

**UJI DAYA HAMBAT BAKTERI PENGHASIL INHIBITOR PROTEASE
(*Acinetobacter baumannii*) TERHADAP PROSES DEGRADASI
HISTIDIN MENJADI HISTAMIN PADA LIMBAH CAIR PEMINDANGAN
IKAN TONGKOL (*Euthynnus affinis*)**

SKRIPSI

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

Oleh :

M. YUNUS EFFENDI

NIM. 0710833006



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2012

**UJI DAYA HAMBAT BAKTERI PENGHASIL INHIBITOR PROTEASE
(*Acinetobacter baumannii*) TERHADAP PROSES DEGRADASI
HISTIDIN MENJADI HISTAMIN PADA LIMBAH CAIR PEMINDANGAN
IKAN TONGKOL (*Euthynnus affinis*)**

Oleh :
M. Yunus Effendi
NIM. 0710833006

Menyetujui,

DOSEN PENGUJI I

DOSEN PEMBIMBING I

(Eko Waluyo, Spi. MSc)
NIP. 19800424 200501 1 001
Tanggal:

(Ir. Darius, M. Biotech)
NIP. 19500531 198103 1 003
Tanggal:

DOSEN PENGUJI II

DOSEN PEMBIMBING II

(Dr. Ir. HARTATI K.N, MS)
NIP. 19640726 198903 2 004
Tanggal:

(Ir. YAHYA, MP)
NIP. 19630706 199003 1 003
Tanggal:

Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP

(Dr. Ir. HAPPY NURSYAM, MS)
NIP. 19600322 198601 1 001
Tanggal:

RINGKASAN

M Yunus Effendi. Laporan Skripsi dengan judul Uji Daya Hambat Bakteri Penghasil Inhibitor Protease (*Acinetobacter Baumannii*) Terhadap Proses Degradasi Histidin Menjadi Histamin Pada Limbah Cair Pemandangan Ikan Tongkol (*Euthynnus Affinis*) (dibawah bimbingan **Ir. Darius, M. Biotech.** dan **Ir. Yahya, MP.**)

Pada beberapa jenis ikan, khususnya dari family scombroidae yang memiliki daging merah, kerusakan oleh aktivitas bakteri maupun enzim dapat menghasilkan racun yang disebut scrombotoksin. Scrombotoksin adalah toksin yang dihasilkan oleh aktivitas bakteri terutama pada ikan-ikan family scombroidae seperti tuna, cakalang, tongkol, marlin, makarel dan sejenisnya (Handy and smith, 1976). Kandungan histamine pada ikan segar umumnya dibawah 10 mg/ 100g (Ozogul et al,2004). Kandungan histamine antara 50 – 100 mg/ 100 g umumnya sudah dianggap berbahaya dan dapat mengakibatkan keracunan pada orang yang mengkomsumsi (Wangga,1995).

Histamin merupakan senyawa yang penting dalam racun scromboid (racun yang ada didalam ikan jenis *scromboidae*) (Rodriguez *et al*, 1994). Perubahan histidin menjadi histamin disebabkan oleh reaksi enzim dekarboksilasi untuk dapat menurunkan kadar histamin maka diperlukan daya hambat yang digunakan untuk menghambat enzim dekarboksilase. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui daya hambat Bakteri penghasil Inhibitor protease (*Acinetobacter baumannii*) dalam perubahan senyawa histidin menjadi histamin pada limbah cair hasil pemandangan ikan tongkol (*Euthynnus affinis*).

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, BLPMHP (Balai Laboratorium Pengujian Mutu Hasil Perikanan) Banyuwangi dan LSIH (Laboratorium Sentral Ilmu Hayati) Universitas Brawijaya pada bulan November 2011 sampai Februari 2012.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode ekperimental. Metode ekperimental bertujuan untuk menentukan hubungan antara dua variabel, meningkatkan reliabilitas terhadap penemuan yang telah diperoleh dan untuk menguji teori (Ghony, 1998). Penelitian ini dilakukan dengan metode percobaan faktorial menggunakan rancangan dasar Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 faktor dan 3 kali pengulangan. Faktor pertama adalah konsentrasi bakteri, yaitu dengan konsentrasi (S₁) 0 ml, (S₂) 0,5 ml, (S₃) 1 ml, (S₄) 1,5 ml. Faktor kedua adalah lama waktu fermentasi (T₁) 24 jam, (T₂) 48 jam. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Analisis pengujian histamin secara kuantitatif ini menggunakan Spektrofluorometri sesuai SNI 2354. 10 tahun 2009.

Dari hasil penelitian didapatkan perlakuan yang terbaik adalah perlakuan T1 yakni Hal ini diduga pada T1 (lama fermntasi 24 jam) dalam proses dekarboksilase dari asam amino histidin bebas menjadi histamin secara biologis kandungan histamin yang terbentuk sangat rendah sehingga konsentrasi bakteri *Acinetobacter bacumannii* dalam menghambat enzim histidin dekarboksilase juga semakin rendah yang dapat berpengaruh pada interaksi konsentrasi bakteri dengan lama fermentasi sehingga tidak berbeda nyata

Perlu diadakan penelitian lebih lanjut terkait tentang karakteristik inhibitor protease dari bakteri *Acinetobacter baumannii* untuk aplikasi bidang perikanan lainnya.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah swt atas segala rahmat serta hidayah-nya sehingga penulis dapat menyelesaikan kegiatan penelitian dan penulisan skripsi dengan judul “ Uji Daya Hambat Bakteri Penghasil Inhibitor Protease (*Acinetobacter Baumannii*) Terhadap Proses Degradasi Histidin Menjadi Histamin Pada Limbah Cair Pemandangan Ikan Tongkol (*Euthynnus Affinis*) ”, untuk memperoleh gelar sarjana stars 1 pada Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

Terima kasih untuk semua pihak yang telah membantu hingga terselesaikannya skripsi ini dengan baik, antara lain:

1. Allah S.W.T atas segala kemudahan yang diberikan.
2. Kedua Orang Tua dan Kakak saya yang senantiasa selalu mendoakanku tanpa henti serta memberikan dukungan moral dan materi. Serta seluruh keluarga besarku yang selalu senantiasa mendoakan.
3. Ir. Darius, M.Biotech selaku dosen pembimbing pertama atas bimbingan dan kesempatan yang diberikan.
4. Ir. Yahya, MP selaku dosen pembimbing kedua atas arahan yang diberikan.
5. Eko Waluyo sebagai dosen penguji pertama atas saran dan masukan yang diberikan.
6. Dr. Ir Hartati K. MS sebagai dosen penguji kedua atas saran dan masukan yang diberikan.
7. Sahabat seperjuangan di program studi Teknologi Hasil Perikanan, khususnya angkatan 2007.
8. MABES KOMPI atas segala ilmu yang diberikan dan semoga bermanfaat.

9. Keluarga Besar JPK yang sudah memeberikan kenangan yang tak terhingga.

10. Semua pihak yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan dan penyelesaian laporan ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

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, 8 Juli 2012

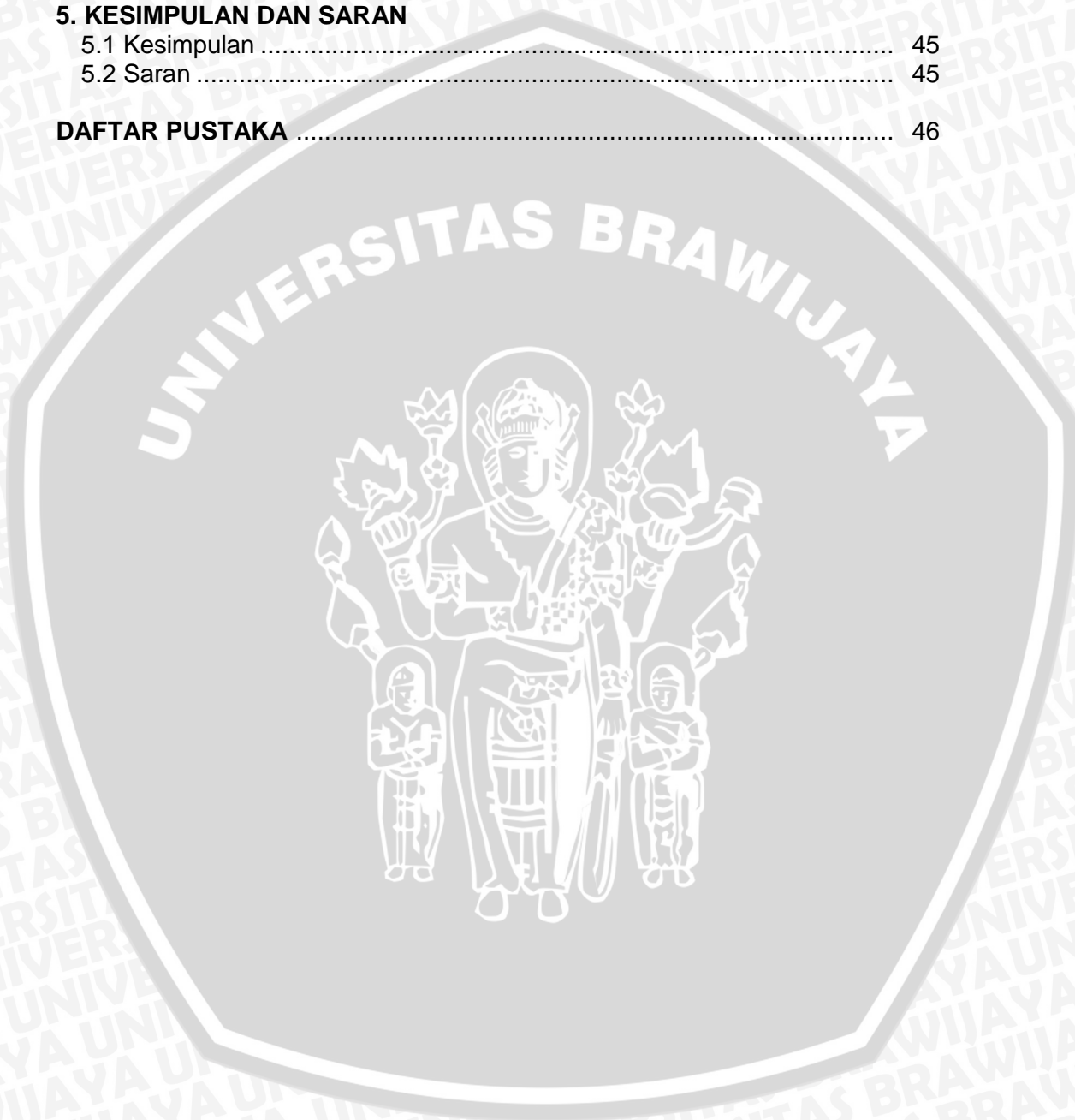
Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
RINGKASAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
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	4
1.4 Kegunaan Penelitian.....	4
1.5 Hipotesis.....	5
1.6 Tempat dan Waktu.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Ikan Tongkol (<i>Euthynnus affinis</i>).....	6
2.1.1 Taksonomi Tongkol (<i>Euthynnus affinis</i>)	6
2.1.2 Morfologi Tongkol (<i>Euthynnus affinis</i>).....	6
2.2 Histamin.....	7
2.3 Bakteri Dekarboksilase	13
2.4 Bakteri Inhibitor Protease	14
2.4.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	15
2.5 Fase Pertumbuhan Bakteri	15
2.5.1 Fase Lag.....	16
2.5.2 Fase Log/Pertumbuhan Eksponensial.....	16
2.5.3 Fase Stasioner.....	17
2.5.4 Fase Penurunan Populasi Atau Fase Kematian.....	17
2.6 Inhibitor enzim	17
2.6.1 Mekanisme Kerja inhibitor enzim	18
2.6.2 Inhibitor protease dari mikroba.....	19
2.6.3 Mekanisme kerja Inhibitor protease dari mikroba	21
2.7 Spektrofluorometri.....	22
3. METODE PENELITIAN	
3.1 Bahan Penelitian.....	25
3.2 Alat Penelitian	25
3.3 Metode Penelitian	26
3.3.1 Rancangan Percobaan	26
3.3.2 Analisis Data.....	27
3.3.3 Variabel	27
3.4 Prosedur Penelitian	28
3.4.1 Pengambilan Sampel Limbah Cair.....	28
3.4.2 Penanaman Bakteri <i>Acinetobacter baumannii</i>	28
3.4.3 Pembiakan Bakteri <i>Acinetobacter baumannii</i>	32
3.4.4 Pengambilan bakteri fase Eksponensial	35
3.4.5 Fermentasi Bakteri Non Dekarboksilasi terhadap Histamin.....	35

3.4.6 Pengujian <i>Biogenic Amine</i> (Histamin)	36
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Fase-Fase Pertumbuhan Bakteri	40
4.2 Data Penelitian	41
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	45
5.2 Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46



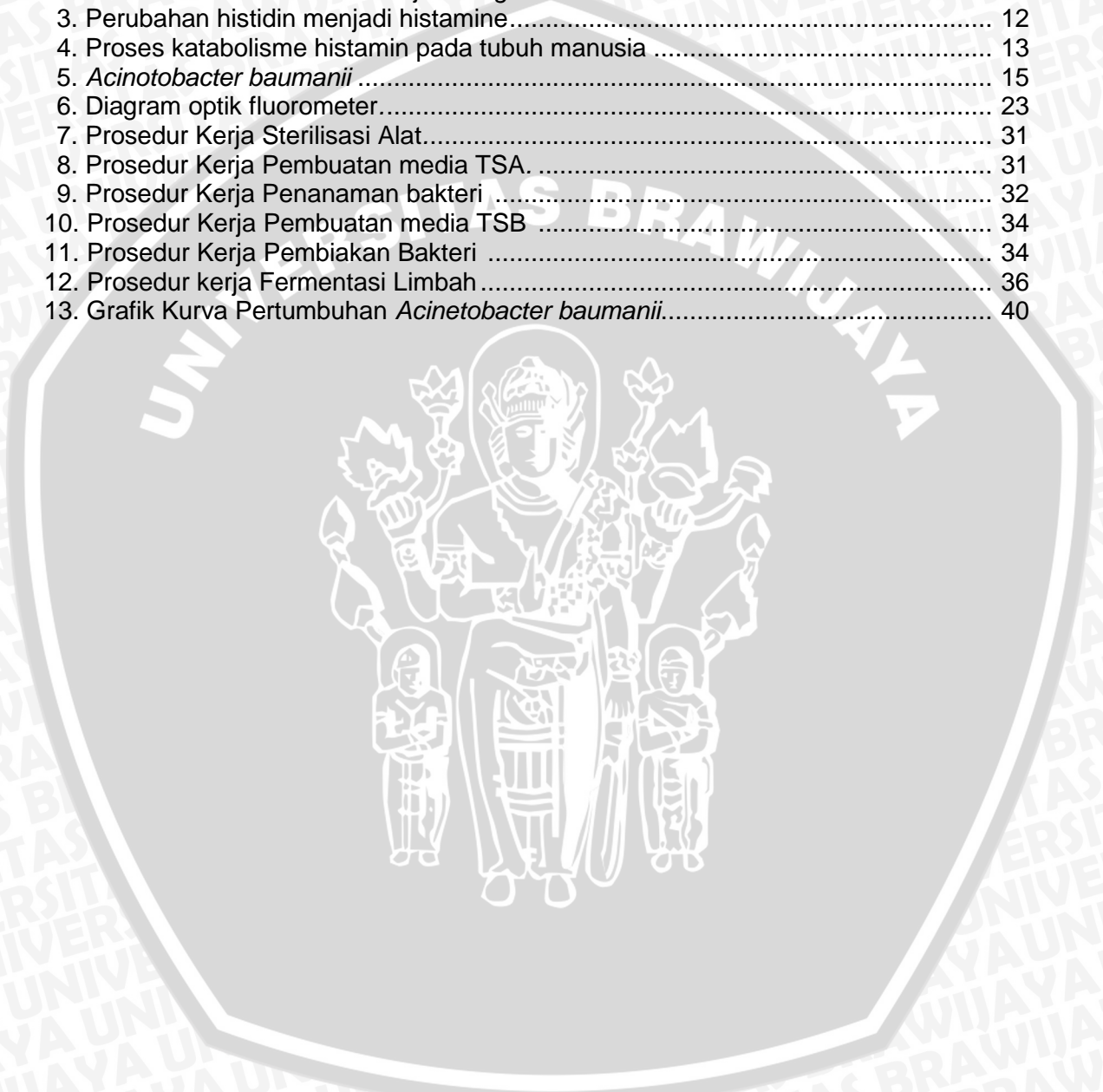
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rancangan Acak Lengkap pola faktorial yang digunakan pada penelitian.....	27
2. Data Hasil Degradasi Histidin menjadi Histamin oleh Bakteri <i>Acinetobacter baumannii</i> pada Limbah Cair Pemandangan Ikan Tongkol.....	41
3. Notasi Uji Jarak Duncan Kepadatan bakteri	42
4. Notasi Uji Jarak Duncan Lama Fermentasi.....	42
5. Notasi Uji Duncan Interaksi	42



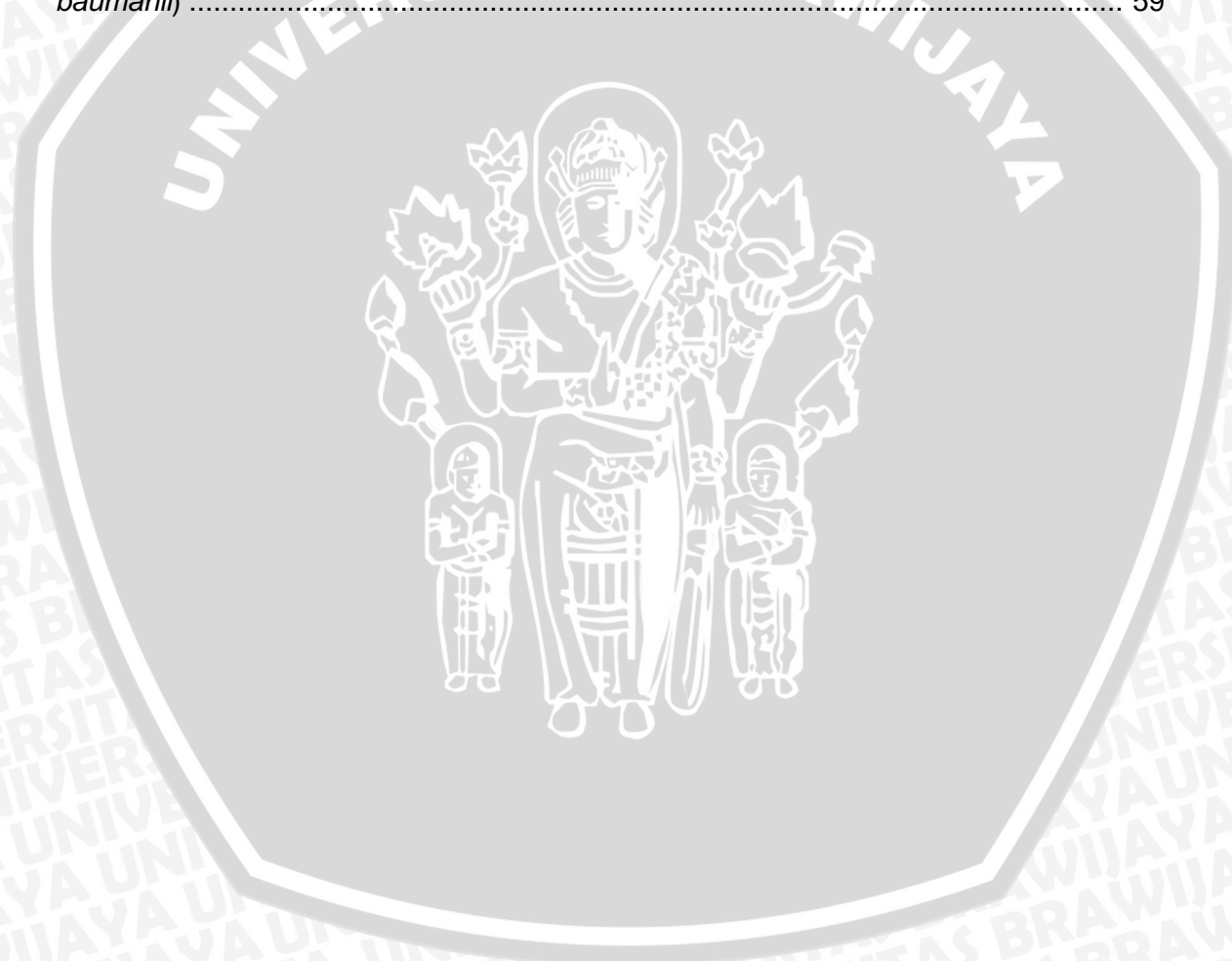
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ikan Tongkol (<i>Euthynnus affinis</i>).....	6
2. Perubahan asam amino menjadi <i>biogenik amin</i>	11
3. Perubahan histidin menjadi histamine.....	12
4. Proses katabolisme histamin pada tubuh manusia	13
5. <i>Acinetobacter baumannii</i>	15
6. Diagram optik fluorometer.....	23
7. Prosedur Kerja Sterilisasi Alat.....	31
8. Prosedur Kerja Pembuatan media TSA.....	31
9. Prosedur Kerja Penanaman bakteri	32
10. Prosedur Kerja Pembuatan media TSB	34
11. Prosedur Kerja Pemiakan Bakteri	34
12. Prosedur kerja Fermentasi Limbah	36
13. Grafik Kurva Pertumbuhan <i>Acinetobacter baumannii</i>	40



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil Pengujian Penelitian Pendahuluan Histamin.....	51
2. Hasil Regresi Penelitian Pendahuluan Histamin	52
3. Hasil Pengujian Uji Daya Hambat Bakteri Penghasil Inhibitor Protease (<i>Acinetobacter baumannii</i>) Terhadap Proses Degradasi Histidin menjadi Histamin pada Limbah Cair Pemindangan Ikan Tongkol (<i>Euthynnus affinis</i>)	53
4. Hasil Regresi Uji Daya Hambat Bakteri Penghasil Inhibitor Protease (<i>Acinetobacter baumannii</i>) Terhadap Proses Degradasi Histidin menjadi Histamin pada Limbah Cair Pemindangan Ikan Tongkol (<i>Euthynnus affinis</i>)	54
5. Hasil Pengukuran dan Analisa Statistik Histamin.....	55
6. Jumlah Pertumbuhan Bakteri Penghasil Inhibitor Protease (<i>Acinetobacter baumannii</i>)	59



1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pada beberapa jenis ikan, khususnya dari family scombroidae yang memiliki daging merah, kerusakan oleh aktivitas bakteri maupun enzim dapat menghasilkan racun yang disebut scambrotoksin. Scrombotoksin adalah toksin yang dihasilkan oleh aktivitas bakteri terutama pada ikan-ikan family scombroidae seperti tuna, cakalang, tongkol, marlin, makarel dan sejenisnya (Handy and smith, 1976). Kandungan histamine pada ikan segar umumnya dibawah 10 mg/ 100g (Ozogul et al,2004). Kandungan histamine antara 50 – 100 mg/ 100 g umumnya sudah dianggap berbahaya dan dapat mengakibatkan keracunan pada orang yang mengkomsumsi (Wangga,1995). Beberapa Negara telah menetapkan batasan kandungan histamine pada produk-produk perikanan, misalnya amerika serikat, Swedia dan Chekoslovakia menetapkan kandungan histamine maksimal 50 mg/ 100 g (Ababouch, 1991).

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 (Aflal et., all. 2006). Berbagai jenis bakteri yang mampu menghasilkan enzim histidin dekarboksilase (HDC) termasuk famili Enterobactericeae dan Bacillaceae (Staruszkiewicz 2002 dalam Allen 2004). Umumnya spesies *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klabsiella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, dan *Streptococcus* menunjukkan aktivitas dekarboksilase asam amino (Kanki et., all, 2002 dalam Allen 2004)

Enzim Protease berperan sebagai faktor virulensi pada proses metabolisme organisme patogen. Pada Bakteri patogen, enzim ini menyebabkan berbagai penyakit, seperti malaria, kanker, tumor, SARS, bahkan penyakit degeneratif yaitu Alzheimer (Suhartono, 2000). Suatu enzim protease dapat dihambat aktivitasnya menggunakan inhibitor protease. Melalui adanya kemampuan ini, menyebabkan inhibitor protease memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai komponen bioaktif dalam upaya mengurangi penyebaran penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen. Salah satu cara untuk mematahkan faktor virulensi bakteri tersebut adalah dengan menghambat kerja protease, atau dengan kata lain diperlukan suatu inhibitor protease bakteri tersebut. Potensi yang paling besar pada mikroba sebagai penghasil inhibitor protease menyebabkan peneliti mengkaji aspek tersebut. Inhibitor yang dihasilkan oleh mikroba antara lain inhibitor metallo protease yang dihasilkan oleh *Serratia marcescens*, *Streptomyces rishiriensis* dan *Aspergillus oryzae*, inhibitor sistein proteinase yang dihasilkan oleh *Glicladium sp.*, inhibitor alkalin dan thiol protease yang dihasilkan oleh *Alteromonas sp.* Penelitian-penelitian tersebut dilakukan oleh para peneliti di Jepang, Korea, dan Amerika dengan menggunakan mikroba yang berasal dari negaranya. Sementara penelitian inhibitor protease yang dilakukan oleh peneliti Indonesia menggunakan mikroba asal Indonesia sangat sedikit.

Produksi inhibitor protease ditentukan oleh konsentrasi NaCl dan pH media produksi. *Acinetobacter baumannii* menghasilkan inhibitor protease dengan aktivitas tertinggi setelah ditumbuhkan selama 28 jam pada media yang mengandung NaCl 2 % (w/v), dengan aktivitas sebesar 1,93 U/ml dan konsentrasi protein 0,101 mg/ml. pH 8 merupakan pH yang tepat bagi *A. baumannii* untuk menghasilkan inhibitor protease dengan aktivitas tertinggi sebesar 1,64 U/ml dan

konsentrasi protein 0,152 mg/ml dengan waktu produksi selama 20 jam. Inhibitor protease dihasilkan pada fase logaritmik (Nurhayati, dkk. 2006).

Selama ini penelitian untuk menurunkan kadar histamine pada ikan belum banyak dilakukan. Penelitian ini dilakukan dengan harapan dapat menurunkan kandungan histamine pada limbah cair pemindangan Ikan Tongkol (*Euthynnus affinis*) dengan cara penambahan Bakteri *Acinetobacter baumannii* yang diduga dapat menghambat Enzim Histidin Dekarboksilase. Dipilihnya Bakteri *Acinetobacter baumannii* dalam penelitian karena pada penelitian pendahuluan mampu menghambat kerja dari Enzim Histidin Dekarboksilase yang sebagai penyebab bertambahnya kandungan histamine pada ikan tongkol hasil limbah cair pemindangan.

1.2. Rumusan Masalah

Histamin merupakan senyawa yang penting dalam racun scromboid (racun yang ada didalam ikan jenis *scromboidae*) (Rodriguez *et al*, 1994). Perubahan histidin menjadi histamin disebabkan oleh reaksi enzim dekarboksilasi untuk dapat menurunkan kadar histamin maka diperlukan daya hambat yang digunakan untuk menghambat enzim dekarboksilase. Bakteri *Acinetobacter baumannii* mampu menghambat enzim dekarboksilase karena bakteri *Acinetobacter baumannii* mempunyai kandungan inhibitor protease yang mampu menghambat kerja dari enzim dekarboksilase. *A. baumannii* mampu menghasilkan inhibitor protease dengan aktivitas tertinggi sebesar 1,64 U/ml dan konsentrasi protein 0,152 mg/ml dengan waktu produksi selama 20 jam. Inhibitor protease dihasilkan pada fase logaritmik (Nurhayati, 2006)

Pada penelitian pendahuluan dengan menggunakan sampel Histidin, Histidin + Bakteri *Enterobacter gergoviae*, Histidin + Bakteri *Acinetobacter*

baumanii, Histidin + Bakteri *Acinetobacter baumannii* + Bakteri *Enterobacter gergoviae* masing-masing menghasilkan histamine sebesar 30.0336 mg/kg, 124.9233 mg/kg, 20.6714 mg/kg, 23.6248 mg/kg. Dapat disimpulkan bahwa Bakteri *Acinetobacter baumannii* mampu menghambat pertumbuhan enzim histidin dekarboksilase. Dari uraian tersebut didapatkan permasalahan sebagai berikut :

- Apakah bakteri *Acinetobacter baumannii* mampu menghambat Enzim Histidin dekarboksilase pada proses degradasi histidin menjadi histamin pada limbah cair hasil pemindangan ikan tongkol (*Euthynnus affinis*)?

1.3. Tujuan dan Kegunaan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui daya hambat Bakteri penghasil Inhibitor protease (*Acinetobacter baumannii*) dalam perubahan senyawa histidin menjadi histamin pada limbah cair hasil pemindangan ikan tongkol (*Euthynnus affinis*).

Kegunaan dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi kepada pihak-pihak yang berkepentingan tentang manfaat dari uji daya hambat bakteri penghasil inhibitor protease (*acinetobacter baumannii*) terhadap proses degradasi histidin menjadi histamine pada limbah cair hasil pemindangan ikan tongkol (*Euthynnus affinis*)

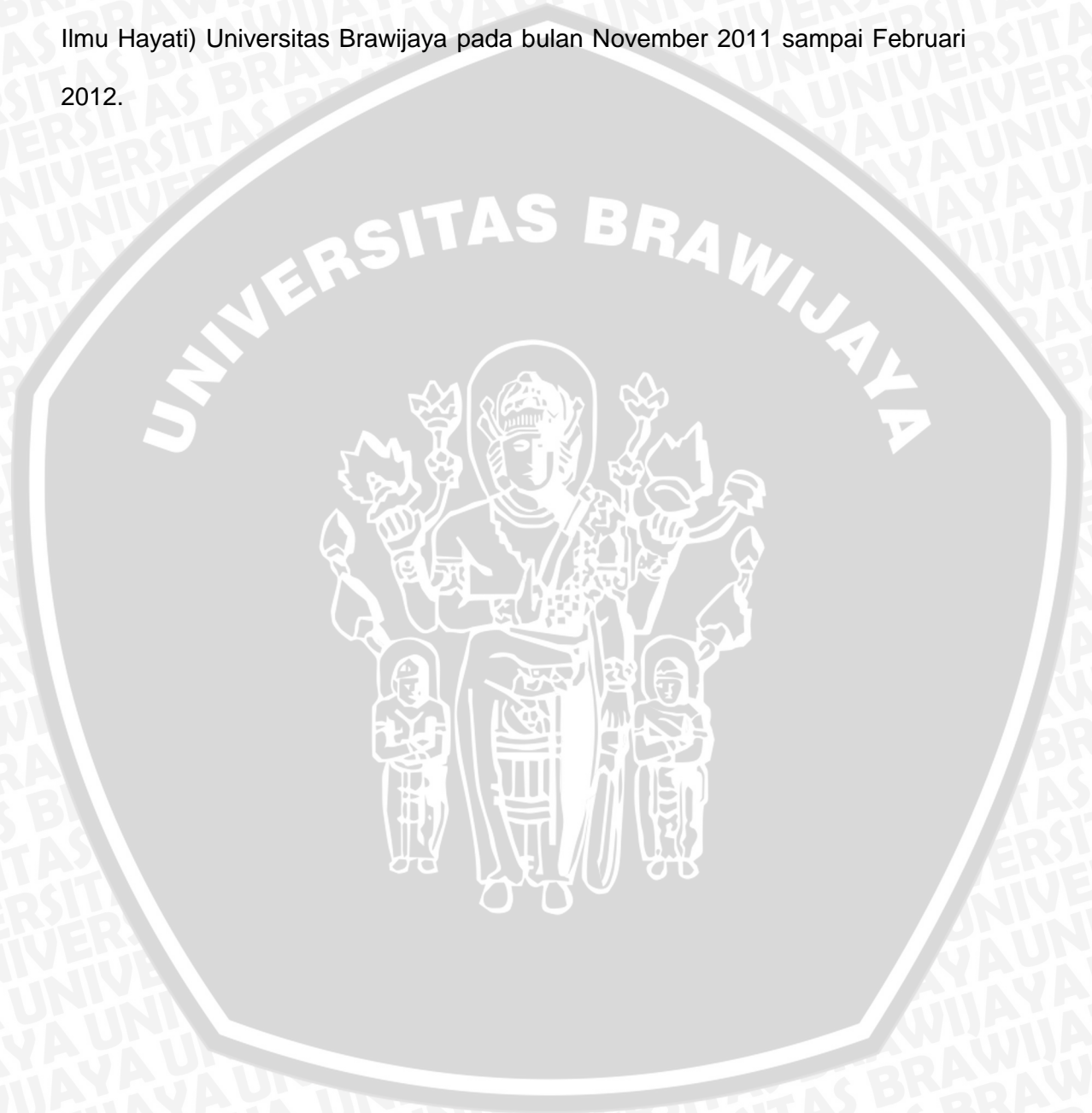
1.4. Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah:

Diduga Bakteri *Acinetobacter baumannii* dapat menghambat dalam perubahan senyawa histidin menjadi histamine yang disebabkan oleh Enzim *histidin dekarboksilase*.

1.5. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, BLPMHP (Balai Laboratorium Pengujian Mutu Hasil Perikanan) Banyuwangi dan LSIH (Laboratorium Sentral Ilmu Hayati) Universitas Brawijaya pada bulan November 2011 sampai Februari 2012.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ikan Tongkol (*Euthynnus affinis*)

Ikan Tongkol adalah jenis ikan pelagis yang merupakan salah satu komoditas utama ekspor Indonesia. Akan tetapi akibat pengelolaan yang kurang baik di beberapa perairan Indonesia, terutama disebabkan minimnya informasi waktu musim tangkap, daerah penangkapan ikan, disamping kendala teknologi tangkapnya itu sendiri, tingkat pemanfaatan sumber daya ikan menjadi sangat rendah.

2.1.1 Taksonomi Tongkol (*Euthynnus affinis*)

Ikan Tongkol Menurut Saanin (1971), klasifikasi Ikan Tongkol adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Sub Phylum	: Vertebrata
Class	: Pisces
Sub Class	: Teleostei
Ordo	: Percomorphi
Family	: Scombridae
Genus	: <i>Euthynnus</i>
Species	: <i>Euthynnus affinis</i>



Gambar 1. Ikan Tongkol (*Euthynnus affinis*)

2.1.2 Morfologi Tongkol (*Euthynnus affinis*)

Menurut Setiawan (1992), ikan tongkol memiliki ciri-ciri morfologis sebagai berikut: mempunyai bentuk badan *fusiform* dan memanjang. Panjang badan kurang lebih 3,4-3,6 kali panjang kepala dan 3,5-4 kali tinggi badannya. Panjang kepala kurang lebih 5,7-6 kali diameter mata. Kedua rahang mempunyai satu seri gigi berbentuk kerucut. Sisik hanya terdapat pada bagian korselet. Garis rusuk (*linea lateralis*) hampir lurus dan lengkap. Sirip dada pendek, kurang lebih hampir sama panjang dengan bagian kepala dibelakang mata. Jari-jari keras pada sirip punggung pertama kurang lebih sama panjang dengan bagian kepala

di belakang mata, kemudian diikuti dengan jari-jari keras sebanyak 15 buah. Sirip punggung kedua lebih kecil dan lebih pendek dari sirip punggung pertama. Permulaan sirip dubur terletak hampir di akhir sirip punggung kedua dan bentuknya sama dengan sirip punggung pertama. Sirip punggung pendek dan panjangnya kurang lebih sama dengan panjang antara hidung dan mata. Bagian punggung berwarna kelam, sedangkan bagian sisi dan perut berwarna keperak-perakan. Di bagian punggung terdapat garis-garis miring ke belakang yang berwarna kehitam-hitaman.

Anggawati *et al* (1984) melaporkan bahwa kandungan histamine pada produk pindang cakalang yang ada di pasaran cukup tinggi yaitu 72,48 – 89,16 mg/100 g. Sementara itu kandungan histamine pada ikan peda yang dilaporkan oleh Samianto *et al* (1984) sebesar 107,32- 133,43 mg/ 100g. Hasil Pengamatan kadar histamine ikan cakalang yang digunakan sebagai bahan baku pindang di Pelabuhan ratu sebesar 289,7 mg/100 g bahan dan 247,6 mg/100g pada produk pindangnya. Tingginya kadar histamine pada produk-produk tersebut dapat menyebabkan terjadinya keracunan histamine. Kandungan histamine pada ikan segar umumnya dibawah 10 mg/ 100g (Ozogul *et al*,2004). Kandungan histamine antara 50 – 100 mg/ 100 g umumnya sudah dianggap berbahaya dan dapat mengakibatkan keracunan pada orang yang mengkomsumsi (Wangga,1995).

2.2. Histamin

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).

Biogenik amin berkembang sebagai hasil dari dekarboksilasi gratis asam amino 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. beberapa diantaranya berperan dalam fungsi fisiologis tubuh manusia dan hewan, seperti regulasi suhu tubuh, volume lambung, pH lambung dan aktivitas otak (Munoz, 2008).

Amina biogenik diproduksi pada jaringan ikan oleh bakteri dari famili *Enterobacteriaceae*, seperti *Morganella*, *Klebsiella*, dan *Hafnia* yang menghasilkan enzim histidin decarboxylase. Apabila telah diproduksi enzim decarboxylase, maka akan terus menerus dihasilkan histamin meskipun pertumbuhan bakteri telah dihambat dengan suhu dingin hingga 4°C. Produksi histamin akan semakin meningkat meskipun telah disimpan pada ruangan pendingin (Sumner *et al.* 2004).

Dekarboksilasi histidin membentuk histamine, 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).

Berbagai jenis bakteri yang mampu menghasilkan enzim histidin dekarboksilase (HDC) termasuk famili *Enterobacteriaceae* dan *Bacillaceae* (Staruszkiewicz 2002 dalam Allen 2004). Umumnya spesies *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klabsiella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Photobacterium*,

Proteus, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, dan *Streptococcus* menunjukkan aktivitas dekarboksilase asam amino (Kanki *et al*, 2002 dalam Allen 2004)

Keracunan histamin (disebut juga sebagai *Scombroid fish poisoning*, *histamine poisoning* atau *pseudoallergic food poisoning*) adalah keracunan (sering pula dikategorikan sebagai keracunan oleh zat kimia) yang terjadi setelah mengkonsumsi makanan yang mengandung histamin atau senyawa amin yang lain. 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). Sedangkan menurut Hardy dan Smith (1976), keracunan histamine dapat di bagi dalam 3 kelompok yaitu (1) keracunan tingkat lemah, apabila mengkonsumsi histamine 8-40 mg/100 g daging ikan, (2) keracunan sedang, apabila mengkonsumsi 70-100 mg/100 g daging ikan, (3) keracunan kuat, apabila mengkonsumsi histamine 150-400 mg/100 g daging ikan selain itu menurut Ronald *et al* (1979), keracunan histamin jarang terjadi dan biasanya terjadi karena overdosis. Gejala utama yang timbul yaitu sakit kepala, diare, muntah-muntah, bibir bengkak dan rasa terbakar di tenggorokan.

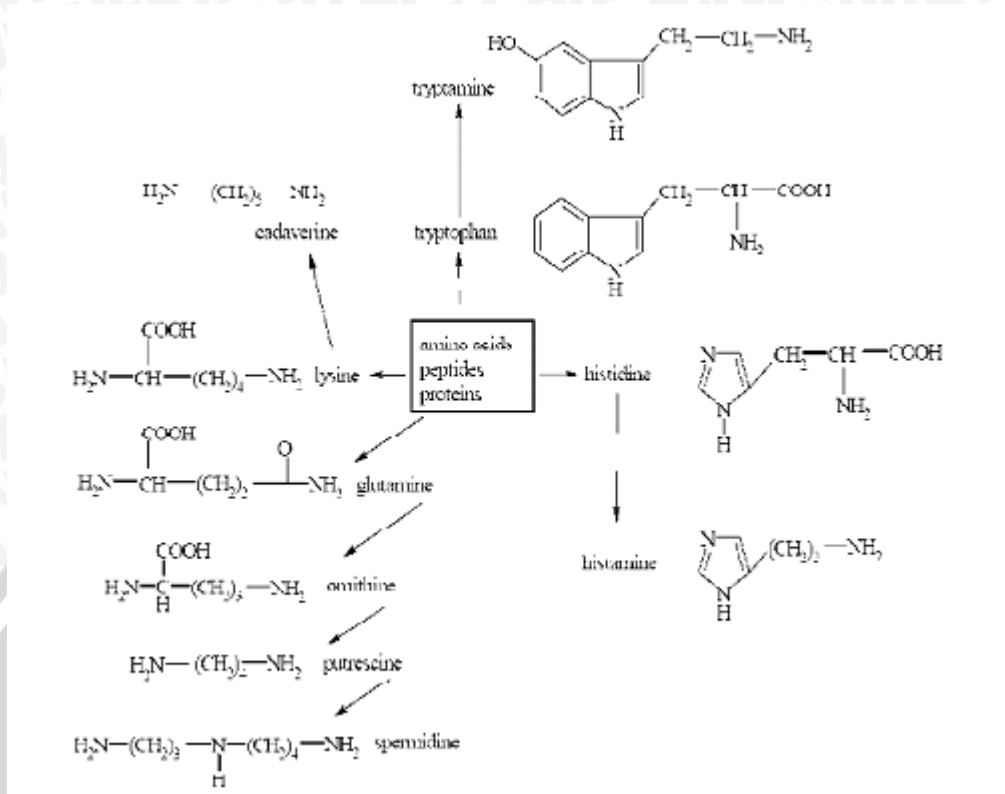
Histamin merupakan perubahan dari histidin yang terbentuk di dalam makanan karena aktivitas bakteri penghasil enzyme histidin dekarboksilase. Beberapa bakteri dilaporkan memiliki aktivitas histidin dekarboksilase yang terbatas, tetapi hanya *Proteus morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Hafnia alvei* 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).

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).

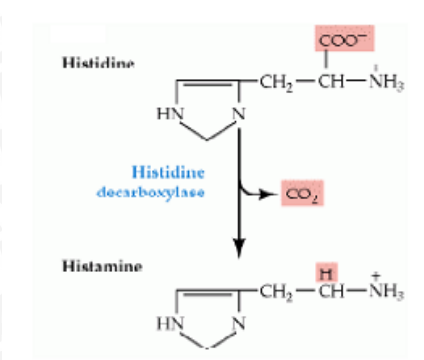
Histamin merupakan komponen yang kecil, mempunyai berat molekul rendah yang terdiri atas cincin imidazol dan sisi rantai etilamin. Histamin juga merupakan komponen yang tidak larut air. Histamin merupakan salah satu amin biogenik yang mempunyai pengaruh terhadap efek fisiologis manusia (Aflal *et al* 2006).





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

Histamin merupakan senyawa yang penting dalam racun scromboid (racun yang ada didalam ikan jenis *scromboidae*), tetapi gejalanya tidak tampak ketika diaplikasikan dengan obat anti-histamin. Histamin bukan hanya senyawa yang responsive untuk racun scromboid, karena tidak begitu beracun bila ikan tersebut dimakan secara langsung atau dalam keadaan segar. Racun histamin akan bertambah ketika bersama dengan senyawa amin yang lain, seperti putrescine dan cadaverin (Rodriguez *et al*, 1994). Dalam SNI (2009), histamin merupakan senyawa turunan dari asam amino histidin yang terbentuk karena tindakan bakteri yang memiliki enzim dekarboksilase.



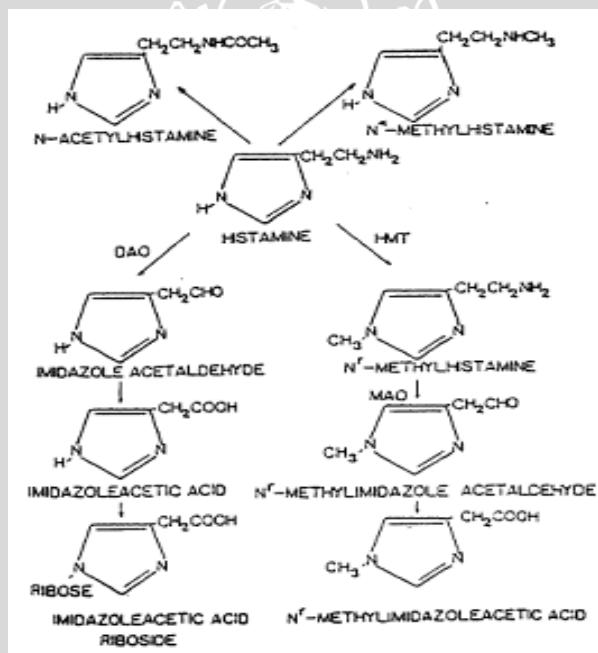
Gambar 3. Perubahan histidin menjadi histamin (Purves et.al. dalam widiastuti, 2001)

Histamin dihasilkan pada daging ikan melalui reaksi dekarboksilasi histidin bebas oleh bakteri yang mengandung enzim histidin dekarboksilase (Gambar 2), dengan suhu optimum untuk menghasilkan histamin adalah 25°C (Kim *et al*, 1999). Berbagai jenis bakteri yang mampu menghasilkan enzim histidin dekarboksilase (HDC) termasuk famili Enterobacteriaceae dan Bacillaceae (Staruszkiewicz 2002 dalam allen 2004). Pada penelitian ini digunakan bakteri dari famili Enterobacteriaceae adalah *Enterobacter gergoviae* dan dari famili Bacillaceae adalah *Bacillus subtilis*.

Konsumsi bahan pangan yang mengandung histamin dalam jumlah yang sedikit memberikan sedikit pengaruh pada manusia, tetapi konsumsi histamin dalam jumlah besar akan menyebabkan keracunan. Pada saluran pencernaan manusia mengandung enzim diamin oksidase (DAO) dan histamin N-metil transferase (HMT), yang mengubah histamin menjadi produk degradasi yang tidak berbahaya (Widiastuti, 2008).

Keberadaan histamin dalam jumlah besar dapat menyebabkan keracunan bahkan kematian bagi manusia yang mengkonsumsinya. Konsumsi makanan yang mengandung kadar histamin yang kecil akan memberikan efek yang kecil pula bagi tubuh manusia. Hal tersebut karena sistem intestinal tubuh manusia

mengandung enzim DAO (diamine oxidase) dan HMT (histamin N-methyl transferase) dimana akan mendegradasi histamin menjadi produk yang tidak berbahaya seperti : *imidazoleacetic acid*, *methylhistamine*, *methylimidazole acetic acid*, *imidazoleacetic acid riboside*, dan *acethylhistamine*. Kemampuan enzim DAO dan HMT di dalam tubuh manusia juga dapat dihambat oleh putresin dan kadaverin. Oleh karena itu konsumsi ikan tuna yang mengandung histamin dapat menyebabkan efek keracunan yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsumsi histamin secara murni (Lehane and Olley 1991 dalam Wicaksono 2009). Proses katabolisme histamin pada tubuh manusia dengan adanya enzim DAO dan HMT dapat ditunjukkan pada gambar 4.



Gambar 4. Proses katabolisme histamin pada tubuh manusia (Taylor 1986 diacu dalam Lehane dan Olley 1999 dalam Wicaksono 2009)

2.3 Bakteri Dekarboksilase

Berbagai jenis bakteri yang mampu menghasilkan enzim histidin dekarboksilase (HDC) termasuk famili *Enterobacteriaceae* dan *Bacillaceae* (Staruszkiewicz 2002 dalam Allen 2004). Umumnya spesies *Bacillus*, *Citrobacter*,

Clostridium, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pedococcus*, *Photobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, dan *Streptococcus* menunjukkan aktivitas dekarboksilase asam amino (Kanki *et al.* 2002 dalam Allen 2004). Histidin dekarboksilase (HDC) adalah enzim yang mengkatalis reaksi pada produksi histamin dari histidin dengan bantuan dari vitamin B6, digambarkan sebagai berikut : $C_6H_9N_3O_2 \rightarrow C_5H_9N_3 + CO_2$. Pada manusia, enzim histidin dekarboksilase disandikan oleh gen HDC. Biogenic amin 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. Enzim yang berkaitan adalah phridoxal phosphate (PDP) - dekarboksilase terikat dan merupakan enzim paling spesifik untuk substrat histidin (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.

2.4 Bakteri Inhibitor Protease

Bakteri merupakan organisme yang paling banyak jumlahnya dan lebih tersebar luas dibandingkan makhluk hidup lain. Bakteri memiliki ratusan ribu spesies yang hidup di darat hingga lautan dan pada tempat-tempat yang ekstrim. Bakteri ada yang menguntungkan tetapi ada pula yang merugikan. Bakteri memiliki ciri-ciri yang membedakannya dengan makhluk hidup yang lain. Bakteri adalah organisme uniseluler dan prokariot serta umumnya tidak memiliki klorofil dan berukuran renik (mikroskopis) (Adhie, 2007).

2.4.1 *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii adalah bakteri gram-negatif yang dapat tumbuh pada suhu 44 °C, menggunakan berbagai jenis karbohidrat sebagai sumber nutrisi, dan mampu melekat pada sel epitelial manusia. Karakteristik dari bakteri ini adalah aerobik, berbentuk koko-basil, dan dapat dengan cepat tahan (resisten) terhadap berbagai antibiotik (Wikipedia, 2010^a). Menurut Nurhayati (2006), *Acinetobacter baumannii* yang ditumbuhkan pada media produksi selama 28 jam mampu menghasilkan inhibitor protease dengan aktivitas tertinggi 1,93 U/ml. Inhibitor protease merupakan senyawa yang diproduksi dengan baik pada media fermentasi dalam kondisi ekstrim, yaitu pada saat semua nutrisi yang terkandung dalam media fermentasi tersebut sudah berkurang. Pada kondisi tersebut inhibitor protease diproduksi pada fase logaritmik sampai fase stationer.

Klasifikasi dari *Acinetobacter baumannii* dalam Wikipedia (2010) :

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Order	: Pseumodales
Family	: Morraaxellaceae
Genus	: <i>Acinetobacter</i>
Species	: <i>Acinetobacter baumannii</i>



Gambar 5. *Acinetobacter baumannii*

2.5 Fase Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai penambahan jumlah atau volume serta ukuran sel. Pada organisme prokariot seperti bakteri, pertumbuhan merupakan penambahan volume dan ukuran sel dan juga sebagai penambahan jumlah sel. Pertumbuhan sel bakteri biasanya mengikuti suatu pola pertumbuhan tertentu berupa kurva pertumbuhan sigmoid.

Perubahan kemiringan pada kurva tersebut menunjukkan transisi dari satu fase perkembangan ke fase lainnya. Nilai logaritmik jumlah sel biasanya

lebih sering dipetakan daripada nilai aritmatik. Logaritma dengan dasar 2 sering digunakan, karena setiap unit pada ordinat menampilkan suatu kelipatan-dua dari populasi. Kurva pertumbuhan bakteri dapat dipisahkan menjadi empat fase utama : fase lag (fase lamban atau lag phase), fase pertumbuhan eksponensial (fase pertumbuhan cepat atau log phase), fase stationer (fase statis atau stationary phase) dan fase penurunan populasi (decline). Fase-fase tersebut mencerminkan keadaan bakteri dalam kultur pada waktu tertentu. Di antara setiap fase terdapat suatu periode peralihan dimana waktu dapat berlalu sebelum semua sel memasuki fase yang baru.

2.5.1. Fase Lag

Setelah inokulasi, terjadi peningkatan ukuran sel, mulai pada waktu sel tidak atau sedikit mengalami pembelahan. Fase ini, ditandai dengan peningkatan komponen makromolekul, aktivitas metabolik, dan kerentanan terhadap zat kimia dan faktor fisik. Fase lag merupakan suatu periode penyesuaian yang sangat penting untuk penambahan metabolit pada kelompok sel, menuju tingkat yang setaraf dengan sintesis sel maksimum.

2.5.2. Fase Log/Pertumbuhan Eksponensial

Pada fase eksponensial atau logaritmik, sel berada dalam keadaan pertumbuhan yang seimbang. Selama fase ini, masa dan volume sel meningkat oleh faktor yang sama dalam arti rata-rata komposisi sel dan konsentrasi relatif metabolit tetap konstan. Selama periode ini pertumbuhan seimbang, kecepatan peningkatan dapat diekspresikan dengan fungsi eksponensial alami. Sel membelah dengan kecepatan konstan yang ditentukan oleh sifat intrinsic bakteri dan kondisi lingkungan. Dalam hal ini terdapat keragaman kecepatan pertumbuhan berbagai mikroorganisme. Waktu lipat dua untuk *E. coli* dalam kultur kaldu pada suhu 37°C, sekitar 20 menit, sedangkan waktu lipat dua minimal sel mamalia sekitar 10 jam pada temperatur yang sama.

Konstantan pertumbuhan spesifik dihitung dari data kelimpahan populasi pada hari ke-0 sampai pada puncak populasi dengan rumus (Fogg, 1965) :

$$K = \frac{\text{Log } W_t - \text{Log } W_0}{\Delta t}$$

Dimana :

- K : konstanta pertumbuhan spesifik
W_t : Jumlah populasi pada hari ke- t
W₀ : Jumlah populasi pada hari ke-0
Δt : waktu dari 0 – t (hari)

2.5.3. Fase Stasioner

Pada saat digunakan kondisi biakan rutin, akumulasi produk limbah, kekurangan nutrisi, perubahan pH, dan faktor lain yang tidak diketahui akan mendesak dan mengganggu biakan, mengakibatkan penurunan kecepatan pertumbuhan. Selama fase ini, jumlah sel yang hidup tetap konstan untuk periode yang berbeda, bergantung pada bakteri, tetapi akhirnya menuju periode penurunan populasi. Dalam beberapa kasus, sel yang terdapat dalam suatu biakan yang populasi selnya tidak tumbuh dapat memanjang, membengkak secara abnormal, atau mengalami penyimpangan, suatu manifestasi pertumbuhan yang tidak seimbang.

2.5.4. Fase Penurunan Populasi Atau Fase Kematian

Pada saat medium kehabisan nutrisi maka populasi bakteri akan menurun jumlahnya, Pada saat ini jumlah sel yang mati lebih banyak daripada sel yang hidup.

2.6 Inhibitor enzim

Pada prinsipnya, inhibitor enzim adalah komponen yang dapat menurunkan rata-rata pengukuran hidrolisis dari substrat yang diberikan. Lebih dari 100 jenis inhibitor alami telah berhasil diidentifikasi, dan lebih banyak lagi

jenis yang telah berhasil disintesis. Inhibitor protease memiliki berbagai macam bentuk dan sering dikelompokkan berdasarkan mekanisme reaksinya dan kesamaan strukturnya. Inhibitor enzim dibagi menjadi 3 kelas, yaitu pertama adalah inhibitor yang bereaksi dengan lebih dari satu kelas protein, kedua adalah inhibitor spesifik terhadap satu kelas proteinase dan ketiga adalah inhibitor yang memperlihatkan selektivitas yang tinggi terhadap satu jenis proteinase (Creighton, 1989)

Sebagian besar enzim bekerja pada jalur yang khusus dalam memperlihatkan berbagai macam fungsi biologis pada organisme. Inhibitor enzim sepertinya menjadi alat yang berguna didalam menganalisa fungsi tersebut, seperti mempelajari mekanisme reaksi dan struktur 3 dimensi dari enzim. Studi mengenai inhibitor enzim mungkin merupakan kunci untuk mengetahui berbagai aspek dari fenomena biologis dan banyak penyakit termasuk inflamasi, respon kekebalan tubuh, reaksi komlemen, karsinogenesis, metastasis, infeksi virus, penyakit autoimun, distrophi otot dan sebagainya. Karena berbagai kegunaannya dalam aktivitas farmakologis, beberapa dari inhibitor sedang dalam evaluasi untuk dimanfaatkan sebagai obat (Aoyagi dan Takeuchi, 1989)

2.6.1 Mekanisme Kerja inhibitor enzim

Senyawa penghambat (inhibitor) enzim dapat dibagi menjadi dua jenis yaitu yang bekerja secara tidak dapat balik (*irreversible*) dan dapat balik (*reversible*). Inhibitor enzim tidak dapat balik adalah golongan yang bereaksi dengan atau merusak suatu gugus fungsional pada molekul enzim yang penting bagi aktivitas katalitiknya. Suatu contoh dari inhibitor tidak dapat balik adalah senyawa diidopropilfluorofosfat (DFP), yang menghambat enzim asetil kolinesterase, yang penting di dalam transmisi impuls syaraf (Sabana, 2004).

Senyawa inhibitor enzim dapat balik (*reversible*) adalah golongan inhibitor yang reaksi penghambatannya dapat dibalikkan. Terdapat dua jenis inhibitor enzim dapat balik, yaitu bersifat kompetitif dan non kompetitif. Suatu inhibitor kompetitif berlomba dengan substrat untuk berikatan dengan sisi aktif enzim, tetapi sekali terikat tidak dapat diubah oleh enzim tersebut. Ciri inhibitor kompetitif adalah penghambatan ini dapat dibalikkan atau diatasi dengan meningkatkan konsentrasi substrat. Pada penghambatan non kompetitif, inhibitor berikatan pada sisi enzim selain sisi tempat substrat berikatan, mengubah konformasi molekul enzim, sehingga mengakibatkan inaktivasi dapat balik sisi katalitik. Inhibitor non kompetitif yang paling penting adalah senyawa antara metabolit yang terdapat di alam, yang dapat berikatan secara dapat balik dengan sisi spesifik pada enzim pengatur tertentu, dan karenanya mengubah aktivitas sisi katalitiknya (Sabana, 2004).

2.6.2 Inhibitor protease dari mikroba

Inhibitor enzim telah mendapat perhatian yang utama tidak hanya sebagai alat yang berguna untuk mempelajari struktur enzim dan mekanisme rekasinya, tetapi juga merupakan substansi yang berpotensi memiliki kegunaan farmakologis. Banyak diantara inhibitor enzim yang telah dikembangkan dan berguna didalam diagnosa dan terapi inflasi, pankreatik dan penyakit yang disebabkan oleh protease (Sabana, 2004).

Penelitian lebih lanjut menunjukkan telah banyak inhibitor protease yang berhasil diisolasi dari mikroba dan digunakan untuk mempelajari mekanisme enzimatik dan aktifitas farmakologis. Inhibitor metalloproteinase seperti phosphorhamidon (Matubara *et al*, 1973 dalam Murao *et al*, 1982) telah berhasil diisolasi dari kultur filtrat *Actinomycetes*. Penelitian lebih lanjut terhadap FMPI yang dilakukan oleh Murao *et al* (1982) menunjukkan adanya potensi aktivitas

penghambatan terhadap metalloproteinase dari beberapa bakteri seperti *Bacillus thermoproteolyticus* (thermolisin) dan *P. Aeruginosa* (Fukuhara *et al* dalam Murao *et al*, 1982).

Serratia marcescens menghasilkan protein inhibitor metalloprotease yang dikenal dengan nama SmaPI. Inhibitor tersebut dihasilkan dalam jumlah kecil menunjukkan penghambatan terhadap metalloprotease *S. Marcescens* yang mempunyai berat molekul 50 kDa. SmaPI stabil dalam air rebusan selama 30 menit dan mempunyai penghambatan yang spesifik terhadap metalloprotease yang berasal dari *S. Marcescens* (Kim *et al*,1995)

Murao *et al.* (1982) melakukan isolasi inhibitor metalloprotease yang dihasilkan oleh mikroba *Streptomyces rishiriensis*. Inhibitor tersebut menunjukkan aktivitas yang baik dengan nama fungal metalloproteinase inhibitor (FMPI). Inhibitor tersebut memperlihatkan aktivitas yang baik terhadap metalloproteinase dari *Aspergillus oryzae* dan mempunyai aktivitas sedang terhadap mikroba lainnya. FMPI mempunyai berat molekul yang rendah dan stabil pada pH alkali (>11).

Inhibitor protease juga berhasil ditemukan dari mikroba yang berasal dari laut seperti yang dilaporkan oleh Imada *et al* (1985a), dan Imada (200). Dari strain penghasil inhibitor yang diperoleh, seluruh strain bersifat aerob, mempunyai flagelle, gram negatif, mempunyai kandungan G+C yang rendah pada DNA nya. Mikroba tersebut membutuhkan NaCl untuk pertumbuhannya. Seluruh strain menghidrolisis kasein, DNA, gelatin dan starch. Berdasarkan hasil identifikasi menunjukkan bahwa mikroba tersebut adalah *Altromonas sp.*, Strain B-10-31 adalah untuk membedakan 2 strain lainnya (Imada *et al*,1985a; Imada, 2000)

Senyawa inhibitor yang dihasilkan oleh bakteri jenis *Altromonas sp.* B-10-31 dikenal dengan nama Marinostatin (Imada *et al.*,1985a). Inhibitor ini mempunyai sifat-sifat stabil pada suasana asam (pH 4-6) tetapi kurang stabil pada pH alkali (pH 10). Adanya logam Cu^{2+} dan Fe^{2+} menghambat aktivitasnya sebesar 30 dan 50 %. Inhibitor ini mempunyai pengaruh terhadap serin protease seperti Aurantioidae-Chymotrypsin (Imada *et al.*, 1986 dan Imada, 2000). Selain senyawa Marinostatin, telah ditemukan pula senyawa inhibitor lain yang dihasilkan oleh *Altromonas sp.* Yang dikenal dengan nama Monastatin yang mempunyai berat molekul tinggi yaitu 20.000 dalton. Inhibitor tersebut termasuk glikoprotein, stabil pada suhu sampai 100°C selama inkubasi 30 menit dengan kehilangan aktivitas sebesar 20 %, stabil pada pH 2-12. Aktivitasnya dihambat oleh ion Cu^{2+} dan Fe^{2+} . Monastatin mempunyai aktivitas penghambatan terhadap thiol protein seperti papain dan ficin (Imada *et al.*, 1985 b).

Berbagai jenis inhibitor enzim pada mikroba telah berhasil ditemukan oleh aoyagi dan Takeuchi (1989). Substansi tersebut menghambat secara spesifik berbagai jenis enzim seperti; proteinase serine, cystein, aspartat dan logam, aminopeptidase, dipeptidil aminopeptidase, karboksil peptidase dan Inhibitor tersebut memiliki berat molekul rendah dan struktur yang unik.

2.6.3 Mekanisme kerja Inhibitor protease dari mikroba

Senyawa antimikroba merupakan salah satu produk metabolik sekunder. Ada beberapa kondisi yang mempengaruhi metabolit sekunder yaitu: keterbatasan nutrisi yang tersedia dilingkungan tumbuh suatu bakteri, penambahan senyawa penginduksi dan penurunan kecepatan pertumbuhan. Umumnya metabolit sekunder tidak terbentuk jika lingkungan tumbuh mengandung cukup nutrisi untuk pertumbuhan bakteri karena senyawa tersebut

bukan unsur esensial bagi pertumbuhan dan reproduksi sel. Ketika isolat bakteri tersebut berada pada fase pertumbuhan (fase logaritma), bakteri melakukan aktivitas pembelahan sel dengan mengonsumsi nutrisi yang tersedia pada media tumbuh. Ketika nutrisi mulai berkurang bakteri akan memasuki fase stasioner dan fase ini diduga terjadi pembentukan senyawa metabolit sekunder yang bersifat antimikroba. Aktivitas antimikroba yang terbentuk setelah memasuki fase stasioner dimungkinkan mengikuti mekanisme *quorum sensing*. Quorum sensing merupakan sistem komunikasi antar sel untuk merespon perubahan lingkungan. Komunikasi antar sel bakteri tersebut berperan penting dalam proses adaptasi terhadap kondisi lingkungan sekitar. Salah satu bentuk respon yang ditunjukkan bakteri adalah pembentukan senyawa metabolit sebagai bentuk pertahanan melawan mikroba lain dan menghindari senyawa toksik yang memiliki potensi bahaya pada bakteri tersebut. Salah satu contoh pemanfaatan *quorum sensing* adalah pembentukan antibiotik phenazine oleh *Pseudomonas aureofaciens*. Pemecahan sel dapat dilakukan pada saat maserasi bakteri pada media tumbuh, konsekuensi dari keadaan tersebut adalah sel akan menggunakan energi berupa ATP untuk memompa proton keluar sel. Jumlah ATP yang digunakan berbanding lurus dengan jumlah proton keluar sel. Kondisi ini yang menyebabkan terjadinya hambatan pertumbuhan karena sel kekurangan energi. Ketika sel tidak cukup memiliki ATP untuk memompa proton keluar sel maka terjadi akumulasi proton di dalam sel dan menyebabkan lisis sel (Nofiani *et al*, 2009).

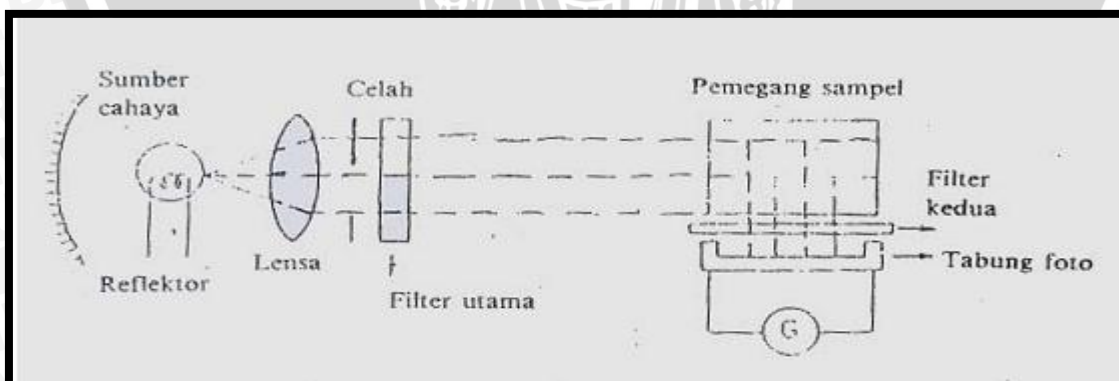
2.7 Spektrofluorometri

Spektrofluorometri adalah metode analisis kimia kuantitatif yang berdasarkan fluorescensi. Fluorescensi dan fosforescensi 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).

Menurut Wanenoor (2010), 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.

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



Gambar 6. Diagram optik fluorometer

Menurut Wanenoor (2010) peralatan pokok spektrofotometer adalah :

- Sumber spectrum 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 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).

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan utama dan isolat bakteri murni bakteri Dekarboksilase (*Enterobacter gergoviae*) dan Penghasil Inhibitor Protease (*Acinetobacter baumannii*). Bahan biakan murni bakteri didapat dari lingkungan perairan limbah pemindangan yaitu *Acinetobacter baumannii* dan *Enterobacter gergoviae* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Bahan utama yang digunakan adalah limbah pemindangan ikan tongkol. Bahan lain yang digunakan pada saat fermentasi adalah Aquades, kapas, Aluminium foil, es. Sedangkan untuk pengujian histamin dibutuhkan : metanol, aquadest, *glasswool*, NaOH 1 N, HCl 0,1 N, *Orto-ptalatdikarbosildehyd* (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.

3.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari peralatan pengambilan sampel, peralatan pembiakan bakteri dan peralatan analisa. Peralatan pengambilan sampel, adalah *coolbox*. Peralatan pembiakan dan pengenceran bakteri, antara lain : kulkas, laminar flow, tabung reaksi tertutup, rak tabung reaksi, erlenmeyer, pipet volum, beaker glass, timbangan digital, gelas arloji, jarum osse, laminaran, gelas ukur, spatula, bunsen, botol semprot, nampan, inkubator, autoklaf. Peralatan Fermentasi Bakteri adalah Erlenmeyer, pipet serologis, bila hisap, waterbath shaker, *coolbox*. 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, *reservoir* 2 cm x 5 cm; labu takar 25 ml, 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml; pipet *volumetric*, spektrofotometer, *stirrer-plate*, tabung reaksi 5 ml bertutup, timbangan analitis, *waterbath*.

3.3. Metode Penelitian

Metode yang digunakan adalah metode eksperimental. Penelitian yang bersifat menerangkan dapat berbentuk eksperimen seperti keadaan dalam laboratorium ilmu ekstrata (koenjaraningrat, 1991). Eksperimen adalah mengadakan kegiatan percobaan untuk melihat sesuatu hasil. Hasil itu yang akan menegaskan bagaimana kedudukan hubungan klausal antara variabel-variabel yang diselidiki (Surakhmad, 1998).

Ada empat alasan didalam melaksanakan eksperimen yaitu untuk menentukan hubungan antara dua variabel, meningkatkan reliabilitas terhadap penemuan yang telah diperoleh dan untuk menguji teori (Ghony, 1998)

3.3.1. Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilakukan dengan metode percobaan faktorial menggunakan rancangan dasar Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 faktor dan 3 kali pengulangan. Faktor pertama adalah konsentrasi bakteri, yaitu dengan konsentrasi (S_1) 0 ml, (S_2) 0,5 ml, (S_3) 1 ml, (S_4) 1,5 ml. Faktor kedua adalah lama waktu fermentasi (T_1) 24 jam, (T_2) 48 jam. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Desain perlakuan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rancangan Acak Lengkap pola faktorial yang digunakan pada penelitian.

Perlakuan		Ulangan		
Konsentrasi bakteri	Lama waktu (jam)	1	2	3
0 ml (S ₁)	24 (T ₁)	S ₁ T ₁ U ₁	S ₁ T ₁ U ₂	S ₁ T ₁ U ₃
	48 (T ₂)	S ₁ T ₂ U ₁	S ₁ T ₂ U ₂	S ₁ T ₂ U ₃
0,5 ml (S ₂)	24 (T ₁)	S ₂ T ₁ U ₁	S ₂ T ₁ U ₂	S ₂ T ₁ U ₃
	48 (T ₂)	S ₂ T ₂ U ₁	S ₂ T ₂ U ₂	S ₂ T ₂ U ₃
1 ml (S ₃)	24 (T ₁)	S ₃ T ₁ U ₁	S ₃ T ₁ U ₂	S ₃ T ₁ U ₃
	48 (T ₂)	S ₃ T ₂ U ₁	S ₃ T ₂ U ₂	S ₃ T ₂ U ₃
1,5 ml (S ₄)	24 (T ₁)	S ₄ T ₁ U ₁	S ₄ T ₁ U ₂	S ₄ T ₁ U ₃
	48 (T ₂)	S ₄ T ₂ U ₁	S ₄ T ₂ U ₂	S ₄ T ₂ U ₃

3.3.2. Analisis Data

Data yang diperoleh ditabulasi berdasarkan model analisis ragam (ANOVA), dan apabila ada perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (Sastrosupadi, 2000).

3.3.3. Variabel

Variabel adalah segala sesuatu yang menjadi obyek penelitian dimana mengandung perbedaan antara obyek satu dengan obyek yang lainnya (muhammad, 1991). Variabel dibedakan menjadi variabel bebas dan variabel tergantung. Variabel bebas adalah variabel yang variasinya mempengaruhi variabel lain (variabel tergantung). Variabel ini dipilih dan sengaja dimanipulasi oleh peneliti agar efeknya terhadap variabel lain tersebut dapat diamati dan diukur. Variabel tergantung adalah variabel penelitian yang diukur untuk mengetahui besarnya efek atau pengaruh variabel bebas (Aswar, 1997). Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Konsentrasi Bakteri dan Lama Fermentasi. Variabel tergantung adalah Uji Histamin.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengambilan Sampel Limbah Cair

Limbah cair yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari limbah industri pemindangan ikan yang diperoleh dari Desa Sendangbiru, Kabupaten Malang, Propinsi Jawa Timur. Sampel langsung diambil dari bak penampungan hasil perebusan limbah pemindangan ikan tongkol. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam botol jerigen dan dibawa menuju laboratorium. Setelah sampai di laboratorium limbah hasil pemindangan kemudian disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit yang berfungsi untuk menghilangkan kotoran-kotoran atau garam yang terdapat dalam limbah agar didapatkan histamin yang dalam keadaan murni. Setelah itu, sampel dimasukkan kedalam lemari pendingin agar komponen sampel yang akan diuji tidak bereaksi.

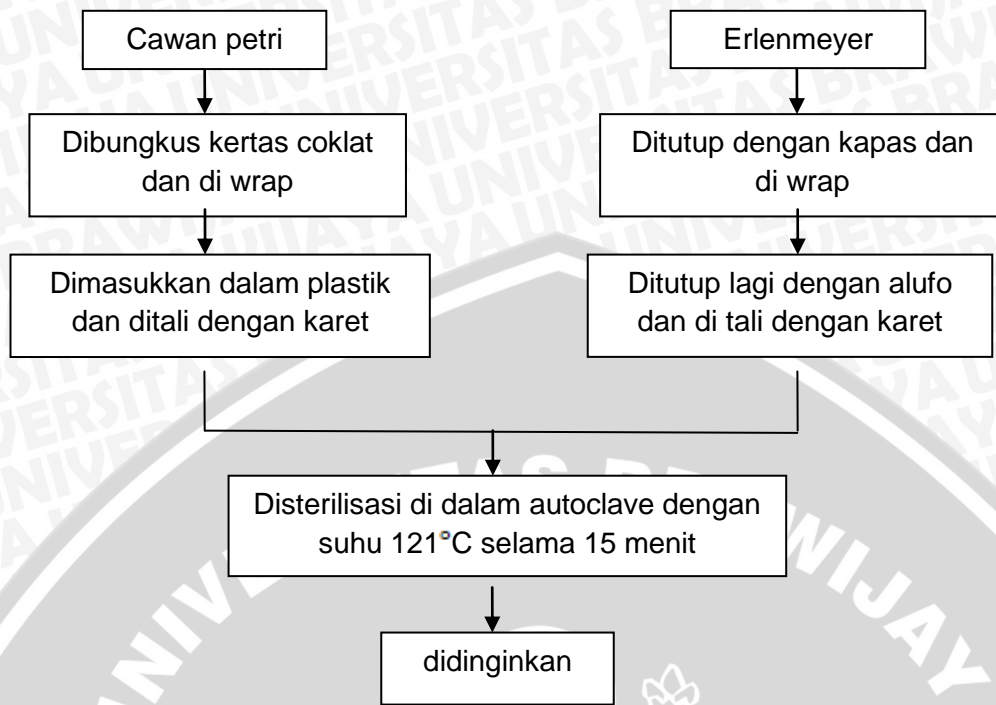
3.4.2 Penanaman Bakteri *Acinetobacter baumannii*

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., all*,1999). Selain itu alat yang harus disterilkan yaitu laminaran, dengan cara menyemprot bagian dalamnya dengan cairan aseptis (alkohol 70%), kemudian lap semua bagiannya menggunakan tissue hingga bersih agar aseptis, ditutup kaca laminaran dan menekan tombol UV untuk menghidupkan sinar UV pada alat yang berfungsi sebagai pensteril laminaran selama 1 jam. Sambil menunggu laminaran selesai disterilkan,

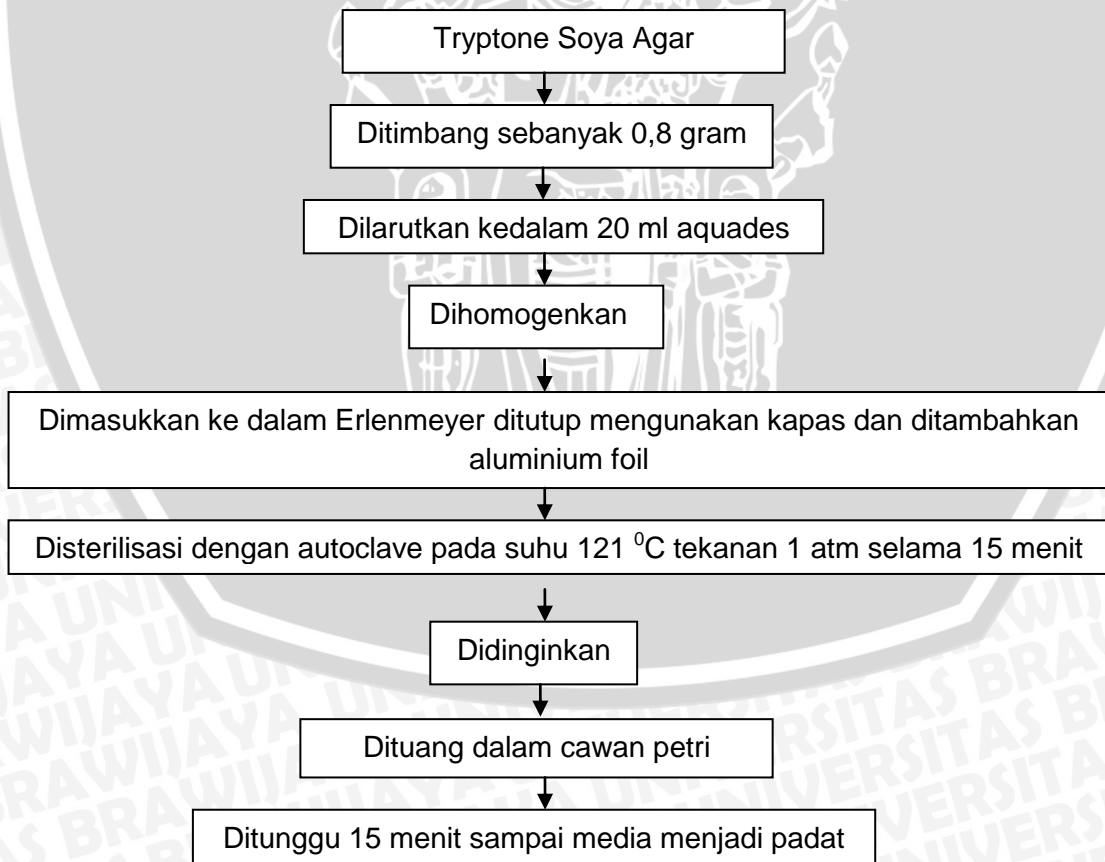
kemudian membuat larutan untuk penanaman bakteri *Acinetobacter baumannii* yaitu media TSA. Komposisi media TSA (Tryptone Soya Agar) adalah Tryptone 15 gr, Soya peptone 5 gr, Sodium chloride 5 gr, Agar 15 gr. Media TSA (Tryptone Soya Agar) digunakan untuk penanaman dan pemeliharaan berbagai mikroorganisme (Atlas, 2005). Pertama-tama yang dilakukan untuk pembuatan larutan TSA yaitu menimbang media TSA sebanyak 0,8 gram menggunakan timbangan digital. Kemudian media TSA dimasukkan kedalam Erlenmeyer 250 ml dan diberi aquadest sebanyak 20 ml, lalu diaduk dengan spatula sambil dipanaskan diatas hotplate sampai homogen. Setelah pembuatan larutan untuk penanaman bakteri selanjutnya sterilisasi alat yaitu cawan petri yang dibungkus dengan sampul coklat kemudian dimasukkan dalam plastik yang tahan panas tujuan dimasukkan dalam plastik agar uap yang ada pada autoclave tidak masuk kedalam cawan petri, erlenmeyer 250 ml yang ditutup dengan menggunakan kapas kemudian di wrap dan ditutup lagi menggunakan aluminium foil dan diikat dengan menggunakan karet yang tahan sterilisasi, hal ini bertujuan agar tidak terjadi kontaminasi, botol 100 ml yang dibungkus dengan sampul coklat dibungkus dalam plastik dan diikat dengan karet. Setelah itu disterilkan menggunakan autoclave 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 cawan petri tidak menguap, bila dicawan petri terjadi penguapan maka akan terjadinya spreader pada cawan petri.

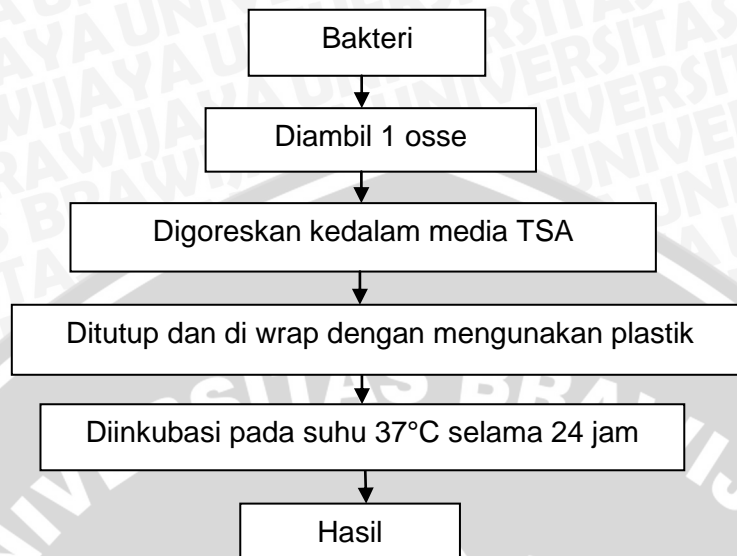
Setelah 1 jam, sinar UV pada laminaran dimatikan lalu lampu laminaran dinyalakan untuk memudahkan penglihatan pada saat penanaman bakteri. Laminaran bagian dalam disemprot dengan alkohol agar aseptis. kemudian tangan yang telah dipasang dengan sarung tangan disemprot juga agar tidak ada

kontaminasi saat penanaman bakteri. Kemudian bunsen dinyalakan dan diletakkan ke dalam laminaran beserta bakteri *Acinotebacter baumannii* dan media padat yang diletakkan di erlenmeyer 250 ml. Lalu ose pada bagian ujungnya disemprot dengan alkohol dan dipanaskan diatas bunsen sampai ose menyala. Hal tersebut dilakukan untuk menghindari kontaminasi alat pada saat penanaman bakteri. Sebelum dilakukan penanaman bakteri media TSA yang telah hangat dituang ke dalam cawan petri dan ditunggu 30 menit sampai TSA berbentuk padat. Setelah TSA berbentuk padat kemudian dilakukan penanaman bakteri, diambil sampel bakteri yang akan ditanam, dibuka sedikit tutup cawan petri sambil dipanaskan diatas bunsen untuk menjaga kondisi tetap aseptis. Ose disentuhkan di media TSA untuk mengurangi panas dari ose sehingga bakteri yang diambil tidak mati. Selanjutnya yaitu mengambil sebanyak 1 ose bakteri dengan cara mencelupkan jarum ose ke dalam bakteri media cair dan digoreskan kedalam media TSA yang telah disiapkan . Bakteri yang telah diinokulasi pada media baru, dipanaskan lagi diatas bunsen bagian permukaan tabung reaksinya dan segera ditutup. Ose dipanaskan diatas bunsen lagi bagian ujungnya agar kembali steril saat digunakan untuk membiakkan bakteri yang lain. Sebelum dimasukkan didalam inkubator cawan petri di wrap dengan menggunakan plastik wrap agar tidak terjadi kontaminasi, setelah itu diinkubator dalam suhu 37^o C selama 24 jam. Setelah diinkubator, dilihat koloni bakteri pada media, dimana ada yang bergerombol menyatu dan ada yang terpisah, yang terpisah itu dijadikan biakan untuk dibiakan dalam media cair TSB. Prosedur kerja sterilisasi alat, pembuatan media cair dan penanaman bakteri dapat dilihat pada gambar 7, 8, dan 9.



Gambar 7. Prosedur Kerja Sterilisasi Alat



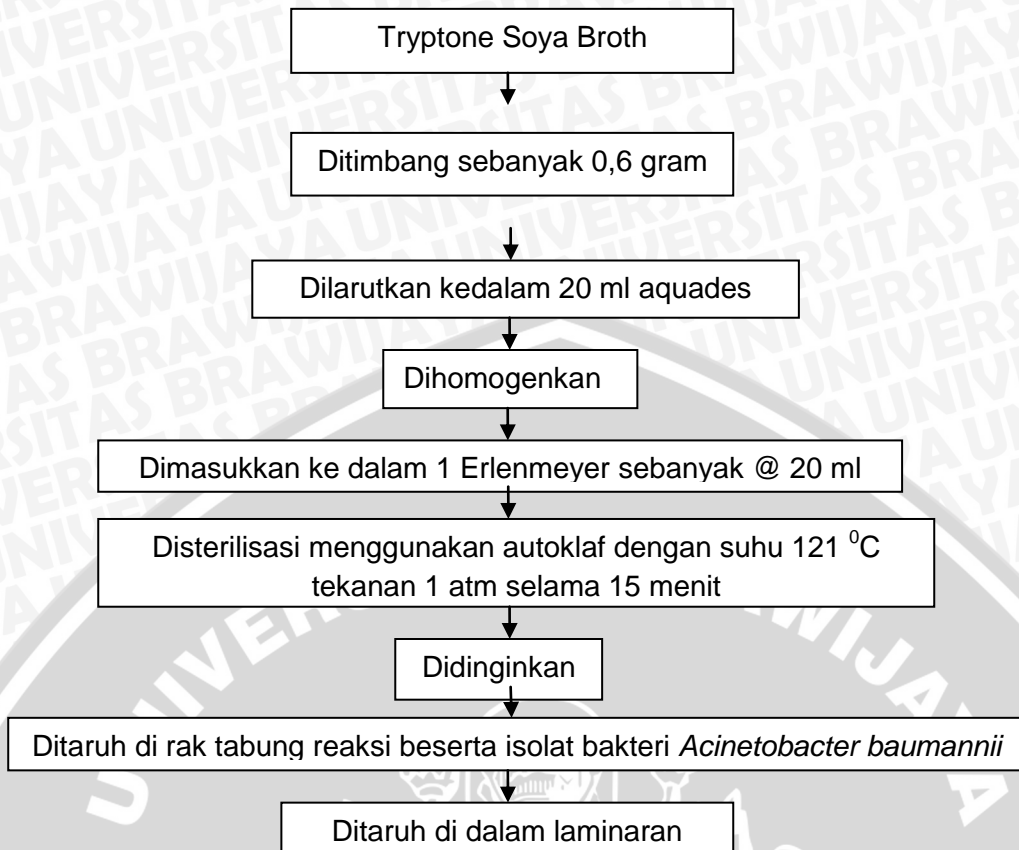
Gambar 8. Pembuatan media TSA**Gambar 9. Penanaman Bakteri**

3.4.3 Pemiakan Bakteri

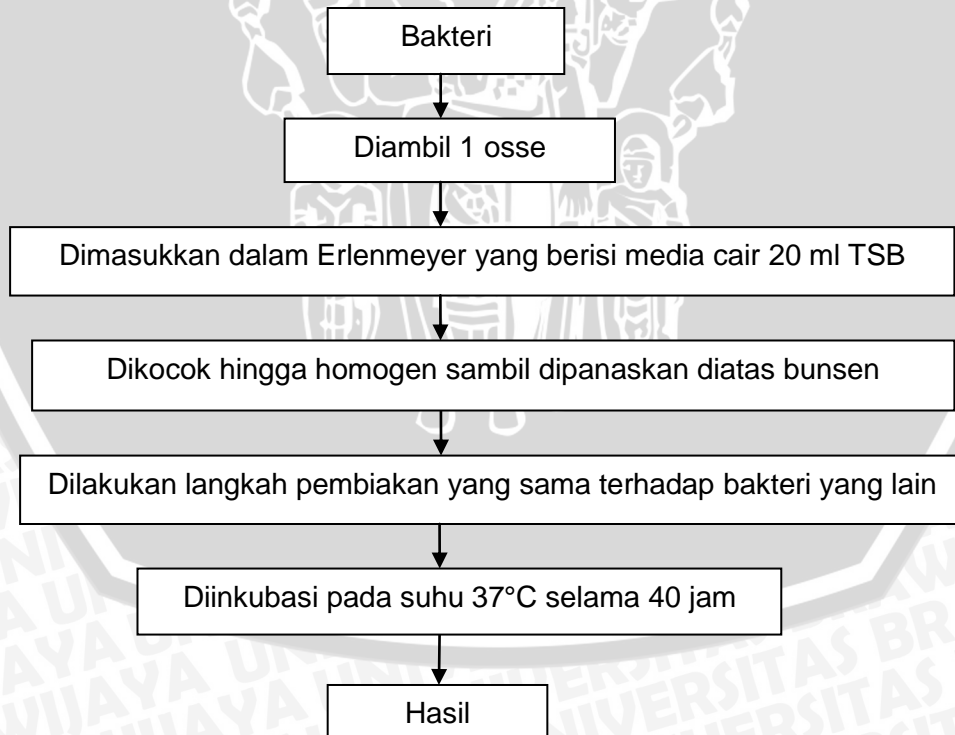
Laminaran yang akan digunakan sebagai tempat pembiakan bakteri disterilkan dengan cara menyemprot bagian dalamnya dengan cairan aseptis (alkohol 70%), kemudian di lap semua bagiannya menggunakan serbet bersih agar aseptis, ditutup kaca laminaran dan menekan tombol UV untuk menghidupkan sinar UV pada alat yang berfungsi sebagai pensteril laminaran selama 1 jam. Langkah pertama yang dilakukan adalah membuat larutan pengenceran yaitu dengan menimbang TSB menggunakan timbangan digital sebanyak 0,6 gram. Komposisi media TSB (Tryptone Soya Broth) adalah Pancreatic digest of casein 17 gr, Papaic digest of soybean meal 3 gr, Sodium chloride 5 gr, Potassium phosphate 2,5 gr, Glukosa 2,5 gr. Media TSB (Tryptone Soya Broth) digunakan untuk pembiakkan berbagai jenis mikroorganisme (Atlas, 2010). Setelah media ditimbang kemudian TSB dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml dan diberi aquades sebanyak 20 ml ditutup dengan menggunakan kapas dan ditutup lagi

dengan menggunakan aluminium foil kemudian ditali dengan menggunakan karet, lalu di aduk hingga homogen menggunakan spatula dan di kompor listrik sampai mendidih. Erlenmeyer tertutup yang berisi media cair disterilkan menggunakan autoclave dengan suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit dengan tujuan menghilangkan kontaminan yang ada pada media. Setelah disterilisasi, media cair didiamkan sampai dingin agar erlenmeyer tidak pecah ketika diberi perlakuan lebih lanjut.

Sinar UV pada laminaran dimatikan setelah 1 jam, dan lampu pada laminaran dinyalakan untuk memudahkan penglihatan pada saat pengenceran bakteri. Bagian dalam laminaran disemprot dengan alkohol 70% agar aseptis, kemudian tangan yang telah dipasang sarung tangan disemprot juga agar tidak ada kontaminasi saat penanaman bakteri. Bunsen yang telah dinyalakan diletakkan ke dalam laminaran beserta koloni penanaman bakteri yang sudah diremajakan yaitu : *Acinetobacter baumannii* dan media cair TSB. Sebelum dilakukan pengambilan koloni bakteri terlebih dahulu jarum ose dipanaskan terlebih dahulu diatas bunsen agar tidak terjadi kontaminasi kemudian koloni penanaman bakteri dari cawan petri diambil 1 koloni dengan menggunakan jarum ose dan dibiakan ke dalam media TSB cair. Setelah bakteri *Acinetobacter baumannii* dibiakan kedalam media TSB kemudian ditutup dengan menggunakan kapas, diwrap dan dilapisi dengan aluminium foil kemudian diikat dengan menggunakan karet. Hasil biakan kemudian dimasukkan ke dalam waterbath dengan suhu 37°C dan di shaker dengan kecepatan sedang selama 40 jam kemudian dilakukan pengamatan fase pertumbuhan bakteri. Prosedur kerja pembuatan media cair dan pembiakan bakteri dapat dilihat pada gambar 10 dan 11.



Gambar 10. Pembuatan media TSB



Gambar 11. Pemiakan Bakteri

3.4.4 Pengambilan bakteri fase Eksponensial

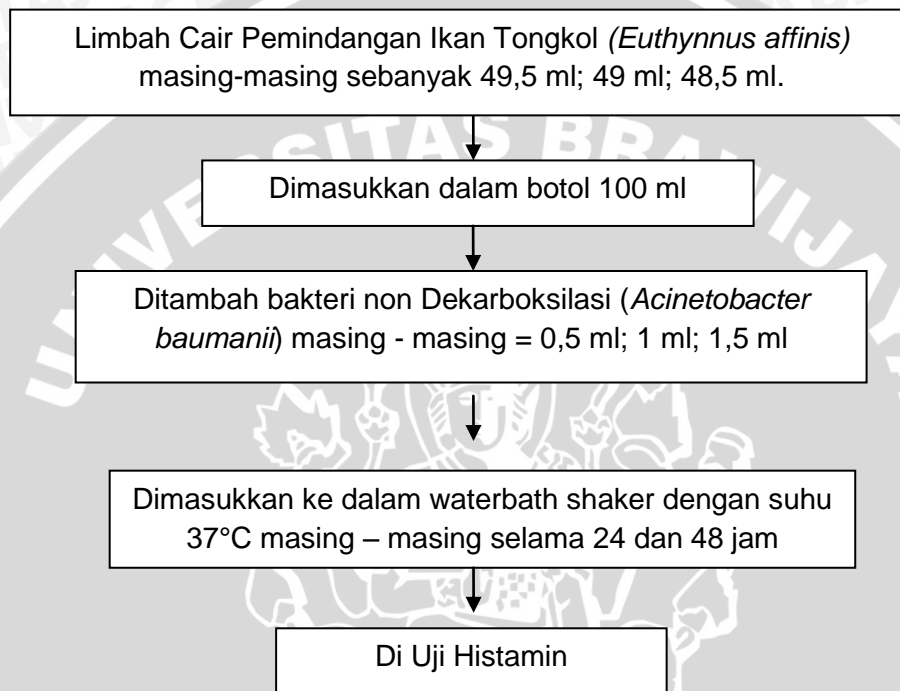
Menurut Soeksmanto *et al.* (1998), pertumbuhan mikroba adalah meningkatnya jumlah kuantitas massa sel dengan cara terbentuknya sel-sel baru. Terjadinya proses pertumbuhan tergantung dari nutrient yang tersedia di lingkungannya. Pada setiap pertumbuhan bakteri dalam suatu medium terdapat fase-fase atau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

Pengamatan fase dilakukan untuk mendapatkan inhibitor protease yang diduga dapat menghambat perkembangan enzim Histidin dekarboksilase. Bakteri *Acinetobacter baumannii* diambil 1 ose kemudian dimasukkan dalam 20 ml media TSB. Selanjutnya di shaker dalam waterbath pada suhu 37°C. Setiap 4 jam sekali sampel bakteri diambil 1 ml dan dihitung kepadatan bakteri dengan menggunakan spektrometer. Pengamatan dan perhitungan fase bakteri dilakukan selama 4 x 48 jam dan dihitung setiap empat jam sekali dengan panjang gelombang 600 nm.

3.4.5 Fermentasi Bakteri Non Dekarboksilasi terhadap Histamin

Sampel limbah diambil 1 liter kemudian di sentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm. Hal ini bertujuan untuk menghasilkan histidin yang bersih dari sumber bahan yang tidak diinginkan, seperti NaCl, lemak dan sebagainya. Setelah disentrifuse hasil sentrifuse akan terbagi menjadi 3 bagian yaitu atas terdapat lemak, tengah cairan, bawah terdapat padatan. Setelah terbagi menjadi 3 kemudian yang diambil adalah bagian tengah yaitu cairan limbah yang berisi histidin kemudian dimasukkan masing-masing sebanyak 49,5 ml; 49 ml; 48,5 ml kedalam botol yang berisi 100 ml. Bakteri *Acinetobacter baumannii* diambil

masing-masing 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml kemudian dimasukkan kedalam botol yang sudah terisi oleh limbah cair hasil pemindangan. Limbah kemudian difermentasi yang dimasukkan ke dalam waterbath shaker dengan suhu 37°C dan di shaker selama masing-masing 24 jam dan 48 jam. Prosedur kerja fermentasi limbah dengan dengan bakteri dapat dilihat pada gambar 12.



Gambar 12. Prosedur Kerja Fermentasi Limbah

3.4.6 Pengujian *Biogenic Amine* (Histamin)

Sampel limbah yang telah difermentasi selama 24 jam dan 48 jam diuji kadar biogenik aminnya secara kuantitatif menggunakan metode Spektrofluorometri. Analisis pengujian histamin secara kuantitatif ini menggunakan metode Spektrofluorometri sesuai SNI 2354. 10 tahun 2009.

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. Besarnya fluoresensi histamin diukur secara fluorometri pada panjang gelombang excitation 350 nm dan emisi 444 nm.

Prosedur Analisis

- Timbang \pm 10 ml sampel dalam beaker glass 250 ml dan tambahkan 50 ml methanol, blender hingga homogeny
- 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)

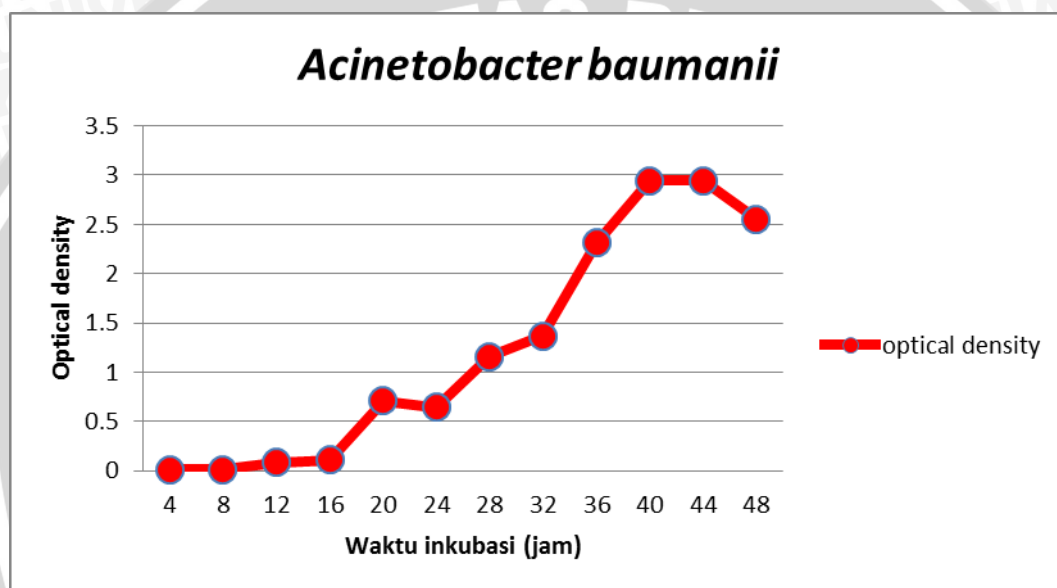
Siapkan tabung reaksi 50ml masing-masing untuk contoh, standar dan blanko.

- 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 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 spektrofлуorometer pada panjang gelombang excitasi : 350 nm dan emisi : 444 nm dalam jangka waktu 90 menit.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Fase-Fase Pertumbuhan Bakteri

Pengamatan fase-fase pertumbuhan bakteri dilakukan adalah untuk mengetahui pada jam ke berapakah akan terjadi fase eksponensial yang akan dipanen sebagai inhibitor protease. Grafik pertumbuhan *Acinetobacter baumannii* tersaji dalam Gambar 14.



Gambar 14. Grafik Kurva Pertumbuhan *Acinetobacter baumannii*

Dari grafik yang terlihat dalam Gambar 14, menunjukkan bahwa fase eksponensial ditunjukkan pada jam 20 sampai ke 40. Sehingga pada jam ke 40 dilakukan pemanenan bakteri yang dapat menghasilkan inhibitor protease. Inhibitor protease merupakan senyawa yang diproduksi dengan baik pada media fermentasi dalam kondisi ekstrim, yaitu pada saat semua nutrisi yang terkandung dalam media fermentasi tersebut sudah berkurang. Pada kondisi tersebut inhibitor protease diproduksi pada fase logaritmik sampai fase stationer (Nurhayati, 2006).

4.2 Data Penelitian

Tabel 2. Data Hasil Degradasi Histidin menjadi Histamin oleh Bakteri *Acinetobacter baumannii* pada Limbah Cair Pemindangan Ikan Tongkol

Perlakuan	Rataan
S1T1	4,54
S2T1	3,58
S3T1	4,45
S4T1	4,15
S1T2	11,32
S2T2	10,31
S3T2	9,43
S4T2	5,73

Keterangan :

S1T1 : Konsentrasi bakteri 0 ml dan lama fermentasi 24 jam.

S1T2 : Konsentrasi bakteri 0 ml dan lama fermentasi 48 jam.

S2T1 : Konsentrasi bakteri 0,5 ml dan lama fermentasi 24 jam.

S2T2 : Konsentrasi bakteri 0,5 ml dan lama fermentasi 48 jam.

S3T1 : Konsentrasi bakteri 1 ml dan lama fermentasi 24 jam.

S3T2 : Konsentrasi bakteri 1 ml dan lama fermentasi 48 jam.

S4T1 : Konsentrasi bakteri 1,5 ml dan lama fermentasi 24 jam.

S4T2 : Konsentrasi bakteri 1,5 ml dan lama fermentasi 48 jam.

Berdasarkan pengujian histamin pada tabel 2 menggunakan metode spektrofotometri secara kuantitatif diperoleh hasil yaitu penghambatan paling rendah terhadap histamin terdapat pada perlakuan S2T1 sebesar 3,58 mg/kg, urutan ke dua pada penghambatan histamin terdapat pada perlakuan S4T1 sebesar 4,415 mg/kg, urutan ke tiga pada penghambatan histamin terdapat pada perlakuan S3T1 sebesar 4,45 mg/kg, urutan ke empat pada penghambatan histamin terdapat pada perlakuan S1T1 sebesar 4,54 mg/kg, urutan ke lima pada penghambatan histamin terdapat pada perlakuan S4T2 sebesar 5,73, urutan ke enam pada penghambatan histamin terdapat pada perlakuan S3T2 sebesar 9,43 mg/kg, urutan ke tujuh pada penghambatan histamin terdapat pada perlakuan S2T2 sebesar 10,31 mg/kg, urutan ke delapan pada penghambatan histamin terdapat pada perlakuan S1T2 sebesar 11,32 mg/kg.

Dari data tabel 2 dengan menggunakan analisa keragaman (Lampiran 5) menunjukkan bahwa perlakuan Konsentrasi bakteri, lama fermentasi dan interaksi masing-masing menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P > 0,01$) terhadap histamin. Dari ketiga perlakuan tersebut maka dapat dicari kombinasi perlakuan yang memberikan penghambatan paling rendah. Untuk dapat mengetahui kombinasi perlakuan terbaik, perlu dicari uji pembandingan ketiga perlakuan dengan menggunakan Uji Jarak Duncan. Uji Jarak Duncan untuk perlakuan konsentrasi bakteri, lama fermentasi dan interaksi konsentrasi bakteri dan lama fermentasi bisa dilihat pada tabel 3, 4 dan 5.

Tabel 3. Notasi Uji Jarak Duncan Konsentrasi bakteri.

Perlakuan	Rataan	Notasi
S4	7,41	a
S3	10,41	b
S2	10,42	b
S1	11,90	b

Tabel 4. Notasi Uji Jarak Duncan Lama Fermentasi.

Perlakuan	Rataan	Notasi
T1	4,18	a
T2	9,20	b

Tabel 5. Notasi Uji Duncan Interaksi.

Perlakuan	Rataan	Notasi
S2T1	3,58	a
S4T1	4,15	a
S3T1	4,45	a
S1T1	4,54	a
S4T2	5,73	ab
S3T2	9,43	c
S2T2	10,31	c
S1T2	11,32	c

Dengan UJD ternyata bahwa tingkat ketelitian konsentrasi bakteri dan lama fermentasi berbeda nyata tetapi tingkat ketelitian pada interaksi konsentrasi bakteri dan lama fermentasi tidak mengalami perbedaan sangat nyata. Dapat dilihat pada tabel 5 notasi Uji Jarak Duncan notasi paling rendah yaitu a terdapat pada perlakuan S2T1, S4T1, S3T1 dan S1T1 sehingga dapat disimpulkan bahwa perlakuan terbaik yang dapat memberikan pengaruh perbedaan yang sangat nyata yaitu pada T1 (lama fermentasi 24 jam). Data dan analisis statistik Histamin selengkapnya terdapat pada Lampiran 5.

4.3 Pengaruh Konsentrasi Bakteri terhadap kandungan histamin

Konsentrasi Bakteri mempengaruhi kandungan histamin dapat dilihat dari tabel F hit menunjukkan bahwa terjadi perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$). Dengan UJD pada tabel 3 ternyata bahwa tingkat ketelitian dapat meningkat karena perlakuan S4 berbeda nyata dengan perlakuan S3. Sehingga perlakuan yang terbaik adalah perlakuan S4 yakni Konsentrasi bakteri 1,5 ml , dengan nilai rata-rata 7,41 mg/kg. Dapat disimpulkan bahwa semakin banyak Konsentrasi bakteri yang digunakan semakin rendah kandungan histamin yang terbentuk. Hal ini disebabkan karena banyaknya Konsentrasi bakteri *Acinetobacter baumannii* yang dapat menghambat *Enzim Histidin Dekaboksilase* dalam merubah kandungan histidin menjadi histamin. Menurut Ardiansyah (2007) menyatakan bahwa kemampuan antimikroba dalam memberikan penghambatan terhadap mikroorganisme yang merusak bahan pangan sangat tergantung pada konsentrasi dan kandungan senyawanya. Pada dasarnya mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh mikroba dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya 1) Gangguan pada senyawa penyusun dinding sel; 2) Peningkatan permeabilitas membran sel yang dapat menyebabkan kehilangan

komponen penyusun sel; 3) Menginaktivasi enzim dan kerusakan fungsi material genetik.

Daya hambat Enzim Histidin Dekarboksilase disebabkan oleh bakteri *Acinetobacter baumannii* yang mampu menghasilkan inhibitor protease. Menurut Nurhayati (2006) *Acinetobacter baumannii* mampu menghasilkan inhibitor protease dengan aktivitas tertinggi sebesar 1,93 U/ml. Inhibitor protease merupakan senyawa yang diproduksi dengan baik pada media fermentasi dalam kondisi ekstrim, yaitu pada saat semua nutrisi yang terkandung dalam media fermentasi tersebut sudah berkurang. Pada kondisi tersebut inhibitor protease diproduksi pada fase logaritmik sampai fase stationer.

4.4. Pengaruh Lama Fermentasi terhadap kandungan histamin

Berdasarkan F hit menunjukkan bahwa lama fermentasi berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap terbentuknya kandungan histamin. Dengan UJD pada tabel 4 ternyata bahwa tingkat ketelitian dapat meningkat karena perlakuan T1 berbeda nyata dengan perlakuan T2. Perlakuan T1 yakni dengan lama fermentasi 24 jam, dengan nilai rata-rata 12,54 mg/kg dan perlakuan T2 yakni dengan lama fermentasi 48 jam, dengan nilai rata-rata 27, 59 mg/kg, sehingga perlakuan yang terbaik adalah perlakuan T1 yakni dengan lama fermentasi 24 jam, dengan nilai rata-rata 4,18 mg/kg bisa disimpulkan bahwa semakin lama fermentasi maka nilai kandungan histamin semakin meningkat. Tingginya kandungan histamin pada lama fermentasi 48 jam diduga masih terdapatnya Enzim histidin dekarboksilase dalam mendegradasi histidin menjadi histamin. Menurut Keer *et al* (2002) Histamin adalah senyawa biogenic amin hasil perombakan asam amino histidin bebas yang berada dalam daging ikan yang diproduksi secara biologis melalui proses dekarboksilase dari asam amino bebas

serta terdapat pada berbagai bahan pangan seperti ikan, daging merah, keju, dan makanan fermentasi.

4.5 Hubungan antara Konsentrasi bakteri dan lama fermentasi terhadap kandungan histamin

Berdasarkan tabel F hit dapat dilihat bahwa hubungan antara lama fermentasi dan Konsentrasi bakteri berbeda sangat nyata ($P < 0,01$). Dapat disimpulkan bahwa Hubungan antara lama fermentasi dan Konsentrasi bakteri dapat mengurangi kandungan histamin. Dengan UJD ternyata bahwa tingkat ketelitian interaksi konsentrasi bakteri dan lama fermentasi tidak berbeda nyata. Dapat disimpulkan bahwa setiap perlakuan antara interaksi konsentrasi bakteri dan lama fermentasi tidak ada yang berbeda yang diakibatkan oleh perlakuan T yaitu lama fermentasi. Hal ini diduga pada T1 (lama fermentasi 24 jam) dalam proses dekarboksilase dari asam amino histidin bebas menjadi histamin secara biologis kandungan histamin yang terbentuk sangat rendah sehingga konsentrasi bakteri *Acinetobacter bacumannii* dalam menghambat enzim histidin dekarboksilase juga semakin rendah yang dapat berpengaruh pada interaksi konsentrasi bakteri dengan lama fermentasi sehingga tidak berbeda nyata .

Bila faktor interaksi konsentrasi bakteri dengan lama fermentasi tidak berbeda nyata maka perlakuan yang terbaik dapat dicari dari faktor konsentrasi bakteri dan faktor lama fermentasi sehingga perlakuan yang terbaik adalah S4T1. Menurut Sastrosupadi (2000) Bila interaksi VJ tidak berbeda nyata maka kesimpulan dapat dicari melalui faktor V dan faktor J.

Hubungan antara Konsentrasi bakteri dan lama fermentasi sangat mempengaruhi kandungan histamin karena keduanya sangat berperan dalam proses penurunan kadar histamin. Menurut Jawet *et all* (2004) Bila zat

antimikroba digunakan untuk menginaktifkan sel-sel mikroba, sering dijumpai bahwa konsentrasi antibakteri yang digunakan berkaitan dengan waktu yang diperlukan untuk membunuh suatu bagian tertentu dari populasi.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian mengenai uji daya hambat bakteri Penghasil Inhibitor Protease (*acinetobacter baumannii*) terhadap proses degradasi histidin menjadi histamine pada limbah cair hasil pemindangan ikan tongkol (*Euthynnus affinis*) diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

- Bahwa konsentrasi bakteri, lama fermentasi dan interaksi antara konsentrasi bakteri dan lama fermentasi bakteri *Acinetobacter baumannii* berpengaruh pada penurunan kandungan histamin secara kuantitatif dari limbah pemindangan ikan tongkol (*Euthynnus affinis*).
- Perlakuan yang terbaik dalam menurunkan histamin adalah perlakuan T1 yakni lama fermentasi 24 jam dengan nilai rata-rata 4,15 mg/ kg.

5.2 Saran

Perlu diadakan penelitian lebih lanjut terkait tentang karakteristik inhibitor protease dari bakteri *Acinetobacter baumannii* untuk aplikasi bidang perikanan lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ababouch, L. 1991. **Histamine food poisoning: An update**. Fish Tech. News, 11:3-5.
- Adhie. 2007. **Bakteri, Ciri-ciri, Struktur, Perkembangbiakan, Bentuk dan Manfaatnya**. <http://www.WordPress.com> weblog. Diakses tanggal 5 April 2010.
- Aflal, 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.
- Allen, G. Green, D.P and Bolton, G. E. 2004. **Control of Histamin Production in Current Commercial Fishing Operation for Mahi-Mahi (*Coryphaena hippurus*) and Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) in North Carolina**. Corresponding author : dave_green@ncsu.edu.
- Anggawati, A.M., Fawzya Y, N. dan Putro S. (1984). **Studies on histamin contents of cured fishery products**. Laporan Penelitian Teknologi Perikanan 33:29-32.
- Aoyagi, T and Takeuchi, T. 1989. **Low molekular weight enzyme inhibitors produced by microorganisms**. Elsevier Science Publishers.
- Ardiansyah. 2007. **Antimikroba dari Tumbuhan** (Bagian Kedua). Berita Iptek Online. 4 hal. <http://www.beritaiptek.com/zberita-beritaiptek-2007-06-09-Antimikroba-dari-Tumbuhan>. Sept, 06, 2008.
- Arisman. 2009. **Keracunan Makanan : Buku Ajar Ilmu Gizi**. Penerbit Buku Kedokteran EGC. <http://books.google.co.id/books>. Diakses pada Tanggal 20 Oktober 2010.
- Aswar, S. 1997. **Metode Penelitian. Pustaka Pelajar**. Yogyakarta.
- Badan Standarisasi Nasional. 2009. **Metode Pengujian Kimia Produk Perikanan, Penentuan Kadar Histamin**. SNI 2354.10.2009. Jakarta:BSN.
- Creighton, R. 1989. **Protein Structure**. Elsevier Science Publishers.
- Ghony. 1988. **Dasar-Dasar Penelitian Eksperimen**. Usaha Nasional. Surabaya.
- Hardy, R. and Smith, J.G.M. 1976. **The storage of mackerel (*Scromber scombrus*)**. Development of histamine and rancidity. J. Sci. Food Agric. 27:595-599.

- Imada, C. Simidu, U and Taga, N. 1985_a. **Isolation and characterization of marine bacteria producing alkaline protease inhibitor**. Bull. Japan. 51 (5) : 799-803.
- Imada, C. Maeda, M. And Taga, N. 1985_b. **Purification and characterization of the protease inhibitor monastin from a marine *Alteromonas* sp. With reference to inhibitor of the protease produced by a bacterium pathogenic to fish**. Can. 31: 1089-1094.
- Imada, C. Maeda, M. Taga, N and Smidu, U. 1986. **Purification and characterization of subtilisin inhibitors marinostatin produced by marine *Alteromonas* sp.** App Bacteriol. 60 : 469-476.
- Imada, C. 2000. **Isolation of protease Inhibitor Producing Marine Microorganism and General Properties of Inhibitors**. International Symposium on Marine Biotechnology. Jakarta.
- Jawetz. Melnick. And Adelberg. 2004. **Mikrobiologi Kedokteran**. Buku Kedokteran. 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.
- Kerr, M. Lawicki, P. Aguirre, S. And Rayner, C. 2002. **Effect of Storage Condition on Histamine Formation in Fresh and Tuna**. State Chemistry Laboratory, Werrbee. Victorian Government Department of Human Service. www.foodsafety.vic.gov.au
- Kim, K. Byun and Shin, Y. 1995. **Characterization of a metalloprotease inhibitor protein (SmaPI) of *Serratia marcescens***. Appl and Environ. Microbiol. 61 (8) : 3035-3041.
- Kim, Y. H. *et al.* 1999. **Synthesis of a Quaternary Ammonium Derivative of Chitosan and Its Application to a Cotton Antimicrobial Finish**, text res. J. 68 (6):428-434
- Koentjaraningrat. 1991. **Metode-metode Penelitian Masyarakat**. PT Gramedia. Jakarta.
- Lehane, L and Olley, J. 2009. **Histamine Fish Poisoning Revisited**. Jurnal Food Microbial. 58 ; 1-37.
- Munoz, Dr. Rosario. 2008. **Bacterial Biogenic Amine Production**. Spanish Research Council (CSIC) - Instituto de Fermentaciones Industriales. <http://www.scitopics.com>. Diakses tanggal 15 Juli 2010.
- Murao, S. Kasai, Y. Kimura and Oda, K. 1982. **Isolation of metallo proteinase inhibitor (FMPI) producing microorganism**. Agric. Biol. Biochem. 46 (II) : 2697-2703.

- Noffiani, R. Nurbetty, S. Sapar, A. 2009. **Aktivitas Antimikroba ekstrak metanol bakteri berasosiasi spons dari pulau lemukutan Kalimantan Barat**. Universitas Tanjungpura. Pontianak.
- Noviarty. 2007. **Kalibrasi alat spektrofotometer luminesen Is-5b menggunakan bahan standar ovalen**. Pusat Teknologi Bahan Bakar Nuklir, BATAN. Tangerang.
- Nurhayati, T., Maggy, T. S., Desniar dan Rini, S. 2006. **Pengaruh Variasi pH dan NaCl Terhadap Produksi Inhibitor Protease yang Dihasilkan oleh *Acinetobacter baumannii* (Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons *Plakortis nigra*)**. Buletin Teknologi Hasil Perikanan Volume IX Nomor 2 Tahun 2006.
- Nursanti dan Madjid, A. 2009. **Dasar-dasar Ilmu Tanah**. http://dasar2ilmutanah.blogspot.com/2009_05_24_archive.html. Diakses pada Tanggal 22 Oktober 2010.
- Ozogul, F., Polat, F. and Ozogul, Y. 2004. **The effect of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardinella pilchardus*)**. J. Food Chem. 85(1):49-57.
- 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.
- Pisang kipas. 2009. ***Acinetobacter baumannii***. <http://www.wordpress.com>. diakses pada tanggal 22 Oktober 2010.
- Rodriguez, J. J. J; Sabater, E. I. L; Herrero, M. M. H; dan Ventura, M. T. M. 1994. **Histamine, Putrescine, and Cadaverine Formation, in Spanish Semipreserved Anchovies as Affected by Time/Temperature**. Journal of Food Science, Volume 59 No. 5.
- Rodwell, V. W; Robert, K. M; Peter, A. M; dan Daryl, K. G. 2003. **Biokimia Harper**. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. Hal 333.
- Sabana, A. 2004. **Screening dan Karakteristik Bakteri Laut Penghasil Inhibitor Protease Pada Spong dari Kepulauan Seribu Jakarta**. Institute Pertanian Bogor. Bogor.
- 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.
- Saanin, H. 1971. **Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan**. Jakarta: Bina Cipta. 245 hal.

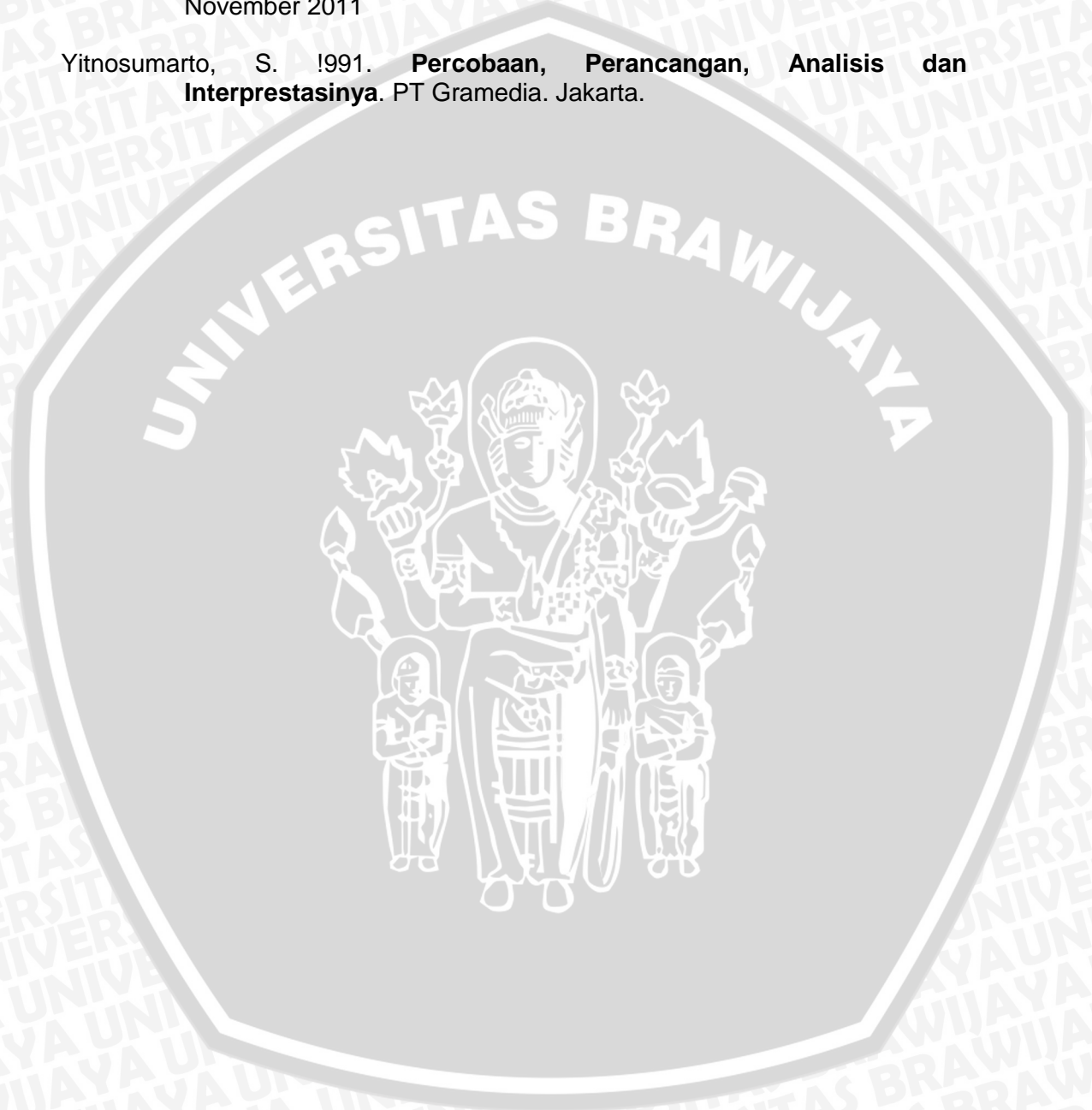
- Samianto, P., Irianto, H.E. and Putro, S. 1984. **Studies on the histamin contents of fermented fishery products**. Laporan Penelitian Teknologi Perikanan 32:35-39.
- Sasongko, L.A. 2006. **Kontribusi Air Limbah Penduduk di Sekitar Sungai TUK terhadap Kualitas Air Sungai Kaligarang serta Upaya Penanganannya**. Tesis Program Magister Ilmu Lingkungan, Program Pascasarjana, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Sastrosupandi, A. 2000. **Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian**. Kanisius. Yogyakarta.
- Setiawan, L.B. 1992. **Studi Tentang Aspek Target Strenght Ikan Tongkol (*Euthynnus affinis*). Skripsi (tidak dipublikasikan)**. Program Studi Pemanfaatan Sumberdaya Perikanan, Fakultas Perikanan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sims, G. G *et al.* 1992. **Quality Indices for Canned Skipjack Tuna : Correlation of Sensory Attributes with Chemical Indices**. Journal of Food Science 57 (5).
- Suhartono, M. 200. **Pemahaman karekterisasi biokimia enzim protease dalam mendukung industri berbasis bioteknologi**. Institute Pertanian Bogor. Bogor.
- Suprapti. 2010. **Bioaugmentasi Limbah Cair Pemindangan Dalam Menurunkan Kadar Histamin Dengan Menggunakan Konsorsium Bakteri *Indigenous* Lingkungan Limbah (*Acinetobacter Baumannii, Bacillus Subtilis, Enterobacter Gergoviae*) Secara Aerob**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya.
- Surakhmad, W. 1998. **Pengantar Penelitian Ilmiah**. Tarsito. Bandung.
- 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.
- Wanenoer. 2010. **Penentuan Kadar Vitamin E Metode Fluorometri**. <http://id.shvoong.com>. Diakses pada Tanggal 22 Desember 2010.
- Wangga, J. 1995. **Pengaruh Perendaman Filet Ikan dalam Air Kelapa terhadap Kandungan Histamin**. Tesis Program Pascasarjana Institute Pertanian Bogor. Bogor.
- 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. 2010. **Acinetobacter baumannii**. <http://www.wikipedia.org>. diakses tanggal 02 November 2010

_____. 2010. **Enterobacter gergoviae**. <http://uk.ask.com/wiki>. diakses pada tanggal 02 November 2010

_____. 2011. **Dekarboksilase**. <http://www.wikipedia.org>. diakses tanggal 02 November 2011

Yitnosumarto, S. 1991. **Percobaan, Perancangan, Analisis dan Interpretasinya**. PT Gramedia. Jakarta.



Lampiran 1. Hasil Pengujian Penelitian Pendahuluan Histamin



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS PERIKANAN DAN KELAUTAN
 UNIT LABORATORIUM PENGENDALIAN DAN PENGUJIAN MUTU HASIL PERIKANAN
 Jl. Barong Bakungan Kec. Glagah Telp. 0333 417845 Fax. 0333 417846
 email : lppmhpbanyuwangi@yahoo.com
BANYUWANGI

LAPORAN HASIL PENGUJIAN KADAR HISTAMIN

Tanggal masuk contoh : 16 Januari 2012
 Tanggal uji : 17 Januari 2012
 Tanggal Selesai : 19 Januari 2012
 Metode Uji : Spektrofotometri SNI : 2354.10: 2009

Hasil Uji :

NOMOR UJI	KODE UJI	HASIL UJI (mg/kg)
1	A	20,6714
2	K	30,0336
3	E	124,9233
4	AE	23,6248

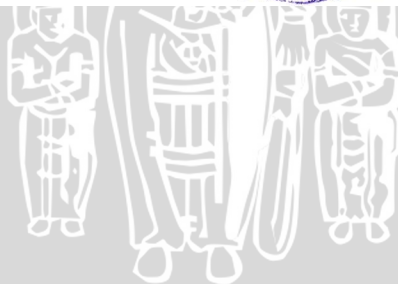
Catatan : Hasil uji hanya berlaku terhadap contoh yang diuji, dan tidak mewakili Lot tertentu.



Banyuwangi, 19 Januari 2011

Manajer Teknis

PROBO SUMARAH, SPI



Lampiran 2. Hasil Regresi Penelitian Pendahuluan Histamin

REPORT OF HISTAMINE DETERMINATION (SNI 2354.10-2009)

Prepared By Chemistry Laboratory

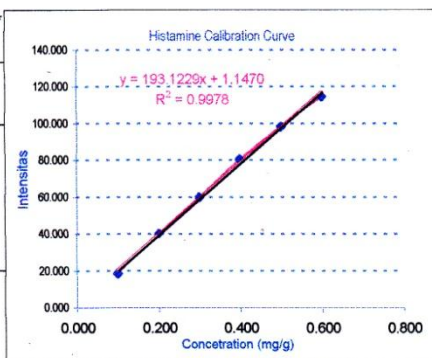
Quantitation results file:C:\FLWINLAB\DATA\Uji Histamine.rpt
Generated on :18-01-2012 at time:13:01:17

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 (mg/kg)	Intens.	BG	Factor
STD 1	0.100	18.537	2.488	1
STD 2	0.200	40.291	2.488	1
STD 3	0.300	59.967	2.488	1
STD 4	0.400	80.559	2.488	1
STD 5	0.500	98.267	2.488	1
STD 6	0.600	114.819	2.488	1



Fit equation:
 $Y = 193.1229 X + 1.1470$
 $a = 1.147$ $b = 193.1229$
 $X \text{ (mg/kg)} = ((Y - a) \times 5000) / (wxb)$

Test Number	Test Code	Intensitas	Weight (Grams)	Conc. (mg/kg)	Test Decision
1	A	9.158	10.0335	20.6714	Accepted
2	K	12.805	10.0497	30.0336	Accepted
3	E	49.663	10.0549	124.9233	Rejected
4	AE	10.298	10.0285	23.6248	Accepted



Lampiran 3. Hasil Pengujian Uji Daya Hambat Bakteri Penghasil Inhibitor Protease (*Acinetobacter baumannii*) Terhadap Proses Degradasi Histidin menjadi Histamin pada Limbah Cair Pemindangan Ikan Tongkol (*Euthynnus affinis*)



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS PERIKANAN DAN KELAUTAN
JNIT LABORATORIUM PENGENDALIAN DAN PENGUJIAN MUTU HASIL PERIKANAN
Jl. Barong Bakungan Kec. Glagah Telp. 0333 417845 Fax. 0333 417846
email : lpmpbanyuwangi@yahoo.com
BANYUWANGI

LAPORAN HASIL PENGUJIAN KADAR HISTAMIN

Tanggal masuk contoh : 6 Maret 2012
Tanggal uji : 6 Maret 2012
Tanggal Selesai : 9 Maret 2012
Metode Uji : Spektrofotometri SNI : 2354.10: 2009

Hasil Uji :

NO. UJI	KODE UJI	HASIL UJI (mg/kg)
1	S1T1U1	5.7975
2	S1T1U2	3.3420
3	S1T1U3	4.4869
4	S1T2U1	11.2837
5	S1T2U2	12.1237
6	S1T2U3	10.5487
7	S2T1U1	3.7132
8	S2T1U2	2.6813
9	S2T1U3	4.3531
10	S2T2U1	8.9007
11	S2T2U2	12.0192
12	S2T2U3	10.0201
13	S3T1U1	3.6191
14	S3T1U2	4.0527
15	S3T1U3	5.6707
16	S3T2U1	10.3006
17	S3T2U2	9.6215
18	S3T2U3	8.3614
19	S4T1U1	5.3642
20	S4T1U2	3.9096
21	S4T1U3	3.1728
22	S4T2U1	4.9647
23	S4T2U2	5.1642
24	S4T2U3	7.0640

Catatan : Hasil uji hanya berlaku terhadap contoh yang diuji, dan tidak mewakili Lot tertentu.

Banyuwangi, 9 Maret 2012
Manajer Teknis



ARUJO SUMARAH, SPI
NIP. 19690728 199901 1 001

Lampiran 4. Hasil Regresi Uji Daya Hambat Bakteri Penghasil Inhibitor Protease (*Acinetobacter baumannii*) Terhadap Proses Degradasi Histidin menjadi Histamin pada Limbah Cair Pemindangan Ikan Tongkol (*Euthynnus affinis*)

REPORT OF HISTAMINE DETERMINATION (SNI 2354.10-2009)

Prepared By Chemistry Laboratory

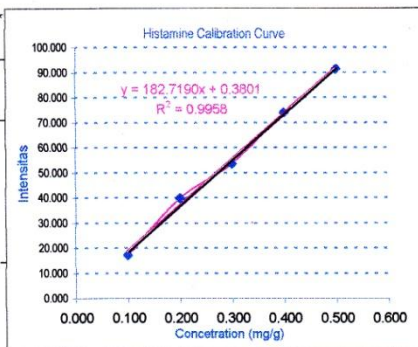
Quantitation results file:C:\FLWINLAB\DATA\Uji Histamine.rpt
Generated on :03-07-2012 at time:11:02:51

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 (mg/kg)	Intens.	BG	Factor
STD 1	0.100	17.157	2.047	1
STD 2	0.200	39.844	2.047	1
STD 3	0.300	53.528	2.047	1
STD 4	0.400	74.023	2.047	1
STD 5	0.500	91.427	2.047	1



Fit equation:
 $Y = 182.719 X + 0.3801$
 $a = 0.3801$ $b = 182.719$
 $X \text{ (mg/kg)} = ((Y - a) \times 5000) / (w \times b)$

Test Number	Test Code	Intensitas	Weight (Grams)	Conc. (mg/kg)	Test Decision
1	S1T1U1	2.515	10.0768	5.7975	Accepted
2	S1T1U2	1.609	10.0623	3.3420	Accepted
3	S1T1U3	2.028	10.0500	4.4869	Accepted
4	S1T2U1	4.531	10.0665	11.2837	Accepted
5	S1T2U2	4.816	10.0123	12.1237	Accepted
6	S1T2U3	4.244	10.0234	10.5487	Accepted
7	S2T1U1	1.740	10.0217	3.7132	Accepted
8	S2T1U2	1.368	10.0822	2.6813	Accepted
9	S2T1U3	1.965	10.0886	4.3531	Accepted
10	S2T2U1	3.662	10.0899	8.9007	Accepted
11	S2T2U2	4.782	10.0219	12.0192	Accepted
12	S2T2U3	4.047	10.0141	10.0201	Accepted
13	S3T1U1	1.711	10.0630	3.6191	Accepted
14	S3T1U2	1.871	10.0668	4.0527	Accepted
15	S3T1U3	2.473	10.0994	5.6707	Accepted
16	S3T2U1	4.163	10.0496	10.3006	Accepted
17	S3T2U2	3.914	10.0507	9.6215	Accepted
18	S3T2U3	3.454	10.0600	8.3614	Accepted
19	S4T1U1	2.350	10.0491	5.3642	Accepted
20	S4T1U2	1.820	10.0784	3.9096	Accepted
21	S4T1U3	1.544	10.0384	3.1728	Accepted
22	S4T2U1	2.203	10.0475	4.9647	Accepted
23	S4T2U2	2.284	10.0885	5.1642	Accepted
24	S4T2U3	2.972	10.0405	7.0640	Accepted



Lampiran 5. Hasil Pengukuran dan Analisa Statistik Histamin

Konsentrasi Bakteri	Lama Fermentasi	ulangan			Jumlah	rata-rata	rata-rata
		1	2	3			
S1	T1	5,80	3,34	4,49	13,63	4,54	7,93
	T2	11,28	12,12	10,55	33,95	11,32	
S2	T1	3,71	2,68	4,35	10,74	3,58	6,95
	T2	8,90	12,02	10,02	30,94	10,31	
S3	T1	3,62	4,05	5,67	13,34	4,45	6,94
	T2	10,30	9,62	8,36	28,28	9,43	
S4	T1	5,36	3,91	3,17	12,44	4,15	4,94
	T2	4,96	5,16	7,06	17,18	5,73	
Total		53,93	52,90	53,67	160,50		
rata-rata		6,74	6,61	6,71			

Keterangan :
 S : Konsentrasi Bakteri
 T : Lama Fermentasi

$$FK = \frac{\left(\sum_{a=1}^h \sum_{b=1}^l \sum_{k=1}^r Y_{abk} \right)^2}{h.l.r} = \frac{(160,50)^2}{4.2.3} = 1073,34$$

Untuk perhitungan Jumlah Kuadrat (JK) disusun tabel 2 arah sebagai berikut:

Konsentrasi bakteri(S)	Lama Fermentasi (T)	
	T1	T2
S1	4,54	11,32
S2	3,58	10,31
S3	4,45	9,43
S4	4,15	5,73
Total	16,72	36,78
rata-rata	4,18	9,20

Jumlah Kuadrat (JK)

$$JK_{Total} = \left[\sum_{a=1}^h \sum_{b=1}^l \sum_{k=1}^r Y_{abk}^2 \right] - FK$$

$$= (13,63^2 + 10,74^2 + \dots + 17,18^2) - 1073,34$$

$$= 226,32$$



$$\begin{aligned}
 JK_{\text{Konsentrasi(S)}} &= \frac{\sum_{a=1}^h \left(\sum_{b=1}^l \sum_{k=1}^r Y_{abk} \right)^2}{l.r} - FK \\
 &= \frac{(47,58^2 + 41,68^2 + 41,62^2 + 29,92^2)}{2.3} - 1073,34 \\
 &= 28,43
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 JK_{\text{lama Ferm (T)}} &= \frac{\sum_{b=1}^l \left(\sum_{a=1}^h \sum_{k=1}^r Y_{abk} \right)^2}{h.r} - FK \\
 &= \frac{(50,15^2 + 110,35^2)}{4.3} - 1073,34 \\
 &= 151
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 JK_{\text{interaksi S-T}} &= \frac{\sum_{a=1}^h \sum_{b=1}^l \left(\sum_{k=1}^r Y_{abk} \right)^2}{r} - FK - JK_{\text{Konsentrasi(S)}} - JK_{\text{lama fermentasi (T)}} \\
 &= \frac{(13,63^2 + 33,95^2 + \dots + 17,18^2)}{3} - 1073,34 - 28,43 - 151 \\
 &= 26,77
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 JK_{\text{Galat}} &= JK_{\text{Total}} - JK_{\text{Konsentrasi(S)}} - JK_{\text{lama fermentasi (T)}} - JK_{\text{interaksi S-T}} \\
 &= 226,32 - 28,43 - 151 - 26,77 \\
 &= 20,05
 \end{aligned}$$



Tabel Analisis Ragam

SK	db	JK	KT	F Hitung	F 0.05	F 0.01
Konsentrasi Bakteri(S)	3	28,43	9,48	7,53	3,24	5,29
Lama Fermentasi (T)	1	151,00	151,00	120,05	4,49	8,53
Interaksi S-T	3	26,77	8,92	7,09	3,24	5,29
Galat	16	20,12	1,26			
Total	23	226,32				

Kesimpulan : **) F hitung > F tabel 1%, Terdapat perbedaan yang sangat nyata (P>0,01).

- Konsentrasi Bakteri (S)

$$\begin{aligned}
 \text{JNT 5\%} &= \text{JND 5\%} \times \sqrt{\frac{KT_{\text{galat}}}{l.r}} \\
 &= \text{JND 5\%} \times \sqrt{\frac{1,43}{2,3}} \\
 &= \text{JND 5\%} \times 0,46
 \end{aligned}$$

Perlakuan	Rataan	Notasi
S4	4,94	a
S3	6,94	b
S2	6,95	b
S1	7,93	b

2,00
2,01 0,01
2,99 0,99 0,98

	2	3	4
JND 5 %	3,00	3,15	3,23
JNT 5%	1,37	1,44	1,48

- Lama Fermentasi (T)

$$\begin{aligned}
 \text{JNT 5\%} &= \text{JND 5\%} \times \sqrt{\frac{KT_{\text{galat}}}{h.r}} \\
 &= \text{JND 5\%} \times \sqrt{\frac{1,43}{4,3}} \\
 &= \text{JND 5\%} \times 0,32
 \end{aligned}$$

Perlakuan	Rataan	Notasi
T1	4,18	a
T2	9,20	b

5,02

	2	3
JND 5%	3,00	3,15

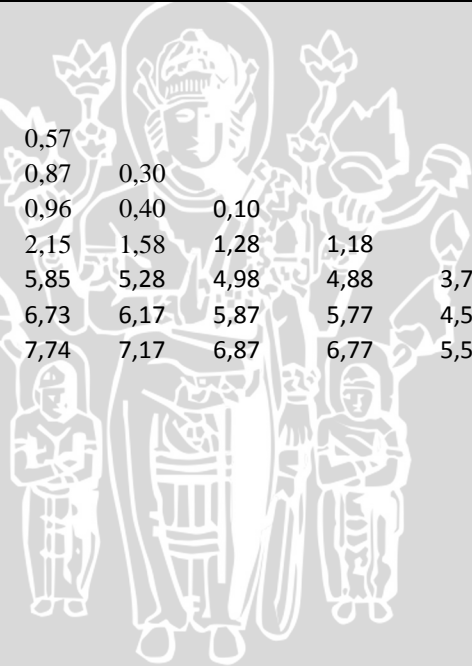
JNT 5%	0,97	1,02
--------	------	------

• Interaksi (S-T)

$$\begin{aligned}
 \text{JNT 5 \%} &= \text{JND 5 \%} \times \sqrt{\frac{KT_{\text{galat}}}{r}} \\
 &= \text{JND 5 \%} \times \sqrt{\frac{1,43}{8,3}} \\
 &= \text{JND 5 \%} \times 0,65
 \end{aligned}$$

	2	3	4	5	6	7	8
JND 5 %	3,00	3,15	3,23	3,3	3,34	3,37	3,39
JNT 5 %	1,94	2,04	2,09	2,14	2,16	2,18	2,20

Perlakuan	Rataan	Notasi
S2T1	3,58	a
S4T1	4,15	a
S3T1	4,45	a
S1T1	4,54	a
S4T2	5,73	ab
S3T2	9,43	c
S2T2	10,31	c
S1T2	11,32	c

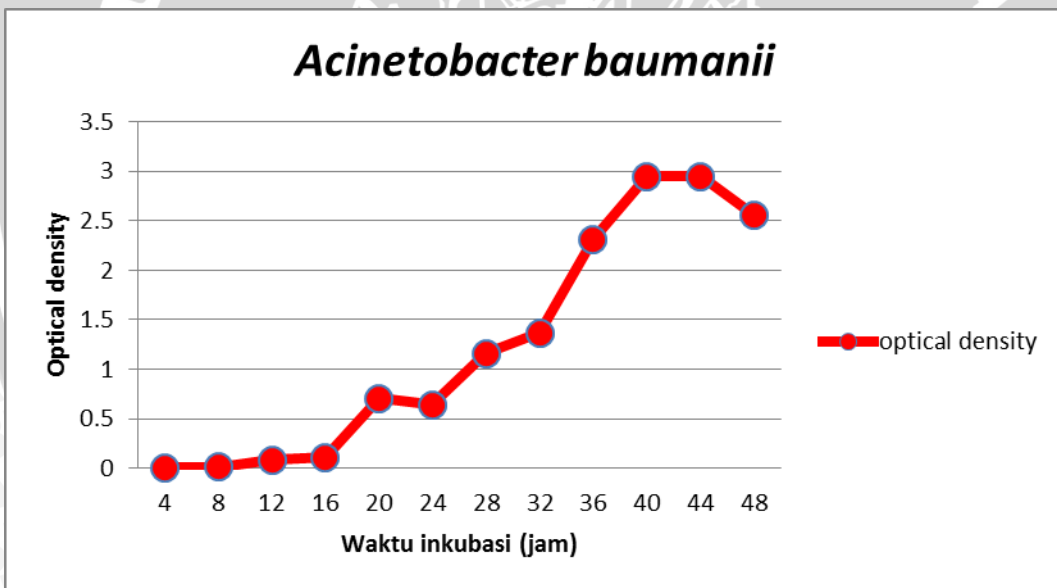


0,57							
0,87	0,30						
0,96	0,40	0,10					
2,15	1,58	1,28	1,18				
5,85	5,28	4,98	4,88	3,70			
6,73	6,17	5,87	5,77	4,59	0,89		
7,74	7,17	6,87	6,77	5,59	9,43	1,00	

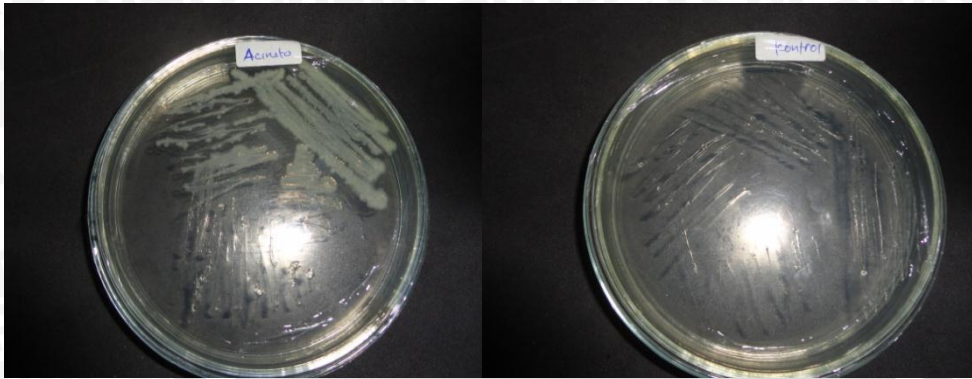


Lampiran 6 . Jumlah Pertumbuhan Bakteri Penghasil Inhibitor Protease (*Acinetobacter baumannii*)

JAM KE	OD
4	0,007
8	0,010
12	0,085
16	0,108
20	0,705
24	0,642
28	1,157
32	1,368
36	2,315
40	2,947
44	2,947
48	2,556



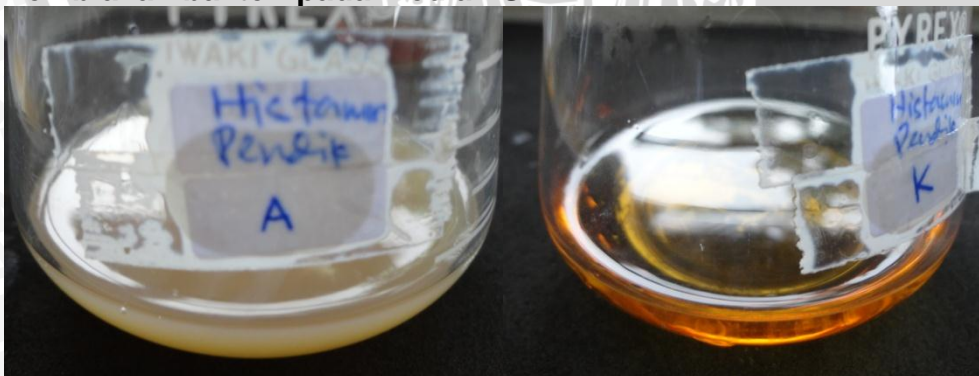
Penanaman Bakteri pada media TSA



Perbandingan gambar antara literatur dan hasil penelitian pewarnaan gram pada bakteri *Acinetobacter baumannii*



Pembiakan bakteri pada media TSB



Laminar Flow dan Waterbath Shaker



Spektrofotometri dan Limbah cair Pemindangan Ikan Tongkol



Hasil Sentrifuse Limbah cair Pemindangan Ikan Tongkol dan Proses pengiriman untuk menguji Histamin

