimbun, M dan Effendi, S. 1989. **Metode Penelitian Survei**. Edisi Revisi. LP3ES. Jakarta.
- Smith, J.C., 1993. **Prinsip Bioteknologi**. Alih bahasa : A Dharma, PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. Hal 66, 130-138.
- SNI. 2009. **Penentuan Kadar Histamin Dengan Spektroflorometri dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada Produk Perikanan**. Standar Nasional Indonesia Nomor 2354.10:2009. Jakarta.
- Soeksmanto., D. Tisnadjaja, M.A. Subroto. 1998. **Penelitian Produk/Teknik Produksi Bioremediasi Limbah Pestisida dengan Mikroba Indigen**. Institut Teknologi Bandung (ITB). Bandung.
- Sorensen, H., S, Sorensen, C. Bjerregaard, and S, Michelson. 1999. **Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis**. The Royal Society of Chemistry. Cambridge.
- Sudarmadji, S., 1996, **Teknik Analisa Biokimia**. Liberty. Yogyakarta
- Suhartono, 1989. **Enzim dan Bioteknologi**. Departemen Pendidikan Dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor. Bogor 147-150.
- 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.
- Tim Penyusun. 2007. Modul Kuliah : **Spektroskopi**. Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.
- Wanenoer. 2010. **Penentuan Kadar Vitamin E Metode Fluorometri**. <http://id.shvoong.com>. Diakses pada Tanggal 22 Desember 2010.
- Widiastuty, I. 2004. **Histidin Dekarboksilase**. http://docs.google.com/viewer_pdf. Diakses pada Tanggal 28 April 2010.
- Widodo, Wahyu Eko. 2010. **Spektrofluorometri untuk Mengukur Kadar Kinin Sulfat**. <http://wordpress.com>. Diakses tanggal 03 Desember 2010.
- Wikipedia. 2011. **Histidin Dekarboksilase**. [http://id.wikipedia.org/wiki/Histidin Dekarboksilase](http://id.wikipedia.org/wiki/Histidin_Dekarboksilase). Diakses pada tanggal 22 Oktober 2011 pukul 05.34 WIB.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Perhitungan Bakteri *Planococcus sp.* pada Tiap Jam

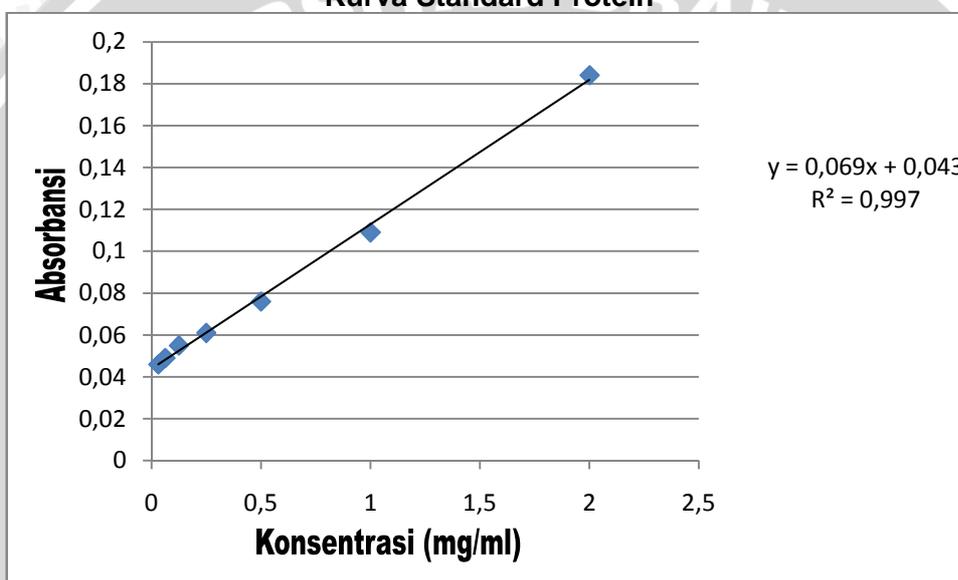
JAM KE	X1	X2	RATA2	Σ Sel / ml	Log Σ Sel / ml
1	287	291	289	$2,9 \cdot 10^6$	6,462
2	315	302	308,5	$3,1 \cdot 10^6$	6,491
3	428	444	436	$4,4 \cdot 10^6$	6,643
4	557	526	541,5	$5,4 \cdot 10^6$	6,732
5	1038	1230	1134	$1,2 \cdot 10^7$	7,079
6	2460	2750	2605	$2,6 \cdot 10^7$	7,414
7	3320	3660	3490	$3,5 \cdot 10^7$	7,544
8	5740	5240	5490	$5,4 \cdot 10^7$	7,732
9	8460	8850	8655	$8,7 \cdot 10^7$	7,939
10	9910	10670	10290	$1,0 \cdot 10^7$	7
11	11500	12300	11900	$1,2 \cdot 10^7$	7,079
12	14780	13610	14195	$1,4 \cdot 10^8$	8,146
13	15460	15800	15630	$1,6 \cdot 10^8$	8,204
14	17870	17530	17700	$1,8 \cdot 10^8$	8,255
15	19490	18760	19125	$1,9 \cdot 10^8$	8,278
16	21790	20450	21120	$2,1 \cdot 10^8$	8,322
17	42870	41560	42215	$4,2 \cdot 10^9$	9,623
18	42110	40780	41445	$4,1 \cdot 10^9$	9,612
19	40030	40820	40425	$4,0 \cdot 10^9$	9,602
20	40390	40820	40605	$4,1 \cdot 10^9$	9,612
21	34950	34270	34610	$3,4 \cdot 10^8$	8,531
22	27610	25750	26680	$2,7 \cdot 10^8$	8,431
23	21790	2310	12050	$2,1 \cdot 10^7$	7,322
24	16340	13810	15075	$1,7 \cdot 10^7$	7,230

Lampiran 2. Hasil Uji Konsentrasi Protein

Standard BSA (Bovin Serum Albumin)

Konsentrasi (mg/ml)	Absorbansi
0,03125	0,046
0,0625	0,049
0,125	0,055
0,25	0,061
0,5	0,076
1	0,109
2	0,184

Kurva Standard Protein



Hasil Absorbansi Spektrofotometri dan Konsentrasi Protein

No.	Sampel	Absorban	Konsentrasi Protein Sampel (mg / ml)
1.	Metabolit Kasar	0,045	4,83
2.	Presipitat 30 %	0,045	4,83
3.	Presipitat 40 %	0,048	12,077
4.	Presipitat 50 %	0,048	12,077
5.	Presipitat 60 %	0,051	19,323
6.	Presipitat 70 %	0,048	12,077
7.	Dialisat	0,084	99,033

Lampiran 3. Hasil Uji Histamin

a. Hasil Uji Kadar Histamin Presipitat

PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS PERIKANAN DAN KELAUTAN
 LABORATORIUM PENGENDALIAN DAN PENGUJIAN MUTU HASIL PERIKANAN
 PROVINCIAL LABORATORY FOR FISH INSPECTION AND QUALITY CONTROL IN SURABAYA, EAST JAVA INDONESIA
 JL. PAGESANGAN II No. 58 B Tlp. (031) 8274692, 8274693, 8274694, Fax No (031) 8280115
 SURABAYA - INDONESIA

REPORT OF TESTING

Serial No : 04 / 03 / RU / 2012

Date of Received : Maret 08 , 2012
 Date of Test : Maret 08 , 2012
 Quantity / Condition of samples : 15 samples
 Company : Universitas Brawijaya

TEST RESULT

No	Kode	Parameter	Result	Reference	Method
1	PC 1.1 Presipitat 30% + Histidin	Histamin	0.63 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
2	PC 1.2 Presipitat 30% + Histidin	Histamin	3.23 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
3	PC 1.3 Presipitat 30% + Histidin	Histamin	1.99 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
4	PC 2.1 Presipitat 40% + Histidin	Histamin	4.62 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
5	PC 2.2 Presipitat 40% + Histidin	Histamin	4.40 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
6	PC 2.3 Presipitat 40% + Histidin	Histamin	5.44 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
7	PC 3.1 Presipitat 50% + Histidin	Histamin	1.16 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
8	PC 3.2 Presipitat 50% + Histidin	Histamin	1.63 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
9	PC 3.3 Presipitat 50% + Histidin	Histamin	4.52 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
10	PC 4.1 Presipitat 60% + Histidin	Histamin	4.60 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
11	PC 4.2 Presipitat 60% + Histidin	Histamin	3.67 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
12	PC 4.3 Presipitat 60% + Histidin	Histamin	5.94 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
13	PC 5.1 Presipitat 70% + Histidin	Histamin	2.46 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
14	PC 5.2 Presipitat 70% + Histidin	Histamin	3.98 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
15	PC 5.3 Presipitat 70% + Histidin	Histamin	4.24 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009

Place and Date of issued , Surabaya Maret 14, 2012
 A. HERIAMBANG S.PI MMA
 KEPALA SEKSI PENGUJIAN
 DINAS PERIKANAN DAN KELAUTAN
 LABORATORIUM PENGENDALIAN DAN PENGUJIAN MUTU HASIL PERIKANAN


 A. Heriambang S.Pi MMA
 Penata Tk I
 NIP. 19640115 198603 1 017

b. Hasil Uji kadar Histamin Dialisat dan Metabolit Kasar

PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS PERIKANAN DAN KELAUTAN
 LABORATORIUM PENGENDALIAN DAN PENGUJIAN MUTU HASIL PERIKANAN
 PROVINCIAL LABORATORY FOR FISH INSPECTION AND QUALITY CONTROL IN SURABAYA, EAST JAVA INDONESIA
 JL. PAGESANGAN II No, 58 B Tlp. (031) 8274692, 8274693, 8274694, Fax No (031) 8280115
 SURABAYA - INDONESIA

REPORT OF TESTING

Serial No : / 02 / RU / 2012

Date of Received : April 04 , 2012
 Date of Test : April 04 , 2012
 Quantity / Condition of samples : 6 samples
 Company : Universitas Brawijaya

TEST RESULT

No	Code	Parameter	Result	Reference	Method
1	PC 1 CRUIDE Histidine+Metabolit 1	Histamin	4.66 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
2	PC 2 CRUIDE Histidine+Metabolit 2	Histamin	4.65 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
3	PC 3 CRUIDE Histidine+Metabolit 3	Histamin	3.86 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
4	PC 1 DIA Histidin + Dialisat 1	Histamin	22.82 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
5	PC 2 DIA Histidin + Dialisat 2	Histamin	18.73 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
6	PC 3 DIA Histidin + Dialisat 3	Histamin	19.57 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009

Place and Date of issued , Surabaya April 12, 2012

An KEPALA LABORATORIUM PENGENDALIAN DAN
 PENGUJIAN MUTU HASIL PERIKANAN

Kepala Seksi Pengujian



Tanjung Herlambang S.Pi MMA

Penata Tk I

NIP. 19640115 198603 1 017