

**APLIKASI IN-VITRO METABOLIT BAKTERI *Bacillus sp.* DARI PERAIRAN
MANGROVE SEBAGAI PENGURAI HISTIDIN MENJADI HISTAMIN**

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

Oleh:
CAESAR MAHENDRA
NIM. 0810830007



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

**APLIKASI IN-VITRO METABOLIT BAKTERI *Bacillus sp.* DARI PERAIRAN
MANGROVE SEBAGAI PENGURAI HISTIDIN MENJADI HISTAMIN**

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

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

**Oleh:
CAESAR MAHENDRA
NIM. 0810830007**



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

SKRIPSI

APLIKASI IN-VITRO METABOLIT BAKTERI *Bacillus sp.* DARI PERAIRAN MANGROVE SEBAGAI PENGURAI HISTIDIN MENJADI HISTAMIN

Oleh :
CAESAR MAHENDRA
NIM. 0810830007

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 14 Agustus 2012
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

DOSEN PENGUJI I

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

DOSEN PENGUJI II

(Ir. Titik Dwi Sulistiyati, MP)
NIP. 19581231 199003 1 003
Tanggal:

DOSEN PEMBIMBING I

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

DOSEN PEMBIMBING II

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)
NIP. 19600322 198601 1 001
Tanggal:

Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)
NIP. 19600322 198601 1 001
Tanggal:

Pernyataan Orisinalitas Skripsi

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini dengan judul **Aplikasi in-vitro Metabolit Bakteri *Bacillus sp.* Dari Perairan Mangrove Sebagai Pengurai Histidin Menjadi Histamin** benar-benar merupakan hasil karya sendiri dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

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

Malang, 14 Agustus 2012
Mahasiswa,

Caesar

Mahendra



RINGKASAN

Caesar Mahendra. Laporan Skripsi dengan judul Aplikasi in-vitro Metabolit Bakteri *Bacillus sp.* Dari Perairan Mangrove Sebagai Pengurai Histidin 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 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). Menurut Holt, *et al* (1994), *Bacillus sp* merupakan bakteri aerob, gram positif, berbentuk batang dengan ukuran diameter 1,2-1,5 mikrometer dan panjang 2,0-2,4 mikrometer, bentuk sel-sel silindris sampai oval atau bentuk pear, dan motil endospora kebanyakan dibentuk dalam waktu 48 jam dengan Suhu optimum untuk pertumbuhannya antara 28°C – 35°C dan suhu maksimumnya antara 40°C – 45°C.

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

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).

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

Hasil rerata pengujian histidin menjadi histamin oleh metabolit *Bacillus sp.* sebesar 4,36 mg/kg, Presipitasi 30% sebesar 1,77 mg/kg, presipitasi 40% sebesar 2,45 mg/kg, presipitasi 50% sebesar 9,22 mg/kg, presipitasi 60% sebesar 12,22 mg/kg, presipitasi 70% sebesar 12,96 mg/kg. Dan untuk dialisat mempunyai nilai rerata kadar histamin sebesar 3,47 mg/kg. Kemudian untuk hasil uji konsentrasi protein pada masing-masing tingkat pemurnian yaitu yang pertama adalah metabolit sebesar 5,513 mg/ml, untuk presipitasi 70% sebesar 12,5 mg/ml dan untuk dialisat sebesar 5,434 mg/ml.

Perlu adanya penelitian lanjutan mengenai karakteristik yang lebih spesifik lagi pada enzim ekstraseluler bakteri *Bacillus sp.* Serta perlu dilakukan teknik pemurnian.

KATA PENGANTAR

Puja dan puji kehadiran Allah SWT yang telah memberikan kekuatan kepada penulis untuk dapat menyelesaikan skripsi ini.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang. Skripsi ini berjudul ” **Alikasi In-vitro Metabolit Bakteri *Bacillus sp.* Dari Perairan Mangrove Sebagai Pengurai Histidin Menjadi Histamin**”

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Allah S.W.T atas segala kemudahan dan rahmat yang telah diberikan.
2. Ir. Yahya, MP selaku dosen pembimbing I dan Dr. Ir. Happy Nursyam, MS selaku dosen pembimbing II yang telah dengan sabar membimbing.
3. Keluarga Besar Caesar, Ibu Sri Wening, Bpk Purwanto, Adik Ghazi dan Kalpiko Ambar Rukmi, serta teman-teman seperjuangan (Kiki, Tama, Sigit, Dimas, Ristian, Riki) atas doa dan seluruh dukungannya.
4. Teman-teman Tim Histamin yang selalu bersama-sama. Terutama Mas Ari Etik, Yeni, Salman atas support dan dukungannya.
5. Seluruh keluarga THP 08 yang tidak dapat disebutkan satu persatu, atas bantuan dan dukungannya selama penulis menyelesaikan skripsi ini.

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

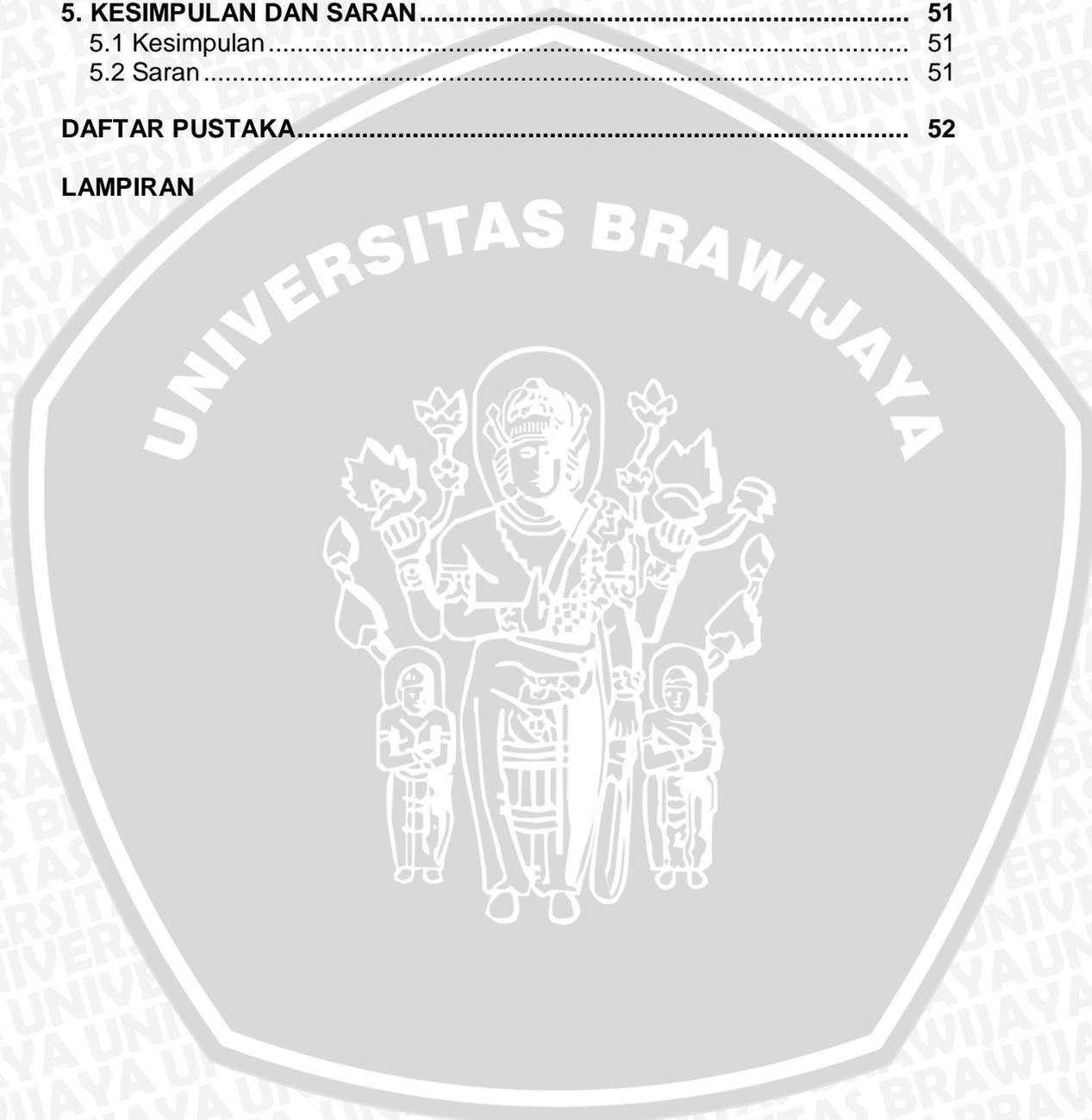
Malang, 14 Agustus 2012

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORISINILITAS SKRIPSI	iii
RINGKASAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Hipotesis.....	3
1.5 Kegunaan Penelitian.....	4
1.6 Waktu dan Tempat.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Bakteri <i>Bacillus sp.</i>	5
2.2 Bakteri di Perairan Mangrove.....	7
2.3 Metabolit.....	9
2.3.1 Metabolit Primer	9
2.3.2 Metabolit Sekunder	9
2.4 Pemurnian Enzim Metabolit	10
2.5 <i>Biogenic Amine</i> (Histamin).....	13
2.6 Karakteristik Dialisat Metabolit	15
2.6.1 Bovine Serum Albumin (BSA).....	15
2.6.2 Sodium Dedosil Sulfat Poliakrilamid Gel Elektroforesis	16
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	19
3.1 Materi Penelitian	19
3.1.1 Bahan Penelitian	19
3.1.2 Alat Penelitian	19
3.1.3 Lokasi Penelitian	20
3.2 Metode Penelitian	20
3.3 Prosedur Penelitian.....	21
3.3.1 Pembiakan Bakteri.....	21
3.3.2 Pemanenan Metabolit Ekstraseluler	24
3.3.3 Pemurnian Metabolit	26
3.3.3.1 Presipitasi.....	26
3.3.3.2 Dialisis.....	27
3.4 Karakterisasi Dialisat Metabolit	30
3.4.1 Pengujian Konsentrasi Protein	30
3.4.2 Pengujian SDS-PAGE.....	32
3.4.3 Pengujian Biogenik Amin (Histamin)	36
3.4.4 Parameter Uji.....	39
3.5 Skema Kerja Konsep Penelitian.....	40

4. HASIL DAN PEMBAHASAN	41
4.1 Hasil Pengujian Histamin Dengan Metode Spektrofluorometri	41
4.2 Karakterisasi Metabolit.....	46
4.2.1 Hasil Pengujian Konsentrasi Protein Metode BSA.....	46
4.2.2 Hasil Pengujian Berat Molekul Metode SDS-PAGE.....	47
5. KESIMPULAN DAN SARAN	51
5.1 Kesimpulan.....	51
5.2 Saran.....	51
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN	



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi Medium Tryptone Soya Borth (TSB)	22
2. Konsentrasi BSA dan Pengencerannya	31
3. Komposisi Stacking Gel	33
4. Komposisi Sparating Gel.....	34
5. Perbandingan hasil kadar histamin metabolit, presipitat dan dialisat.....	44
6. Perbandingan konsentrasi protein metabolit, presipitat dan dialisat	47
7. Berat molekul (kDa) pita peptida metabolit, presipitat 70%, dan dialisat....	50



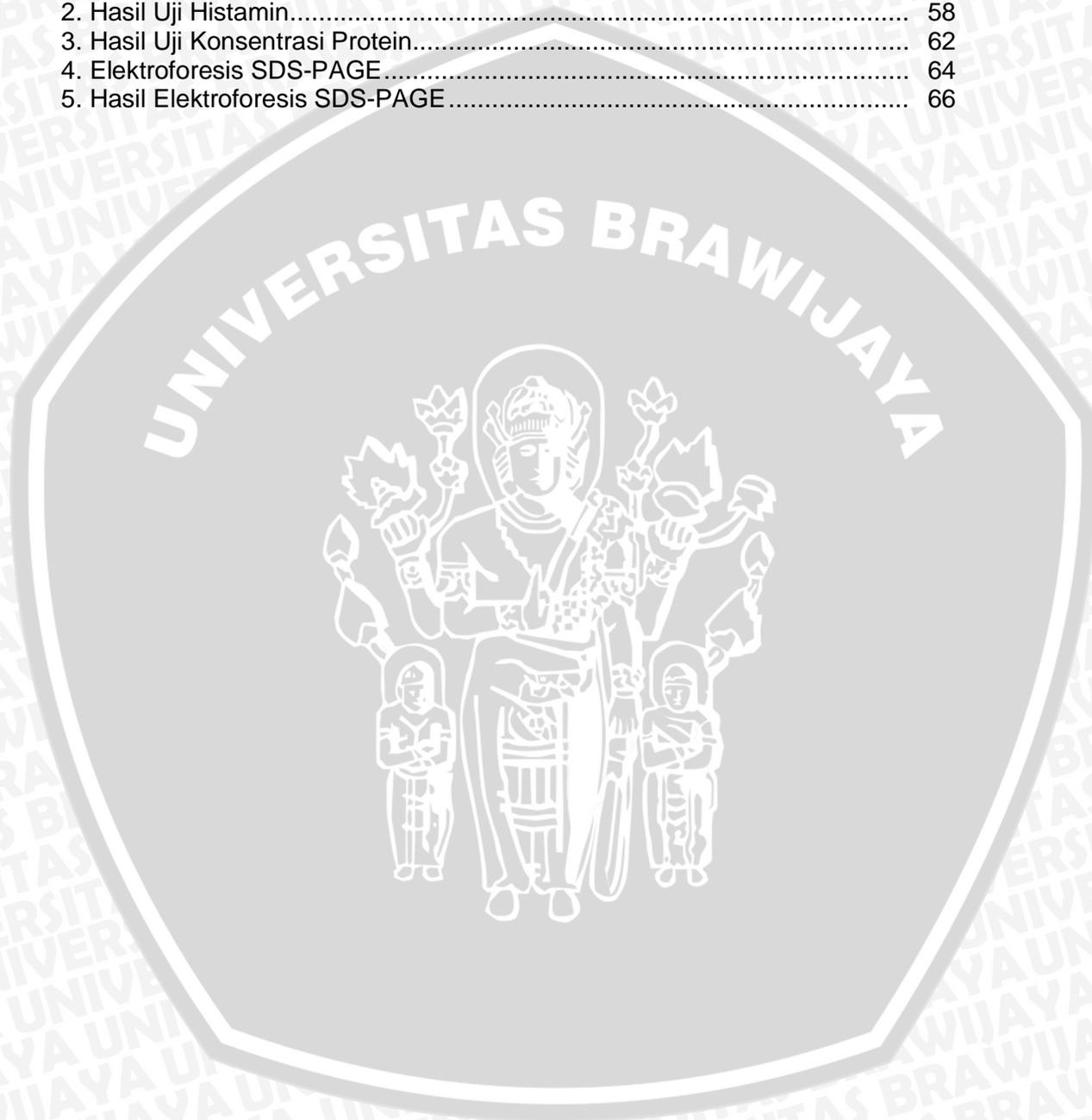
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Bacillus sp</i>	7
2. Perubahan Histidin Menjadi Histamin.....	14
3. Elektroforesis SDS-PAGE.....	18
4. Skema Kerja Sterilisasi Alat.....	23
5. Skema Pembuatan Media Cair.....	23
6. Skema Kerja Peremajaan Bakteri.....	24
7. Pembuatan Metabolit Bakteri.....	25
8. Skema Kerja Presipitasi dengan Amonium Sulfat.....	27
9. Diagram Alir SDS-PAGE.....	35
10. Alat Spektrofluorometri.....	36
11. Skema Kerja Penelitian.....	40
12. Kurva Log Pertumbuhan Bakteri <i>Bacillus sp</i>	41
13. Dialisis Sampel.....	43
14. Perbandingan hasil kadar histamin metabolit, presipitat dan dialisat.....	44
15. Perbandingan konsentrasi protein metabolit, presipitat dan dialisat.....	47
16. Profil Pita Peptida.....	48



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil Perhitungan Bakteri <i>Bacillus sp.</i> pada Tiap Jam	57
2. Hasil Uji Histamin.....	58
3. Hasil Uji Konsentrasi Protein.....	62
4. Elektroforesis SDS-PAGE.....	64
5. Hasil Elektroforesis SDS-PAGE	66



1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

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

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 diri misalnya protein, karbohidrat dan enzim.

berwarna gelap tinggi kandungan histidin bebasnya (Keer *et al.*, 2002). Enzim pada umumnya dihasilkan di dalam sel, beberapa diekstrak melalui dinding sel dan dapat berfungsi di luar sel. Jadi dikenal 2 tipe enzim yaitu enzim ekstraselular (berfungsi di luar sel) dan enzim intraselular (berfungsi di dalam sel). Fungsi utama enzim ekstraselular adalah mengubah nutrient disekitarnya sedemikian hingga nutrient tersebut masuk ke dalam sel. Sedangkan enzim intraselular mensintesis bahan selular atau menguraikan nutrien untuk menyediakan energi yang dibutuhkan sel. Untuk memisahkan protein enzim tertentu dari ekstrak kasar yang mengandung banyak unsur lain maka dilakukan isolasi atau pemurnian enzim (Aulanni, 2004).

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.

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 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).

Berbagai jenis bakteri yang mampu menghasilkan enzim histidin dekarboksilasi (HDC) termasuk famili *Enterobacteriaceae* dan *Bacillaceae* (Staruszkiewicz 2002 dalam Allen 2004). Umumnya spesies *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pedicoccus*, *Photobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, dan *Streptococcus* menunjukkan aktivitas dekarboksilasi asam amino (Kanki *et al.* 2002 dalam Allen 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, 2005). Pemurnian dengan metode pengendapan dilakukan dengan penambahan ammonium sulfat. Penambahan ammonium sulfat kedalam 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 menjadi histamin oleh metabolit ekstraselular bakteri didapatkan hasil kandungan histamin terendah yaitu dari penambahan metabolit ekstraseluler bakteri *Bacillus sp.* Berdasarkan uraian diatas maka dapat permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah kadar histamin akan semakin tinggi seiring bertingkatnya pemurnian dari metabolit ekstraseluler bakteri *Bacillus sp* ?
2. Bagaimana profil pita protein dan kadar protein dimasing-masing tingkat pemurnian metabolit ekstraseluler bakteri *Bacillus sp* ?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk menguji aktivitas penguraian histidin murni menjadi histamin dari masing-masing tingkat pemurnian metabolit ekstraseluler bakteri *Bacillus sp.*
2. Untuk mendapatkan profil pita protein dan kadar protein dari masing-masing tingkat pemurnian metabolit ekstraseluler bakteri *Bacillus sp.*

1.4 Hipotesis

Hipotesa yang mendasari penelitian ini adalah:

H₀ : Metabolit ekstraseluler bakteri *Bacillus sp.* diduga tidak mampu menghasilkan kadar histamin, profil pita protein, dan kadar protein cagus fungsi.

H₁ : Metabolit ekstraseluler bakteri *Bacillus* sp. diduga mampu menghasilkan kadar histamin, profil pita protein, dan kadar protein.

1.5 Kegunaan Penelitian

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

1.6 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 Maret – Mei 2012.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Bacillus sp*

Menurut Holt, *et al* (1994), *Bacillus sp* merupakan bakteri aerob, gram positif, berbentuk batang dengan ukuran diameter 1,2-1,5 mikrometer dan panjang 2,0-2,4 mikrometer, bentuk sel-sel silindris sampai oval atau bentuk pear, dan motil endospora kebanyakan dibentuk dalam waktu 48 jam dengan suhu optimum untuk pertumbuhannya antara 28°C – 35°C dan suhu maksimumnya antara 40°C – 45°C. Dalam media glukosa agar, bentuk batangnya terkadang lebih panjang dan besar diameter sampai 3 µm/ lebih pada beberapa strain. *Bacillus sp* memerlukan aerasi untuk memacu pertumbuhan, spora bervariasi dari oval pendek hingga memanjang pada beberapa strain, tudung spora terwarnai dengan fuchsin. Pada Nutrient Agar tampak tumbuh bertumpuk-tumpuk, non spreading, mengkilap, kadang-kadang rugose samping. Pada media agar biasanya berwarna kuning pada inkubasi lama pertumbuhan dan medium menjadi coklat atau hitam.

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).

Klasifikasi bakteri *Bacillus sp* dalam Zipcodezoo (2011^a), adalah sebagai berikut :

Kerajaan : Bacteria
Filum : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Ordo : Bacillales
Famili : Bacillaceae
Genus : *Bacillus*
Spesies : *Bacillus sp*

Mikroba yang berperan dalam pelarutan fosfat adalah bakteri, jamur dan aktinomisetes. Dari golongan bakteri antara lain: *Bacillus firmus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. polymixa*, *B. megatherium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* dan *Mycobacterium* (Nursanti dan Madjid, 2009).

Bacillus merupakan bakteri yang berbentuk basil dimana bakteri jenis ini merupakan bakteri pengurai dari protein menjadi senyawa sederhana, *Bacillus* sendiri terbagi atas 2 golongan yaitu yang bersifat proteolitik dan patogen dimana bakteri jenis patogen seperti *Bacillus anthracis* yang merupakan bakteri berbahaya pembawa penyakit antraks khususnya pada hewan ternak seperti sapi, sedangkan yang bersifat proteolitik yaitu yang mampu menguraikan protein dan dapat menghasilkan senyawa lain seperti penisilin dan lain sebagainya. Sebagai contoh sebagai berikut :

- *Bacillus brevis*, menghasilkan terotrisin
- *Bacillus subtilis*, menghasilkan basitrasin
- *Bacillus polymyxa*, menghasilkan polimixin



Gambar 1. *Bacillus sp*

2.2 Bakteri di Perairan Mangrove

Bakteri merupakan salah satu komponen penting yang berperan dalam penguraian serasah daun di ekosistem mangrove. Hampir semua bakteri laut bersifat gram negatif dan ukurannya lebih kecil dibanding dengan bakteri non laut. Bakteri gram positif hanya sekitar 10% dari total populasi bakteri laut dan proporsi terbesar terdiri atas bakteri gram negatif berbentuk batang, yang umumnya aktivitas gerakan dilakukan dengan bantuan flagel. Bakteri bentuk kokus umumnya lebih sedikit dibanding bentuk batang. Keberadaan bakteri laut Gram positif terbanyak ditemukan pada sedimen (Kathiresan dan Bingham, 2001).

Shome *et al*, (1995) mengisolasi 38 bakteri mangrove dari sedimen di Andaman Selatan. Isolat terbanyak terdiri atas bakteri yang memiliki sifat morfologi dan biokimia sebagai berikut: Gram positif (76,3%), motil (87%), fermentatif (6,9 - 82,1%), pigmen (31%) dan antibiotik (100%). Isolat yang paling banyak ditemukan adalah *Bacillus spp* (50%).

Kebanyakan bakteri laut terikat, bergabung sesamanya untuk membentuk permukaan yang kuat karena adanya bahan berlendir yang terbentuk pada permukaan sel, sehingga sel-sel saling terikat. Dengan cara ini bakteri dapat

membentuk lapisan permukaan yang mengakibatkan bakteri dapat hidup pada alga, rumput laut dan tumbuhan mangrove (Hutching dan Saenger, 1987). Bakteri dapat hidup pada lingkungan salin dan membutuhkan Na^+ untuk pertumbuhan dan untuk menjaga tekanan osmotik dan integritas sel (Lyla dan Ajmal, 2006).

Secara umum mikroorganisme memainkan peranan penting dalam pertukaran energi pada suatu ekosistem. Mikroorganisme berperan sebagai dekomposer senyawa makro molekul menjadi mikro molekul, dimana senyawa mikro molekul tersebut kemudian dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme atau organisme yang lain (Nybakken, 1988). Studi tentang keanekaragaman jamur pada *A. Marina* telah dilaporkan oleh Odum (1996), dimana pada daerah tersebut didominasi oleh *Aspergillus*, *Penicillium* dan *Deuteromycotina*. Sedangkan data tentang keanekaragaman bakteri pada *A. marina* belum pernah dilaporkan.

Mikroba dan jamur menjadikan lingkungan di sekitar akar mangrove (rhizosfer) sebagai habitat. Mikroba dan jamur mendapatkan keuntungan karena memperoleh “tempat tinggal” yang banyak mengandung bahan organik yang terjebak diantara akar mangrove. Bahan organik yang ada disekitar mangrove akan diuraikan oleh mikroba dan jamur sebagai sumber energi untuk hidup. Hasil sampingan dari proses penguraian tersebut adalah tersedianya nutrisi dan naiknya pH tanah yang sangat menguntungkan bagi pertumbuhan mangrove (Effendi, 2007).

Jumlah bakteri rata-rata pada serasah daun *Avicennia spp* yang ditemukan di perairan Dumai $1,12 \times 10^8$ cfu/gram (Feliatra, 2001). Menurut Adel (2001) jumlah bakteri aminolitik yang ditemukan pada serasah mangrove sebanyak $1,46 \times 10^6$ cfu/gram. Komunitas bakteri mangrove di ekosistem mangrove India, menunjukkan bahwa jumlah bakteri yang hidup bebas berkisar

antara $8,1 \times 10^6$ sampai $10,9 \times 10^6$ dan yang berpigmen berkisar antara 0.18×10^6 sampai $1,95 \times 10^6$ cfu/gram. Penelitian yang dilakukan oleh D'Costa *et al*, (2004) pada komunitas mangrove di India ditemukan 10 genus bakteri yaitu *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Beijerinckia*, *Erwinia*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Staphylococcus* dan *Xanthomonas*.

2.3 Metabolit

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

2.3.1 Metabolit Primer

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

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

2.3.2 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder pada suatu organisme hidup (*natural product*) merupakan suatu senyawa kimia yang diproduksi sebagai respon terhadap lingkungannya, salah satunya sebagai sistem pertahanan diri (Sijabat, 2009).

Wibowo (2006), menambahkan bahwa metabolit sekunder merupakan hasil metabolisme yang tidak digunakan untuk proses pertumbuhan, tetapi misalnya untuk pertahanan diri, contohnya adalah protein, asam lemak, karbohidrat, senyawa antimikroba, dan lain-lain. Umumnya metabolit sekunder berasal dari metabolit primer dimana memiliki karakter yang unik pada setiap mikroorganisme karena bergantung pada lingkungan tempat hidupnya. Contoh metabolit sekunder dari mikroorganisme antara lain antibiotik, pigmen dan vitamin.

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

2.4 Pemurnian Enzim Metabolit

Enzim pada umumnya dihasilkan di dalam sel, beberapa diekstrak melalui dinding sel dan dapat berfungsi di luar sel. Jadi dikenal 2 tipe enzim yaitu enzim ekstraselular (berfungsi di luar sel) dan enzim intraselular (berfungsi di dalam sel). Fungsi utama enzim ekstraselular adalah mengubah nutrisi disekitarnya sedemikian hingga nutrisi tersebut masuk ke dalam sel. Sedangkan enzim intraselular mensintesis bahan selular atau menguraikan nutrisi untuk menyediakan energi yang dibutuhkan sel. Untuk memisahkan protein enzim tertentu dari ekstrak kasar yang mengandung banyak unsur lain maka dilakukan isolasi atau pemurnian enzim (Aulanni'am, 2004)

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).

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

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

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

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

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

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

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

2.5 Biogenic Amine (Histamin)

Biogenik amina merupakan komponen dasar nitrogen yang dibentuk terutama oleh dekarboksilasi asam amino atau dengan transaminasi 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.*, *all.*, 2003).

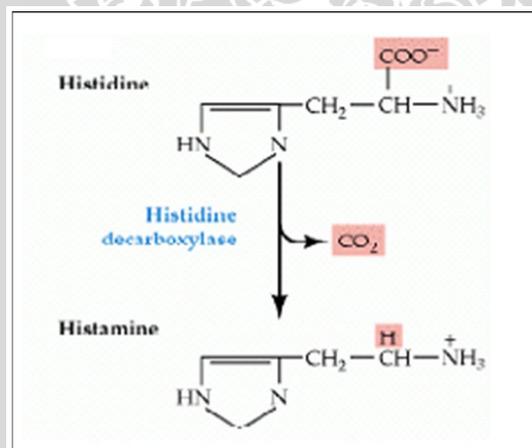
Biogenik amin adalah senyawa amin yang terbentuk sebagai hasil proses dekarboksilasi asam amino bebas yang terdapat di dalam tubuh ikan. Masalah yang dihadapi dalam pembuatan ikan pindang adalah terbentuknya suatu senyawa yang dapat menyebabkan keracunan yaitu biogenik amin akibat sanitasi yang buruk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

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).

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

seketika, kondisi baik untuk produksi biogenik amin asalkan bakteri mengandung enzim decarboxylase. Pertumbuhan bakteri akan terhenti pada suhu rendah dari 5° C, bagaimanapun aktivitas enzymatic akan tetap berlanjut, menghasilkan dalam produksi amin selanjutnya (Ahmed, 1991).

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



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

Dekarboksilasi histidin membentuk histamin, yaitu suatu reaksi di jaringan tubuh mamalia yang dikatalis oleh enzim dekarboksilase asam L-amino aromatik yang memiliki spesifitas yang luas. Enzim ini juga mengkatalis reaksi dekarboksilasi dopa, 5-hidroksi-triptofan, fenilalanin, tirosin dan triptofan. Asam amino α -metil yang menghambat aktivitas dekarboksilasi digunakan di klinik sebagai anti-hipertensi (Rodwell et., all, 2003).

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

2.6 Karakterisasi Dialisat Metabolit

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

2.6.1 *Bovine Serum Albumin (BSA)*

Penentuan konsentrasi protein khamir laut menggunakan metode biuret dengan BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai standar. Prinsip kerja metode biuret adalah senyawa dengan 2 atau lebih ikatan peptida apabila direaksikan dengan garam kupri dalam suasana basa akan membentuk warna violet. Reaksi biuret bergantung pada pembentukan suatu kompleks antara ion 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).

2.6.2 Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Elektroforesis adalah pemisahan molekul berdasarkan bobot molekul dan muatan elektronnya. Molekul yang bermuatan negative 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*).

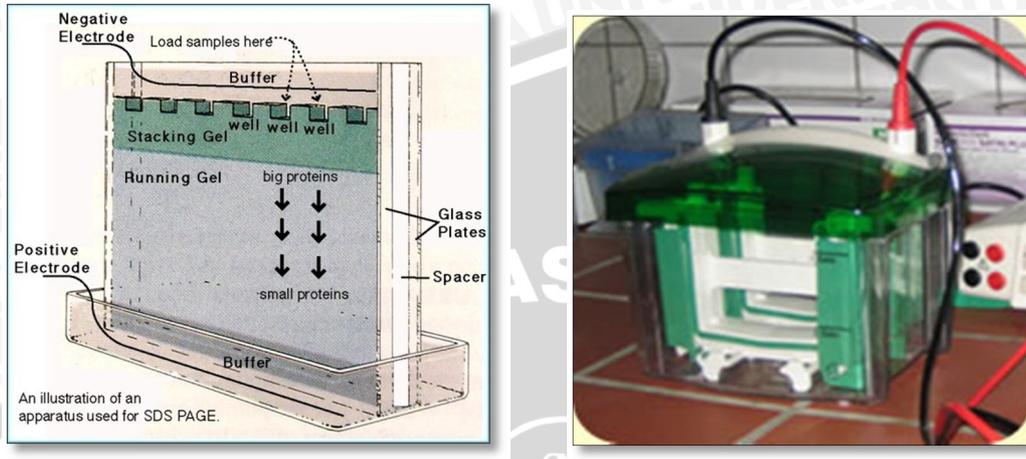
Prinsip analisis SDS-PAGE adalah pemisahan protein berdasarkan ukuran molekul. Pada SDS-PAGE, semua ikatan disulfide yang ada pada protein direduksi oleh β -merkaptotanol. Senyawa SDS yang ditambahkan berfungsi memutuskan ikatan diantara sub unit penyusun protein dan membuat keseluruhan protein diselimuti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

Metode elektroforesis protein dengan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) merupakan salah satu metode

untuk menganalisis protein dengan memisahkan pita-pita protein yang ada di dalam sampel berdasarkan berat molekulnya (Utami *et al.*, 2007).

Elektroforesis dipergunakan untuk memisahkan campuran protein, baik pada larutan bebas maupun pada larutan dengan matriks berpori solid seperti pati. SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-polyacrilamide-gel electrophoresis*) menggunakan cross-linked gel poliakrilamid sebagai matriks inert di mana protein akan bermigrasi. Gel biasanya disiapkan sebelum dipergunakan. Ukuran pori gel dapat disesuaikan sehingga cukup kecil untuk memperlambat migrasi molekul protein yang dikehendaki. Protein-protein tersebut tidak berada pada larutan biasa tetapi pada larutan yang mengandung deterjen yang bermuatan negatif sangat kuat, yakni *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS). Deterjen tersebut mengikat daerah hidrofobik molekul protein sehingga menyebabkannya terurai menjadi rantai polipeptida yang panjang. Molekul protein individu dilepaskan dari asosiasinya dengan protein lain dan lipid, serta bebas terlarut pada larutan deterjen. Agen reduksi seperti merkptoetanol ditambahkan untuk mengurai pautan S-S protein sehingga semua konstituen polipeptida pada molekul multisubunit dapat dianalisis secara terpisah. SDS-PAGE merupakan prosedur yang lebih baik daripada analisis protein lainnya karena dapat dipergunakan untuk memisahkan semua jenis protein, termasuk protein yang tidak dapat larut dalam air. Protein membran, komponen protein sitoskeleton, dan protein yang merupakan bagian agregat molekul besar dapat pula diresolvasi. Metode ini memisahkan polipeptida berdasarkan ukurannya sehingga metode ini juga memberikan informasi tentang berat molekul dan komposisi subunit dari setiap kompleks protein (Alberts *et al.*, 1994 dalam Rizki, 2010).

Dapat dilihat gambar Elektroforesis SDS-PAGE yang digunakan pengujian untuk menganalisis protein dengan memisahkan pita-pita protein yang ada di dalam sampel berdasarkan berat molekulnya



Gambar 3. Elektroforesis SDS-PAGE (Google, 2011)

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1. Materi Penelitian

3.1.1. Bahan Penelitian

Sampel diperoleh dari perairan mangrove (*Sonneratia alba*) yang terdapat di hulu sungai Bulu Desa Bulukerto Kecamatan Kraton Kabupaten Pasuruan. Sampel diambil dengan menggunakan botol hitam. Pengambilan sampel dilakukan pada permukaan perairan, tengah, dasar dan sedimen, kemudian dicampur. Bahan tersebut kemudian diidentifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Bahan pendukung lainnya adalah media cair TSB, sephadex untuk matriks kromatografi kolom filtrasi gel, hexan untuk mengelusi sampel akuades, NaCl untuk isolasi bakteri. Untuk presipitasi digunakan ammonium sulfat dan akuades. Untuk dialisis digunakan buffer fosfat 0,1 M pH 7, buffer fosfat 0,005 M pH 7, etanol dan akuades. Untuk pengujian *Bovine Serum Albumin* (BSA) digunakan *phosphate Buffer Saline* (PBS), *reagen biuret*, dan akuades. Sedangkan untuk pengujian SDS-PAGE digunakan sampel berupa *crude* metabolit ekstraseluler bakteri *Bacillus* sp.

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, autoklaf.

Untuk melakukan analisis presipitasi digunakan *stirrer*, dan sentrifuse. Untuk dialisis digunakan kantong selofan, *ependorf*, dan sentrifuse. Untuk pengujian *Bovine Serum Albumin* (BSA) digunakan erlenmeyer, *ependorf*,

vortek, tabung reaksi dan spektrofotometer UV-Vis. Sedangkan untuk pengujian 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 *Bacillus sp.* di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, untuk presipitasi, dialisis, uji BSA, dan Uji SDS-PAGE di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, untuk aerasi dan preparasi uji histamin di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, sedangkan untuk uji 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 merupakan salah satu pendekatan dalam penelitian. Metode eksploratif berupaya menemukan informasi umum mengenai sesuatu topik/masalah yang belum dipahami sepenuhnya oleh seorang peneliti. Jadi, penelitian eksploratif merupakan salah satu pendekatan penelitian yang digunakan untuk meneliti sesuatu (yang menarik perhatian) yang belum diketahui, belum dipahami, belum dikenali, dengan baik.

Menurut Singarimbun dan Effendi (1989), metode eksploratif bertujuan untuk memperoleh pengetahuan tentang suatu gejala, sehingga setelah melalui tahap observasi, masalah serta hipotesisnya dapat dirumuskan. Dalam penelitian eksploratif 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. (Yumei dan Yulia, 2009).

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 infeksi (Dart, 2003). Karena stabilitas panas dari bakteri yang tidak bisa dihilangkan dengan cara direbus, sterilisasi menggunakan uap panas dilakukan pada suhu dan tekanan yang tinggi di dalam autoklaf. Mesin ini beroperasi pada suhu 121°C dan dapat membunuh mikroba (Nicklin *et al.*, 1999). Selain itu alat yang harus disterilkan yaitu laminaran, dengan cara menyemprot bagian dalamnya dengan cairan aseptis (alkohol 70%), kemudian lap semua bagiannya menggunakan serbet makan bersih agar aseptis, ditutup kaca laminaran dan menekan tombol UV untuk menghidupkan sinar UV pada alat yang berfungsi sebagai pensteril laminaran selama 1 jam.

Pembuatan larutan untuk perkembangbiakan bakteri *Bacillus* sp. yaitu media TSB. Pertama yaitu menimbang media TSB sebanyak 18 gram menggunakan timbangan digital. Kemudian media TSB dimasukkan kedalam erlenmeyer 1000 ml dan diberi aquades sebanyak 600 ml, lalu diaduk dengan spatula sampai homogen. Kemudian didapatkan media cair, lalu dimasukkan kedalam masing-masing erlenmeyer sebanyak 100 ml. Setelah itu disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit

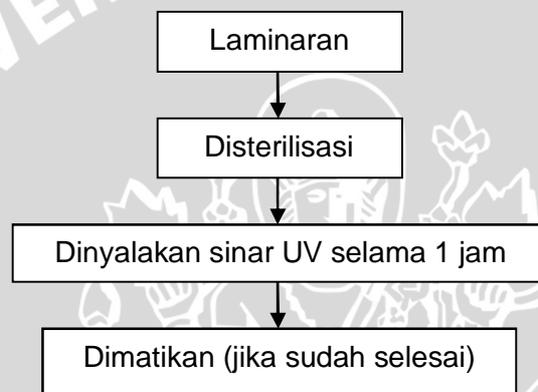
dengan tujuan menghilangkan kontaminan yang ada pada media. Setelah disterilisasi, media cair didiamkan sampai dingin agar botol tidak pecah ketika diberi perlakuan lebih lanjut. Adapun komposisi dari media TSB dapat dilihat pada Tabel 1 dibawah ini :

Tabel 1. Komposisi Medium Tryptone Soya Broth (TSB)

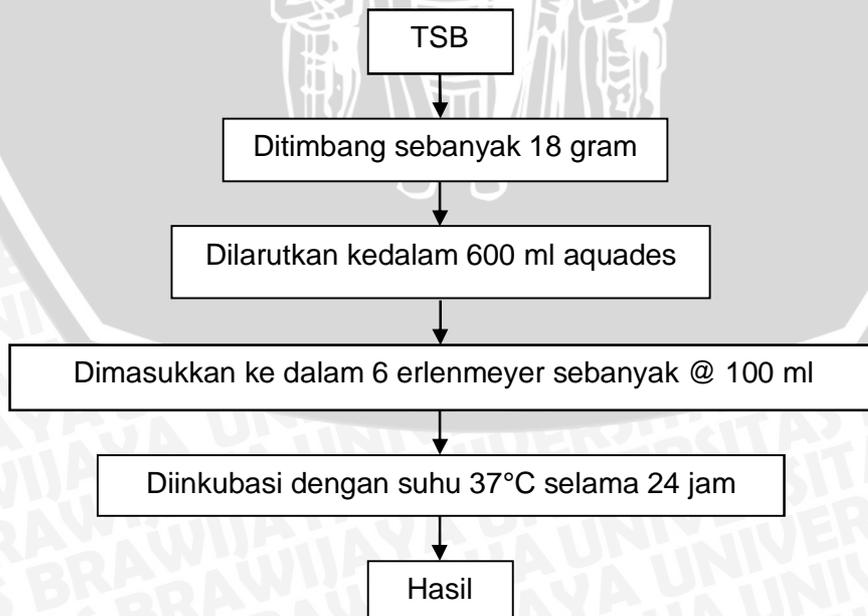
Formula	Gram per liter
Casein	17
Soybean Meal	3
Sodium Chloride	5
Dipotassium Phosphate	2,5
Dextrose	2,5

Setelah 1 jam, sinar UV pada 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 isolat murni bakteri *Bacillus* sp. dan media cair yang diletakkan di rak tabung reaksi. Lalu jarum osse pada bagian ujungnya disemprot dengan alkohol dan dipanaskan diatas bunsen. Hal tersebut dilakukan untuk menghindari kontaminasi alat pada saat penanaman bakteri. Kemudian diambil sampel bakteri yang akan dibiakkan, dibuka tutup tabung sambil dipanaskan diatas bunsen untuk menjaga kondisi tetap aseptis. Jarum osse disentuh di media isolat bakteri untuk mengurangi panas dari jarum osse, sehingga bakteri yang diambil tidak mati. Selanjutnya diambil sebanyak 1 osse bakteri dengan cara menggores isolat dan dimasukkan kedalam media cair baru yang telah disiapkan (jarum osse dimasukkan di permukaan saja agar tidak terjadi kontaminasi, karena hanya bagian ujung jarum osse yang disterilkan). Bakteri yang telah diinokulasi pada media baru, dipanaskan lagi diatas bunsen bagian permukaan erlenmeyernya dan segera ditutup. Jarum osse dipanaskan

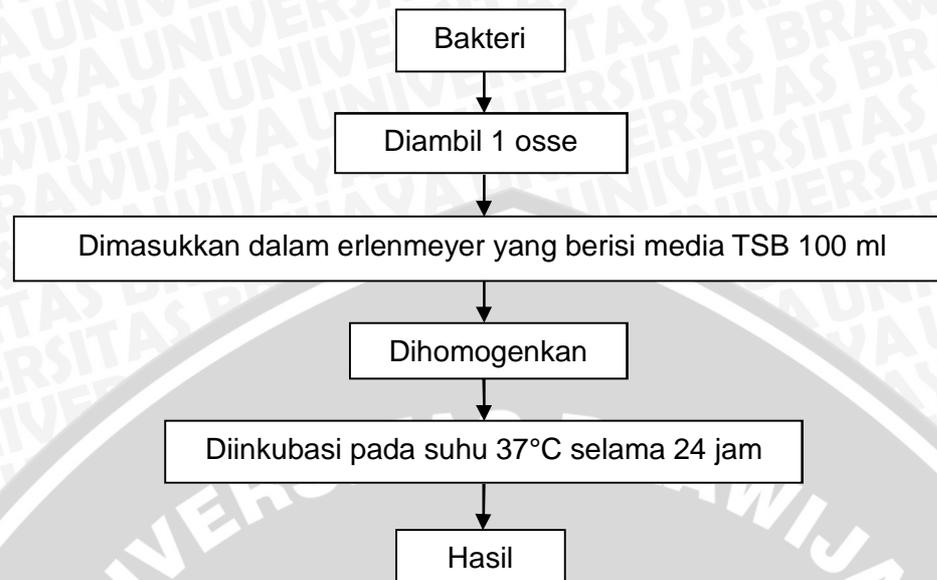
diatas bunsen lagi bagian ujungnya agar kembali steril saat digunakan untuk membiakkan bakteri yang lain. Setelah itu, bakteri dan media dihomogenkan, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, dilihat ada atau tidak endapan pada media, dimana adanya endapan berarti pembiakan telah berhasil dilakukan. Erlenmeyer diberi label nama bakteri yang telah dibiakkan agar tidak terjadi kesalahan pada saat pengamatan perlakuan fermentasi. Prosedur kerja sterilisasi alat, pembuatan media cair dan peremajaan bakteri dapat dilihat pada Gambar 4, 5, dan 6.



Gambar 4. Skema Kerja Sterilisasi Alat



Gambar 5. Skema Kerja Pembuatan Media Cair

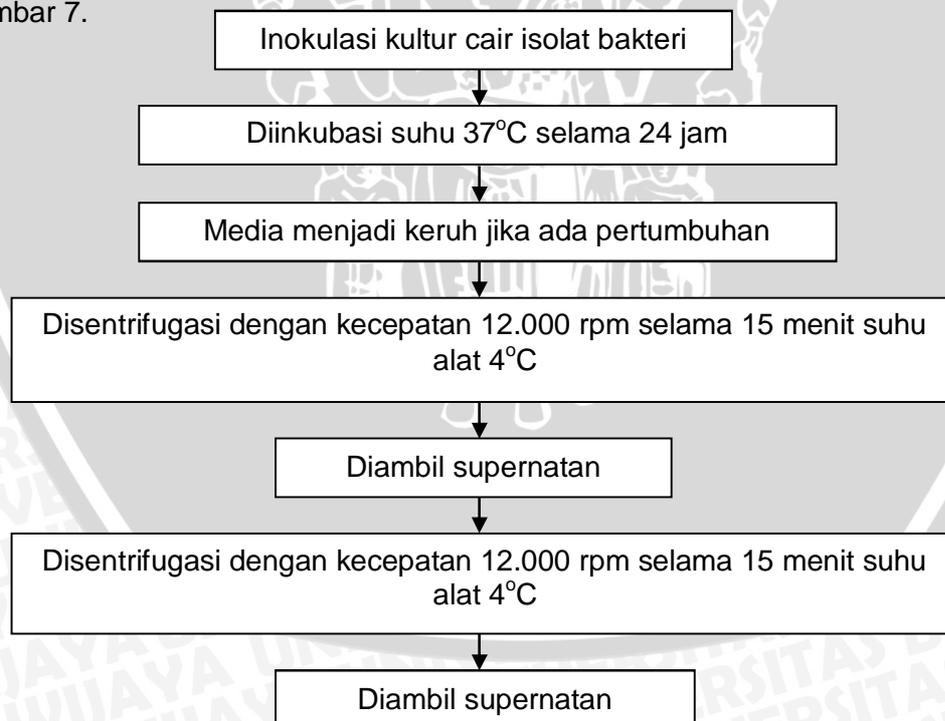


Gambar 6. Skema Kerja Peremajaan Bakteri

3.3.2. Pemanenan Metabolit Ekstraseluler

Metabolit yang digunakan pada penelitian ini adalah metabolit primer. Metabolit yang dihasilkan dari fase eksponensial pertumbuhan bakteri (Dharma, 2005). Pemanenan sampel berupa metabolit primer bakteri *Bacillus* sp. dilakukan berdasarkan metode Noviani *et al.* (2009), yang dimodifikasi. Setelah dilakukan pengamatan fase-fase pertumbuhan bakteri, maka kita dapat mengetahui pada jam ke berapakah bakteri tersebut memasuki fase eksponensial. Sampel metabolit primer dipanen pada fase eksponensial. Fase eksponensial dipilih karena pada fase ini merupakan fase pertumbuhan tertinggi dari bakteri itu sendiri. Menurut Nurwantoro (2003), populasi total bakteri cenderung meningkat seiring dengan pertambahan lama waktu penyimpanan. Hal ini dapat diakibatkan bakteri sedang berada dalam fase eksponensial. Semakin banyak bakteri yang dihasilkan maka akan semakin banyak pula bioaktif yang dapat dipanen dari bakteri tersebut.

Prosedur kerja untuk pembuatan metabolit primer yaitu menginokulasi kultur cair isolat bakteri pada erlenmeyer dengan menggunakan media TSB kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24-72 jam. Setelah perlakuan tersebut media akan menjadi keruh hal ini dikarenakan bakteri tersebut mengalami pertumbuhan. Proses 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. Dari hasil tersebut di dapatkan metabolit primer. Proses sentrifugasi ini dilakukan dua kali, hal ini dikarenakan untuk mendapatkan metabolit primer yang lebih murni. Prosedur kerja pembuatan metabolit primer bakteri *Bacillus sp* dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Pembuatan Metabolit Bakteri

3.3.3. Pemurnian Metabolit (*Bacillus sp*)

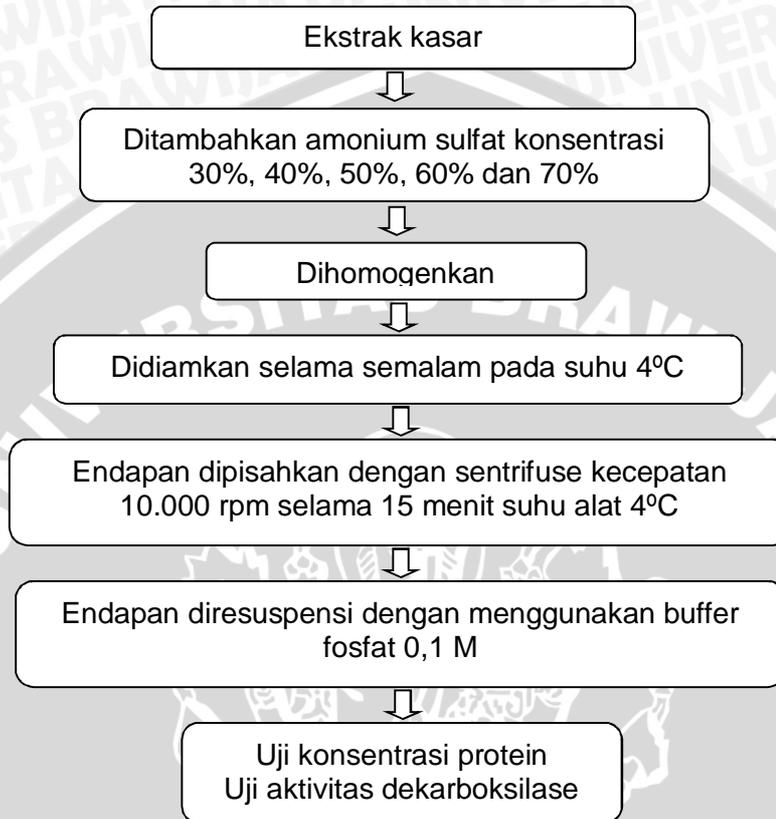
Menurut Dewi (2006), pemurnian enzim adalah salah satu cara untuk memisahkan protein enzim dari protein jenis lain dan kontaminan. Secara umum, pemurnian enzim dibagi dalam tiga tahap, yaitu ekstraksi, pemekatan, dan fraksinasi. Dalam prosedur penelitian ini dilakukan presipitasi yaitu pengendapan dengan ammonium sulfat dan dialisis.

3.3.3.1.Presipitasi

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, 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).

Protein dari ekstrak kasar metabolit diendapkan menggunakan ammonium sulfat dengan modifikasi Putranto (2006) dan Nurhasanah (2008). Untuk menggumpalkan protein, supernatan hasil sentrifugasi ditambahkan ammonium sulfat sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* dengan tingkat kejenuhan atau konsentrasi (30%, 40%, 50%, 60%, 70%) dan dibiarkan selama satu malam pada suhu 4⁰C. Selanjutnya disentrifugasi 10.000 rpm, suhu 4⁰C, selama 15 menit. Pelet yang diperoleh diresuspensikan dengan buffer fosfat 0,1 M untuk dilakukan penelitian selanjutnya dan untuk penentuan

kadar proteinnya dengan metode Bradford (1976). Skema pengendapan ekstrak kasar ekstraseluler bakteri *Bacillus sp.* dengan menggunakan ammonium sulfat ini bisa dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Skema Kerja Presipitasi dengan Amonium Sulfat (Aulanni, 2004)

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

- Pelet hasil endapan dengan ammonium sulfat
- Buffer fosfat 0,1 M pH 7
 - o Larutan A = 0,028392 gr Na_2HPO_4 dilarutkan dalam 2 mL aquades
 - o Larutan B = 0,143256 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 4 mL aquades
 - o Diambil larutan A (1,95 mL) dan larutan B (3,05 mL), kemudian dicek pH 7 dan ditambahkan aquades hingga 10 mL
 - Perhitungan Na_2HPO_4 = $M \times V \times \text{BM}$
 = $0,1 \times 0,002 \text{ L} \times 141,96$
 = 0,028392 g
 - Perhitungan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ = $M \times V \times \text{BM}$
 = $0,1 \times 0,004 \text{ L} \times 358,14$
 = 0,143256 g
- Buffer fosfat 0,05 M pH 7
 - o Larutan A = 1,41 gr Na_2HPO_4 dilarutkan dalam 200 mL aquades
 - o Larutan B = 6,267 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 350 mL aquades
 - o Diambil larutan A (195 mL) dan larutan B (305 mL), kemudian dicek pH 7 dan ditambahkan aquades hingga 1 L.
 - Perhitungan Na_2HPO_4 = $M \times V \times \text{BM}$
 = $0,05 \times 0,02 \text{ L} \times 141,96$
 = 1,41 g
 - Perhitungan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ = $M \times V \times \text{BM}$
 = $0,05 \times 0,35 \text{ L} \times 358,14$
 = 6,267 g
- Na_2CO_3 5% = 5 gr Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL aquades
- EDTA 50 mM pH 7 : 1,861 gr EDTA dilarutkan dalam 100 mL aquades

- Kantong selofan 10 kDa
 - o Didihkan 100 mL larutan Na_2CO_3 5% diatas hot plate kemudian masukkan kantong selofan selama 15 menit, kemudian dicuci dengan aquades.
 - o Didihkan 100 mL larutan EDTA 50 mM pH 9 diatas hot plate kemudian masukkan kantong selofan selama 15 menit, kemudian dicuci dengan aquades.
 - o Didihkan aquades steril diatas hot plate kemudian masukkan kantong selofan selama 15 menit, kemudian cuci dengan aquades.

Prosedur kerja

- Pelet hasil pengendapan ammonium sulfat ditambahkan 2 mL buffer fosfat 0,1 M pH 7
- Dimasukkan dalam kantong selofan ukuran 10 kDa dan dijepit tiap ujungnya
- Selanjutnya didialisis dengan cara direndam dalam 1 L buffer fosfat 0,05 M pH 7 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 ekstraseluler bakteri *Bacillus sp* yang diperoleh dikering anginkan dan disimpan pada suhu 4°C.

3.4. Karakterisasi Dialisat Metabolit

3.4.1. Uji Konsentrasi Protein (Metode BSA)

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

Preparasi bahan untuk uji BSA yaitu dialisat ekstraselular metabolit 1 mL 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 tartarat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$); 15 mL NaOH 2,5 M; 0,05 gr KI kemudian ditambahkan akuades 50 mL. Untuk 2 mL larutan standar protein BSA 1.200 ppm (1,2 mg/mL), kemudian dilakukan pengenceran larutan stok (Khotim, 2012).

Prosedur kerja uji BSA dilakukan dengan modifikasi Nurhasanah (2008) dan Khotim (2012). Dibuat larutan standar dengan pengenceran larutan stok. Konsentrasi standar protein BSA dan pengencerannya dapat dilihat pada Tabel 2. Disiapkan *ependorf* sebanyak 14 buah, isi masing-masing dengan akuades dan larutan stok (BSA) sehingga didapatkan konsentrasi yang diinginkan (sesuai perhitungan pengenceran), lalu divortek. Diambil 1 mL larutan dari masing-

masing *ependorf*, lalu pindahkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan masing-masing tabung dengan 2 ml reagen biuret (1:2). Diinkubasi pada suhu 37°C, selama 20 menit. Warna yang terbentuk dibaca serapannya pada panjang gelombang 740 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Konsentrasi protein ditentukan dengan menggunakan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan konsentrasi 0-800 ppm. 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 dan x = konsentrasi protein.

Preparasi Uji Kadar Protein

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

Prosedur Kerja Uji Kadar Protein

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

Tabel 2. Konsentrasi BSA dan Pengencerannya

Larutan stok BSA (μL)	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

Sumber: Khotim (2012).

- Siapkan *ependorf* sebanyak 7 buah, isi masing-masing dengan aquades dan larutan stok (BSA) sehingga didapatkan konsentrasi yang diinginkan (sesuai perhitungan pengenceran), lalu vortex.
- Ambil 1 mL larutan dari masing-masing *ependorf* tadi lalu pindahkan ke dalam tabung reaksi.
- Tambahkan masing-masing tabung dengan 2 ml reagen biuret (1:2).
- Untuk sampel yang diuji juga ditambahkan dengan 2 ml reagen biuret (1:2).
- Inkubasi sampel dan larutan standard BSA pada suhu 37 °C, selama 30 menit
- Baca absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm

3.4.2. Uji 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 *Bacillus* 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).

Dalam uji SDS-PAGE preparasi bahan yang dilakukan adalah enzim dialisat ekstraselular metabolit sebanyak 1 mg dilarutkan 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*) dibuat dari 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* dibuat dari 20 mL Metanol 20% + 10 mL Asam Asetat Glisial 10%, kemudian ditambahkan akuades sampai volume 100 mL dan dihomogenkan. Larutan *staining* dibuat dari 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* dibuat dari 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. Adapun komposisi *Stacking gel* dan *Separating gel* dapat dilihat pada Tabel 3 dan 4.

Tabel 3. Komposisi *Stacking gel*

Komposisi	1 slab (μ L)
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

Sumber: Aulanni (2004).

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

Sumber: Aulanni (2004).

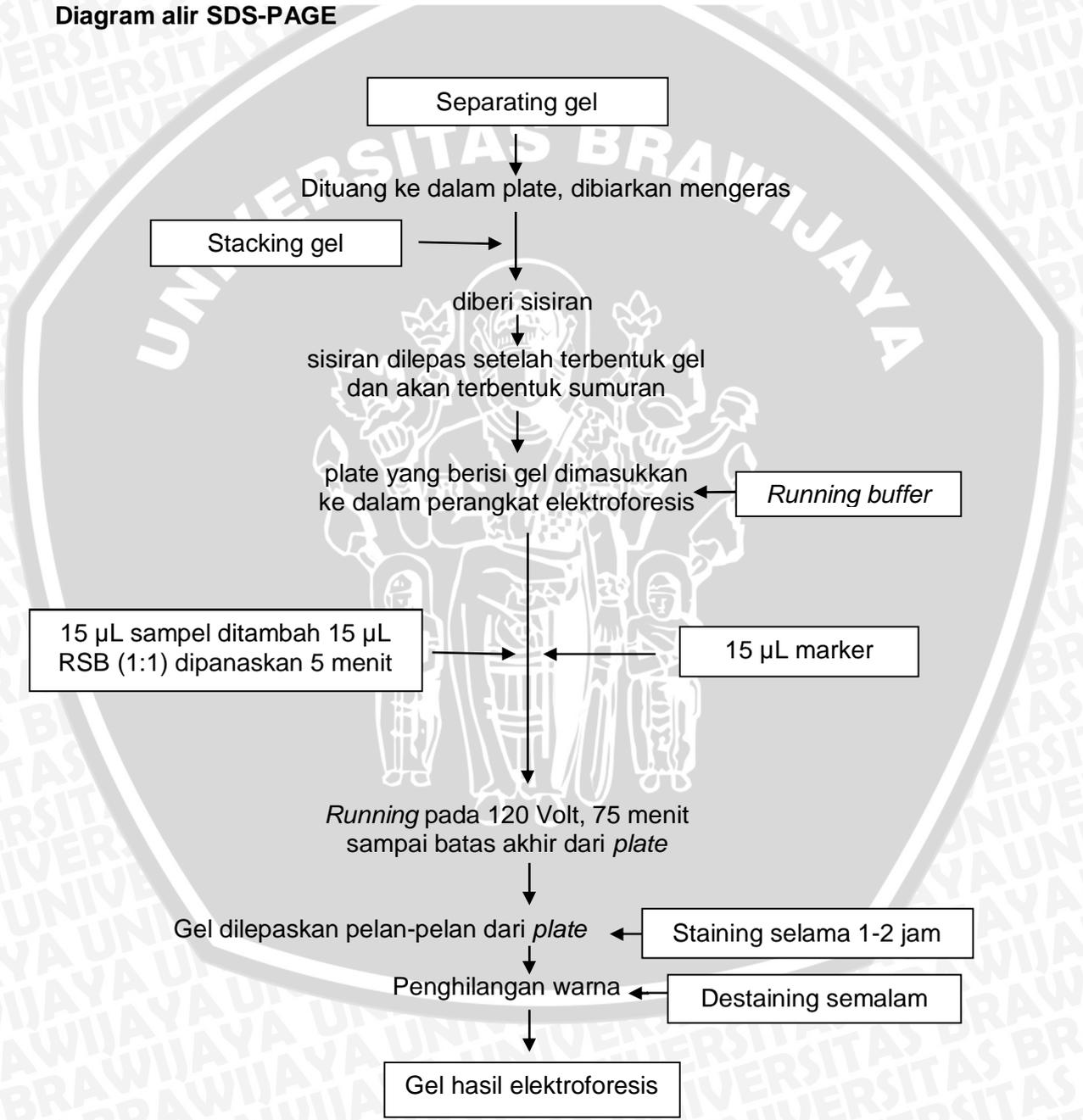
Prosedur kerja SDS-PAGE modifikasi dari Aulanni (2004), dalam pelaksanaannya dibutuhkan dua peralatan, yaitu *power supply* dan *buffer system*. Setelah buffer sistem dipasang maka *separating gel* dengan konsentrasi 12,5% dimasukkan dalam *plate* dan ditunggu sampai mengeras. Di atas *separating gel* 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.

Prosedur untuk pengukuran berat molekul protein sampel adalah sebagai berikut, untuk setiap sampel protein diamati dahulu berapa jumlah pita protein yang nampak, lalu masing-masing pita protein diukur jarak pergerakan protein

(Rf) dengan penggaris (cm). Dari setiap nilai Rf (jarak pergerakan protein) untuk masing-masing pita protein yang diperoleh, dihitung berat molekulnya dengan bantuan persamaan linier dari kurva standar berat molekul (marker). Rumus jarak pergerakan protein adalah sebagai berikut:

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

Diagram alir SDS-PAGE



Gambar 9. Diagram Alir SDS-PAGE

3.4.3. Pengujian Biogenik Amin (Histamin)

Sampel yang telah di aerasi selama 24 Jam diuji kadar biogenik aminnya secara kuantitatif menggunakan metode spektrfluorometri, dimana menurut Wanenoor (2010), metode spektroflluorometri adalah suatu metode pengukuran berdasarkan sinar yang berfluoresensi. Fluoresensi adalah gejala dari suatu molekul setelah radiasi cahaya, melepas kembali radiasi tadi dengan panjang gelombang yang lebih panjang. Fluoresensi akan nampak jelas apabila penyerapan sinar pada daerah ultraviolet dan melepaskannya dalam daerah gelombang nampak.

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



Gambar 10. Alat Spektroflluorometri

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

- **Prosedur Analisis**
 - Timbang \pm 10 ml sampel dalam beaker glass 250 ml dan tambahkan 50 ml methanol

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

- **Persiapan Resin**

- Timbang 3 gr *resin* untuk setiap kolom dalam *beaker glass* 250 ml
- Tambahkan 15 ml NaOH 2 N/gr resin untuk mengubah resin menjadi bentuk OH
- Aduk menggunakan *stirrer-plate* selama 30 menit
- Tuang cairan pada bagian atas dan ulangi penambahan NaOH 2 N dengan jumlah yang sama
- Cuci/bilas *resin* dengan aquades sebanyak 3 kali
- Saring melalui kertas saring No. 588 atau yang setara dan cuci kembali dengan aquades. Siapkan *resin* setiap minggu dan simpan dalam aquades

- **Persiapan Kolom Resin**

- Masukkan *glasswool* ke dalam kolom *resin* setinggi $\pm 1,5$ cm
- Masukkan *resin* dalam medium air ke kolom *resin* setinggi ± 8 cm, pertahankan volume air yang berada di atas *resin* ± 1 cm, jangan dibiarkan kering
- Letakkan labu takar 50 ml yang sudah berisi 5 ml HCl 1 N di bawah kolom *resini* 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 spectrofluorometer pada panjang gelombang excitasi : 350 nm dan emisi : 444 nm dalam jangka waktu 90 menit.

- **Perhitungan**

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

$$y = a + bx$$

keterangan :

y = fluoresensi sampel;

a = intersep;

b = *slope*;

x = konsentrasi sampel yang akan dihitung

- Setelah didapat harga x, kalikan dengan faktor pengenceran dan kembalikan ke berat sampel. Nyatakan kandungan histamin dalam ($\mu\text{g/g}$) atau mg/kg sampel.

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

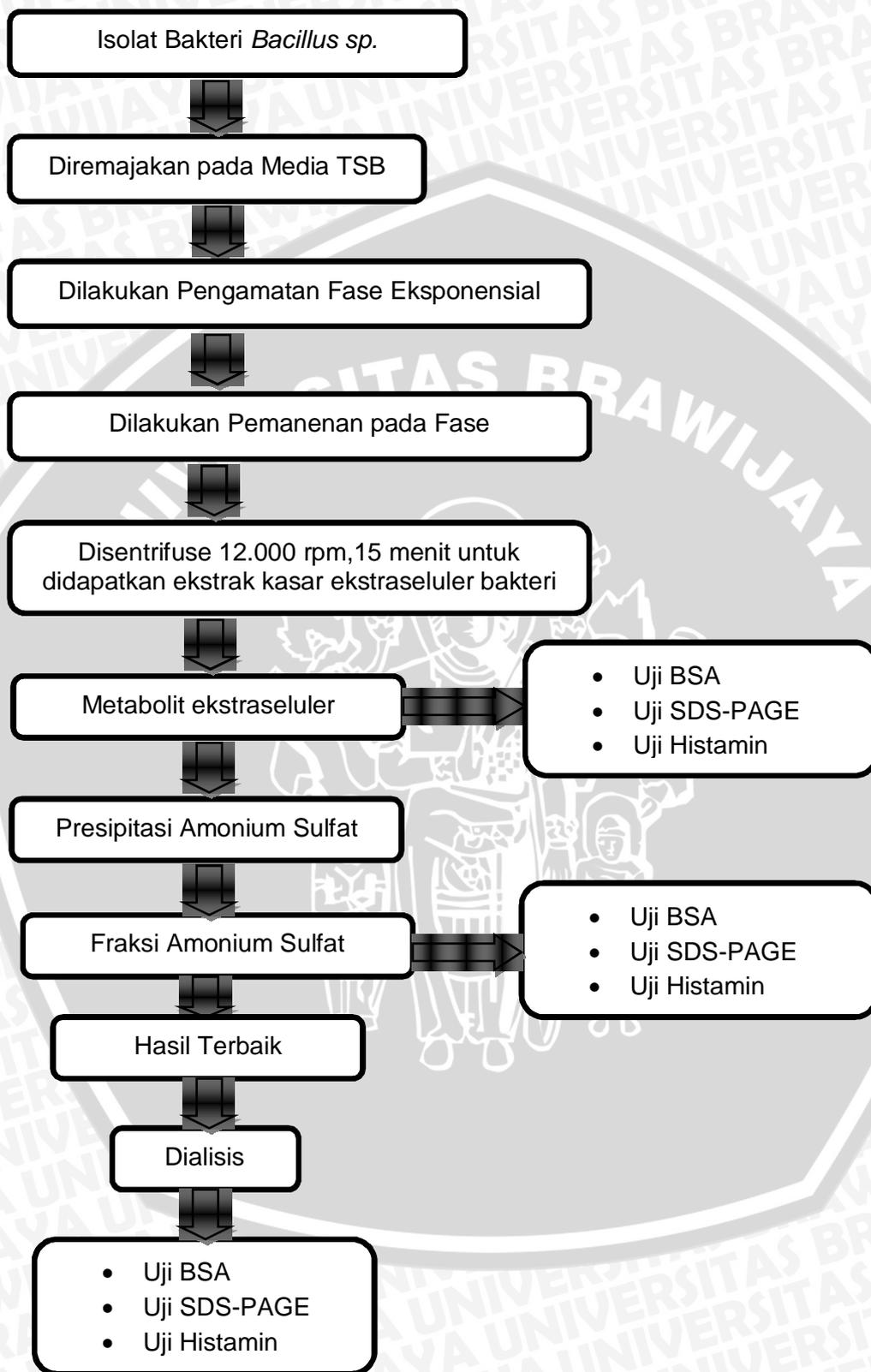
Keterangan :

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

3.4.4 Parameter Uji

Parameter yang dilakukan adalah parameter kuantitatif, yaitu data yang diperoleh dari hasil uji aktivitas dekarboksilase metabolit ekstraseluler bakteri, presipitat dan dialisat enzim dalam mendegradasi histidin menjadi histamin. Uji FT-IR. Serta pengujian elektroforesis SDS-PAGE dan juga konsentrasi protein masing-masing proses pemurnian kemudian dianalisa dengan cara membandingkan hasilnya.

3.5 Skema Kerja Konsep Penelitian

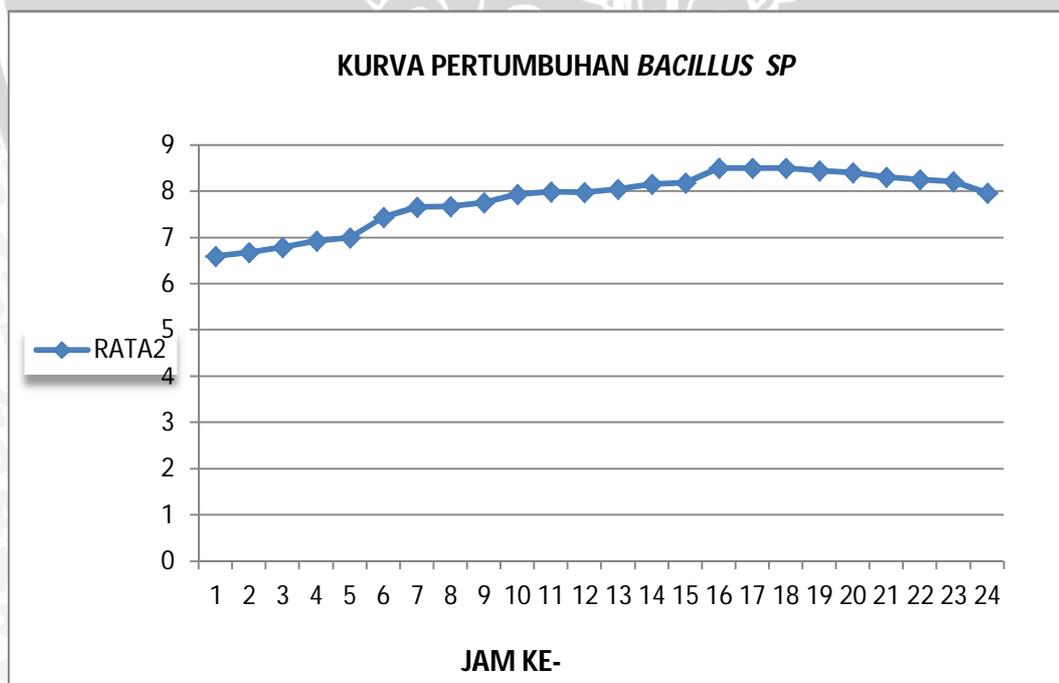


Gambar 11. Skema Kerja Penelitian

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Pengujian Histamin Dengan Metode Spektrofluorometri

Pemurnian enzim ekstraseluler dimulai dengan menumbuhkan isolat murni bakteri *Bacillus sp* yang bersifat proteolitik yaitu yang mampu menguraikan protein dan dapat menghasilkan senyawa lain seperti penisilin dan lain sebagainya. Setelah bakteri dipindahkan ke media TSB dan dihomogenkan kemudian diinkubasi dalam suhu 37⁰ C selama 24 jam. Setelah diinkubator, dilihat ada atau tidak endapan pada media, dimana adanya endapan berarti pembiakan telah berhasil dilakukan. Untuk mendapatkan metabolit enzim ekstraseluler *Bacillus sp.* perlu dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm dengan suhu alat 4°C selama 15 menit ketika bakteri berada pada fase eksponensial. Perhitungan bakteri *bacillus sp.* pada tiap jam dapat dilihat pada lampiran 1. Sedangkan kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus sp.* dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Kurva Log Pertumbuhan Bakteri *Bacillus sp.*

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

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

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

jumlah yang lebih banyak dari pada konsentrasi yang lainnya. Pada konsentrasi presipitasi 70%, endapan coklat yang diduga merupakan protein kemudian disentrifugasi dan dikumpulkan untuk didialisis.

Sampel yang memiliki kandungan garam tinggi harus didialisis, karena berpotensi mengganggu hasil analisis selanjutnya, menggunakan kantung dialisis yang memiliki pori-pori berukuran 10 kD yang dimasukkan ke dalam wadah berisi pelarut akuades yang digunakan untuk menciptakan lingkungan hipotonik di luar membran dialisis. Pori-pori ini menyebabkan molekul garam dan air yang kecil dapat bertukar dengan lingkungan, sementara protein yang berbobot molekul besar tidak dapat melewatinya (Nelson & Cox 2005 dalam Angky, 2011). Dialisis dapat dilihat pada Gambar 13.



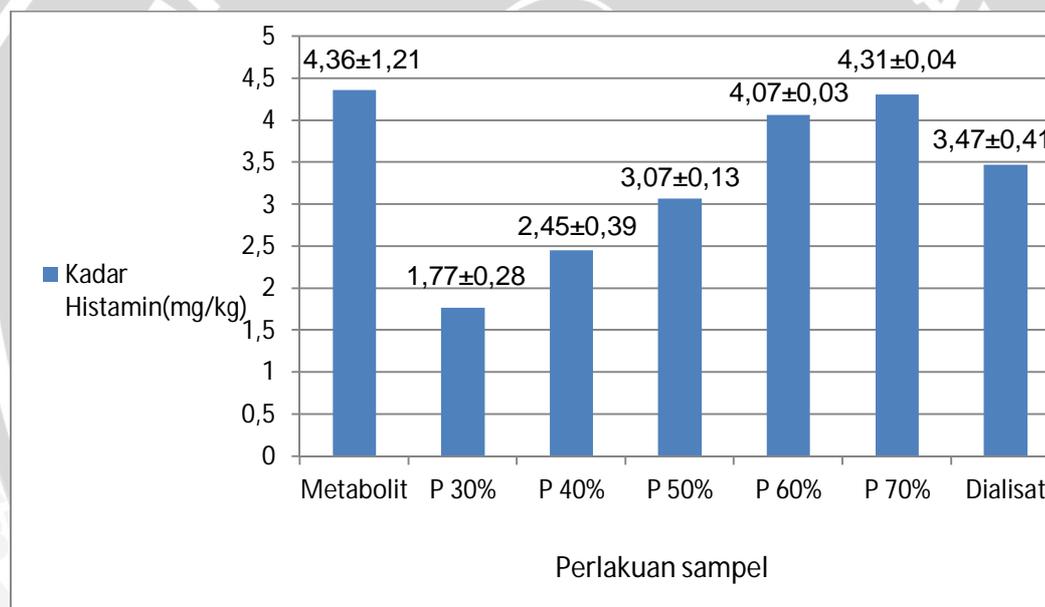
Gambar 13. Dialisis Sampel

Aktivitas dekarboksilase enzim ekstraseluler bakteri *Bacillus sp.* dalam mendegradasi histidin menjadi histamin dari tingkat pemurnian terendah sampai tertinggi dapat diketahui pada hasil pengamatan. Parameter uji yang dilakukan pada penelitian pendahuluan ini adalah pengujian kadar histamin dengan metode spektrofotometri sesuai dengan SNI 01-2354.10-2009 dengan panjang gelombang excitasi: 350 nm dan emisi: 444 nm. Hasil kadar histamin dapat dilihat

pada lampiran 2. Sedangkan perbandingan hasil uji histamin pada penelitian ini adalah pemurnian berbeda yaitu metabolit, presipitat dan dialisat dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Perbandingan hasil kadar histamin metabolit, presipitat dan dialisat

No.	Sampel	Kadar Histamin (mg/kg)			Jumlah	Rerata	
		U1	U2	U3			
1.	Metabolit	5,69	4,12	3,29	13,1	4,36 ± 1,21	
2.	Presipitat	30 %	1,89	1,44	1,98	5,31	1,77 ± 0,28
		40 %	2,85	2,06	2,45	7,36	2,45 ± 0,39
		50 %	3,08	3,20	2,94	9,22	3,07 ± 0,13
		60 %	4,11	4,05	4,07	12,23	4,07 ± 0,03
		70 %	4,37	4,28	4,29	12,94	4,31 ± 0,04
3.	Dialisat	3,86	3,52	3,03	10,41	3,47 ± 0,41	



Gambar 14. Grafik perbandingan hasil kadar histamin metabolit, presipitat dan dialisat

Didapatkan Hasil penelitian pengujian histamin sampel mulai dari sampel metabolit, presipitat dan dialisat dengan metode spektrofotometer terdapat pada Tabel 5, sedangkan grafik perbandingan hasil kadar histamin metabolit, presipitat dan dialisat dapat dilihat pada Gambar 14. Setiap bakteri mempunyai kemampuan yang berbeda dalam menguraikan histidin menjadi histamin. Menurut Bennour *et al.* (1991), produksi histamin tidak selalu berkorelasi dengan

besarnya jumlah bakteri penghasil histamin, tetapi lebih berkaitan dengan kemampuan bakteri tersebut dalam mensintesis histidin dekarboksilase.

Pada Gambar 14 dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan tingkat kemampuan sampel dalam menguraikan histidin murni menjadi histamin. Hal ini dikarenakan dari metabolit ke presipitasi sampai dialisis dilakukan perbedaan perlakuan yaitu metabolit dimurnikan menjadi suatu enzim. Baranowski *et al.* (1985) dalam Rospiati (2006), menjelaskan bahwa histidin dekarboksilase selalu dihasilkan oleh bakteri yang terhenti pertumbuhannya dan masih mampu mengkonversi histidin menjadi histamin. Dengan demikian hal ini dapat mendukung meskipun kondisi tersebut tidak berbanding lurus.. Ukuran kemurnian enzim dinyatakan sebagai aktivitas spesifik yang didefinisikan sebagai enzim per mg protein. Aktivitas dari enzim akan meningkat selama proses pemurnian dan akan mencapai nilai maksimal dan konstan jika enzim tersebut dalam keadaan murni (Lehninger, 1982). Aktivitas spesifik merupakan indikator tingkat kemurnian enzim. Semakin tinggi aktivitas enzim, maka kemurnian enzim tersebut meningkat Hasil uji histamin dapat dilihat pada Lampiran 3.

menurut Sumner *et al.* (2004), apabila telah diproduksi enzim dekarboksilase, maka akan terus menerus dihasilkan histamin meskipun pertumbuhan bakteri telah dihambat dengan suhu dingin 4°C. Produksi histamin akan semakin meningkat meskipun telah disimpan pada ruang pendingin.

4.2. Karakterisasi Metabolit

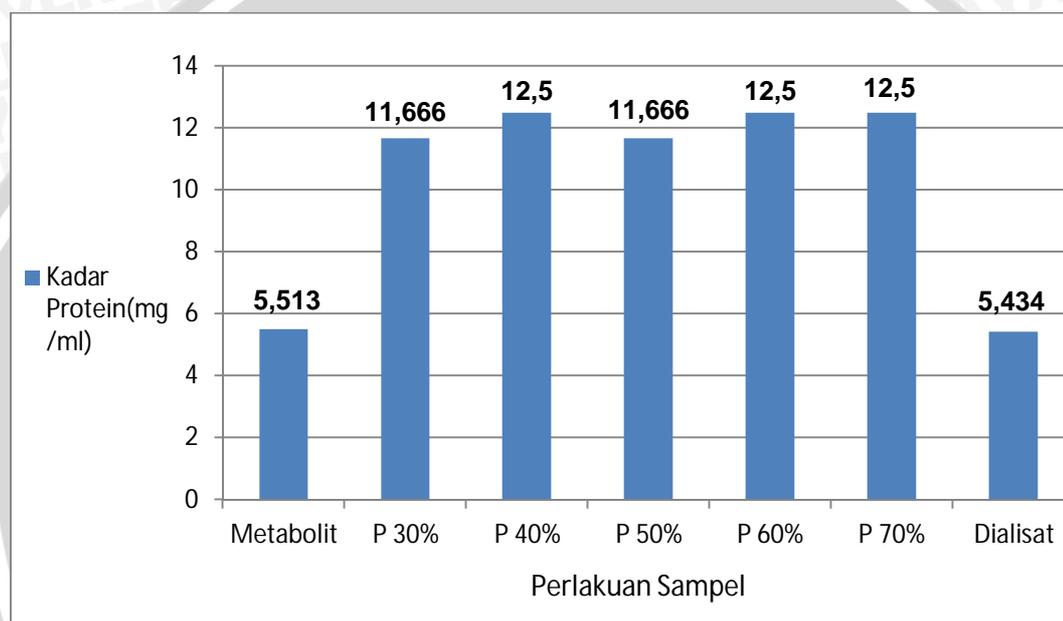
4.2.1. Hasil Pengujian Konsentrasi Protein Metode BSA

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

Hasil konsentrasi protein dari metabolit, presipitat dan dialisat dapat dilihat pada Tabel 6. Pada Tabel 6 dapat dilihat bahwa konsentrasi protein presipitat 70% adalah 12,5 mg/ml, nilai ini lebih tinggi dibanding nilai konsentrasi protein metabolit *Bacillus sp.* yang mempunyai nilai sebesar 5,513 mg/ml. Dan nilai konsentrasi protein dialisat. yang mempunyai nilai sebesar 5,434 mg/ml. hal ini dimungkinkan karena pada presipitat masih banyak terdapat protein-protein tertentu. dilakukan proses pemurnian dengan dialisis sehingga terbebas dari kontaminan. Dialisis digunakan untuk meningkatkan konsentrasi enzim. Schmidt *et al.*, (2007) menyebutkan bahwa kantung 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 *Bacillus sp.* menjadi lebih pekat. Alat yang dipakai untuk mengukur konsentrasi protein adalah spektrofotometer. Perhitungan konsentrasi protein dapat dilihat pada Lampiran 2, sedangkan grafik perbandingan konsentrasi protein metabolit, presipitat dan dialisat dapat dilihat pada Gambar 15.

Tabel 6. Perbandingan konsentrasi protein metabolit, presipitat dan dialisat

Sampel	Konsentrasi Protein (mg/ml)
Metabolit	5,513
Presipitat 30 %	11,666
Presipitat 40 %	12,5
Presipitat 50 %	11,666
Presipitat 60 %	12,5
Presipitat 70 %	12,5
Dialisat	5,434



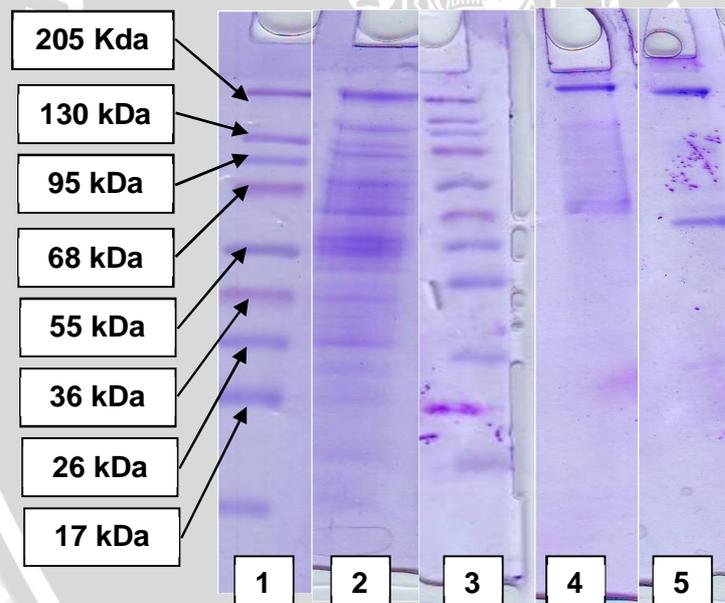
Gambar 15. Grafik perbandingan konsentrasi protein metabolit, presipitat dan dialisat

4.2.2. Hasil Pengujian Berat Molekul Metode SDS-PAGE

Profil pita peptida metabolit, presipitat dan dialisat *Bacillus sp.* dapat dilihat pada Gambar 16. Dapat dilihat pada sampel metabolit terlihat tebal dikarenakan kadar protein pada sampel metabolit masih besar. Selanjutnya pita pada sampel sebelum dialisat dan sesudah dialisat terlihat adanya pemisahan kadar protein pita peptida protein terlihat semakin sedikit. Hal ini dikarenakan terjadi proses hidrolisis pada saat dialisat metabolit *Bacillus sp.* sehingga memecah ikatan protein menjadi peptida dengan berat molekul kecil. Menurut

Poedjiadi dan Supriyanti, 2007 peran protease yaitu sebagai katalis dalam reaksi pemecahan molekul protein dengan cara hidrolisis, pemecahan protein pada tempat tertentu dalam molekul protein dan biasanya tidak mempengaruhi gugus yang terletak diujung molekul protein.

Tingkat kemurnian enzim dapat diketahui dengan menggunakan teknik elektroforesis gel poliakrilamida, SDS-PAGE. Gel disusun oleh akrilamida dan N,N'-metilen - bis - akrilamida yang berpolimerisasi melalui mekanisme radikal bebas dengan bantuan katalisator N,N,N',N'- tetrametilen diamina (TEMED) dan inisiator amonumpersulfat (APS) (Dunn,1989). Prinsip analisis SDS-PAGE yaitu pemisahan protein berdasarkan ukuran molekul.



Gambar 16. Profil pita peptida, 1. Marker, 2. Metabolit ekstraseluler, 3. Marker , 4. Sebelum dialisis , 5. Sesudah dialisis

Mathews and Holde (1990) menyebutkan protease memiliki variasi pemilihan substrat yang lebih luas atau berbeda dalam hal aktivitasnya terhadap ikatan-ikatan peptida protein. Protease selama dialisis memecah ikatan-ikatan yang ada pada protein menjadi tidak kompak dan berat molekulnya menjadi

rendah sehingga mudah larut dalam air. Hasil perhitungan SDS-PAGE dapat dilihat pada Lampiran 3.

Pada Tabel 7 dapat dilihat berat molekul pita peptida metabolit *Bacillus sp.*, presipitat 70% dan dialisat memperlihatkan bahwa beberapa berat molekul pita peptida metabolit *Bacillus sp.* muncul tetapi setelah dilakukan presipitasi dan dialisis berat molekul pita peptida tersebut menjadi berkurang. Hal ini dimungkinkan karena berubahnya struktur molekul asam amino akibat perlakuan pada presipitasi dan dialisis. Pita-pita protein yang hilang kemungkinan berubah menjadi polipeptida yang lebih pendek (Riyanto, 2006).

Tebalnya pita protein pada sampel metabolit menunjukkan tingginya kemampuan dialisat tersebut dalam mendegradasi histidin menjadi histamin. Semakin tebal pita peptida maka semakin tinggi sampel tersebut dalam mengurai histidin murni menjadi histamin. Dari hasil pada Gambar 16 dan Tabel 7 dapat diketahui bahwa semakin banyak asam amino pada sampel maka semakin besar kemampuan sampel dalam mengurai histidin murni menjadi histamin lebih besar. Menurut Baranowski *et al.* (1985) dalam Rospiati (2006), menjelaskan meskipun dalam sampel tidak didapatkan mikroba yang tumbuh akan tetapi enzim yang telah dihasilkan sebelum mikroba tersebut mati akan terus beraktifitas. Hal ini yang menyebabkan pada sampel metabolit lebih banyak terdapat asam amino dibandingkan dengan sampel presipitat dan dialisat.

Terlihat bahwa metabolit yang diperoleh cenderung meningkat dengan meningkatnya konsentrasi amonium sulfat yang ditambahkan ke dalam media. Pada media metabolit dengan menambahkan amonium sulfat terjadi peningkatan jumlah enzim-enzim glutamat dehidrogenase, glutamat sintetase, glutamat polymerase dan γ - glutamil transpeptidase yang sangat berperan dalam biosintesis Metabolit (Goto & Kunioka, 1992). Presipitasi paling tinggi diperoleh pada media amonium sulfat 70%. Hasil pengamatan elektroforesis menunjukan

bahwa pita Protein berada di atas marker miosin (205 kDa) dan mendekati hasil yang diperoleh Ito *et al.* (1996), yang diperkirakan mempunyai berat molekul sekitar 275 kDa (Gambar 16). enzim yang dihasilkan masih belum murni, hal ini dapat terlihat dari adanya pita-pita protein dengan berat molekul 130 kDa sampai 17 kDa. Diduga pita-pita protein tersebut merupakan enzim-enzim yang berperan dalam pembentukan enzim yang turut terdeteksi pada pewarnaan SDS-PAGE. Salah satu enzim yang terdeteksi adalah enzim hidrolase yang mempunyai berat molekul 68 kDa. Enzim ini dapat mendegradasi enzim menjadi asam L-glutamat pada waktu pertumbuhan sel (Tanaka *et al.*, 1993).

Tabel 7. Berat molekul (kDa) pita peptida metabolit ekstraseluler *Bacillus sp.*, presipitat 70% dan dialisat

No.	Metabolit Ekstraseluler	Presipitat	Dialisat
1	135,0629	-	-
2	-	129,9266	122,1831
3	103,2728	-	-
4	91,66129	-	-
5	86,35469	87,9673	-
6	-	71,11054	-
7	68,02771	-	66,8478
8	-	61,70814	-
9	56,88343	-	55,7840
10	-	-	49,4453
11	42,21683	40,3244	-
12	39,77275	-	-
13	-	-	38,84681
14	37,47016	37,56402	-
15	27,809	-	-
Jumlah	10 asam amino	6 asam amino	5 asam amino

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

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

Hasil rerata pendegradasian histidin menjadi histamin oleh ekstrak kasar enzim ekstraseluler bakteri *Bacillus sp.* sebesar 4,36 mg/kg. Presipitasi 30% sebesar 1,77 mg/kg, presipitasi 40% sebesar 2,45 mg/kg, presipitasi 50% sebesar 9,22 mg/kg, presipitasi 60% sebesar 12,23 mg/kg, presipitasi 70% sebesar 12,94 mg/kg. Dan untuk dialisat mempunyai nilai rerata kadar histamin sebesar 3.47 mg/kg. semakin murni sampel metabolit maka semakin tinggi sampel dalam menguraikan zat histidin menjadi histamin.

Kemudian untuk hasil uji konsentrasi protein pada masing-masing tingkat pemurnian yaitu yang pertama adalah metabolit sebesar 5,513 mg/ml, untuk presipitasi 70% sebesar 12,5 mg/ml dan untuk dialisat sebesar 5,434 mg/ml.

5.2 Saran

Perlu adanya penelitian lanjutan mengenai karakteristik yang lebih spesifik lagi pada enzim ekstraseluler bakteri *Bacillus sp.* Serta perlu dilakukan teknik pemurnian enzim yang lebih murni misalnya memakai filtrasi gel atau kromatografi lainnya sehingga karakter dari enzim bisa terlihat lebih spesifik sehingga peneliti lebih jelas.

DAFTAR PUSTAKA

- Adel, S. 2001. *Mangrove*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta
- 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., Asehrou., 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. 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*. Corresponding author: dave green@ncsu.eduAmirin (2009)
- Amirin, T.M. 2009. **Penelitian Eksploratori (Eksploratif)**. www.tatangmanguny.wordpress.com. diakses tanggal 25 Juli 2011.
- Anam, C, Sirojudin, dan K. S. Firdausi. 2007. *Analisis Gugus Fungsi pada Sampel Uii, Bensin dan Spiritus Menggunakan Metode Spektroskopi FTIR*. Jurusan Fisika fakultas MIPA Universitas Diponegoro. Semarang.
- Angky, A. 2011. *Karakterisasi Aktivitas Dialisat Enzim Protease Fibrinolitik Dari Cacing Tanah (*Eisenia foetida*) Galur Lokal*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Aulanni. 2004. *Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul*. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press. Malang..
- Bennour, M., Marrakchi, A. E., Bouchriti, N., Hamama, A. and Quadaa, M. E. 1991. *Chemical and Microbiology Assessment of Mackerel (*Scomber scombrusti*) Stored in Ice*. J Food prot. 54:789-792.
- Bradford, M. 1976. *A Rapid and Sensitive Method For The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-dye Binding*. Journal Biochem. 72: 248-254.
- Davidson .V. L., and D. B. Sittman., 1999. **Biochemistry**. Lipincott Williams and Wilkins. Maryland
- Day, R. A. dan A. L. Underwood. 1989. *Quantitative Analysis, 4th ed*. Prentice Hall, Inc. New Jersey.
- 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*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Dharma, B. 2005. *Mikrobiologi Industri*. Jakarta.
- Effendi. 2007. *Pengantar mikrobiologi Laut*. Fakultas perikanan dan Ilmu Lyla, P. S., dan Ajmal. K. S. 2006. *Marine Microbial Diversity and Ecology: Importance and Future Perspectives*. Current Science. 90: 1325 - 1335. Kelautan Universitas Riau, Pekanbaru.
- Farrell, SO dan Ranallo, RT. 2000. *Experiments in Biochemistry: A Hands-on Approach*. California: Thomson Learning.
- Feliatra. 2001. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Heterotrof yang Terdapat pada Daun Mangrove (Avicennia spp. dan Sonneratia spp.) dari Kawasan Stasiun Kelautan Dumai*. Jurnal Natur Indonesia. 2: 104 - 112.
- Google. 2011. **Gambar SDS-PAGE ELEKTROFORESIS**. <http://google.co.id>. Diakses pada Tanggal 10 Desember 2011.
- 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.
- Harris, ELV dan Angel, S. 1989. *Protein Purification Methods a Practical Approach*. Oxford Univ. Pr., UK.
- Holme D. J., dan Peck. H. 1993. *Analytical Biochemistry*. Second Edition. Willey and Sons, Inc. New York. Hal. 47-53.
- Holt JC, Bergey DH (1994). **Bergey's manual of determinative bacteriology (edisi ke-9th ed.)**. Baltimore: Williams & Wilkins. ISBN 0-683-00603-7
- Jenie, B.S.L dan Rahayu, W.P.R. 1993. *Penanganan Limbah Industri Pangan*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Kathiresan, K., dan B. L. Bingham. 2001. *Biology of Mangrove and Mangrove Ecosystems*. Centre of advanced Study in Marine Biology, Annamalai University. Huxley College of Environmental Studies, Western Washington University. Annamalai, India.
- Keer, M. Lawicki, P. Aguirre, S. and Rayner, C. 2002. *Effect of Storage Conditions on Histamine Formation in Fresh and Canned Tuna*. State Chemitry Laboratory, Werbee. Victorian Government Departement of Human Service. [www. Fodsafety.vic.gov.au](http://www.Fodsafety.vic.gov.au)
- Khotim, H. 2012. *Karakteristik Dialisat Ekstraseluler Khamir Laut Berberat Molekul >10 kDa yang Didialisis Pada pH 8 dan Aplikasinya Dalam Pembuatan Hidrolisat Protein Ikan Peperek (Leiognathus sp.)*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Kunaepah, U. 2008. *Pengaruh Lama Fermentasi Dan Konsentrasi Glukosa Terhadap Aktivitas Antibakteri, Polifenol Total Dan Mutu Kimia Kefir Susu Kacang Merah*. Program Pascasarjana Universitas Diponegoro. Semarang

- Lehninger , A. 1993. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jilid I. Thenawidjaja M. penerjemah: Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari: Principles of Biochemistry.
- Lehninger. 1995. **Dasar-Dasar Biokimia**. Jilid 1. Alih bahasa : Moggy Thenawidjaja. Erlangga. Jakarta.
- Lehninger, A. L. 1997. **Dasar-Dasar Biokimia**. Jilid 2. Alih Bahasa Thenawidjaya. Erlangga. Jakarta.
- Mathews, C.K dan Van Holde, K.E. 1990. *Biochemistry*. Benjamin Cummings Pubkishing Company Inc. USA.
- Nurhasanah dan Dian, H. 2008. *Pemurnian Enzim Lipase Dari Bakteri Lokal dan Aplikasinya Dalam Reaksi Esterifikasi*. Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II. ISBN: 978-979-1165-74-7.
- Nursanti dan Madjid, A. 2009. Dasar-dasar Ilmu Tanah. http://dasar2ilmutanah.blogspot.com/2009_05_24_archive.html. Diakses pada Tanggal 22 Oktober 2010
- Nybakken, J. W. 1993. *Biologi Laut Suatu Pendekatan Ekologis*. Diterjemahkan oleh Eidman, Koesoebiono, D. G. Bengen, M. Hutomo dan S. Sukarjo. Gramedia. Jakarta. 459 Hlm.
- Odum. E. P. 1996. *Dasar-dasar Ekologi*. Edisi ketiga. Terjemahan Tjahjono Samingan. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta: 697 Hlm.
- Perkin; Elmer. 1981. **Operator's Manual Luminescence Spectrometer LS-5**. Beaconsfield, Bucking-hamshire. England.
- Poedjadi dan Supriyanti. 2007. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta. Hal 37-45.
- Rachmadani, D. 2007. *Pemurnian Enzim Kitonase Termotabil Dari Isolat Bacillus licheniformis MB-2 Asal Tompaso Manado Sulawesi Utara*. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Rizki, S.Si. 2010. **Biologi-UNP**, Plant Biotechnology-Brawijaya University. Malang.
- 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.
- Schimidt, S., Richard I., Harshi K., Bernard J., Carrol, Peer M., Schenk. 2007. *Plant s can use Protein as a Nitrogen Source Without Assistance from Other Organisms*. PNAS March 18, 2008 Vol. 105 No. 11 4524-4529.
- Scopes, RK. 1987. *Protein Purification Principles and Practice*. Ed Ke-2. New York: Springer-Verlag
- Scopes, RK. 1989. *Protein Purification*. USA: R. R. Donnelley and Sons.

- Shome, R. Shome, B. R., Mandal, A. B., dan Bandopadhyaya, A. K.1995. *Bacterial Flora in Mangrove of Andaman*. Indian Journal of Marine Science. 24: 97 – 98
- Sijabat, L. 2009. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Sponge Haliclona sp terhadap Aktivitas Proliferasi Sel dengan Metode Hitung AgNOR pada Sel Adenocarcinoma Mammae Mencit C3H*. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang.
- Singarimbun, M. dan Effendi, S. 1989. *Metode Penelitian Survei*. Edisi Revisi. LP3ES. Jakarta.
- 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).
- Smith, J.C., 1993. *Prinsip Bioteknologi*. Alih bahasa : A Dharma, PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. Hal 66, 130-138
- Sorensen, H., S, Sorensen, C. Bjerregaard, and S, Michelson. 1999. *Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge
- Suhartono, 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Departemen Pendidikan Dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor. Bogor 147-150
- Suhartono, MT. 1992. *Protease*. Bogor: IPB. PAU Bioteknologi.
- Sumner J, Ross T, Ababouch L. 2004. *Application of Risk Assessment in the Fish Industry*. Roma: FAO
- Wanenoer. 2010. **Penentuan Kadar Vitamin E Metode Fluorometri**. <http://id.shvoong.com>. Diakses pada Tanggal 22 Desember 2010.
- Utami, E.S.W., Issirep S., Taryono, Endang S. 2007. **Sintesis Protein Selama Embriogenesis Somatik Anggrek Bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.)**. Biodiversitas ISSN: 1412-033X Volume 8, Nomor 3 Juli 2007 Halaman: 188 191. Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta. Surakarta.
- Wibowo, M.A. 2006. *Biosintesis Senyawa Obat*. Fakultas Farmasi, Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Wiseman, A. 1989. *Handbook of Enzymes Biotechnology. 2nd. Edition*. Ellis Howard, New York. Hal. 17-25.
- Zipcodezoo. 2011. *Klasifikasi Bakteri Bacillus sp*. [http://zipcodezoo.com/Bacteria/N/Bacillus sp](http://zipcodezoo.com/Bacteria/N/Bacillus%20sp). Diakses pada tanggal 08 mei 2011.

LAMPIRAN

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

JAM KE	X1	X2	RATA2	Σ Sel / ml	Log Σ Sel / ml
1	385	396	390,5	$3,9 \cdot 10^6$	6,591
2	469	482	475,5	$4,8 \cdot 10^6$	6,681
3	599	616	607,5	$6,1 \cdot 10^6$	6,785
4	798	899	848,5	$8,5 \cdot 10^6$	6,929
5	1040	1037	1038,5	$1,0 \cdot 10^7$	7
6	2640	2850	2745	$2,7 \cdot 10^7$	7,431
7	4270	4690	4480	$4,5 \cdot 10^7$	7,653
8	4480	4740	4610	$4,6 \cdot 10^7$	7,662
9	6240	5030	5635	$5,6 \cdot 10^7$	7,748
10	8350	8880	8615	$8,6 \cdot 10^7$	7,934
11	9580	9940	9760	$9,8 \cdot 10^7$	7,991
12	9760	8920	9340	$9,3 \cdot 10^7$	7,968
13	10740	11770	11255	$1,1 \cdot 10^8$	8,041
14	14830	14580	14705	$1,4 \cdot 10^8$	8,146
15	15400	15390	15395	$1,5 \cdot 10^8$	8,176
16	30320	30970	30645	$3,1 \cdot 10^8$	8,491
17	31250	31260	31255	$3,1 \cdot 10^8$	8,491
18	30210	30940	30575	$3,1 \cdot 10^8$	8,491
19	27430	28150	27790	$2,8 \cdot 10^8$	8,447
20	25270	25310	25290	$2,5 \cdot 10^8$	8,397
21	19120	20170	19645	$2,0 \cdot 10^8$	8,301
22	18050	17100	17575	$1,8 \cdot 10^8$	8,255
23	15818	15650	15734	$1,6 \cdot 10^8$	8,204
24	9650	8720	9185	$9,2 \cdot 10^7$	7,963

Lampiran 2. Hasil Uji Histamin Presipitat

PEMEPINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS PERIKANAN DAN KELAUTAN

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

REPORT OF TESTING

Serial No : / 02 / RU / 2012

Date of Received : April 04 , 2012
Date of Test : April 04 , 2012
Quantity / Condition of samples : 57 samples
Company : Universitas Brawijaya

TEST RESULT

No	Code	Parameter	Result	Reference	Method
1	PC 1 CRUIDE Histidine+Metabolit 1	Histamin	4.66 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
2	PC 2 CRUIDE Histidine+Metabolit 2	Histamin	4.65 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
3	PC 3 CRUIDE Histidine+Metabolit 3	Histamin	3.86 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
4	PC 1 DIA Histidine+Enzim 1	Histamin	22.82 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
5	PC 2 DIA Histidine+Enzim 2	Histamin	18.73 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
6	PC 3 DIA Histidine+Enzim 3	Histamin	19.57 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
7	NC 1 CRUIDE Histidine+Metabolit 1	Histamin	2.71 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
8	NC 2 CRUIDE Histidine+Metabolit 2	Histamin	2.66 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
9	NC 3 CRUIDE Histidine+Metabolit 3	Histamin	2.96 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
10	NC 1 DIA Histidine+Enzim 1	Histamin	23.97 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
11	NC 2 DIA Histidine+Enzim 2	Histamin	24.25 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
12	NC 3 DIA Histidine+Enzim 3	Histamin	22.62 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
13	BC 1 30% Histidine+Enzim 1 30%	Histamin	1.89 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
14	BC 2 30% Histidine+Enzim 2 30%	Histamin	1.44 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
15	BC 3 30% Histidine+Enzim 3 30%	Histamin	1.98 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
16	BC 1 40% Histidine+Enzim 1 40%	Histamin	2.85 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009

40	AC 1 80% Histidine+Enzim 1 80%	Histamin	0.53 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
41	AC 2 80% Histidine+Enzim 2 80%	Histamin	0.32 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
42	AC 3 80% Histidine+Enzim 3 80%	Histamin	0.74 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
43	EN 1 40% Histidine+Enzim 1 40%	Histamin	0.35 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
44	EN 2 40% Histidine+Enzim 2 40%	Histamin	0.51 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
45	EN 3 40% Histidine+Enzim 3 40%	Histamin	0.92 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
46	EN 1 50% Histidine+Enzim 1 50%	Histamin	5.85 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
47	EN 2 50% Histidine+Enzim 2 50%	Histamin	4.82 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
48	EN 3 50% Histidine+Enzim 3 50%	Histamin	8.26 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
49	EN 1 60% Histidine+Enzim 1 60%	Histamin	3.03 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
50	EN 2 60% Histidine+Enzim 2 60%	Histamin	4.23 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
51	EN 3 60% Histidine+Enzim 3 60%	Histamin	2.89 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
52	EN 1 70% Histidine+Enzim 1 70%	Histamin	1.33 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
53	EN 2 70% Histidine+Enzim 2 70%	Histamin	1.09 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
54	EN 3 70% Histidine+Enzim 3 70%	Histamin	2.42 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
55	EN 1 80% Histidine+Enzim 1 80%	Histamin	0.57 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
56	EN 1 80% Histidine+Enzim 1 80%	Histamin	0.80 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
57	EN 1 80% Histidine+Enzim 1 80%	Histamin	0.31 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009

Place and Date of issued , Surabaya / 11 / 12, 2012

KEPALA LABORATORIUM PENGENDALIAN DAN
 PENGUJIAN MUTU HASIL PERIKAMAN
 Kepala Seksi Pengujian

DIKAS PERIKAMAN
 DAN KELAUTAN
 UPT. LABORATORIUM
 PENGENDALIAN DAN
 PENGUJIAN MUTU HASIL
 PERIKAMAN

Tanjung Herlambang S.PI MMA
 Penata Tk I
 NIP. 19640115 198603 1 017



No	Kode	Parameter	Result	Reference	Method
17	BC 2 40% Histidine+Enzim 2 40%	Histamin	2.06 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
18	BC 3 40% Histidine+Enzim 3 40%	Histamin	2.45 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
19	BC 1 50% Histidine+Enzim 1 50%	Histamin	3.08 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
20	BC 2 50% Histidine+Enzim 2 50%	Histamin	3.20 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
21	BC 3 50% Histidine+Enzim 3 50%	Histamin	2.94 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
22	BC 1 60% Histidine+Enzim 1 60%	Histamin	4.11 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
23	BC 2 60% Histidine+Enzim 2 60%	Histamin	4.05 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
24	BC 3 60% Histidine+Enzim 3 60%	Histamin	4.07 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
25	BC 1 70% Histidine+Enzim 1 70%	Histamin	4.37 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
26	BC 2 70% Histidine+Enzim 2 70%	Histamin	4.28 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
27	BC 3 70% Histidine+Enzim 3 70%	Histamin	4.29 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
28	AC 1 40% Histidine+Enzim 1 40%	Histamin	0.08 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
29	AC 2 40% Histidine+Enzim 2 40%	Histamin	0.08 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
30	AC 3 40% Histidine+Enzim 3 40%	Histamin	0.06 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
31	AC 1 50% Histidine+Enzim 1 50%	Histamin	0.84 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
32	AC 2 50% Histidine+Enzim 2 50%	Histamin	0.87 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
33	AC 3 50% Histidine+Enzim 3 50%	Histamin	0.82 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
34	AC 1 60% Histidine+Enzim 1 60%	Histamin	1.58 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
35	AC 2 60% Histidine+Enzim 2 60%	Histamin	1.93 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
36	AC 3 60% Histidine+Enzim 3 60%	Histamin	1.38 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
37	AC 1 70% Histidine+Enzim 1 70%	Histamin	0.54 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
38	AC 2 70% Histidine+Enzim 2 70%	Histamin	0.57 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009
39	AC 3 70% Histidine+Enzim 3 70%	Histamin	0.31 mg/kg	MRL = 100 mg/kg	SNI 01-2354.10-2009

Crude Metabolit Dan Dialisat

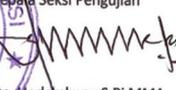
PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS PERIKANAN DAN KELAUTAN
 LABORATORIUM PENGENDALIAN DAN PENGUJIAN MUTU HASIL PERIKANAN
 PROVINCIAL LABORATORY FOR FISH INSPECTION AND QUALITY CONTROL IN SURABAYA, EAST JAVA INDONESIA
 JL. PAGESANGAN II No, 58 B Tlp. (031) 8274692, 8274693, 8274694, Fax No (031) 8280115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

Laporan Hasil Uji
 Serial No : 01/06/RU/2012

Tanggal terima : 30 Mei 2012
 Tanggal analisa : 30 Mei 2012
 Jumlah/ kondisi contoh : 18 Contoh
 Istansi : Universitas Brawijaya Malang

No.	Kode	Parameter	Hasil (mg/kg)	Metode	Kesimpulan
1	AC 1 CRUDE	Histamin	9.84	SNI 01-2354.4-2006	SN 2354.10 : 2009
2	AC 2 CRUDE	Histamin	8.72	SNI 01-2354.4-2006	
3	AC 3 CRUDE	Histamin	8.90	SNI 01-2354.4-2006	
4	AC 1 DIA	Histamin	3.69	SNI 01-2354.4-2006	
5	AC 2 DIA	Histamin	3.99	SNI 01-2354.4-2006	
6	AC 3 DIA	Histamin	4.13	SNI 01-2354.4-2006	
7	BC 1 CRUDE	Histamin	5.69	SNI 01-2354.4-2006	
8	BC 2 CRUDE	Histamin	4.12	SNI 01-2354.4-2006	
9	BC 3 CRUDE	Histamin	3.29	SNI 01-2354.4-2006	
10	BC 1 DIA	Histamin	3.86	SNI 01-2354.4-2006	
11	BC 2 DIA	Histamin	3.52	SNI 01-2354.4-2006	
12	BC 3 DIA	Histamin	3.03	SNI 01-2354.4-2006	
13	EN 1 CRUDE	Histamin	3.52	SNI 01-2354.4-2006	
14	EN 2 CRUDE	Histamin	3.88	SNI 01-2354.4-2006	
15	EN 3 CRUDE	Histamin	3.84	SNI 01-2354.4-2006	
16	EN 1 DIA	Histamin	4.04	SNI 01-2354.4-2006	
17	EN 2 DIA	Histamin	3.94	SNI 01-2354.4-2006	
18	EN 3 DIA	Histamin	3.70	SNI 01-2354.4-2006	

Catatan :

Surabaya, 18 Juni 2012
 M. H. KEPALA LABORATORIUM PENGENDALIAN DAN
 PENGUJIAN MUTU HASIL PERIKANAN
 Kepala Seksi Pengujian

 Tanoto Herliambang S.Pi MMA
 Penata Tk I
 NIP. 19640115 198603 1 017

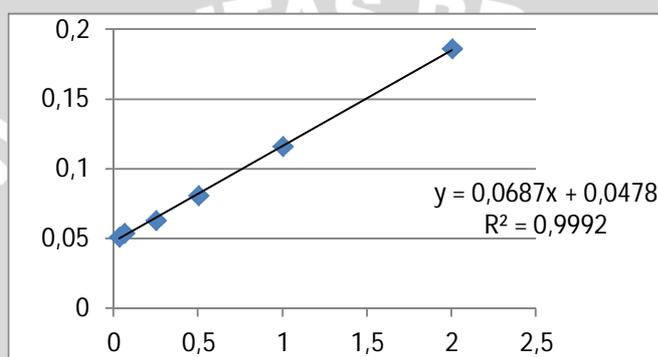


Lampiran 3. Hasil Uji Konsentrasi Protein

Standard BSA (Bovin Serum Albumin) Metabolit

Konsentrasi (mg/ml)	Absorbansi
0,03125	0,051
0,0625	0,054
0,25	0,063
0,5	0,081
1	0,116
2	0,186

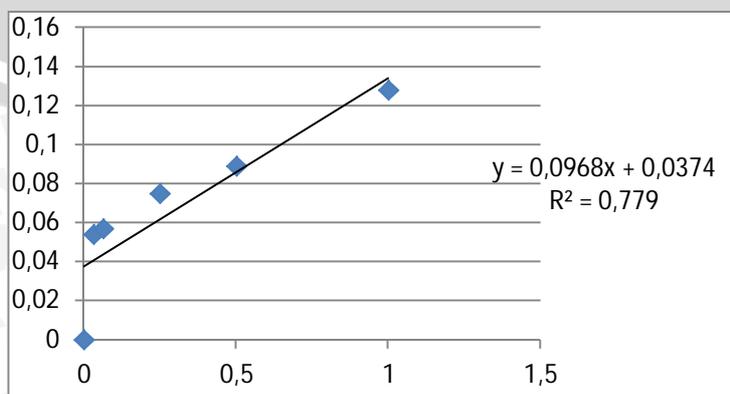
Kurva Standard Protein Metabolit



Standard BSA (Bovin Serum Albumin) Presipitat

Konsentrasi	Absorbansi
0	0
0,03125	0,054
0,0625	0,057
0,25	0,075
0,5	0,089
1	0,128

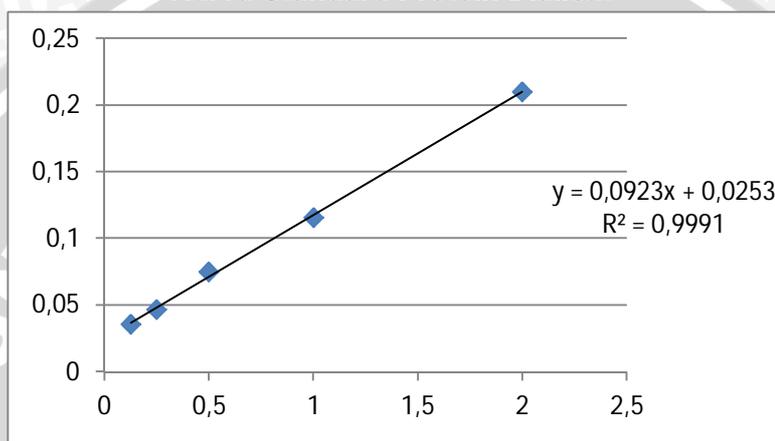
Kurva Standard Protein Presipitat



Standard BSA (Bovin Serum Albumin) Dialisat

Konsentrasi	Absorbansi
0,125	0,036
0,25	0,047
0,5	0,075
1	0,116
2	0,21

Kurva Standard Protein Dialisat



Hasil Absorbansi Spektrofotometri dan Konsentrasi Protein

NO	Sampel	Absorban	Konsentrasi Protein Sampel (mg/ml)
1	Metabolit	0,056	5,513
2	Presipitat 30 %	0,051	11,666
3	Presipitat 40 %	0,052	12,5
4	Presipitat 50 %	0,051	11,666
5	Presipitat 60 %	0,052	12,5
6	Presipitat 70 %	0,052	12,5
7	Dialisat	0,028	5,434

Lampiran 4. Elektroforesis SDS-PAGE

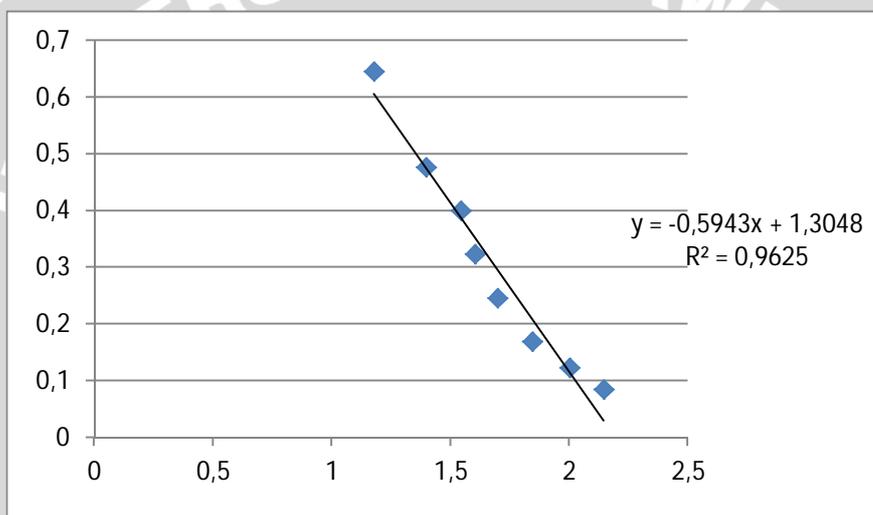


Lampiran 5. Hasil Elektroforesis SDS-PAGE

Standard SDS-PAGE Metabolit

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
140	5,5	2,146128036	0,084615
100	8	2	0,123077
70	11	1,8409804	0,169231
50	16	1,698970004	0,246154
40	21	1,602059991	0,323077
35	26	1,544068044	0,4
25	31	1,397940009	0,476923
15	42	1,176091259	0,646154

Kurva Standard SDS-PAGE Metabolit



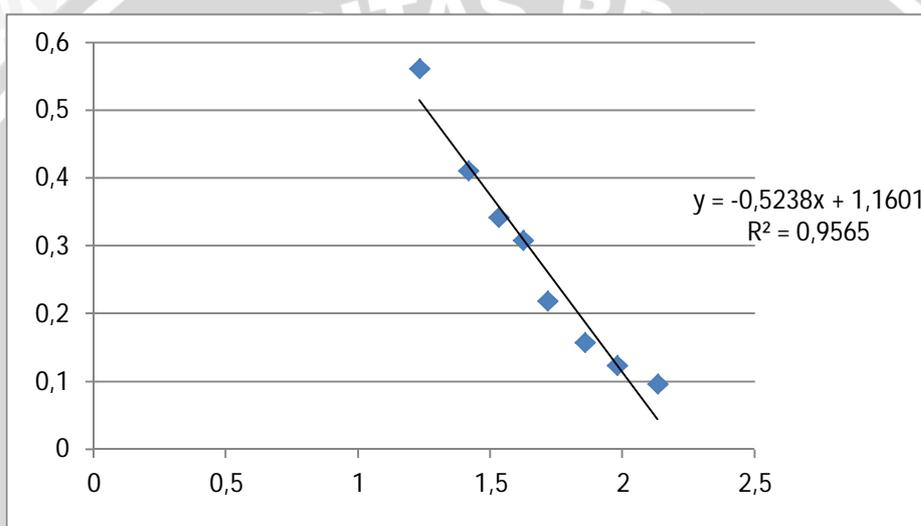
Berat Molekul (kDa) Metabolit Kasar

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
135,0629	2,5	2,130536131	0,038462
103,2728	7	2,013986014	0,107692
91,66129	9	1,962185962	0,138462
86,35469	10	1,936285936	0,153846
68,02771	14	1,832685833	0,215385
56,88343	17	1,754985755	0,261538
42,21683	22	1,625485625	0,338462
39,77275	23	1,5995856	0,353846
37,47016	24	1,573685574	0,369231
27,809	29	1,444185444	0,446154

Standard SDS-PAGE Sebelum dan Sesudah Dialisis

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
135	7	2,130333768	0,09589
95	9	1,977723605	0,123288
72	11,5	1,857332496	0,157534
52	16	1,716003344	0,219178
42	22,5	1,62324929	0,308219
34	25	1,531478917	0,342466
26	30	1,414973348	0,410959
17	41	1,230448921	0,561644

kurva Standard SDS-PAGE Sebelum dan Sesudah Dialisis



Berat Molekul (kDa) Sebelum dan Sesudah Dialisis

BM(kDa)	Jarak Tracking	Log BM	Rf
122,1831	5	2,087011184	0,068493
66,8478	15	1,82508709	0,205479
55,78403	18	1,746509861	0,246575
49,4453	20	1,694125043	0,273973
38,84681	24	1,589355405	0,328767