

repository.ub.ac.id

**PROSES PEMURNIAN DAN AKTIVITAS ENZIM DARI
Nitrococcus sp. DALAM PENGURAIAN HISTIDIN MENJADI
HISTAMIN**

SKRIPSI

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

Oleh:

ETIK MAFTUHAH

NIM. 0810830054



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2012



repository.ub.ac.id

**PROSES PEMURNIAN DAN AKTIVITAS ENZIM DARI
Nitrococcus sp. DALAM PENGURAIAN HISTIDIN MENJADI
HISTAMIN**

SKRIPSI

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

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana

Oleh:

ETIK MAFTUHAH

NIM. 0810830054



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



SKRIPSI

PROSES PEMURNIAN DAN AKTIVITAS ENZIM DARI *Nitrococcus sp.*
DALAM PENGURAIAN HISTIDIN MENJADI HISTAMIN

Oleh :

ETIK MAFTUHAH

NIM. 0810830054

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 12 Juli 2012
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Dosen Penguji I

Dosen Pembimbing I

(Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS)

(Ir. Yahya, MP)

NIP. 19640726 198903 2 004

NIP. 19630706 199003 1 003

Tanggal :

Tanggal :

Dosen Penguji II

Dosen Pembimbing II

(Dr. Ir. M. Firdaus, MP)

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)

NIP. 19680919 200501 1 001

NIP. 19600322 198601 1 001

Tanggal :

Tanggal :

Mengetahui,

Ketua Jurusan MSP

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)

NIP. 19600322 198601 1 001

RINGKASAN

ETIK MAFTUHAH. Laporan Skripsi dengan judul Proses Pemurnian dan Aktivitas Enzim Dari *Nitrococcus* sp. Dalam Penguraian Histidin Murni Menjadi Histamin (dibawah bimbingan Ir. Yahya, MP dan Dr. Ir. Happy Nursyam, MS).

Histamin adalah senyawa biogenik 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 perubahan dari histidin yang terbentuk di dalam makanan karena aktivitas bakteri penghasil enzim histidin dekarboksilase (Taylor dan Behling, 1982).

Enzim pada umumnya dihasilkan di dalam sel, beberapa diekstrak melalui dinding sel dan dapat berfungsi di luar sel. Jadi dikenal 2 tipe enzim yaitu enzim ekstraseluler (berfungsi di luar sel) dan enzim intraseluler (berfungsi di dalam sel) (Aulanni'am, 2004).

Pemurnian enzim dapat dilakukan berdasarkan sifat-sifat enzim sebagai protein yang berbeda dalam hal kelarutan, muatan serta ukuran atau berat molekulnya (Lehninger, 1995). Metode-metode pemurnian enzim antara lain pengendapan, filtrasi membran, kromatografi adsorpsi, kromatografi afinitas dan filtrasi gel (Smith, 1993). Metode yang paling sering digunakan adalah pengendapan dengan konsentrasi garam bervariasi (Aulanni'am, 2005). Pemurnian dengan metode pengendapan dilakukan dengan penambahan ammonium sulfat. Penambahan ammonium sulfat ke dalam larutan protein akan memberikan pengaruh terhadap kelarutan enzim yaitu menurunkan kelarutan enzim di dalam air (*salting out*) (Voet and Voet, 1990).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas enzim dari *Nitrococcus* sp. terhadap penguraian kadar histamin dan untuk mengetahui karakteristik enzim dari *Nitrococcus* sp. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Maret 2012 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan di Laboratorium Penelitian Pengujian Mutu Hasil Perikanan Surabaya.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif. Tujuan menggunakan metode eksploratif adalah untuk memperoleh pengetahuan tentang suatu gejala, sehingga setelah melalui tahap observasi, masalah serta hipotesisnya dapat dirumuskan.

Tahapan prosedur penelitian ini adalah: (1) pembiakan bakteri, (2) pemanenan metabolit, (3) pemurnian metabolit meliputi presipitasi (pengendapan dengan ammonium sulfat) dan dialisis. (4) pengujian kadar histamin metode spektrofotometri, (5) penentuan konsentrasi protein, dan (6) penentuan berat molekul protein dengan metode SDS-PAGE.

Dari hasil penelitian didapatkan bahwa kadar histamin yang terukur hasil dialisis enzim dari *Nitrococcus* sp. adalah dengan rerata 23,61 mg/kg, dan

mempunyai karakteristik: konsentrasi protein 0,580 mg/ml dan menghasilkan peptida 10-105 kDa dengan 9 asam amino.

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai pemurnian enzim metabolit ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri pembentuk histamin terutama dalam memberikan manfaat terhadap masyarakat.



KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Wr. Wb.

Puji syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT karena dengan rahmat dan ridho-Nya lah penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi ini yang menjadi salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Ir. Yahya, MP selaku dosen pembimbing 1 yang telah banyak memberikan bimbingan, arahan dan motivasi kepada penulis.
2. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS selaku dosen pembimbing 2 yang telah banyak memberikan bimbingan, arahan dan motivasi kepada penulis.
3. Dr. Ir. Hartati Kartianingsih, MS selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktunya untuk memberi masukan.
4. Dr. Ir. M. Firdaus, MP selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktunya untuk memberi masukan.
5. Kedua orang tua terutama ayah Abu Bakar Abak atas do'a, motivasi dan segala dukungan moril maupun spiritual.
6. Kakakku Devi Hilyah dan Muhyiddin atas segala motivasi dan dukungan yang diberikan.
7. Agung Nur Ardiyanto atas segala dukungan dalam keadaan apapun.
8. Seluruh teman-teman dan semua pihak yang telah membantu terselesaikannya Laporan Skripsi ini, yang tidak bisa disebutkan satu-persatu, saya ucapkan banyak terimakasih.

Penulis menyadari bahwa dalam laporan ini masih banyak kelemahan dan kekurangannya, sehingga penulis mengharapkan masukan, perbaikan, dan penelitian lebih lanjut demi kelengkapan laporan ini. Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi semua pihak.

Wassalamualaikum Wr. Wb.

Malang, 12 Juli 2012

Penulis

LEMBAR PERSEMBAHAN



Laporan skripsi ini saya Persembahkan untuk :

“ Tiada kata yang mampu terucap selain Rasa Terima Kasih yang teramat Banyak... “

Ayahku
Drs. H. Abu Bakar Abak, MM
Saudariku Tersayang
Devi Hilyah dan Suaminya Muhyiddin



Laki-Laki Tercinta
Agung Nur Ardiyanto



My Best Friends :
Yayah, Olyy, Khusnul,
Putu, Bagus, Rina, Veni,
Dora n other friends



Semua Temen-temen Seperjuangan THP Angkatan 2008... thanks for all.

**Dan Semua Warga Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya
Malang (Dosen, Mahasiswa, Karyawan)**

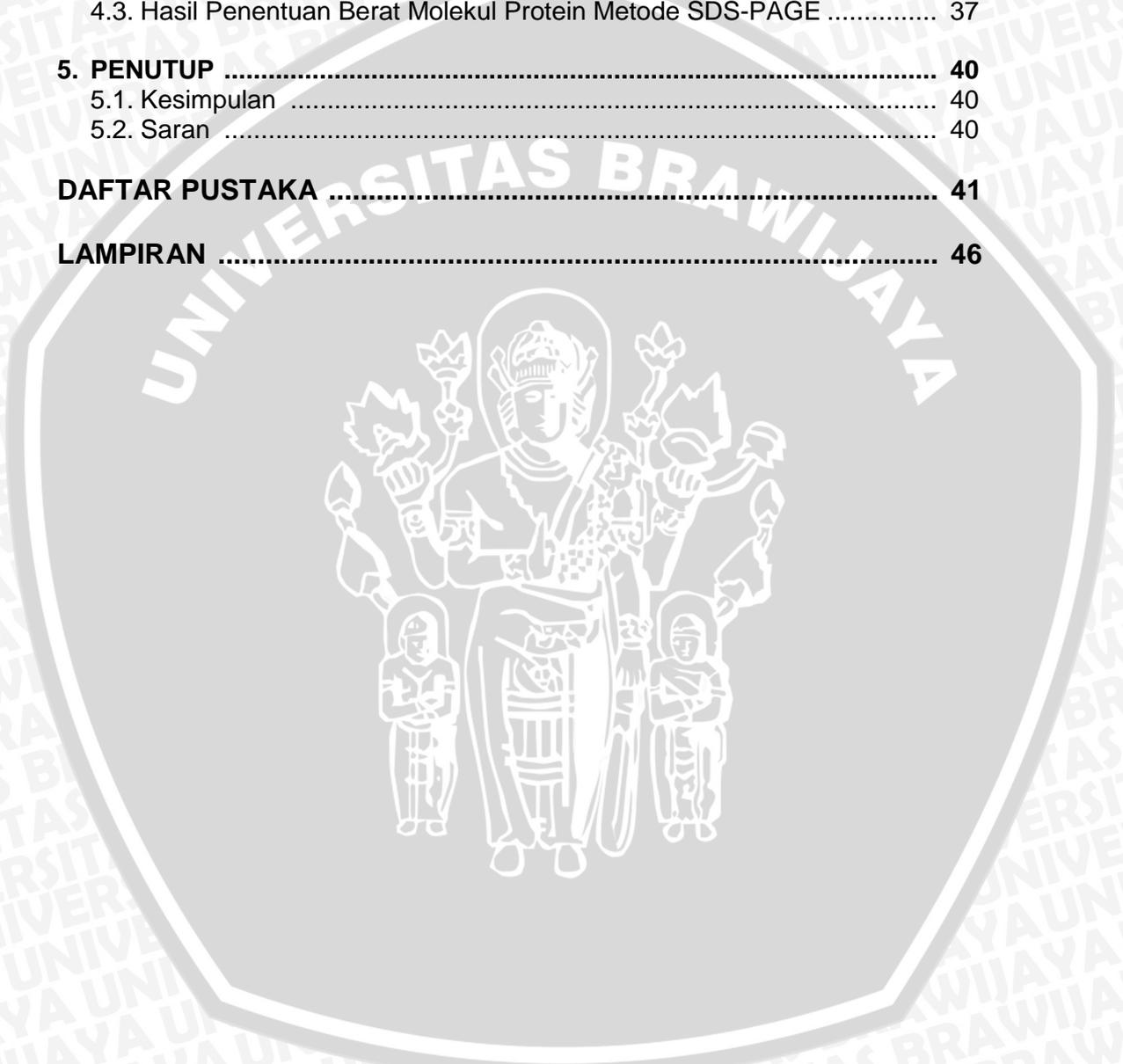
eth_meilodies@yahoo.co.id



DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	v
LEMBAR PERSEMBAHAN	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Kegunaan Penelitian	3
1.5. Tempat dan Waktu	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Bakteri <i>Nitrococcus</i> sp.	4
2.2. Metabolit (<i>Crude Enzim</i>)	5
2.2.1. Metabolit Primer	5
2.2.2. Metabolit Sekunder	6
2.3. Pemurnian Enzim	6
2.4. Histidin	8
2.5. Histamin	10
2.6. Spektrofotometri	11
2.7. Bovine Serum Albumin (BSA)	13
2.8. Sodium Dedosil Sulfat Poliakrilamid Gel Elektroforesis (SDS-PAGE) ..	13
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	15
3.1. Materi Penelitian	15
3.1.1. Bahan Penelitian	15
3.1.2. Alat penelitian	15
3.1.3. Lokasi penelitian	16
3.2. Metode Penelitian	16
3.3. Prosedur Penelitian	17
3.3.1. Pembiakan Bakteri	17
3.3.2. Ekstraksi Enzim	19
3.3.3. Pemurnian Enzim	21
3.3.3.1. Presipitasi	21

3.3.3.2. Dialisis	22
3.4. Penentuan Kadar Histamin Metode Spektrofotometri	24
3.5. Penentuan Konsentrasi Protein	28
3.6. Penentuan Berat Molekul Protein Metode SDS-PAGE	29
3.7. Diagram Alur Kerangka Konsep Penelitian.....	33
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1. Hasil Penentuan Kadar Histamin Metode Spektrofotometri	34
4.2. Hasil Penentuan Konsentrasi Protein	35
4.3. Hasil Penentuan Berat Molekul Protein Metode SDS-PAGE	37
5. PENUTUP	40
5.1. Kesimpulan	40
5.2. Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	46



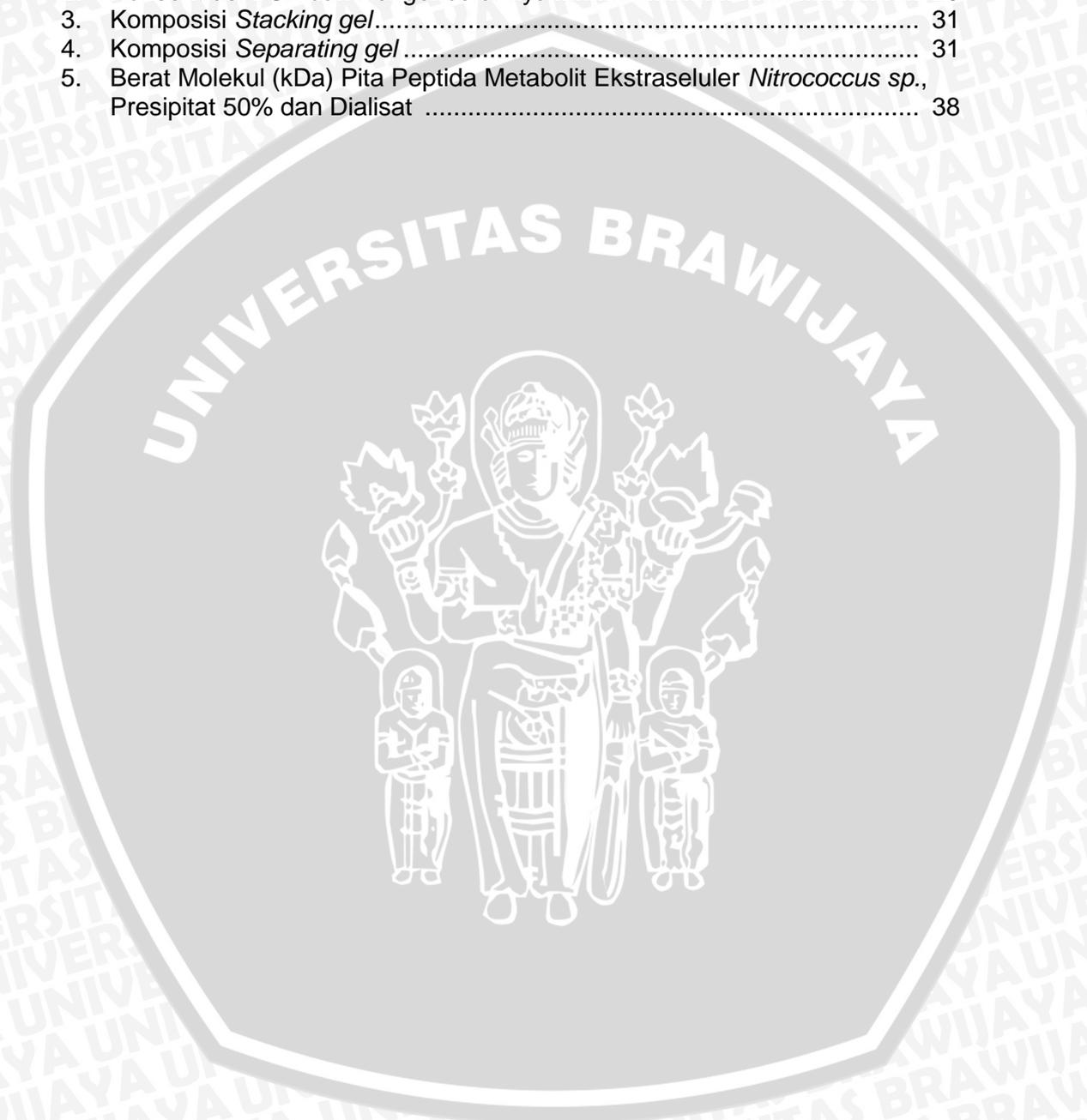
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Nitrococcus</i> sp.	4
2. Proses Oksidasi Ammonia	5
3. Proses Oksidasi Ion Nitrit.....	5
4. Perubahan Histidin Menjadi Histamin	9
5. Degradasi Histidin Menjadi <i>Urocanic Acid</i> dan Amonia Oleh HAL	9
6. Diagram Fluorometer Sederhana	12
7. Alat Spektrofluorometer	12
8. Alat SDS-PAGE	14
9. Diagram Alur Kerangka Konsep Penelitian	33
10. Diagram batang perbandingan hasil kadar histamin metabolit, presipitat dan dialisat	34
11. Diagram batang perbandingan konsentrasi protein metabolit, presipitat dan dialisat	36
12. SDS-PAGE <i>Nitrococcus</i> sp.	37



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi Medium <i>Tryptone Soya Broth</i> (TSB)	18
2. Konsentrasi BSA dan Pengencerannya	29
3. Komposisi <i>Stacking gel</i>	31
4. Komposisi <i>Separating gel</i>	31
5. Berat Molekul (kDa) Pita Peptida Metabolit Ekstraseluler <i>Nitrococcus sp.</i> , Presipitat 50% dan Dialisat	38



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Nitrococcus sp.</i>	46
2. Hasil Uji Histamin	47
3. Perhitungan Konsentrasi Protein Enzim Dialisat Metabolit <i>Nitrococcus sp.</i> dengan Metode BSA	49
4. Perhitungan Berat Molekul SDS-PAGE	51
5. Gambar Prosedur Penelitian	55



1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Histamin adalah senyawa biogenik 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 perubahan dari histidin yang terbentuk di dalam makanan karena aktivitas bakteri penghasil enzim histidin dekarboksilase. Beberapa bakteri dilaporkan memiliki aktivitas histidin dekarboksilase yang terbatas, tetapi hanya *Proteus 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).

Berbagai jenis bakteri yang mampu menghasilkan enzim histidin dekarboksilasi termasuk famili *Enterobacteriaceae* dan *Bacillaceae*. Umumnya spesies *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pedicoccus*, *Photobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, dan *Streptococcus* menunjukkan aktivitas dekarboksilasi asam amino (Allen, 2004). Sedangkan *Nitrococcus sp.* adalah bakteri yang mampu mengoksidasi ammonia menjadi nitrit (Jenie dan Rahayu, 1993).

Crude enzim pada bakteri biasanya disebut juga dengan metabolit. Menurut Dharma (2005), metabolit adalah senyawa yang diproduksi oleh bakteri dalam siklus hidupnya. Metabolit dibagi menjadi 2 yaitu metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer adalah metabolit yang dihasilkan pada fase

eksponensial dan dibutuhkan untuk pertumbuhannya, misalnya asam-asam organik, sedangkan metabolit sekunder adalah metabolit yang dihasilkan pada fase pertumbuhan stasioner dan tidak dibutuhkan untuk pertumbuhan melainkan untuk pertahanan misalnya protein, karbohidrat dan enzim.

Enzim pada umumnya dihasilkan di dalam sel, beberapa diekstrak melalui dinding sel dan dapat berfungsi di luar sel. Jadi dikenal 2 tipe enzim yaitu enzim ekstraseluler (berfungsi di luar sel) dan enzim intraseluler (berfungsi di dalam sel). Fungsi utama enzim ekstraseluler adalah mengubah nutrisi disekitarnya sedemikian hingga nutrisi tersebut masuk ke dalam sel. Sedangkan enzim intraseluler mensintesis bahan seluler atau menguraikan nutrisi untuk menyediakan energi yang dibutuhkan sel (Aulanni'am, 2004).

Dalam memisahkan protein enzim tertentu dari ekstrak kasar yang mengandung banyak unsur lain maka dilakukan isolasi atau pemurnian enzim. Pemurnian enzim dapat dilakukan berdasarkan sifat-sifat enzim sebagai protein yang berbeda dalam hal kelarutan, muatan serta ukuran atau berat molekulnya (Lehninger, 1995). Metode-metode pemurnian enzim antara lain pengendapan, filtrasi membran, kromatografi adsorpsi, kromatografi afinitas dan filtrasi gel (Smith, 1993). Metode yang paling sering digunakan adalah pengendapan dengan konsentrasi garam bervariasi (Aulanni'am, 2005). Pemurnian dengan metode pengendapan dilakukan dengan penambahan ammonium sulfat. Penambahan ammonium sulfat ke dalam larutan protein akan memberikan pengaruh terhadap kelarutan enzim yaitu menurunkan kelarutan enzim di dalam air (*salting out*) (Voet and Voet, 1990).

1.2. Rumusan Masalah

Dalam penelitian sebelumnya tentang penguraian histidin murni menjadi histamin oleh *crude* enzim didapatkan hasil kandungan histamin tertinggi yaitu

dari penambahan *crude* enzim *Nitrococcus sp.* oleh karena itu dalam penelitian ini didapatkan rumusan masalah bagaimana aktivitas enzim dari *Nitrococcus sp.* dalam menguraikan histidin menjadi histamine dan apa karakteristik enzim dari *Nitrococcus sp.*

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas enzim dari *Nitrococcus sp.* terhadap penguraian histidin menjadi histamin dan untuk mengetahui karakteristik enzim dari *Nitrococcus sp.*

1.4. Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi kepada pihak-pihak yang berkepentingan tentang manfaat senyawa bioaktif dari metabolit ekstraseluler bakteri *Nitrococcus sp.* dalam peranannya menguraikan histidin murni menjadi histamin.

1.5. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang serta Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang dimulai pada bulan Februari – Maret 2012.

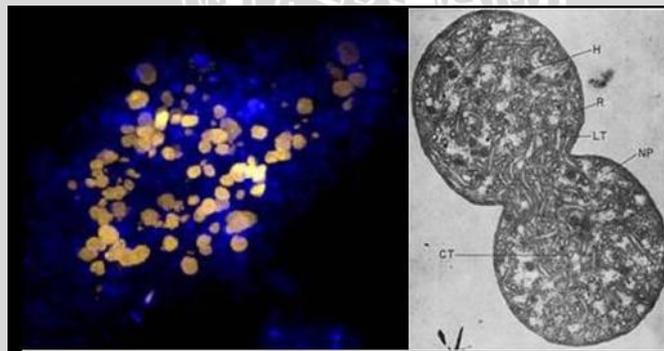
2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Nitrococcus sp.*

Bakteri nitrifikasi yang dikenal paling penting untuk proses nitrifikasi adalah *Nitrosomonas* atau *Nitrococcus* yang mengoksidasi amonia menjadi nitrit dan *Nitrobacter* yang mengoksidasi nitrit menjadi nitrat. Faktor utama yang mempengaruhi kecepatan proses nitrifikasi adalah konsentrasi mikroba nitrifikasi. Jumlah mikroba nitrifikasi tersebut dapat dicerminkan dengan waktu generasi mikroba yang akan berhubungan dengan jumlah energi yang dibutuhkan selama proses oksidasi (Jenie dan Rahayu, 1993).

Gambar dari *Nitrococcus sp.* dapat dilihat pada Gambar 1 dan Klasifikasi *Nitrococcus sp.* dalam Zipcodezoo (2011) adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: <i>Bacteria</i>
Filum	: <i>Proteobacteria</i>
Kelas	: <i>Gammaproteobacteria</i>
Ordo	: <i>Chromatiales</i>
Famili	: <i>Ectothiorhodospiraceae</i>
Genus	: <i>Nitrococcus</i>

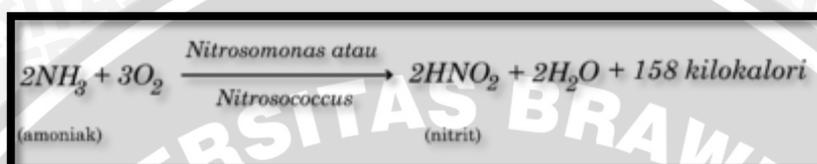


Gambar 1. *Nitrococcus sp.*

Menurut Rompas (1998), bakteri autotrofi (bakteri nitrifikasi) dapat menggunakan N-anorganik untuk melakukan nitrifikasi, seperti genus *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio*, dan *Nitrosobolus*. Pada

tahap pertama reaksi berjalan berlangsung dari amoniak ke nitrit yang melibatkan bakteri *Nitrosomonas* dan *Nitroccoccus*.

Dalam Sahara (2010), bakteri Nitrifikasi yaitu bakteri yang mengoksidasi amoniak menjadi nitrat. *Nitromonas* dan *Nitrococcus* termasuk bakteri nitrit yaitu bakteri yang mengoksidasi ammonia (NH_3). Prosesnya dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Proses Oksidasi Ammonia (Sahara, 2010)

Sedangkan bakteri *Nitrobacter* termasuk bakteri nitrat yaitu bakteri yang mengoksidasi ion nitrit (HNO_2). Prosesnya dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Proses Oksidasi Ion Nitrit (Sahara, 2010)

2.2. Metabolit (*Crude Enzim*)

Metabolit merupakan senyawa yang dihasilkan sel mikroba selama pertumbuhannya. Metabolit dibagi menjadi dua yaitu metabolit primer dan metabolit sekunder.

2.2.1. Metabolit Primer

Metabolit primer adalah senyawa yang termasuk produk akhir yang mempunyai berat molekul rendah dan dihasilkan pada fase eksponensial oleh mikroba. Senyawa digunakan sebagai bahan dasar pembangun makromolekul atau dikonversikan menjadi koenzim. Contohnya asam-asam organik seperti

asam sitrat, asam fumarat dan asam amino. Dalam memproduksi senyawa metabolit primer harus dipilih mikroba yang potensial untuk digunakan sebagai bakteriosin (Dharma, 2005). Metabolit primer adalah senyawa-senyawa kimia yang dihasilkan dan dibutuhkan oleh mikroba untuk pertumbuhannya. Metabolit primer antara lain asam laktat dan alkohol (Kunaepah, 2008).

2.2.2. Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder pada suatu organisme hidup merupakan suatu senyawa kimia yang diproduksi sebagai respon terhadap lingkungannya, salah satunya sebagai sistem pertahanan diri (Sijabat, 2009). Wibowo (2006), menambahkan bahwa metabolit sekunder merupakan hasil metabolisme yang tidak digunakan untuk proses pertumbuhan, tetapi untuk pertahanan diri. Protein, enzim, asam lemak dan karbohidrat adalah termasuk metabolit sekunder. Umumnya metabolit sekunder berasal dari metabolit primer dimana memiliki karakter yang unik pada setiap mikroorganisme karena bergantung pada lingkungan tempat hidupnya. Contoh metabolit sekunder dari mikroorganisme antara lain antibiotik, pigmen dan vitamin.

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

2.3. Pemurnian Enzim

Enzim atau biokatalisator adalah katalisator organik yang dihasilkan oleh sel. Enzim sangat penting dalam kehidupan, karena semua reaksi metabolisme dikatalis oleh enzim. Enzim diklasifikasikan menjadi 6 golongan yaitu: (1)

Oxidoreductase yakni mengkatalis reaksi reduksi-oksidasi, (2) Transferase yakni memindah gugus fungsional, (3) Hydrolase yakni menyebabkan reaksi hidrolisis, (4) Lyase yakni pengurangan gugus untuk membentuk ikatan rangkap, ikatan C-O, C-C atau C-N, (5) Isomerase yakni penyusunan kembali gugus fungsional, dan (6) Ligase yakni pembentukan ikatan yang berpasangan dengan hidrolisis ATP, penggabungan 2 molekul (Rauf, 2012).

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

Tahap awal dalam pemurnian protein atau enzim ekstraseluler adalah tahap isolasi yang bertujuan memisahkan biomassa sel serta senyawa pengotor yang berasal dari media pertumbuhan. Pemisahan dilakukan dengan sentrifugasi dengan kecepatan tertentu. Enzim yang diisolasi akan tertinggal dalam filtrat (supernatan) dan endapan yang terbentuk adalah zat-zat pengotor yang tidak diinginkan (Scopes, 1987).

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

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

dipengaruhi oleh konsentrasi pelarut organik, konsentrasi protein, kekuatan ionik, pH, dan suhu (Suhartono, 1989).

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

Selanjutnya menurut Angky (2011), dilakukan dialisis untuk menghilangkan garam-garam yang terikat pada endapan protein. Dialisis dilakukan dengan memasukkan larutan ke kantong dialisis (selofan) dengan pori-pori 10 kD dalam larutan buffer. Ditambahkan Dewi (2006), dengan demikian konsentrasi enzim bebas garam dapat dimurnikan lebih lanjut melalui fraksinasi enzim. Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan enzim dari protein non enzim lainnya. Metode fraksinasi yang umum dilakukan adalah kromatografi kolom dan elektroforesis.

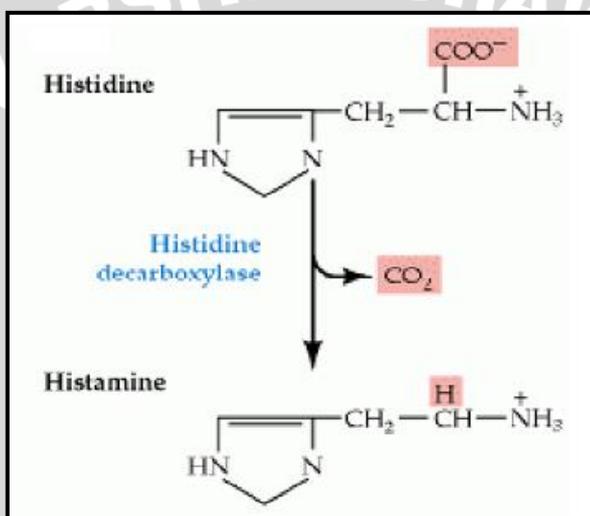
2.4. Histidin

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

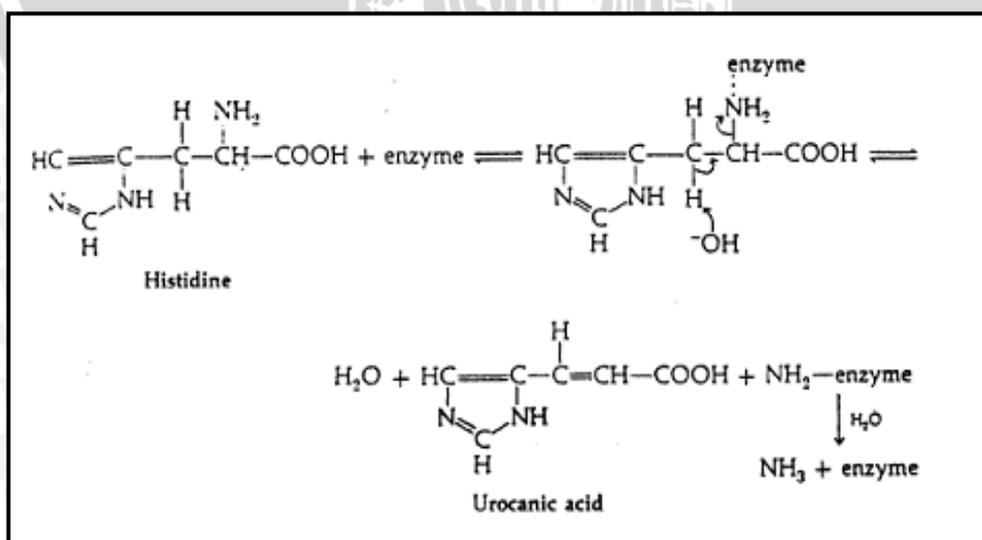
Berbagai jenis bakteri yang mampu menghasilkan enzim histidin dekarboksilase (HDC) termasuk famili *Enterobacteriaceae* dan *Bacillaceae*

(Staruszkiewicz, 2002 dalam Allen, 2004). Umumnya spesies *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Photobacterium*, *Salmonella*, *Shigella* dan *Streptococcus* menunjukkan aktivitas dekarboksilase asam amino (Kanki *et al.*, 2002 dalam Allen, 2004).

Faktor-faktor yang mempengaruhi perombakan histidin menjadi histamin adalah faktor waktu, temperatur, jenis dan banyaknya mikroflora bakteri yang terdapat dalam tubuh ikan (Sims *et al.*, 1992). Perubahan histidin menjadi histamin dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Perubahan Histidin Menjadi Histamin (Widiatusti, 2004)



Gambar 5. Degradasi Histidin Menjadi Urocanic Acid dan Amonia Oleh HAL (Lehane dan Olley, 1999).

Dalam tubuh ikan histidin tidak hanya diubah menjadi histamin melalui reaksi dekarboksilase, namun diubah menjadi *urocanic acid* dan amonia. Dalam kondisi yang sama, proses perubahan histidin menjadi histamin lebih sedikit daripada proses perubahan histidin menjadi *urocanic acid* dan amonia. Hal ini dikarenakan histidin memiliki distribusi yang luas pada hampir semua bakteri (Lehane dan Olley, 1999). Degradasi (perubahan) histidin oleh HAL menjadi *urocanic acid* dan amonia dapat ditunjukkan pada Gambar 5.

2.5. Histamin

Histamin merupakan perubahan dari histidin yang terbentuk di dalam makanan karena aktivitas bakteri penghasil enzim histidin dekarboksilase. (Taylor dan Behling, 1982). 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).

Histamin dihasilkan dari perombakan histidin yang merupakan prekursor histamin. Ada dua macam histidin dalam daging ikan yaitu histidin bebas yang akan diubah menjadi histamin dan histidin terikat dalam protein (Sims *et al.*, 1992). Histidin dapat diubah menjadi histamin selama proses pembusukan oleh bakteri pembentuk histamin yang mengandung enzim histidin dekarboksilase. Pembentukan histamin sering disebabkan oleh suhu ikan yang tinggi setelah penangkapan (Guizani *et al.*, 2005).

Histamin umumnya terbentuk dari fraksi protein yang bereaksi dengan enzim-enzim dan merupakan hasil metabolisme *anaerob post mortem*, yakni terjadi setelah kematian makhluk hidup. Sehingga kasus alergi hanya terjadi bila makanan hasil laut yang dikonsumsi kadaluarsa atau kualitas tidak lagi baik.

Karena komposisi kimiawi berubah oleh aktivitas enzim-enzim atau oleh aktivitas mikroorganisme pembusuk (Agustina, 2010). Histamin dihasilkan pada daging ikan melalui reaksi dekarboksilasi histidin bebas oleh bakteri yang mengandung enzim histidin dekarboksilase dengan suhu optimum untuk menghasilkan histamin adalah 25°C (Kim *et al.*, 1999).

Kasus keracunan histamin pada mulanya lebih dikenal sebagai keracunan scombroid karena melibatkan ikan dari famili *Scombroide* yaitu tuna, bonito, tongkol, mackerel, dan *seerfish*. Jenis ikan tersebut mengandung histidin bebas dalam jumlah besar pada dagingnya, yang pada kondisi tertentu dapat diubah menjadi histamin karena adanya aktivitas enzim histidin dekarboksilase dari bakteri yang mencemari ikan tersebut. Gejala keracunan histamin dimulai beberapa menit sampai beberapa jam setelah ikan di konsumsi. Gejalanya berupa muntah-muntah, diare, pembengkakan pada bibir, kejang-kejang, dan kerongkongan terasa terbakar. Gejala ini berlangsung kurang dari 12 jam dan dapat diobati dengan terapi antihistamin (Djaafar dan Rahayu, 2007).

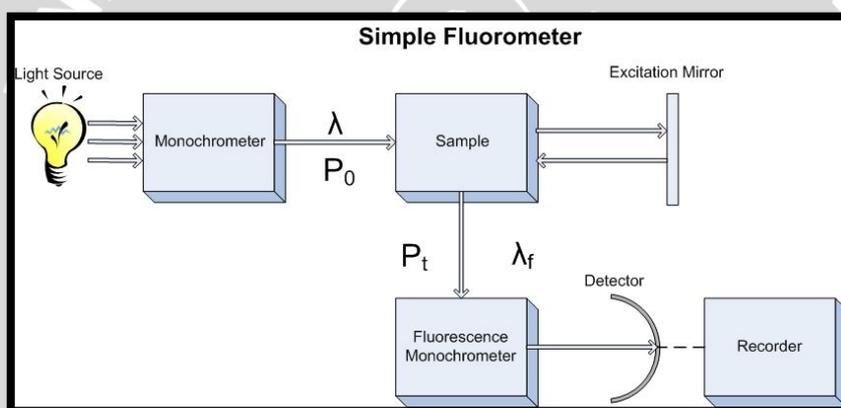
Tingginya kadar histamin dalam makanan ini merupakan dampak aktivitas bakteri pada asam amino histidin. Histamin sesungguhnya bukan zat yang asing pada tubuh manusia. Dalam takaran fisiologis, histamin berfungsi sebagai substansi yang berperan dalam sekresi asam lambung, tetapi dengan dosis tinggi, zat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

2.6. Spektrofluorometri

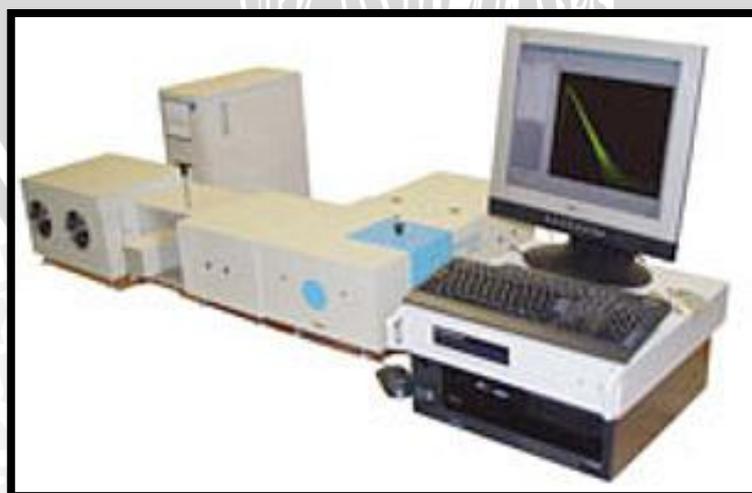
Spektrofotometri fluoresensi merupakan suatu prosedur yang menggunakan pengukuran intensitas cahaya fluoresensi yang dipancarkan oleh zat uji dibandingkan dengan yang dipancarkan oleh suatu baku tertentu. Pada umumnya cahaya yang diemisikan oleh larutan berfluoresensi mempunyai intensitas maksimum pada panjang gelombang yang biasanya 20 nm hingga 30

nm lebih panjang dari panjang gelombang radiasi eksitasi (gelombang pita penyerapan sinar yang membangkitkannya) (Widodo, 2010). Diagram fluorometer sederhana dapat dilihat pada Gambar 6.

Metode spektrofluorometri mempunyai limit deteksi yang rendah dengan kemampuan analisis kimia relatif kecil sekitar sepersepuluh metoda spektrometri biasa, dan daerah pengukurannya sekitar 0,1 sampai 0,001 ppm. Namun walaupun metoda analisis kimia fluorometri ini sangat selektif, pemakaiannya terbatas pada senyawa-senyawa yang berfluoresensi atau yang dapat dibuat berfluoresensi (Noviarty, 2007). Alat Spektrofluorometer dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 6. Diagram Fluorometer Sederhana (Chemwiki, 2008)



Gambar 7. Alat Spektrofluorometer (Directindustry, 2009)

2.7. Bovine Serum Albumin (BSA)

Penentuan konsentrasi protein menggunakan metode biuret dengan BSA (Bovine Serum Albumin) sebagai standar. Prinsip kerja metode biuret adalah senyawa dengan 2 atau lebih ikatan peptida apabila direaksikan dengan garam kupri dalam suasana basa akan membentuk warna violet. Reaksi biuret bergantung pada pembentukan suatu kompleks antara ion Cu^{++} dengan 4 atom N-peptida pada suasana basa, maka akan membentuk suatu kompleks warna ungu yang absorbansinya dapat dibaca pada panjang gelombang 540 nm. Pada metode menggunakan larutan BSA (Holme dan Peck, 1993).

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

2.8. Sodium Dedosil Sulfat Poliakrilamid Gel Elektroforesis (SDS-PAGE)

Elektroforesis adalah pemisahan molekul berdasarkan bobot molekul dan muatan elektronnya. Molekul yang bermuatan negatif cenderung bergerak ke kutub positif. Kecepatan perpindahan molekul tergantung muatan elektronnya, tegangan yang digunakan, dan koefisien gesek. Media penahan yang dapat digunakan dalam elektroforesis antara lain cairan, kertas, gel. Agarosa dan poliakrilamida termasuk golongan media berbasis gel. Agarosa mampu memisahkan asam nukleat sementara poliakrilamida mampu memisahkan molekul protein (Farrell dan Ranallo, 2000).

Menurut Harris dan Angel (1989), elektroforesis gel poliakrilamida (PAGE) adalah metode yang paling banyak digunakan karena memiliki kapasitas pemisahan yang tinggi. Salah satu metode PAGE yang umumnya digunakan

adalah SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*).

Prinsip analisis SDS-PAGE adalah pemisahan protein berdasarkan ukuran molekul. Pada SDS-PAGE, semua ikatan disulfida yang ada pada protein direduksi oleh β -merkптоetanol. Senyawa SDS yang ditambahkan berfungsi memutuskan ikatan diantara sub unit penyusun protein dan membuat keseluruhan protein diselimuti muatan negatif, sehingga pergerakan protein hanya dipengaruhi oleh ukurannya (Dewi, 2006). Alat SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Alat SDS-PAGE

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1. Materi Penelitian

3.1.1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk membuat *crude* metabolit ekstraseluler bakteri adalah isolat bakteri murni *Nitrococcus sp.* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Bahan pendukung lainnya adalah media cair TSB, akuades, NaCl untuk isolasi bakteri. Proses presipitasi digunakan ammonium sulfat dan akuades. Proses dialisis digunakan buffer fosfat 0,1 M pH 7, buffer fosfat 0,005 M pH 7, etanol dan akuades. Pengujian konsentrasi protein digunakan *phosphate Buffer Saline* (PBS), *reagen biuret*, dan akuades. Sedangkan pengujian berat molekul metode Sodium Dedosil Sulfat Poliakrilamid Gel Elektroforesis (SDS-PAGE) digunakan sampel berupa *crude* metabolit ekstraseluler bakteri *Nitrococcus sp.* dan Gel.

3.1.2. Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam proses penelitian ini antara lain *waterbath shaker*, kulkas, laminar *flow*, tabung reaksi, rak tabung reaksi bertutup, *erlenmeyer*, pipet volum, *beaker glass*, timbangan digital, gelas arloji, *osse*, laminaran, gelas ukur, spatula, bunsen, botol semprot, nampan, inkubator, dan autoklaf. Proses presipitasi digunakan *stirrer* dan sentrifuse. Proses dialisis digunakan kantong selofan, *ependorf*, dan sentrifuse. Pengujian konsentrasi protein digunakan *erlenmeyer*, *ependorf*, vortek, tabung reaksi dan spektrofotometer UV-Vis. Sedangkan pengujian berat molekul metode Sodium Dedosil Sulfat Poliakrilamid Gel Elektroforesis (SDS-PAGE) digunakan perangkat elektroforesis SDS-PAGE.

3.1.3. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di beberapa laboratorium diantaranya adalah untuk pengadaaan bakteri, isolasi bakteri dan metabolit *Nitrococcus sp.* di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, untuk presipitasi, dialisis, pengujian konsentrasi protein dan pengujian berat molekul metode Sodium Dedosil Sulfat Poliakrilamid Gel Elektroforesis (SDS-PAGE) di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, dan pengujian histamin di Laboratorium Penelitian Pengujian Mutu Hasil Perikanan Surabaya.

3.2. Metode Penelitian

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

Menurut Singarimbun dan Effendi (1989) metode eksploratif bertujuan untuk memperoleh pengetahuan tentang suatu gejala sehingga setelah melalui tahap observasi, masalah dan hipotesisnya dapat dirumuskan. Penelitian metode eksploratif memberikan pengetahuan tentang gejala yang hendak diteliti masih sangat terbatas dan merupakan langkah pertama bagi penelitian yang lebih mendalam.

Penelitian eksploratif bersifat menjelajah, artinya penelitian yang dilakukan apabila pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang atau tidak ada sama sekali. Penelitian eksploratif seringkali berupa studi kasus

dari suatu kelompok atau golongan tertentu, yang masih kurang diketahui orang. (Surakhmad, 1994).

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Pemiakan Bakteri

Sebelum melakukan penelitian terlebih dahulu dilakukan sterilisasi alat. Sterilisasi adalah suatu proses penguapan yang digunakan untuk beberapa produk dalam situasi dimana produk-produk tersebut terhindar dari kontaminasi (Dart, 2003). Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan uap panas (autoklaf) pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Pada suhu dan tekanan tersebut mampu membunuh mikroba (Nicklin *et al.*,1999). Selain itu alat yang harus disterilkan yaitu laminar *flow*, dengan cara menyemprot bagian dalamnya dengan alkohol 70%, kemudian dilap semua bagiannya menggunakan serbet bersih agar aseptis, ditutup kaca laminar *flow* dan menekan tombol UV untuk menghidupkan sinar UV pada alat yang berfungsi sebagai pensteril laminar *flow* selama 1 jam.

Prosedur Kerja

Prosedur kerja untuk perkembangbiakan bakteri yaitu dengan menggunakan media TSB.

- Ditimbang media TSB (*Tryptone Soya Broth*) sebanyak 18 gram menggunakan timbangan digital.
- Media TSB dimasukkan kedalam erlenmeyer 1000 ml dan diberi akuades sebanyak 600 ml, lalu diaduk dengan spatula sampai homogen, kemudian didapatkan media cair.
- Dimasukkan kedalam masing-masing erlenmeyer sebanyak 100 ml, setelah itu disterilkan menggunakan autoklaf 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 botol tidak pecah ketika diberi perlakuan lebih lanjut. Digunakan media ini dikarenakan pada penelitian sebelumnya oleh Yuliantika (2012) didapatkan hasil bahwa media yang paling baik digunakan dalam membiakkan bakteri *Nitrococcus sp.* adalah media TSB. Adapun komposisi dari media TSB dapat dilihat pada Tabel 1 dibawah ini :

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

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

- Setelah 1 jam, sinar UV pada laminar *flow* dimatikan, lalu lampu laminar *flow* dinyalakan untuk memudahkan penglihatan pada saat penanaman bakteri.
- Laminar *flow* bagian dalam disemprot dengan alkohol agar aseptis, kemudian tangan yang telah dipasang dengan sarung tangan disemprot juga agar tidak ada kontaminasi saat penanaman bakteri.
- Kemudian bunsen dinyalakan dan diletakkan didekat laminar *flow* beserta isolat murni bakteri *Nitrococcus sp.* dan media cair yang diletakkan di rak tabung reaksi, lalu jarum ose pada bagian ujungnya disemprot dengan alkohol dan dipanaskan di atas bunsen. Hal tersebut dilakukan untuk menghindari kontaminasi alat pada saat penanaman bakteri.
- Kemudian diambil sampel bakteri yang akan dibiakkan, dibuka tutup tabung sambil dipanaskan diatas bunsen untuk menjaga kondisi tetap aseptis.

- Jarum ose disentuhkan di media isolat bakteri untuk mengurangi panas dari jarum osse, sehingga bakteri yang diambil tidak mati.
- Selanjutnya diambil sebanyak 1 jarum ose bakteri dengan cara menggores isolat dan dimasukkan kedalam media cair baru yang telah disiapkan (jarum ose di masukkan di permukaan saja agar tidak terjadi kontaminasi, karena hanya bagian ujung jarum ose yang disterilkan).
- Bakteri yang telah diinokulasi pada media baru, dipanaskan lagi diatas bunsen bagian permukaan erlenmeyernya dan segera ditutup.
- Jarum osse dipanaskan di atas bunsen lagi bagian ujungnya agar kembali steril saat digunakan untuk membiakkan bakteri yang lain.
- Setelah itu, bakteri dan media dihomogenkan, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- Setelah diinkubasi, dilihat ada atau tidak endapan pada media, dimana adanya endapan berarti pembiakan telah berhasil dilakukan.
- Erlenmeyer diberi label nama bakteri yang telah dibiakkan agar tidak terjadi kesalahan pada saat pengamatan perlakuan fermentasi.
- Dari penelitian sebelumnya oleh Yuliantika (2012) didapatkan hasil bahwa fase stasioner terdapat pada jam ke-17.
- Kurva pertumbuhan bakteri dari jam ke-1 sampai ke jam ke-24 dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3.2. Ekstraksi Enzim

Crude enzim yang dimaksud dalam penelitian ini adalah metabolit. Metabolit yang digunakan pada penelitian ini adalah metabolit sekunder. Metabolit yang dihasilkan dari fase stasioner pertumbuhan bakteri (Dharma, 2005). Pemanenan *crude* enzim berupa metabolit sekunder bakteri *Nitrococcus sp.* dilakukan berdasarkan metode Noviani *et al.* (2009) yang dimodifikasi. Setelah

dilakukan pengamatan fase-fase pertumbuhan bakteri, maka kita dapat mengetahui pada jam keberapakah bakteri tersebut memasuki fase stasioner. Sampel metabolit sekunder dipanen pada fase stasioner. Fase stasioner dipilih karena pada fase ini merupakan fase pertumbuhan tertinggi dari bakteri itu sendiri. Menurut Nurwantoro (2003), populasi total bakteri cenderung meningkat seiring dengan penambahan lama waktu penyimpanan. Hal ini dapat diakibatkan bakteri sedang berada dalam fase stasioner. Semakin banyak bakteri yang dihasilkan maka akan semakin banyak pula metabolit yang dapat dipanen dari bakteri tersebut.

Prosedur Kerja

Prosedur kerja untuk ekstraksi enzim yaitu:

- Menginokulasi kultur cair isolat bakteri pada erlenmeyer dengan menggunakan media TSB kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam.
- Setelah perlakuan tersebut media akan menjadi keruh hal ini dikarenakan bakteri tersebut mengalami pertumbuhan.
- Selanjutnya adalah disentrifugasi menggunakan alat *ultracentrifuge* dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit dengan suhu alat 4°C, suhu ini digunakan pada alat tersebut dikarenakan dengan kecepatan 12.000 rpm sampel tersebut akan panas sehingga dapat merusak nutrisi-nutrisi yang ada di dalamnya, maka dari itu digunakan suhu ini untuk menghindari terjadinya kerusakan pada nutrisi yang ada di dalamnya.
- Supernatan yang diperoleh berupa *crude* enzim (ekstrak enzim), sedangkan endapan yang terbentuk adalah zat-zat pengotor yang tidak diinginkan.

3.3.3. Pemurnian Enzim

3.3.3.1. Presipitasi (Pengendapan dengan Amonium Sulfat)

Presipitasi yaitu pengendapan dengan amonium sulfat. Memisahkan protein dari protein yang berbeda dan juga dengan non protein dari *crude* protein. Konsentrasi amonium sulfat yang tinggi akan meningkatkan muatan listrik disekitar protein yang akan menarik mantel air dari koloid protein (Aulanni'am, 2004). Penambahan amonium sulfat berpengaruh terhadap protein yang terendapkan selama proses pemurnian. Ion-ion garam amonium sulfat akan berkompetisi dengan protein untuk menarik molekul air. Ion-ion garam memiliki kelarutan lebih besar dibandingkan dengan protein sehingga ion garam akan menarik molekul air dari protein enzim. Protein-protein enzim akan berinteraksi membentuk gumpalan dan mengendap (Davidson dan Sittman, 1999). Endapan enzim yang terbentuk dipisahkan dengan sentrifugasi (Deustcher, 1990).

Preparasi Bahan

- 50 mL metabolit *Nitrococcus sp.*
- Masing-masing konsentrasi 10 mL.
- Amonium sulfat 30%, 40%, 50%, 60%, 70%

Perhitungan amonium sulfat

$$30\% = \frac{30}{100} \times 10 \text{ mL} = 3 \text{ gram}$$

$$40\% = \frac{40}{100} \times 10 \text{ mL} = 4 \text{ gram}$$

$$50\% = \frac{50}{100} \times 10 \text{ mL} = 5 \text{ gram}$$

$$60\% = \frac{60}{100} \times 10 \text{ mL} = 6 \text{ gram}$$

$$70\% = \frac{70}{100} \times 10 \text{ mL} = 7 \text{ gram}$$

Prosedur Kerja

- Supernatan diambil sebanyak 100 mL.

- Ditambah amonium sulfat 30 %, 40 %, 50 %, 60 % dan 70 % disertai dengan pengadukan menggunakan *stirer* secara perlahan sampai homogen.
- Disimpan pada suhu 4°C selama 10 menit.
- Campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit, dan dihasilkan endapan berupa pelet.

3.3.3.2. Dialisis

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

Preparasi Bahan

- Pelet hasil endapan dengan ammonium sulfat.
- Buffer fosfat 0,1 M pH = 8.
 - o Larutan A = 0,028392 gr Na_2HPO_4 dilarutkan dalam 2 mL akuades.
 - o Larutan B = 0,143256 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 4 mL akuades.
 - o Diambil larutan A (1,95 mL) dan larutan B (3,05 mL), kemudian dicek pH 8 dan ditambahkan akuades hingga 10 mL.
 - Perhitungan Na_2HPO_4 = $M \times V \times \text{BM}$
= $0,1 \times 0,002 \text{ L} \times 141,96$

$$= 0,028392 \text{ gr}$$

- Perhitungan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} = M \times V \times \text{BM}$

$$= 0,1 \times 0,004 \text{ L} \times 358,14$$

$$= 0,143256 \text{ gr}$$

- Buffer fosfat 0,05 M pH 8

- Larutan A = 1,41 gr Na_2HPO_4 dilarutkan dalam 200 mL akuades.

- Larutan B = 6,267 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 350 mL akuades.

- Diambil larutan A (195 mL) dan larutan B (305 mL), kemudian dicek pH 8 dan ditambahkan akuades hingga 1 L.

- Perhitungan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = M \times V \times \text{BM}$

$$= 0,05 \times 0,2 \text{ L} \times 141,96$$

$$= 1,41 \text{ gr}$$

- Perhitungan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} = M \times V \times \text{BM}$

$$= 0,05 \times 0,35 \text{ L} \times 358,14$$

$$= 6,267 \text{ gr}$$

- Na_2CO_3 5% = 5 gr Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL akuades.

- EDTA 50 mM pH 8 : 1,861 gr EDTA dilarutkan dalam 100 mL akuades.

- Kantong selofan 10 kDa.

- Didihkan 100 mL larutan Na_2CO_3 5% diatas *hot plate* kemudian masukkan kantong selofan selama 15 menit, kemudian dicuci dengan akuades.

- Didihkan 100 mL larutan EDTA 50 mM pH 8 di atas *hot plate* kemudian masukkan kantong selofan selama 15 menit, kemudian dicuci dengan akuades.

- Didihkan akuades steril diatas *hot plate* kemudian masukkan kantong selofan selama 15 menit, kemudian cuci dengan akuades.

Prosedur Kerja

- Pelet hasil pengendapan amonium sulfat ditambahkan 10 mL buffer fosfat 0,1 M pH 8.
- Dimasukkan dalam kantong selofan ukuran 10 kDa dan dijepit tiap ujungnya.
- Selanjutnya didialisis dengan cara direndam dalam 1 L buffer fosfat 0,005 M pH 8 selama semalam.
- Hasil dialisis dimasukkan dalam *ependorf* sebanyak 0,5 mL.
- Ditambahkan etanol dingin dengan perbandingan (1:1), kemudian dihomogenkan.
- Didiamkan selama ± 1 jam pada suhu 4°C.
- Disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm, suhu 4°C selama 15 menit.
- Dialisat metabolit yang diperoleh dikering-anginkan dan disimpan pada suhu 4°C.

3.4. Penentuan Kadar Histamin Metode Spektrofluorometri

Prinsip metode penentuan kadar histamin secara spektrofluorometri menurut SNI 01-2354.10-2009, histamin diukur secara fluorometri pada panjang gelombang eksitasi 350 nm dan emisi 444 nm.

Prosedur Kerja

- Diambil ± 10 mL sampel dalam *beaker glass* 250 mL dan ditambahkan 50 mL metanol, divortex hingga homogen.
- Dipanaskan di atas *waterbath* selama 15 menit pada suhu 60°C dijaga sampel dalam kondisi tertutup, didinginkan hingga suhu kamar.
- Dituang sampel dalam labu takar 100 mL dan ditepatkan hingga volume labu dengan metanol.

- Disaring menggunakan kertas saring dan filtratnya ditampung dalam botol sampel. Pada tahap ini filtrat sampel disimpan dalam *refrigerator*.

Persiapan Resin

- Ditimbang 3 gr resin untuk setiap kolom dalam *beaker glass* 250 mL.
- Ditambahkan 15 mL NaOH 2 N/gr resin untuk mengubah resin menjadi bentuk OH.
- Diaduk menggunakan *stirrer plate* selama 30 menit.
- Dituang cairan pada bagian atas dan diulangi penambahan NaOH 2 N dengan jumlah sama.
- Dicuci/dibilas resin dengan akuades sebanyak 3 kali.
- Disaring melalui kertas saring No. 588 atau yang setara dan dicuci kembali dengan akuades.
- Disiapkan resin setiap minggu dan disimpan dalam akuades.

Persiapan Kolom Resin

- Dimasukkan *glasswool* ke dalam kolom resin setinggi $\pm 1,5$ cm.
- Dimasukkan resin dalam medium air ke kolom resin setinggi ± 8 cm. Dipertahankan volume air yang berada di atas resin ± 1 cm, jangan dibiarkan kering.
- Diletakkan 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 filtrat contoh, dimasukkan dalam kolom resin, kran kolom resin dalam posisi terbuka biarkan aliran menetes (hasil elusi) ditampung dalam labu takar 50 mL.
- Ditambahkan akuades pada saat tinggi cairan ± 1 cm di atas resin dan dibiarkan cairan terelusi. Dilakukan seterusnya hingga hasil elusi dalam

labu takar tepat 50 mL. Hasil elusi (contoh) dapat disimpan dalam *refrigerator*.

Pembentukan Senyawa Turunan (Derivatisasi)

- Disiapkan tabung reaksi 50 mL masing-masing untuk contoh, standar dan blanko.
- Pipet masing-masing 5 mL filtrat contoh, larutan standar kerja dan blanko (HCl 0,1 N).
- Ditambahkan ke dalam tabung reaksi diatas berturut-turut:
 - o 10 mL HCl 0,1 N, dihomogenkan.
 - o 3 mL NaOH 1 N, dihomogenkan.
 - o 3 mL H₃PO₄ 3,57 N, dihomogenkan.
- Dilakukan pengukuran *fluorescence* terhadap sampel, standard dan blanko sesegera mungkin dengan alat spektrofлуorometer pada panjang gelombang eksitasi 350 nm dan emisi 444 nm dalam jangka waktu 90 menit.

Perhitungan

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

$$y = a + bx$$

dimana:

y = fluoresensi sampel

a = *intersep*

b = *slope*

x = konsentrasi sampel yang akan dihitung

- Setelah didapat harga x , kemudian dikalikan dengan faktor pengenceran dan kembalikan ke berat sampel. Dinyatakan kandungan histamin dalam $\mu\text{g/g}$ atau mg/kg sampel.
- Konsentrasi histamin $\mu\text{g/g}$ sampel = $A \times \frac{\text{Volume akhir (ml)} \times f_p}{\text{gram contoh}}$

Dimana:

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

Penjelasan:

- **Intersep (*Intercept*)**

Intersep adalah titik perpotongan antara suatu garis regresi dengan sumbu Y pada diagram/sumbu kartesius saat nilai $X = 0$. Sedangkan definisi secara statistik adalah nilai rata-rata pada variabel Y apabila nilai pada variabel X bernilai 0. Dengan kata lain, apabila X tidak memberikan kontribusi, maka secara rata-rata variabel Y akan bernilai sebesar intersep. Perlu diingat, intersep hanyalah suatu konstanta yang memungkinkan munculnya koefisien lain di dalam regresi. Intersep tidak selalu dapat atau perlu untuk diinterpretasikan. Apabila data pengamatan pada variabel X tidak mencakup 0 atau mendekati 0, maka intersep tidak memiliki makna yang berarti, sehingga tidak perlu diinterpretasikan.

- **Slope**

Secara matematis, *slope* merupakan ukuran kemiringan dari suatu garis. Slope adalah koefisien regresi untuk variabel X (variabel bebas). Dalam konsep statistika (sumbangan) yang diberikan suatu variabel X terhadap Y. Nilai *slope* dapat pula diartikan sebagai rata-rata pertambahan (pengurangan) yang terjadi pada variabel Y untuk setiap peningkatan satu-satuan variabel X.

3.5. Penentuan Konsentrasi Protein

Penentuan konsentrasi protein metabolit menggunakan metode biuret dengan BSA (Bovine Serum Albumin) sebagai standar. Prinsip kerja metode biuret adalah senyawa dengan 2 atau lebih ikatan peptida apabila direaksikan dengan garam kupri dalam suasana basa akan membentuk warna violet. Reaksi biuret bergantung pada pembentukan suatu kompleks antara ion Cu^{++} dengan 4 atom N-peptida pada suasana basa, maka akan membentuk suatu kompleks warna ungu yang absorbansinya dapat dibaca pada panjang gelombang 540 nm. Pada metode menggunakan larutan BSA. Kelebihan BSA adalah larutan stabil pada pemanasan 70°C selama 30 menit, lebih spesifik karena 95 % protein terdiri dari albumin. Adapun kelebihan biuret ini sendiri adalah lebih spesifik untuk peptida, polipeptida, dan protein, tidak bereaksi dengan ammonia, urea, dan senyawa nitrogen sederhana. Metode BSA berdasarkan Wiseman (1985) dan Holme dan Peck (1993) dengan biuret.

Persiapan

- Dialisat metabolit 1 mL : 2 mg dialisat metabolit dilarutkan dalam 1.000 μL *phosphate buffer saline* (PBS).
- Reagen biuret 50 mL : sebanyak tembaga (II) sulfat 0,075 gr CuSO_4 ; 0,3 gr kalium natrium tartat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$); 15 mL NaOH 2,5 M; 0,05 gr KI kemudian ditambahkan akuades 50 mL.
- 2 mL larutan standar protein BSA 1.200 ppm (1,2 mg/mL), kemudian dilakukan pengenceran larutan stok.

Prosedur Kerja

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

Tabel 2. Konsentrasi BSA dan Pengencerannya

Larutan stok BSA (μL)	13	26	52	104	208	416	832
Akuades (μL)	987	974	948	896	792	584	168
Konsentrasi protein ($\mu\text{g/mL}$)	15.625	31.25	62.5	125	250	500	1000

- Disiapkan *ependorf* sebanyak 14 buah, isi masing-masing dengan akuades dan larutan stok (BSA) sehingga didapatkan konsentrasi yang diinginkan (sesuai perhitungan pengenceran), lalu vortek.
- Diambil 1 mL larutan dari masing-masing *ependorf*, lalu dipindahkan ke dalam tabung reaksi.
- Ditambahkan masing-masing tabung dengan 2 ml reagen biuret (1:2)
- Diinkubasi pada suhu 37°C , selama 20 menit.
- Dibaca absorbansi dengan spektrofotometer *Ultra Violet Visible* (UV-Vis) pada panjang gelombang 540 nm.

Perhitungan Konsentrasi Protein

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

Dimana : y = nilai absorbansi

x = konsentrasi protein

3.6. Penentuan Berat Molekul Protein Metode SDS-PAGE

Elektroforesis adalah teknik pemisahan fraksi-fraksi zat berdasarkan migrasi partikel bermuatan di bawah pengaruh medan listrik karena adanya perbedaan ukuran, bentuk, muatan dan sifat kimia molekul (Boyer, 1986).

Penentuan berat molekul dialisat metabolit *Nitrococcus sp.* dapat dilakukan dengan menggunakan metode populer yang disebut Sodium Dodesil

Sulfat Poliakrilamid Gel Elektroforesis (SDS-PAGE). Metode SDS-PAGE dilakukan dengan menggunakan 2 jenis gel yaitu “*stacking*” dan “*separating*”. Pada *stacking gel*, molekul bermuatan dapat bergerak bebas dalam pengaruh medan listrik. Molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang berdekatan. Protein dengan berat molekul tinggi dielektroforesis pada kondisi terdisosiasi menjadi monomer sehingga protein menjadi subunit yang lebih kecil sehingga elektroforetiknya bergantung pada berat molekulnya (Granner *et al.* 2003). Prosedur kerja SDS-PAGE menurut Aulanni'am (2004).

Preparasi

- Dilarutkan 1 mg dialisat metabolit *Nitrococcus sp.* dalam 500 μ L PBS.
- *Stacking gel* dan *separating gel* (12,5%), komposisi pembuatan *Stacking gel* dapat dilihat pada Tabel 3 dan komposisi pembuatan *Separating gel* dapat dilihat pada Tabel 4.
- RSB (*Reducing Sample Buffer*) : 1 mL Tris Cl pH 8,8 + 0,8 mL Gliserol + 1,6 mL SDS 10% + 0,4 Mercaptoetanol + 0,2 mL *Bromopenol blue* kemudian ditambahkan 0,8 mL akuades sampai dan dihomogenkan.
- Larutan *destaining* : 20 mL Metanol 20% + 10 mL Asam Asetat Glisial 10%, kemudian ditambahkan akuades sampai volume 100 mL dan dihomogenkan.
- Larutan *staining* : 0,1 gr *coomasie blue* R 0,1 % + 40 mL metanol 40% + 10 mL Asam Asetat Glisial 10% kemudian ditambahkan akuades sampai volume 100 mL dan dihomogenkan.
- *Running buffer* : 3,03 gr Tris Base + 14,2 gr Glisin dilarutkan dalam 700 mL akuades kemudian dicek pH 8,8. Setelah itu ditambahkan 1 gr SDS, dihomogenkan dan ditambah akuades sampai volumenya 1 L.

Tabel 3. Komposisi *Stacking gel*

Komposisi	1 slab (μL)
Acrylamide 30%	515
Tris HCL 1.5 M, pH 8.8	625
H ₂ O	1325
SDS 10%	25
APS 10%	7,5
TEMED	5

Tabel 4. Komposisi *Separating gel*

Komposisi	1 slab (μL)
Acrylamide 30%	4126
Tris HCL 1.5 M, pH 8.8	2500
H ₂ O	3270
SDS 10%	100
APS 10%	100
TEMED	20

Prosedur Kerja

- Dalam pelaksanaannya dibutuhkan dua peralatan, yaitu *power supply* dan *buffer system*. Setelah buffer sistem dipasang maka *separating gel* dengan konsentrasi 12.5 % dimasukkan dalam *plate* dan ditunggu sampai mengeras.
- Di atas *separating gel* dimasukkan *stacking gel* dengan konsentrasi 12.5 % dan sisir dimasukkan di antara *plate* sehingga nantinya akan terbentuk sumuran sebagai tempat masukan enzim.
- Sampel 15 μL diberi 15 μL RSB (*reducing sample buffer*) dan dipanaskan selama 5 menit. Marker (*prestained protein ladder*) 15 μL yang digunakan mempunyai BM dengan kisaran 17 – 250 kDa. Kemudian sampel dan marker dimasukkan dalam sumur gel. *Running buffer* dituang ke dalam *buffer system*. Selanjutnya anoda dan katoda dihubungkan dengan *power supply* dan dialiri arus listrik sebesar 120 Volt, 20 *Ampere* selama kurang lebih 75 menit.

- Proses elektroforesis dilakukan sampai pita mencapai batas akhir dari gel
- Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam *staining solution* sambil di goyang dengan shaker selama 1-2 jam.
- Selanjutnya penghilangan warna dilakukan dengan merendam gel dalam *destaining solution*. Proses *destaining* dilakukan sampai pita protein pada gel terlihat dan warna gel tidak terlalu biru. untuk menghilangkan warna latar belakang.
- Pita protein akan nampak dalam gel.

Pengukuran Berat Molekul Protein Sampel

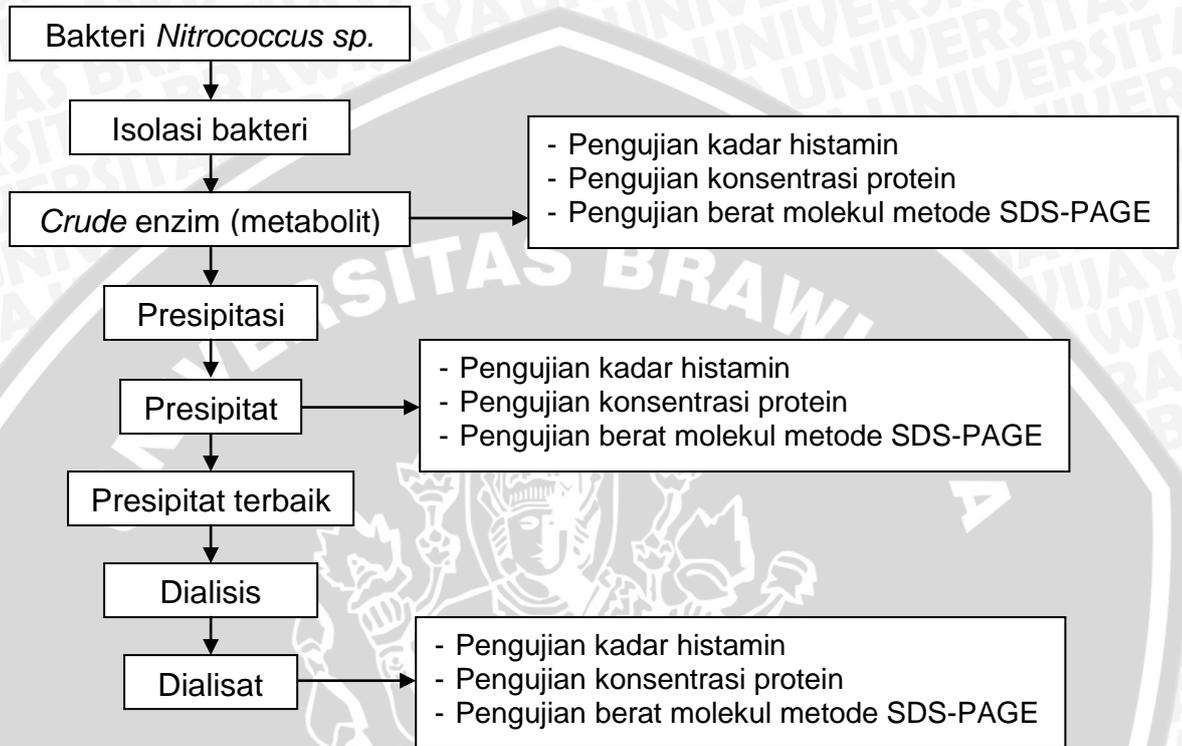
- Untuk setiap sampel protein, diamati dahulu berapa jumlah pita protein yang nampak, lalu masing-masing pita protein diukur jarak pergerakan protein (R_f) dengan penggaris (cm).
- Dari setiap nilai R_f (jarak pergerakan protein) untuk masing-masing pita protein yang diperoleh, dihitung berat molekulnya dengan bantuan persamaan linier dari kurva standar berat molekul (marker)

Rumus

$$R_f = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat}}$$

3.7. Diagram Alur Kerangka Konsep Penelitian

Diagram alur kerangka konsep penelitian adalah hasil dari modifikasi dari Putranto (2006). Untuk Gambar prosedur penelitian dapat dilihat pada Lampiran 5.

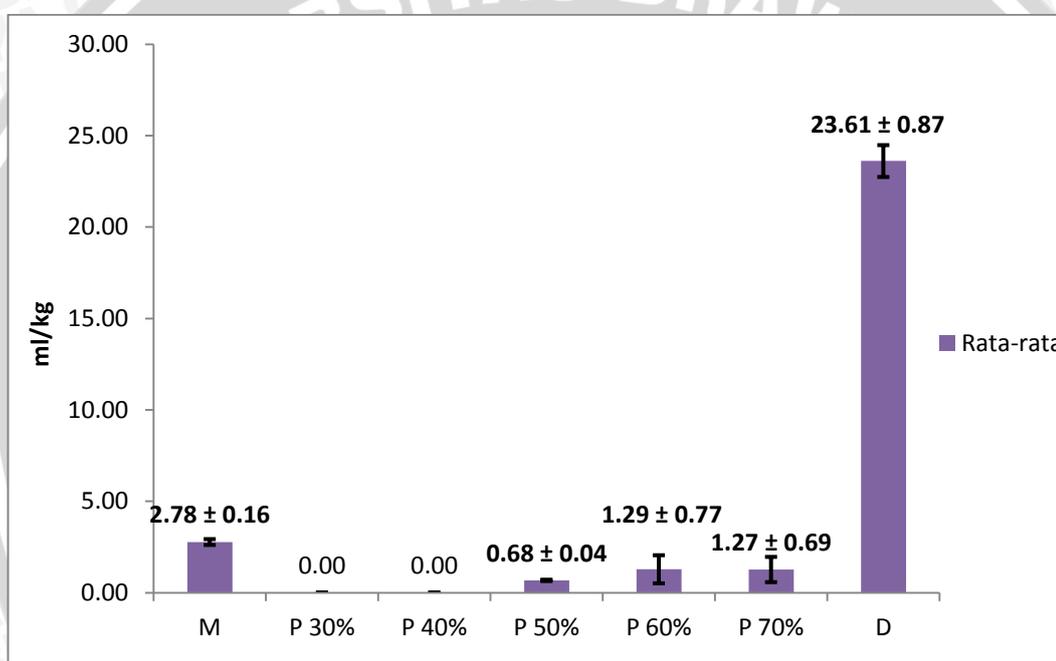


Gambar 9. Diagram Alur Kerangka Konsep Penelitian

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penentuan Kadar Histamin Metode Spektrofluorometri

Parameter uji yang dilakukan pada penelitian pendahuluan ini adalah pengujian kadar histamin dengan metode spektrofluorometri sesuai dengan SNI 01-2354.10-2009 dengan panjang gelombang eksitasi: 350 nm dan emisi: 444 nm. Hasil kadar histamin pada penelitian dapat dilihat pada diagram batang pada Gambar 10.



Gambar 10. Diagram batang perbandingan hasil kadar histamin metabolit, presipitat dan dialisat

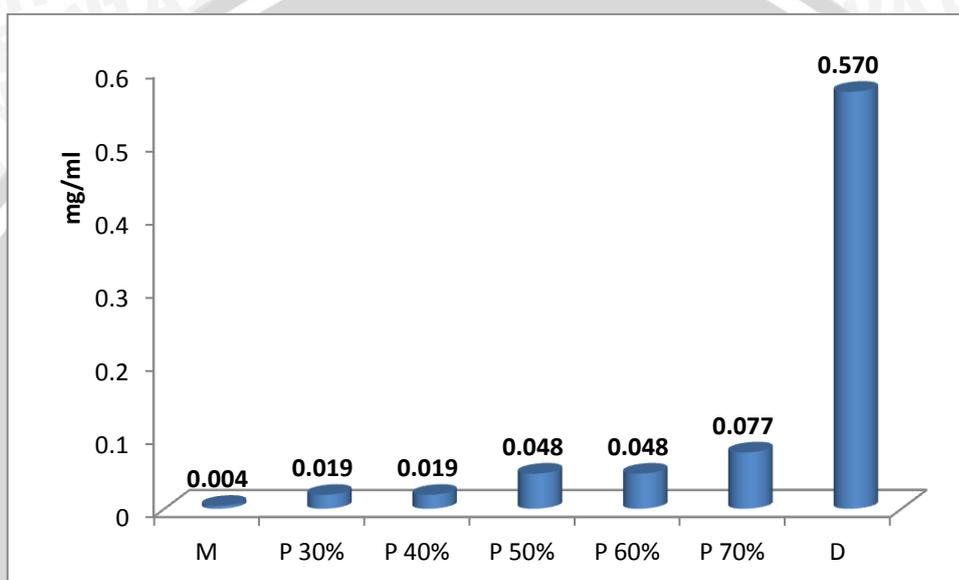
Setiap bakteri mempunyai kemampuan yang berbeda dalam menguraikan histidin menjadi histamin. Bakteri penghasil histamin adalah bakteri yang dapat menghasilkan enzim histidin dekarboksilase, suatu enzim yang diperlukan dalam proses dekarboksilasi, perubahan dari histidin menjadi histamin (Indriati *et al.*, 2006). Proses dekarboksilasi merupakan proses yang menyebabkan gugus karboksil (-COOH) terlepas dari senyawa semula menjadi karbon dioksida (CO₂).

Berdasarkan diagram batang pada Gambar 10 dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan tingkat kemampuan sampel dalam menguraikan histidin menjadi histamin. Hal ini dikarenakan yang semula metabolit (*crude* enzim) dilakukan pemurnian menjadi enzim melalui proses presipitasi dan dialisis. Kadar histamin dari dialisat (enzim) lebih tinggi dibandingkan dengan kadar histamin metabolit (*crude* enzim). Menurut Sumner *et al.*, (2004) kenaikan kadar histamin dapat diakibatkan oleh kenaikan suhu, berkaitan dengan pertumbuhan jumlah bakteri histidin dekarboksilase dan juga kerja enzim dekarboksilase yang terdapat pada sampel. Jadi didapatkan hasil bahwa bakteri *Nitrococcus sp.* merupakan bakteri penghasil enzim histidin dekarboksilase karena enzim pada bakteri ini mampu menguraikan histidin menjadi histamin dengan nilai yang tinggi yakni 23,61 ml/kg. Hasil uji histamin dapat dilihat pada Lampiran 2.

4.2. Hasil Penentuan Konsentrasi Protein

Hasil konsentrasi protein dari metabolit (*crude* enzim), presipitat dan dialisat dapat dilihat pada Gambar 11. Pada Gambar 11 dapat dilihat bahwa konsentrasi protein dialisat adalah 0,580 mg/ml, nilai ini lebih tinggi dibanding nilai konsentrasi metabolit (*crude* enzim) *Nitrococcus sp.* yang mempunyai nilai sebesar 0,014 mg/ml. Hal ini dikarenakan pada sampel dialisat telah mengalami pemurnian yang semula *crude* enzim menjadi enzim murni. Dialisis digunakan untuk meningkatkan konsentrasi enzim (Naiola dan Widhyastuti, 2007), dan sering digunakan untuk memisahkan kontaminan (non enzim) dengan ukuran molekul kecil. Kontaminan (non protein) dengan berat molekul rendah akan keluar (Matthew *et al.*, 2000). Schmidt *et al.*, (2007) menambahkan kantong selofan dengan *molecular weight cutoff* (MWCO) 10 kDa dapat digunakan untuk menghilangkan ion nitrogen, asam amino, atau peptida yang berukuran kecil. Protease merupakan protein yang memiliki berat molekul lebih besar dari 12 kDa

(Sindumarta, 1999). Sehingga dimungkinkan protein non enzim dan kontaminan yang berukuran kecil ($BM < 25$ kDa) ikut keluar dari kantung selofan sehingga konsentrasi protein dialisat metabolit *Nitrococcus sp.* menjadi lebih pekat. Untuk perhitungan konsentrasi protein dapat dilihat pada Lampiran 3, sedangkan grafik perbandingan konsentrasi protein metabolit, presipitat dan dialisat dapat dilihat pada Gambar 11.

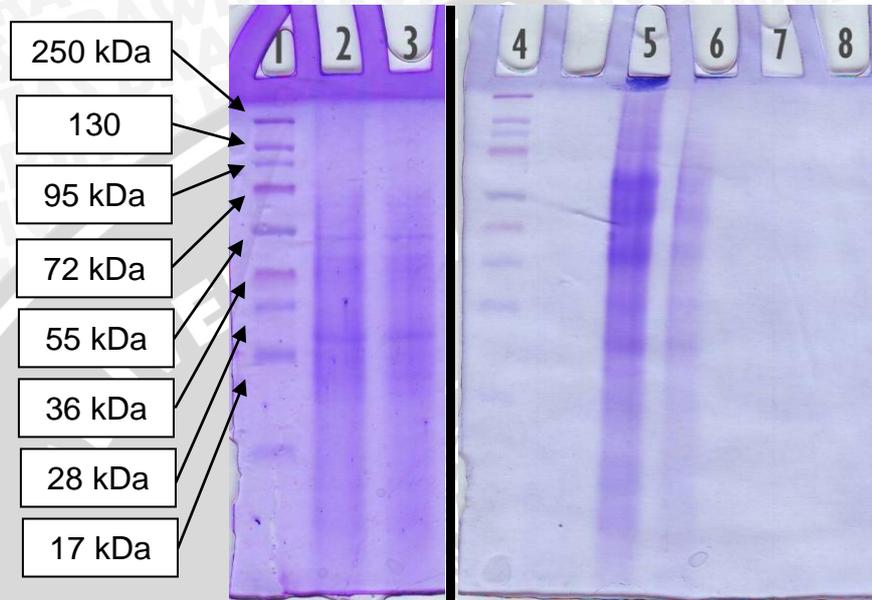


Gambar 11. Diagram batang perbandingan konsentrasi protein metabolit, presipitat dan dialisat

Kepekatan konsentrasi protein dapat dipengaruhi oleh penambahan garam (ammonium sulfat). Kehadiran garam ammonium sulfat pada konsentrasi tertentu berpengaruh terhadap kelarutan suatu protein. Jika konsentrasi garam tinggi (kekuatan ionik larutan meningkat) maka kelarutan protein akan menurun sehingga protein dapat mengendap dengan sempurna (*salting out*), tetapi jika kekuatan ionik larutan rendah maka akan terjadi sebaliknya (*salting in*) (Englard dan Seifter, 1990). Oleh karena itu didapatkan hasil bahwa semakin banyak penambahan garam maka semakin tinggi konsentrasi protein seperti halnya pada presipitat 70%. Konsentrasi pada presipitat 30% sampai presipitat 70% mengalami kenaikan.

4.3. Hasil Penentuan Berat Molekul Metode SDS-PAGE

Hasil pengujian berat molekul dengan menggunakan metode SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 13. Prinsip analisa SDS-PAGE yaitu pemisahan protein berdasarkan ukuran molekul.



Gambar 13. SDS-PAGE *Nitrococcus sp.*

- Keterangan :
- 1 = Marker 1
 - 2 = Metabolit *Nitrococcus sp.*
 - 3 = Metabolit dengan pengenceran 1:1
 - 4 = Marker 2
 - 5 = Presipitat 50%
 - 6 = Dialisat
 - 7 = Presipitat 60%
 - 8 = Presipitat 70%

Pada Gambar 13 memperlihatkan bahwa dari sampel metabolit (*crude* enzim) tampak menebal karena kadar protein masih banyak. Pita pada sampel presipitat tampak semakin banyak sedangkan pada sampel dialisat terlihat semakin sedikit pita-pita peptidanya. Hal ini diduga bahwa telah terjadi proses pemurnian dari sampel metabolit (*crude* enzim) *Nitrococcus sp.* sampai sampel dialisat (enzim murni), sehingga mengeluarkan ikatan protein yang mempunyai

berat molekul kecil. Prinsip analisa SDS-PAGE menurut Dewi (2006) adalah pemisahan protein berdasarkan berat molekul.

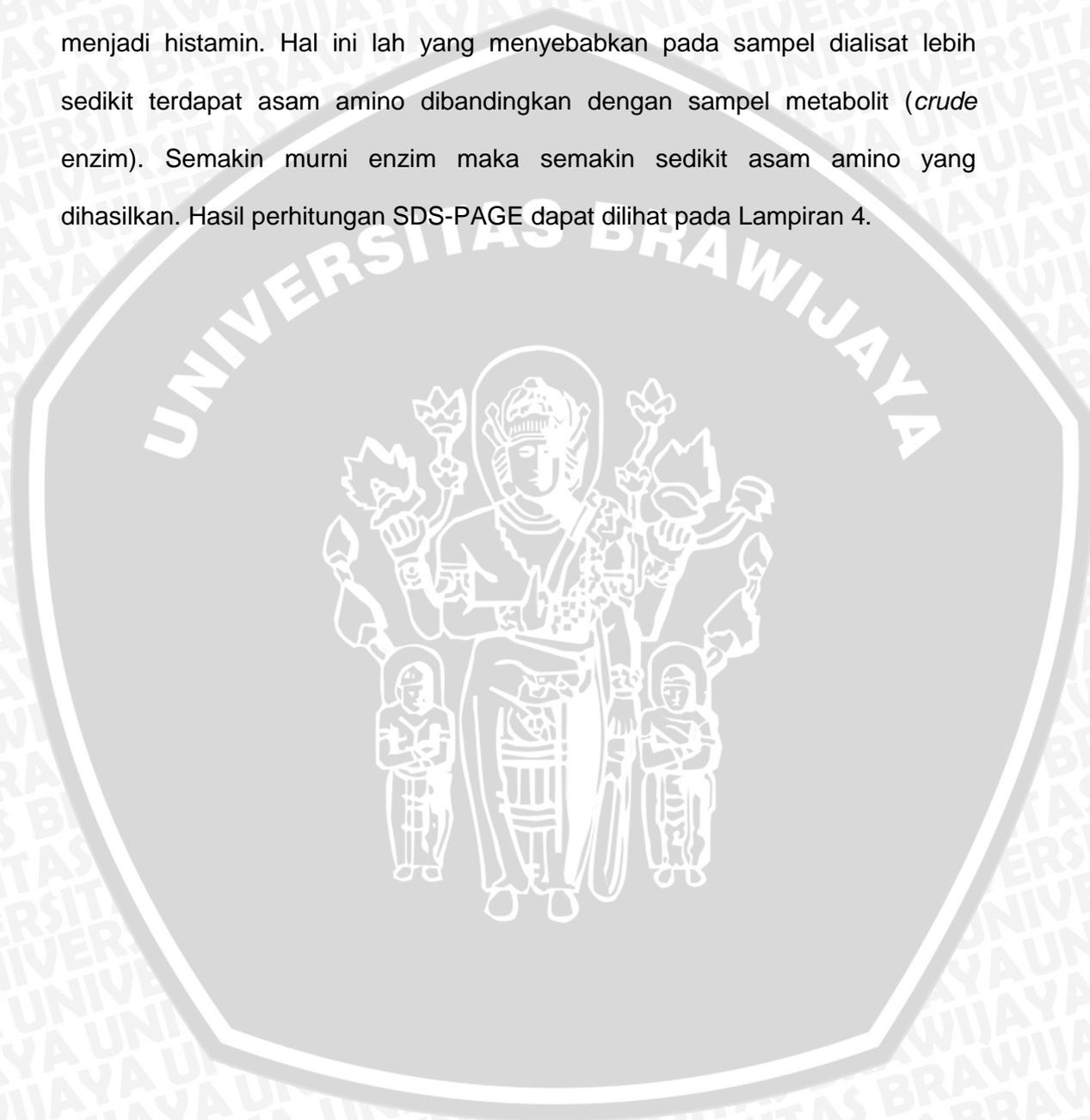
Tabel 5. Berat molekul (kDa) pita peptida metabolit ekstraseluler *Nitrococcus sp.*, presipitat 50% dan dialisat

No.	Metabolit (2)	Presipitasi 50% (5)	Dialisat (6)
1	-	125.1355	-
2	105.3090	101.9262	105.4715
3	-	88.8974	88.8974
4	76.5227	-	-
5	71.2810	72.4093	72.4093
6	68.7964	67.6233	-
7	64.0839	63.1536	63.1536
8	53.6670	55.0810	-
9	-	48.0402	48.0402
10	44.9434	41.8995	-
11	31.5197	31.8724	31.8724
12	23.7310	21.1459	21.1459
13	16.6430	-	-
14	14.4411	14.0293	14.0293
15	11.6721	11.4272	-
16	-	9.9665	9.9665
Jumlah	12 asam amino	14 asam amino	9 asam amino

Berat molekul pita peptida metabolit *Nitrococcus sp.*, presipitat 50% dan dialisat dapat dilihat pada Tabel 5. Pada Tabel 5 memperlihatkan bahwa berat molekul pita peptida metabolit (*crude* enzim) *Nitrococcus sp.* ke dialisat semakin sedikit yang semula 12 asam amino menjadi 9 asam amino . Hal ini diduga karena keluarnya struktur molekul asam amino akibat perlakuan pemurnian enzim. Pita-pita protein yang hilang kemungkinan berubah menjadi polipeptida yang lebih pendek (Riyanto, 2006). Menurut Prozorovski dan Hal (1973) melaporkan bahwa enzim histidin dekarboksilase memiliki berat molekul 29 kDa dan 110 kDa, menurut Tran dan Snyder (1980) melaporkan bahwa enzim histidin dekarboksilase memiliki berat molekul 210 kDa, 145 kDa dan 66 kDa,

sedangkan menurut Wada *et al.*, (1983) melaporkan bahwa enzim histidin dekarboksilase memiliki berat molekul 110 kDa dan 54 kDa.

Tebalnya pita peptida (banyaknya asam amino) pada sampel dialisat menunjukkan rendahnya kemampuan sampel dalam menguraikan histidin menjadi histamin. Hal ini lah yang menyebabkan pada sampel dialisat lebih sedikit terdapat asam amino dibandingkan dengan sampel metabolit (*crude* enzim). Semakin murni enzim maka semakin sedikit asam amino yang dihasilkan. Hasil perhitungan SDS-PAGE dapat dilihat pada Lampiran 4.



5. PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilaksanakan dapat diambil kesimpulan bahwa hasil uji histamin dari dialisat metabolit ekstraseluler *Nitrococcus sp.* dengan rerata 23,61 mg/kg dan mempunyai karakteristik: konsentrasi protein 0,580 mg/ml dan menghasilkan peptida 10-105 kDa dengan 9 asam amino.

5.2. Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai pemurnian dari *crude* enzim *Nitrococcus sp.* yakni kromatografi untuk mendapatkan enzim yang lebih murni.



DAFTAR PUSTAKA

- Aflal, M. A., Daoudi, H. Jdani, S., Asehraou., and Bouali, A. 2006. *Study of The Histamine Production in a Red Flesh Fish (Sardina pilchardus) and a White Fleh Fish (Dicentrarchus punctatus)*. J. Of Fish and Aquatic Science 6.
- Agustina. 2010. *Efektifitas Chitosan dalam Meminimalkan Pembentukan Histamin Pada Ikan Kembung (Rastrelliger sp.) Selama Distribusi di Kalimantan Selatan*. Disertasi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Allen, G. D. P., Green and G. E. Bolton. 2004. *Control of Histamine Production in Current Commercial Fishing Perations for Mahi-mahi (Coryphaena hippurus) and Yellowfin Tuna (Thunnus albacores) in North California*. Thesis. Faculty of North Carolina State University. Raleigh. New York.
- Amirin, T. M. 2009. *Penelitian Eksploratif (Efksploratif)*. www.tatangmanguny.wordpress.com. Diakses tanggal 25 April 2012.
- Angky, A. 2011. *Karakterisasi Aktivitas Dialisat Enzim Protease Fibrinolitik Dari Cacing Tanah (Eisenia foetida) Galur Lokal*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Arisman. 2009. *Keracunan Makanan : Buku Ajar Ilmu Gizi*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. <http://books.google.co.id/books>. Diakses pada Tanggal 20 Oktober 2011.
- Aulanni'am. 2004. *Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul*. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press. Malang. Hal 21-55.
- . 2005. *Protein dan Analisisnya*. Citra Mentari Group. Malang. Hal 29-56.
- Boyer, RF. 1986. *Modern Experimental Biochemistry*. The Benjamin/Cummings Pub. Co. Inc., Canada.
- Chemwiki. 2008. *Gambar Diagram Fluorometer Sederhana*. <http://www.nrc-cnrc.gc.ca/eng/licensing/bri/fluorometric-system.html>. Diakses tanggal 1 April 2012.
- Dart, R. K. 2003. *Microbiology For The Analytical Chemist*. Loughborough University
- Davidson V. L., and D. B. Sittman,. 1999. *Biochemistry*. Lipincott Williams and Wilkins. Maryland.
- Deutscher, MP. 1990. *Methods in Enzymology*, Vol. 182. Guide to Protein Purification, Academic Press. Inc. San Diego, pp. 285-289

- Dewi, W. K. 2006. *Pemurnian dan Pencirian Protease Dari Isolat Bakteri W-1 Yang Dihasilkan Oleh Tauco Hitam*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Dharma, B. 2005. *Mikrobiologi Industri*. Jakarta.
- Directindustry, 2009. *Gambar Alat Spektrofluorometer*. <http://www.directindustry.de/prod/horiba-jobin-yvon/lifetime-spektrofluorometer-25366-597008.html>. Diakses tanggal 1 April 2012.
- Djaafar, T. F. dan S. Rahayu. 2007. *Cemaran Mikroba Pada Produk Pertanian, Penyakit yang Ditimbulkan dan Pencegahannya*. Jurnal Litbang Pertanian, 26(2). 2007. Yogyakarta.
- Englard, S., S. Seifter. 1990. *Precipitation Techniques*. dalam: M.P. Deutscher (ed.). 1990. *Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification*. Vol. 182. Academic Press, USA.
- Farrell, SO and Ranallo, RT. 2000. *Experiments in Biochemistry: A Hands-on Approach*. California: Thomson Learning.
- Granner, D. K., P. A. Mayes., R. K. Murray, and V. W. Rodwell. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26th edition. McGraw Hill Co. New York.
- Guizani, N., A. A. Moza., M. A. Ismail., M. Ann and S. R. Mohammad. 2005. *The Effect of Storage Temperature and Histamine Production and The Freshness of Yellowfin Tuna (Thunus albacares)*. Journal Food Research International 38 : 215-222.
- Harris, ELV and Angel, S. 1989. *Protein Purification Methods a Practical Approach*. Oxford Univ. Pr., UK.
- Holme D. J., and Peck. H. 1993. *Analytical Biochemistry*. Second Edition. John Wiley and Sons, Inc. New York. Hal. 47-53.
- Indriati, N., dan Arifah. K. 2006. *Penggunaan Ekstrak Daun Sirih Untuk Menghambat Pertumbuhan Bakteri Penghasil Histamin*. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan
- Jenie, B. S. L dan Rahayu, W. P. R. 1993. *Penanganan Limbah Industri Pangan*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Keer, M. Lawicki, P. Aguirre, S. and Rayner, C. 2002. *Effect of Storage Conditions on Histamine Formation in Fresh and Canned Tuna*. State Chemistry Laboratory, Werbee. Victorian Government Departement of Human Service. www.foodsafety.vic.gov.au
- Kim, Y. H. Brinker, C., M. Kerr and C. Rayne. 1999. *Synthesis of a Quaternary Ammonium Derivative of Chitosan and Its Application to a Cotton Antimicrobial Finish*. text rest. J. 68 (6):428-434.

- Kunaepah, U. 2008. *Pengaruh Lama Fermentasi Dan Konsentrasi Glukosa Terhadap Aktivitas Antibakteri, Polifenol Total Dan Mutu Kimia Kefir Susu Kacang Merah*. Thesis. Program Pascasarjana Universitas Diponegoro. Semarang
- Lehane, L and Olley, J. 1999. *Histamine Fish Poisoning Revisited*. Jurnal Food Microbial. 58 ; 1-37.
- Lehninger, A. L. 1995. *Dasar-Dasar Biokimia I*. Erlangga. Jakarta.
- Matthew, C. K. Van H, K. E., and Kevin G. A. 2000. *Biochemistry, Third Edition*. Addison Wesley Publishing Company. San Fransisco. Hal 57.
- Naiola dan Widhyastuti. 2007. *Semi Purifikasi dan Karakterisasi Protease dari Beberapa Bakteri Hayati*. Hal 47-53.
- Nicklin, Y. K., Gloema, C and T. Fogel. 1999. *Microbiology*. Blog Scientit Publisher.
- Noviani, R., Siti, N. Ajuk, S. 2009. *Aktivitas Antimikroba Ekstrak Metanol Bakteri Berasosiasi Spons dari Pulau Lemukutan, Kalimantan Barat*. Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Tanjungpura. Pontianak.
- Noviarty. 2007. *Kalibrasi Alat Spektrofluorometer Luminesen Ls-5b Menggunakan Bahan Standar Ovalen*. Pusat Teknologi Bahan Bakar Nuklir. BATAN. Tangerang.
- Nurwantoro, Prastiwi, WD., Achmadi, J. 2003. *Populasi Mikrobialisa Susu pada Peralatan Unit Pendingin Susu Akibat Lama Penyimpanan dan Aras Penambahan Dedak Padi*. Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro, Semarang.
- Prozorovski, V., and Jornvall H. 1973. *Separation and Characterisation of Subunits of Histidine Decarboxylase from Micrococcus sp.* Department of Chemistry. Karolinska Institute. Stockholm and Laboratory of Enzymology. Academy of Medical Sciences of U.S.S.R. Moscow.
- Putranto, W. S. 2006. *Purifikasi dan Karakterisasi Protease Yang Dihasilkan Lactobacillus acidophilus Dalam fermentasi Susu Sapi Perah*. Seminar Nasional Bioteknologi. Pusat Penelitian Bioteknologi. Bandung.
- Rauf, M. 2012. Enzim. <http://www.scribd.com/doc/51456761/5/Penggolongan-Klasifikasi-enzim>. Diakses tanggal 15 Juli 2012.
- Riyanto, I. 2006. *Analisis Kadar, daya Cerna dan Karakteristik Protein Daging Ayam Kampung dan Hasil Olahannya*. Skripsi. Departemen Ilmu Produksi dan teknologi Peternakan. Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor. Hal 63-66.
- Rompas, M. R. 1998. *Kimia Lingkungan*. Edisi Pertama. Penerbit Tarsito. Bandung.

- Sahara, T. 2010. *Monera*. <http://tatitsahara.blogspot.com/2010/10/monera.html>. Diakses pada tanggal 05 April 2011.
- Schimidt, S., Richard I., Harshi K., Bernard J., Carrol, Peer M., and Schenk. 2007. *Plants can use Protein as a Nitrogen Source Without Assistance from Other Organisms*. Journal Food Science Vol. 105 No. 11-4524-4529.
- Scopes, RK. 1987. *Protein Purification Principles and Practice*. Ed Ke-2. New York: Springer-Verlag
- . 1989. *Protein Purification*. USA: R. R. Donnelley and Sons.
- Sijabat, L. 2009. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Sponge Haliclona sp terhadap Aktivitas Proliferasi Sel dengan Metode Hitung AgNOR pada Sel Adenocarcinoma Mammae Mencit C3H*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang.
- Sims, G. G. 1992. *Quality Indices for Canned Skipjack Tuna: Correlation of Sensory Attributes with Chemical Indices*. Journal of Food Science 57 (5)
- Sindumarta, M. 1999. *Biokimia I : Struktur dan Katalisis*. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. ITB. Bandung.
- Singarimbun, M. dan Effendi, S. 1989. *Metode Penelitian Survei*. Edisi Revisi. LP3ES. Jakarta.
- Smith, J. C.,. 1993. *Prinsip Bioteknologi*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. Hal 66, 130-138
- SNI. 2009. *Penentuan Kadar Histamin dengan Spektrofluorometri dan Kromatografi Kinerja Tinggi (KCKT) pada Produk Perikanan*. Standar Nasional Indonesia Nomor 2354.10:2009. Jakarta.
- Sorensen, H., S, Sorensen, C. Bjerregaard, and S, Michelson. 1999. *Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge
- Suhartono, MT. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan Dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor. Bogor 147-150
- . 1992. *Protease*. Bogor: IPB. PAU Bioteknologi.
- Sumner J., Ross T., Ababouch L. 2004. *Application of Risk Assessment in The Fish Industry*. Roma: FAO.
- Surakhmad, W. 1994. *Pengantar Penelitian Ilmiah*. Penerbit Tarsito. Bandung.
- Taylor, S. L. and Behling, A. R. 1982. *Bacterial Histamine Production as a Function of Temperature and Time of Incubation*. Journal of Food Science, Volume 4. Hal 121-129.

Tran, V. T. and Snyder S. H. 1980. *Purification From Fetal Rat Liver, Immunologic Properties and Histochemical Localization in Brain and Stomach*. The Journal of Biological Chemistry Vol. 256, No. 2. Issue of January 25, pp. 680-686, 1981 Printed in U. S. A.

Wada, H., Hayashi H., Kubota, H., Watanabe T. and Taguchi, Y. 1983. *Purification of Histidine Decarboxylase from Liver of Fetal Rats and Its Immunochemical and Immunohistochemical Characterization*. The Journal of Biological Chemistry. The American Society of Biological Chemistry, Inc.

Webb, EC and Dixon, M. 1979. *Enzymes*. Academic Press. New York.

Wibowo, M.A. 2006. *Biosintesis Senyawa Obat*. Fakultas Farmasi, Institut Teknologi Bandung. Bandung.

Widiatusti, I. 2004. *Histidin Dekarboksilase*. http://docs.google.com.viewer_pdf. Diakses tanggal 11 april 2012.

Widodo, W. E. 2010. *Spektrofluorometri untuk Mengukur Kadar Kinin Sulfat*. <http://wordpress.com>. Diakses tanggal 15 April 2012.

Wiseman, A. 1985. *Handbook of Enzymes Biotechnology. 2nd. Edition*. Ellis Howard, New York. Hal. 17-25.

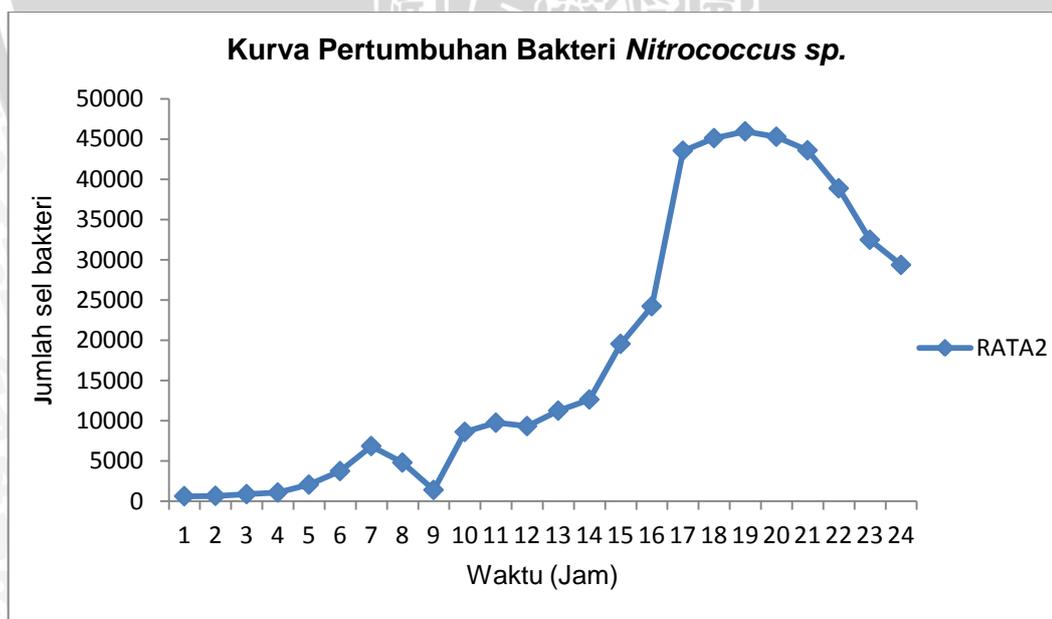
Voet, D. and Voet, J. 1990. *Biochemistry*. John Wiley and Sons Inc. New York. Hal 432-509.

Yuliantika, N. 2012. *Pengaruh Penambahan Metabolit Dari Bakteri Nitrococcus sp. Dan Acinetobacter baumannii Terhadap Penguraian Histidin Menjadi Histamin Secara in Vitro*. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.

Zipcodezoo. 2011. *Klasifikasi Bakteri Nitrococcus sp.* http://zipcodezoo.com/Bacteria/N/Nitrococcus_mobilis/. Diakses pada tanggal 05 April 2011.

Lampiran 1. Kurva Pertumbuhan Bakteri *Nitrococcus sp.*

JAM KE	X1	X2	RATA-RATA
1	598	666	632
2	659	682	671
3	898	876	887
4	1079	1086	1083
5	2100	2037	2069
6	3645	3850	3748
7	7842	5869	6856
8	10548	8560	9554
9	13162	15030	14096
10	8350	8880	8615
11	9580	9940	9760
12	9760	8920	9340
13	10740	11770	11255
14	12830	12450	12640
15	19540	19560	19550
16	22530	21920	22225
17	43860	43240	43550
18	44060	42170	43115
19	42450	41450	41950
20	40270	40310	40290
21	33180	34010	33595
22	31630	29120	30375
23	28810	27160	27985
24	25960	23750	24855



Lampiran 2. Hasil Uji Histamin

FROM : LPPMHP BWI

FAX NO. : 0333417846

Mar. 13 2012 01:33AM P1

REPORT OF HISTAMINE DETERMINATION (SNI 2354.10-2009)

Prepared By Chemistry Laboratory

Quantitation results file:C:\FLWINLAB\DATA\Uji Histamine.rpt
Generated on :03-12-2012 at time:13:42:55

Measurement conditions

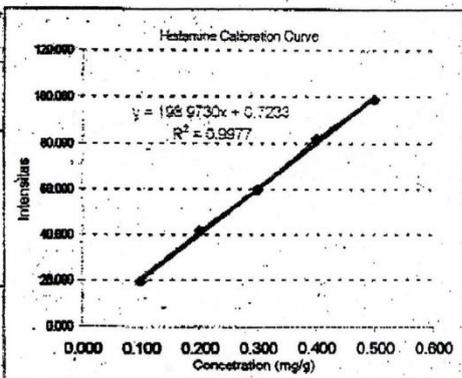
Method: C:\FLWINLAB\METHODS\CONC.MTH

Comments: Default concentration method

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

Reference sample results

Std#	Conc*Fact	Intens.	BG	Factor
	(mg/kg)			
STD 1	0.100	19.435	2.303	1
STD 2	0.200	41.856	2.303	1
STD 3	0.300	59.857	2.303	1
STD 4	0.400	82.157	2.303	1
STD 5	0.500	98.771	2.303	1



Fit equation:

$$Y = 198.973 X + 0.7233$$

$$a = 0.7233$$

$$b = 198.973$$

$$X \text{ (mg/kg)} = (Y - a) / (b \times 5000)$$

Test Number	Test Code	Intensitas	Weight (Grams)	Conc. (mg/kg)	Test Decision
1	PC 1.1	0.978	10.0873	0.6345	Accepted
2	PC 1.2	2.019	10.0789	3.2305	Accepted
3	PC 1.3	1.517	10.0355	1.9874	Accepted
4	PC 2.1	2.572	10.0147	4.6388	Accepted
5	PC 2.2	2.480	10.0256	4.4031	Accepted
6	PC 2.3	2.893	10.0165	5.4433	Accepted
7	PC 3.1	1.186	10.0047	1.1622	Accepted
8	PC 3.2	1.373	10.0428	1.6257	Accepted
9	PC 3.3	2.532	10.0617	4.5172	Accepted
10	PC 4.1	2.572	10.0991	4.6000	Accepted
11	PC 4.2	2.189	10.0274	3.6731	Accepted
12	PC 4.3	3.092	10.0253	5.9373	Accepted
13	PC 5.1	1.706	10.0552	2.4559	Accepted
14	PC 5.2	2.312	10.0211	3.9838	Accepted
15	PC 5.3	2.421	10.0643	4.2389	Accepted
16	NC 1.1	-0.463	10.0564	-2.9643	Accepted
17	NC 1.2	-0.367	10.1031	-2.7119	Accepted
18	NC 1.3	-0.587	10.0639	-3.2653	Accepted
19	NC 2.1	0.373	10.0539	-0.8156	Accepted
20	NC 2.2	0.596	10.0341	-0.3188	Accepted
21	NC 2.3	0.496	10.0694	-0.5872	Accepted
22	NC 3.1	0.653	10.0174	-0.1764	Accepted
23	NC 3.2	1.009	10.0581	0.7138	Accepted
24	NC 3.3	0.998	10.0705	0.6855	Accepted
25	NC 4.1	1.502	10.0702	1.9432	Accepted
26	NC 4.2	1.315	10.0611	1.4779	Accepted
27	NC 4.3	0.901	10.0517	0.4442	Accepted
28	NC 5.1	1.547	10.0118	2.0674	Accepted

REPORT OF HISTAMINE DETERMINATION (SNI 2354.10-2009)

Prepared By Chemistry Laboratory

29	NC 5.2	1.057	10.0345	0.8357	Accepted
30	NC 5.3	1.067	10.0326	0.8110	Accepted
31					
32					
33					

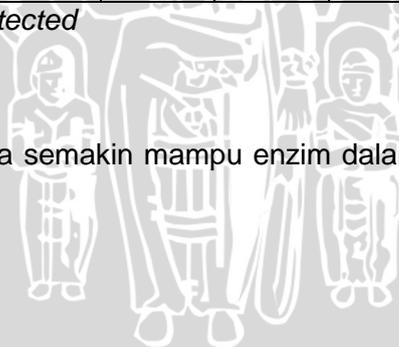
Tabel Perbandingan hasil kadar histamin metabolit, presipitat dan dialisat

No.	Sampel	Kadar Histamin (mg/kg)			Jumlah	Rerata	
		U1	U2	U3			
1.	Metabolit	2,71	2,66	2,96	8,33	2,78 ± 0,16	
2.	Presipitat	30 %	ND	ND	ND	0	-
		40 %	ND	ND	ND	0	-
		50 %	0,64	0,71	0,69	2,04	0,68 ± 0,04
		60 %	1,94	1,48	0,44	3,86	1,29 ± 0,77
		70 %	2,07	0,84	0,91	3,82	1,27 ± 0,69
3.	Dialisat	23,97	24,25	22,62	70,84	23,61 ± 0,87	

Keterangan: ND = Not Detected

Kesimpulan:

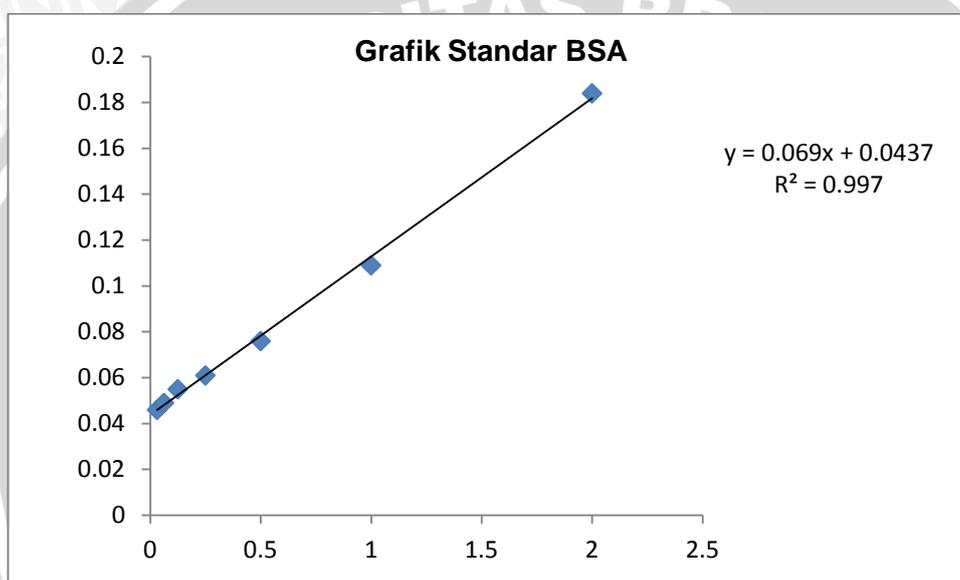
Semakin murni enzim maka semakin mampu enzim dalam menguraikan histidin menjadi histamin.



Lampiran 3. Perhitungan Konsentrasi Protein Enzim Dialisat Metabolit *Nitrococcus sp.* Dengan Metode BSA

Hasil spektrofotometri standar protein BSA pada berbagai konsentrasi yaitu:

konsentrasi (mg/ml)	Absorbansi	k x abs
0.03125	0.046	0.0459
0.0625	0.049	0.0492
0.125	0.055	0.0547
0.25	0.061	0.0607
0.5	0.076	0.0760
1	0.109	0.1090
2	0.184	0.1842



Hasil spektrofotometri pada sampel metabolit *Nitrococcus sp.* yaitu:

Sampel	Absorbansi	Konsentrasi (mg/ml)	Konsentrasi x FP (mg)
Metabolit Murni	0,044	0,004	0,725
Presipitat 30 %	0,045	0,019	3,140
Presipitat 40 %	0,045	0,019	3,140
Presipitat 50 %	0,047	0,048	7,791
Presipitat 60 %	0,047	0,048	7,791
Presipitat 70 %	0,049	0,077	12,802
Dialisat	0,083	0,570	94,928

Selanjutnya standar BSA tersebut dibuat kurva linier grafik standar BSA dengan

Microsoft excel 2007. Konsentrasi (ppm) sebagai sumbu X dan absorbansi

sebagai sumbu Y. Grafik standar BSA dapat dilihat pada Gambar 21. Dari grafik tersebut didapatkan persamaan $y = 0,069x + 0,0437$, $R^2 = 0,997$.

Untuk mengetahui konsentrasi protease dialisat metabolit *Nitrococcus sp.*, hasil absorbansi pada dialisat tersebut dimasukkan dalam persamaan regresi linier grafik standar BSA tersebut sebagai sumbu x, sehingga dapat diketahui nilai konsentrasi protein dialisat *Nitrococcus sp.* yaitu:

$$y = 0,069x + 0,0437$$

$$0,083 = 0,069x + 0,0437$$

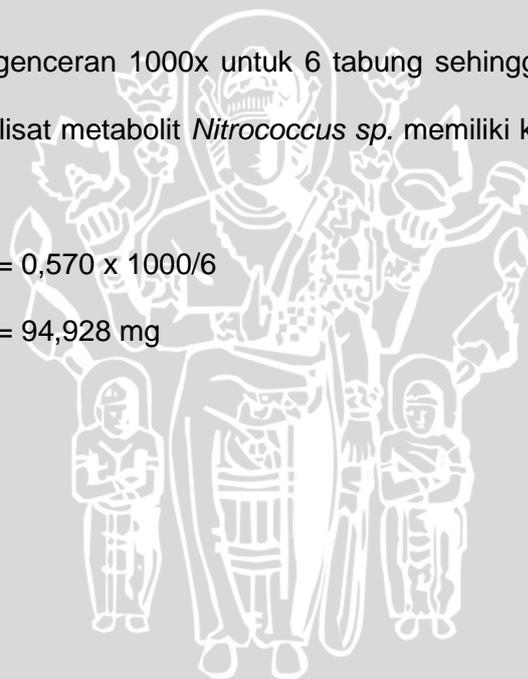
$$0,069x = 0,083 - 0,0437$$

$$x = 0,570 \text{ mg/ml}$$

karena dilakukan pengenceran 1000x untuk 6 tabung sehingga dapat diketahui bahwa dalam 1 ml dialisat metabolit *Nitrococcus sp.* memiliki konsentrasi protein sebesar 94,928 mg.

$$\text{konsentrasi protein} = 0,570 \times 1000/6$$

$$= 94,928 \text{ mg}$$



Lampiran 4. Perhitungan Berat Molekul SDS-PAGE

Hasil SDS-PAGE metabolit *Nitrococcus sp.* dapat dilihat pada Gambar 13. Dari semua hasil tersebut yang dilakukan perhitungan berat molekul pada sumur 2 yaitu sampel metabolit kasar *Nitrococcus sp.*, pada sumur ke-5 yaitu sampel presipitat 50% dan pada sumur ke-6 yaitu sampel dialisat.

Untuk perhitungan berat molekul yang dilakukan pertama kali adalah diukur jarak tracking masing-masing pita protein hasil gel elektroforesis. Jarak penuh tracking yaitu 70.

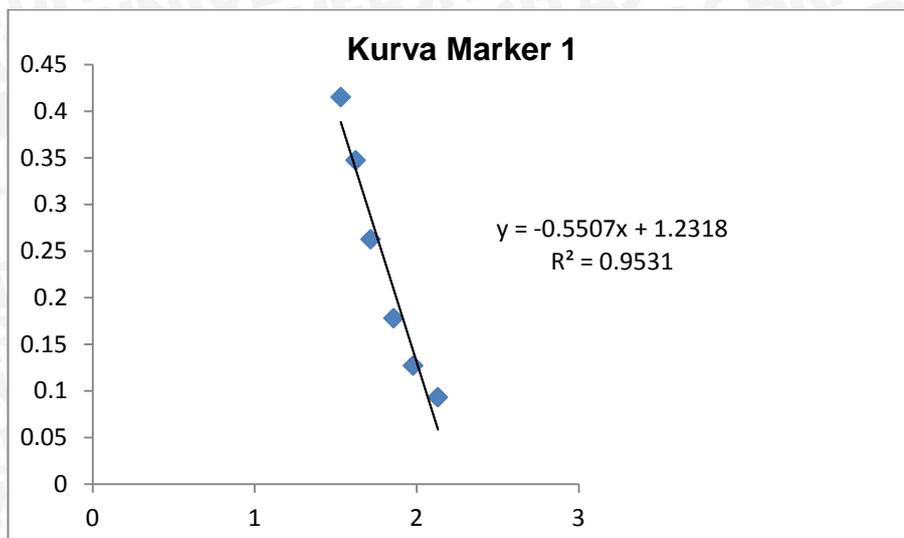
Marker 1.

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
135	5.5	2.1303	0.0932
95	7.5	1.9777	0.1271
72	10.5	1.8573	0.1780
52	15.5	1.7160	0.2627
42	20.5	1.6232	0.3475
34	24.5	1.5315	0.4153

Marker 2

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
135	4.5	2.1303	0.0652
95	5.5	1.9777	0.0797
72	8.5	1.8573	0.1232
52	15	1.7160	0.2174
42	19	1.6232	0.2754
34	24	1.5315	0.3478

Berdasarkan hasil pada marker 1 dibuat kurva sebagai berikut:



Dari kurva diatas diperoleh persamaan $y = -0,550x + 1,231$

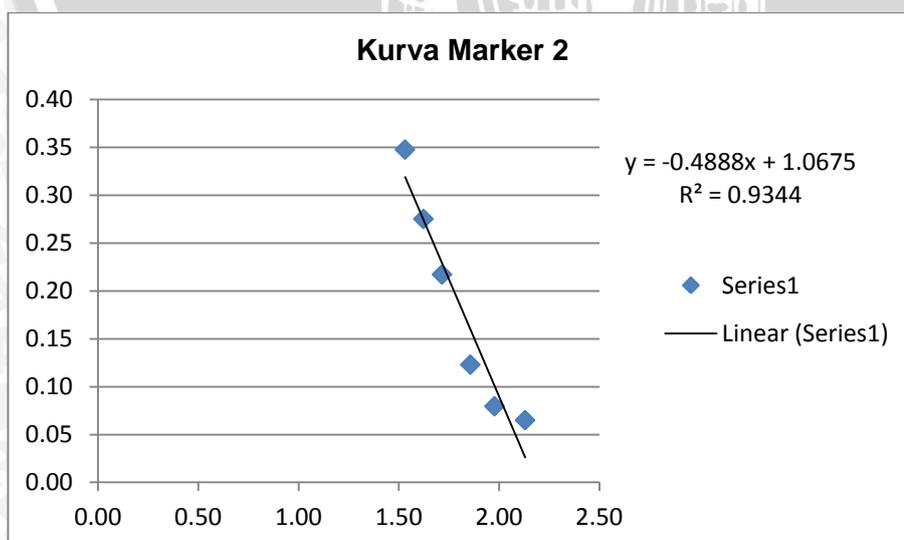
Persamaan tersebut digunakan untuk mendapatkan nilai BM dari sampel metabolit dengan cara terlebih dahulu dihitung.

Rf = jarak tracking / jarak penuh tracking

Log BM (x) = $y - 1,231 / -0,550$

BM = $10^{\log BM}$

Berdasarkan hasil dari marker 2 dibuat kurva sebagai berikut:



Dari kurva diatas diperoleh persamaan $y = -0,488x + 1,067$

Persamaan tersebut digunakan untuk mendapatkan nilai BM dari sampel metabolit dengan cara terlebih dahulu dihitung.

R_f = jarak tracking / jarak penuh tracking

$\text{Log BM (x)} = y - 1,067 / -0,488$

$\text{BM} = 10^{\text{logBM}}$

Berat Molekul Metabolit *Nitrococcus sp.*

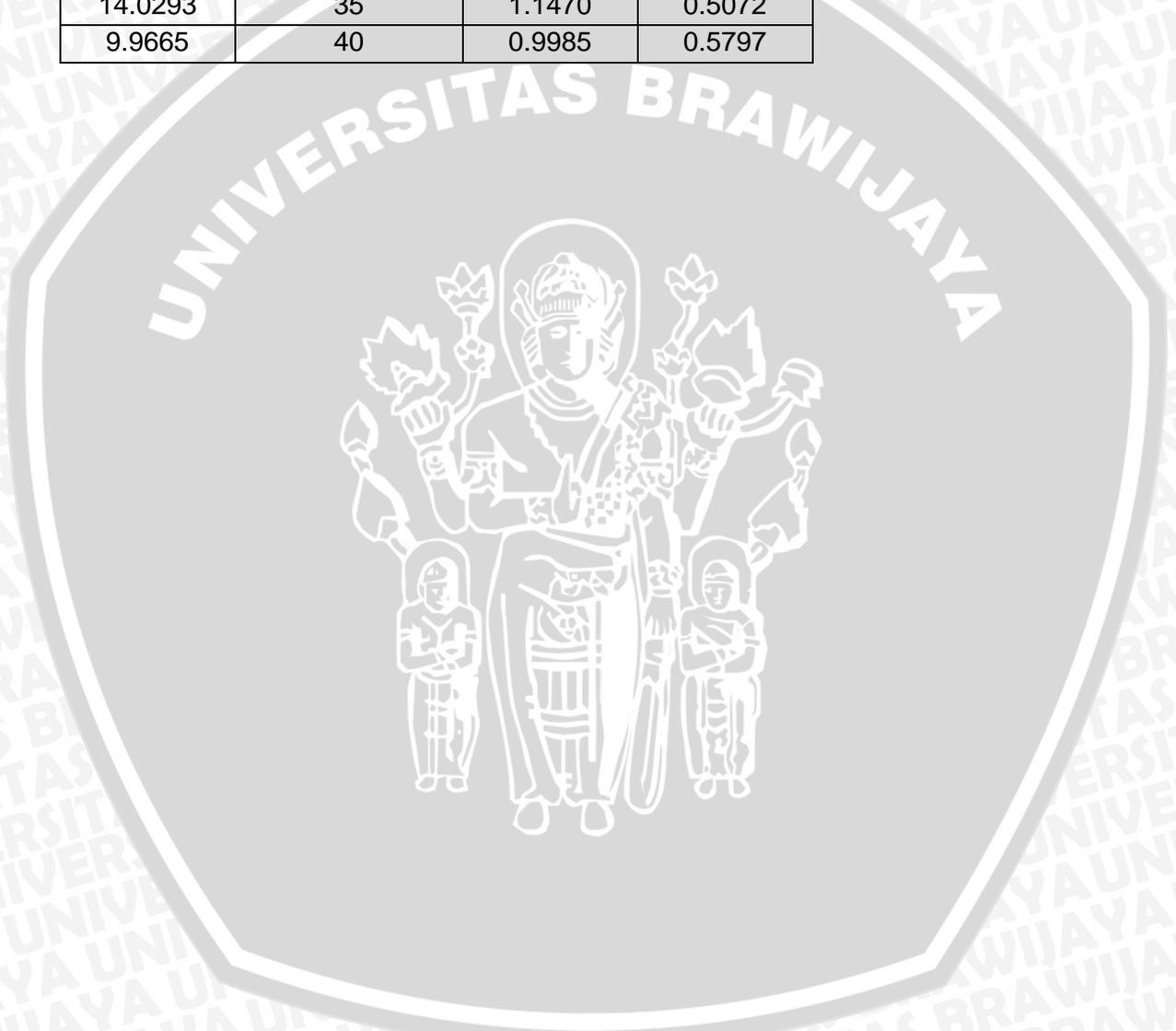
BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
105.3090	7	2.0225	0.1186
76.5227	11.5	1.8838	0.1949
71.2810	12.5	1.8530	0.2119
68.7964	13	1.8376	0.2203
64.0839	14	1.8067	0.2373
53.6670	16.5	1.7297	0.2797
44.9434	19	1.6527	0.3220
31.5197	24	1.4986	0.4068
23.7310	28	1.3753	0.4746
16.6430	33	1.2212	0.5593
14.4411	35	1.1596	0.5932
11.6721	38	1.0671	0.6441

Berat Molekul Presipitat 50% *Nitrococcus sp.*

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
125.1355	3	2.0974	0.0435
101.9262	6	2.0083	0.0870
88.8974	8	1.9489	0.1159
72.4093	11	1.8598	0.1594
67.6233	12	1.8301	0.1739
63.1536	13	1.8004	0.1884
55.0810	15	1.7410	0.2174
48.0402	17	1.6816	0.2464
41.8995	19	1.6222	0.2754
31.8724	23	1.5034	0.3333
21.1459	29	1.3252	0.4203
14.0293	35	1.1470	0.5072
11.4272	38	1.0579	0.5507
8.1180	43	0.9094	0.6232

Berat Molekul Dialisat *Nitrococcus* sp.

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
105.4715	5.5	2.0231	0.0797
88.8974	8	1.9489	0.1159
72.4093	11	1.8598	0.1594
63.1536	13	1.8004	0.1884
48.0402	17	1.6816	0.2464
31.8724	23	1.5034	0.3333
21.1459	29	1.3252	0.4203
14.0293	35	1.1470	0.5072
9.9665	40	0.9985	0.5797



Lampiran 5. Gambar Prosedur Penelitian



Sampel metabolit *Nitrococcus*

Presipitasi



Supernatan + ammonium



Penyimpanan sampel pada suhu



Sampel Presipitat



Sampel disentrifuse 1000 rpm suhu

Dialisis



Sampel presipitat + buffer fosfat 0,1 M



Dijepit tiap



Dimasukkan ke dalam kantong selofan ukuran 10



Direndam dalam buffer fosfat
0,005 M pH 8

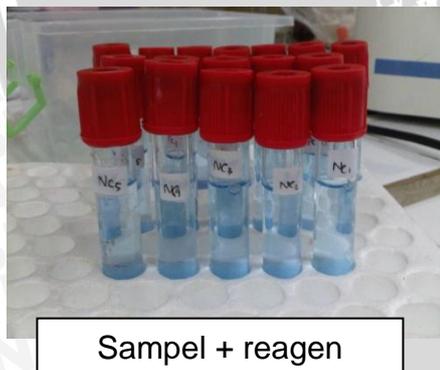
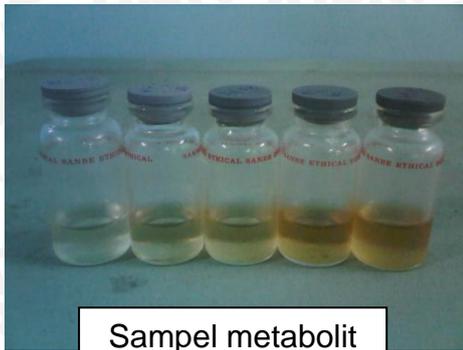


Dimasukkan ke dalam *ependorf*
dan disentrifuse 12.000 rpm suhu



Sampel Dialisat

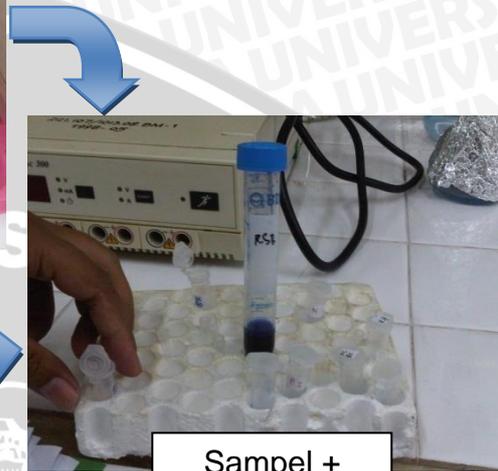
Uji BSA



Uji SDS-PAGE



Persiapan peralatan SDS-



Sampel +



Sampel dipanaskan selama 5



Sampel + marker
dimasukkan ke dalam



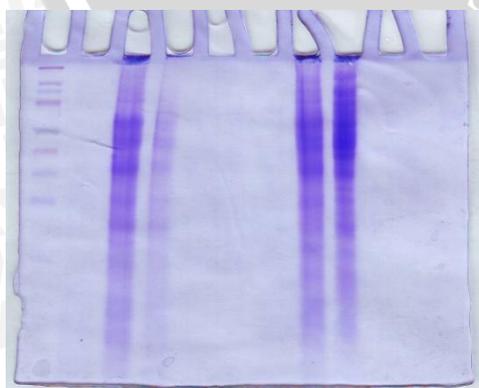
Running buffer dituang ke
dalam buffer system



Dihubungkan dengan *power supply* selama kurang lebih 75



Proses elektroforesis dilakukan sampai pita mencapai batas akhir dari



Hasil SDS-PAGE



Pewarnaan dengan *waterbath*